

高压液相色谱法快速测定饮料中的五种食品添加剂

魏 杰¹, 郭志谋^{2*}, 章飞芳^{1*}, 梁鑫淼^{1,2}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

摘要: 目的 建立一种高压液相色谱方法同时检测饮料制品中3种甜味剂(安赛蜜、糖精钠、阿斯巴甜)和2种防腐剂(苯甲酸、山梨酸)。**方法** 样品采用起始流动相稀释后直接过膜分析, 色谱分离在极性修饰XAqua C₁₈色谱柱上进行, 流动相采用50 mmol/L pH 4.5 KH₂PO₄和乙腈, 梯度模式洗脱, 流速2 mL/min, 柱温40 ℃, 6 min内即可完成一次分离分析, 加上4 min梯度平衡时间, 10 min内即可完成平衡及分离。**结果** 5种食品添加剂在0.5~50 mg/L内线性关系良好, 相关系数 r^2 均大于0.9999。在两种饮料基质中添加50、100、150 mg/kg 3个浓度水平, 方法回收率为96.48%~105.64%, 相对标准偏差为0.21%~5.39%; 以信噪比S/N=3计算, 方法检测限为0.02~0.08 mg/L。**结论** 建立的分析方法快速、准确, 可满足饮料中甜味剂和防腐剂的同时检测。

关键词: 高压液相色谱法; 快速分析; 甜味剂; 防腐剂; 饮料

Rapid determination of five food additives in soft drinks by high pressure liquid chromatography

WEI Jie¹, GUO Zhi-Mou^{2*}, ZHANG Fei-Fang^{1*}, LIANG Xin-Miao^{1,2}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;
2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high pressure liquid chromatography method for the simultaneous determination of 3 sweeteners (acesulfame-K, saccharin sodium, aspartame) and 2 preservatives (benzoic acid, sorbic acid) in soft drinks. **Methods** The samples were diluted with initial mobile phase and filtrated for liquid chromatographic analysis. The separation was performed on a polar-modified XAqua C₁₈ column with 50 mmol/L pH 4.5 KH₂PO₄ and acetonitrile as mobile phase in gradient mode. The flow rate was set at 2 mL/min and column temperature was 40℃. The separation could be achieved within 6 min. And one sample could be analyzed within 10 min with the addition of 4 min equilibration time. **Results** Under the optimized chromatographic conditions, a good linearity was obtained in the range of 0.5~50 mg/L for the 5 food additives, with correlation coefficients (r^2) all above 0.9999. For samples (carbonated and fruit juice beverage matrix) spiked with 50, 100 and 150 mg/kg of the 5 food additives, the recoveries and relative standard deviations (RSD) were

基金项目: 科技部重大科学仪器设备开发专项(2012YQ090229)、国家科技支撑项目(2011BAK10B04)、国家自然科学基金项目(21177040)

Fund: Supported by the Major scientific Instruments Equipment Special Ministry of Science and Technology of China(2012YQ090229), the Ministry of Science and Technology of China (2011BAK10B04) and the National Natural Science Foundation of China (21177040)

*通讯作者: 章飞芳, 副研究员, 主要研究方向为食品安全分析。E-mail: zhangff@ecust.edu.cn

郭志谋, 副研究员, 主要研究方向为新型分离材料与分离技术。E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn

Corresponding author: ZHANG Fei-Fang, Associate Professor, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, No.130, Meilong Road, Shanghai 200237, China. E-mail: zhangff@ecust.edu.cn

GUO Zhi-Mou, Associate Professor, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, No. 457, Zhongshan Road, Dalian 116023, China. E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn

96.48%~105.64% and 0.21%~5.39%, respectively. The limits of detection (LOD) of the method calculated by signal to noise ratio (S/N) = 3:1 was 0.02~0.08 mg/L. **Conclusion** The developed analysis method was rapid and accurate, and could be used for the simultaneous determination of sweeteners and preservatives in soft drinks.

KEY WORDS: high pressure liquid chromatography; rapid analysis; sweeteners; preservatives; soft drinks

1 引言

饮料是人们日常生活中常用的消费品之一。在饮料行业,为改善产品口感和延长保质期,常在其中添加一定量的甜味剂和防腐剂。同时,甜味剂的合理使用还可以降低饮料热量,为肥胖和糖尿病患者带来方便,如可口可乐公司推出的零度可乐,即为无糖饮料。然而,过量使用这些食品添加剂,可能会带来人体健康的隐患。因此,我国对于它们的使用限量制定有严格标准^[1]。

对于食品中甜味剂和防腐剂的定量测定,目前文献报道的检测方法主要有液相色谱法^[2-3]、毛细管电泳法^[4-5]、气相色谱法^[6]和离子色谱法^[7]等。我国也制定了一系列甜味剂和防腐剂测定的标准方法^[8-11]。在这些测定方法中,以液相色谱法应用最为广泛。刘芳等^[12]采用高压液相色谱-蒸发光散射检测法测定食品中5种甜味剂,该法操作简单、测定成本低,可一次性测定食品中5种甜味剂,但是采用蒸发光散射检测灵敏度低,重现性差。Yang等^[13]建立了HPLC/ESI-MS方法用于食品中8种甜味剂的检测,定性准确且灵敏度高,但是质谱检测成本太高,不利于普及。紫外检测器应用广泛、灵敏度高、检测成本低,非常适合食品中甜味剂和防腐剂的检测。目前国内内外有不少学者采用紫外检测测定食品中的甜味剂和防腐剂^[2-3,14],取得了不错的结果。

在以上分析方法中,检测目标一般只针对甜味剂或防腐剂。然而在饮料生产中,甜味剂和防腐剂一般同时使用。一些同时检测食品中甜味剂和防腐剂的文献往往需要较长的分析时间^[14-16],大大降低了食品安全监测的效率。因此,开发一种同时测定饮料中甜味剂和防腐剂的快速分析方法就显得尤为重要。本文以饮料中常用的安赛蜜、糖精钠、阿斯巴甜、苯甲酸、山梨酸为研究对象,并充分考虑食品安全检测的效率问题,发展了饮料中甜味剂和防腐剂的快速测定方法。图1所示为饮料中常用甜味剂与防腐剂结构式。

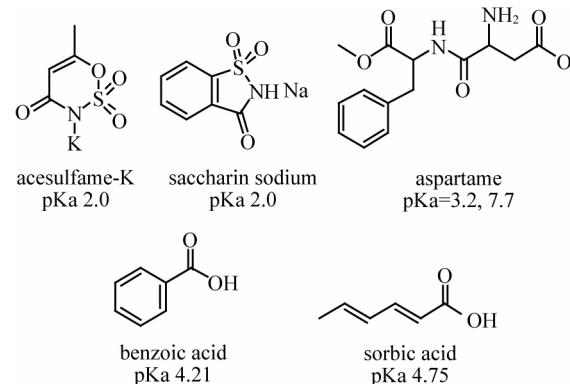


图1 甜味剂和防腐剂结构式

Fig. 1 Chemical structures of the sweeteners and preservatives

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695 高压液相色谱仪,配有Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司); XAqua C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm 填料; 华谱新创科技有限公司); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司); KQ5200DE 超声仪(江苏昆山超声仪器有限公司)。

安赛蜜(acesulfame-K, 纯度 99.9%)、糖精钠(saccharin sodium, 纯度 99.9%)、阿斯巴甜(aspartame, 纯度 99.0%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 苯甲酸(benzoic acid, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 山梨酸(sorbic acid, 纯度 99.0%, 百灵威科技有限公司); 乙腈(安徽时联特种溶剂股份有限公司); 磷酸二氢钾(纯度 99%, 百灵威科技有限公司); 三氟乙酸(HPLC 级, 纯度 99.9%, 百灵威科技有限公司)。

2.2 标准溶液配制

准确称取 100 mg(精确到 0.01 mg)苯甲酸和山梨酸至两个 10 mL 容量瓶中,用甲醇:水(50:50, v/v)定容,配置成 10 mg/mL 标准储备溶液。准确称取 10 mg 安赛蜜、糖精钠和阿斯巴甜至同一个 10 mL 容量瓶中,加少量水溶解,然后准确加入 1 mL 苯甲酸和 1 mL 山梨酸储备液,混匀后用水定容至 10 mL,配制成浓

度为 1 mg/mL 的混合标准储备液。

用水逐级稀释混合标准储备液, 配制成浓度为 50、10、2、0.5 mg/L 的标准溶液, 所有标准溶液均置于 4 ℃冰箱中避光保存。

2.3 样品前处理

碳酸饮料超声 5~10 min, 脱去二氧化碳。准确称取脱气后的碳酸饮料或果汁饮料样品 1 g(精确到 0.01 g), 置于 10 mL 容量瓶中, 用 50 mmol/L KH₂PO₄ (pH 4.5):乙腈(95:5, v/v)定容至 10 mL, 混匀, 取试样适量过 0.45 μm 水系微孔滤膜, 直接进行液相分析。

2.4 色谱条件

色谱柱: XAqua C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm); 流动相 A: 50 mmol/L pH 4.5 KH₂PO₄, 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~6 min, 5%~40% B; 流速: 2 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样体积: 20 μL; 分析时间: 6 min; 平衡时间: 4 min; 检测波长 215 nm, 以保留时间定性, 外标法定量。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

实验中所选的 3 种甜味剂和 2 种防腐剂均为酸性物质(其中阿斯巴甜为两性化合物, 各化合物 pKa 值见图 1), 同时甜味剂还是极性化合物。常规烷基键合

反相色谱柱, 主要依靠疏水作用实现分离, 在极性选择性方面存在一定的局限性, 因此不利于此类化合物的快速分离^[17-18]。根据 5 种食品添加剂的极性特征, 选择极性修饰的反相 C₁₈ 柱, 可在提供疏水作用力的同时提供部分极性作用力, 以改善极性化合物的保留和分离选择性, 实现选择性主导的快速分离。

从图 2 可以看出, 5 种食品添加剂的最大紫外吸收各不相同, 阿斯巴甜在 230 nm 以上基本无紫外吸收。为实现同时检测, 实验中选取 215 nm 作为检测波长。流动相体系首先采用三氟乙酸/水-三氟乙酸/乙腈, 但在此条件下, 苯甲酸与山梨酸无法实现分离(图 3a)。这与文献^[2]中结论一致, 即苯甲酸与山梨酸的分离需控制流动相 pH 值在 4.5 以上。醋酸铵与磷酸盐缓冲液均可控制 pH 4.5, 但是醋酸铵在低波长(215 nm)下本底吸收过高, 不利于检测, 因此本文选取 50 mmol/L pH 4.5 KH₂PO₄ 和乙腈为流动相进行 5 种食品添加剂的分离, 从图 3b 可以看到, 在此流动相体系下所有食品添加剂均实现了很好的分离。

在食品安全分析中, 常常有大量的样品需要进行检测, 此时分析效率就显得尤为重要。为提高分析效率, 在前述分析方法基础上进一步优化色谱条件, 将流动相流速提高到 2 mL/min, 同时色谱柱柱温设置为 40 ℃(40 ℃柱温可适当降低 2 mL/min 引起的高压), 可在 6 min 内完成一次分析(图 3c), 加上 4

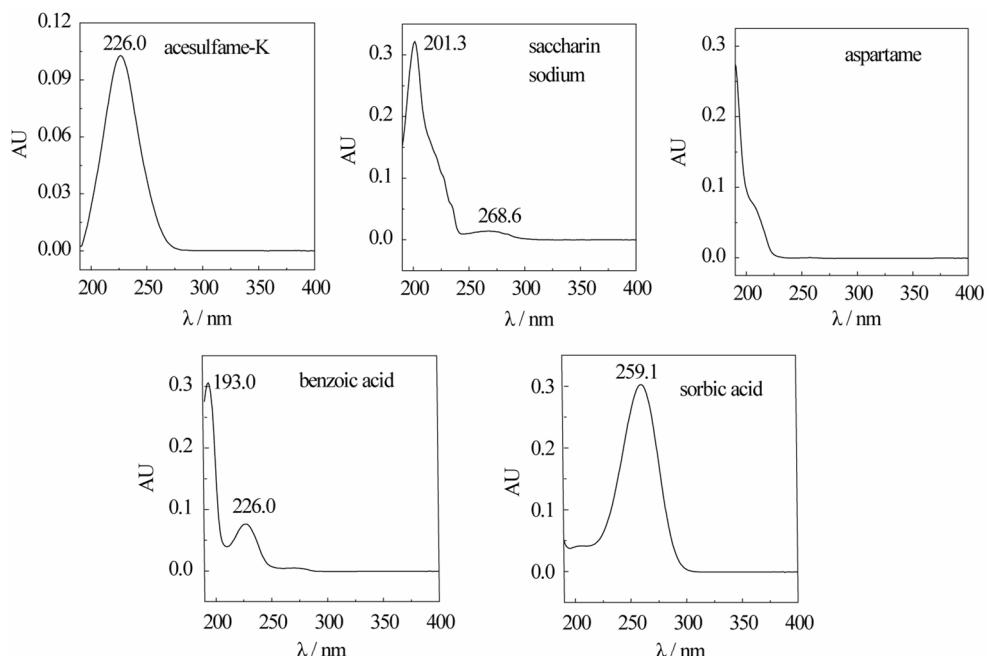
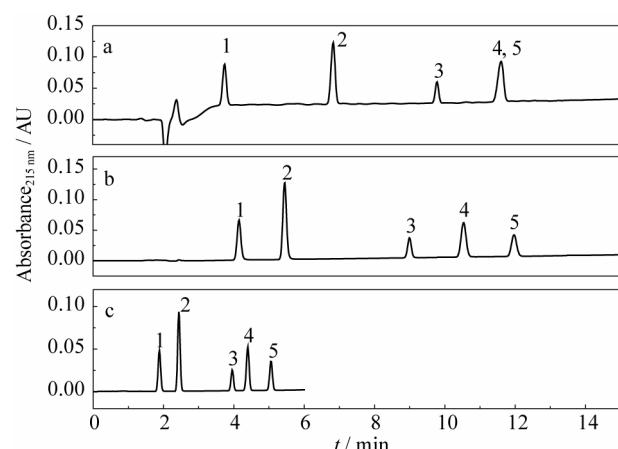


图 2 5 种食品添加剂的紫外光谱图
Fig. 2 UV absorbance spectra of the 5 food additives



1、安赛蜜；2、糖精钠；3、阿斯巴甜；4、苯甲酸；5、山梨酸

图3 不同流动相条件下5种食品添加剂的分离色谱图
Fig. 3 Chromatograms of the 5 food additives under different separation conditions

注：色谱条件：(a)流动相 A: 0.1% (v/v)三氟乙酸/水，流动相 B: 0.09% (v/v)三氟乙酸/乙腈；梯度：0~15 min, 5%~50% B；流速：1 mL/min；柱温：30 °C。(b) 流动相 A: 50 mmol/L KH₂PO₄, pH 4.5, 流动相 B: 乙腈；梯度：0~15 min, 5%~40% B；流速：1 mL/min；柱温：30 °C。(c) 流动相：同(b)；梯度：0~6 min, 5%~40% B；流速：2 mL/min；柱温：40 °C。

min 梯度平衡时间，每个样品分析时间可缩短至 10 min，大大提高了样品测定效率。

3.2 线性范围和检测限

将 1.2 节中配制的不同质量浓度(0.5、2、10、50 mg/L)的混合标准溶液各重复分析 3 次，用所得到的峰面积平均值为纵坐标，五种食品添加剂的质量浓度(mg/L)为横坐标建立回归曲线，结果表明五种食品添加剂在 0.5~50 mg/L 内线性关系良好，相关系数 r^2 均大于 0.9999；以信噪比 S/N=3 计算，检测限为 0.02~0.08 mg/L，如表 1 所示。

3.3 回收率和精密度

碳酸类饮料选择某饮料公司出品的无糖碳酸饮料，果汁饮料选择另一公司出品的柠檬汁饮料为代表基质。在两种空白基质中均添加 50、100、150 mg/kg 3 个浓度水平的 5 种食品添加剂，进行加标回收率测定，每个浓度平行测定 5 次，用线性回归方程计算加标回收率和相对标准偏差(RSD)。如表 2 所示，无糖

表1 五种食品添加剂的线性方程、线性相关系数和检测限(n=3)

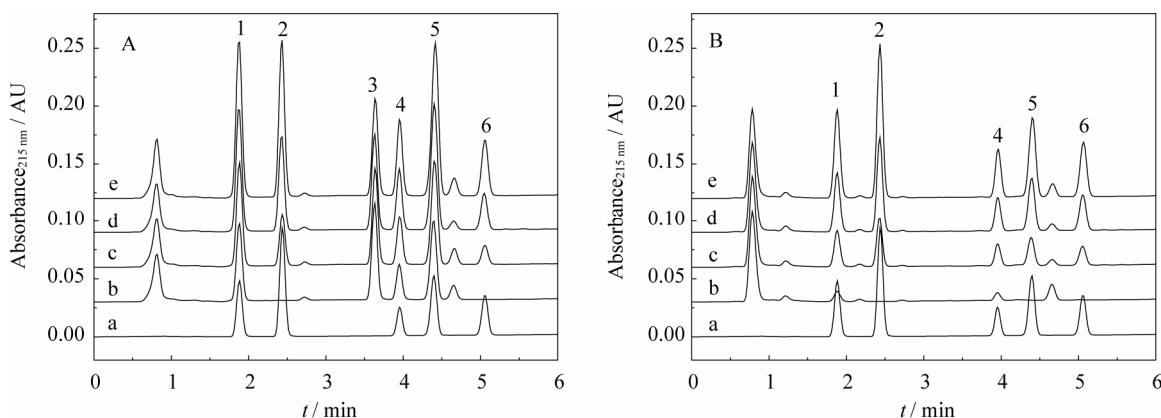
Table 1 regression equations, correlation coefficients (r^2) and limits of detection (LODs) of the five food additives (n=3)

样品	浓度范围 (mg/L)	线性方程	线性相关系数(r^2)	LOD (mg/L)
安赛蜜	0.5~50	$Y = 24710 X + 2275.7$	0.99996	0.04
糖精钠	0.5~50	$Y = 46271 X + 4474.8$	0.99996	0.02
阿斯巴甜	0.5~50	$Y = 12045 X + 1494.2$	0.99995	0.08
苯甲酸	0.5~50	$Y = 28079 X + 3195.1$	0.99995	0.04
山梨酸	0.5~50	$Y = 18711 X + 2505.6$	0.99994	0.06

表2 不同饮料基质中5种食品添加剂的回收率和相对标准偏差(n=5)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the 5 food additives in different soft drinks (n=5)

样品	添加量 (mg/kg)	无糖碳酸饮料				柠檬汁饮料			
		本底值 (mg/kg)	测定量 (mg/kg)	回收率/%	RSD/%	本底值 (mg/kg)	测定量 (mg/kg)	回收率/%	RSD/%
安赛蜜	50	144.81	197.62	105.64	2.49	19.85	69.07	98.54	3.78
	100		246.15	101.35	5.39		117.92	98.12	2.66
	150		295.68	100.59	3.79		170.20	100.26	0.21
糖精钠	50	0	49.31	98.62	0.96	0	48.24	96.48	4.79
	100		98.81	98.81	3.99		96.64	96.64	4.02
	150		147.58	98.39	3.34		150.17	100.11	0.60
阿斯巴甜	50	128.61	180.10	103.00	1.99	30.17	81.24	102.07	1.57
	100		230.57	101.97	2.27		130.94	100.74	0.85
	150		281.73	102.09	1.04		181.63	100.95	0.77
苯甲酸	50	138.49	189.90	102.80	1.84	0	50.31	100.63	1.12
	100		239.77	101.27	1.91		99.78	99.78	0.56
	150		290.16	101.11	1.34		150.36	100.24	0.66
山梨酸	50	0	49.42	98.83	0.93	0	51.55	103.11	1.02
	100		100.46	100.46	1.50		101.34	101.34	0.54
	150		151.09	100.73	0.70		152.15	101.43	0.62



a、10 mg/L 混合标样; b、基质空白样品; c、添加 50 mg/kg; d、添加 100 mg/kg; e、添加 150 mg/kg
1、安赛蜜; 2、糖精钠; 3、咖啡因; 4、阿斯巴甜; 5、苯甲酸; 6、山梨酸

图 4 无糖碳酸饮料(A)和柠檬汁饮料(B)加标回收色谱图

Fig. 4 Spiked chromatograms of (A) sugar-free carbonated beverage and (B) lemon juice

表 3 多种碳酸饮料和果汁饮料基质中 5 种食品添加剂的测定结果

Table 3 Quantitation of the 5 food additives in market soft drink samples

实际样品	安赛蜜		糖精钠		阿斯巴甜		苯甲酸		山梨酸	
	标签标示	测定量 (mg/kg)								
碳酸饮料-1	无	n.d.								
碳酸饮料-2(无糖)	有	127.67	无	n.d.	有	192.41	无	n.d.	无	n.d.
碳酸饮料-3	无	n.d.	无	n.d.	无	n.d.	有	144.42	无	n.d.
碳酸饮料-4	有	33.03	无	n.d.	无	n.d.	有	135.99	无	n.d.
橙汁饮料	无	n.d.	无	n.d.	无	n.d.	无	n.d.	无	64.25
桃汁饮料	无	n.d.								

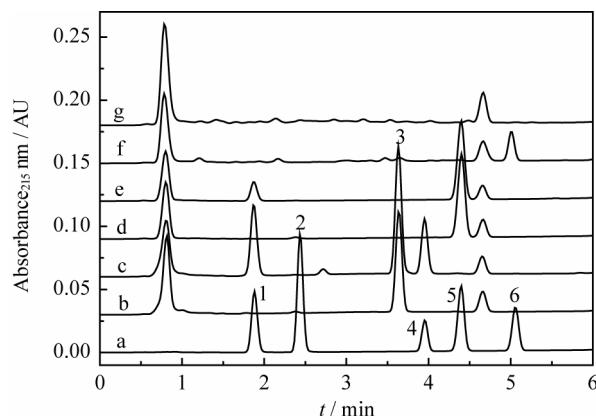
注: n.d.: 未检出

碳酸饮料中 5 种食品添加剂的回收率为 98.39%~105.64%, RSD 为 0.70%~5.39%; 柠檬汁饮料中五种食品添加剂的回收率为 96.48%~103.11%, RSD 为 0.21%~4.79%。结果表明 5 种食品添加剂在 3 个添加浓度范围内回收率良好, 可满足检测要求。图 4 是无糖碳酸饮料和柠檬汁饮料的加标色谱图, 从图 4A 中还可看出, 本方法同时适用于碳酸饮料中咖啡因的含量测定。

3.4 实际样品分析

使用本方法对市场上多种碳酸饮料和果汁饮料样品进行检测, 结果如表 3 所示。对于饮料标签中所标注添加的甜味剂和防腐剂, 使用本方法可测定出添加量。测定结果与 GB 2760-2011《食品添加剂使用标准》中最大使用限量值进行比较, 所有测定样品中 5 种食品添加剂的添加量均小于国标限量值, 即所有测定产品均合格。此外, 在某品牌橙汁样品中, 测

到了标签中未予写出的山梨酸的存在。图 5 为几种实际样品的检测色谱图。



a、10 μg/mL 混合标样; b、碳酸饮料-1; c、碳酸饮料-2(无糖); d、碳酸饮料-3; e、碳酸饮料-4; f、橙汁饮料; g、桃汁饮料. 1、安赛蜜; 2、糖精钠; 3、咖啡因; 4、阿斯巴甜; 5、苯甲酸; 6、山梨酸

图 5 实际样品测定色谱图

Fig. 5 Chromatograms of real soft drink samples

4 结 论

建立了饮料基质中三种甜味剂和两种防腐剂的快速检测方法。在优化的色谱条件下,采用2 mL/min流速和40℃柱温,可在6 min完成一次分离分析,10 min内完成一个样品的定量测定(4 min梯度平衡时间),大大提高了样品测定效率。本方法测定结果准确,稳定性好,检测效率高,为饮料中甜味剂和防腐剂的同时检测提供了一种新的参考方法,可在相关质检机构普及使用。

参 考 文 献

- [1] GB 2760-2011 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2011 Food Additive Standards [S].
- [2] Guarino C, Fuselli F, La Mantia A, et al. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses [J]. Food Chem, 2011, 127(3): 1294–1299.
- [3] Lino CM, Pena A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment [J]. Food Chem, 2010, 121(2): 503–508.
- [4] Bergamo AB, Fracassi da Silva JA, de Jesus DP. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection [J]. Food Chem, 2011, 124(4): 1714–1717.
- [5] Cantarelli MA, Pellerano RG, Marchevsky EJ, et al. Simultaneous Determination of Saccharin and Aspartame in Commercial Noncaloric Sweeteners Using the PLS-2 Multivariate Calibration Method and Validation by Capillary Electrophoresis [J]. J Agr Food Chem, 2008, 56(20): 9345–9349.
- [6] Dong CZ, Wang WF. Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages[J]. Anal Chim Acta, 2006, 562(1): 23–29.
- [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] GB/T 5009.140-2003 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S].
GB/T 5009.140-2003 Determination of acesulfame K in beverage [S].
- [9] GB/T 5009.28-2003. 食品中糖精钠的测定[S].
GB/T 5009.28-2003 Determination of saccharin sodium in food [S].
- [10] GB/T 22254-2008 食品中阿斯巴甜的测定[S].
GB/T 22254-2008 Determination of aspartame in food [S].
- [11] GB/T 5009.29-2003. 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].
GB/T 5009.29-2003 Determination of sorbic acid and benzoic acid in foods [S].
- [12] 刘芳, 王彦, 王玉红, 等. 固相萃取-高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时检测食品中5种人工合成甜味剂[J]. 色谱, 2012, 30(03): 292–297.
Liu F, Wang Y, Wang YH, et al. Simultaneous determination of five synthetic sweeteners in food by solid phase extraction-high pressure liquid chromatography-evaporative light scattering detection [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(03): 292–297.
- [13] Yang DJ, Chen B. Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS[J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(8): 3022–3027.
- [14] 张伟, 李芊, 唐晓丹, 等. RP-HPLC 同时测定饮料中安赛蜜、阿斯巴甜及苯甲酸[J]. 光谱实验室, 2012, 29(01): 87–90.
Zhang W, Li Q, Tang XD, et al. Simultaneous determination of acesulfame, aspartame and benzoic acid in drinks by RP-HPLC [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2012, 29(01): 87–90.
- [15] 宋戈, 姜金斗, 张秋梅. 乳及乳制品中多种防腐剂和甜味剂的同时测定[J]. 色谱, 2010, 28(03): 323–326.
Song G, Jiang JD, Zhang QM. Simultaneous determination of various aseptics and sweeteners in milk and dairy products [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(03): 323–326.
- [16] 翟增运, 王家保. HPLC 法同时测定果冻中的防腐剂、甜味剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(04): 806–807.
Zhai ZY, Wang JB. Simultaneous determination of preservatives and sweetenings in fruit jelly by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(04): 806–807.
- [17] Wilson NS, Gilroy J, Dolan JW, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography-VI. Columns with embedded or end-capping polar groups [J]. J Chromatogr A, 2004, 1026(1-2): 91–100.
- [18] Guo ZM, Wang CR, Liang T, et al. Polar-copolymerized approach based on horizontal polymerization on silica surface for preparation of polar-modified stationary phases [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(27): 4555–4560.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



魏杰, 博士在读, 主要研究方向为食品安全分析。

E-mail: weijie302@126.com



章飞芳, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品安全分析。

E-mail: zhangff@ecust.edu.cn



郭志谋, 副研究员, 主要研究方向为新型分离材料与分离技术。

E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn