比较用于测定水果中维生素 C 的 UPLC/UV 和 UPC²/UV 方法

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

周围，王波
甘肃省检验检疫科学技术研究院

引言

维生素 C（Vitamin C，Ascorbic Acid）又叫 L- 抗坏血酸，属于水溶性维生素。具有较强的还原作用，参与体内氧化还原反应，是维持人体正常生理代谢不可缺少的一类有机化合物 [1]。医学研究还发现它不但具有生理活性，而且在人体内能够阻止亚硝胺的形成，具有一定的防癌作用，增加机体对传染病的抵抗力，对肝炎、肝硬变有疗效 [2-6]。同时又是一种理想的食品抗氧化剂。但是人体本身不能合成，必须依靠膳食供给，维生素 C 广泛存在于新鲜的水果、蔬菜中 [7-9]。因此建立准确测定维生素 C 含量的方法有着非常重要的现实意义。

维生素 C 测定的方法一般有碘量法 [10]、比色法 [11]、电位法 [12]、紫外分光光度法 [13]、荧光法 [14] 等，这些方法选择性较差，容易受其他还原性成分、丙酮酸和糖等成分的干扰，所需试剂较多，操作繁琐 [15]。近年来高效液相色谱法发展迅速，它具有高效、快速等特点，但是在实验过程中有机溶剂耗费多，实验成本较高，并对环境或多或少造成一定的污染。众多文献均在传统的反相液相色谱中对维生素 C 进行分离分析，由于维生素 C 本身具有较高极性而导致保留时间较短，严重影响到维生素 C 的准确定量。采用超高效合相色谱法对维生素 C 进行直接检测的方法却鲜有报道，超高效合相色谱除了具有传统超高效液相色谱所具有的优点外，还与超临界流体色谱技术进行结合，加之亚 2 µm 填料技术，以 CO_2 为流动相主体，具有操作温度低，有机溶剂使用量少、灵敏度高、重现性好、分析速度快等优点 [16-18]。本实验通过系统考察超高效合相色谱对维生素 C 分离的影响因素，为准确检测维生素 C 建立一种可靠、快速、节约型的分离分析方法。

方法

样本制备

固体及半固体样品：分别准确称取样品 5.00 g 于 50 mL 聚乙烯管中，加入 15 g 含 0.05 % H_3PO_4 的甲醇 - 水（8:2，V/V）溶液后，均质 5 min，高速冷冻离心机于 4 ˚C 下以 13000 r/min 离心 10 min，取上清液 1 mL（维生素 C 含量较高时可适当进行稀释），经 0.22 µm 滤膜过滤后，直接进样分离分析。

液体样品：准确称取 2.00 g 饮料于 50 mL 聚乙烯管中，加入含 0.05 % H_3PO_4 的甲醇 - 水（8:2，V/V）溶液至 20 g，置于高速冷冻离心机于 4 ˚C下以 13000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL，经 0.22 µm 滤膜过滤后，直接进样分离分析。

UPLC-UV 方法分析维生素 C

作为一款高度稳定，可靠，重现性好的色谱系统，超高效液相色谱系统的亚二 µm 杂化颗粒技术，与当今传统的 5 µm 颗粒填料技术的 HPLC 系统相比，可以达到 3 倍以上的效率，分离效率提高 9 倍以上，同时不影响分辨率，各方面性能得到了显著的提高。

Vc 的分析

色谱柱：ACQUITY UPLC® BEH C_{18} 2.1 × 50 mm 1.7 µm
流动相：A：水（含 0.05 % H_3PO_4）B：甲醇；等度洗脱：A:B=98:2
流速： 0.3 mL/min；进样体积：5 µL；柱温：30 ˚C；检测波长：245 nm

采集 / 处理方法

数据文件使用 Empower® 3 软件进行采集和处理。并计算出 Vc 的相对含量。

UPC²-UV 方法分析维生素 C

沃特世（Waters®）超高效合相色谱（UltraPerformance Convergence Chromatography™，UPC²®）技术集合 SFC 和 UPLC® 的技术优点。泵系统的传输性能精准（精度 0.001 mL/ min）；样品室温控 4~40 ˚C，专利技术的进样器可在 0.1~50 µL 内调控，进样线性 >0.999、进样交叉污染 <0.005 %；色谱柱管理器可容纳并自动切换 6 根色谱柱，色谱柱具有 eCord™、主动预加热器功能（温控精度 ±0.1 ˚C）；连接 PDA 检测器。结合亚 2 µm 颗粒填料技术，UPC² 系统为正相 HPLC 取代技术，GC、反相 HPLC 的正交、互补技术。

Vc 的分析

色谱柱： ACQUITY UPC²™ CSH Fluoro-Phenyl 3.0 × 100 mm 1.7 µm
流动相： A：CO_2 B：甲醇（含 0.05 % H_3PO_4）
流速： 0.6 mL/min 进样体积：1 µL 柱温：30 ˚C
检测波长： 245 nm 动态背压（ABPR）：2000 Psi

表 1 . 梯度洗脱方法

时间 (min)	流速 (mL/min)	CO_2 比例 (%)	甲醇 : 水 (含 0.05 % H_3PO_4)(%)
Initial	0.6	92.0	8.0
0.2	0.6	92.0	8.0
3.0	0.6	65.0	35.0
3.5	0.6	65.0	35.0
4.3	0.6	92.0	8.0
7.0	0.6	92.0	8.0

采集 / 处理方法

数据文件使用 Empower3 软件进行采集和处理。并计算出 Vc 的相对含量。

结果

UPLC-UV 方法分析维生素 C

通过 UPLC-UV 分析所得出的色谱分离结果如图 1 所示，一定浓度校准标样 (上图) 和一份新鲜橘子果肉样品 (下图) 所得出色谱图的第一部分。同时，显示出在此色离谱条件下其他杂质成分对 Vc 分析造成干扰。

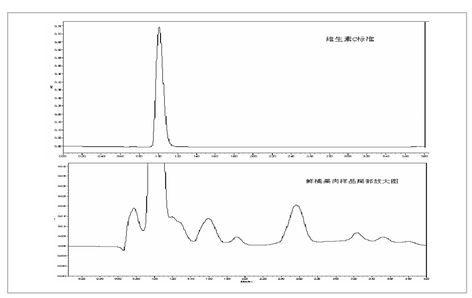

图1. 一定浓度Vc校准标样（上图）和一份新鲜橘子果肉样品（下图）的UPLC-UV色谱图的第一部分

UPC²-UV 方法分析维生素 C

通过 UPC²-UV 分析所得出的色谱分离结果如图 2 所示，一定浓度维生素 C 的标准 (上图) 和一份新鲜橘子果肉样品 (下图) 所得出色谱图的第二部分。

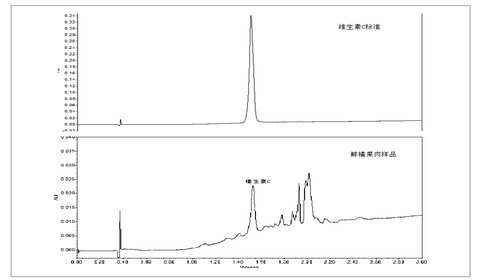

图2. 一定浓度Vc标准样（上图）和一份新鲜橘子果肉样品的UPC²-UV色谱图

下文图 3 显示出使用 UPC²-UV 对新鲜橘子果肉样品和不含 Vc 的橘子果皮样品同样处理后的分离情况，显示出在此色离谱条件下没有其他杂质成分对 Vc 分析造成干扰。

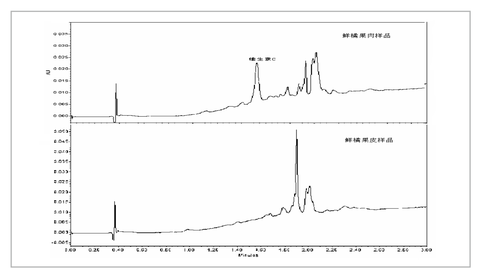

图3. 使用UPC²-UV对新鲜橘子果肉样品和不含Vc的橘子果皮样品同样处理后的分离情况。

方法比较

对于两种 Vc 分析方法而言，均在 5 mg/L~200 mg/L Vc 浓度范围内有较好的线性关系。方法对维生素 C 的检出限为 1.5 mg/kg，定量限为 5 mg/kg。对于 UPLC-UV，实际样品进行平行重复分析并确定全部 10 份实际样本的平均值。在 UPC²-UV 分析中，测定 10 份相同实际样本的平均值。关于两种方法所得含量结果的偏差介于 0.25 %-5.5 % 之间。

UPC² 分析参数对 Vc 峰形的改善

在 CO_2/ 甲醇体系下维生素 C 标准色谱图（上图），略显拖尾，峰宽较宽、峰形不尖锐。考虑到维生素 C 具有酸性，水溶性强，易被氧化等特点，在 CO_2/ 甲醇体系中加入 H_3PO_4，改性剂使色谱峰形更完美。优化后的色谱图见图 4：

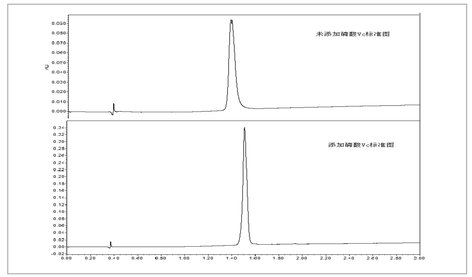

图4. 添加磷酸对Vc峰形的影响

结论

1. 本研究表明使用超高效合相色谱（UPC²）不仅适合分析非极性及中等极性化合物，也可以分析水溶性较强的化合物，如Vc。
2. UPC²由于特殊的流动相体系，使样品处理变得简单快捷。半小时内可以完成对新鲜水果中Vc的含量测定。
3. 与UPLC-UV方法相比，使用UPC²-UV方法可将样本处理量提高5倍。
4. 在使用相同样本制备方法的情况下，UPLC-UV方法其他杂质成分对Vc分析造成一定的干扰。而UPC²-UV方法没有其他杂质成分对Vc分析造成干扰。

参考文献

[1] 杨建洲，张荣莉 . 毛细管区带电泳分析果蔬中的维生素 C 含量 [J]. 分析化学 , 2002,1(30): 120.
[2] 成志强，孙成均，黎源倩 . 反相高效液相色谱法同时测定食品和多维片中 8 中水溶性维生素 [J]. 分析化学 , 2001, 9(29): 1068~1071.
[3] 高志杰，李静涛，饶小思 . 高效液相色谱 - 二极管阵列检测器法测定饮料中维生素 C 的研究 [J]. 中国卫生检验杂志 , 2006, 16(4): 446~447.
[4] 桑宏庆，王丽，柯林俊 . 采用褪色光度法测定维生素 C[J]. 饮料工业 ,2010,13(11):79~82.
[5] 陈再洁，郑建明，王智 . 高效液相色谱法测定维生素 C 片中 Vc 含量 [J]. 分析仪器 , 2008(6): 37~39.
[6] 胡应杰，潘康标，陈昌云，柳闽生 . 高效液相色谱法测定辣椒中维生素 C 的含量 [J]. 南京晓庄学院学报 , 2008, 11(6): 30~32.
[7] 魏峰，计双芝，彭铁军 . 维生素 C 的高效液相色谱检测方法研 [J]. 黄山学院学报 , 2010, 12(5): 47~49.
[8] 高申 . 食品中维生素 C 含量的测定 [J]. 天津化工 , 2002, 4:39~40.
[9] 崔容，李皎，王洪伟 . 水溶性维生素的高效液相色谱测定方法的研究 [J]. 中国卫生检验杂质 , 2005, 1(15): 55~57.
[10] 中国人民共和国卫生部药典委员会 . 中华人民共和国药典二部 . 北京 : 化学工业出版社 , 2005: 669.
[11] 杨宇民，沈毅 . 催化分光光度法测定生物样品中维生素 C[J]. 中国卫生检验杂志 , 2000, 10(5): 566~567.
[12] 陈秋丽，甘振威，张娅婕等 . 电位滴定法测定深色蔬菜和水果中的维生素 C[J]. 吉林大学学报 , 2004(5): 821~822.
[13] 冰冰，周晓光，朱泮民 . 紫外光度法测定药品中抗坏血酸的研究 [J]. 光谱实验室 , 2005, 22(1): 152~153.
[14] 曾美云，邱海鸥，郑洪涛等 . 动力学荧光法测定抗坏血酸 [J]. 分析试验室 , 2008, 27(1):16~18.
[15] 郝学宁，郝婵婵，刘雪莲 .HPLC 法测定果蔬中维生素 C[J]. 现代农业科技 , 2011, 3:30~31.
[16] Charlotte G, Alexandre G P, Laura W, Emilie R, Joelle V, Bertrand D, Jean-Luc V, Serge R, Julie S, Davy G. Journal of Chromatography A.2013(1282):172~177.
[17] Alexandre G P, Jean-Luc V, Davy G.Journal of Chromatography A.2012(1266):158~167.
[18] Alexandre G P, Julien B, Jean-Luc V, Davy G.Journal of Chromatography A.2012(1262):205~213.

如需下载此海报，请访问WWW.WATERS.COM/POSTERS

©2013 Waters Corporation