

高效液相色谱法测定甜菊糖甙中的甜蜜素

朱莉萍*, 张晓琳

(济宁出入境检验检疫局, 济宁 272000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定食品添加剂甜菊糖甙中甜蜜素的检测方法。**方法** 样品, 经水溶解后无需添加沉淀剂, 加入衍生试剂, 最后采用高效液相色谱法进行测定。对称样量、流动相的选择、沉淀剂的使用和衍生化试剂的用量进行研究, 确定 0.5 g 称样量, 4 mL 衍生试剂次氯酸钠溶液衍生 10 min, 加入 25 mL 50 g/L NaHCO₃ 溶液, 振荡萃取。**结果** 甜蜜素浓度在 2.5~25.0 mg/kg 的范围与峰面积成线性关系, 线性相关系数为 0.9991, 甜蜜素的回收率为 81.8%~95.0%之间, RSD(n=6)为 1.21%~2.07%, 方法检测限为 2.5 mg/kg。**结论** 该方法操作简便, 准确可靠, 可用于鉴别甜菊糖甙中掺入的甜蜜素。

关键词: 高效液相色谱法; 甜菊糖甙; 甜蜜素; 碳纳米管

Determination of cyclamate in stevioside by high performance liquid chromatography

ZHU Li-Ping*, ZHANG Xiao-Lin

(Jining Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jining 272000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of cyclamate by high performance liquid chromatography. **Methods** These factors including mobile phase, pH and derivatization time, and the amount of derivatization reagent were investigated. The samples were derivatized after being dissolved directly without precipitating agent, the amount of derivatization reagent was 4 mL, and the derivating time was 10 min. Methanol+water (75+25, v/v) was selected as the eluent. **Results** The linear relationships between the concentration and peak area were obtained in the concentration range of 2.5~25.0 mg/L with $R^2=0.9991$. The recoveries were 81.8%~95.0% with the relative standard deviations (n=6) of 1.21%~2.07%, and the detection limit was 2.5 mg/kg. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; stevioside; cyclamate; carbon nano-tube

1 引言

甜蜜素, 又名环己基氨基磺酸钠, 属于非营养型合成甜味剂, 是我国于 1987 年开始应用甜蜜素。甜蜜素也是目前我国食品行业中应用最多的一种甜味添加剂^[1]。但从 20 世纪 70 年代初开始, 在对甜蜜素的毒理学研究中发现, 甜蜜素可能有致癌性,

其代谢产物环己胺对心血管系统和睾丸有毒理作用^[1], 美国、英国等国家开始禁止在食品中使用甜蜜素, 中国、欧盟等四十多个国家和地区对此也分别作出了限制^[2]。

甜菊糖甙是一种纯天然的高倍甜味剂, 从原产南美洲巴拉圭东北部的菊科小灌木甜叶菊的叶子中提取而得, 属于天然低热量的高倍甜味剂, 其甜度是蔗

*通讯作者: 朱莉萍, 工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: gufeng1979@163.com

*Corresponding author: ZHU Li-Ping, Engineer, Jining Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jining 272000, China. E-mail: gufeng1979@163.com

糖的 200~300 倍,而热量仅为蔗糖的 1/300 左右^[2]。20 世纪 50 年代人工苗圃栽培和大田移植甜叶菊获得成功,日本、马来西亚、中国、韩国、阿根廷、巴拉圭、巴西等 20 多个亚洲和拉美国家开始批准使用^[3]。但部分企业为降低成本,在甜菊糖甙中非法加入甜蜜素并进行销售从而导致食品中甜蜜素的存在。甜蜜素的使用应该从源头上进行控制,因此食品添加剂甜菊糖甙中甜蜜素的检测突显重要性。

GB/T 5009.97-2003《食品中环己基氨基磺酸钠的测定》中甜蜜素的检验方法——气相色谱法、比色法和薄层层析法均针对甜点类食品中甜蜜素的检验^[4];也有报道的食品中的甜蜜素采用直接测定^[5,6]或亚硝酸衍生法^[7],但未见甜菊糖甙中甜蜜素的检测方法。

本文通过对甜菊糖甙样品基质背景进行考察,优化前处理条件以及流动相的配比等因素,创新型加入碳纳米管材料去除甜菊糖甙中杂质的干扰,将甜蜜素衍生化后在弱碱环境下用液相色谱测定,满足甜菊糖苷中甜蜜素准确定量的需求。

2 材料与方法

2.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1100);台式冷冻离心机(3-18 K 型);电子摇床(IKA 公司 HS260B);分析天平(北京赛多利斯仪器)。

2.2 试剂

甜蜜素标准品(纯度 99.0%,Dr 公司);去离子水;次氯酸钠(有效氯 > 10%)(分析纯);乙腈(色谱纯,天津光复);正己烷(色谱纯,天津光复);硫酸(分析纯,烟台三合);碳酸氢钠(分析纯,烟台三合);220 g/L 乙酸锌(分析纯);106 g/L 亚铁氰化钾溶液(分析纯)。

2.3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX-C₁₈, 5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 μ m;柱温: 40 $^{\circ}$ C;流速: 1 mL/min;检测波长: 314 nm;进样量: 20 μ L;流动相: 甲醇+水(75+25, v/v)。

2.4 标准溶液的配制

标准储备溶液配制:称取甜蜜素标准物质 0.10 g(标准品纯度 99.0 %),置于 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,配制成 0.10 g/L 的标准储备液。

标准工作溶液配制:移取 1.25、2.5、5、7.5、10、

12.5 mL 标准储备液于 100 mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 100 mL,配制成浓度分别为 1.25、2.5、5、7.5、10、12.5 mg/L 的甜蜜素标准工作液。

2.5 样品溶液制备

2.5.1 固体样品

称取 0.5 g 样品溶于 10 mL 水中,混匀后作为待衍生溶液。在样品中加入碳纳米管 15 mg 涡混后静置 10 min。

2.5.2 液体样品

直接吸取 10 mL 液体样品作为待测溶液^[8-10]。在样品中加入碳纳米管 15 mg 涡旋混合后静置 10 min。

2.6 衍生化

2.6.1 标准溶液衍生

吸取甜蜜素梯度标准使用液 10 mL,分别加 2 mL 硫酸水溶液(1+1, v/v)、加入次氯酸钠溶液(有效氯 > 10%)2 mL,充分振荡 1~2 min,静置 10 min,加入 5.0 mL 正己烷,充分振荡萃取,静置分层后弃去水层,加入 25 mL 50 g/L NaHCO₃ 溶液,振荡萃取,分层后弃去水相,有机相经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后供液相色谱分析测定。

2.6.2 样品衍生

移取 10 mL 的样品溶液于 50 mL 离心管中,加 2 mL 硫酸水溶液(1+1, v/v)、分别加入次氯酸钠溶液(有效氯 > 10 %)2、3、4、5 mL,充分振荡 1~2 min,静置 10 min,按照 2.6.1 标准品衍生方法处理。

3 结果与讨论

3.1 样品制备的优化

按照 2.5 方法制备样品溶液,甜蜜素的回收率在 10%以下。接称取 0.50 g 样品溶于 10 mL 水中,将其作为待测溶液进行实验,甜蜜素有回收在 50%~70%。结果表明称样量大,样品基质浓度大,加标后甜蜜素分布不均匀,导致取样的不均匀性,回收很低,无法代表样品中甜蜜素的质控情况。故采用减少称样量,并移取全部溶液进行衍生。

3.2 净化条件的选择

因甜菊糖甙有较好的水溶性,样品可直接称取溶解进行衍生处理。甜菊糖甙虽然基质简单,但仍有较高的背景干扰。本试验采用了在衍生前加入净化步骤,直接在样品溶液中加入碳纳米管材料(实验室自制)。基质背景明显降低,见图 1。

3.3 流动相的优化

以乙腈-水(70+30, v/v)、乙腈-水(85+15, v/v)、甲醇-水(80+20, v/v)、甲醇-水(75+25, v/v)四种不同配比的溶液作为流动相^[11], 实验证明, 当流动相为甲醇-水(75+25, v/v)时, 甜蜜素色谱峰与杂质峰能获得良好的峰型和分离度, 见图 2, 因此选用甲醇-水(75+25,

v/v)作为检测甜菊糖甙中甜蜜素的流动相。

3.4 前处理方法的优化

甜蜜素检测中存在着回收率低, 回收不稳定的情况。本文分别对衍生试剂次氯酸钠的用量、酸化剂碳酸氢钠的用量、衍生时间及 PH 值进行了讨论^[12,13]。

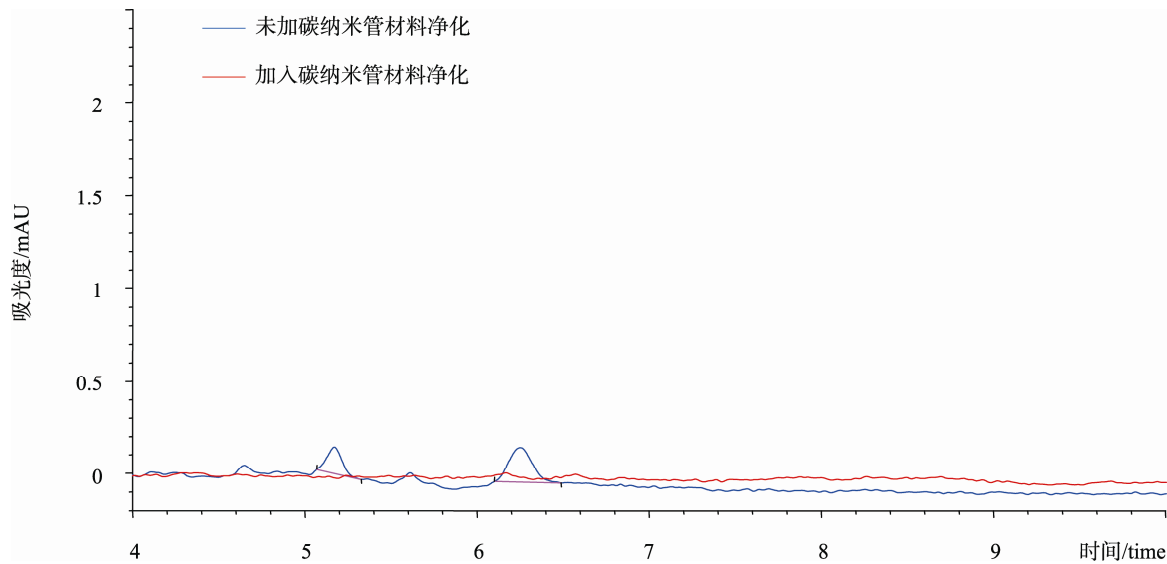


图 1 碳纳米管材料净化和未净化色谱图
Fig. 1 Chromatograms of sample dealing with carbon nano-tube and undealing with carbon nano-tube

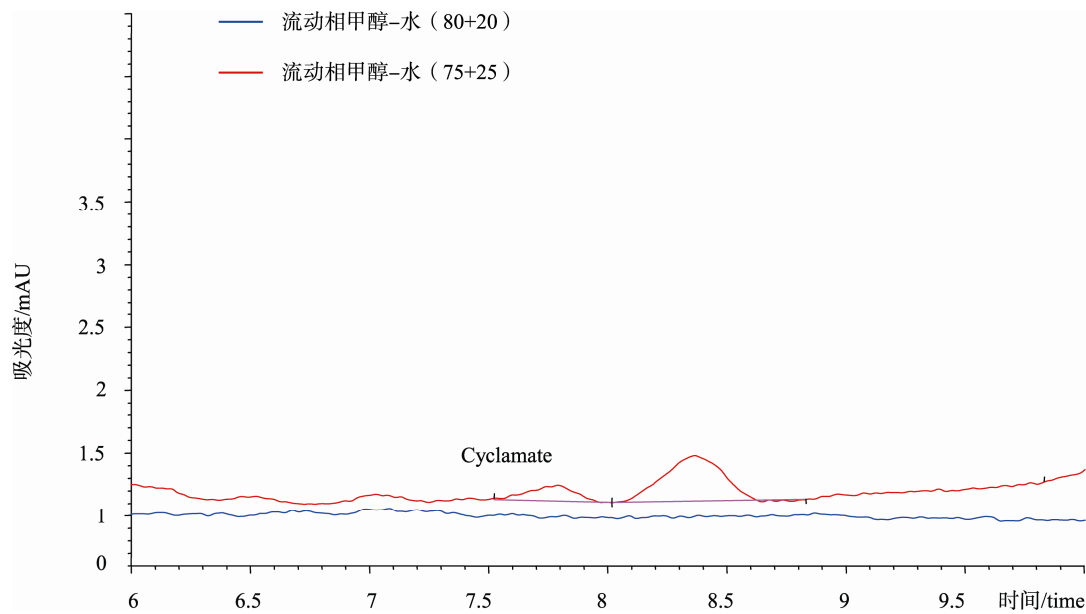


图 2 流动相为甲醇-水的样品加标回收色谱图
Fig. 2 Chromatograms of different mobile phases

3.4.1 衍生试剂用量

分别加入 3、4、5 mL 次氯酸钠衍生。加入 3 mL 衍生试剂时, 甜蜜素色谱峰的强度明显降低。加入 4 mL 衍生试剂时, 响应值升高, 回收率也提高; 加入 5 mL 衍生试剂时, 色谱图中样品回收率没有明显的提高见图 3。结果表明在衍生试剂为 4 mL, 反应已经完全。故试验采用 4 mL 次氯酸钠作为衍生试剂用量。

3.4.2 衍生时间

加入次氯酸钠后, 本文选择 5、10、15、20、30 min 作为时间梯度进行考察, 结果表明在选择衍生时间梯度对甜蜜素的衍生效果无明显影响。衍生超过 3 h 后甜蜜素峰高明显增加, 但标准品线性相关系数在降低, 因此在考虑试验效率及效果的基础上选择 10 min 作为衍生时间。

3.4.3 碳酸氢钠(50 g/L NaHCO₃)的用量

试验选择 10、15、20、25、30、35、40 mL 碳

酸氢钠水溶液, 结果表明在加入 25 mL 碳酸氢钠的溶液时, 甜蜜素在 10 小时内较为稳定, pH 值在 7.6~7.8 之间。若增加或减少 NaHCO₃ 溶液的使用量, 甜蜜素衍生物稳定性差。

3.5 方法线性范围、回收率、精密度

取系列浓度的标准工作液衍生后, 依次进样, 以色谱峰面积定量作标准曲线, 得甜蜜素的线性方程及相关系数, 在 2.5~25 mg/L 之间线性关系良好。线性方程为 $A=1.7497C-0.4904$, 相关系数为 0.9991。

在确定的优化条件下, 按照试验方法对含有标准品的样品及样品空白进行处理, 标准品谱图见图 4, 回收率及精密度见表 1; 实验结果表明甜蜜素的浓度范围在 2.5~20 mg/kg 之间时, 回收率在 81.8%~95.0% 之间、RSD 为 1.21%~2.07%。

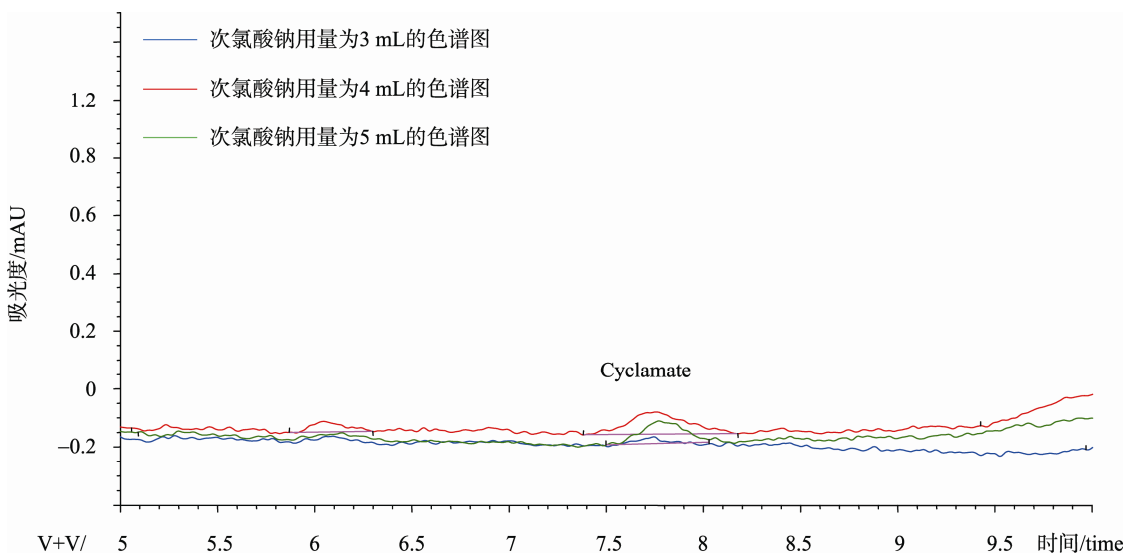


图 3 不同用量的衍生试剂的衍生后色谱图

Fig. 3 Chromatograms of sample dealing with different amount of derivative reagents

表 1 甜菊糖甙中甜蜜素加标回收率和精密度(n=6)
Table 1 The recoveries, and relative standard deviations (RSDs) of cyclamate in stevioside (n=6)

分析物	加标浓度(mg/kg)					
	2.5		10		20	
	回收率%	RSD %	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
甜蜜素(DMP)	80.0	2.07	88.5	2.01	90.1	1.21

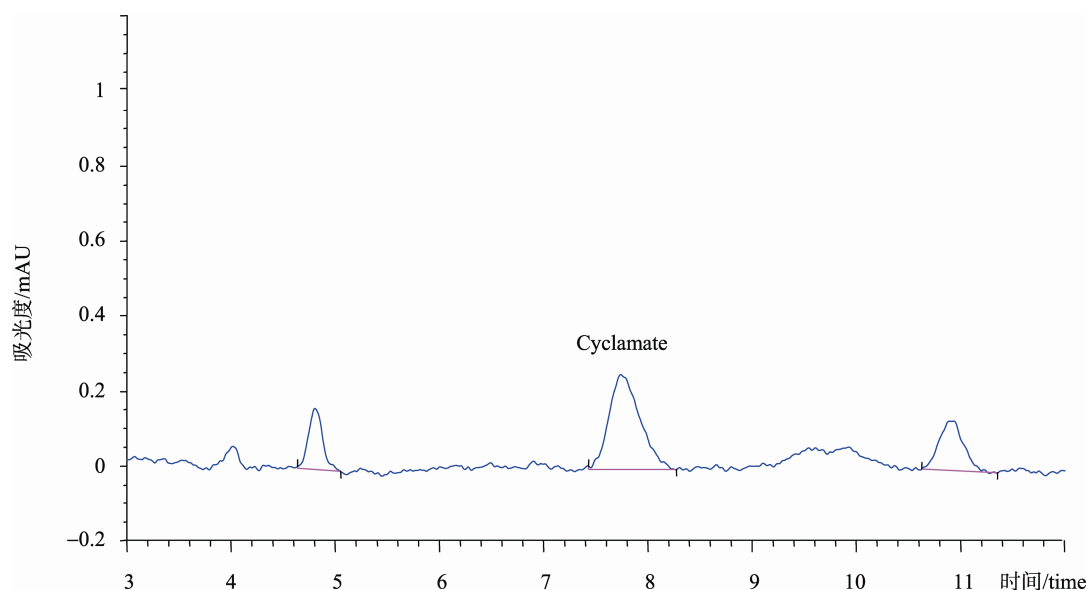


图4 甜蜜素标准品谱图

Fig. 4 The chromatogram of cyclamate standard

4 结 论

本方法采用了分散固相萃取技术液相色谱法测定了甜菊糖甙中的甜蜜素, 同时在实验室日常工作中进行了验证试验。本方法简单、试剂用量少, 具有绿色环保的优势。试验过程中优化前处理, 并优化了前处理、净化步骤、衍生试剂用量及时间等条件。此方法有效的降低了检测限, 提高了灵敏度, 具有良好的回收率和检测限, 对食品添加剂甜菊糖甙中加入的甜蜜素监测和检测具有重要的意义。

参考文献

- [1] 李宁. 国内外甜蜜素限量标准及使用现状分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(5): 455-457.
Li N. Analysis of domestic and foreign cyclamate standard and current situation[J]. Chin J Food Hyg, 2007, 19(5): 455-457.
- [2] 讨论甜味剂. <http://bbs.foodmate.net/thread-225868-1-1.html>
Discussion of sweetener. <http://bbs.foodmate.net/thread-225868-1-1.html>
- [3] 郑鹏然, 周树南. 食品卫生全书[M]. 北京: 红旗出版社, 1996: 642-643.
Zheng PR, Zhou SN. The food hygiene encyclopedia[M]. Red Flag Press, 1996: 642-643.
- [4] 邱洪冰, 吴一华. 甜菊糖甙在食品饮料工业中的应用[J]. 饮料工业, 2010, 13(3): 38-40.
Qiu HB, Wu YH. Use of stevia in food and beverage industries[J]. Bev Ind, 2010, 13(3): 38-40.
- [5] GB/T 5009.97-2003 食品中环己氨基磺酸钠的测定[S].
GB/T 5009.97-2003 Determination of sodium cyclamate in foods[S].
- [6] 尹艳春, 李智红. 反相高效液相色谱法同时测定食品中甜蜜素、糖精钠和苯甲酸钠[J]. 理化检验, 2003, 39(8): 469-470.
Yin YC, Li ZH. RP-HPLC determination of sodium cyclamate sodium saccharin and sodium benzoate in food[J]. Phys Testing and Chem Anal Part B: Chem Anal, 2003, 39(8): 469-470.
- [7] 郑琦, 李欣, 王鹏举, 等. 在线渗析样品前处理-离子色谱法直接检测牛奶和果汁中甜蜜素含量[J]. 分析试验室, 2011, 30(4): 96-98.
Zheng Q, Li X, Wang PJ, et al. Determination of sodium cyclamate in milk and juice by ion chromatography coupling with dialysis as an online sample pretreatment technique [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(4): 96-98.
- [8] 张秀尧. 反相高效液相色谱法测定食品中甜蜜素[J]. 理化检验: 化学分册, 2000, 36(10): 451-454.
Zhang XY. Determination of Cyclamate in food by RP-HPLC[J]. Phys Testing and Chem Anal Part B: Chem Anal, 2000, 36(10): 451-454.
- [9] 朱莉萍, 朱涛, 潘守奇, 等. 气相色谱法同时测定蔬菜及水果中多类农药残留量[J]. 分析化学, 2008, (36): 999-1003.
Zhu LP, Zhu T, Pan SQ, et al. Determination of different kinds of pesticides in vegetable by Gas-chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2008, (36): 999-1003.
- [10] 鲁秋宏, 曹叶中. 食品中甜蜜素检测方法的改进[J]. 内蒙古农

- 业科技, 2010, (1): 62–63.
- Lu QH, Cao YZ. Improvement of Detection Method for Sodium Cyclamate in Food[J]. Inner Mongolia Agric Sci Tech, 2010, (1): 62–63.
- [11] 朱莉萍, 高坤, 朱涛, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱测定蔬菜及其制品中苯霜灵等 5 种农药残留量[J]. 分析测试学报, 2012, 12(31z): 12–14.
- Zhu LP, Gao K, Zhu T, *et al.* Determination of benalaxyl, methomyl, propazine, tebufenpyrad and pyridaben residues in vegetable by Liquid Chromatography-ESI-Mass Spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2012, 12(31z): 12–14.
- [12] 张书文, 夏辉, 曲雁. 毛细管柱气相色谱法测定白酒中的甜蜜素[J]. 化学分析计量, 2013, 22(1): 57–59.
- Zhang SW, Xia H, Qu Y. Determination of Sodium Cyclamate in Chinese Spirits by Capillary Chromatographic Column Gas Chromatography[J]. Chem Anal Meterage, 2013, 22(1): 57–59.
- [13] Mahdi H, Ali H, Narges J. Determination of cyclamate in articial sweeteners and beverage using headspace single-drop microextraction and gas chromatography ame-ionisation detection[J]. Food Chem, 2011, (124): 1258–1263.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



朱莉萍, 工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: gufeng1979@163.com