

高效液相色谱法同时测定可乐中苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因

迟秋池, 陈燕, 邵晓贇, 刘畅*, 王柯*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱同时测定可乐中苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因的方法, 并应用于国际FAPAS能力验证。**方法** 样品经超声脱气用水稀释, 采用C₁₈色谱柱分离, 以乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L)/甲醇为流动相, 采用梯度洗脱分离, 在230 nm、272 nm波长下进行检测。**结果** 苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因线性范围为2.0~200 µg/mL, 线性关系良好, 相关系数大于0.999, 回收率在97%~103%之间, RSD为0.5%~2.8%之间, 检出限在0.005~0.02 µg/mL之间。**结论** 该法灵敏度高、重现性好, 用于FAPAS能力验证时结果接近中值。

关键词: 苯甲酸; 糖精钠; 安赛蜜; 咖啡因; 可乐; 高效液相色谱法; FAPAS

Simultaneous determination of benzoic acid, sodium saccharin, acesulfame potassium and caffeine in cola soft drink by high performance liquid chromatography

CHI Qiu-Chi, CHEN Yan, SHAO Xiao-Yun, LIU Chang*, WANG Ke*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of benzoic acid, sodium saccharin, acesulfame potassium and caffeine in cola by high performance liquid chromatography (HPLC), and apply to international FAPAS proficiency testing. **Methods** After ultrasonic degasification, the samples were diluted by water, separated on a C₁₈ column with the mobile phase of ammonium acetate (0.02 mol/L)/methanol in gradient elution, and detected at the wavelength of 230 nm and 272 nm. **Results** The calibration curves within the range of 2.0~200 µg/mL showed a good linearity and the correlation coefficients were higher than 0.999. The individual average recovery at 3 spiked concentration levels ranged from 97% to 103%, while the relative standard deviations (RSD) were between 0.5%~2.8% (n=6). The limits of detection of benzoic acid, sodium saccharin, acesulfame potassium and caffeine were 0.005~0.02 µg/mL. **Conclusion** The established method is sensitive and accurate and can be used to the FAPAS proficiency testing, and the Z-scores of the benzoic acid, saccharin, acesulfame potassium and caffeine were close to median.

*通讯作者: 刘畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品安全质量控制。E-mail: ccchangchang@hotmail.com

王柯, 主任药师, 主要研究方向为食品化妆品检验检测技术与标准制订。E-mail: wangke@smda.gov.cn

*Corresponding author: LIU Chang, Associate Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, 1500 Zhangheng Road, Shanghai 201203, China. E-mail: ccchangchang@hotmail.com

WANG Ke, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, 1500 Zhangheng Road, Shanghai 201203, China. E-mail: wangke@smda.gov.cn

KEY WORDS: benzoic acid; sodium saccharin; acesulfame potassium; caffeine; cola; high performance liquid chromatography; FAPAS

1 引言

食品添加剂是为改善食品品质和色、香、味,以及为防腐、保鲜和加工工艺的需要而加入食品中的人工合成或者天然物质。近年来,食品加工及餐饮行业中滥用和违禁使用食品添加剂的现象越来越引起人们的重视,过量或长期摄入苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因等食品添加剂对人体造成危害。我国现行版 GB2760-2014《食品添加剂使用标准》^[1]对可乐型碳酸类饮料中食品添加剂的种类和限量均具有明确规定,同时也制订了相应食品添加的检测方法标准,但没有一个能同时测定苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因的国家标准或行业标准^[2-6]。

目前,食品中苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因的文献测定方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法^[7-9]、紫外分光光度法^[10]、液相色谱串联质谱法^[11-13]、毛细管电泳法^[14,15]等,这几种化合物作为防腐剂、甜味剂等添加剂中的代表性物质,经常被作为国际和国内实验室能力验证的考试项目。本研究利用高效液相色谱法同时测定可乐型碳酸饮料中苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因,前处理方法简单、灵敏度高、准确度高,不仅可用于样品的常规检测,还可应用于 FAPAS 国际能力验证,其结果接近中值。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 材料与试剂

空白可乐样品:可口可乐原味(无咖啡因)(美国可口可乐公司);样品:可乐(英国, FAPAS)。

苯甲酸钠(德国 Dr.Ehrenstorfer, 批号: 40109; 美国 SUPELCO, 批号: LB9644V); 糖精钠(德国 Dr.Ehrenstorfer, 批号: 20310; 美国 SUPELCO, 批号: LB05666V); 安赛蜜(德国 Dr.Ehrenstorfer, 批号: 40410; 美国 SUPELCO, 批号: LC11345V); 咖啡因(中国食品药品检定研究院, 批号: 171215-201211); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司, 批号: UN1230); 乙酸铵(色谱级, 上海安谱实验科技股份有限公司, 批号: K302K210)。

2.1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Waters2695/2996 高效液相色谱仪(美国沃特世公司); 天平(Sartorius CP225D/ME235S, 美国赛多利斯公司); 振荡器(IKA VIBRAX-VXR, 美国艾卡公司); 离心机(Thermo ST40R, 美国赛默飞公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准品

(1)标准储备液的配制

精密称取苯甲酸钠、糖精钠、安赛蜜和咖啡因标准物质 60、65、50、50 mg(精确至 0.1 mg), 分别置于 50 mL 容量瓶中, 用水(若无特别说明, 本文中所用水均为去离子水)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到相应标准储备液, 4℃冰箱保存。

(2)混合标准中间溶液的配制

精密量取苯甲酸钠、糖精钠、安赛蜜和咖啡因标准储备液 2.0 mL, 置同一 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得到混合标准中间溶液, 临用新制。

(3)混合标准工作溶液的配制

精密量取标准中间溶液适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 配制成系列线性标准工作溶液, 供高效液相色谱仪测定。

2.2.2 样品处理

样品经超声脱气后, 精密量取 1 mL 至 2 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液供高效液相色谱仪测定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱为华谱 Acchrom Unitary C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 带预柱。流动相 A: 乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L), 流动相 B: 甲醇, 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 流动相 B 5%; 0.5~6.0 min, 5%~10%; 6.0~9.0 min, 10%~20%, 20%维持 2 min; 11.0~16.0 min, 20%~75%, 75%维持 3 min; 19.0~20.0 min, 75%~5%, 5%维持 7 min。流速 1.0 mL/min; 进样量为 20 μL; 柱温 30℃; 检测波长 230 nm 和 272 nm。

3 结果与分析

3.1 方法的线性范围和检出限

将 2.2.1(3)系列线性标准工作溶液(浓度范围为 2.0~200 $\mu\text{g/mL}$)在 2.2.3 仪器条件下进行分析, 建立标准曲线, 苯甲酸、糖精钠、安赛蜜和咖啡因的相关系数 r 均大于 0.999。以逐渐降低样品中标准溶液添加量的方法进行实验, 以峰面积相当于基线噪音的 3 倍($S/N=3$)计算检出限。苯甲酸钠、糖精钠、安赛蜜和咖啡因的保留时间、检测波长、检测限等见表 1。

表 1 检测波长、检出限、相关系数
Table 1 Detection wavelength, LOD and correlation coefficient

化合物	检测波长 (nm)	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关 系数	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)
苯甲酸	230	2.0~200	0.9999	0.01
糖精	230	2.0~200	0.9999	0.02
安赛蜜	230	2.0~200	0.9999	0.01
咖啡因	272	2.0~200	0.9999	0.005

3.2 回收率和精密度

在空白可乐中添加 3 种不同浓度的标准溶液, 按 2.2.2 项下进行前处理后, 按 2.2.3 项下色谱条件进行测定, 每个加标水平平行测定 6 次, 结果见表 2。本方法在 3 种不同浓度水平的回收率为 97.1%~103.0%, RSD 为 0.5%~2.8%, 回收率高, 重现性好。

表 2 空白加标回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Recovery and RSD of blank sample($n=6$)

化合物	加标量($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	RSD (%)
苯甲酸	5.0	98.3~102.1	2.1
	10.0	97.5~102.5	1.8
	50.0	99.5~101.2	0.5
糖精钠	5.0	97.5~102.9	2.8
	10.0	98.5~102.3	2.0
	50.0	98.2~102.7	1.7
安赛蜜	5.0	97.5~102.9	2.8
	10.0	97.9~101.8	1.9
	50.0	98.5~102.7	1.7
咖啡因	5.0	97.1~102.5	2.5
	10.0	98.0~102.1	2.1
	50.0	97.9~103.0	2.6

在实测 FAPAS 可乐样品并取得结果后(具体结果见 3.3), 取 FAPAS 可乐样品 0.5 mL 进行自身加标试验, 按照样品实测浓度的约 1/2 水平处进行自身加标回收率测定, 故苯甲酸、糖精、安赛蜜、咖啡因加标浓度依次分别为 60、30、30、50 mg/L , 按 2.2.2 项下进行前处理后, 按 2.2.3 项下色谱条件进行测定, 平行制备 6 份进行测定, 结果见表 3。自身加标回收率结果为 97.1%~102.2%, RSD 为 0.7%~2.3%。

表 3 自身加标回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recovery and RSD of FAPAS sample ($n=6$)

化合物	自身加标量(mg/L)	回收率(%)	RSD(%)
苯甲酸	60	99.3~101.4	0.7
糖精	30	97.6~101.9	1.9
安赛蜜	30	97.1~102.2	2.3
咖啡因	50	98.4~101.7	1.7

3.3 样品分析

本实验室将本方法应用于 FAPAS 组织的能力验证可乐样品测定, 标准品和样品色谱图见图 1、图 2。本次能力验证全球共有 107 个实验室参加, 本实验室通过本方法上报的测定结果与 FAPAS 组织统计的中值基本一致, 结果满意, 见表 4。本实验室上报结果为苯甲酸 115 mg/L 、糖精 53.1 mg/L 、安赛蜜 53.3 mg/L 、咖啡因 97.9 mg/L , Z 值分别 0、-0.1、0、0, 结果说明本方法色谱分离无干扰, 定量准确, 可满足国际实验室能力验证测定的较高要求, 更可满足常规样品的检测需求。

表 4 本实验室参加 FAPAS 国际比对可乐中测定结果($n=6$)
Table 4 Result and Z-scores of FAPAS sample ($n=6$)

化合物	本实验室测得值 (mg/L)	全球实验室均值 (mg/L)	Z 值
苯甲酸	115	115.4	0
糖精	53.1	53.7	-0.1
安赛蜜	53.3	53.2	0
咖啡因	97.9	97.6	0

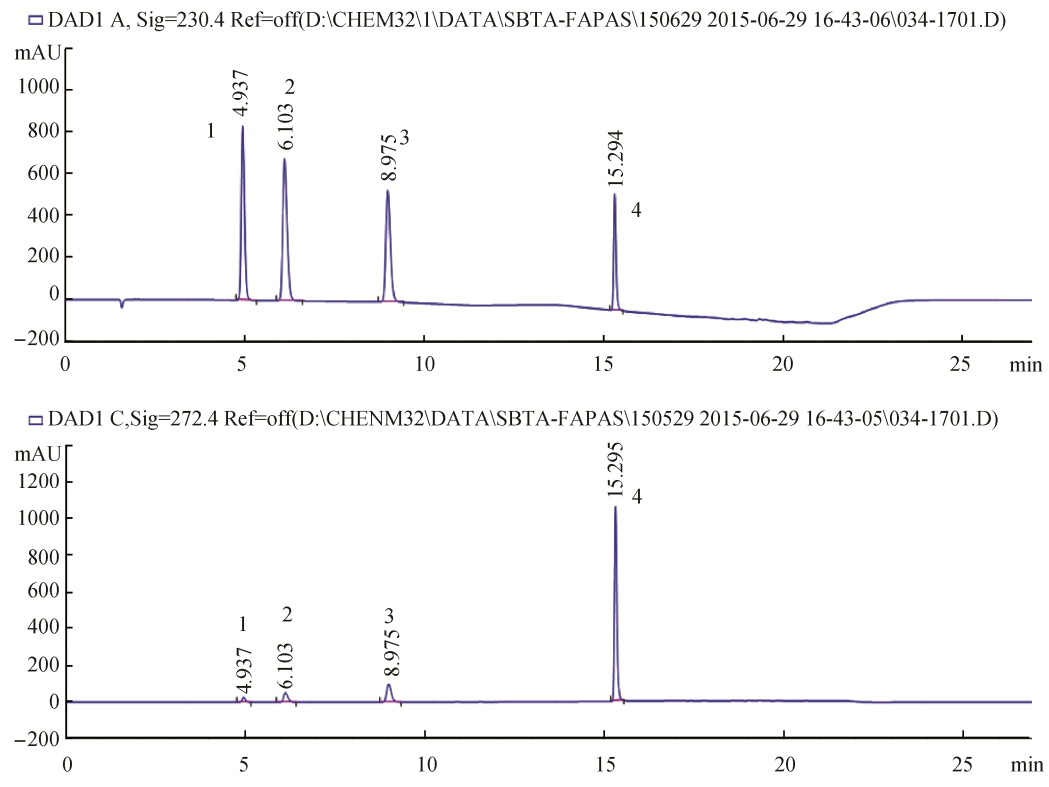


图 1 标准品溶液色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standards

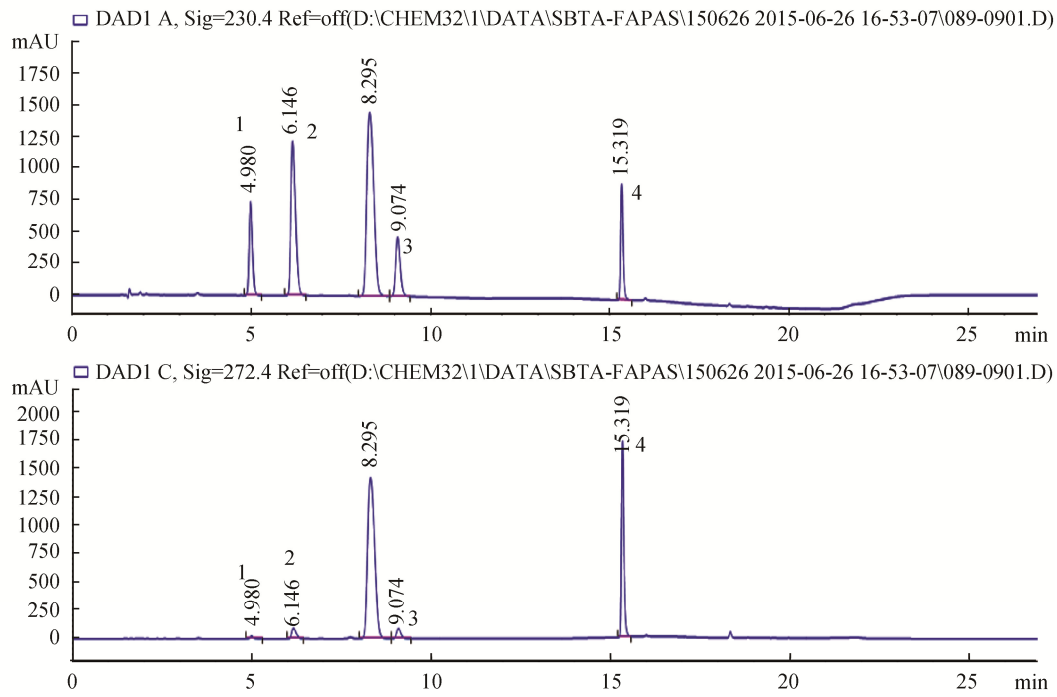


图 2 FAPAS 比对用可乐样品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of FAPAS sample

注: 峰 1 为安赛蜜, 峰 2 为苯甲酸, 峰 3 为糖精钠, 峰 4 为咖啡因。

4 结 论

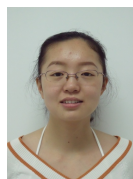
本方法采用高效液相色谱法同时测定可乐饮料中苯甲酸、糖精、安赛蜜和咖啡因,方法操作简单,检测灵敏度高,色谱分离效果好,可作为国标方法的补充。

参考文献

- [1] GB 2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 Standards for uses of food additives[S].
- [2] 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].
- [3] GB/T 5009.28-2003 食品中糖精钠的测定[S].
GB/T 5009.28-2003 Determination of saccharin sodium salt in foods[S].
- [4] GB 5009.139-2014 饮料中咖啡因的测定[S].
GB 5009.139-2014 Determination of caffeine in beverages[S].
- [5] 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 beverages[S].
- [6] GB/T 23495-2009 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定高效液相色谱法[S].
GB/T 23495-2009 Determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in foods-High performance liquid chromatography method[S].
- [7] 李蔚, 李凤华, 赵秀香. 高效液相色谱法测定饮品中的咖啡因[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(19): 2787-2790.
Li W, Li FH, Zhao XX. Determination of caffeine in drinks by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(19): 2787-2790.
- [8] 官咏仪, 林海丹, 邱志超, 等. 高效液相色谱法测定调味酱中的苯甲酸和山梨酸[J]. 食品科技, 2014, 39(3): 285-287.
Guan YY, Lin HD, Qiu ZC, et al. Determination of benzoic acid and sorbic acid in soy and sauce by HPLC [J]. Food Sci Technol, 2014, 39(3): 285-287.
- [9] 程春梅, 李歆, 董刘敏, 等. 月饼中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸检测方法的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(11): 102-103.
Cheng CM, Li X, Dong LM, et al. Simultaneous determination of acesulfame-K, saccharinsodium, benzoicacid, sorbicacid and dehydroacetic acid in moon cake by HPLC [J]. Acta Agric Jiangxi, 2009, 21(11): 102-103.
- [10] 武思齐. 可乐饮料中咖啡因含量的测定[J]. 贵阳学院学报(自然科学版), 2014, 9(4): 54-56.
Wu SQ. Determination of caffeine in cola drinks [J]. J Guiyang Coll (Nat Sci), 2014, 9(4): 54-56.
- [11] 许秀敏, 吴西梅, 梁春穗, 等. 液相色谱-质谱联用检测食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1057-1059.
Xu XM, Wu XM, Liang CH, et al. Determination of benzoic, sorbic acid, sodium saccharin in food by LC-MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(9): 1057-1059.
- [12] 王祖翔, 任连兵, 蒋俊, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定调味料中的痕量苯甲酸与山梨酸[J]. 分析测试学报, 2011, 30(6): 665-669.
Wang ZX, Ren LB, Jiang J, et al. Determination of benzoic acid and sorbic acid in seasoning by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2011, 30(6): 665-669.
- [13] 王震, 石丽珠. 超高效液相色谱-串联质谱测定饮料和酒中防腐剂与甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(4): 1179-1184.
Wang Z, Shi LZ. Determination of preservative and sweetener in drink and wine by ultra per-formance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(4): 1179-1184.
- [14] 王咏梅, 刘恺, 卢玉妹, 等. 毛细管区带电泳法测定食品中山梨酸、苯甲酸和糖精的含量[J]. 食品科技, 2007, 6: 227-229.
Wang YM, Liu K, Lu YM, et al. Determination of sorbic acid, benzoic acid, saccharin in food by capillary electrophoresis [J]. Food Sci Technol, 2007, 6: 227-229.
- [15] 涂逢樟, 姚辉梅, 吴舜华, 等. 高效毛细管电泳法同时测定药品中苯甲酸和山梨酸钾[J]. 分析试验室, 2010, 29(4): 99-102.
Tu FZ, Yao HM, Wu LH, et al. Determination of benzoic acid and potassium sorbate in drugs by HPCE [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(4): 99-102.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



迟秋池, 理化检验技师, 主要研究方向为药物分析和食品安全质量控制。
E-mail: chiqiuchi@126.com



刘 畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品安全质量控制。
E-mail: ccchangchang@hotmail.com



王 柯, 主任药师, 主要研究方向为食品化妆品检验检测技术研究与标准制订。
E-mail: wangke@smda.gov.cn

“现代食品生物技术”专题征稿函

生物技术既是历史悠久的传统技术,也是充满活力与生机的现代高新技术。现代生物技术,正在推动世界工业革命的进程,也在以前所未有的速度冲击着人类固有的传统观念。随着生物技术理论和方法的不断趋于完善、成熟,它对现代食品工业的影响也更加广泛而深入。生物技术在食品领域的应用,包括在优质食品原料生产、食品加工与保藏、食品质量与安全控制、食品生产废弃物利用及改善和增加食品营养价值等方面,都将日益显示其巨大的作用与意义。

鉴于此,本刊特别策划“现代食品生物技术”专题。专题将围绕**基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程、分子生物学技术、免疫学技术、基因芯片和生物传感器等现代生物技术在食品加工生产与保藏保鲜及食品安全检测与控制的应用**等方面展开,基于技术原理、技术特点、优势与局限性、影响因素、工艺及设备、应用实践等各个方面展开讨论,同时该专题也关注**转基因食品的安全性评价与管理**。本专题预计在 2016 年 5 月出版。

鉴于您在该领域的杰出成就,本刊主编**吴永宁研究员**特邀请您撰稿,综述、研究论文、研究简报等稿件形式均可,以期为食品生物技术的推广应用、科研开发提供理论和实践指导。请您请在 2016 年 4 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!盼您回复!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部