

乳粉中抗坏血酸的含量测定

高效液相色谱法

参考标准: GB 5009.86-2016 (第一法)

一、摘要

本文使用 Wooking K2025 高效液相色谱仪测定乳粉中抗坏血酸的含量。色谱条件: C_{18} 色谱柱 (4.6×250mm, 5 μ m), 流速为 0.7mL/min, 柱温为 25°C, 进样量为 20 μ L, 检测器为紫外-可见光检测器, 检测波长为 245nm。实验结果: L (+) -抗坏血酸的理论塔板数为 10816, D (-) -抗坏血酸的理论塔板数为 11070, L (+) -抗坏血酸和 D (-) -抗坏血酸的分离度为 1.83; 重复性测试中, 抗坏血酸混合标准溶液连续进样 7 针, L (+) -抗坏血酸保留时间的 RSD 为 0.203%, 峰面积的 RSD 为 0.501%; D (-) -抗坏血酸保留时间的 RSD 为 0.222%, 峰面积的 RSD 为 0.300%; L (+) -抗坏血酸的仪器检出限为 0.015 μ g/mL, 仪器定量限为 0.049 μ g/mL; D (-) -抗坏血酸的仪器检出限为 0.017 μ g/mL, 仪器定量限为 0.056 μ g/mL; L (+) -抗坏血酸和 D (-) -抗坏血酸在测定浓度范围内均呈现良好的线性关系, 确定系数 R^2 均在 0.999 以上; 对乳粉试样进行测定, L(+)-抗坏血酸的含量为 61mg/100g, D (-) -抗坏血酸未检出, L (+) -抗坏血酸总量为 59mg/100g, 抗坏血酸的加标回收率范围为 75.2%~81.2%。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《GB 5009.86-2016 食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定 (第一法)》乳粉中抗坏血酸含量测定的需求。

二、背景

抗坏血酸可分为 L (+) -抗坏血酸和 D (-) -抗坏血酸。L (+) -抗坏血酸, 又称为维生

素 C, 是一种天然存在的具有抗氧化性质的有机化合物, 也是一种维持人体正常活动不可缺少的营养物质。D (-) -抗坏血酸常作为抗氧化剂、防腐剂、发色助剂用于食品工业, 但摄入过多也会使白细胞的抗病能力明显下降, 会引起尿酸结石、腹泻、多尿及皮疹等。因此, 分离并同时测定乳粉中 L (+) -抗坏血酸和 D (-) -抗坏血酸具有重要意义。

三、实验过程

1 范围

适用于乳粉中抗坏血酸的含量测定。

2 原理

试样中的抗坏血酸用偏磷酸溶解、超声提取后, 以磷酸盐为流动相, 经反相色谱柱分离, 其中 L (+) -抗坏血酸和 D (-) -抗坏血酸直接用配有紫外检测器的液相色谱仪 (波长 245nm) 测定; 试样中的 L (+) -脱氢抗坏血酸经 L-半胱氨酸溶液进行还原后, 用紫外检测器 (波长 245nm) 测定 L (+) -抗坏血酸总量, 或减去原样品中测得的 L (+) -抗坏血酸含量而获得 L (+) -脱氢抗坏血酸的含量。以色谱峰的保留时间定性, 外标法定量。

3 试剂与材料

3.1 水: 符合 GB/T 6682 的一级水;

3.2 偏磷酸 (HPO_3)_n: 含量 (以 HPO_3 计) $\geq 38\%$;

3.3 偏磷酸溶液 (200g/L): 称取 200g (精确至 0.1g) 偏磷酸 (3.2), 溶于水并稀释至 1L;

- 3.4 偏磷酸溶液 (20g/L) : 量取 50mL 200g/L 偏磷酸溶液 (3.3) , 用水稀释至 500mL;
- 3.5 磷酸三钠 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ;
- 3.6 偏磷酸三钠溶液 (100g/L) : 称取 100g (精确至 0.1g) 磷酸三钠 (3.5) , 溶于水并稀释至 1L;
- 3.7 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) : 分析纯;
- 3.8 磷酸 (H_3PO_4) : 色谱纯;
- 3.9 L-半胱氨酸 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) : 分析纯;
- 3.10 L-半胱氨酸溶液 (40g/L) : 称取 4g L-半胱氨酸 (3.9) , 溶于水并稀释至 100mL;
- 3.11 甲醇 (CH_3OH) : 色谱纯;
- 3.12 L (+) -抗坏血酸标准品 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) , 纯度 $\geq 99\%$;
- 3.13 D (-) -抗坏血酸 (异抗坏血酸) 标准品 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) , 纯度 $\geq 99\%$;
- 3.14 L (+) -抗坏血酸标准储备液 (1.000 mg/mL) : 准确称取适量 L (+) -抗坏血酸标准品 (3.12) , 用 20g/L 的偏磷酸溶液 (3.4) 稀释配制成浓度为 1.000 mg/mL 的 L (+) -抗坏血酸标准储备液;
- 3.15 D (-) -抗坏血酸标准储备液 (1.000 mg/mL) : 准确称取适量 D (-) -抗坏血酸标准品 (3.13) , 用 20g/L 的偏磷酸溶液 (3.4) 稀释配制成浓度为 1.000 mg/mL 的 D (-) -抗坏血酸标准储备液;
- 3.16 抗坏血酸混合标准系列工作液: 分别移取一定量的 L (+) -抗坏血酸标准储备液 (3.14) 和 D (-) -抗坏血酸标准储备液 (3.15) , 用 20g/L 的偏磷酸溶液 (3.4) 稀释配制成浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准系列工作液;

3.17 流动相: A: 6.8g 磷酸二氢钾 (3.7) , 用水溶解并定容至 1L, 用磷酸 (3.8) 调 pH 至 2.5~2.8; B: 100% 甲醇。按 A:B=98:2 混合, 过 0.45 μ m 滤膜, 超声脱气。

4 仪器与设备

4.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

4.2 分析天平: 精确到 0.0001g;

4.3 超声波清洗机;

4.4 pH 计: 精度为 0.01;

4.5 离心机: 转速 \geq 4000r/min;

4.6 真空抽滤装置;

4.7 塑料离心管: 50 mL, 材质为聚丙烯;

4.8 容量瓶: 10mL、50mL, 棕色带刻度;

4.9 烧杯: 50mL;

5.0 滤膜: 水相, 0.45 μ m。

5 测定步骤

整个检测过程尽可能在避光条件下进行。

5.1 试样溶液的制备

称取乳粉试样 2g (精确至 0.001g) 于 50mL 烧杯 (4.9) 中, 用 20g/L 的偏磷酸溶液

(3.4) 将试样转移至 50mL 容量瓶中, 振摇溶解并定容。摇匀, 全部转移至 50mL 离心管

中, 超声提取 5min 后, 于 4000r/min 离心 5min, 取上清液过 0.45 μ m 水相滤膜, 滤液待测[由此试液可同时分别测定试样中 L (+) -抗坏血酸和 D (-) -异抗坏血酸的含量]。

5.2 试样溶液的还原

准确吸取 20mL 上述离心后的上清液 (5.1) 于 50mL 离心管中, 加入 10mL 40g/L 的 L-半胱氨酸溶液 (3.10), 用 100g/L 的磷酸三钠溶液 (3.6) 调节 pH 至 7.0~7.2, 以 200 次/min 振荡 5min。再用磷酸 (3.8) 调节 pH 至 2.5~2.8, 用水将试液全部转移至 50mL 容量瓶中, 并定容至刻度。混匀后取此试液过 0.45 μ m 水相滤膜后待测[由此试液可测定试样中包括脱氢型的 L (+) -抗坏血酸总量]。

5.3 色谱条件

- (a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱, 4.6 \times 250mm, 5 μ m 或者相当的色谱柱;
- (b) 流动相: 详见 3.17;
- (c) 流速: 0.7 mL/min;
- (d) 进样量: 20 μ L;
- (e) 柱温: 25 $^{\circ}$ C;
- (f) 检测器及波长: 紫外-可见光检测器, 检测波长为 245nm。

6 实验结果

6.1 重复性测试

按照上述色谱条件 (5.3) 进行采集, 抗坏血酸混合标准工作液 (浓度均为 1.0 μ g/mL) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

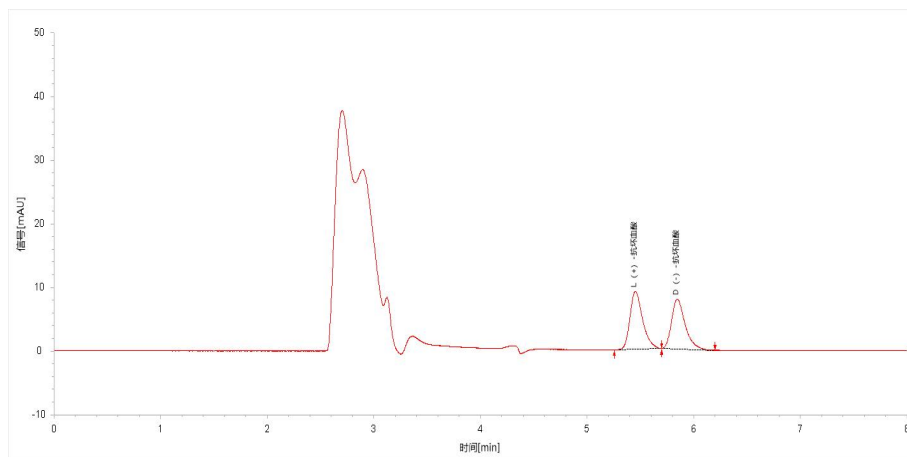


图 1 抗坏血酸混合标准溶液的色谱图

表 1 抗坏血酸混合标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
L (+)-抗坏血酸	5.463	33.331	4.053	10816	-	1.34
D (-)-抗坏血酸	5.858	31.354	3.553	11070	1.83	1.28

由表 1 中数据可知, L (+)-抗坏血酸的理论塔板数为 10816, D (-)-抗坏血酸的理论塔板数为 11070, L (+)-抗坏血酸和 D (-)-抗坏血酸的分离度为 1.83, 可实现基线分离。

将抗坏血酸混合标准溶液连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

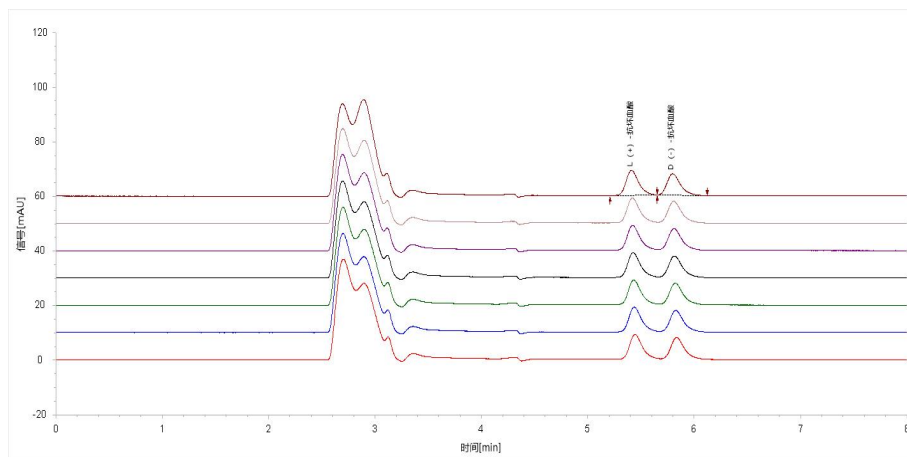


图 2 抗坏血酸混合标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 抗坏血酸混合标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
L (+) - 抗坏血酸	保留时间	5.448	5.438	5.435	5.430	5.425	5.422	5.415	5.430	0.203
L (+) - 抗坏血酸	峰面积	74.736	74.563	74.282	74.175	74.453	74.914	75.248	74.624	0.501
D (-) - 抗坏血酸	保留时间	5.838	5.832	5.827	5.820	5.815	5.812	5.800	5.821	0.222
D (-) - 抗坏血酸	峰面积	69.239	69.085	68.871	68.748	68.791	69.124	69.233	69.013	0.300

将混合标准溶液连续进样 7 针进行重复性测试, L (+) -抗坏血酸保留时间的 RSD 为 0.203%, 峰面积的 RSD 为 0.501%; D (-) -抗坏血酸保留时间的 RSD 为 0.222%, 峰面积的 RSD 为 0.300%。均具有良好的定性定量重复性。

6.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

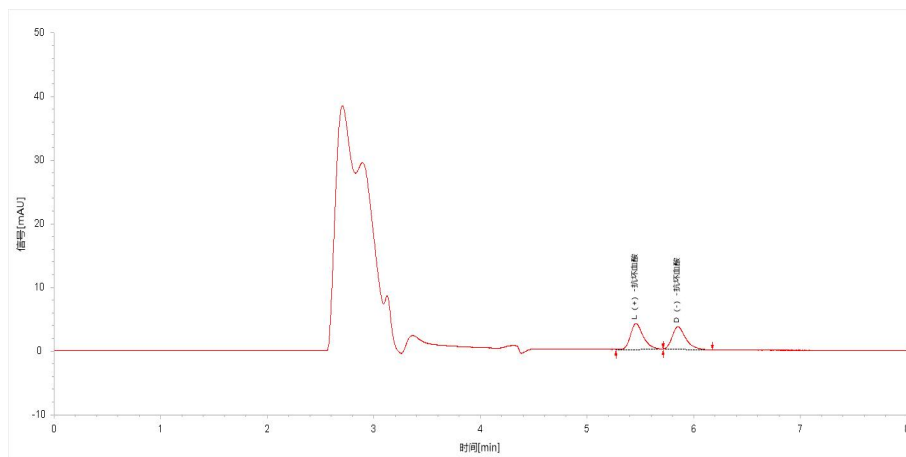


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度	峰高	噪声 (mAu)	S/N	LOD	LOQ
	($\mu\text{g/mL}$)	(mAU)			($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
L (+) - 抗坏血酸	0.5	4.053	0.040	101.3	0.015	0.049
D (-) - 抗坏血酸	0.5	3.553	0.040	88.8	0.017	0.056

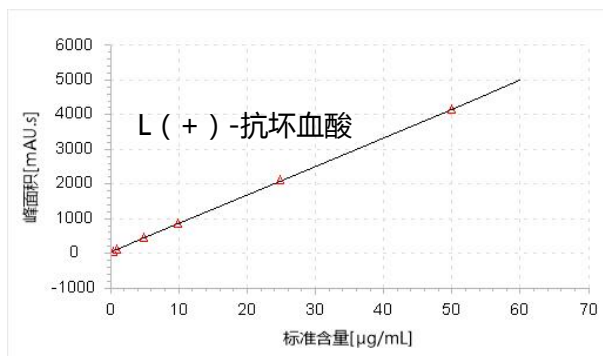
由表 3 中数据可知, L (+) - 抗坏血酸的仪器检出限为 $0.015\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 $0.049\mu\text{g/mL}$; D (-) - 抗坏血酸的仪器检出限为 $0.017\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 $0.056\mu\text{g/mL}$ 。

6.3 含量测定

6.3.1 校准曲线

按照色谱条件 (5.3), 将抗坏血酸标准系列工作液 (3.16) 上机测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 线性方程和确定系数如图 4~图 5 所示。由图 4~图 5 可知, L (+) - 抗坏血酸和 D (-) - 抗坏血酸在测定浓度范围内均呈现良好的线性关系, 确

定系数 R^2 均在 0.999 以上。抗坏血酸系列标准工作液叠加的色谱图如图 6 所示。

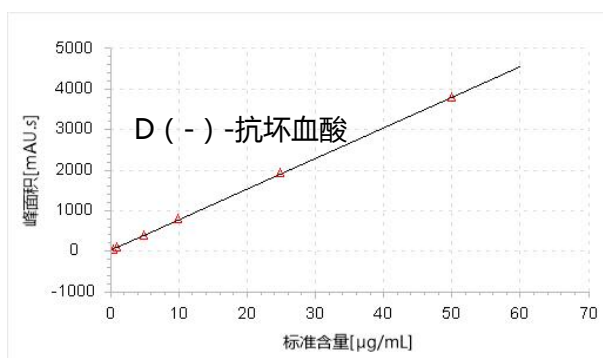


方程式 (L (+) -抗坏血酸) $y=82.80604*x+3.41388$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R^2) 0.9999

图 4 L (+) -抗坏血酸的校准曲线



方程式 (D (-) -抗坏血酸) $y=75.64816*x+3.64433$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R^2) 0.9999

图 5 D (-) -抗坏血酸的校准曲线

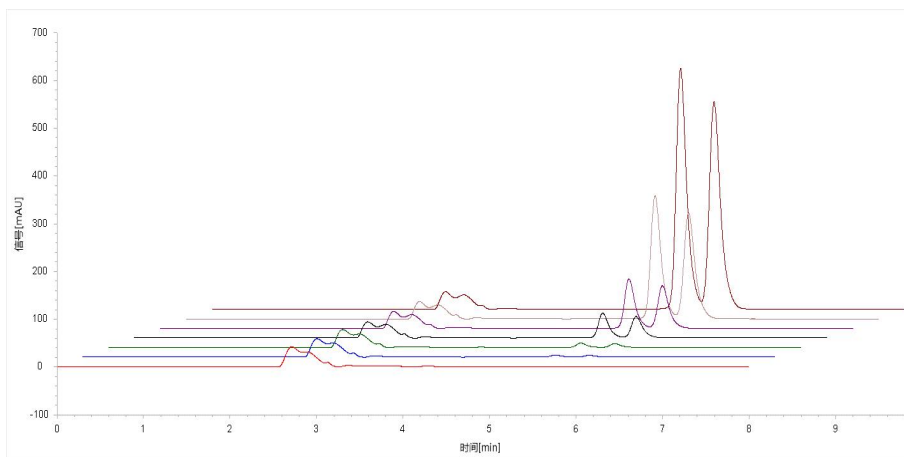


图 6 抗坏血酸系列标准工作液叠加的色谱图

6.3.2 试样溶液的测定

以乳粉作为试样，按照流程（5.1~5.2）对其进行处理，并进行加标回收实验。

依据公式（1）计算乳粉中 L（+）-抗坏血酸[或 D（-）-抗坏血酸]的含量和 L（+）-抗坏血酸总量。

$$X = \frac{(C_1 - C_0) \times V}{m \times 1000} \times F \times 100 \quad \text{----公式 (1)}$$

式中：X---试样中 L（+）-抗坏血酸[或 D（-）-抗坏血酸]的含量、L（+）-抗坏血酸总量]

的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

C_1 ---样液中 L（+）-抗坏血酸[或 D（-）-抗坏血酸]的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

C_0 ---样液空白液中 L（+）-抗坏血酸[或 D（-）-抗坏血酸]的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V---试样的最后定容体积，单位为毫升（mL）；

m---实际检测试样质量，单位为克（g）；

1000----换算系数（由 $\mu\text{g/mL}$ 换算成 mg/mL 的换算因子）；

F----稀释倍数（若使用 6.3 还原步骤时，即为 2.5）；

100----换算系数（由 mg/mL 换算成 mg/100g 的换算因子）。

空白溶液的色谱图、乳粉试样的色谱图、乳粉试样还原后的色谱图、乳粉试样加标的色谱图、乳粉试样加标还原后的色谱图如图 7~图 11 所示。

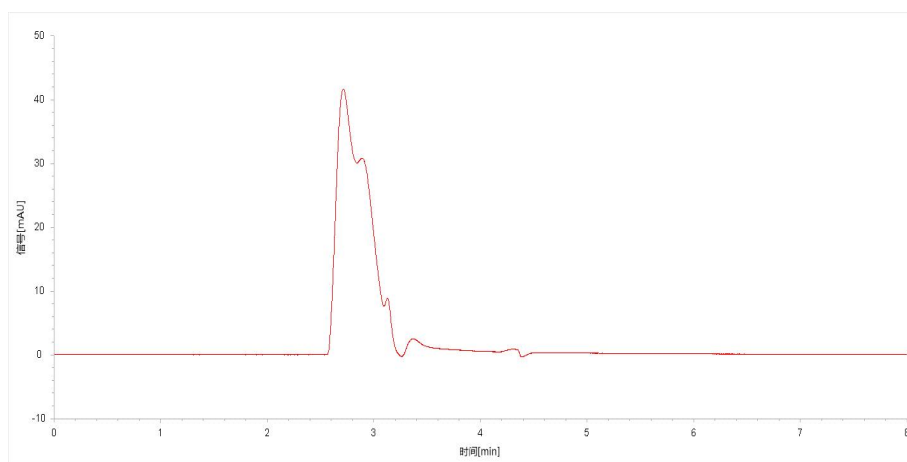


图 7 空白溶液的色谱图

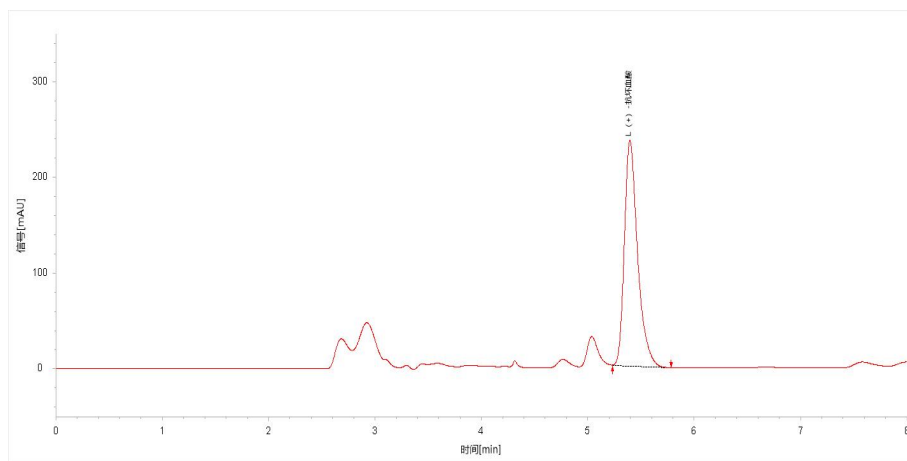


图 8 乳粉试样的色谱图

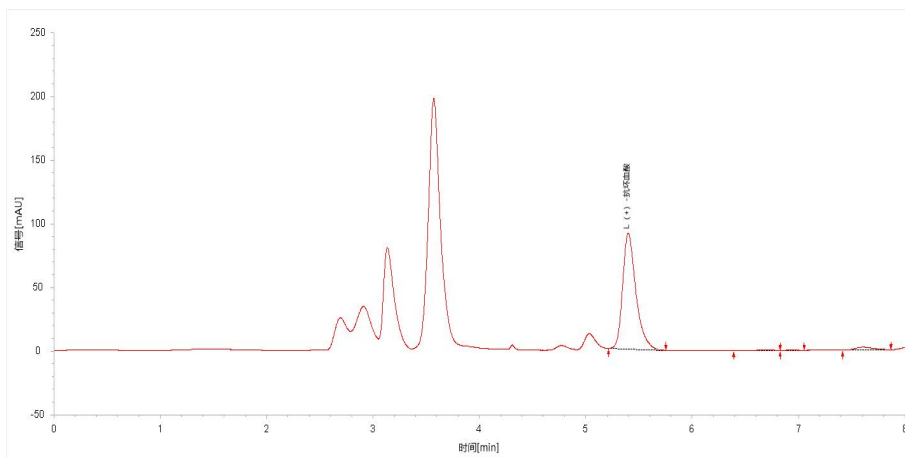


图 9 乳粉试样还原后的色谱图

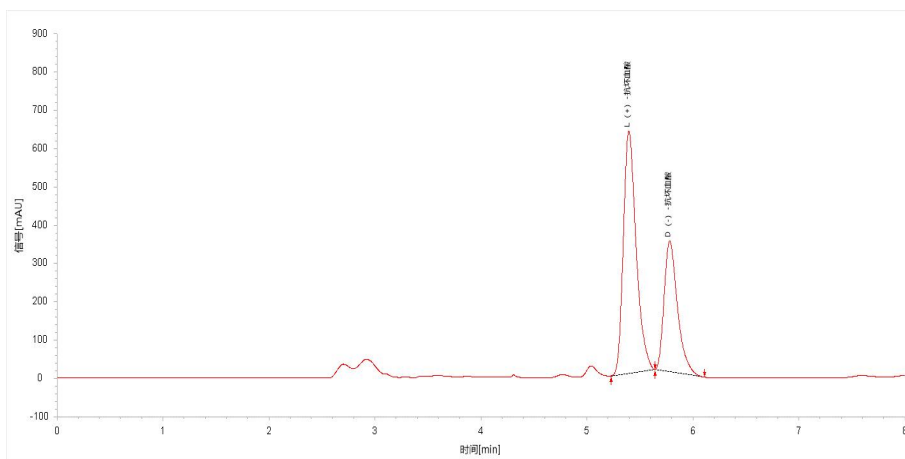


图 10 乳粉试样加标的色谱图

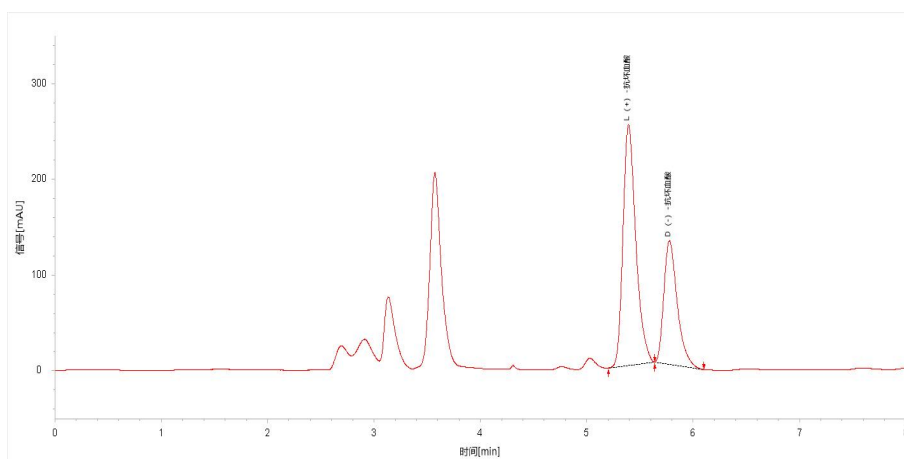


图 11 乳粉试样加标还原后的色谱图

依据公式(1)计算乳粉试样中L(+)-抗坏血酸[或D(-)-抗坏血酸]的含量和L(+)-抗坏血酸总量,该乳粉试样中L(+)-抗坏血酸的含量为61mg/100g,D(-)-抗坏血酸未检出,L(+)-抗坏血酸总量为59mg/100g,抗坏血酸的加标回收率范围为75.2%~81.2%。

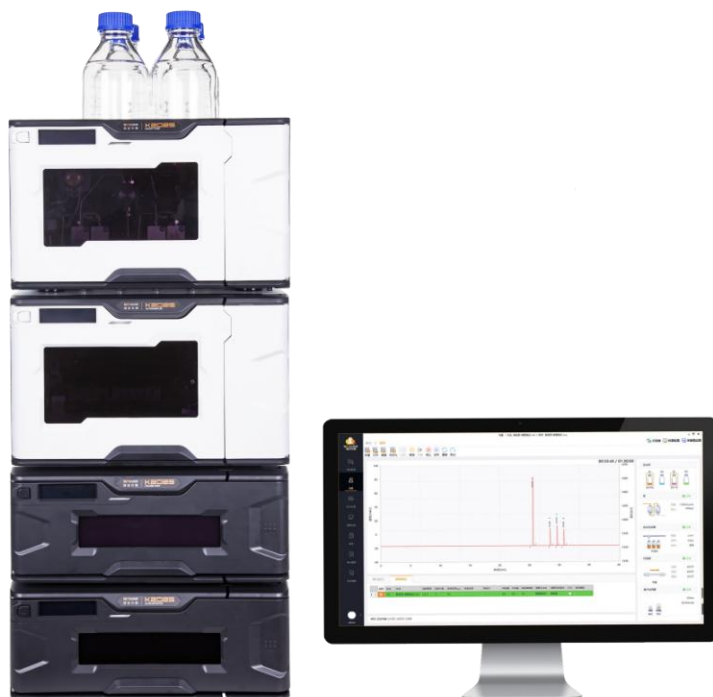
四、结论

通过对抗坏血酸的分离度、重复性、灵敏度、线性的测试以及对乳粉试样中抗坏血酸的含量及加标进行测定,实验结果表明:L(+)-抗坏血酸的理论塔板数为10816,D(-)-抗坏血酸的理论塔板数为11070,L(+)-抗坏血酸和D(-)-抗坏血酸的分离度为1.83,可实现良好的分离;重复性测试中,抗坏血酸混合标准溶液连续进样7针,L(+)-抗坏血酸保留时间的RSD为0.203%,峰面积的RSD为0.501%;D(-)-抗坏血酸保留时间的RSD为0.222%,峰面积的RSD为0.300%,均具有良好的定性定量重复性;L(+)-抗坏血酸的仪器检出限为0.015 μ g/mL,仪器定量限为0.049 μ g/mL;D(-)-抗坏血酸的仪器检出限为0.017 μ g/mL,仪器定量限为0.056 μ g/mL;L(+)-抗坏血酸和D(-)-抗坏血酸在测定浓度范围内均呈现良好的线性关系,确定系数 R^2 均在0.999以上;对乳粉试样进行测定,L(+)-抗坏血酸的含量为0.610mg/g,D(-)-抗坏血酸未检出,L(+)-抗坏血酸总量为59mg/100g,抗坏血酸的加标回收率范围为75.2%~81.2%。因此,Wooking K2025高效液相色谱仪满足《GB 5009.86-2016 食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定(第一法)》乳粉中抗坏血酸含量测定的需求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit 泵单元</u>
1	62MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1L)
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector 进样器</u>
1	自动进样器
2	样品瓶 (2mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven 柱温箱</u>
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 85 $^{\circ}$ C)
2	色谱柱: Kromasil 100-5- C ₁₈ 4.6 \times 250mm, 5 μ m
D)	<u>Detector 检测器</u>
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation 工作站</u>
1	Wookinglab (中文版)

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 张帆

联系方式: 15120069384