

# 高效液相色谱法测定槟榔中阿斯巴甜的含量

康志娇<sup>1\*</sup>, 夏延斌<sup>2</sup>, 赵志友<sup>1</sup>, 袁 河<sup>1</sup>, 肖晓毅<sup>1</sup>

(1. 湖南宾之郎食品科技有限公司, 湘潭 411100; 2. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128)

**摘 要:** **目的** 建立高效液相色谱法检测槟榔中阿斯巴甜的含量的分析方法。**方法** 槟榔去除卤水及内层纤维后, 以磷酸-水溶液(pH=2)为提取液、采用超声法提取槟榔中阿斯巴甜。提取液经 Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱分离, 以乙腈-10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液(pH=3.5)(14:86, V:V)为流动相, 流速为 1 mL/min, 采用紫外检测器在 210 nm 检测波长下对阿斯巴甜含量进行测定。**结果** 阿斯巴甜在 4.444~222.2 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系, 检出限为 0.22 μg/mL, 精密度为 0.17%, 在 3 个加标水平下的平均回收率为 99.80%。**结论** 本提取方法易于操作、提取率高且稳定性良好, 可用于槟榔中阿斯巴甜的提取; 本检测方法具有线性范围广、灵敏度高、快速、准确等优点, 适用于槟榔中阿斯巴甜的含量测定。

**关键词:** 槟榔; 阿斯巴甜; 高效液相色谱法

## Determination of aspartame in areca by high performance liquid chromatography

KANG Zhi-Jiao<sup>1\*</sup>, XIA Yan-Bin<sup>2</sup>, ZHAO Zhi-You<sup>1</sup>, YUAN He<sup>1</sup>, XIAO Xiao-Yi<sup>1</sup>

(1. Hunan Binzhilang Corporation of Food Science and Technology, Xiangtan 411100, China; 2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of aspartame in areca by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Aspartame was extracted from areca by ultrasound extraction method with phosphoric acid aqueous solutions (pH=2) after removed of brine and inner fiber. The extraction solution was separated by Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), using acetonitrile and 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution (pH=3.5)(14:86, V:V) as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min, and detected by ultraviolet detector at the wavelength of 210 nm. **Results** Aspartame had a good liner relationship in the range of 4.444~222.2 μg/mL, and the limit of detection of aspartame was 0.22 μg/mL. The precision of this method was 0.17% and the average recoveries spiked at 3 levels was 99.80%. **Conclusion** The extraction method is easy to operate with good extraction yield and good stability, which can be used for extracting aspartame from areca. Besides, the detection method has the advantages of wide linear range, high sensitivity, rapidness and accuracy, which can be used for determination of aspartame in areca.

**KEY WORDS:** areca; aspartame; high performance liquid chromatography

\*通讯作者: 康志娇, 硕士, 工程师, 主要研究方向为药物及食品质量分析与控制. E-mail: kzjiao@126.com

\*Corresponding author: KANG Zhi-Jiao, Master, Engineer, Hunan Binzhilang Corporation of Food Science and Technology, Xiangtan 411100, China. E-mail: kzjiao@126.com

## 1 引言

阿斯巴甜,是一种人造甜味剂,分子式为  $C_{14}H_{18}N_2O_5$ ,化学名称为 *L*-天冬氨酐-*L*-苯丙氨酸甲酯<sup>[1]</sup>,常温下为白色结晶性的粉末。阿斯巴甜是迄今甜味最接近蔗糖一种化合物,其甜味持续性强且甜度远高于蔗糖,约为蔗糖的 200 倍,与蔗糖或其他甜味剂混用时具有协同作用<sup>[2]</sup>,与香精同用能增加香精香料的作用。目前阿斯巴甜已被 80 个国家批准为食品添加剂,其在我国可用于除罐头食品外的其他各类食品,用量按需适量使用<sup>[3]</sup>。虽然如此但国内外仍有部分研究学者对阿斯巴甜的安全性存在质疑,阿斯巴甜在体内可代谢生成甲醇、苯丙氨酸和天冬氨酸<sup>[4]</sup>,具有一定的神经毒性和致癌性<sup>[5]</sup>,孕妇和苯酮尿症患者不能食用阿斯巴甜<sup>[6]</sup>。

槟榔为四大南药之一,具有驱虫、抗菌、下气、消食的作用,嚼食槟榔能使人产生轻微的欣快感,其消费量仅次于烟草、酒精和咖啡因<sup>[7]</sup>。阿斯巴甜作为槟榔的一种添加剂,为防止其对人体的潜在危害,需要严格监控其含量。目前已有部分食品中阿斯巴甜含量测定的相关文献报道<sup>[8-14]</sup>,但未见槟榔中阿斯巴甜的含量测定,且已见报道的阿斯巴甜提取及含量测定方法不适用于槟榔中阿斯巴甜的提取及测定。本研究针对槟榔的特性建立了一种适用于槟榔中阿斯巴甜含量提取及测定的方法,可用于槟榔中阿斯巴甜的检测。

## 2 材料与方法

### 2.1 主要仪器、试剂与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配 1200 紫外检测器,美国 Agilent 公司); AR224CN 分析天平(奥豪斯仪器有限公司); 超纯水机(湖南中沃水务环保科技有限公司); KQ-700E 超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司); STARTER3100 pH 计(奥豪斯仪器有限公司)。

阿斯巴甜对照品(纯度  $\geq 98\%$ ,上海源叶生物科技有限公司); 乙腈(色谱纯, TEDIA); 磷酸二氢钾(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司); 磷酸(色谱纯,上海展云化工有限公司); 冰醋酸(分析纯,湖南汇虹试剂有限公司); 超纯水为实验室自制。

本实验中所检测的样品均由湖南宾之郎食品科技有限公司提供。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液(10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调 pH 3.5), A:B=14:86 (V:V); 流速: 1 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ L; 检测波长: 210 nm; 检测器: 紫外检测器。

### 2.3 标准储备液的配制

精确称取 11.11 mg 阿斯巴甜标准品置 25 mL 容量瓶中,以冰醋酸调 pH=4.3 的水溶液为溶剂溶解定容,配制浓度为 0.4444 mg/mL 的阿斯巴甜标准储备液。

将阿斯巴甜标准储备液用冰醋酸调 pH=4.3 的水溶液逐级稀释成浓度为 222.20、199.98、177.76、133.32、88.88、44.44、22.22、4.444  $\mu$ g/mL 的阿斯巴甜标准使用液。

### 2.4 样品的处理方法

取槟榔数片,去除卤水及内层纤维,切碎、混匀,精密称取 2~3 g 样品置具塞锥形瓶中,以经磷酸调 pH=2 的水溶液为提取液,按料液比 1:10(m:V)加入提取液后于 60  $^{\circ}$ C 下超声提取 30 min,置冷,提取液经 0.45  $\mu$ m 水系滤膜过滤后上机检测。

## 3 结果与分析

### 3.1 提取方法的确定

实验初期采用将整颗槟榔切碎用纯水超声的方法提取槟榔中阿斯巴甜,结果发现阿斯巴甜几乎全部降解,提取率极低。此种现象是由于阿斯巴甜在溶液中的稳定性受 pH 影响较大,当溶液 pH>6 时易环化成 5-苯甲基-3,6 双氧-2-哌嗪乙酸而造成<sup>[15]</sup>。槟榔本身呈弱碱性,经纯水提取后提取液 pH 值为 7~8,而阿斯巴甜仅在溶液 pH 为 3~5 时稳定性良好,故需对提取方法进行优化。

由于阿斯巴甜仅存于槟榔片中且槟榔中卤水明显显碱性,故制样时将槟榔中卤水去除以期降低提取液 pH 值增加阿斯巴甜稳定性,然而此方法所得提取液 pH 值仍在 6~7 之间,阿斯巴甜极易降解。为了得到 pH 值适宜的提取液,最后改纯水为酸-水溶液提取槟榔中阿斯巴甜,分别考察了经冰醋酸、磷酸及盐酸调 pH=1.5、2.0、3.0、3.5 的酸-水溶液,实验结果表明,当提取溶液 pH 为 2.0 时可保证所得槟榔提取液 pH 在 3.0~4.0 之间,由于磷酸不易挥发,采用磷酸-水溶液提取所得提取液 pH 值较冰醋酸-水溶液及盐酸-水溶液稳定,故最终确定以 pH=2.0 的磷酸-水溶液为提取溶剂。

同时,为了保证实验结果的平行性及准确性,槟榔样品切碎前不仅扣除卤水同时将粘有少量卤水的内层纤维一并去除。此外,还对提取方法中超声温度进行了考察,分别考察了 40、60、80  $^{\circ}$ C,实验表明阿斯巴甜 40  $^{\circ}$ C 时不易溶解,80  $^{\circ}$ C 时较不稳定,60  $^{\circ}$ C 可兼顾溶解度及稳定性,故最终确定超声温度为 60  $^{\circ}$ C。

### 3.2 色谱条件的优化

通过参考文献<sup>[12]</sup>对流动相比例及流动相 pH 进行调节,最终确定以乙腈及 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液为流动相,为了保证阿斯巴甜在流动相中的稳定性,用 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 将

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液的 pH 值调至 3.5, 流动相比比例为乙腈: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ =14:86 (V:V)。同时, 采用紫外分光光度计在 200~400 nm 范围内对阿斯巴甜对照品溶液进行扫描, 最终确定检测波长为 210 nm。阿斯巴甜标准溶液及槟榔样品色谱图分别见图 1、图 2, 由图可知此方法专属性良好, 阿斯巴甜出峰时间为 6.37 min。

### 3.3 线性范围与检出限

按“2.2”项下色谱条件设置高效液相色谱仪参数, 注入阿斯巴甜标准使用液, 测定其峰面积, 以标准使用液浓度  $X$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标、相应峰面积  $Y$  为纵坐标进行线性

拟合, 得线性回归方程  $Y=34.6797X-7.0060$ ,  $r^2=0.9999$ , 表明阿斯巴甜在 4.444~222.2  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好。经不断稀释阿斯巴甜标准使用液, 以信噪比( $S/N$ )=3 时阿斯巴甜的浓度为检出限, 在本方法下阿斯巴甜的检出限为 0.22  $\mu\text{g/mL}$ , 能满足日常检测需求。

### 3.4 精密度

按“2.2”项下色谱条件设置高效液相色谱仪参数, 将浓度为 88.88  $\mu\text{g/mL}$  的阿斯巴甜标准使用液连续进样 6 次, 测定峰面积并求其相对标准偏差 RSD 值为 0.17%, 表明此方法精密度良好。

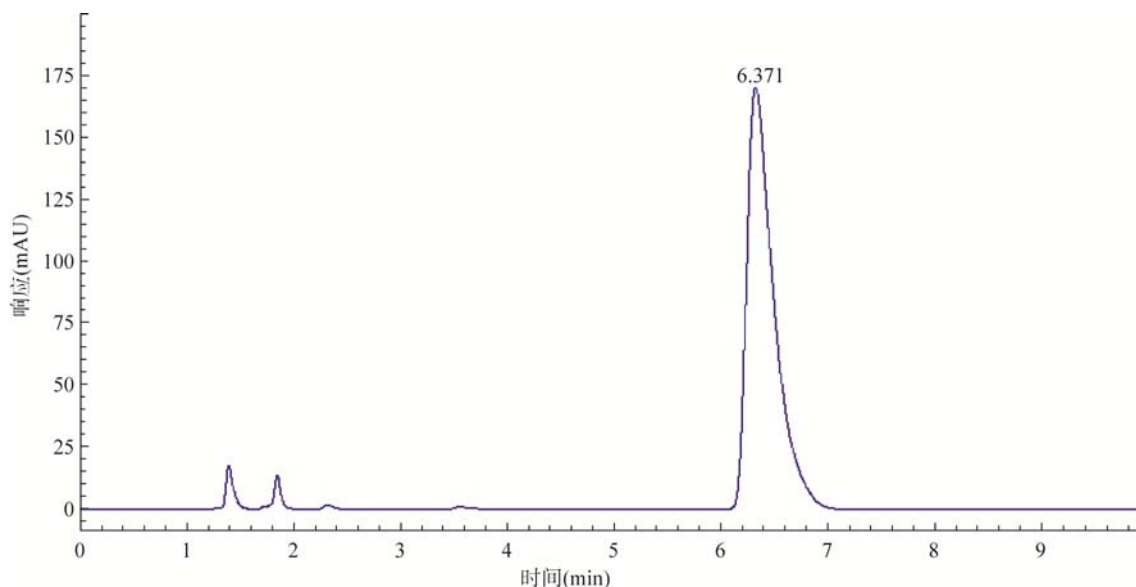


图 1 阿斯巴甜标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of aspartame standard

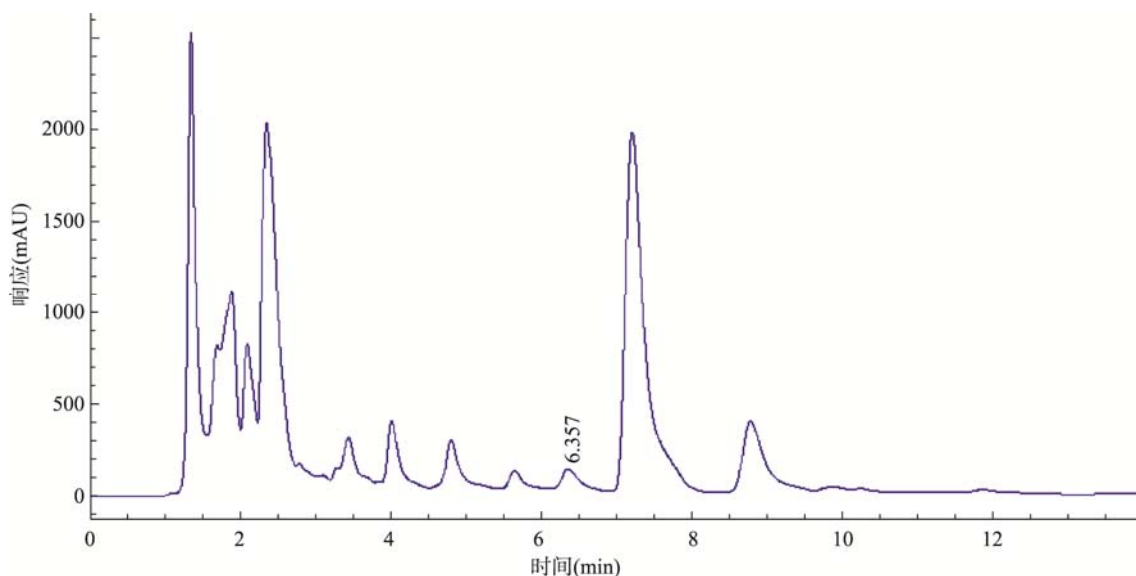


图 2 槟榔样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of areca sample

3.5 回收率

采用在空白样品中加入高、中、低浓度的阿斯巴甜标准使用液的方法进行回收率测定实验,其中高、中、低浓度分别为 199.98、88.88、4.444 μg/mL,每个浓度平行操作 3 份,计算平均回收率及 RSD 值,具体结果见表 1,由表 1 可知平均回收率为 99.80%,RSD 值为 0.96%,结果表明此方法回收率高,结果准确,能用于槟榔样品中阿斯巴甜的检测。

表 1 回收率实验结果(n=3)  
Table 1 Results of recovery tests (n=3)

| 理论值<br>(μg/mL) | 测得值<br>(μg/mL) | 回收率(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|----------------|----------------|--------|--------------|------------|
| 4.444          | 4.398          | 98.96  | 99.80        | 0.96       |
|                | 4.407          | 99.17  |              |            |
|                | 4.499          | 101.24 |              |            |
| 88.88          | 88.02          | 99.03  | 99.80        | 0.96       |
|                | 89.57          | 100.78 |              |            |
|                | 87.95          | 98.95  |              |            |
| 199.98         | 198.31         | 99.16  | 99.80        | 0.96       |
|                | 199.72         | 99.87  |              |            |
|                | 201.98         | 101.00 |              |            |

3.6 样品分析

在超市中随机购买 6 个不同品牌槟榔各 10 包,将其按“2.4”项下样品处理方法处理后注入高效液相色谱仪进行测定,结果见表 2。GB 2760-2014<sup>[16]</sup>规定,槟榔中阿斯巴甜的最大添加量为 2‰,由表 2 可见,6 种槟榔中阿斯巴甜的添加量均符合国家规定。

表 2 样品含量测定结果(n=6)  
Table 2 Determination of samples (n=6)

| 槟榔品牌代号 | 平均含量(‰) | 合格率(%) |
|--------|---------|--------|
| 1      | 1.065   | 100    |
| 2      | 0.068   | 100    |
| 3      | 0.909   | 100    |
| 4      | 1.054   | 100    |
| 5      | 0.374   | 100    |
| 6      | 0.097   | 100    |

4 结 论

本研究采用去除槟榔中卤水及内层纤维并以酸性水

溶液为提取液的方法提取槟榔中阿斯巴甜,使槟榔提取液 pH 值在 3~5 之间,保证了阿斯巴甜的稳定性,有利于槟榔提取液中阿斯巴甜的含量测定。建立高效液相色谱法测定槟榔中阿斯巴甜含量的分析方法,此方法具有分析速度快、专属性强、准确度高、线性范围广、检测限低等优点,适用于槟榔中阿斯巴甜的含量测定,可为广大槟榔生产企业提供阿斯巴甜检测依据,使其对槟榔中阿斯巴甜的添加量进行检测并严格限制,保障消费者健康。

参考文献

[1] 范长胜. 氨基酸二肽甜味剂的开发研究进展[J]. 工业微生物, 2002, 32(2): 37-46, 47.  
Fan CS. Development of dipeptide sweetener research [J]. Ind Microb, 2002, 32(2): 37-46, 47.

[2] 周力. 阿斯巴甜的生产与应用[J]. 食品科学, 1997, 18(7): 18-21.  
Zhou L. The production and application of aspartame [J]. Food Sci, 1997, 18(7): 18-21.

[3] 倪梅林, 谢东华, 房科腾, 等. 高效液相色谱法测定食品中阿斯巴甜的含量[J]. 光谱实验室, 2009, 26(1): 23-26.  
Ni ML, Xie DH, Fang KT, et al. Determination of aspartame in food by HPLC [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2009, 26(1): 23-26.

[4] 吴璞强, 赵桂霞, 张亚楠, 等. 阿斯巴甜的合成和应用研究进展[J]. 中国调味品, 2010, 35(1): 30-32, 37.  
Wu PQ, Zhao GX, Zhang YN, et al. Research progress of aspartame on application and synthesis [J]. China Condiment, 2010, 35(1): 30-32, 37.

[5] 张爱科, 阚建全, 陈景旺, 等. 阿斯巴甜的安全性研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 243-244, 247.  
Zhang AK, Kan JQ, Chen JW, et al. Research advancement of security of aspartame [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(4): 243-244, 247.

[6] 宋雁, 樊永祥, 李宁. 阿斯巴甜的安全性评价进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(1): 84-87.  
Song Y, Fan YX, Li N. Advances on the safety assessment of aspartame [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(1): 84-87.

[7] 张春江, 吕飞杰, 陶海腾. 槟榔活性成分及其功能作用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2008, 1(6): 50-53.  
Zhang CJ, Lv FJ, Tao HT. Research advancement of the active ingredients and it's function of aspartame [J]. Chin Food Nutr, 2008, 1(6): 50-53.

[8] 陈炜, 仲平, 张军霞. HPLC 法测定去羟肌苷咀嚼片中阿斯巴甜的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 31-373.  
Chen W, Zhong P, Zhang JX. Content determination of aspartame in didanosine chewable tablets by HPLC [J]. China Pharm, 2015, 26(3): 31-373.

[9] 李皓, 陈长武, 张培刚, 等. HPLC 法测定果冻食品中阿斯巴甜含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 520-522.  
Li H, Chen CW, Zhang PG, et al. Study on determination aspartame content in fruit jelly by HPLC [J]. Food Sci, 2008, 29(8): 520-522.

[10] 蒋定国, 方从容, 杨大进. HPLC 法同时测定口香糖中阿斯巴甜和阿力甜[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1268-1270, 1274.  
Jiang DG, Fang CR, Yang DJ. Determination of aspartame and alitame in chewing gums by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(6): 1268-1270, 1274.

[11] 金建秀, 刘东华, 石 杰, 等. 水果中阿斯巴甜的研究[J]. 天然产物研

- 究与开发, 2013, 25(1): 812–818.
- Jin JX, Liu DH, Shi J, *et al.* The study of aspartame in fruit [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25(1): 812–818.
- [12] 杨柳, 王林, 孙成均. 高效液相色谱法测定保健食品和饮料中的阿斯巴甜[J]. *分析试验室*, 2007, 26(7): 79–82.
- Yang L, Wang L, Sun CY. Determination of aspartame by high performance liquid chromatography in health foods and drinks [J]. *Chin J Anal Lab*, 2007, 26(7): 79–82.
- [13] 蒋定国, 王竹天, 杨大进, 等. 高效液相色谱法测定食品中阿斯巴甜的含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(6): 1012–1013.
- Jiang DG, Wang ZT, Yang DJ, *et al.* Determination of aspartame in food by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(6): 1012–1013.
- [14] 陈金东, 李蔚. 高效液相色谱法同时测定食品中阿斯巴甜、阿力甜[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(9): 1069–1070.
- Chen JD, Li W. Determination of aspartame and alitame in food simultaneously by HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2006, 16(9): 1069–1070.
- [15] Gibbs BF, Alli I, Mulligan CN. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 725(2): 372–377.
- [16] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
- GB 2760-2014 National food safety standard-Standards of using food additives [S].

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



康志娇, 硕士, 工程师, 主要研究方向为药物及食品质量分析与控制。  
E-mail: kzjiao@126.com