

高效液相色谱法同时测定奶昔粉中的安赛蜜和瑞鲍迪苷 A

高芝炆, 梁嘉敏*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时快速检测奶昔粉中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 含量的分析方法。**方法** 样品用水溶解稀释, 加入沉淀剂, 离心过滤得样品供试液。采用 C₁₈ 色谱柱, 以硫酸铵溶液:乙腈:甲醇=65:30:5(V:V:V)作为流动相, 检测波长为 210 nm, 流速 0.6 mL/min, 进行检测, 外标法定量。**结果** 本方法在 20 min 内完成 2 种目标化合物的分离分析。试样中安赛蜜浓度在 0.0040~0.0403 mg/mL 的范围内与峰面积的线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$, 在 3 水平不同浓度安赛蜜标准溶液添加下, 安赛蜜的回收率为 98.58%。试样中瑞鲍迪苷 A 浓度在 0.0028~0.0283 mg/mL 的范围内与峰面积的线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。在 3 水平不同浓度瑞鲍迪苷 A 标准溶液添加下, 瑞鲍迪苷 A 的回收率为 99.04%。均符合标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中的要求, 且目标峰分离效果更好, 效率提升 49.5%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合同时测定奶昔粉中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 含量。

关键词: 奶昔粉; 安赛蜜; 瑞鲍迪苷 A; 高效液相色谱法

Determination of acesulfame potassium and rebaudioside A in milkshake powder by high performance liquid chromatography

GAO Zhi-Yang, LIANG Jia-Min*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of acesulfame potassium and rebaudioside A in milkshake powder by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was diluted with water, after the precipitant was added, the sample was centrifuged and filtered to obtain the sample test solution. Ammonium sulfate solution:acetonitrile:methanol=65:30:5 (V:V:V) was used as mobile phase on a C₁₈ column, the detection wavelength was 210 nm and the flow rate was 0.6 mL/min for detection, and the external standard method was used for quantitative analysis. **Results** Two target compounds were separated and analyzed in 20 min. In the sample, there was a good linear relationship between the concentration of acesulfame potassium and the peak area in the range of 0.0040–0.0403 mg/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The recovery rate of acesulfame potassium was 98.58% when the standard solution with different concentrations of acesulfame potassium was added at 3 levels. There was a good linear relationship between the concentration of rebaudioside A and the peak area in the range of 0.0028–0.0283 mg/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The

*通讯作者: 梁嘉敏, 助理工程师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: 1025171799@qq.com

*Corresponding author: LIANG Jia-Min, Assistant Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1025171799@qq.com

recovery rate of acesulfame was 98.58% when the standard solution with different concentrations of rebaudioside A was added at 3 levels. All of them met the requirements of the standard GB/T 27404-2008 *Laboratory quality control standard-Physical and chemical testing of food*, the separation effect of target peak was better, and the efficiency is increased by 49.5%. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for the simultaneous determination of acesulfame potassium and rebaudioside A in milkshake powder.

KEY WORDS: milkshake powder; acesulfame potassium; rebaudioside A; high performance liquid chromatography

1 引言

甜菊糖是天然低热量高倍甜味剂, 被誉为“世界第三糖”。甜菊糖主要含有甜菊糖苷、瑞鲍迪苷 A、瑞鲍迪苷 C 等 8 种成分。其中, 瑞鲍迪苷 A 是甜味品质最好的成分。甜菊糖甜度为蔗糖的 250~450 倍, 而热量仅为蔗糖的 1/300。目前报道甜菊糖有抗糖尿病、降血压、抗菌抗病毒、抗炎等功能。因此, 饮料中常用瑞鲍迪苷 A 替代蔗糖, 可使饮料低糖化。随着人们越来越崇尚保健和安全食品, 甜菊糖因其具有低热量、安全、天然、保健等优点, 成为 21 世纪保健食品消费方向和未来甜味剂发展方向^[1-4]。

安赛蜜是一种食品添加剂, 化学名称为乙酰磺胺酸钾, 作为一种低热量甜味剂被允许使用。甜度为蔗糖的 200~250 倍。安赛蜜甜味纯正而强烈, 优于蔗糖, 对光、热稳定, pH 值适用范围较广, 是当前世界上稳定性最好的甜味剂之一^[5,6]。作为第四代合成甜味剂, 它和其他甜味剂混合使用能产生很强的协同效应, 一般浓度下可增加甜度 20%~40%, 被认为是最有前途的甜味剂之一^[7,8]。当前, 全球已有 90 多个国家正式批准安赛蜜用于食品、饮料、口腔卫生、化妆品及药剂等领域中^[9,10]。

安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 作为一种非糖非营养型的甜味剂, 广泛应用于各类食品和医学中^[9]。目前, 安赛蜜的检测方法有 GB/T 5009.140-2003《饮料中乙酰磺胺酸钾的测定》^[11], GB 25540-2010《食品安全国家标准 食品添加剂 乙酰磺胺酸钾》^[12]及 SN/T 3538-2013《出口食品中六种合成甜味剂的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》^[13]。现阶段测定瑞鲍迪苷 A 的标准方法有 GB 8270-2014《食品安全国家标准 食品添加剂 甜菊糖苷》^[14]和 SN/T 3854-2014《出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定 高效液相色谱法》^[15]。

在现有的标准方法中, 高效液相色谱法和高效液相色谱串联质谱法都是单独检测安赛蜜或瑞鲍迪苷 A 中的一种甜味剂^[16-19], 检测效率较低。因此本研究采用高效液相色谱法同时检测安赛蜜和瑞鲍迪苷 A, 检测效率高, 检测结果的线性、重复性、回收率、稳定性以及准确度偏差均符合标准要求, 为快速、同时检测安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 提

供了技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); 超声仪(德国 Elmasonic P 公司); 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

硫酸铵、硫酸、亚铁氰化钾、乙酸锌(分析纯, 广州化学试剂厂); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 实验室用水为超纯水。

安赛蜜对照品(纯度: 98.00%, 上海源叶公司); 瑞鲍迪苷 A 对照品(纯度: 99.31%, 北京科量公司)。

蛋白纤维营养奶昔(榛子味, 批号 20200620A、20200621A、20200622A, 汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准溶液配制: 分别准确称取约 10 mg 安赛蜜对照和瑞鲍迪苷 A 对照品, 置于 100 mL 容量瓶中, 加适量水溶解并定容至容量瓶刻度, 配制成约 0.10 mg/mL 标准工作液。该标准溶液在 4 °C 下 1 个月内稳定。

0.02 mol/L 硫酸铵缓冲溶液: 称取 2.5 g 硫酸铵, 加 800 mL 水溶解, 加 50 mL 10% H₂SO₄, 用水定容至 1000 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

沉淀剂 I: 称取 15.0 g 亚铁氰化钾, 用水溶解并定容至 100 mL。该沉淀剂在室温下 3 个月内稳定。

沉淀剂 II: 称取 30.0 g 乙酸锌, 用水溶解并定容至 100 mL。该沉淀剂在室温下 3 个月内稳定。

2.2.2 样品前处理

精密称取均匀试样约 1 g 至锥形瓶中, 加入适量的纯化水, 充分混匀, 超声波振荡器上室温超声提取 20 min, 待试样完全溶解, 冷却到室温。加入 1.0 mL 沉淀剂 I 和 1.0 mL 沉淀剂 II, 涡旋混合, 转入 50 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 充分混匀, 样液于 5000 r/min 下离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 水相滤膜, 即得。上清液在 4 °C 保存放置 24 h 内稳定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Agilent5 HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流

动相: 0.02 mol/L 硫酸铵缓冲溶液:乙腈:甲醇=65:30:5(V:V:V), 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 35 °C, 波长: 210 nm。

2.2.4 测定

精密吸取安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 标准溶液 0.5、1、2、3、5 μ L, 样品供试液 30 μ L 注入高效液相色谱仪。以安赛蜜、瑞鲍迪苷 A 峰面积 Y 为纵坐标, 安赛蜜、瑞鲍迪苷 A 标准溶液浓度(X , mg/mL)为横坐标绘制标准曲线, 外标法定量。

2.2.5 试样中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 含量计算

试样中安赛蜜或瑞鲍迪苷 A 的含量

$$X = \frac{C \times V}{M} \times K$$

式中:

X ——试样中安赛蜜或瑞鲍迪苷 A 的含量, g/kg;

C ——试样待测液中安赛蜜或瑞鲍迪苷 A 的浓度, mg/mL;

V ——试样溶液的体积, mL;

M ——试样的质量, g;

K ——单位转换系数。

3 结果与分析

3.1 新方法测定结果与产品理论含量比对

取蛋白纤维营养奶昔(批号 20200620A、20200621A、20200622A)为样品, 称样量约为 1 g, 按照 2.2 实验方法进行样品及测定, 其标准溶液和样品溶液色谱图如图 1、2 所示, 测定其安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 的含量, 测定结果如表 1。

从表 1 中数据中可以看出, 样品中安赛蜜和瑞鲍迪苷

A 的测定结果与投料中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 的理论标准偏差均 < 15%, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求^[20](当含量满足 $0.01 \text{ g/kg} < X \leq 1 \text{ g/kg}$ 时, 检测结果的准确度偏差 < 15%)。

3.2 标准曲线

安赛蜜的标准曲线方程为 $A=644.7859C-0.0348$, 其相关系数为 1, 表明安赛蜜在浓度 0.0040~0.0403 mg/mL 范围内均具有良好的线性关系。瑞鲍迪苷 A 的标准曲线方程为 $Y=82.7276X-0.0050$, 其相关系数为 1, 表明瑞鲍迪苷 A 在浓度 0.0028~0.0283 mg/mL 范围内均具有良好的线性关系, 均符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(GB/T 27404-2008 要求相关系数 $r^2 \geq 0.99$)。

3.3 检出限

将安赛蜜检出限(limits of detection, LOD)为 0.00032 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 安赛蜜的方法检出限为 20 mg/kg。将瑞鲍迪苷 A 浓度为 0.00075 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 瑞鲍迪苷 A 的方法检出限为 40 mg/kg, 满足检测的要求。

3.4 精密度

6 份样品中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 的平均含量分别为 0.79 g/kg 和 0.80 g/kg, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 1.6%和 1.8%, 其 RSD 值均 < 3.8%, 表明该方法重复性良好(见表 2), 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(GB/T 27404-2008 要求当含量满足 $0.1 \text{ g/kg} < X \leq 1 \text{ g/kg}$ 时, 检测结果的 $RSD \leq 3.8\%$)。

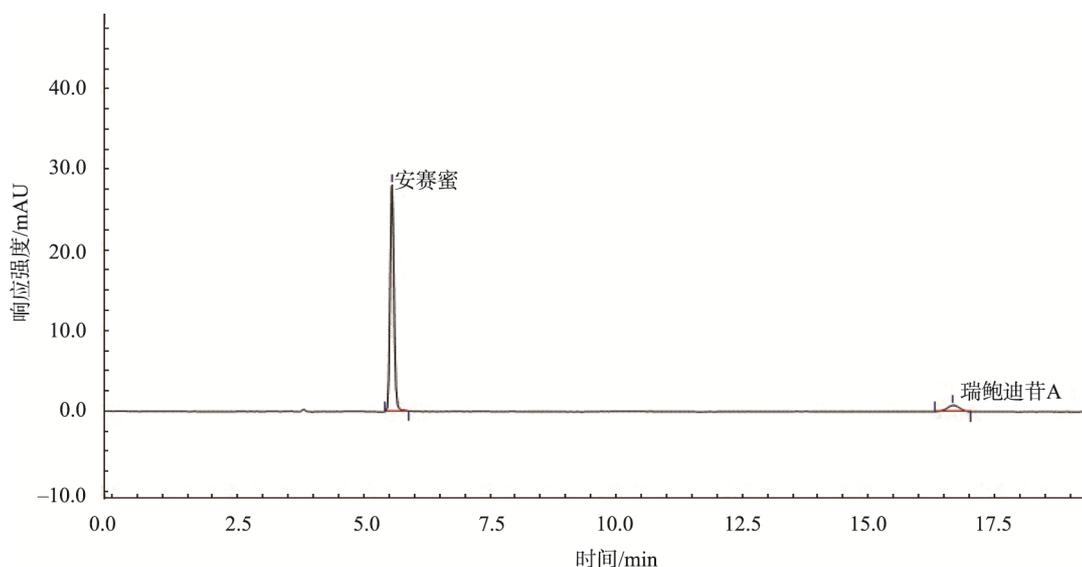


图 1 标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of standard solution

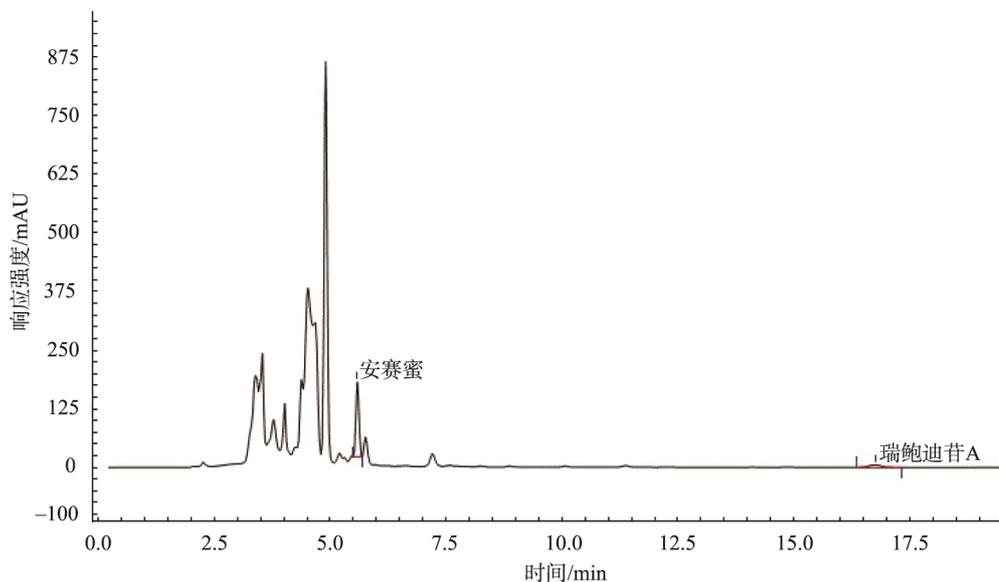


图 2 样品溶液色谱图

Fig.2 Chromatogram of sample solution

表 1 新方法的测定结果与产品理论含量进行比对($n=6$)Table 1 Comparison of the measured results of the new method with the theoretical content of the product ($n=6$)

项目名称	批号	样品测定含量/(g/kg)	理论含量/(g/kg)	准确度偏差/%	准确度偏差标准/%	结论
安赛蜜	20200620A	0.8112	0.8083	0.4	< 15	符合规定
	20200621A	0.7924		2.0		符合规定
	20200622A	0.7908		2.2		符合规定
瑞鲍迪苷 A	20200620A	0.8098	0.8083	0.2	< 15	符合规定
	20200621A	0.8135		0.7		符合规定
	20200622A	0.8202		1.5		符合规定

3.5 稳定性

将样品在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h 时, 安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 峰面积 RSD 值分别为 0.1% 和 0.6% (见表 3), 表明样品溶液在室温下 12 h 内的稳定。

3.6 回收率

当加标为 80%、100% 和 120% 时, 样品中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 的平均回收率分别为 98.58% 和 99.04%, RSD 分别为 0.8% 和 1.0% (见表 4), 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(当含量满足 $0.1 \text{ g/kg} < X$ 时, 回收率为 95%~105%), 表明该方法测定安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 准确。

4 结论

在现有标准检测方法中, 无同时测定安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 两种甜味剂的检测方法。本研究通过优化流动相及色谱柱体系, 实现安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 2 种甜味剂成分的同时检测, 特别是在基质复杂的奶昔粉中, 2 种甜味剂实现了良好的基线分离。相比标准方法, 本研究方法从样品前处理到结果分析测定的效率大大提升且准确度、线性、重复性、稳定性、回收率均符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求, 旨在为同时快速检测不同基质样品中安赛蜜和瑞鲍迪苷 A 两种甜味剂提供指导方向。

表 2 重复性实验结果($n=6$)
Table 2 Results of repeatability experiment ($n=6$)

名称	序号	称样量/g	浓度/(mg/mL)	含量/(g/kg)	平均含量/(g/kg)	RSD/%	标准要求/%
安赛蜜	1	1.2665	0.02032	0.802	0.79	1.6	3.8
	2	1.3751	0.02156	0.783			
	3	1.2594	0.02008	0.797			
	4	1.4303	0.02262	0.79			
	5	1.2768	0.01996	0.781			
	6	1.3187	0.02147	0.814			
瑞鲍迪苷 A	1	1.2665	0.02073	0.818	0.80	1.8	3.8
	2	1.3751	0.02154	0.783			
	3	1.2594	0.01989	0.789			
	4	1.4303	0.02235	0.781			
	5	1.2768	0.02054	0.804			
	6	1.3187	0.02098	0.795			

表 3 稳定性实验($n=6$)
Table 3 Stability test ($n=6$)

时间/h	0	2	4	6	8	10	12	RSD/%
安赛蜜峰面积/mAU	13.1886	13.1905	13.1914	13.1789	13.1954	13.2042	13.1918	0.1
瑞鲍迪苷 A 峰面积/mAU	1.7097	1.7355	1.7214	1.7195	1.7228	1.7301	1.7157	0.6

表 4 加标回收率实验结果($n=3$)
Table 4 Spiked recovery rate experiment results ($n=3$)

项目名称	加标量	称样量/g	测定浓度/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%			
安赛蜜	80%加标	1.2052	0.03451	98.547	98.58	0.8			
		1.2365	0.03512	99.286					
		1.2148	0.03474	99.057					
	100%加标	1.2205	0.03885	99.734					
		1.2102	0.03828	97.655					
		1.2095	0.03851	98.878					
	120%加标	1.2115	0.04223	98.071					
		1.2108	0.04236	98.666					
		1.2154	0.04212	97.341					
	瑞鲍迪苷 A	80%加标	1.2052	0.03499			99.758	99.04	1.0
			1.2365	0.03552			99.936		
			1.2148	0.03495			98.526		
100%加标		1.2205	0.03912	99.532					
		1.2102	0.03898	99.664					
		1.2095	0.03901	99.867					
120%加标	1.2115	0.04262	98.374						
	1.2108	0.04263	98.467						
	1.2154	0.04241	97.222						

参考文献

- [1] 张友财, 俞坚, 董雪瑞, 等. HPLC 法快速测定甜叶菊中瑞鲍迪苷 A[J]. 食品工程, 2014, (4): 60-63.
Zhang YC, Yu J, Dong XR, *et al.* Rapid determination of rebaudioside A in stevia by HPLC [J]. Food Eng, 2014, (4): 60-63.
- [2] 孙绍鹏, 周卫强, 李皓然, 等. 新型甜味剂甜菊糖苷产品的开发及其应用进展[J]. 现代食品, 2020, 3(5): 23-25.
Sun SP, Zhou WQ, Li HR, *et al.* Development and application of new sweetener stevioside products [J]. Mod Food, 2020, 3(5): 23-25.
- [3] 杨远志, 李发财, 琚争艳, 等. 甜菊糖的应用现状及发展前景[J]. 发酵科技通讯, 2011, (1): 40-44.
Yang YZ, Li FC, Ju ZY, *et al.* Application status and development prospect of stevia [J]. J Ferment Technol, 2011, (1): 40-44.
- [4] Wang Y, Chen LL, Li YY, *et al.* Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(1): 67-73.
- [5] 黄林峰. 安赛蜜工厂工艺流程设计探讨[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
Huang LF. Discussion on process design of acesulfame potassium factory [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [6] 姜彬, 冯志彪. 甜味剂发展概况[J]. 食品科技, 2006, (1): 11-13.
Jiang B, Feng ZB. Development of sweeteners [J]. Food Sci Technol, 2006, (1): 11-13.
- [7] 江玉. 甜味剂安赛蜜的合成研究[J]. 科技创新导报, 2008, (35): 16-18.
Jiang Y. Synthesis of the sweetener acesulfame potassium [J]. J Sci Technol Innov, 2008, (35): 16-18.
- [8] 陈金娥, 张海容. 几种重要的食品甜味剂[J]. 酿酒科技, 2007, (4): 22-23.
Chen JE, Zhang HR. Several important food sweeteners [J]. Brew Technol, 2007, (4): 22-23.
- [9] 刘婷, 吴道澄. 食品中甜味剂的检测方法[J]. 中国调味品, 2011, 36(3): 1-12, 16.
Liu T, Wu DC. Analytical methodologies for determination of sweeteners in foodstuffs [J]. China Cond, 2011, 36(3): 1-12, 16.
- [10] 杨双春, 刘慧芳, 王健, 等. 国内外人工合成的非能量型甜味剂研究现状[D]. 抚顺: 辽宁石油化工大学, 2013.
Yang SC, Liu HF, Wang J, *et al.* Research status of artificial non-energy sweeteners at home and abroad [D]. Fushun: Liaoning University of Petroleum and Chemical Technology, 2013.
- [11] 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 in beverages [S].
- [12] GB 25540-2010 国家食品安全标准 食品添加剂 乙酰磺胺酸钾[S].
GB 25540-2010 National food safety standard-Food additive-Acesulfame potassium [S].
- [13] SN/T 3538-2013 出口食品中六种合成甜味剂的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S].
SN/T 3538-2013 Methods for the detection of six synthetic sweeteners in exported food-Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrumetry [S].
- [14] GB 8270-2014 国家食品安全标准 食品添加剂 甜菊糖苷[S].
GB 8270-2014 National food safety standard-Food additive-Stevia glycoside [S].
- [15] SN/T 3854-2014 出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定 高效液相色谱法[S].
SN/T 3854-2014 Determination of stevia glycoside, stevia diglycoside, glycyrrhizic acid and glycyrrhizic acid in natural sweeteners for export food-High performance liquid chromatography [S].
- [16] 蔡伟谊, 曾羲, 苏燕瑜, 等. 流动相 pH 对苯甲酸等 5 种食品添加剂反相高效液相色谱行为影响及分析方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 118-121.
Cai WY, Zeng X, Su YY, *et al.* Influence of pH on the behavior of five food additives including benzoic acid by reversed-phase high performance liquid chromatography and establishment of analytical method [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(12): 118-121.
- [17] 袁凤琴, 王佳, 李照, 等. 高效液相色谱法同时检测黄油及无水奶油中苯甲酸、山梨酸、安赛蜜、糖精钠[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(19): 102-103.
Yuan FQ, Wang J, Li Z, *et al.* Simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, aceesi and saccharin sodium in butter and anhydrous butter by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(19): 102-103.
- [18] 梅婕, 司冠儒, 张温清, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定白酒中 6 种甜味剂[J]. 酿酒科技, 2016, (3): 102-103.
Mei J, Si GR, Zhang WQ, *et al.* Determination of 6 sweeteners in liquor by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Liquor Mak Technol, 2016, (3): 102-103.
- [19] 于敏聪, 石岩. 甜菊糖苷的测定方法[J]. 中国糖料, 2009, (1): 65-67.
Yu MC, Shi Y. Methods for the determination of stevia glycosides [J]. Chin Sugar, 2009, (1): 65-67.
- [20] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specification for physical-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



高芝扬, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品安全。
E-mail: 1046621420@qq.com



梁嘉敏, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品安全。
E-mail: 1025171799@qq.com