

离子抑制剂对苯甲酸等 9 种食品添加剂的 反相液相色谱行为的影响

赵永纲, 陈晓红, 李小平, 姚珊珊, 金米聪*

(宁波市疾病预防控制中心 宁波市毒物研究与控制重点实验室, 浙江 宁波 315010)

摘要: 研究了反相高效液相色谱(RP-HPLC)流动相中酸性离子抑制剂三氟乙酸(TFA)与缓冲盐离子抑制剂TFA-乙酸铵(AmAc)对安赛蜜、糖精、咖啡因、阿斯巴甜、苯甲酸、山梨酸、甜菊糖苷、脱氢乙酸和纽甜等9种食品添加剂色谱保留行为的影响。着重探讨了TFA与TFA-AmAc作为离子抑制剂的有机调节剂作用,考察了乙腈-TFA水溶液和乙腈-TFA-AmAc水溶液流动相体系中溶质的保留因子与离子抑制剂体积分数之间的关系。在最佳流动相组成(乙腈-TFA(0.01%, v/v)-AmAc(2.5 mmol/L)水溶液)条件下梯度洗脱,苯甲酸等9种食品添加剂实现了基线分离。9种食品添加剂在10.0~100.0 mg/L内具有良好的线性关系($r^2 > 0.9991$);检出限为0.33~2.36 mg/L,定量限为1.11~7.80 mg/L;9种食品添加剂在空白干红葡萄酒中的添加回收率为87.61%~108.4%,其相对标准偏差为2.2%~9.4%。本实验结果对于食品中多组分食品添加剂的RP-HPLC分离分析方法的建立和优化具有较好的指导意义。

关键词: 反相高效液相色谱; 离子抑制剂; 三氟乙酸; 乙酸铵; 食品添加剂; 葡萄酒

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)10-0988-07

Influences of ion-suppressors on retention behaviors of nine food additives in reversed-phase high performance liquid chromatographic separation

ZHAO Yonggang, CHEN Xiaohong, LI Xiaoping, YAO Shanshan, JIN Micong*

(Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo Key Laboratory of
Poison Research and Control, Ningbo 315010, China)

Abstract: The influences of ion-suppressors on retention behaviors of nine food additives, *i. e.*, acesulfame, saccharin, caffeine, aspartame, benzoic acid, sorbic acid, stevioside, dehydroacetic acid and neotame in reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) separation were investigated. The organic modification effects of acids, *i. e.*, trifluoroacetic acid (TFA) and buffer salts, *i. e.*, TFA-ammonium acetate (AmAc) were studied emphatically. The relationships between retention factors of solutes and volume percentages of ion-suppressors in the mobile phase systems of acetonitrile-TFA aqueous solution and acetonitrile-TFA-AmAc aqueous solution were quantitatively established, separately. The separation of nine food additives was completed by a gradient elution with acetonitrile-TFA (0.01%, v/v)-AmAc (2.5 mmol/L) aqueous solution as the mobile phases. An RP-HPLC method was established for the simultaneous determination of nine food additives in red wine. In the range of 10.0–100.0 mg/L, nine food additives showed good linearity with the correlation coefficients (r^2) larger than 0.9991. The limits of detection (LODs) were in the range of 0.33–2.36 mg/L and the limits of quantification (LOQs) were in the range of 1.11–7.80 mg/L. The spiked recoveries were between 87.61% and 108.4% with the relative standard deviations (RSDs) of 2.2%–9.4%. These results are of referen-

* 通讯联系人: 金米聪, 博士, 研究员, 主要从事食品安全的检测技术研究。Tel: (0574) 87274559, E-mail: jmcjc@163.com.

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(No. 2010A610010)和浙江省医药卫生科学研究基金项目(No. 2010KYB098)。

收稿日期: 2011-04-29

tial significance for the rapid establishment and accurate optimization of RP-HPLC separation for the simultaneous determination of food additives in other foods.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ; ion-suppressor; trifluoroacetic acid; ammonium acetate; food additives; wine

近年来,随着人们消费和认识水平的不断提高,食品添加剂的使用和食用安全性也日益受到关注。食品添加剂在规定的剂量范围内使用对人无害,超量使用则可能引起各种形式的毒性表现^[1]。因此,欧盟及我国均对食品添加剂的使用作了明确的限量规定,而且也出台了相应的检测方法标准^[2-5]。目前,食品中常见的添加剂主要涉及安赛蜜、糖精、咖

啡因、阿斯巴甜、苯甲酸、山梨酸、甜菊糖苷、脱氢乙酸和纽甜等(其相关信息见图 1)。虽然国内外采用高效液相色谱法(HPLC)^[6-7]、离子色谱法^[8]、伏安法^[9]和毛细管电泳法^[10]等测定上述添加剂的报道较多,但未见能同时检测这 9 种添加剂的报道。为提高工作效率、减少实验成本,我们开展了多组分食品添加剂的同时检测研究。

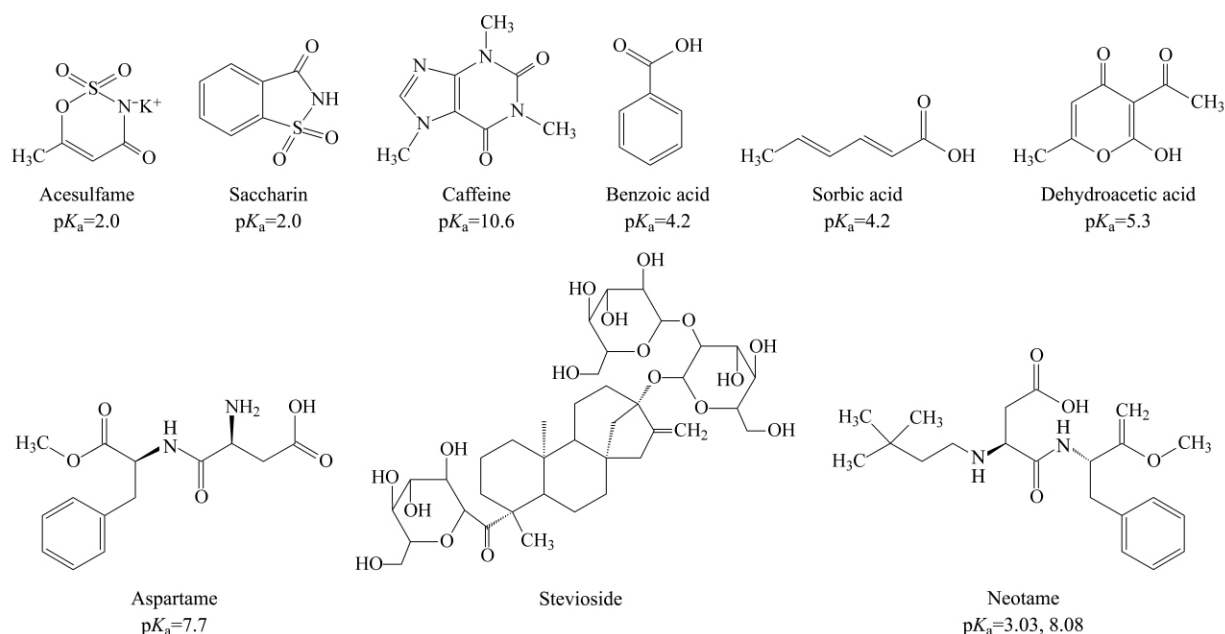


图 1 9 种食品添加剂的结构式与 pK_a 值

Fig. 1 Structural formulas and pK_a values of nine food additives

在应用反相高效液相色谱(RP-HPLC)检测食品添加剂的过程中,为了保证待测物在色谱柱中有足够的保留,常在水溶液中加入含盐缓冲溶液作为离子抑制剂^[11,12]。这些缓冲溶液在分析过程中不仅能调节和缓冲流动相的 pH,抑制待测物的解离,还能覆盖色谱柱中固定相的活性中心(即活性硅羟基),从而改善色谱峰形、提高分离度^[13-15]。一般情况下,在实际的 RP-HPLC 工作中,常采用酸、碱或缓冲液来调节流动相的 pH 值以抑制待测物的解离,但由于抑制剂的种类和浓度对待测物的色谱保留行为具有重要的影响^[13],需经过反复多次试验才能确定适宜的色谱条件。目前,关于离子抑制剂在 RP-HPLC 分离分析方面的机理研究已有较多的文献报道^[14-17],如 Ming 等^[14]报道了乙酸、高氯酸和磷酸作为离子抑制剂对苯甲酸类和酚类等一元弱酸

色谱分离的影响,戚争春等^[17]研究了乙酸和三乙胺作为离子抑制剂对甲苯等中性化合物进行色谱分离的离子抑制和有机调节作用。近年来,离子抑制剂在安赛蜜等甜味剂的分离分析中也得到了一定的应用^[18],如添加甲酸-甲酸铵缓冲液进行色谱流动相的改性。但总的来说,离子抑制剂在食品添加剂的色谱分析应用方面的文献还较少,在一定程度上阻碍了食品添加剂残留分析技术的进步,也影响了离子抑制剂色谱分离技术的应用推广。因此,开展离子抑制剂对食品添加剂的色谱行为影响研究具有重要的现实意义,对多组分色谱分离方法的建立和优化具有一定的指导作用。

三氟乙酸(TFA)和乙酸铵(AmAc)是两种主要的液相色谱分离流动相改性剂。本文重点研究了 TFA 作为酸性离子抑制剂和 TFA-AmAc 作为缓冲盐

离子抑制剂对 9 种食品添加剂的色谱保留行为的影响,探讨了乙腈-TFA 水溶液和乙腈-TFA-AmAc 水溶液两种流动相体系中各溶质保留行为的变化规律,并建立了一种以乙腈-TFA-AmAc 水溶液为流动相,梯度洗脱 RP-HPLC 同时测定葡萄酒中安赛蜜、糖精、咖啡因、阿斯巴甜、苯甲酸、山梨酸、甜菊糖苷、脱氢乙酸和纽甜等 9 种食品添加剂的方法。该方法具有操作简单、灵敏度高、精密度和准确度高等优点,并用于葡萄酒样品的测定,获得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括紫外检测器(G1314A)、四元泵(G1311A)、真空脱气机(G1379A)、柱温箱(G1316A)、自动进样器(G1313B)和 Chemical Station 色谱工作站(美国 Agilent 公司); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司); Gemini C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm, 广州菲罗门公司); Legend RT 型高速离心机(德国 Heraeus 公司)。

安赛蜜、糖精、苯甲酸和山梨酸标准溶液(1.00 g/L)购自中国计量科学研究院;咖啡因、阿斯巴甜、脱氢乙酸、纽甜、甜菊糖苷均购于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH; 乙腈、TFA 和 AmAc(HPLC 级)均购自德国 Merck 公司;实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

1.2 色谱条件

色谱柱: Gemini C₁₈ 柱;柱温: 30 °C;紫外检测波长 210 nm;流动相: TFA (0.01%, v/v) - AmAc (2.5 mmol/L) 水溶液(A)和乙腈(B);梯度洗脱程序: 0 ~ 10.0 min, 5% B ~ 13% B; 10.0 ~ 15.0 min, 13% B ~ 41% B; 15.0 ~ 30.0 min, 41% B ~ 30% B;流速: 1.0 mL/min;进样体积: 10.0 μL。

1.3 标准溶液的配制

准确称取咖啡因、阿斯巴甜、甜菊糖苷、脱氢乙酸和纽甜标准品各 10.0 mg 分别于 5 个 10.0 mL 容量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,制成 1.0 g/L 的单标储备液。准确移取上述单标储备液及安赛蜜、糖精、苯甲酸和山梨酸标准溶液(1.00 g/L)各 1.0 mL 于一个 10 mL 容量瓶中,用超纯水定容至刻度,得到上述 9 种食品添加剂的 100.0 mg/L 的混合标准工作液。分别吸取此混合标准工作液 50.0、100.0、200.0、500.0 和 1 000.0 μL 至 1 mL 容量瓶中,用超纯水定容至刻度,制得质量浓度分别为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 mg/L 的系列混合标准

溶液。

1.4 实验方法

1.4.1 保留因子(k)的获得

由公式 $k = (t_R - t_0) / t_0$ 计算可得 k , 其中 t_R 是溶质的保留时间, t_0 是死时间, 本实验的死时间以 NaNO₃ (0.05 mol/L) 在甲醇-水(35:65, v/v) 流动相中测得, 所有的溶质保留时间是至少两次相近实验值的平均值。

分别以不同比例的乙腈-TFA 水溶液体系(TFA 的体积分数(φ (TFA))分别为 0.005%、0.008%、0.010%、0.012% 和 0.015%) 和乙腈-TFA (0.010%) - AmAc 水溶液体系(c_{AmAc} 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L) 为流动相,记录 9 种食品添加剂在 Gemini C₁₈ 柱上的保留值,得到 9 种食品添加剂的保留因子与流动相中 φ (TFA) 和 c_{AmAc} 之间的基准关系,考察 TFA 和 AmAc 作为离子抑制剂对 9 种食品添加剂色谱保留行为的影响。

1.4.2 样品制备方法

准确移取 10.0 mL 葡萄酒样品于蒸发皿中,于 50 °C 水浴加热 30 min 以除去样品中少量的乙醇,然后转移至 10.0 mL 容量瓶中,以纯水洗涤蒸发皿,将洗涤液转移至容量瓶中,并定容至刻度,用 0.22 μm 滤膜过滤,滤液供 RP-HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 乙腈-TFA 水溶液体系中 TFA 对 9 种食品添加剂色谱行为的影响

在液相色谱中,保留因子 k 与二元流动相中有机调节剂的体积分数 Φ_b 的关系以 Snyder-Soczewinski 公式^[19]来表示:

$$\log k = \log k_w - S\Phi_b \quad (1)$$

式(1)中: S 是 Φ_b 的回归系数, $\log k_w$ 是假定以纯水作流动相时溶质的保留值。卢佩章等^[15]对公式(1)进行了修正:

$$\ln k = a + b \ln C_b + c C_b \quad (2)$$

式(2)中: a 、 c 和 C_b 分别相当于公式(1)中的 $\log k_w$ 、 $-S$ 和 Φ_b 。在 RP-HPLC 中 $b \ln C_b$ 的贡献很小,可以忽略不计,因而有:

$$\ln k = a + c C_b \quad (3)$$

其中,参数 a 反映了 RP-HPLC 中溶质与键合相的疏水作用;参数 c 反映了 RP-HPLC 中溶质在流动相中的作用能,亦被称为作用指数,表示了 RP-HPLC 系统中洗脱剂的强度,对于特定的溶质和洗脱剂而言是一个常数^[20]。

为了解 TFA 对上述 9 种食品添加剂色谱行为

的影响,本研究固定流动相梯度洗脱程序,配制不同体积比的 TFA-水溶液, $\varphi(\text{TFA})$ 分别为 0.005%、0.008%、0.010%、0.012% 和 0.015%,考察了 $\varphi(\text{TFA})$ 对 9 种食品添加剂色谱行为的影响,结果见图 2。

从图 2 可以看出,随着 $\varphi(\text{TFA})$ 的增大,安赛蜜和糖精的保留值逐渐减小,安赛蜜的保留时间从 21.8 min 缩短至 11.5 min,糖精的保留时间从 24.1 min 缩短至 15.2 min。按公式(3)计算安赛蜜和糖

精在 Gemini C_{18} 柱上的保留值与 $\varphi(\text{TFA})$ 之间的关系,结果见表 1。

表 1 乙腈-TFA 流动相体系中安赛蜜与糖精的保留因子(k)与 $\varphi(\text{TFA})$ 之间的关系

Table 1 Relationships between retention factors (k) of acesulfame and saccharin and $\varphi(\text{TFA})$ in the mobile phase of acetonitrile-TFA solution

Food additive	Relation equation	r^2
Acesulfame	$\ln k = 7.222 - 312.5\varphi(\text{TFA})$	1.000
Saccharin	$\ln k = 7.653 - 240.0\varphi(\text{TFA})$	0.9994

从表 1 可以看出,随着 $\varphi(\text{TFA})$ 的增大,安赛蜜和糖精的保留因子明显减小,而且二者的 $\ln k - \varphi(\text{TFA})$ 回归方程均具有良好的线性 ($r^2 > 0.9994$)。这主要是由于 TFA 是一种强酸,其 $\text{p}K_{\text{a}} = 0.23$,而安赛蜜与糖精是两种具有较强酸性的甜味剂,其 $\text{p}K_{\text{a}} = 2.0$,当流动相中 TFA 的体积分数从 0.005% 增至 0.015% 时,流动相的 pH 从 3.3 降至 2.5,在此过程中,流动相中离子型的安赛蜜与糖精的含量随着 pH 的降低而慢慢降低,分子型的安赛蜜与糖精含量慢慢增加,它们的解离受到了一定程度的抑制,如果按照离子抑制液相色谱的反“S”规律^[17,21-23],安赛蜜和糖精的保留时间应随着 TFA 体积分数的增大(即 pH 值的减小)而增大,但是我们在实验中发现安赛蜜和糖精的保留时间明显缩短,与反“S”规律不符。这种现象可以解释为:随着流动相中 $\varphi(\text{TFA})$ 的增加,流动相中未解离的处于中性分子状态的 TFA 含量显著增加,而且 $\ln k - \varphi(\text{TFA})$ 呈现良好的线性,这时 TFA 主要起到有机调节剂的作用。而咖啡因、阿斯巴甜、苯甲酸、山梨酸、甜菊糖苷、脱氢乙酸和纽甜等 7 种待测物,其保留时间不随 $\varphi(\text{TFA})$ 的增大而发生显著变化,保留因子也无显著差异。这主要是由于流动相的 pH 在 2.5~3.3 范围内时,流动相中 $7.0 > \text{p}K_{\text{a}} > 3.5$ 的弱酸性物质(苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸)的解离均受到较好的抑制,按照反“S”规律^[17,21-23],苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的保留时间应随着 $\varphi(\text{TFA})$ 的增大(即 pH 值的减小)而增加,但从图 2 可知,3 个目标化合物的保留时间均没有显著变化。究其原因,这种现象可以解释为:流动相中 TFA 对苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的离子抑制作用(保留时间延长)和有机调节作用(保留时间缩短)刚好对等,从而表现为保留时间基本不变。另外,针对 $\text{p}K_{\text{a}}$ 约等于或大于 7.0 的近中性或弱碱性物质(咖啡因、阿斯巴甜、甜菊糖苷和纽甜)(甜菊糖苷分子中不存在具有较强活性的羟基、氨基或类氨基、类胺基等基团,我们

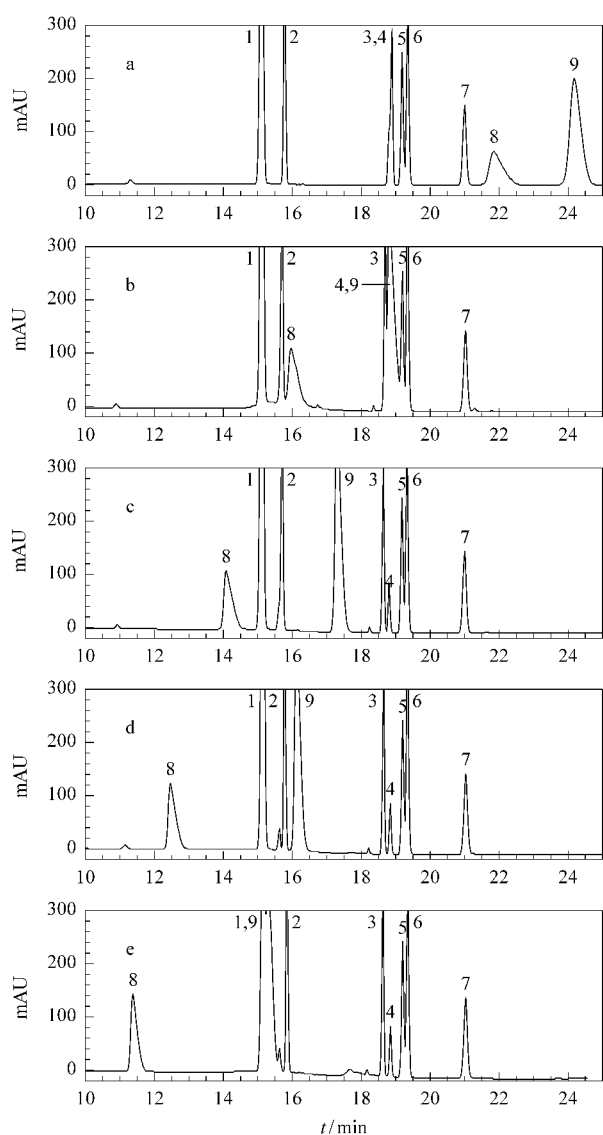


图 2 9 种食品添加剂在 5 种乙腈-TFA 水溶液流动相体系中的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of nine food additives in five mobile phase systems of acetonitrile-TFA aqueous solution

Mobile phase: acetonitrile-TFA aqueous solution. Volume percentages of TFA: a. 0.005%; b. 0.008%; c. 0.010%; d. 0.012%; e. 0.015%.

Peaks: 1. caffeine; 2. aspartame; 3. neotame; 4. stevioside; 5. sorbic acid; 6. benzoic acid; 7. dehydroacetic acid; 8. acesulfame; 9. saccharin.

未查阅到其 pK_a 值,推测其 pK_a 应为 7.0 左右),它们在流动相中主要以中性分子或解离状态存在,其离子抑制作用可忽略。同时由于咖啡因、阿斯巴甜、甜菊糖苷和纽甜的保留时间没有随 TFA 的体积分数的增加而发生显著的变化,表明对于咖啡因、阿斯巴甜、甜菊糖苷和纽甜而言,TFA 亦不具有有机调节剂的特征。

2.2 乙腈-三氟乙酸-乙酸铵水溶液体系中乙酸铵对 9 种食品添加剂色谱行为的影响

固定流动相的梯度洗脱程序及 TFA 的体积分数为 0.01% 配制不同比例的 TFA-AmAc-水溶液,其中 c_{AmAc} 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L,考察在 TFA 存在条件下,AmAc 对 9 种食品添加剂色谱行为的影响,结果见图 3。

从图 3 可以看出,随着 c_{AmAc} 的增大,安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸等 5 种食品添加剂的保留因子逐渐减小。按公式 (3) 计算安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸与脱氢乙酸在 Gemini C_{18} 柱上的保留因子与 c_{AmAc} (mmol/L) 之间的关系(见表 2)。结果表明,随着 c_{AmAc} 的增加,安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸与脱氢乙酸的保留因子明显减小。分析其原因,我们认为在 0.01% TFA 存在下,AmAc 可转化为乙酸和氯化铵,其中乙酸具有有机调节剂的作用,溶液中的乙酸浓度随着 AmAc 浓度的增加而增加。同时从表 2 可以看出,安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的 $\ln k-c_{AmAc}$ 回归方程均具有良好的线性 ($r^2 > 0.9935$),表明 TFA-AmAc 水溶液体系符合有机调节剂的特征。另外,安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的 pK_a 在 3.0 ~ 7.0 范围内,当 0.01% TFA 存在于溶液中时,安赛蜜、糖精、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的解离得到一定程度的抑制,主要以中性分子状态存在。对安赛蜜、糖精、阿斯巴甜、山梨酸与脱氢乙酸而言,TFA-AmAc 水溶液体系不仅具有离子抑制剂的作用,而且具有良好的有机调节剂的作用。从图 3 可以看出,当 c_{AmAc} 为 2.5 mmol/L 时 9 种食品添加剂实现了良好的基线分离。

2.3 校正曲线、检出限、定量限、回收率与精密度

为了验证 9 种食品添加剂在乙腈-TFA (0.01%) -AmAc (2.5 mmol/L) 水溶液流动相体系中的线性关系,配制了质量浓度分别为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 mg/L 的系列混合标准溶液。每个浓度重复测定 5 次,实验结果见表 3。

由表 3 可以看出,9 种食品添加剂在 10.0 ~

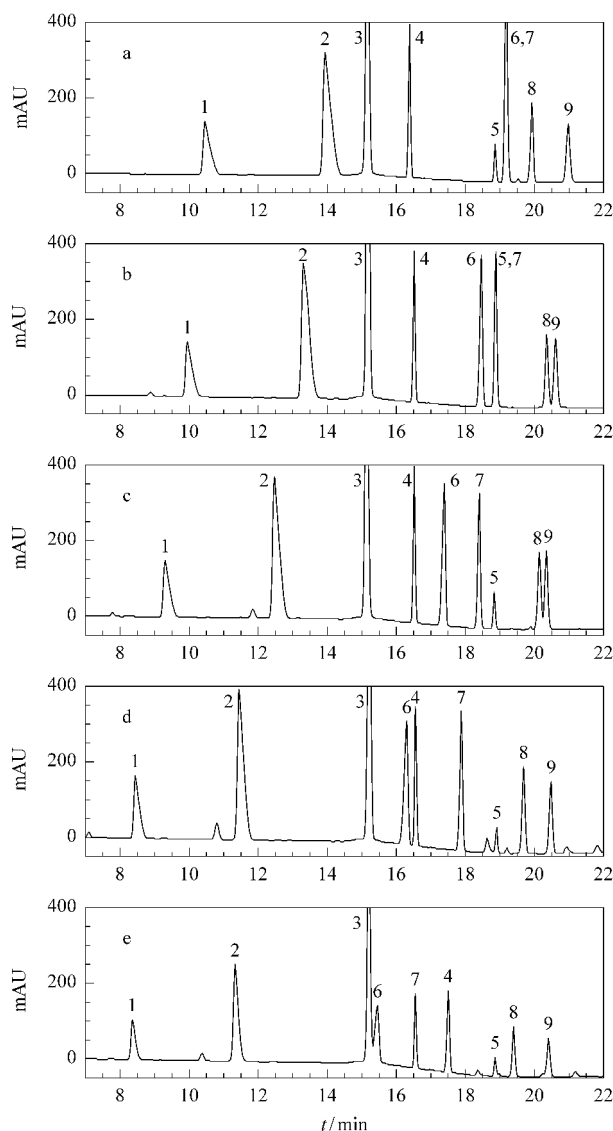


图 3 9 种食品添加剂在 5 种乙腈-TFA (0.01%) -AmAc 水溶液流动相体系中的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of nine food additives in five mobile phase systems of acetonitrile-TFA (0.01%, v/v) -AmAc aqueous solution

Concentrations of AmAc: a. 1.0 mmol/L; b. 1.5 mmol/L; c. 2.0 mmol/L; d. 2.5 mmol/L; e. 3.0 mmol/L.

Peaks: 1. acesulfame; 2. saccharin; 3. caffeine; 4. aspartame; 5. stevioside; 6. benzoic acid; 7. sorbic acid; 8. dehydroacetic acid; 9. neotame.

表 2 乙腈-TFA-AmAc 水溶液流动相体系中 5 种添加剂的保留因子与 c_{AmAc} 之间的关系

Table 2 Relationships between retention factors of five food additives and c_{AmAc} in the mobile phase system of acetonitrile-TFA-AmAc aqueous solution

Food additive	Relation equation	r^2
Acesulfame	$\ln k = 3.376 - 0.537c_{AmAc}$	0.9935
Saccharin	$\ln k = 4.769 - 0.666c_{AmAc}$	0.9967
Benzoic acid	$\ln k = 6.760 - 0.772c_{AmAc}$	1.000
Sorbic acid	$\ln k = 6.283 - 0.354c_{AmAc}$	0.9996
Dehydroacetic acid	$\ln k = 6.864 - 0.330c_{AmAc}$	1.000

100.0 mg/L 内均具有良好的线性关系 ($r^2 \geq 0.9991$); 采用在空白基质中添加目标组分的方法, 依据色谱峰的信噪比 (S/N) 大于 3 确定检出限 (LOD), S/N 大于 10 确定定量限 (LOQ)^[24, 25], 得到 9 种目标组分的 LOD 和 LOQ 分别为 0.33 ~ 2.36 mg/L 和 1.11 ~ 7.80 mg/L。

表 3 9 种食品添加剂的保留时间、标准曲线、相关系数、线性范围、检出限与定量限
Table 3 Retention times, linear equations, correlation coefficients (r^2), linear ranges, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of nine food additives

Food additive	Retention time/min	Linear equation*	r^2	Linear range/(mg/L)	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
Acesulfame	8.4	$y = 18.240x + 25.966$	0.9996	5.0 – 100.0	1.25	4.17
Saccharin	11.4	$y = 49.830x + 31.544$	0.9999	5.0 – 100.0	0.46	1.52
Caffeine	15.2	$y = 72.570x + 40.238$	0.9999	5.0 – 100.0	0.33	1.11
Aspartame	16.3	$y = 26.019x + 3.3762$	0.9998	5.0 – 100.0	0.90	3.00
Benzoic acid	16.5	$y = 16.258x + 4.5037$	0.9995	5.0 – 100.0	1.27	4.24
Sorbic acid	17.8	$y = 22.555x + 3.7054$	0.9998	5.0 – 100.0	1.06	3.53
Stevioside	18.8	$y = 5.787x + 1.9635$	0.9991	10.0 – 100.0	2.36	7.80
Dehydroacetic acid	19.6	$y = 14.899x - 8.6486$	0.9993	10.0 – 100.0	1.84	6.14
Neotame	20.4	$y = 12.714x + 3.3612$	0.9991	10.0 – 100.0	1.60	5.34

* y : peak area; x : mass concentration, mg/L.

以市售干红葡萄酒为空白基质, 9 种食品添加剂的加标水平分别为 8.0 和 40.0 mg/L, 各进行 5 次的回收率平行试验, 其色谱图见图 4。9 种目标组分在 8.0 mg/L 和 40.0 mg/L 两个加标水平下的回

收率分别为 91.10% ~ 104.4% 与 87.61% ~ 108.4%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 6.7% ~ 9.4% 与 2.2% ~ 9.3% (见表 4)。

表 4 葡萄酒样品中 9 种食品添加剂的回收率 ($n=5$)
Table 4 Spiked recoveries of nine food additives in a wine sample ($n=5$)

Food additive	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
Acesulfame	56.71	8.0	64.34	95.40	8.3
		40.0	91.75	87.61	9.0
Saccharin	57.07	8.0	64.44	92.10	7.8
		40.0	93.24	90.44	6.2
Caffeine	1.21	8.0	8.67	93.23	7.2
		40.0	39.80	96.47	4.7
Aspartame	1.77	8.0	9.06	91.10	9.4
		40.0	45.11	108.4	4.1
Benzoic acid	ND	8.0	7.84	98.00	6.9
		40.0	39.01	97.53	5.8
Sorbic acid	40.83	8.0	48.46	95.38	6.7
		40.0	77.10	90.67	9.3
Stevioside	ND	8.0	8.35	104.4	8.1
		40.0	36.08	90.20	6.0
Dehydroacetic acid	ND	8.0	7.78	97.25	8.5
		40.0	40.14	100.4	5.4
Neotame	ND	8.0	8.20	102.5	7.6
		40.0	37.38	93.45	2.2

ND: not detected.

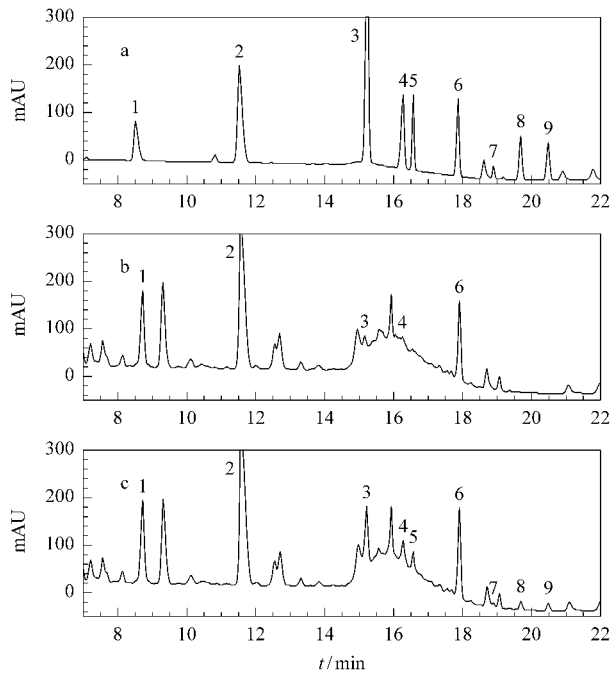


图 4 在乙腈-TFA (0.01%) -AmAc (2.5 mmol/L) 水溶液体系中 (a) 40 mg/L 的混合标准溶液、(b) 葡萄酒样品和 (c) 加标水平为 8.0 mg/L 的葡萄酒样品的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of (a) a mixture of nine food additives at 40 mg/L, (b) a real wine sample and (c) a wine sample spiked with 8.0 mg/L nine food additives with acetonitrile-TFA (0.01%, v/v) -AmAc (2.5 mmol/L) aqueous solution as the mobile phase

Peaks: 1. acesulfame; 2. saccharin; 3. caffeine; 4. aspartame; 5. benzoic acid; 6. sorbic acid; 7. stevioside; 8. dehydroacetic acid; 9. neotame.

2.4 实际样品的测定

应用所建立的方法对市售的不同品牌的干型、半干型及甜型 3 类共 6 份葡萄酒样品进行了测定, 结果见表 5。由表 5 可知 6 份葡萄酒样品中有 4 份添加了甜味剂, 有 1 份添加了防腐剂山梨酸。国家标准 GB 2760-2011《食品添加剂使用标准》和 CCGF 103.4-2010《产品质量监督抽查实施规范》对葡萄酒中允许添加的食品添加剂种类和浓度作了明确规

定,其中规定不允许将人工合成的甜味剂及苯甲酸和脱氢乙酸等防腐剂添加到葡萄酒中,同时也规定了山梨酸的允许使用限量标准(不大于 0.2 g/kg)^[26,27]。然而,对市售葡萄酒的检测结果表明目

前市场上的葡萄酒含有非法添加的人工合成甜味剂和防腐剂,这应引起有关食品安全监管部门的重视,以便应对潜在的食品安全风险。

表 5 葡萄酒样品的测定结果

Table 5 Determination results of wine samples

mg/L

Food additive	Dry red wine-1	Dry red wine-2	Demi-sec wine-1	Demi-sec wine-2	Doux wine-1	Doux wine-2
Acesulfame	22.63	ND	ND	2.28	ND	1.32
Saccharin	ND	16.72	ND	ND	ND	ND
Caffeine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Aspartame	12.75	ND	ND	19.62	ND	ND
Benzoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sorbic acid	ND	ND	ND	ND	ND	32.26
Stevioside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dehydroacetic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Neotame	1.81	2.71	ND	1.92	ND	ND

ND: not detected.

3 结论

通过对反相高效液相色谱法同时检测苯甲酸等 9 种食品添加剂所采用的流动相体系(乙腈-TFA 水溶液体系和乙腈-TFA-AmAc 水溶液体系)的定量研究,建立了反相高效液相色谱法梯度洗脱同时检测葡萄酒中 9 种食品添加剂的分析方法。结果表明,TFA 与 TFA-AmAc 缓冲体系均具有离子抑制剂与有机调节剂的双重作用,对于溶质的色谱保留行为具有较强的调节能力。在 TFA 与 AmAc 的协同作用下,在乙腈-TFA (0.01% v/v)-AmAc (2.5 mmol/L) 水溶液流动相体系中 9 种食品添加剂得到了基线分离。该方法准确、高效、灵敏度高,为食品添加剂的多组分同时测定提供了一种新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Ji C, Sun Y Y, Li X Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (嵇超, 孙艳艳, 李秀琴, 等. 色谱), 2009, 27(1): 111
- [2] Guarino C, Fuselli F, Mantia A L, et al. Food Chem, 2011, 127: 1294
- [3] GB/T 23495-2009
- [4] GB/T 21703-2010
- [5] GB/T 5009.140-2003
- [6] Wasik A, McCourt J, Buchgraber M. J Chromatogr A, 2007, 1157: 187
- [7] Cantarelli M A, Pellerano R G, Marchevsky E J, et al. Food Chem, 2009, 115: 1128
- [8] Zhu Y, Guo Y Y, Ye M L, et al. J Chromatogr A, 2005, 1085: 143
- [9] Medeiros R A, de Carvalho A E, Rocha-Filho R C, et al. Talan-

ta, 2008, 76: 685

- [10] Frazier R A, Inns E L, Dossi N, et al. J Chromatogr A, 2000, 876: 213
- [11] Schoenmakers P J, van Molle S, Hayes C M G, et al. Anal Chim Acta, 1991, 250: 1
- [12] Marko-Varga G, Barcelo D. Chromatographia, 1992, 34: 146
- [13] Gardner M S, Voyksner R D, Haney C A. Anal Chem, 2000, 72: 4659
- [14] Ming X, Han S Y, Qi Z C, et al. Talanta, 2009, 79: 752
- [15] Zou H F, Zhang Y K, Lu P C. Chinese Journal of Chromatography (邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 色谱), 1992, 10(6): 329
- [16] Liu J Y, Yang X D, Xu L Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 等. 色谱), 2002, 20(3): 245
- [17] Qi Z C, Mei S B, Lian H Z. Science in China Series B: Chemistry (戚争春, 梅少博, 练鸿振. 中国科学 B 辑: 化学) 2009, 39: 806
- [18] Ji C, Feng F, Chen Z X, et al. Chinese Journal of Chromatography (嵇超, 冯峰, 陈正行, 等. 色谱), 2010, 28(8): 749
- [19] Dolan J W, Gant J R, Synder L R. J Chromatogr, 1979, 165: 31
- [20] Lu P C, Lu X M. J Chromatogr, 1984, 292: 169
- [21] LoBrutto R, Jones A, Kazakevich Y V, et al. J Chromatogr A, 2001, 913: 173
- [22] Nikitas P, Pappa-Louisi A. J Chromatogr A, 2002, 971: 47
- [23] Yu Y N, Shang Z H, Chen J Z, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (于亿年, 商振华, 陈谨之, 等. 分析化学), 1991, 19(11): 1243
- [24] Bolaños P P, Frenich A G, Martínez Vidal J L. J Chromatogr A, 2007, 1167: 9
- [25] Walorczyk S. J Chromatogr A, 2007, 1165: 200
- [26] GB 2760-2011
- [27] CCGF 103.4-2010