

# 高效液相色谱法同时检测酸性乳饮料及冰淇淋中 安赛蜜、苯甲酸、山梨酸和糖精钠含量

袁凤琴\* 王佳, 牛爱华, 苏美玲, 梁轶, 常建军, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

**摘要:** **目的** 建立酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠含量的高效液相色谱分析方法。**方法** 样品去除蛋白后, 用甲醇提取, 提取液用高压液相色谱仪进行检测。**结果** 安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠在 0~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  范围内, 浓度与峰面积有良好的线性关系, 相关系数大于 0.999, 检出限分别为 2.87、0.96、0.97 和 2.69  $\text{mg}/\text{kg}$ ; 样品的加标平均回收率分别为 95.59%~104.52%、93.21%~108.05%、97.75%~107.98% 和 97.48%~103.67%, 相对标准偏差均小于 10%。**结论** 本方法适用于酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠含量同时测定的需要。

**关键词:** 安赛蜜; 苯甲酸; 山梨酸; 糖精钠; 高效液相色谱法; 检测

## Determination of acesulfame, benzoic acid, sorbic and sodium saccharin in acidic milk drink and ice cream by high performance liquid chromatography

YUAN Feng-Qin\*, WANG Jia, NIU Ai-Hua, SU Mei-Ling, LIANG Yi,  
CHANG Jian-Jun, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co.Ltd, Hohhot 011500, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of the content of acesulfame, benzoic acid, sorbic acid, and sodium saccharin in acidic milk and ice cream. **Methods** The samples were extracted with methanol after precipitating the protein, and their contents were measured by HPLC. **Results** There was a good linear relationship between the concentration and peak area of acesulfame, benzoic acid, sorbic acid, and saccharin sodium in the range of 0~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , the correlation coefficient is greater than 0.999. The detection limit were 2.87, 0.96, 0.97, and 2.69  $\text{mg}/\text{kg}$ , and the recoveries were 95.59%~104.52%, 93.21%~108.05%, 97.75%~107.98%, and 97.48~103.67%, respectively, with the relative standard deviation less than 10%. **Conclusion** This method is suitable for the requirement of determination of the content of acesulfame, benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in acidic milk drinks and ice cream.

**KEY WORDS:** acesulfame; benzoic acid; sorbic acid; sodium saccharin; high performance liquid chromatography; detection

\*通讯作者: 袁凤琴, 分析员, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。E-mail:yuanfengqin2008@163.com

\*Corresponding author: YUAN Feng-Qin, Analyst, Senior Engineer, Central Laboratory of Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd, Shengle Economic Park, Helingeer County, Hohhot 011500, China. E-mail:yuanfengqin2008@163.com

## 1 引言

安赛蜜, 化学名乙酰磺胺酸钾, 日容许摄入量(acceptable daily intake estimation)为0~15 mg/kg 体重(世界卫生组织(World Health Organization)/粮食及农业组织(United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 1994), 是目前各种乳制品饮料中的主要甜味剂, 限量为0.3 g/kg。苯甲酸是原奶中马尿酸在微生物作用下的产物, 国际上规定在乳制品中的限量残留为0.3 g/kg。山梨酸抑制骨骼生长, 危害肝脏、肾脏, 糖精钠很多食品中使用, 在冰淇淋中添加更为普遍, 在一般添加限量为0.15 g/kg, 这两种防腐剂及两种添加剂被广泛的用于食品行业中, 过量的摄入对人体均有害<sup>[1-3]</sup>。

目前各种食品添加剂的检测方法各不相同, 如GB/T 5009.28-2003《食品中糖精钠的测定》<sup>[4]</sup>、GB/T 5009.29-2003《食品中山梨酸、苯甲酸的测定》<sup>[5]</sup>及GB 21703-2010《乳及乳制品中苯甲酸、山梨酸的测定》<sup>[6]</sup>、GB/T 5009.140-2003《饮料中乙酰磺胺酸钾的测定》<sup>[7]</sup>等方法。两种甜味剂及两种防腐剂均采用等度液相色谱法分别测定<sup>[8,9]</sup>。目前, 安赛蜜、糖精钠的检测方法都是针对饮料产品的, 适合检测饮料产品的方法, 在检测酸性乳饮料及冰淇淋时会存在蛋白无法沉淀的问题, 同时, 安赛蜜糖精钠对于同一个产品没有方法同时进行检测。

本研究在参考相关文献<sup>[10,11]</sup>及GB 21703-2010《乳及乳制品中苯甲酸、山梨酸的测定》<sup>[6]</sup>的基础上, 采用High Performance Liquid Chromatography方法同时检测酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的含量, 以提高检测工作效率。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

仪器: 日立2000系列, 迪马钻石C8色谱柱一代(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 万分之一天平(XP-205型); 水浴锅(金坛鸿科仪器厂 HH-8型); 涡旋仪(MS 3 BASIC型), 100 mL容量瓶, 25 mL量筒, 1000 mL容量瓶及50 mL烧杯。

试剂: 亚铁氰化钾、乙酸锌、氢氧化钠均为分析纯、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)和磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)均为优级纯、甲醇(色谱纯),

安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠标准溶液: 1 mg/mL(中国计量科学研究院)。

亚铁氰化钾溶液(92 g/L): 称取亚铁氰化钾(K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O) 106 g, 溶解于1000 mL容量瓶中, 定容到刻度后混匀。

乙酸锌溶液(183 g/L): 称取乙酸锌(Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 219 g, 加入32 mL乙酸, 用水溶解于1000 mL容量瓶中, 定容到刻度后混匀。

0.1 mol/L的氢氧化钠溶液: 用水溶解4 g氢氧化钠并稀释到1000 mL。

0.5 mol/L的硫酸溶液: 将30 mL浓硫酸小心缓慢加入500 mL水中, 待冷却后用水加到1000 mL。

磷酸盐缓冲液: 分别称取2.5 g磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)和2.5 g磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)于1000 mL容量瓶中, 用水定容到刻度后混匀, 用滤膜过滤后备用。

HPLC流动相: 混合5体积的色谱纯甲醇和95体积的磷酸盐缓冲溶液。

### 2.2 色谱参考条件

柱温箱为38 °C, 流速1.0 mL/min, 检测波长为227 nm。进样量20 μL, 色谱柱: 反相C<sub>8</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸缓冲液: 甲醇=95:5(v/v)。

### 2.3 样品制备

准确称取酸奶、冰淇淋20 g左右(精确到0.01 g)样品于100 mL容量瓶中, 加入25 mL 0.1 mol/L的氢氧化钠溶液, 混匀后将容量瓶放入超声波超生15 min, 或者将容量瓶放入70 °C水浴中加热15 min(在放样品之前先将水浴锅的温度升到70 °C, 然后再将样品放入水浴锅中, 当水浴锅的温度达到70 °C时开始计时)。冷却后, 用0.5 mol/L的硫酸溶液调整pH值至7.0~8.0, 加入2 mL亚铁氰化钾和2 mL醋酸锌溶液, 用力摇匀。摇匀样品, 然后加入甲醇到容量瓶的3/4处, 混匀冷却到室温, 将样品摇匀并定容到100 mL, 剧烈震荡完全提取后, 至少放置2 h之后。用样品过滤器过滤上层澄清的抽提液, 作为待测样品。

## 3 结果与讨论

### 3.1 标准曲线、检出限及标样图谱

#### 3.1.1 标准曲线、检出限

利用1:1甲醇水分别配制含有苯甲酸、山梨酸

为 1、5、10、20、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及含有安赛蜜、糖精钠 3、6、15、20、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准工作液、采用本研究中“1.2 色谱参考条件”利用液相色谱仪进行检测,以标准物质的浓度为横坐标,对应峰面积为纵坐标进行线性回归分析,得到线性回归方程及其相关系数,并根据信噪比  $S/N=3$ , 计算的 4 组分最低检测浓度,结果见表 1。

表 1 安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的工作曲线、相关系数和检出限

Table 1 Calibration curves, correlation coefficients and detections limit of 4 kinds of p-hydroxy benzoate antiseptics

组分	线性回归方程	相关系数 ( $R^2$ )	检出限 (mg/kg)
安赛蜜	$Y=59602.7X+137080.7$	0.9992	2.87
苯甲酸	$Y=79573X-59258.8$	0.9995	0.96
山梨酸	$Y=111784.5X-97519$	0.9998	0.97
糖精钠	$Y=29576.7X+47768.2$	0.9994	2.69

### 3.1.2 标样图谱

标样出峰顺序依次为安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠,详见图 1。

### 3.2 方法的回收率与精密度

分别向空白酸性乳饮料和冰淇淋中添加 3 个水平的混合标准溶液,每个加标水平取 16 个平行样,

考察方法的回收率和精密度,结果见表 2。两种防腐剂及两种甜味剂的平均回收率为 93.21%~108.05%,相对标准偏差为 1.51%~6.13%,表明该方法具有较好的准确度和精密度,满足甜味剂的添加及防腐剂的残留检测要求。

### 3.3 前处理过程中静止时间的选择

由于 GB 21703-2010《乳及乳制品中苯甲酸、山梨酸的测定》<sup>[6]</sup>的方法中,样品前处理没有规定静止时间的长短,本实验对样品提取完的待测液中各组分的含量与静止时间的关系进行了实验,具体结果如图 2。

随着样品静止时间的增加,样品中的各组分的含量在不断的增加。当静止时间在 120 min 之后,随着静止时间的延长,样品中各组分的含量不在发生变化,因此样品的静止时间选择 120 min。

### 3.4 波长的选择

乳制品和食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠这 3 种物质都是采用 230 nm 波长处检测,实验分别用 230 nm 和 254 nm 进行测定,结果山梨酸在 254 nm 处有最大吸收,峰面积为 230 nm 处的 2.5 倍,其它两种组分别在 230 nm 处有最大吸收;有文献<sup>[12]</sup>报道,安赛蜜的最大吸收波长为 230 nm,所以同时检测这 4 种物质时,检测波长选择 230 nm。

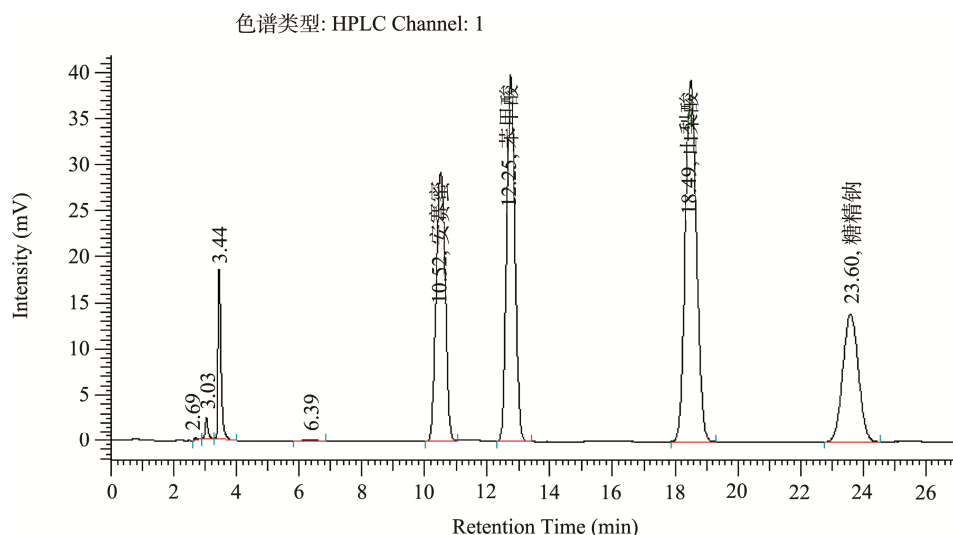


图 1 安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的标准色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the 4 kinds of p-hydroxybenzoate antiseptics standard samples

表2 样品中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠检测回收率

化合物	添加水平 (mg/kg)	样品	回收率 (%)	相对标准偏 差(%)
安赛蜜	3	酸性乳饮料	102.07	3.67
	6		95.59	
	15		99.44	
苯甲酸	1		99.33	6.13
	2		96.13	
	5		103.72	
山梨酸	1		99.53	5.81
	2		105.57	
	5		101.07	
糖精钠	3		96.48	4.88
	6		102.35	
	15		98.47	
安赛蜜	3	冰淇淋	104.52	3.33
	6		101.38	
	15		97.56	
苯甲酸	1		108.05	1.51
	2		100.37	
	5		93.21	
山梨酸	1		100.60	4.85
	2		97.75	
	5		107.98	
糖精钠	3		103.67	2.79
	6		98.21	
	15		97.59	

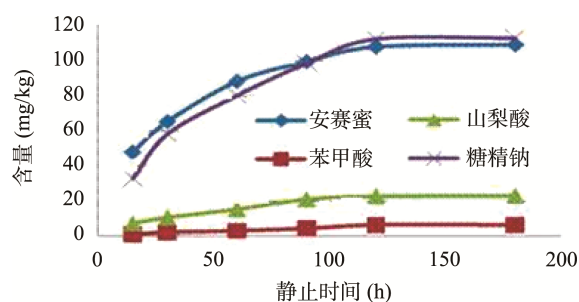


图2 样品静止时间与各组分含量的关系

Fig. 2 The relationship between sample resting time and components

## 4 结 论

采用高效液相色谱法同时检测酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的含量,采用沉淀蛋白的前处理方式,方法简便易操作,且通过精密密度实验和回收率实验分别验证了该方法的重现性和准确度,安赛蜜的相对标准偏差为 3.67%和 3.33%,回收率为 95.59%~104.52%;苯甲酸的相对标准偏差为 6.13%和 1.51%,回收率为 93.21%~108.05%;山梨酸的相对标准偏差为 4.85%和 5.81%,回收率为 97.75%~107.98%;糖精钠的相对标准偏差为 2.79%和 4.88%,回收率为 97.48~103.67%,都能够满足仪器法检测酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的含量同时检测的条件。

## 参考文献

- [1] 徐焯,李丽君,王乃芝,等. 高效液相色谱法测定饮料中防腐剂和甜味剂[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 339-341.  
Xu Y, Li LJ, Wang NZ, *et al.* Determination of preservatives and sweeteners by HPLC [J]. Food Sci, 2008, 29(6): 339-341
- [2] 汪辉,曹小彦,李林,等. 反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中 14 种常见食品添加剂的快速测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(10): 1194-1197.  
Wang H, Cao XY, Li L, *et al.* Determination of 14 kinds of common food additives in Fruit and vegetable juices by reversed-phase HPLC[J]. Anal Test J, 2009, 28(10): 1194-1197.
- [3] 陆永健. 食品添加剂和食品安全[J]. 中国高新技术企业, 2008, 24: 199.  
Lu YJ. Food additives and food safety[J]. Chin High-tech Enter, 2008, 24: 199.
- [4] 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].
- [5] 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, benzoic acid[S].
- [6] GB21703-2010 乳及乳制品中苯甲酸、山梨酸的测定[S].  
GB21703-2010 Determination of milk and dairy products benzoic acid, sorbic acid[S].
- [7] 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 potassium beverages[S].

- [8] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生检验方法-理化部分(二)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 203-207.  
Health department of People's Republic of China. Food hygiene inspection method-physical and chemical part(II)[M]. Beijing: China Standard Press, 2003: 203-207.
- [9] 骆和东, 贾玉珠, 朱宝平. 高效液相色谱法多波长同时检测饮料中的 5 种食品添加剂[J]. 海峡预防医学杂志, 2005, 11(2): 12-14.  
Luo DH, Jia YZ, Zhu BP. Determination of 5 kinds of food additives in Drinks in multi-wavelength by HPLC[J]. Strait Prev Med J, 2005, 11(2): 12-14.
- [10] GB/T5009-2003. 食品卫生标准检验方法 理化部分[S].  
GB/T5009-2003. Food hygiene inspection method physical and chemical part[S].
- [11] 邓立刚, 李增梅, 赵善仓, 等. 高效液相色谱法测定乳饮料和果汁饮料中的安塞蜜和糖精钠[J]. 山东农业科学, 2007, 3: 102-103.  
Deng LG, Li ZM, Zhao SL, *et al.* Determination of acesulfame and saccharin sodium in drinks and Fruit and vegetable juices by HPLC[J]. Shandong Agr Sci, 2007, 3: 102-104.
- [12] 白静. 高效液相色谱法测定食品中的安塞蜜[J]. 食品科学, 2011, 32: 16.  
Bai J. Determination of acesulfame by high performance liquid chromatography[J]. Food Sci, 2011, 32: 16.

(责任编辑: 邓伟)

### 作者简介



袁凤琴, 分析员, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。  
E-mail: yuanfengqin2008@163.com