

高效液相色谱法同时测定黄酒中 4 种人工合成甜味剂的研究

徐爱萍¹, 俞露¹, 顾建华¹, 金米聪²

(1. 浙江省宁海县疾病预防控制中心 浙江宁海 315600; 2. 浙江省宁波市疾病预防控制中心 浙江宁波 315000)

[摘要] 目的:建立黄酒中糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素等 4 种人工合成甜味剂的高效液相色谱同时测定方法。方法:样品经去醇和脱色后,采用 C_{18} 色谱柱,以乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH=5.5)/甲醇为流动相,采用梯度洗脱分离,在紫外 230 nm 波长进行检测。结果:4 种人工合成甜味剂的加标回收率在 84%~99% 范围,其相对标准偏差在 1.4%~4.7% 范围,安赛蜜和甘素在 0.05 mg/L~10.0 mg/L 范围具有良好的线性,糖精钠和阿斯巴甜在 0.25 mg/L~50.0 mg/L 范围具有良好的线性,其回归系数均大于 0.999,最低定量检出限(LOQ)为 0.6 mg/kg~4.0 mg/kg 范围。结论:本方法简便、灵敏、重现性好,能满足黄酒中 4 种人工合成甜味剂的监测要求。

[关键词] 液相色谱法;黄酒;人工合成甜味剂

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)05-1085-03

Simultaneous determination of four synthetic food sweeteners in yellow wine by high-performance liquid chromatography

XU Ai-ping¹, YU Lu¹, GU Jian-hua¹, JIN Mi-cong²

(1. Ninghai Center for Disease Control and Prevention, Ninghai 315600, China; 2. Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an assay for the simultaneous analysis of four synthetic food sweeteners, such as saccharin sodium (SA), acesulfame potassium (AK), aspartame (ASP) and dulcin (DUL) in yellow wine by high-performance liquid chromatography. **Methods:** After the sample was removed ethanol and decolorized, the sweeteners were separated on a C_{18} column by a mobile phase consisting of ammonium acetate-acetic acid (0.02 mol/L, pH=5.5)/methanol in gradient elution. Detection was carried out by an ultraviolet detector at 230 nm. **Results:** Calibration curves of ASP and DUL were linear within the range of 0.05 mg/L~10.0 mg/L, SA and AK were linear within the range of 0.25 mg/L~50.0 mg/L with correlation coefficients of more than 0.999. The limits of quantification (LOQ) were between 0.6 mg/kg~4.0 mg/kg. The extraction recoveries were between 84%~99%, and the RSDs were between 1.4%~4.7%. **Conclusion:** This method is simple, sensitive, and accurate, and which was suitable for monitoring the four synthetic food sweeteners residues in yellow wine.

[Key words] High-performance liquid chromatography; Yellow wine; Synthetic food sweeteners

甜味剂是一类能赋予食品甜味的食品添加剂,按其来源可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂,其中人工合成甜味剂又分为磺胺类、二肽类、蔗糖衍生物三类。人工合成甜味剂由于在人体内不进行代谢吸收、不提供热量或因为其用量极低而热量供应少且甜度是蔗糖的几十倍至几千倍,又被称为非营养型甜味剂或高倍(高甜度)甜味剂。目前,我国经全国食品添加剂标准化技术委员会审定,由卫生部批准实施的食品添加剂使用卫生标准 GB 2760 中允许使用的人工合成甜味剂共计 7 种,其中在市场上比较常见的有糖精钠(saccharin sodium, SA)、安赛蜜(acesulfame, AK)、阿斯巴甜(aspartame, ASP)和甘素(dulcin, DUL)等^[1]。当前,在我国酿酒行业产品中,关于甜味剂的使用存在不少问题,在发酵酒中常有违规使用糖精钠等。强制性国家标准规定,发酵酒种不得添加甜味剂(糖

精钠、甜蜜素、甜味素等),而在目前的黄酒、葡萄酒的抽查中,检测出的不合格产品较多,在甜味剂的添加及标签和标注上问题严重。

目前文献已报道的人工合成甜味剂检测方法主要以高效液相色谱-紫外法^[2~7]较为常见,如 GB/T 5009.128-2003 和 GB/T 5009.140-2003 规定的糖精钠和安赛蜜的检测方法。阿斯巴甜和甘素虽尚未有标准检验方法,文献也已有报道采用液相色谱法进行测定^[4,5]。由于这些检测方法采用各自的前处理技术和分析方法,当需要同时检测多种人工合成甜味剂时,检测费时、费力、费试剂,工作效率低下。尽管液/质联用法已大量用于卫生检测中^[8~11],针对食品甜味剂的分析检测也已有文献报道^[12,13],但由于液/质联用仪价格昂贵,不易普及。鉴于此,本研究建立了一种高效液相色谱检测方法,用于黄酒中 4 种人工合成甜味剂的检测。该方法处理样品方式简单,分析速度快,灵敏度高,适用于黄酒中人工合成甜味剂的检测。

[作者简介] 徐爱萍(1959-),女,副主任技师,主要从事理化检测研究工作。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

甲醇、乙酸均为 HPLC 级(德国 Merck 公司),乙酸铵为分析纯;所有的溶剂使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤;糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素(>98.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)。

糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素标准贮备液(1.0 mg/ml):分别准确称取 10.0 mg 糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素标准品于 4 个 10 ml 容量瓶中,分别用少量乙腈溶解后,并用乙腈定容至刻度。

实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

1.2 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括四元泵、在线真空脱气机、紫外检测器、柱温箱、自动进样器及 Breeze 化学工作站(美国 Waters 公司);全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters 公司);SB25-12D 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);5 号砂蕊漏斗;Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱:MN Nucleodur C₁₈ Pyramid 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm);流速:1.0 ml/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流动相:流动相为乙酸-乙酸铵缓冲溶液(0.02 mol/L, pH = 5.5)/甲醇,梯度洗脱程序:其中甲醇:0 min $\rightarrow$ 4.0 min,保持 20%;4.0 min $\rightarrow$ 11.0 min,甲醇 20% $\rightarrow$ 70%;11.0 min $\rightarrow$ 15.0 min,甲醇保持 70%。紫外检测波长为 230 nm,进样体积:10 μl 。

1.4 样品处理

取混匀酒样 10.0 g,放入烧杯中,置于沸水浴中加热脱醇,使溶液保持微沸状态,直至蒸发酒样体积约为 5 ml,停止加热,然后加入聚酰胺粉 2 g 左右,搅拌调成糊状,加甲醇/乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5) = 80:20(V/V)流动相 25 ml,用 5 号砂蕊漏斗过滤转移至 50 ml 容量瓶中,重复 1 次,全部转入 50 ml 容量瓶中,并用流动相定容至刻度,经 0.45 μm 滤膜过滤后,注入 HPLC 进行测定。

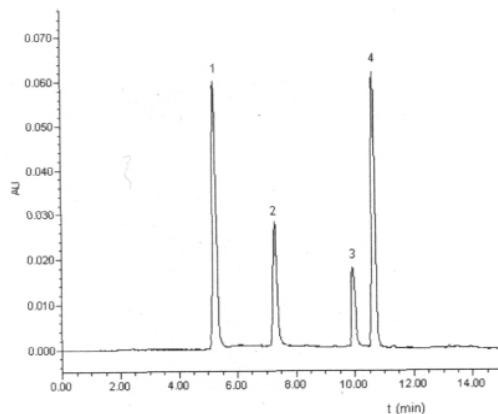
2 结果与讨论

2.1 分离色谱柱的选择

试验了 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm)、Waters Atlantis C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 3.0 mm i.d., 5 μm)、Zorbax XDB C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm)和 MN Nucleodur Pyramid C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm)等 4 种色谱柱对 4 种人工合成甜味剂标准物质分离的影响。结果表明,Phenomenex Luna C₁₈ 柱、Waters Atlantis C₁₈ 柱和 Zorbax XDB C₁₈ 柱对 4 种人工合成甜味剂的分离效果均不是十分理想,只有德国 MN Nucleodur C₁₈ Pyramid 柱的分离效果较好,见图 1。

2.2 流动相的选择

流动相中如果不加入乙酸-乙酸铵缓冲液,安赛蜜、糖精钠和甘素有保留,阿斯巴甜无保留,糖精钠峰型展宽,加入乙酸-乙酸铵缓冲液之后,各组分保留增强,峰型得到改善。实验同时试验了以乙腈和甲醇分别作为有机流动相时 4 种目标化合物的色谱行为。实验显示,用乙腈作为有机流动相时,系统柱压低,化合物在柱内保留时间短,分离度差,尤其是阿斯巴甜和甘素,其色谱行为十分相似,无法基线分离。改用甲醇作为有机流动相,各化合物在柱内保留时间有所增大,通过尝



1 - 安赛蜜;2 - 糖精钠;3 - 阿斯巴甜;4 - 甘素

图 1 4 种人工合成甜味剂的标准谱图

试不同的梯度洗脱,可以使所有目标化合物都能达到基线分离,而且保留时间适中。经优化,流动相为乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5)/甲醇,梯度洗脱程序:其中甲醇:0 min $\rightarrow$ 4.0 min,保持 20%;4.0 min $\rightarrow$ 11.0 min,甲醇 20% $\rightarrow$ 70%;11.0 min $\rightarrow$ 15.0 min,甲醇保持 70%。图 1 给出了 4 种甜味剂标准物质的分离色谱图,由图 1 可知,在本文的色谱条件下 4 种甜味剂获得了较好的分离效果,在 12 min 内完全分离,糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素的保留时间分别为 5.24 min、7.33 min、10.03 min 和 10.68 min。

2.3 检测波长的选择

实验分别对 4 种甜味剂在 190 nm~400 nm 之间进行全波长扫描。结果显示,糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素的最大紫外吸收波长分别为 201 nm、227 nm、202 nm 和 240 nm,由于在低波长检测会产生较大的干扰,综合考虑各化合物的紫外吸收曲线及干扰因素,实验选择 230 nm 作为检测波长,检测灵敏度能达到检测要求。

2.4 提取剂的选择

样品经聚酰胺粉吸附后,用 0:100、20:80、40:60、60:40、80:20、100:0 的不同体积比的乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5)/甲醇考察其提取效率。结果显示,随着甲醇浓度的增大,各被测化合物的提取效率都有不同程度的提高,为避免溶剂效应,实验选择甲醇/乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5) = 80:20(V/V)作为提取溶剂。

2.5 线性范围及检出限

准确吸取浓度为 1.0 mg/ml 的糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素各 1.0 ml 于 10 ml 容量瓶中,用甲醇/乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5) = 80:20 定容至 10 ml,此混合中间液的浓度为 0.10 mg/ml。分别吸取混合中间液 0.005 ml、0.01 ml、0.05 ml、0.25 ml、0.5 ml、1.0 ml 和 5.0 ml 用甲醇/乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5) = 80:20 定容至 10 ml,配成浓度分别为 0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.5 mg/L、2.5 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L 和 50.0 mg/L 的标准溶液系列。按所述的色谱条件进样 10 μl 进行分析,获得不同质量浓度下各组分的峰面积,以质量浓度(C, mg/L)对峰面积(A)进行线性回归,结果见表 1。由表 1 可知,安赛蜜和甘素在 0.05 mg/L~10.0 mg/L 范围具有良好的线性,糖精钠和阿斯

巴甜在 0.25 mg/L ~ 50.0 mg/L 范围具有良好的线性 ,其相关系数均大于 0.999。同时对不含目标化合物的空白样品进行检测 ,按色谱峰高为噪声高 3 倍(S/N = 3) 相对应的浓度为检出限(LOD) ,结果表明黄酒中糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素的 LOD 分别为 0.2 mg/kg 、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg 和 0.3 mg/kg ,按 10 倍(S/N = 10) 相对应的浓度为最低定量检出限(LOQ) ,黄酒中糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素的 LOQ 分别为 0.6 mg/kg 、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg 和 1.0 mg/kg ,见表 1。

表 1 各组分的线性范围及检出限					
化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 (r)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
安赛蜜	0.05 ~ 10.0	A = 273.55C - 1.75	0.9996	0.2	0.6
糖精钠	0.25 ~ 50.0	A = 83.12C - 2.88	0.9992	1.1	3.5
阿斯巴甜	0.25 ~ 50.0	A = 68.84C - 2.03	0.9994	1.2	4.0
甘素	0.05 ~ 10.0	A = 267.90C - 2.92	0.9993	0.3	1.0

2.6 方法的回收率与精密度

取一定量的未添加被测化合物的空白样品 ,加入一定量的糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素标准溶液 ,按上述方法进行处理 ,分析 ,平行测定 6 次 ,计算其回收率 ,结果见表 2。由表 2 可知 ,糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素的回收率在 84% ~ 99% 范围 ,RSD 在 1.4% ~ 4.7% 范围 ,表明本方法具有较好的回收率和测定精密度。

表 2 回收率与精密度试验				
化合物	加入量(mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率(%)	RSD (%)
糖精钠	5.0	4.93 ± 0.07	98.6	1.4
	10.0	9.47 ± 0.18	94.7	1.9
	100.0	96.7 ± 1.62	96.7	1.7
安赛蜜	2.0	1.68 ± 0.06	84.0	3.6
	10.0	9.72 ± 0.32	97.2	3.3
	40.0	36.6 ± 1.62	91.5	4.4
阿斯巴甜	5.0	4.67 ± 0.07	93.4	1.5
	10.0	9.55 ± 0.45	95.5	4.7
	100.0	97.8 ± 1.71	97.8	1.7
甘素	2.0	1.89 ± 0.06	94.5	3.2
	10.0	9.63 ± 0.26	96.3	2.7
	40.0	37.9 ± 1.48	94.8	3.9

2.7 样品分析

采用本实验所建方法 ,分别对市售的 50 份不同产地、不同等级的黄酒样品进行了检测。结果表明 ,其中 18 份市售的不同黄酒中分别检出糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素 ,其含

量在 0 mg/kg ~ 0.26 mg/kg 范围 ,甜味剂的检出率为 36.0% ,图 2 给出了典型的其中一份黄酒样品的色谱图。

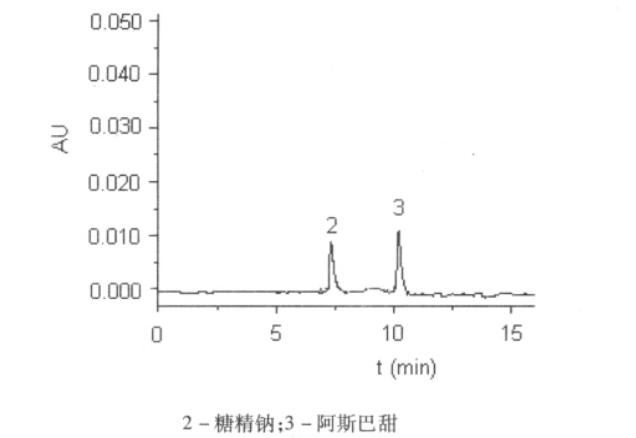


图 2 黄酒样品色谱图

3 结论

建立的高效液相色谱测定方法可同时测定黄酒中糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和甘素 ,具有准确、快速、简便的优点 ,能用于黄酒样品中的甜味剂的实际监测。

[参考文献]

[1] 朱兴江 ,丁振华 ,方猛 ,等. 人工合成甜味剂与防腐剂的现状及发展趋势[J]. 食品工业科技 2009 ,30(8) : 340 - 342 ,345.

[2] GB/T5009.128 - 2003. 食品中糖精钠的测定[S].

[3] GB/T5009.140 - 2003. 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S].

[4] 蒋定国 ,王竹天 ,杨大进 ,等. 高效液相色谱法测定食品中阿斯巴甜的含量[J]. 中国卫生检验杂志 2007 ,17(6) : 1012 - 1014.

[5] 杨雪娇 ,付登洲 ,黄伟 ,等. 高效液相色谱法测定蜜饯中的甘素[J]. 食品工业 2009 ,4: 68 - 70.

[6] 林钦 ,黄红霞. 高效液相色谱法同时检测食品中十种添加剂[J]. 食品科学 2007 ,28(11) : 485 - 487.

[7] Zhu Y ,Guo YY ,Ye ML ,et al. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography[J]. J Chromatogr A ,2005 ,1085(1) : 143 - 146.

[8] 陈晓红 ,盛雪飞 ,金米聪. 超快速液相色谱 - 串联质谱联用法测定牛奶中 8 种孕激素残留研究[J]. 中国卫生检验杂志 ,2010 ,20(11) : 2671 - 2675.

[9] 陈晓红 ,金米聪. 采用液相色谱 - 串联质谱法检测血清中痕量异杀鼠酮[J]. 中华预防医学 ,2010 ,44(11) : 1060 - 1063.

[10] 吕云妮 ,陈晓红 ,金米聪. 鼠药杀鼠酮和异杀鼠酮的离子阱质谱快速鉴定方法[J]. 中国卫生检验杂志 ,2010 ,20(5) : 965 - 967.

[11] 陈晓红 ,蔡美强 ,金米聪. 高效液相色谱 - 离子阱质谱快速鉴定茚满二酮类鼠药[J]. 卫生研究 2010 ,39(5) : 586 - 590.

[12] 嵇超 ,冯峰 ,陈正行 ,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定葡萄酒中的 5 种人工合成甜味剂[J]. 色谱 2010 ,28(8) : 749 - 753.

[13] 刘晓霞 ,丁利 ,刘锦霞 ,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定食品中 6 种人工合成甜味剂[J]. 色谱 2010 ,28(11) : 1020 - 1025.

(收稿日期: 2011 - 01 - 24)