

高效液相色谱柱前衍生法测定食品中的营养型和非营养型抗坏血酸

任一平¹ 黄百芬¹ 铁晓威¹ 黄棣华²

1(浙江省疾病预防控制中心,杭州,310009) 2(浙江大学医学院,杭州,310009)

摘要 应用高效液相色谱柱前衍生法分离测定食品中的营养型(L型)和非营养型抗坏血酸(D异型)总量。样品中的抗坏血酸经活性炭脱氢,在pH值5.0的醋酸盐缓冲液中与邻苯二胺进行柱前衍生,用磷酸氢二钠、V[二乙胺的水溶液(pH=7.0)]:V(乙腈)=90:10作为流动相,在Inertsil ODS-3柱上得以完全分离,经荧光检测器 $E_x=346\text{nm}$, $E_m=428\text{nm}$ 下检测,外标法定量。试验结果表明,各组分在2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,线性相关系数均为0.999, RSD值为3.5%,回收率可达99%~101%。

关键词 L型抗坏血酸,D型抗坏血酸,邻苯二胺,柱前衍生,高效液相色谱

抗坏血酸分L型和D型抗坏血酸,又分别以氧化和还原型的形式存在。L型抗坏血酸作为营养强化剂普遍应用于食品中。L型抗坏血酸和L型脱氢抗坏血酸具有等同的生理活性。D型异型抗坏血酸几乎没有生理活性,但其氧化性极佳,是一种极优的食品抗氧化剂。在营养强化食品中常常同时存在这两种抗坏血酸,如何区分二者(营养型与非营养型),并同时准确测定还原和氧化型L型抗坏血酸(即脱氢抗坏血酸)的含量,是正确评价食品营养的关键,也是目前尚未解决的一项分析难题。

目前,测定抗坏血酸的常用定量分析方法有:2,6-二氯靛酚滴定法,2,4-二硝基苯肼比色法,荧光比色法和反相高效液相色谱法。但这4种方法均存在各自的局限性,不能全面准确地分别测定强化食品或天然食品中的具有营养型和非营养型抗坏血酸的含量。

笔者通过酸洗活性炭,先将还原型的L型和D型抗坏血酸转化成氧化型L型和D型抗坏血酸。在一定条件下与邻苯二胺生成具有强荧光物质的3-(1,2-二羰基乙基)呋喃(3,4-b)对二氮杂,经反相色谱分离为氧化型L型和D型抗坏血酸邻苯二胺衍生物,由荧光检测器定

量检测。

1 材料与设备

1.1 化学试剂

HCl, Na₂HPO₄, 二乙胺, 无水乙酸钠, 冰乙酸, 偏磷酸, 邻苯二胺, L型抗坏血酸, D型抗坏血酸, 质量分数8%乙酸溶液、含5%偏磷酸的8%乙酸溶液。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:BECKMAN 126 微流量双溶剂泵(美国贝克曼库尔特公司),ODS-3柱(日本Inertsil公司),RF-540 荧光检测器(日本岛津公司)。

WH861 旋涡混合器,超声波振荡器, BECKMAN pH计, AEL-200型电子天平,微量移液管,微孔过滤液装置,实验室其他常规仪器和设备。

2 实验方法

2.1 色谱条件

流动相(A):含5mmol/L二乙胺的200mmol/L Na₂HPO₄溶液(pH 7.0,用1mol/L H₃PO₄调节);(B),乙腈。[V(A):V(B)=90:10]。色谱柱:Inertsil ODS-3

第一作者:大学毕业,教授级高工。

收稿时间:2002-10-11,改回时间:2003-08-26

$5\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ 。流速: 1 mL/min 。进样量: $20\mu\text{L}$ /次。检测波长: $E_x = 346\text{nm}$, $E_m = 428\text{nm}$ 。柱温: 室温。进样方式: 手动进样。

2.2 样品预处理

2.2.1 前处理

精确称取适量样品, 用质量分数为 8% 的乙酸溶液溶解(当测定含脂肪、蛋白质时用质量分数 8% 乙酸溶液), 转移至 100 mL 容量瓶中, 用含 5% 偏磷酸的 8% 乙酸定容, 摆匀。

2.2.2 脱氢(氧化反应)

分别取 50 mL 浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液和 50 mL 2.1 步骤样液于放有约 2 g 酸洗活性炭的 250mL 三角瓶中, 剧烈摇动数分钟, 用定性滤纸过滤, 弃去初滤液, 其余滤液供衍生。

2.2.3 衍 生

吸取 5 mL 滤液于放有 5 mL 的 30.13% 乙酸钠溶液的 100 mL 容量瓶中, 用重蒸水稀释至刻度, 吸取 2 mL 于试管中, 加入 5 mL 邻苯二胺溶液, 摆匀后在避光条件下放置 35 min , 用 $0.3\mu\text{m}$ 膜过滤, 滤液供进样。

2.3 定量计算

外标法, 以保留时间定性, 峰面积定量。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择

分别吸取浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 的 L -抗坏血酸和 D -异抗坏血酸标准工作液按 2.2.2 脱氢和 2.2.3 衍生操作。衍生液置于荧光分光光度计中扫描(E_x 扫描波长范围 $250\sim 400\text{ nm}$; E_m 扫描波长范围 $400\sim 550\text{ nm}$), 参比溶液为邻苯二胺空白衍生液。由扫描结果可知, L -抗坏血酸和 D -异抗坏血酸邻苯二胺衍生反应液分别在 $E_x = 346\text{ nm}$, $E_m = 428\text{ nm}$ 处有最大吸收, 故本试验采用 $E_x = 346\text{ nm}$, $E_m = 428\text{ nm}$ 为检测波长。

3.1.2 色谱分离柱选择

不同的色谱柱对 2 种抗坏血酸的分离效

果及峰形不同。试验采用 3 种色谱分离柱:

(a) BECKMAN ODS-IP $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ (美国 BECKMAN 公司)。

(b) ODS-3 $3\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ (日本 Inertsil 公司)。

(c) BECKMAN ODS C-18 $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ (美国 BECKMAN 公司)。

所用流动相皆为 V [5 mmol/L 二乙胺的 20 mmol/L 磷酸缓冲液(用磷酸调节 pH 至 7.5)]: V (乙腈) = 90:10, 样品为 L -抗坏血酸和 D -异抗坏血酸混合标准液, 经脱氢、衍生后, 再经各种色谱柱分离的结果可知: 分离效果及峰形最佳的柱子为 b 柱, 故选用 b 柱即 Inertsil ODS-3 为本试验的分离柱。

3.1.3 流动相选择

分别配制 3 组组分的流动相:(a) V [20 mmol/L Na_2HPO_4 、 100 mmol/L 二乙胺, pH = 7.0(用 1 mol/L NaOH 调节)]: V (乙腈) = 90:10; (b) V [20 mmol/L Na_2HPO_4 、 10 mmol/L 二乙胺, pH = 7.0(用 1 mol/L HCl 调节)]: V (乙腈) = 90:10; (c) V [20 mmol/L $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 20 mmol/L Na_2HPO_4 , 10 mmol/L 二乙胺, pH = 7.0(用 1 mol/L HCl 调节)]: V (乙腈) = 90:10。使用同一分离柱中进样分离。所进样为同一衍生样品, 试验结果可知, 3 种流动相峰面积基本一致, 且每个流动相均能分离 2 种抗坏血酸, 但 b 组流动相的峰形最佳(见图 3), 保留时间适中。故选用 V [5 mmol/L 二乙胺的 20 mmol/L Na_2HPO_4 (pH 7.0, 用 1 mol/L 磷酸调节)]: (乙腈) = 90:10 为本试验流动相。

3.1.4 流动相 pH 选择

考虑到 Inertsil 色谱分离柱 pH 适用范围为 $2.0\sim 7.5$, 配制含 5 mmol/L 二乙胺的 20 mmol/L 磷酸缓冲液, 用 1 mol/L 的磷酸调节 pH 值分别为 7.2, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0 与乙腈混合体积比皆为 90:10。由试验结果可知, 流动相的 pH 值对分离起到非常关键的作用: 当 pH = 6.5 时 L -抗坏血酸与 D -异抗坏血酸已能够很好地分离, 当 pH = 5.0 时

2种抗坏血酸重叠在一起成为一个峰,随着流动相pH的降低,峰型展宽明显,当pH=7.2时,出峰时间推迟。随着pH值进一步增大,两者分离度增大,但峰形展宽。考虑本法采用荧光检测,干扰少,所用Inertsil ODS-3分离柱对流动相的pH适用范围为2.0~7.5,故确定本试验流动相pH值为7.0。

3.1.5 二乙胺浓度选择

本试验之目的是研究不同二乙胺浓度对组分分离效果和峰形的影响。分离柱为Inertsil ODS-3,流动相中二乙胺浓度分别为2.5、5、7.5、10、20 mmol/L,其他条件不变。通过试验结果可知,二乙胺的浓度对2种抗坏血酸的分离效果及峰面积影响并不显著,在浓度为5 mmol/L时的峰高与20、10 mmol/L相差不大。由于二乙胺为离子对试剂,浓度高对柱填料的破坏较大,故选用流动相中二乙胺浓度为5 mmol/L。

3.1.6 Na₂HPO₄浓度选择

通过试验主要鉴别Na₂HPO₄浓度对峰分离效果和峰形的影响。分离柱为Inertsil ODS-3,流动相中Na₂HPO₄的浓度分别5、10、15、20、40 mmol/L,其他条件不变。由试验结果可知,流动相Na₂HPO₄的浓度对2种抗坏血酸的分离效果有影响,随浓度的增加,2种抗坏血酸峰高略有增加,在20 mmol/L与40 mmol/L无明显差异,磷酸盐浓度较高会对柱子有一定的损伤,故选用Na₂HPO₄浓度为20 mmol/L。

3.1.7 乙腈含量选择

通过调节流动相中乙腈的含量,观察对L与D-异脱氢抗坏血酸分离效果影响。在其他条件不变的情况下,分别调整乙腈的百分比含量为6%、8%、10%、12%、14%。试验结果可知,乙腈的含量降低时,分离效果较好,但峰形变差,峰保留时间延长,在10%时2种抗坏血酸已达到完全分离。考虑到在完全分离的前提下应选择尽快的出峰时间,本试验选择乙腈含量10%。

综上所述,选用含5 mmol/L二乙胺的

20 mmol/L Na₂HPO₄溶液(用1 mol/L磷酸盐调节pH至7.0):乙腈(体积比90:10)为本试验的流动相,可将L-抗坏血酸与D-异抗坏血酸获得最佳分离(见图3)。

3.2 预处理条件摸索

3.2.1 衍生pH的选择

(a)取50 mL浓度为100 μg/mL标准工作液按步骤2.2.2和2.2.3处理。用8%的乙酸及30.13%的乙酸钠溶液配制不同pH值的衍生前稀释用醋酸缓冲液,pH值分别为4.0、4.5、5.0、5.5和6.0。定容后各取2 mL进行衍生。由试验结果可知,当溶液pH 5.0时衍生较完全,经比色测定所得峰面积最大,故选用衍生之前醋酸缓冲液溶液pH 5.0。

(b)偏磷酸浓度对衍生pH值的影响。针对样品中含有较多的脂肪和蛋白,应加入适量质量分数5%偏磷酸溶液使蛋白和脂肪与样品分离,具体按步骤a进行。由试验结果可见,偏磷酸浓度对溶液的pH值产生作用,从而影响对抗坏血酸的衍生。当溶液pH值在5.0时衍生所得峰面积最大,这说明加入质量分数为5%偏磷酸,并调节保持pH值为5.0是衍生的最佳条件。

3.2.2 衍生时间的确定

按时间从衍生后的反应液中取样检测,确立标准品脱氢后与邻苯二胺的最佳衍生时间。由图1可知,在衍生反应开始时随衍生时间增加,峰面积增大,在15 min时峰面积达到最大,以后峰面积稍微减少,并随时间推移渐趋稳定。故衍生时间可选择在30~60 min。

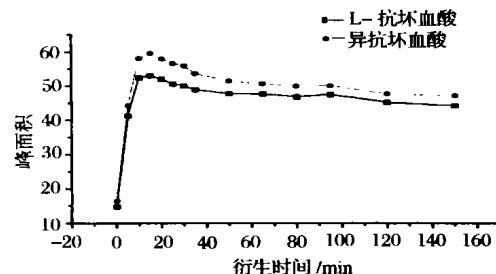


图1 衍生时间与峰面积的关系图

3.3 标准曲线与最低检出限

3.3.1 标准工作曲线

将标准工作液按步骤 2.2 进行脱氢处理后, 分别配制成 2、6、8、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行衍生, 用 $0.3 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进样检测, 分别测得不同浓度标样的峰面积。以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制工作曲线, 并求回归方程和相关系数。相关系数分别为 $R = 0.9999$ 和 $R = 0.9997$ 。

3.3.2 最低检出限

将脱氢后滤液依次稀释, 分别衍生, 按最佳分离条件, 测出 2 种抗坏血酸的检测限(信噪比 S/N)(见图 2), 最低检测浓度均为 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此可见, 荧光检测法测定具有较高的灵敏度。

3.4 精密度试验

选用多维片(上海健特)作为试验材料, 因多维片经检测只含有 L-抗坏血酸, 故试验时添加适量 D-异抗坏血酸。取 1.0 g 多维片加入 5 mL 浓度为 6 mg/mL 的 D-异抗坏血酸, 用 8% 乙酸溶液溶解, 并定容至 100 mL, 同时做 6 个平行, 按所选定色谱条件分离检测, 根据峰面积计算精密度。结果可知, 2 种抗坏血酸的相对标准差分别为 3.45% 和 3.03%, 精密度良好。

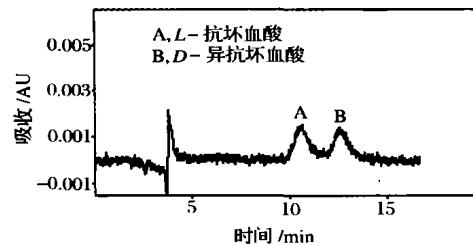


图 2 浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标样信噪图谱

3.5 回收率试验

以多维片为样品, 按预处理方法进行高浓度样品加标实验。测定后, D-异抗坏血酸系添加)回收率分别是 99.73 和 100.38, 回收率良好。

3.6 干扰性试验

(1)考虑到在样品中会存在能产生荧光

的其他物质, 特别是 B 类维生素。配制 V_{B_1} 、 V_{B_2} 、 V_{B_6} 、牛磺酸、叶酸混合溶液, 按预处理方法处理后进行分离, 在 2 种抗坏血酸出峰位置未见有杂峰出现, 可见 V_{B_1} 、 V_{B_2} 、 V_{B_6} 、牛磺酸、叶酸在本方法条件下未产生干扰。

(2)取工业奶粉 10 g, 按步骤 2.2 处理, 按 2.3 色谱条件分离检测, 在 2 种抗坏血酸处及附近不出峰, 可见工业奶粉中未添加 2 种抗坏血酸, 因而采用本方法未检出杂质峰。

3.7 实际样品的分离测定及方法对比试验

(1)分别取多维片(上海健特)和燕牌婴儿奶粉按本法进行分离测定, 同时采用现行的 IP-HPLC 方法检测, 进行对比试验, 结果见表 1。表 1 中样 1、2 两法结果一致, 样 3 为天然水果, 存在还原态和氧化态抗坏血酸, 2 法结果有差异, 这表明 IP-HPLC 方法无法准确测出还原态抗坏血酸的量。

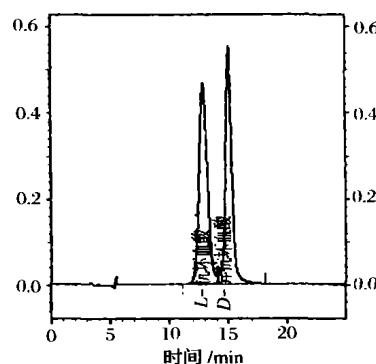


图 3 两种标准抗坏血酸的分离图谱

表 1 各样品内两种抗坏血酸含量的测定

名 称	应用方法	g/g(样品)	
		L-抗坏血酸	D-异抗坏血酸
1 多维片(加标)	本方法	0.0604	0.0202
	IP-HPLC	0.0583	0.0222
2 婴儿奶粉	本方法	1.12	/
	IP-HPLC	1.10	/
3 猕猴桃	本方法	1.25	/
	IP-HPLC	1.14	/

(2)实样测定如图 4、图 5 所示。

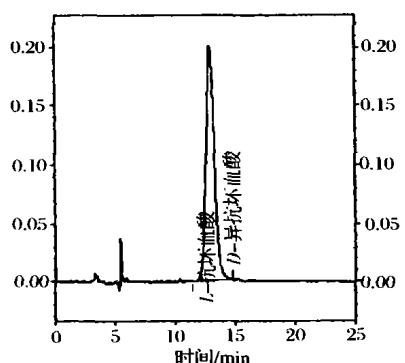


图4 婴儿配方奶粉

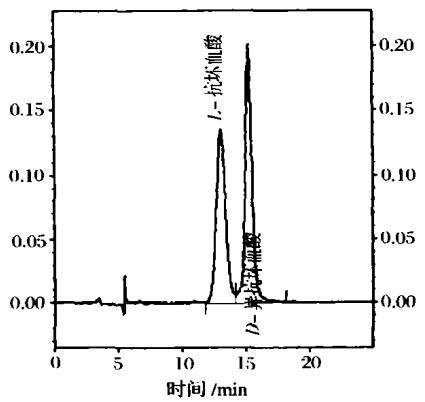


图5 统一绿茶饮料

4 结论

(1) 用含 5 mmol/L 二乙胺 20 mmol/L Na₂HPO₄ 溶液(用 1 mol/L 磷酸盐调节 pH 7.0)和乙腈(体积比 90:10)为流动相, Inertsil ODS-3 为分离柱。在 $E_x = 350 \text{ nm}$, $E_m = 430 \text{ nm}$ 波长下进行荧光检测。此法能准确全面地区分测定加工食品或天然食品中的具有营养型和非营养型抗坏血酸的总含量。

(2) 本法线性关系良好(R 值分别为 0.9999 和 0.9997 以上), 相对标准差分别为 3.45% 和 3.03%, 回收率在 99.7% ~ 100.3%。最低检出浓度为 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其准确度和灵敏度可满足食品中的两种营养类型的抗坏血酸的检测要求。

参考文献

- 日本药学会编著, 中华预防医学会组译. 卫生试验法·注解. 北京: 文华出版社, 1995. 297~300
- [美]沃斯博尔内 D R 等著, 胡正芝等译. 食品中营养素的分析. 北京: 轻工业出版社, 1987. 297~308
- 任一平, 黄百芬, 俞荣华. 食品与发酵工业, 1993 (2): 12~17, 29
- 中华人民共和国国家标准 GB/T 5413.18—1997 《婴幼儿配方食品和乳粉维生素 C 测定》, 77~79

HPLC Pre-column Derivation for Measuring Nutritive and Non-nutritive Ascorbic Acid

Ren Yiping¹ Huang Baifen¹ Tie Xiaowei¹ Huang Dihua²

1(Zhejiang Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou, 310009)

2(Zhejiang University Medical School, Hangzhou, 310009)

ABSTRACT A method was developed for testing the total contents of nutritive (L Ascorbic Acid) and non-nutritive Vitamin C(D Isoascorbic Acid) in food by HPLC-Pre-Column derivation method. The ascorbic acid in sample was dehydrogenated with acid active carbon, followed by pre-column derivation with o-phenylenediamine in acetic acid buffer solution ($\text{pH} = 5.0$) . The mobile phase was 10% acetonitrile in the solution ($\text{pH} = 7.0$) containing 20 mmol/L disodium hydrogen phosphate and 5 mmol/L diethylamine. The two kinds of Vitamin C were separated completely on Inertsil ODS-3 column, with fluorescence detector for monitoring ($E_x = 346\text{nm}$, $E_m = 428\text{nm}$) and peak area method for quantification. In the concentration range of 2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, regression factor was 0.999. The RSD were within 3.5%. The percentage of recovery rate during analysis was between 99%~101%.

Key words L-ascorbic acid, D-isoascorbic acid, o-phenylenediamine, pre-column derivation, HPLC(high-performance liquid chromatography)