



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0869—2017
代替 SN/T 0869—2000

出口饮料中抗坏血酸的测定

Determination of ascorbic acid in beverage for export

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

出口饮料中抗坏血酸的测定

SN/T 0869—2017

*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字

2018年4月第一版 2018年4月第一次印刷

印数 1—500

*

书号: 155066·2-32884 定价 16.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 0869—2000《进出口饮料中维生素 C 的测定方法》。

本标准与 SN/T 0869—2000 相比,主要变化如下:

——修改了标准名称;

——增加了高效液相色谱法作为本标准的第一法;原标准的荧光法作为第二法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:樊祥、王传现、陈迪、张润何、张弛、张秀芹、倪昕路、韩丽、王敏、邓晓军。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 0869—2000。

出口饮料中抗坏血酸的测定

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法、荧光法测定出口饮料中抗坏血酸的测定方法。

本标准第一法适用于出口饮料中的 L(+)-抗坏血酸总量和 D(+)-抗坏血酸的测定。第二法适用于出口饮料中 L(+)-抗坏血酸总量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗坏血酸 ascorbic acid

一种含有 6 个碳原子的酸性多羟基化合物,分 L 型和 D 型。

3.2

L(+)-抗坏血酸 L(+)-ascorbic acid

左式右旋光抗坏血酸。具有强还原性,对人体具有生物活性。

3.3

D(+)-抗坏血酸 D(+)-ascorbic acid

又称异抗坏血酸。具有强还原性,但对人体基本无生物活性。

3.4

L(+)-脱氢抗坏血酸 Dehydro-L(+)-ascorbic acid

L(+)-抗坏血酸极易被氧化为 L(+)-脱氢抗坏血酸,L(+)-脱氢抗坏血酸亦可被还原为 L(+)-抗坏血酸。

3.5

L(+)-抗坏血酸总量 total ascorbic acid

将试样中 L(+)-脱氢抗坏血酸还原成 L(+)-抗坏血酸后测得的 L(+)-抗坏血酸总量。

第一法 高效液相色谱法

4 方法提要

试样中的抗坏血酸用偏磷酸溶解超声提取后,L(+)-脱氢抗坏血酸经 L-半胱氨酸溶液进行还原后,以离子对试剂为流动相,经反相色谱柱分离液相色谱紫外检测器(波长 245 nm)测定 L(+)-抗坏血

酸总量和 D(+)-抗坏血酸。以色谱峰的保留时间定性,外标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1 偏磷酸(HPO_3)_n:纯度 $\geq 38\%$ 。
- 5.2 磷酸三钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.3 磷酸二氢钾。
- 5.4 磷酸:85%。
- 5.5 L-半胱氨酸($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$):优级纯。
- 5.6 十六烷基三甲基溴化铵($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$):色谱纯。
- 5.7 甲醇:色谱纯。
- 5.8 偏磷酸溶液(200 g/L):称取 200 g(精确至 0.1 g)偏磷酸(5.1),溶于水并稀释至 1 L,此溶液保存于 4℃ 的环境下可保存一个月。
- 5.9 偏磷酸溶液(20 g/L):吸取 50 mL 200 g/L 偏磷酸溶液,用水稀释至 500 mL。
- 5.10 磷酸三钠溶液(100 g/L):称取 100 g(精确至 0.1 g)磷酸三钠,溶于水并稀释至 1 L。
- 5.11 L-半胱氨酸溶液(40 g/L):称取 20 g L-半胱氨酸,溶于水并稀释至 500 mL,临用时配制。
- 5.12 L(+)-抗坏血酸标准品(CAS 号:50-81-7):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 5.13 D(+)-抗坏血酸标准品(CAS 号:89-65-6):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 5.14 L(+)-抗坏血酸标准储备溶液(1.000 mg/mL):准确称取 L(+)-抗坏血酸标准品 0.01 g(精确至 0.01 mg),用 20 g/L 的偏磷酸溶液定容至 10 mL,该储备液在 2℃~8℃ 避光条件下可保存一周。
- 5.15 D(+)-抗坏血酸标准储备溶液(1.000 mg/mL):准确称取 D(+)-抗坏血酸标准品 0.01 g(精确至 0.01 mg),用 20 g/L 的偏磷酸溶液定容至 10 mL,该储备液在 2℃~8℃ 避光条件下可保存一周。
- 5.16 抗坏血酸混合标准系列工作液:分别吸取 L(+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸标准储备液 0 mL, 0.05 mL, 0.50 mL, 1.0 mL, 2.5 mL, 5.0 mL,用 20 g/L 的偏磷酸溶液定容至 100 mL。标准系列工作液中 L(+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸的浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$,避光保存,保存时间为 24 h。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪:配有二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 6.2 pH 计:精度为 0.01。
- 6.3 天平:感量为 0.1 g、1 mg、0.01 mg。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 离心机:转速 $\geq 4\,000\text{ r/min}$ 。
- 6.6 均质机。
- 6.7 滤膜:0.45 μm 水相膜。
- 6.8 振荡器。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

固体或半固体样品用组织捣碎机粉碎混匀,液体样品混合均匀,混匀后样品置于密闭容器中,待称

样处理,样品制备后应尽快完成试验。

7.2 试样保存

试验于 0℃~4℃ 密闭保存;在制样的操作过程中及样品保存期间,应避免样品长时间与大量空气接触,防止样品中被测物质受到氧化导致被测物含量发生变化。

8 分析步骤

8.1 提取

称取约 1 g(精确至 0.01 g)固体试样,或量取 5 mL±0.05 mL 液体试样于 50 mL 烧杯中,用偏磷酸溶液(5.9)将试样转移至 50 mL 容量瓶中,振摇溶解并定容。摇匀,全部转移至 50 mL 离心管中,超声提取 5 min 后,于 4 000 r/min 离心 5 min,准确吸取 20 mL 上述离心后的上清液于 50 mL 离心管中,加入 10 mL L-半胱氨酸溶液(5.11),用磷酸三钠溶液(5.10)调节 pH 至 7.0~7.2,振荡 5 min。再用磷酸调节 pH 至 2.5~2.8,将试液全部转移至 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。混匀后过 0.45 μm 水相滤膜后,供 HPLC 测定。

注:整个检测过程尽可能在避光条件下进行。

8.2 液相色谱测定

8.2.1 色谱参考条件

8.2.1.1 色谱柱: C₁₈, 250 mm×4.6 mm(内径), 5 μm, 或性能相当者。

8.2.1.2 柱温: 室温。

8.2.1.3 流动相: A: 6.8 g 磷酸二氢钾和 0.91 g 十六烷基三甲基溴化铵, 用水溶解并定容至 1 L(用磷酸调 pH 至 2.5~2.8); B: 100% 甲醇。按 A : B = 98 : 2 混合, 过 0.45 μm 滤膜, 超声脱气。

8.2.1.4 流速: 0.7 mL/min。

8.2.1.5 进样量: 20 μL。

8.2.1.6 检测器: 二极管阵列检测器或紫外检测器。

8.2.1.7 检测波长: 245 nm。

8.2.2 标准曲线制作

分别对抗坏血酸混合标准系列工作溶液(5.16)进行测定, 以标准溶液的质量浓度(μg/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

8.2.3 定量测定

待测样液中 L(+)-抗坏血酸总量[或 D(+)-抗坏血酸]的响应值应在标准曲线线性范围内, 超过线性范围则应稀释后再进样检测。L(+)-抗坏血酸总量、D(+)-抗坏血酸标准色谱图参见附录 A 中图 A.1。

8.3 空白试验

除不加试样外, 均按上述测定步骤进行。

9 结果计算和表述

试样中 L(+)-抗坏血酸总量[或 D(+)-抗坏血酸]的含量按式(1)计算获得, 计算结果应保留 3 位

有效数字:

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times V}{m \times 1\,000} \times F \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——试样中 L(+)-抗坏血酸总量[或 D(+)-抗坏血酸]的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- c_1 ——样液中 L(+)-抗坏血酸总量[或 D(+)-抗坏血酸]的测定值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_0 ——样品空白液中 L(+)-抗坏血酸总量[或 D(+)-抗坏血酸]的测定值,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);
- 1 000 ——由 $\mu\text{g/mL}$ 换算成 mg/mL 的换算因子;
- F ——稀释倍数(2.5);
- 100 ——由 mg/g 换算成 mg/100 g 的换算因子。

10 定量限和回收率

10.1 定量限

本方法 L(+)-抗坏血酸总量和 D(+)-抗坏血酸的定量限(LOQ)均为 0.4 mg/100 g。

10.2 回收率

回收率见表 1。

表 1 回收率

样品	添加浓度/(mg/100 g)	L(+)-抗坏血酸总量 回收率范围/%	D(+)-抗坏血酸回 收率范围/%
果汁	0.40	85.0~102	87.5~110
	4.00	89.0~100	90.2~101
	40.0	89.8~103	89.2~101
浓缩果汁	2.00	86.0~110	85.0~108
	20.0	87.7~106	85.2~103
	200	88.0~102	89.1~98.1
含乳饮料	0.40	85.0~105	87.5~108
	4.00	88.0~103	89.0~103
	40.0	88.0~98.5	89.0~104
碳酸饮料	0.40	87.5~108	85.0~102
	4.00	90.5~104	88.8~105
	40.0	89.0~102	88.0~102
固体饮料	2.00	85.0~110	89.5~102
	20.0	89.2~109	87.5~105
	200	88.6~102	88.0~105

第二法 荧光法

11 方法提要

试样中 L(+)-抗坏血酸经活性炭氧化为 L(+)-脱氢抗坏血酸后,与邻苯二胺(OPDA)反应生成有荧光的喹啉(quinoxaline),其荧光强度与 L(+)-抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比,以此测定试样中 L(+)-抗坏血酸总量。

注: L(+)-脱氢抗坏血酸与硼酸可形成复合物而不与 OPDA 反应,以此排除试样中荧光杂质产生的干扰。

12 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 12.1 偏磷酸(HPO_3)_n:含量(以 HPO_3 计) $\geq 38\%$ 。
- 12.2 冰乙酸(CH_3COOH):浓度约为 30%。
- 12.3 硫酸(H_2SO_4):浓度约为 98%。
- 12.4 乙酸钠(CH_3COONa)。
- 12.5 硼酸(H_3BO_3)。
- 12.6 邻苯二胺($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$)。
- 12.7 百里酚蓝($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{S}$)。
- 12.8 活性炭粉。
- 12.9 偏磷酸-乙酸溶液:称取 15 g 偏磷酸,加入 40 mL 冰乙酸及 250 mL 水,加温,搅拌,使之逐渐溶解,冷却后加水至 500 mL。于 4℃ 冰箱可保存 7 天~10 天。
- 12.10 硫酸溶液(0.15 mol/L):取 8.3 mL 硫酸,小心加入水中,再加水稀释至 1 000 mL。
- 12.11 偏磷酸-乙酸-硫酸溶液:称取 15 g 偏磷酸,加入 40 mL 冰乙酸,滴加 0.15 mol/L 硫酸溶液至溶解,并稀释至 500 mL。
- 12.12 乙酸钠溶液(500 g/L):称取 500 g 乙酸钠,加水至 1 000 mL。
- 12.13 硼酸-乙酸钠溶液:称取 3 g 硼酸,用 500 g/L 乙酸钠溶液溶解并稀释至 100 mL。临用时配制。
- 12.14 邻苯二胺溶液(200 mg/L):称取 20 mg 邻苯二胺,用水溶解并稀释至 100 mL,临用时配制。
- 12.15 酸性活性炭:称取约 200 g 活性炭粉(75 μm ~177 μm),加入 1 L 盐酸(1+9),加热回流 1 h~2 h,过滤,用水洗至滤液中无铁离子为止,置于 110℃~120℃ 烘箱中干燥 10 h,备用。
- 12.16 检验铁离子方法:利用普鲁士蓝反应。将 20 g/L 亚铁氰化钾与 1% 盐酸等量混合,将上述洗出滤液滴入,如有铁离子则产生蓝色沉淀。
- 12.17 百里酚蓝指示剂溶液(0.4 mg/mL):称取 0.1 g 百里酚蓝,加入 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液约 10.75 mL,在玻璃研钵中研磨至溶解,用水稀释至 250 mL。(变色范围:pH 等于 1.2 时呈红色;pH 等于 2.8 时呈黄色;pH 大于 4 时呈蓝色)
- 12.18 L(+)-抗坏血酸标准品($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 12.19 L(+)-抗坏血酸标准溶液(1.000 mg/mL):称取 L(+)-抗坏血酸 0.05 g(精确至 0.01 mg),用偏磷酸-乙酸溶液溶解并稀释至 50 mL,该贮备液在 2℃~8℃ 避光条件下可保存一周。
- 12.20 L(+)-抗坏血酸标准工作液(100.0 $\mu\text{g/mL}$):吸取 L(+)-抗坏血酸标准液 10.00 mL,用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100 mL,临用时配制。

13 仪器和设备

荧光分光光度计:具有激发波长 338 nm 及发射波长 420 nm,配有 1 cm 比色皿。

14 分析步骤

14.1 提取

称取约 100 g(精确至 0.1 g)试样,加 100 g 偏磷酸-乙酸溶液,倒入捣碎机内打成匀浆,用百里酚蓝指示剂测试匀浆的酸碱度。如呈红色,即称取适量匀浆用偏磷酸-乙酸溶液稀释;若呈黄色或蓝色,则称取适量匀浆用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液稀释,使其 pH 为 1.2。匀浆的取用量根据试样中抗坏血酸的含量而定。当试样液中抗坏血酸含量在 40 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 之间,一般称取 20 g(精确至 0.01 g)匀浆,用相应溶液稀释至 100 mL,过滤,滤液备用。

14.2 测定

14.2.1 氧化处理:分别准确吸取 50 mL 试样滤液及抗坏血酸标准工作液于 200 mL 具塞锥形瓶中,加入 2 g 活性炭,用力振摇 1 min,过滤,弃去最初数毫升滤液,分别收集其余全部滤液,即为试样氧化液和标准氧化液,待测定。

14.2.2 分别准确吸取 10 mL 试样氧化液于两个 100 mL 容量瓶中,作为“试样液”和“试样空白液”。

14.2.3 分别准确吸取 10 mL 标准氧化液于两个 100 mL 容量瓶中,作为“标准液”和“标准空白液”。

14.2.4 于“试样空白液”和“标准空白液”中各加 5 mL 硼酸-乙酸钠溶液,混合摇动 15 min,用水稀释至 100 mL,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 2 h~3 h,取出待测。

14.2.5 于“试样液”和“标准液”中各加 5 mL 的 500 g/L 乙酸钠溶液,用水稀释至 100 mL,待测。

注:整个检测过程尽可能在避光条件下进行。

14.3 标准曲线的制备

准确吸取上述“标准液”[L(+)-抗坏血酸含量 10 $\mu\text{g/mL}$]0.5 mL,1.0 mL,1.5 mL,2.0 mL,分别置于 10 mL 具塞刻度试管中,用水补充至 2.0 mL。另准确吸取“标准空白液”2 mL 于 10 mL 带盖刻度试管中。在暗室迅速向各管中加入 5 mL 邻苯二胺溶液,振摇混合,在室温下反应 35 min,于激发波长 338 nm、发射波长 420 nm 处测定荧光强度。以“标准液”系列荧光强度分别减去“标准空白液”荧光强度的差值为纵坐标,对应的 L(+)-抗坏血酸含量为横坐标,绘制标准曲线或计算直线回归方程。

14.4 试样测定

分别准确吸取 2 mL“试样液”和“试样空白液”于 10 mL 具塞刻度试管中,在暗室迅速向各管中加入 5 mL 邻苯二胺溶液,振摇混合,在室温下反应 35 min,于激发波长 338 nm、发射波长 420 nm 处测定荧光强度。以“试样液”荧光强度减去“试样空白液”的荧光强度的差值于标准曲线上查得或回归方程计算测定试样溶液中 L(+)-抗坏血酸总量。

15 结果计算和表述

试样中 L(+)-抗坏血酸总量,结果以毫克每百克表示,按式(2)计算获得,计算结果应保留 3 位有效数字:

$$X = \frac{c \times V}{m} \times F \times \frac{100}{1\ 000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中 L(+)-抗坏血酸的总量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

c ——由标准曲线查得或回归方程计算的进样液中 L(+)-抗坏血酸的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——荧光反应所用试样体积,单位为毫升(mL);

m ——实际检测试样质量,单位为克(g);

F ——试样溶液的稀释倍数。

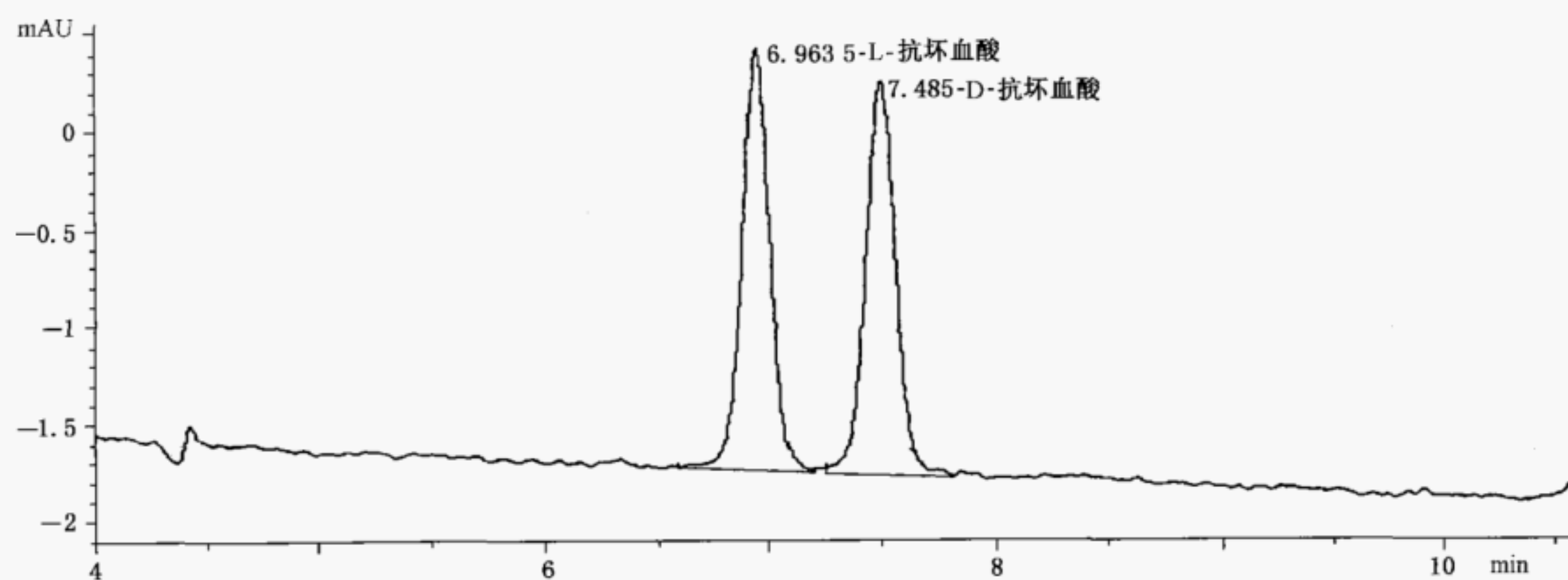
16 定量限

方法 L(+)-抗坏血酸总量的定量限(LOQ)为 0.7 mg/100 g。

附录 A

(资料性附录)

L(+)-抗坏血酸总量、D(+)-抗坏血酸标准液相色谱图

L(+)-抗坏血酸总量和 D-抗坏血酸标准液相色谱图(0.5 $\mu\text{g/mL}$)见图 A.1。图 A.1 L(+)-抗坏血酸总量和 D-抗坏血酸标准液相色谱图(0.5 $\mu\text{g/mL}$)

SN/T 0869-2017

书号:155066 • 2-32884

定价: 16.00 元