

5种甜味添加剂的反相高效液相色谱法同时测定

刘丽敏, 彭敬东

(西南大学 化学化工学院, 重庆 400715)

摘要:建立了同时测定5种人工合成甜味剂阿斯巴甜、糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、纽甜的反相高效液相色谱分析方法。以 Synergi Fusion-RP 柱为分离柱, 20 mmol/L 硫酸铵缓冲溶液 (pH 4.4) - 乙腈为流动相, 梯度洗脱。采用二极管阵列检测器进行检测, 整个分离过程在 9 min 内完成。样品加标回收率为 89% ~ 107%; 相对标准偏差小于 3.2%。该法可用于食品和饮料中 5 种甜味剂的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 人工合成甜味剂; 阿斯巴甜; 糖精钠; 甜蜜素; 安赛蜜; 纽甜

中图分类号: O657.72; TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2008)05-0549-04

Simultaneous Determination of Five Sweeteners by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

LIU Li-min, PENG Jing-dong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: A simple method was proposed for the simultaneous separation and determination of five artificial sweeteners, acesulfame potassium (AK), saccharin sodium (SA), sodium cyclamate (SC), aspartame (ASP) and neotame (NTM) by reversed-phase high performance liquid chromatography. The separation was carried out on a Synergi Fusion-RP (150 mm × 4.6 mm; 4 μm) column with 20 mmol/L (NH₄)₂SO₄ (pH 4.4) - acetonitrile as mobile phase, gradient elution. The qualification and quantitation were accomplished using a diode array detector. Measurement could be finished in 9 min with recoveries for real samples ranging from 89% to 107% and the relative standard deviation below 3.2%. This method can be used for the routine analysis of these additives in food and beverage.

Key words: high performance liquid chromatography; artificial sweeteners; aspartame (ASP); saccharin (SA); sodium cyclamate (SC); acesulfame potassium (AK); neotame (NTM)

近年来, 食品中的各种添加剂, 特别是人工合成甜味剂的使用情况越来越受到人们的重视^[1]。常见的人工合成甜味剂有糖精钠 (SA)、乙酰磺胺酸钾 (安赛蜜, AK)、天门冬酰苯丙氨酸甲酯 (阿斯巴甜, ASP)、环己基氨基磺酸钠 (甜蜜素, SC)、纽甜 (NTM) 等。为了消除单一甜味剂的副作用, 改善口感, 提高甜味剂的甜味稳定性, 大多数甜味剂由多种成分复合使用^[2]。国家卫生标准对人工甜味剂的加入量有严格规定^[3], 为了保证食品质量安全, 须建立一种能够同时测定食品中多种甜味剂的方法。目前, 大多数分析方法一般可测定 1 ~ 3 种甜味剂, 测定方法有紫外分光光度法^[4]、高效液相色谱法^[1,5-6]、离子色谱法^[7-8]、毛细管电泳法^[9-10]。同时测定上述 5 种甜味剂的方法极少见报道。

本文建立了反相高效液相色谱同时测定糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜、甜蜜素和纽甜的新方法。对实验条件进行了优化, 检测结果符合分析要求。该方法可用于多种样品的测定, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1315B 二极管阵列检测器; KH-3200B 超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海荣光生化仪器厂); pH-3C 型精密 pH 计 (上海精密仪器科学有限公司); Strata-X 固相萃取柱 (Phenomenex, USA)。乙腈 (色谱纯); 硫酸铵 (分析纯); 糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜、甜蜜素和纽甜标准品由上海美农饲料有限公司提供。实验用水为重

收稿日期: 2007-07-03; 修回日期: 2007-09-10

第一作者: 刘丽敏 (1979-), 女, 河南周口人, 硕士研究生

通讯作者: 彭敬东, Tel: 023-68254290, E-mail: hxpengjd@swu.edu.cn

蒸水。

1.2 色谱条件

色谱柱: Synergi Fusion-RP(150 mm × 4.6 mm, 4 μm)(Phenomenex, USA); 流动相为 20 mmol/L 硫酸铵(用 H₃PO₄ 调 pH 至 4.4) - 乙腈; 梯度洗脱程序: 0 ~ 8 min, 乙腈从 10% 变为 50%; 流速 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长为 200、226 nm; 进样量为 20 μL。

1.3 样品溶液的制备

1.3.1 标准溶液的配制 精密称取糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜、甜蜜素和纽甜标样各 40 mg, 用流动相溶解后定容于 50 mL 容量瓶中, 制成标准储备液。再用储备液配制成一系列不同浓度的 5 种标样的混合溶液。

1.3.2 样品预处理 将市场采集的样品稀释液均经 0.45 μm 滤膜过滤, 然后进样测定。样品前处理方法参照文献[1]。碳酸饮料和果汁: 先将样品超声脱气, 再用水适当稀释。茶饮料: 取适量样品, 用水适当稀释后超声脱气 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 经固相萃取柱(事先经 3 mL 乙腈活化, 再用 3 mL 水平衡)萃取。然后依次用 2 mL 20 mmol/L 的硫酸铵和 2 mL 乙腈洗脱, 所有流出液收集于 10 mL 容量瓶中, 用水定容。含乳饮料: 取适量样品, 用水适当稀释后超声脱气 10 min, 然后取出 2 mL, 依次加入 2 mL 0.08 mol/L K₄[Fe(CN)₆] 和 2 mL 0.25 mol/L 乙酸锌溶液, 剧烈振摇 1 min, 用水定容于 10 mL 容量瓶中, 然后转入离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 经固相萃取柱萃取, 以下操作同茶饮料。蜜饯: 将样品切碎, 称取适量置于 25 mL 容量瓶中, 加入 15 mL 水, 超声 20 min, 加水定容至 25 mL。取上清液 2 mL, 经固相萃取柱萃取, 以下操作同茶饮料。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

本文采用二极管阵列检测器, 在 195 ~ 400 nm 范围内对所有分析物进行紫外波长扫描。结果发现, 5 种化合物的最大吸收波长分别为: 200 nm(阿斯巴甜), 200 nm(甜蜜素), 206 nm(糖精钠), 226 nm(安赛蜜), 210 nm(纽甜)。选择 200 nm 波长对糖精钠、阿斯巴甜、甜蜜素、纽甜进行测定, 选择 226 nm 波长对安赛蜜进行测定。

2.2 流动相的选择

因为甲醇的截止波长为 210 nm 左右, 乙腈的截止波长为 190 nm 左右, 而阿斯巴甜、糖精钠、甜蜜素和纽甜选择在 200 nm 波长处检测。并且乙腈的溶剂强度较高, 粘度较小, 故测定时选用乙腈。实验考察了乙酸铵、硫酸铵和柠檬酸铵等溶液作为缓冲溶液时对分离测定的影响, 结果显示, 乙腈 - 硫酸铵缓冲体系的洗脱效果最好。当硫酸铵的浓度为分别为 20、40 mmol/L 时, 对分离影响不大, 考虑到缓冲盐浓度增大, 对色谱柱及系统管路造成的损害也会加大, 所以选择 20 mmol/L 的硫酸铵作为缓冲溶液。

调节 20 mmol/L 硫酸铵缓冲液 pH 分别为 3.0、4.0、4.4、5.0、5.6, 在 pH 4.4 条件下, 几种化合物的色谱峰形和分离度良好。

流动相比对分离效果的影响实验结果表明, 当硫酸铵缓冲溶液 pH 4.4, 乙腈的体积分数小于 8% 时, 几种化合物均可实现基线分离, 但阿斯巴甜和纽甜的保留时间比较长, 峰形拖尾。随着乙腈体积分数的增大, 所有分析物的保留时间均逐渐缩短。乙腈的体积分数大于 17% 时, 安赛蜜、糖精钠和甜蜜素的色谱峰重叠, 纽甜的保留时间大于 40 min。采用梯度洗脱可以缩短分析时间, 提高分离度, 改善峰形。考虑到本实验在短波长处测定, 梯度增加太快基线会严重漂移, 增加太慢分析时间就会延长, 最终选择的梯度程序为“1.2 节”所述。

在此色谱条件下, 5 种甜味剂的标准混合溶液的色谱图如图 1 所示。

2.3 干扰实验

在实验条件下, 食品和饮料中可能存在的其它食品添加剂如柠檬酸、苹果酸和抗坏血酸均出峰较早, 接近死时间, 不干扰测定。防腐剂苯甲酸和山梨酸在此实验条件下的保留时间分别为 7.31 min 和 7.80 min, 也不干扰测定。可通过加入聚酰胺粉除去食品中含有的色素。

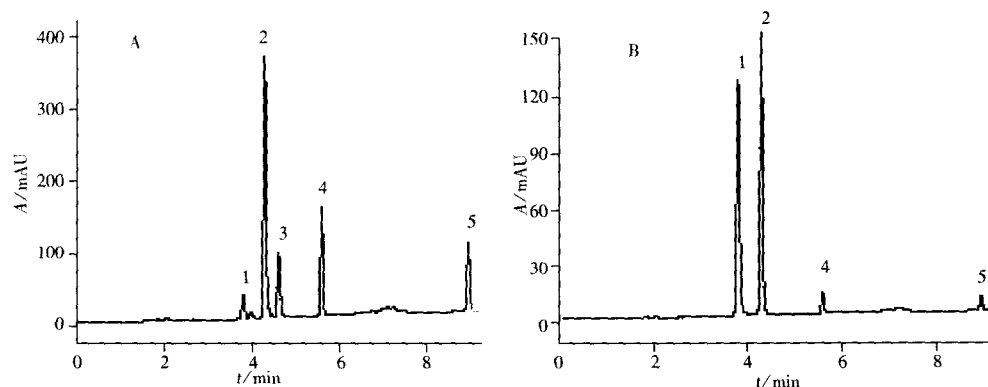


图1 标准混合溶液在200 nm(A)和226 nm(B)波长下的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution at 200 nm(A) and 226 nm(B)

1. AK(安赛蜜); 2. SA(糖精钠); 3. SC(甜蜜素); 4. ASP(阿斯巴甜); 5. NTM(纽甜)

2.4 线性范围、精密度与检出限

在实验条件下,所有分析物的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和峰面积($\text{mAU} \times \text{s}$)之间均有良好的线性关系,具体结果和检出限($S/N=3$)见表1。对混合标准溶液(糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜、纽甜质量浓度均为 40 mg/L ,甜蜜素质量浓度为 80 mg/L)平行测定6次,相对标准偏差见表1。

表1 线性关系与检出限

Table 1 Linearities and detection limits

Analyte	Detection wave λ/nm	Linear range $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Regression equation	Correlation coefficient r	Detection limit $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD($n=6$) $s_r/\%$
SA(糖精钠)	200	0.4~120	$Y=68.57X+7.58$	0.999 95	0.004	1.70
AK(安赛蜜)	226	0.4~160	$Y=71.84X+18.56$	0.999 90	0.069	1.60
ASP(阿斯巴甜)	200	0.4~160	$Y=69.91X+69.33$	0.999 92	0.047	1.20
NTM(纽甜)	200	0.4~120	$Y=32.08X+61.80$	0.999 25	0.056	0.43
SC(甜蜜素)	200	5.0~120	$Y=0.954X-3.70$	0.999 27	3.680	1.50

2.5 实际样品的测定

2.5.1 样品中甜味剂含量的测定 在该实验条件下,分别对5种样品进行了测定,结果见表2。

表2 实际样品的测定结果($n=3$)Table 2 The determination of sweeteners in real samples($n=3$) $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$

Sample	No	AK	SA	SC	ASP	NTM
Drink containing milk(乳饮料)	1	14.2	nd*	nd	21.2	nd
Preserved fruit(蜜饯)	2	47.6	nd	117	nd	nd
Tea drink(茶饮料)	3	nd	18.1	nd	116	nd
Fruit juice(果汁)	4	13.4	nd	46.0	nd	nd
Carbonated drink(碳酸饮料)	5	29.0	nd	nd	nd	21.5

* not detected(未检出)

2.5.2 样品加标回收率的测定 取适量样品,在线性范围内加入一定量的标准品做加标回收实验。每种样品平行测定3次,结果如表3。平均加标回收率在89%~107%,相对标准偏差小于3.2%,测定结果令人满意。

表3 样品加标回收实验结果($n=3$)Table 3 The recoveries in different samples($n=3$)

Sample*	Added $\rho_A/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$					Recovery $R/\%$					RSD $s_r/\%$				
	SA	AK	ASP	NTM	SC	SA	AK	ASP	NTM	SC	SA	AK	ASP	NTM	SC
1	4.0	4.0	4.0	4.0	8.0	94	103	103	97	98	0.84	0.68	2.04	0.72	1.44
2	10.0	10.0	10.0	10.0	20.0	105	90	89	95	93	3.00	2.66	1.03	0.73	1.18
3	4.0	4.0	4.0	4.0	8.0	92	107	99	93	99	2.30	1.96	0.71	1.94	1.61
4	8.0	8.0	8.0	8.0	16.0	97	95	96	96	100	3.10	1.47	0.83	2.39	2.01
5	10.0	10.0	10.0	10.0	20.0	92	91	95	93	94	2.10	1.42	1.27	3.13	0.80

* all samples are the same as those in table 2(所有样品同表2中的样品)

参考文献:

- [1] 陈青川, 于文莲, 王静. 高效液相色谱法同时测定多种食品添加剂[J]. 色谱, 2001, 19(2): 105-108.
- [2] 陈金东, 李蔚. 高效液相色谱法同时测定食品中的阿斯巴甜、阿力甜[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(9): 1069-1070.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB2760 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 28-29.
- [4] 陈少波, 潘超华. 食品中甜蜜素的紫外分光光度法测定[J]. 分析测试学报, 2000, 19(3): 82-83.
- [5] 贾玉珠, 骆和东, 林健. HPLC 法同时测定饮料中 5 种添加剂的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(4): 448-449.
- [6] 郭又珍, 王志宏. 同时测定碳酸饮料中苯甲酸钠、山梨酸钾和安赛蜜的高效液相色谱法[J]. 分析测试学报, 2001, 20(4): 67-68.
- [7] 郭莹莹, 朱岩, 叶明立. 淋洗液发生器离子色谱抑制电导法测定甜味剂[J]. 浙江大学学报, 2004, 31(4): 435-437.
- [8] ZHU Yan, GUO Yingying, YE Mingli, et al. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography[J]. J Chromatogr: A, 2005, 1085: 143-146.
- [9] BOYCE M C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr: A, 1999, 847: 369-375.
- [10] CATHERINE O T, CRAIGE TRENNERY V. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods[J]. J Chromatogr: A, 1995, 694: 507-514.

(上接第 548 页)

参考文献:

- [1] FLORAS De. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(4): 533-541.
- [2] FANG Guozhen, LUO Jikuen. Spectrophotometric determination of chromium(III , VI) by use of chromium(III , VI) chrom A zuro S-cetylpyridinium bromide-hydroxylamine hydrochloride-zinc(II) system[J]. Talanta, 1992, 39(12): 1579-1582.
- [3] SCINDIA Y M, PANDEY A K, REDDY A V, et al. Selective preconcentration and determination of chromium(VI) using a flat sheet polymer inclusion sorbent: potential application for Cr(VI) determination in real samples[J]. Anal Chem, 2002, 74(16): 4204-4212.
- [4] SAMANTA G, BORING C B, DASGUPTA P K. Continuous automated measurement of hexavalent chromium in airborne particulate matter[J]. Anal Chem, 2001, 73(9): 2034-2040.
- [5] THORBUM D, DANGOLLE C D F. Spectrophotometric determination of chromium(VI) by extraction of the dichromate anion into propylene carbonate[J]. Anal Chim Acta, 1997, 356: 145-152.
- [6] SAHAYAM A C. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in potable waters by using activated neutral alumina as collector and ET - AAS for determination[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 372(7/8): 840-842.
- [7] XU Yi, BESSOTH F G, EIJKE J C T, et al. On-line monitoring of chromium(III) using a fast micromachined mixer/reactor and chemiluminescence detection[J]. Analyst, 2000, 125: 677-685.
- [8] FRANCESCO C, ANDREA R. Determination of cadmium, lead, iron, nickel and chromium in selected food matrices by plasma spectrometric techniques[J]. Microchemical Journal, 2002, 79(1/2): 91-96.
- [9] WU Ying, HU Bin, PENG Tong, et al. In-situ separation of chromium(III) and chromium(VI) and sequential ETV - ICP - AES determination using acetylacetone and PTFE as chemical modifiers[J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 370(7): 904-910.
- [10] 王柏松, 李华, 丁富新, 等. 毛细管电泳柱上络合分离、间接紫外检测重金属离子[J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 25-29.
- [11] CATHUM S, BROWN C E, WONG Wei. Determination of Cr^{3+} , CrO_4^{2-} and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ in environmental matrixes by high-performance liquid chromatography with diode-array detection[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 373(1/2): 103-110.
- [12] TOMAS D H, ROHRER J S, JACKSON P E, et al. Determination of hexavalent chromium at the level of the California Public Health Goal by ion chromatography[J]. J Chromatogr: A, 2002, 956(1/2): 255-259.
- [13] 周光明, 刘珍, 杨光明, 等. 低压离子色谱分离 - 化学发光在线检测过渡金属离子[J]. 色谱, 2005, 23(3): 265-268.