

安捷伦应用解决方案

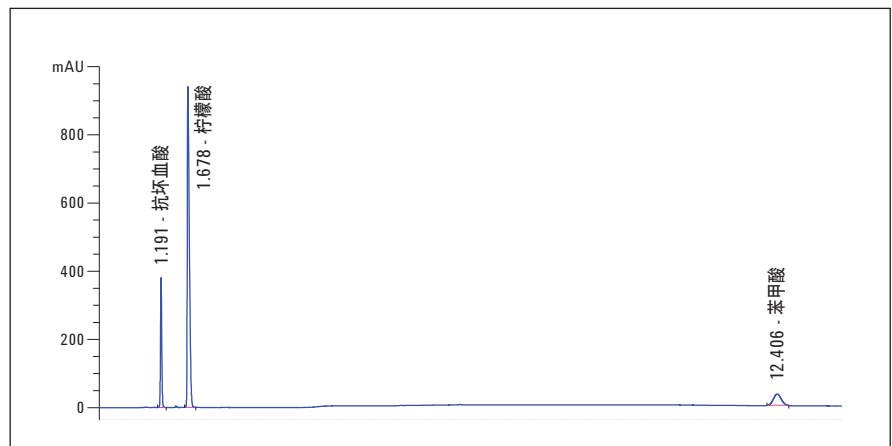
# 橙汁中抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的分析

## 应用报告

### 作者

Syed Salman Lateef  
Agilent Technologies, Inc.  
Bangalore, India

### 食品



### 摘要

食品添加剂，如抗氧化剂和防腐剂的添加，可以延长食品的保质期。在本文中，我们描述了一种定量分析橙汁中抗氧化剂（维生素 C）和防腐剂（柠檬酸、苯甲酸）的方法。该方法的开发是通过采用配备 Agilent Poroshell EC-C18 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity LC 系统来实现的。对样品分析进行部分方法学验证，证明其线性、稳定性，以及峰面积和保留时间的精密度符合要求。该方法中苯甲酸的检测限为 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在样品回收率的研究中，所有化合物的回收率都大于 90%。该方法通过采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统可有效地转换为一个快速的超高效液相色谱（UHPLC）方法。新方法分析速度比原方法快 5 倍，并且苯甲酸的检测限不变。两种方法都能被食品制造商有效采用，实现对食品添加剂的质量控制。



Agilent Technologies

## 引言

抗氧化剂，如抗坏血酸的抗氧化作用是通过减少环境中的氧来实现的。抗坏血酸优先被氧化并生成去氢抗坏血酸（DHA），从而防止了基质的氧化。防腐剂，如柠檬酸或苯甲酸防止或抑制食品中微生物的生长。在一些水果中天然含有抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸<sup>[1]</sup>，额外添加这些成分可延长果汁的保质期。虽然果汁中苯甲酸的含量法规限值为 400 µg/mL 到 600 µg/mL，但我们更加关注的是由苯甲酸和抗坏血酸在一定条件下反应生成的致癌物质苯<sup>[2,3]</sup>。

据报道，抗坏血酸的含量随时间、温度和其他因素变化而减少并最终生成 DHA。AOAC 官方方法 967.22 中检测分析维生素 C 含量的方法是首先氧化抗坏血酸生成 DHA，然后再进行衍生和荧光

检测。对于 UV 分析，DHA 在波长 220 nm 以上紫外吸收很小，而抗坏血酸在 244–265 nm 波长处有紫外吸收（取决于缓冲液的 pH 值<sup>[5]</sup>）。AOAC 官方方法 994.11 采用 UV 检测分析橙汁中的苯甲酸。

本文运用简单的样品提取步骤并采用 UV 检测器对抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸进行定量分析。

## 试剂和化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级。高纯水由 Milli Q 水净化系统制备（Millipore Elix 10，美国）。梯度使用的乙腈购自 Lab-Scan 公司（泰国），磷酸二氢钾购自 Fluka 公司（德国）。磷酸购自 Fluka 公司（瑞士）。抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸标准品均购自 Sigma-Aldrich 公司（印度）。购买在印度生产的知名国际品牌橙汁。

## 实验部分

### 仪器及软件

Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器和恒温器 (G1367E, G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B) 配备 10 mm 最大光强流通池

采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统实现了 UHPLC 分析的开发和运行。该系统由以下几个模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器和恒温器 (G4226A, G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A) 配备 10 mm 最大光强流通池

色谱柱：

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6×100 mm, 2.7 µm (部件号 697975-302)

工作站软件：

- B.04.02 版 Agilent ChemStation 工作站

## 色谱参数

反相液相色谱法和 UHPLC 法的色谱参数见表 1。

## 标准品制备

准确称取抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸，用流动相 A 分别配制浓度为 5000 µg/mL (ppm)、50000 ppm 和 100 ppm 标准储备液。超声 10 min 使苯甲酸溶解完全。用流动相 A 依次稀释上述三种标准储备液配制成线性浓度水平的标准溶液，见表 2。pH 值 2.5 的流动相 A 能防止抗坏血酸的电离。

## 样品制备

将适量的磷酸滴加到 5 mL 橙汁中，调节其 pH 值到 2.5 并涡旋混合。样品溶液在 1897×g 离心力下离心 5 min，通过 0.2 µm 安捷伦再生纤维素滤膜过滤（部件号 5185-5830）。过滤后的样品溶液直接用于样品分析。

## 步骤

5 µL 流动相 A 作为空白进样分析，每个线性浓度水平重复分析六次。每个浓度水平的峰面积和保留时间的数据被用于计算相对标准偏差 (RSD)。根据苯甲酸低线性浓度进样计算其检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。确定线性浓度之前，进样分析萃取后的橙汁样品以测定其中抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的大致浓度。以每个线性浓度水平的平均峰面积对溶液浓度作图得线性曲线。

## 色谱条件

参数	Agilent 1260 Infinity LC 系统		Agilent 1290 Infinity LC 系统	
TCC 温度	20 °C		20 °C	
采集速率	40 Hz		40 Hz	
DAD 波长 (nm)	210.0, 230.0, 243.5		210.0, 230.0, 243.5	
流通池	10 mm, 1 µL		10 mm, 1 µL	
样品恒温箱	4 °C		4 °C	
流动相 A	20 mM 磷酸二氢钾缓冲溶液 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )，用磷酸调节 pH 值至 2.5		20 mM 磷酸二氢钾缓冲溶液 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )，用磷酸调节 pH 值至 2.5	
流动相 B	60% 甲醇-40% 乙腈		60% 甲醇-40% 乙腈	
梯度	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0	5	0	5
	2	5	0.5	5
	2.1	25	0.6	25
	13.0	25	3.0	25
	13.1	90	3.1	70
	18.0	90	3.9	70
	18.1	5	4.0	5
	25.0	5	5.0	5
流速	1.0 mL/min		1.5 mL/min	
进样量	5 µL, 清洗端口 3.0 s		4 µL, 清洗端口 5.0 s	

表 1  
Agilent 1260 Infinity LC 和 Agilent 1290 Infinity LC 系统使用的色谱参数

浓度水平	抗坏血酸 (µg/mL)	柠檬酸 (µg/mL)	苯甲酸 (µg/mL)
1	10	5500	0.2
2	45	6000	1
3	63	6500	2
4	90	7000	3
5	108	7500	5
6	144	8000	10
7	162	8500	20
8	180	9000	35
9	225		50

表 2  
三种目标分析物的稀释溶液浓度

进行回收率实验时,将橙汁的 pH 值调节到 2.5。添加高浓度和低浓度的维生素 C、柠檬酸和苯甲酸到橙汁中,配制成高浓度和低浓度的加标样品。高浓度和低浓度加标样品的差异用于回收率计算。为评价该方法的耐用性,改变了四个关键的方法参数——流速  $\pm 2\%$ 、TCC 温度  $\pm 5\%$ 、进样量  $\pm 5\%$  和波长  $\pm 3\%$ 。

针对每一个变动,重复进样分析浓度分别为 108 ppm、7000 ppm 和 5 ppm 的维生素 C、柠檬酸和苯甲酸混合加标样品七次。分析了三种不同品牌橙汁中该三种酸性物质的含量。

随后将该方法成功转换成一个 UHPLC 方法。评估每个标准品的 LOD、LOQ 和线性,同时用峰面积和保留时间的 RSD 验证该方法的精密密度。

## 结果与讨论

### 分离与检测

采用多种色谱柱分离检测维生素 C、柠檬酸和苯甲酸。标准品用流动相 A 溶解,同时添加标准品到橙汁中,配制成加标样品用以测试基质干扰。安捷伦苯基-己基柱和 Poroshell EC-C18 色谱柱对水溶性标准品具有良好的分离性能。

Agilent Poroshell EC-C18 色谱柱被用于进一步实验。在一个低的 TCC 温度和 60% 甲醇 – 40% 乙腈的流动相 B 下,标准品峰与基质峰实现了良好的分离。pH 值 2.5 时,游离型抗坏血酸在波长 243.5 nm 处具有最大的紫外吸收。在这个波长下基质吸收较少,所以能简单地定量分析抗坏血酸。在波长 210.0 nm 处检测柠檬酸,而在波长 230.0 nm 处检测苯甲酸。因为抗坏血酸在低温下稳定,所以在整个分析过程中,自动进样器温度一直恒定在 4 °C。

Margolis 等人<sup>[6]</sup>报道指出当抗坏血酸储存在自动进样器样品瓶中 22h 后,其浓度会显著下降。结果显示,在不同批次的自动进样器样品瓶中抗坏血酸的浓度损失可高达 89%。然而, Margolis 的研究表明样品瓶在经过酸碱清洗后,抗坏血酸的最大损失只有 4%。

在本研究中,测试了三种不同的样品瓶:

- MS 校验样品瓶 (p/n 5190-2280)
- ALS 样品瓶 (p/n 5182-0716)
- 经酸碱清洗的 ALS 样品瓶

校准标准品储存于缓冲溶液中,并放置于 4 °C 的 ALS 恒温箱中,16h 后在所有三种样品瓶的样品中,抗坏血酸的峰面积损失为 3%,而柠檬酸和苯甲酸的峰面积损失均小于 1%。本研究表明这三种样品瓶都可以用于本分析。在本应用报告中,使用的是 MS 校验样品瓶。图1展示了采用 Agilent 1260 Infinity LC 系统分离抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的色谱图。一步升至 25% 流动相 B 的梯度程序对于从基质中洗脱出苯甲酸峰非常必要。维持高比例的有机相 13 min 以上,可确保完全去除来自橙汁的基质峰。

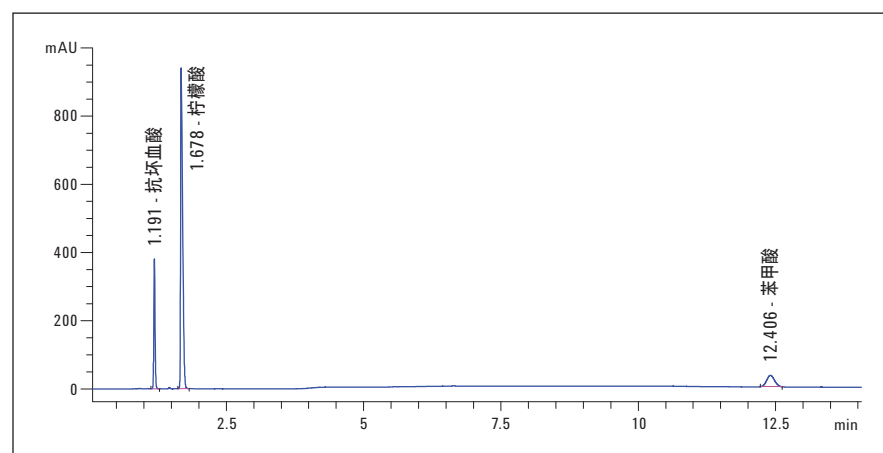


图 1  
采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸标准品的色谱图,于波长 230 nm 处获得

## 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

信噪比大于 3 时的被测物浓度可被认定为 LOD, 同时信噪比大于 10 时的被测物浓度可被认定为 LOQ。峰间值法用于计算噪音并与被分析物的峰高进行比较获得 S/N 值。在本应用报告中, 测定了苯甲酸的 LOD 和 LOQ。以 S/N = 3 和 S/N = 16 分别计算得 LOD 为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ , LOQ 为 0.2  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 线性

绘制了三种化合物不同浓度范围的校准曲线。苯甲酸在 LOQ 水平开始进行线性关系考察。每个浓度水平的校准溶液进样六次, 取其平均值用于建立校准曲线。校准曲线的线性范围涵盖了橙汁中三种化合物的一般浓度。图 3 展示了抗坏血酸的线性水平。三种化合物的 LOD、LOQ 值, 以及线性结果列于表 3。

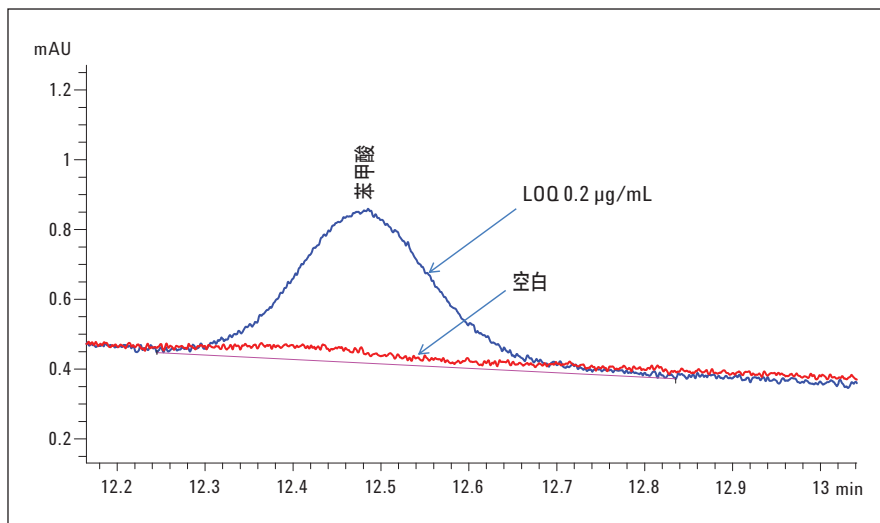


图 2  
0.2  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸校准液 (柱上量 1 ng, LOQ 水平) 与空白样品的叠加色谱图 (在 LOQ 水平)。该浓度下 S/N 为 16

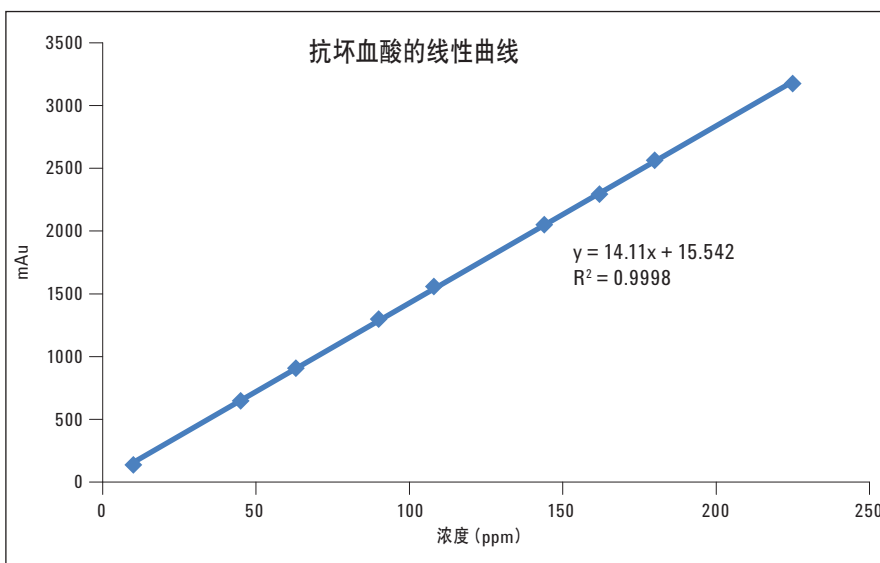


图 3  
10  $\mu\text{g/mL}$  到 225  $\mu\text{g/mL}$  抗坏血酸的线性水平及相关系数

编号	名称	LOD		LOQ		线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$R^2$ 值	浓度水平, 重复次数 = 6	准确度
		$\mu\text{g/mL}$	S/N	$\mu\text{g/mL}$	S/N				
1	抗坏血酸	—	—	—	—	10–225	0.9998	9	L1=87% (98%–100%)
2	柠檬酸	—	—	—	—	5500–9000	0.9995	8	99%–101%
3	苯甲酸	0.05	3	0.2	16	0.2–50	1	9	L1 = 106% 96–101%

表 3  
抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的线性水平。橙汁中三种化合物的含量在线性范围内

## 保留时间 (RT) 和峰面积的精密度

通过 RSD (%) 衡量各个线性水平化合物峰面积的精密度。如图 4 所示, 水平 1 (L1) 的苯甲酸具有最大的 RSD 值 1.9%。类似地, 保留时间的精密度计算结果表明其最大 RSD 值仅为 0.13%。低的峰面积和保留时间的 RSD 值表明本方法的重现性和精密度是可以被接受的。图 4 为峰面积 RSD 值的图示。

## 耐用性

为考察本方法的耐用性, 使用了分别含 108  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的标准混合溶液。改变四种关键方法参数 (流速、TCC 温度、进样量和波长) 进行测试, 重复七次进样采集数据, 并采用后六次重复进样的目标物峰面积进行计算。峰面积和保留时间允许的最大偏差分别设定为  $\pm 5\%$  和  $\pm 3\%$ 。

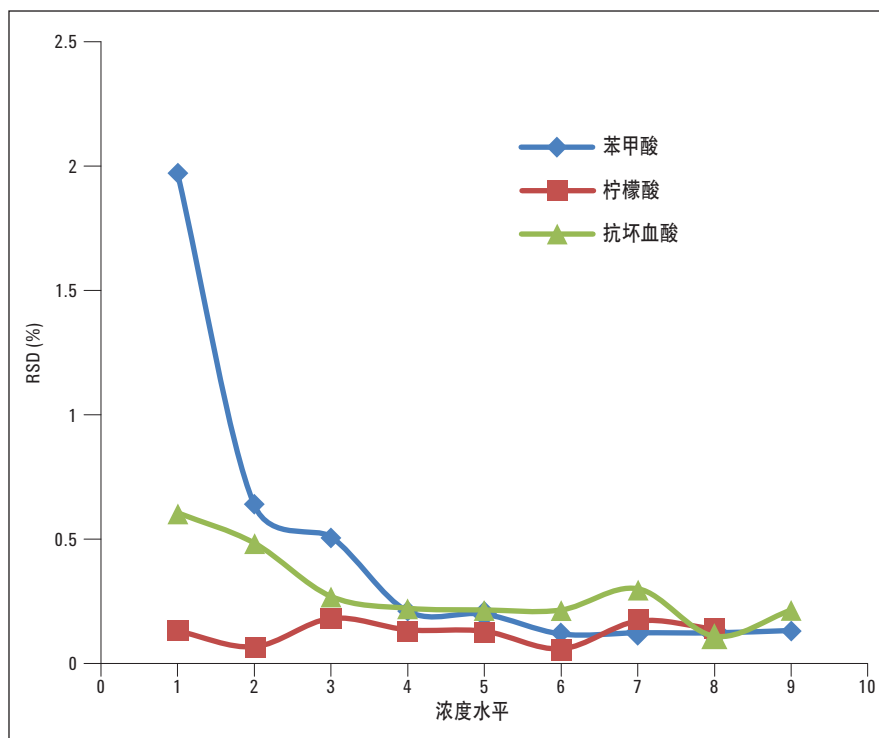


图 4  
每个浓度水平重复进样六次的峰面积 RSD (%)

参数	参数变化	抗坏血酸		在波长 230 nm 处柠檬酸的分离度	柠檬酸		苯甲酸	
		% 峰面积	% 保留时间	% 分离度	% 峰面积	% 保留时间	% 峰面积	% 保留时间
流速: 1.0 mL/min ± 2%	高: 1.02 mL/min	6.2	2.1	0.0	2.2	2.2	3.4	1.8
	低: 0.98 mL/min	3.3	1.8	0.6	1.2	1.3	0.5	1.7
TCC: 20 °C ± 5%	高: 21 °C	7.6	0.4	0.1	0.1	0.6	2.0	1.4
	低: 19 °C	18.1	0.5	0.7	0.4	0.9	2.7	1.5
进样量: 5 µL ± 5%	高: 5.25 µL	2.4	0.2	1.6	5.6	0.3	4.3	0.9
	低: 4.75 µL	8.2	0.0	0.5	5.0	0.2	6.1	0.2
波长: 210.0, 230.0, 243.5 nm ± 3 nm	高: 213.0, 233.3, 246.5 nm	2.5	0.1	0.1	5.6	0.2	5.2	0.5
	低: 207.0, 227.0, 240.5 nm	3.3	0.1	0.8	3.3	0.1	3.4	0.3

表 4  
方法耐用性实验结果。表 4 中红色数字表示峰面积的偏差已超出了标准方法所允许的偏差范围

表 4 总结了耐用性实验的结果。红色数字表示该组合所得峰面积的偏差已超过允许的偏差范围。流速改变 2% 导致了抗坏血酸的峰面积和保留时间均发生改变。尽管峰面积的偏差超出了 5% 的允许范围但保留时间的偏差却在允许的范围内。同样, 对于抗坏血酸, TCC 温度的微小偏差引起其峰面积的最大偏差。这些结果表明在分析过程中保持柱温恒定的重要性。柠檬酸和苯甲酸峰面积的重现性在很大程度上受进样精密度和波长准确度的影响。对 UV DAD 进行适当的校准, 并且通过准确度检验是十分重要的。耐用性研究结果表明在正常情况下运用该方法是非常可靠的, 同时其性能在很大程度上不受参数刻意改变的影响。当然, 有些参数十分关键, 必需严格控制。

### 样品回收率实验

由于无法进行空白试验, 所以对三种目标化合物进行加标回收率实验。将一个含抗坏血酸 (300 µg)、柠檬酸 (4000 µg) 和苯甲酸 (20 µg) 的低浓度标准混合溶液添加到橙汁中 (用磷酸调节 pH 到 2.5)。另一高浓度混合标准溶液含抗坏血酸 (600 µg)、柠檬酸 (8000 µg) 和苯甲酸 (40 µg) 也同样添加到另一份橙汁样品中。如上所述, 从橙汁样品中提取目标分析物。利用校准曲线 (见第 5 页图 3 及

“线性”段落), 相应峰面积被计算转换为浓度值。用计算得到的高浓度加标样品浓度减去低浓度加标样品浓度, 与高低不同加标样品加标量的差比较计算回收率。这种减差法可以避免实验中任何化合物/基质的降解产物造成的影响。进行三次平行加标回收率实验, 其结果列于表 5。由于抗坏血酸最大吸收波长的 243.5 nm 处具有最小的背景吸收, 因此其获得了极佳的回收率。三种目标分析物的回收率都大于 90%。

化合物名称	回收率 (%)
抗坏血酸	100 ± 3
柠檬酸	91 ± 12
苯甲酸	98 ± 6

表 5  
三次平行加标回收率实验的结果

## 样品分析

在本研究中, 采用上述过程对橙汁中的抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸进行提取并采用所建立的色谱分析方法进行定量分析。分析了三种不同的橙汁样品(每种样品重复三次), 分别标记为 O-juice 1、O-juice 2 和 O-juice 3。样品制备如上所述。分析测试结果代入线性方程计算得分析物的浓度(表 6), 三种品牌的橙汁中三种分析物的浓度有差异, 结果列于表 6。O-juice 1 的营养标签上标明含 111  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗坏血酸, 但其实际测得量为 145  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这可能是因为橙汁中天然存在着抗坏血酸, 从而使其含量增加, 又或者是由产品批次的差异造成。虽然 O-juice 1 标明未添加任何防腐剂, 但还是发现有痕量的苯甲酸存在。O-juice 3 标明添加了抗氧化剂 E300 和酸性调节剂 E330(未标明用量), 它们分别对应着抗坏血酸和柠檬酸。用本方法对两种化合物进行了检测和定量分析。另外, 在该样品中还检测到了浓度为 2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的苯甲酸, 见图 5。

橙汁样品	抗坏血酸 $\mu\text{g}/\text{mL}$	柠檬酸 $\mu\text{g}/\text{mL}$	苯甲酸 $\mu\text{g}/\text{mL}$
O-juice1	145 $\pm$ 2	8895 $\pm$ 21	0.62 $\pm$ 0.07
O-juice 2	93 $\pm$ 3	8188 $\pm$ 43	0 $\pm$ 0
O-juice 3	35.4 $\pm$ 0.3	3160 $\pm$ 8	2.25 $\pm$ 0.06

表 6  
三种不同品牌橙汁中抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的含量

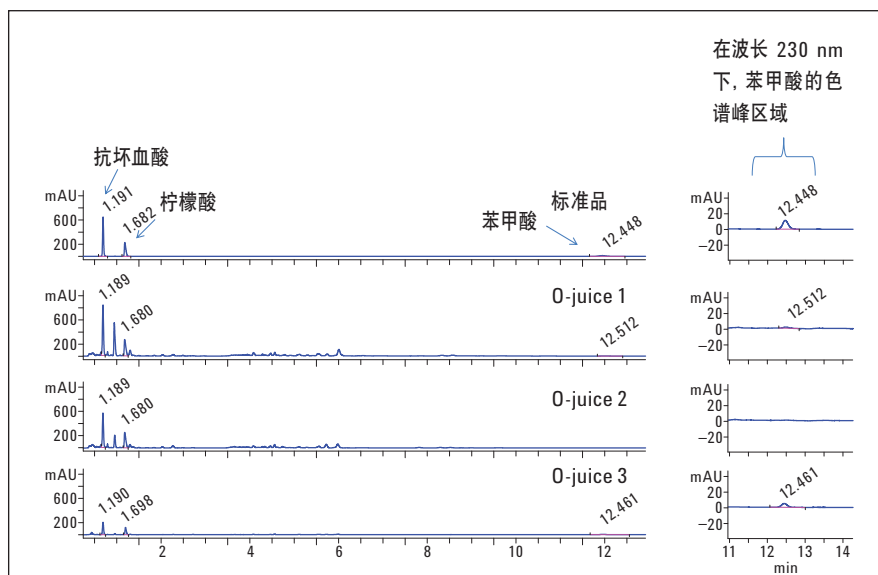


图 5  
在波长 230 nm 处, 检测三种不同品牌橙汁中的苯甲酸

## UHPLC方法

通过采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统将 HPLC 分析方法转换成一个 UHPLC 分析方法。通过采用一个更短的色谱柱和相同的流动相开发出了一种更简单、更快速的分析方法。UHPLC 方法只需 5 min 即可完成整个分析,如图 6 所示,而一般的 HPLC 方法则需用时 25 min。提高 5 倍分析速度的同时也节省了 68% 的溶剂。该快速分析方法也解决了在分析过程中抗坏血酸的损失问题。这里应该注意的是在 UHPLC 方法中有机相 B 的最大比例为 70% 而不是 90%。探讨了 90% 和 70% 两种有机相比例的可行性,其都能运用在基于 Agilent 1290 LC Infinity 系统的方法上。苯甲酸的检测限是 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,定量限是 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $S/N = 16$ ),这与用 Agilent 1260 Infinity LC 方法所获得的结果一致。抗坏血酸的校准曲线呈线性,如图 7 所示。

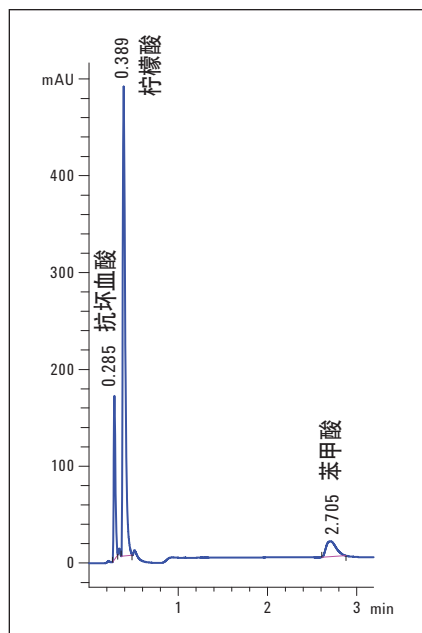


图 6  
采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (3.0 × 75 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  粒径) 的 UHPLC 方法分离抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸标准品

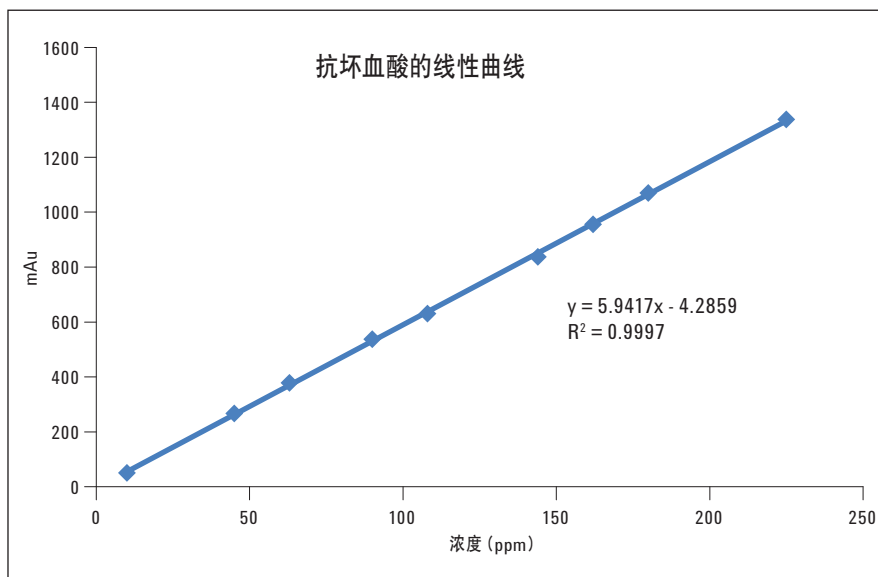


图 7  
采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统分析得到抗坏血酸浓度在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  到 225  $\mu\text{g}/\text{mL}$  呈线性 (50 ng 到 1125 ng 柱上量)

相关浓度水平的峰面积和保留时间偏差的 RSD (%) 计算与 HPLC 方法相同。结果显示所有浓度水平的峰面积偏差的 RSD (%) 均小于 2.5%，如图 8 所示。保留时间偏差的 RSD (%) 均小于 0.5%。

## 结论

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离和定量分析了抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸。开发了一种部分验证的耗时 25 min 的分析方法。采用该方法在少量基质干扰或无基质干扰的情况下定量分析了各种橙汁中抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的含量，同时获得了 >90% 的回收率。采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统通过提高流速和采用更短的色谱柱将该方法有效地转换成一个用时仅 5 min 的 UHPLC 方法。两种方法的线性和精密度均符合要求。因此这两种方法均能用于橙汁质量控制中分析抗坏血酸、柠檬酸和苯甲酸的含量。

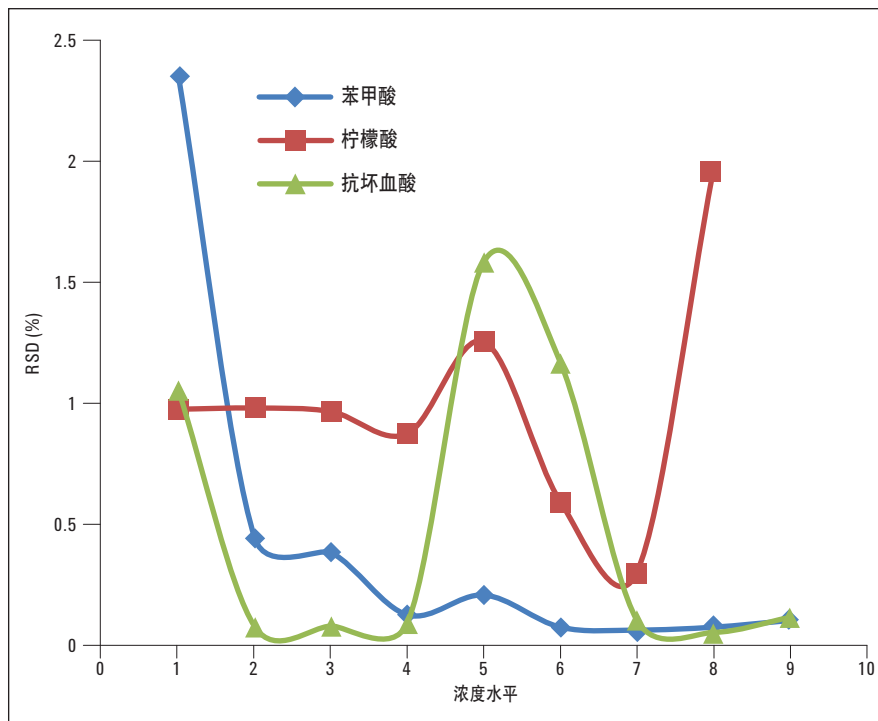


图 8  
UHPLC 方法用 RSD (%) 衡量峰面积的精密度，每个浓度水平重复进样六次

## 参考文献

1. INCHEM chemical safety information for intergovernmental organization: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad26.htm#SubSectionNumber:5.1.1>
2. US FDA, Food contamination and adulteration: Data on Benzene in Soft Drinks and Other Beverages Data through May 16, 2007 <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Benzene/ucm055815.htm>
3. L.K Gardner, G.D Lawrence, "Benzene Production from Decarboxylation of Benzoic Acid in the Presence of Ascorbic Acid and a Transition-Metal Catalyst," *J. Agric. Food. Chem.*, 41: 693-695, 1993.
4. K. Zerdine; M.L. Rooney; J Vermue, "The Vitamin C Content of Orange Juice packed in an Oxygen Scavenger Material," *Food Chemistry*, 82: 387-395, 2003.
5. L. Novakova; P. Solich; D. Solichova, "HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acids," *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 942-958, 2008.
6. S.A. Margolis; E. Park, "Stability of Ascorbic Acid in Solutions Stored in Autosampler Vials," *Clinical Chemistry*, 47: 1463-1464 2001.

**[www.agilent.com/chem/  
lc:cn](http://www.agilent.com/chem/lc:cn)**

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011  
2011年9月1日, 中国印刷  
出版号 5990-8720CHCN

