

复配食品添加剂中维生素 C 的检验方法研究

李俊楠, 毕春波, 张丹丹, 吴腾, 卢光辉, 马秀红, 马月莲, 卢光业

(内蒙古特康瑞营养食品有限责任公司, 呼和浩特 010000)

摘要: 依据 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 高效液相色谱法对复配食品添加剂中维生素 C 含量进行检测。对维生素 C 主峰响应值偏低, 分离度差、精密度不稳定很难进行有效积分原因进行分析研究。本次实验应用国标参考条件, 对标准曲线低浓度点、检出限浓度点、定量限浓度点上机检测后, 发现主峰响应值偏低, 分离度差、精密度不稳定很难进行有效积分, 直接影响检验结果准确度。通过控制变量、调整检测参考条件、完善样品前处理过程等方法, 对检验过程进行分析研究, 对检验方法进行有效验证。最终得到提高维生素 C 灵敏度及响应值的重要条件: 样品前处理过程增加沉淀过滤步骤以消除复配添加剂中复杂基质的干扰; 调节色谱参考条件中流动相比比例、流速已达到色谱主峰有效积分效果; 减少样品上机检测的进样量, 以降低样品上机浓度。三个条件同时满足时, 所测得的结果主峰能够有效积分, 准确度及灵敏度高, 精密度重复性良好。

关键词: GB 5009.86; 高效液相色谱; 维生素 C; 抗坏血酸; 复配添加剂; 检出限; 灵敏度

Abstract: According to GB 5009.86-2016, the first high-efficient color score is to duplicate the number of calories in the calories. At the same time, experiment with national reference conditions, standard benchmark low 2798787; points, detection of 2798787; points, quantification of 2798787; points, quantification of 2798787; points, detection of calculus, reduction of calculus, differentiation of calculus, non-detection of calculus, direct detection of calculus, correction of calculus, improvement of calculus, reduction of calculus, analysis of calculus, analysis of calculus. How to take some of the log-ups, until the log-ups started until they started started using some of the log-ups. There are still log-ups. There are log-ups. There are log-ups. There are still log-ups. There are log-ups. There are log-ups. There are log-ups. At 27987;. At the time of completion of three conditions, the main results can be positive, accurate and 28789; high, accurate duplication.

Keywords: GB 5009.86; high-efficacy photosynthesis; UV C; anti-clot acids; duplicate additives; detect limits

1 绪论

1.1 研究对象

维生素 C 是一种水溶性维生素,化学命名为 L-(+)-苏阿糖型 2,3,4,5,6-五羟基-2-己烯酸-4-内酯,又名 L-抗坏血酸,分子式为 $C_6H_8O_6$,维生素 C 可参与机体内抗体及胶原形成,组织修补,代谢,利用,合成,维持免疫功能,促进非血红素铁吸收。可治疗急慢性传染性疾病,紫癜,防治坏血病,慢性铁中毒,高铁血红蛋白血症和维生素 C 缺乏。可补充维生素 C,治疗化学性灼伤,预防角膜上皮损伤、肝硬化、急性肝炎、慢性中毒时的肝脏损害,贫血等。维生素 C 的缺乏直接导致人体形成全身性疾病坏血病。其特征为骨骼病变和毛细血管通透性增高引起的出血性表现,尚可伴有骨髓巨核细胞退行性变。维生素 C 在伤口愈合中的作用近年来得到重视和肯定^[1]

复配食品添加剂维生素 C 是为了满足强化维生素 C 含量、增强食品抗氧化工艺、满足特定疾病状态人群对营养素或膳食的特殊需要,专门加工配制而成的配方食品。其配方及基质复杂,严格控制原料的质量安全,同时按照 GB 14754-2010 食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 C(抗坏血酸)通则^[2]的要求对食品添加剂 维生素 C 进行重点监控检测,保障终端产品安全。高效液相色谱法具有稳定性强、操作步骤简单、灵敏度较高、选择性好、准确定更高等优点^[3]

本文旨在对食品添加剂 维生素 C 检验方法进行研究,对维生素 C 响应值偏低、分离度差、精密度不稳定的原因进行分析研究,对检验风险问题进行分析验证,并得出有效结论。

1.2 立题依据

高效液相色谱法检测复配食品添加剂中维生素 C 含量,方法适用于乳粉、谷物、蔬菜、水果及其制品、肉制品、维生素类补充剂、果冻、胶基糖果、八宝粥、葡萄酒中的 L-(+)-抗坏血酸、D(-)-抗坏血酸和 L-(+)-抗坏血酸总量的测定。研究表明,高效液相色谱法是当前在维生素 C 定量检测方面有着相当应用广度的方法。实际应用过程中表现出灵敏、准确并且重复性好等多方面优点,并且适合食品中维生素 C 含的检测。此方法将样品中的维生素 C 用偏磷酸溶液溶解超声提取后,以离子对试剂为流动相,经过反向色谱柱分离,用配有紫外检测器的液相进行测定,以色谱峰的出峰时间定性,以峰面积外标法进行定量。

依据 GB 5009.86-2016《食品安全国家标准食品中抗坏血酸的测定》^[4]为复配食品添加剂中维生素 C 检测方法应用提供有效依据。对检测方法的线性关系、回收率、检出限、定量限、精密度进行验证,结果均符合 GB/T27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测^[5]的要求。

2 材料

2.1 仪器

Agilent 高效液相色谱仪(安捷伦科技(中国)有限公司)、BSA224S-CW 万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)、BL-220H 千分之一电子天平(日本岛津)、FE28 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、QC10260 超声波清洗机(天津市旗美科技有限公司)、TGL-16M 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、DKZ-2 电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司)。

2.2 试剂、标准品、耗材

分析纯偏磷酸含量 $\geq 38\%$ (20170323)、分析纯磷酸三钠(20210310)、优级纯磷酸二氢钾(20201209)、分析纯磷酸(20171127)、优级纯 L-半胱氨酸分析纯氯化钾(20210114)、色谱纯十六烷基三甲基溴化铵、分析纯盐酸(20200715)、色谱纯甲醇(20170323)、一次性微孔滤头(20211109)购自国药集团化学试剂有限公司;L(+)-抗坏血酸标准品($C_6H_8O_6$)CAS 号(21040251)购自坛墨质检科技股份有限公司、水为 GB/T 6682-2008^[6]规定的一级水。

3 方法与结果

3.1 复配食品添加剂维生素 C 的测定

3.1.1 色谱条件:

a) 流动相: A 6.8g 磷酸二氢钾和 0.91g 十六烷基三甲基溴化铵,用水定溶至 1L,用磷酸调节 pH 至 2.5~2.8; B 100%甲醇。A:B=98%:2%,混合过滤用 0.45 μ m 滤膜过滤,超声脱气。

b) 色谱柱: C18 柱(柱长 250mm,柱内径 4.6mm,填料粒径 5 μ m);

- c) 流速: 0.7mL/min;
- d) 柱温: 25°C;
- e) 进样量: 20μL;
- f) 高效液相色谱仪配有紫外检测波长: 245nm;

3.1.2 标准溶液的配制:

a) L(+)-抗坏血酸标准储备液(1mg/mL): 准确称取 L(+)-抗坏血酸标准品 0.01g, 用 20% 的偏磷酸溶液定容至 10mL, 在 2~8°C 条件下可以保存一周。

b) 标准系列工作溶液: 准确移取标准储备液 0mL、0.05mL、0.5mL、1mL、2.5mL、5mL, 至 100mL 容量瓶中, 用 20g/L 的偏磷酸溶液定容至刻度, 即得 L(+)-抗坏血酸浓度为 0μg/mL、0.5μg/mL、5.0μg/mL、10μg/mL、25μg/mL、50μg/mL、的系列标准溶液。临用时配制, 要求避光保存。

3.1.3 样品制备

称取 1g 试样(精确至 0.001g)混合均匀的固体试样, 于 50mL 烧杯中, 用 20g/L 的偏磷酸溶液溶解并转移至 50mL 容量瓶中。振摇溶解定容后摇匀, 全部转移至 50mL 离心管中, 超声提取 5min, 4000r/min 离心 5min, 取上清液, 0.45μm 滤膜过滤, 收集滤液于进样瓶中以备进样。不称取试样, 同法制备空白试验。

3.1.4 线性关系考察

将 L(+)-抗坏血酸标准工作溶液由低到高浓度依次进样检测, 以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线。在色谱积分过程中发现标准曲线各个点目标峰明显, 但是响应值没有规律不成线性, 峰形分离度为 0.7, 按照中国药典推荐分离度应达到 1.5 以上。强制手动积分会导致线性偏离或拟合程度失信, 影响检验结果。存在检测风险。

3.1.5 试样溶液的测定

待测样液中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内, 浓度超过线性范围的样品则应稀释后重新进样分析。试样中将 L(+)-抗坏血酸的含量按公式计算:

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times F \times K \times 100$$

式中:

X——试样中将 L(+)-抗坏血酸标准的含量, mg/100g;

ρ——进样液中 L(+)-抗坏血酸按照外标法在标准曲线中对应的浓度, 单位为纳克每

毫升($\mu\text{g/mL}$);

V——最终定容体积,单位为毫升(mL);

F——稀释倍数,2.5;

K——使用甲醇,1.25;

m——试样的称样量, g;

1000——换算系数;

3.1.6 数据分析

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 高效液相色谱法,检出限为 $0.5\text{mg}/100\text{g}$, 定量限为 $2\text{mg}/100\text{g}$ 。分析对比浓度关系, 检出限低于标准系列工作溶液最低点 ($0.5\mu\text{g/mL}$), 定量限相当于标准系列工作溶液最低点 ($400\mu\text{g/mL}$)。而标准系列工作溶液最低点 ($0.5\mu\text{g/mL}$) 上机检测目标峰已经出现分离不明。所以规定的检出限、定量限按照现在的检验参数不易检出、很难积分。并采用加标回收的方式对检出限 $0.5\text{mg}/100\text{g}$, 定量限 $2\text{mg}/100\text{g}$ 进行验证。色谱峰均不能有效积分。实验图谱如图 1,

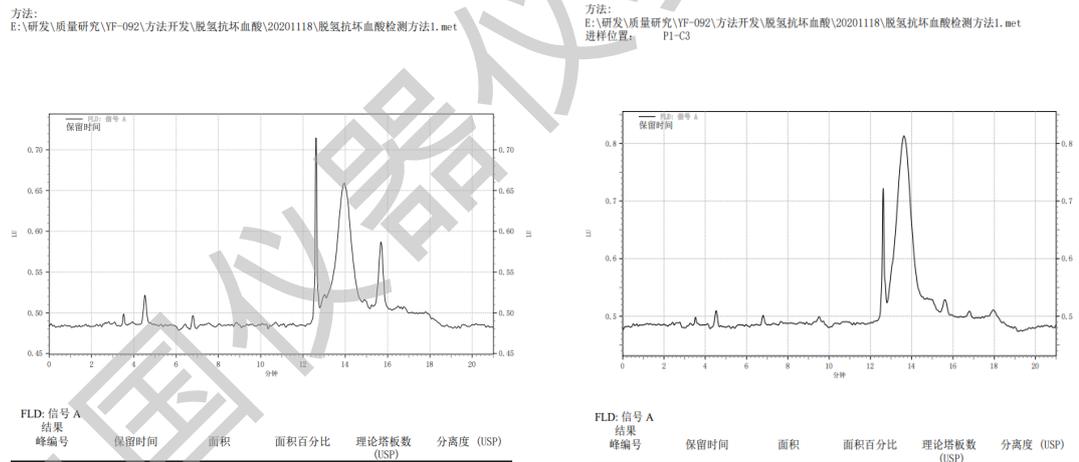


图 1 过程出现异常图谱

Figure 1 Abnormal process graph

对检验方法中的参数条件进行分析, 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 高效液相色谱法中规定待测液液中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,浓度超过线性范围的样品则应稀释后重新进样分析。若提高标准曲线最低点浓度可进行有效积分,但维生素 C 为营养类维生素,且食品安全国家标准中有标准限值。提高标准曲线最低点浓度,不能保证样品中维生素 C 完全分离检出,存在食品安全风险。

分析方法中流动相、进样量均为色谱参考条件。以调整流动相比例、减少进样量、减少样品稀释倍数来控制变量,来弥补维生素 C 在仪器分离度低的缺陷,设计了实验进行分析

如表 1:

表 1 分析实验设计

Table 1 Analysis Experiment Design

项目	GB 5009.86-2016 色谱条件	调整后色谱条件
色谱参考条件	流动相比例:	流动相比例:
	盐相:甲醇 (100%) =98%:2%	盐相:甲醇 (50%) =98%:2%
	进样量: 20 μ L	进样量: 10 μ L
	流速: 0.7mL/min;	流速: 0.5mL/min;

对上机后标准曲线进行分析, 流动相比例为盐相:甲醇 (100%) =98%:2%: 调整为水:盐相:甲醇 (50%) =98%:2%, 即减少有机相比例, 降低流动相极性, 目标峰出峰时间延后。可以在将样品的中的杂质部分先用流动相走出, 避免杂质干扰主峰, 使得主峰不在拖尾。同时进样量由 20 μ L 调整为 10 μ L, 在灵敏度没有变化的情况下, 浓度降低过高, 响应值波动变小。峰型分离度为 1.6, 能够与杂质峰有效分离。控制流动相流速, 使标准品与流动相充分混匀, 减少色谱柱中固定相中固定体积对色谱峰的影响。并使用该方法制作标准曲线, 得到标准曲线回归方程式为 $y=10181378.2561941x+279.81$ ($R^2=0.999968932$) 如图 2, 结果表明在 0 μ g/L~50 μ g/L 范围内呈良好的线性关系。

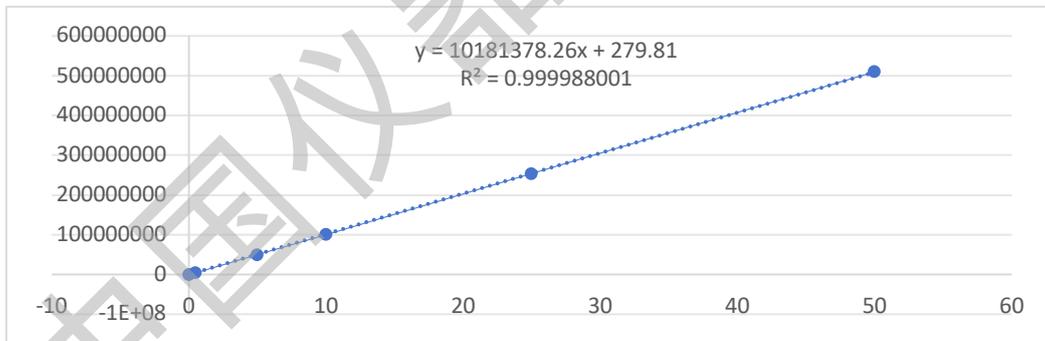


图 2 维生素 C 标准曲线

Figure 2 Standard curve of vital C

对样品本身基质进行分析, 复配添加剂维生素 C, 里面主要成分为淀粉糖、乳粉, 在样品前处理过程直接使用偏磷酸的酸水解方法中很难消除淀粉糖和乳粉对检验的干扰。完善样品前处理的过程, 以消除基质中脂肪蛋白等大分子的对实验的干扰, 设计了实验进行分析如表 2:

表 2 分析实验设计

Table 2 Analysis Experiment Design

项目	样品前处理	调整后色谱条件
样品前处理过程	称取 1g 于 50mL 烧杯中	称取 1g 试样于 50mL 烧杯中,加入缓慢加入乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液各 5mL。
	直接用 20g/L 的偏磷酸溶液溶解并转移至 50mL 容量瓶中。	先取 10mL 滤液,再用 20g/L 的偏磷酸溶液溶解并转移至 50mL 容量瓶中。
	过滤: 0.45 μ m 滤膜过滤	过滤: 0.22 μ m 滤膜过滤

缓慢加入乙酸锌溶液(乙酸锌 21.9g,加冰乙酸 3mL,加水溶解并稀释至 100mL)和亚铁氰化钾溶液(称取亚铁氰化钾 10.6g,加水溶解至 100mL)各 5mL,,磁力搅拌或超声 30min,用干燥滤纸过滤,弃去初滤液。消除了基质中脂肪蛋白等大分子的对实验的干扰,最终在使用过滤效果更好的 0.22 μ m 滤膜进行过滤,再次消除大分子物质对实验的影响。实验结果表明实验结果图谱峰型没有其他杂质峰的干扰,且分离度达到 1.5 以上。实验图谱如图 3,

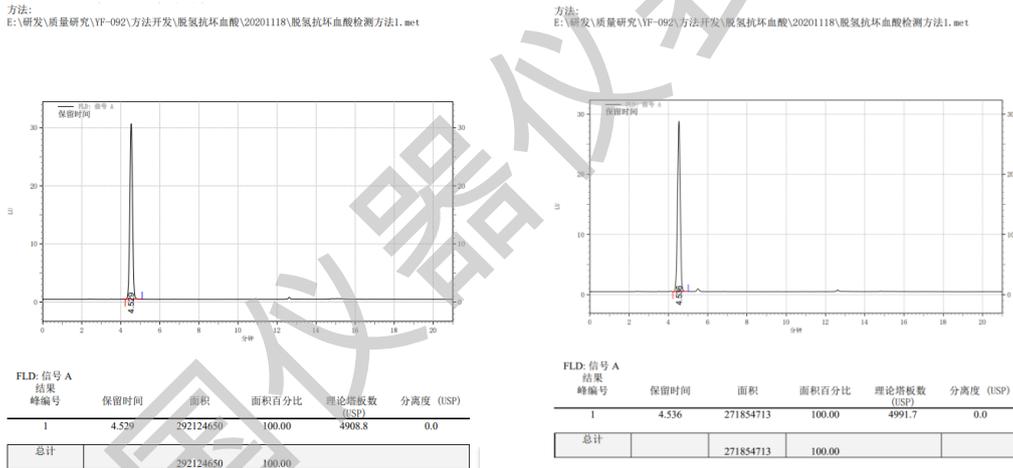


图 3 优化实验条件后正常图谱

Figure 3 Normal spectrum after optimizing experimental conditions

3.2 样品测定

对复配食品添加剂中维生物 C 样品按照优化后的表 2 实验条件过程进行处理。用 3.1.5 过程进行计算,结果图谱正常,结果符合产品标准要求。结果精密度分别 2.0%、3.3%,符合国标在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%的要求。检验结果如表 3:

表 3 检测结果

Table 3 Test Results

样品名称	样品编号	检测结果 mg/100g	检测结果平均 值 mg/100g	精密度
复配 食品添加剂	1	156	157.5	2.0%
	2	159		
	3	153	155.5	3.3%
	4	158		

3.3 加标回收率实验（检出限、定量限、随机选取一点验证）

准备 3 个梯度加标样品，分别加入已知含量标准溶液。配置成检出限浓度 0.5mg/100g、定量限浓度 2mg/100g、随机选取一点浓度 50mg/Kg 进行回收率实验。

对以上样品按照调整后条件进行检测。用测得量减去样品中的含量，并除以加标量。得到维生素 C 检出限浓度 0.5mg/100g 能够有效积分，且 S/N 值为 3.0；定量限浓度 2mg/100g 能够有效积分，且 S/N 值为 7.3，回收率为 96%；随机选取一点浓度 50mg/Kg 能够有效积分，回收率为 99.5%。回收率结果均符合 GB/T 27404 中附录 F 中 80%~120%范围的标准要求。表明本方法准确度好、灵敏度高、分离效果好，加标回收率实验（检出限、定量限、随机选取一点验证）结果如表 4：

表 4 样品加标回收率实验

Table 4 Sample spiking recovery rate experiment

样品编号	样品本底含 量,mg	加标量,mg	测得量,mg	加标回收 率,%	平均回收 率,%
1-1	0	0.49777	0.31792	63.87	69
1-2	0	0.49777	0.31279	62.76	
1-3	0	0.49777	0.33843	67.99	
1-4	0	0.49777	0.38766	77.88	
1-5	0	0.49777	0.31200	62.76	
1-6	0	0.49777	0.36262	72.85	
2-1	0	2.0075	2.0179	100.5	99.5
2-2	0	2.0075	1.9994	99.6	
2-3	0	2.0075	2.0014	99.7	
2-4	0	2.0075	1.9793	98.6	

2-5	0	2.0075	1.9894	99.1	
2-6	0	2.0075	1.9954	99.4	
3-1	0	50.201	50.0034	99.6	
3-2	0	50.201	49.7434	99.1	
3-3	0	50.201	50.0172	99.6	
3-4	0	50.201	50.0453	99.7	99.1
3-5	0	50.201	48.7926	97.2	
3-6	0	50.201	49.946	99.5	

3.4 精密度测试

利用 3.3 加标回收率实验过程, 计算在重复性条件下获得测定结果的 RSD 分别为 5.2%、7.0%、3.8% (n=6)。结果均符合 GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测中 $\leq 30\%$ 的标准要求。表明该方法精密度重复性良好。

4 讨论

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 高效液相色谱法, 对复配食品添加剂中维生素 C 含量进行了测定。按照原有条件和样品前处理过程主峰响应值偏低, 分离度差、精密度不稳定很难进行有效积分。原因可能为样品基质复杂, 目标峰很难分离出来。通过设计实验, 降低色谱参考条件中流动相比例中有机相比例 (盐相: 甲醇 (100%) = 98%: 2% 调整为盐相: 甲醇 (50%) = 98%: 2%)、减少仪器设备进样量 (20 μ L 调整为 10 μ L)、降低色谱柱流速 (0.7 mL/min 调整为 0.5 mL/min) 延长出峰时间来减少固定相色谱柱中固定体积对色谱峰的波动影响。同时在样品前处理过程中加入乙酸锌和亚铁氰化钾对复杂基质进行沉淀净化处理, 使得目标峰不受其他杂质峰干扰, 提高过滤净化效果 (0.45 μ m 滤膜过滤调整为 0.225 μ m 滤膜过滤) 来提高仪器设备的响应值。为确保实验的可信度, 对线性关系进行了验证考察, 结果表明范围内呈良好的线性关系; 对加标回收率实验 (检出限、定量限、随机点验证) 进行了测试验证, 结果表明本方法准确度好、灵敏度高; 对方法精密度进行了测试, 结果表明该方法精密度重复性良好。

综上所述, 调整了流动相比例、减少进样量、降低色谱柱流速、增加乙酸锌和亚铁氰化钾净化样品、改善上机前滤膜过滤孔径, 提高了仪器设备响应值和样品分离的效果。整个测定方法简单易行, 结果准确。本文可为后续按照 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 高效液相色谱法，检测复配食品添加剂中维生素 C 含量提供一定的参考。

参考文献：

- [1]蒋琪霞,耿广莉,张晓霞,刘亚红,蒋菁,梁苹.维生素 C 在四类伤口愈合中的效果观察[J].医药卫生科技, 0253-3685.2000.12.065.
- [2]朱碧宁.高效液相色谱电化学发光法检测抗坏血酸的效果研究[J].山西化工.2019-03-018
- [3]GB 14754-2010 《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 C(抗坏血酸)》 [S].
- [4]GB 5009.86-2016 《食品安全国家标准食品中抗坏血酸的测定》 [S].
- [5] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- [6] GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法[S].