

高效液相色谱法同时测定多种食品添加剂

陈青川, 于文莲, 王 静

(中国进出口商品检验技术研究所, 北京 100025)

摘要 采用反相高效液相色谱法, 一次进样, 同时测定食品中的人工合成甜味剂(糖精钠、安赛蜜、甜味素)、防腐剂(苯甲酸、山梨酸)、咖啡因、可可碱和茶碱。以 Alltech Econosphere C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 3 μm) 为分离柱, 10 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 4.00)-乙腈(体积比为 90:10) 为流动相, 采用二极管阵列检测器进行检测。整个分离过程在 23 min 内完成。样品平均加标回收率为 78.5%~107.2%。方法也可用于药品分析。

关键词 高效液相色谱法; 食品添加剂; 人工合成甜味剂; 防腐剂; 咖啡因; 可可碱; 茶碱

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2001)02-0105-04

1 前言

近年来, 由于消费者对于食品的安全性日益关注, 食品中各种食品添加剂, 特别是人工合成甜味剂(主要是糖精钠(SA)、乙酰磺胺酸钾(安赛蜜, AK)、天门冬酰苯丙氨酸甲酯(甜味素, ASP))和防腐剂(苯甲酸(BA)、山梨酸(SOR))的使用情况越来越受到人们的重视。此外, 咖啡因(CA)、可可碱(TB)和茶碱(TP)也广泛地存在于各种食品当中^[1]。因此, 建立一种能够同时测定食品中以上多种食品添加剂的方法十分必要。目前, 大多数分析方法只能测定上述物质中的 1 种或少数 2~3 种, 能够同时测定 3 种以上物质的方法较少。所用的方法主要是高效液相色谱法^[2~9]、离子色谱法^[10]和毛细管电泳法^[11, 12]。可以同时测定以上 8 种食品添加剂的方法未见报道。由于高效液相色谱法同时具备分离效率高、灵敏度高和重现性好等优点, 因此应是目前进行上述物质分析的首选方法。本文建立了一种采用反相高效液相色谱法等度洗脱, 能够同时测定上述 8 种食品添加剂的方法, 并已用于多种食品和药品的测定, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 600 泵, 717 plus 自动进样器, 996 光电二极管阵列检测器, Millennium 2010 色谱工作站。Alltech Econosphere C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 3 μm), Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱。Horiba F-23 pH 计。日立 U-3000 分光光度计, 1 cm 石英比色皿。

糖精钠和苯甲酸(质量浓度均为 1.00 g/L) 购自国家标准物质研究中心(北京), 咖啡因和茶碱(购自中国药品生物制品检定所), 甜味素和可可碱

(Sigma 公司产品), 安赛蜜(Supelco 公司产品), 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯或优级纯, 实验用水(18 MΩ·cm) 由 Millipore Milli-Q RG 超纯水系统制备。

2.2 色谱条件

流动相为 10 mmol/L NaH₂PO₄ (用 1 mol/L H₃PO₄ 调至 pH 4.00)-乙腈(体积比为 90:10), 等度洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL, 紫外波长扫描范围为 195 nm~320 nm。以保留时间和紫外吸收谱图定性, 峰面积定量。

2.3 实际样品的制备

所有样品均为市场采集的样品, 按照品种将其分为饮料、蜜饯和药品等 3 类, 其中饮料按照 GB10789-1996^[13] 的分类方法, 又可进一步分为碳酸饮料、果汁、茶饮料、含乳饮料、植物蛋白饮料和固体饮料等。所有样品稀释液最后均经 0.45 μm 滤膜过滤, 然后进样测定。

2.3.1 介质比较简单的饮料 经超声脱气后用水进行适当稀释。

2.3.2 介质比较复杂的饮料 经超声脱气后用水进行适当稀释, 取其中 5 mL (对于含果肉较多的饮料, 稀释后可事先在 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液 5 mL) 经固相萃取柱(事先经 5 mL 乙腈和 5 mL 水进行活化), 然后依次用 2 mL 10 mmol/L NaH₂PO₄ 和 5 mL 10 mmol/L NaH₂PO₄ (含体积分数为 25% 的乙腈) 对固相萃取柱进行洗脱。所有流出液收集于 25 mL 容量瓶中, 用水定容。

2.3.3 固体饮料和药品 研成粉末, 配成溶液后, 再根据具体情况按上述方法进行处理。

2.3.4 植物蛋白和含乳饮料 用水适当稀释后超声 10 min, 冷却至室温, 依次加入 2 mL 0.085

mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ 和 2 mL 0.25 mol/L $ZnSO_4$ 溶液,剧烈振摇 2 min,用水定容至 25 mL,然后转入离心管中,在 4000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液 5 mL,经固相萃取柱萃取,以下操作同“2.3.2”节。

2.3.5 蜜饯 将样品切碎,称取适量置于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 水,超声 30 min,加水定容至 50 mL。取上清液 1 mL,经固相萃取柱萃取,以下操作同“2.3.2”节。

3 结果与讨论

3.1 分离条件的选择

初步实验结果表明,在中性条件下,以水-乙腈(体积比为 90:10)为流动相,苯甲酸和山梨酸先后出峰,虽然可以实现基线分离,但均为严重的前伸峰。这是因为此时二者在流动相中均以阴离子的形式存在(苯甲酸和山梨酸的 pK_a 值分别为 4.19 和 4.76^[14]),与固定相之间的相互作用较弱。此外,可可碱与山梨酸、茶碱与山梨酸的色谱峰也部分重叠。因此,应当采用酸性流动相,使苯甲酸和山梨酸在溶液中主要以中性分子的形式存在,增加与固定相之间的相互作用。考虑到甜味素只在短波长的紫外光区才具有较大吸收,为了保证方法的灵敏度,采用磷酸盐缓冲溶液为流动相,并添加一定量的乙腈。我们首先研究了乙腈体积分数为 10% 时,流动相中缓冲溶液 pH 值对分离效果的影响,结果见图 1。

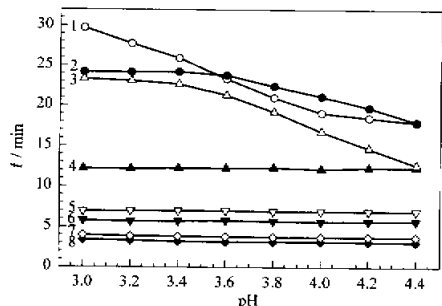


图 1 流动相中缓冲溶液 pH 值对分析物保留时间的影响

Fig.1 Effect of pH of buffer solution in mobile phase on retention times of analytes

1. aspartame(ASP); 2. sorbic acid(SOR); 3. benzoic acid(BA); 4. caffeine(CA); 5. theophylline(TP); 6. theobromine(TB); 7. saccharin sodium(SA); 8. acesulfame potassium(AK).

由图 1 可见,缓冲溶液的 pH 值在 3.00~4.40 的范围内,安赛蜜、糖精钠、可可碱、茶碱和咖啡因的保留时间基本不变,这主要是因为以上分析物在此 pH 范围内,存在形式保持不变(咖啡因、可可碱和茶碱以中性分子的形式存在^[1],安赛蜜和糖精钠可能

以阴离子的形式存在^[10]);相反,苯甲酸、山梨酸和甜味素的保留时间均随 pH 值的增加而减少,这是因为在此 pH 范围内,以上 3 种分析物的存在形式发生了变化,以离子形式存在的比例逐渐增加,分析物与固定相之间的相互作用逐渐减小。甜味素的 pK_{a1} 和 pK_{a2} 值分别为 2.96 和 7.37^[15],在 pH 3.00 左右,甜味素以阴离子形式存在的比例迅速增加,它与固定相之间的相互作用也在迅速减小。因此在 pH 3.00~3.40 的范围内,甜味素在山梨酸之后出峰,而在 pH 3.60~4.40 的范围内,甜味素在山梨酸之前出峰(此时山梨酸以阴离子形式存在的比例虽然也在缓慢增加,但主要仍以中性分子的形式存在)。此外,随着 pH 值的增大,苯甲酸的色谱峰在 pH 4.20 时开始出现轻微的前伸,在 pH 4.40 时前伸已经非常严重,在 pH 4.50 时色谱峰已经分叉;山梨酸的色谱峰在 pH 4.20 时也开始出现轻微的前伸,在 pH 4.40 时前伸已经比较严重,而且与甜味素的色谱峰部分重叠。考虑到 pH 4.00 时,8 种分析物均可实现基线分离,而且流动相 pH 值的轻微变化不会影响各种物质的分离,整个分离时间也较短,因此最终选择流动相缓冲溶液的 pH 值为 4.00。

我们又进一步研究了流动相中乙腈体积分数对分离的影响(图略)。结果发现,随着乙腈体积分数的增大,所有分析物的保留时间都在缩短。在苯甲酸、山梨酸和甜味素 3 种分析物当中,以甜味素保留时间的变化最大,当乙腈的体积分数为 13% 时,甜味素在苯甲酸之前出峰。另外,乙腈的体积分数为 7%~8% 时,甜味素和山梨酸的色谱峰部分重叠;乙腈的体积分数为 12%~13% 时,甜味素和苯甲酸的色谱峰部分重叠。综合考虑,最终选择流动相中乙腈的体积分数为 10%。

此外,我们还研究了柱温对分离的影响。在 30℃~50℃ 范围内,随着柱温的增加,柱压下降,所有分析物的保留时间均在缩短,分离效果也有所改善。但由于甜味素在高温下稳定性较差^[16],最终选择柱温为 40℃。

3.2 检测条件的选择

由于以上 8 种食品添加剂均具有紫外吸收,因此以往的分析方法基本上均采用紫外固定波长检测法。由于分析物的最大吸收波长不同,固定波长检测会造成测定灵敏度偏低,而且对于介质复杂的样品,也无法对峰的纯度进行确定性评价。本文采用光电二极管阵列检测器,在 195 nm~320 nm 范围内对所有分析物进行紫外波长扫描。结果发现,在实验条件下,安赛蜜、糖精钠、可可碱、茶碱、咖啡因、苯甲酸、甜味素、山梨酸的最大吸收波长分别为

224.0 nm ,201.7 nm ,200.5 nm ,200.5 nm ,205.2 nm ,195.8 nm ,195.8 nm 和 260.7 nm。由于流动相在低于 200 nm 的波长下背景的紫外吸收较高 ,另外考虑到应使每种分析物的测定灵敏度尽可能的大 ,且定量方法不致于过分复杂 ,因此最终决定分别采用 224 nm ,261 nm 和 202 nm 等 3 个波长分别对安赛蜜、山梨酸、糖精钠、可可碱、茶碱、咖啡因、苯甲酸、甜味素进行测定。此时 ,安赛蜜、糖精钠、可可

碱、茶碱、咖啡因、苯甲酸、甜味素、山梨酸的峰面积为各自最大吸收波长时峰面积的 100% ,95.6% ,99.8% ,99.5% ,99.0% ,28.7% ,60.5% 和 99.9% ,灵敏度均能满足实际样品的测定。标准溶液在不同检测波长时的色谱图见图 2 ,其中安赛蜜的质量浓度为 4 mg/L ,糖精钠、可可碱、茶碱、咖啡因浓度质量均为 2 mg/L ,苯甲酸、甜味素、山梨酸浓度质量均为 8 mg/L。

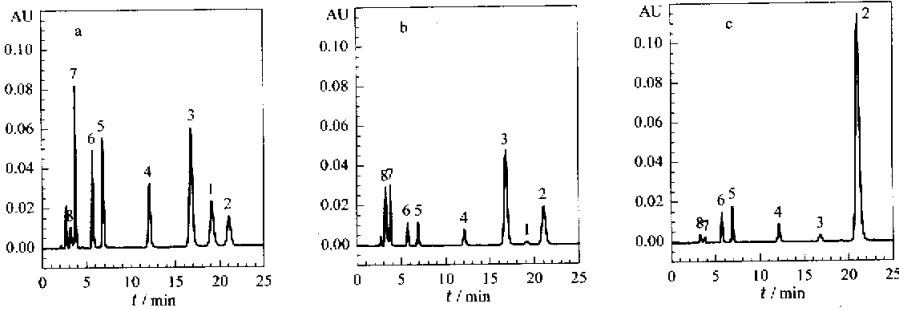


图 2 标准溶液在 202 nm (a) ,224 nm (b) 和 261 nm (c) 检测波长下的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of standard solution at 202 nm (a) ,224 nm (b) and 261 nm (c)

Peak No. the same as curve No. in Fig. 1.

3.3 干扰试验

在实验条件下 ,食品中可能存在的其他常见食品添加剂和有机酸如环己氨基磺酸钠(甜蜜素)、柠檬酸、苹果酸、酒石酸和抗坏血酸等均在死时间附近出峰 ,对测定不会产生干扰。另外 ,上述物质在 224 nm 处的紫外吸收都非常弱 ,因此选择 224 nm 对安赛蜜进行定量 ,也有利于避免高浓度的上述物质可能造成的干扰。

3.4 线性范围、精密度和检出限

在实验条件下 ,所有分析物的浓度与峰面积之间均具有良好的线性关系 ,具体结果和检出限 (S/N=3) 均列于表 1。对混合标准溶液 (安赛蜜质量浓度为 10 mg/L ,糖精钠、可可碱、茶碱、咖啡因质量浓度均为 5 mg/L ,苯甲酸、甜味素、山梨酸质量浓度均为 20 mg/L) 平行测定 10 次 ,相对标准偏差分别为安赛蜜 1.46%、糖精钠 1.20%、可可碱 0.22%、茶碱 0.24%、咖啡因 0.24%、苯甲酸 0.84%、甜味素 0.22%、山梨酸 0.53%。

表 1 线性关系与检出限

Table 1 The linearities and detection limits

Anal- yte ¹⁾	Concen- tration range (mg/L)	Regression equation ²⁾	Correlation coefficient (n=5)	Detection limit (mg/L)
AK	0.5-20	$A=(1.22C-0.20)\times 10^5$	0.999 8	0.012
SA	0.25-10	$A=(2.48C-0.08)\times 10^5$	0.999 9	0.003 7
TB	0.25-10	$A=(2.83C-0.07)\times 10^5$	0.999 9	0.005 0
TP	0.25-10	$A=(3.18C-0.08)\times 10^5$	0.999 9	0.004 7
CA	0.25-10	$A=(2.78C-0.08)\times 10^5$	0.999 9	0.008 2
BA	1-40	$A=(1.29C-0.31)\times 10^5$	0.999 9	0.027
ASP	1-40	$A=(7.49C-4.14)\times 10^4$	0.999 6	0.057
SOR	1-40	$A=(4.15C-0.65)\times 10^5$	0.999 9	0.005 0

1) For analytes see the note in Fig. 1 ; 2) A : peak area response ; C : concentrations of analytes (mg/L) .

3.5 实际样品的测定

每种样品平行测定 4 次 ,其中植物蛋白饮料中各种分析物均未被检出 ,其余样品的测定结果列于表 2 (表中分析物未列出者为所有样品中未检出) ,加标回收率的实验结果列于表 3。本方法在一年内 ,对 60 多种实际样品进行了分析 ,结果令人满意。

表 2 实际样品的测定结果 (n=4)

Table 2 The determination results of real samples (n=4)

Sample ¹⁾	SA ± SD	CA ± SD	BA ± SD	ASP ± SD	SOR ± SD
1	137 ± 2	114 ± 1	149 ± 3	ND	ND
2	41.4 ± 2.0	ND	ND	ND	ND
3	ND ²⁾	26.5 ± 0.2	ND	111 ± 1	ND
4	ND	ND	ND	ND	545 ± 9
5	7070 ± 60	ND	ND	ND	ND
6	4806 ± 79	ND	ND	ND	ND
7	ND	(409 ± 2) × 10 ³	(445 ± 4) × 10 ³	ND	ND

1) Samples : 1. carbonated drink 2. fruit juice 3. tea drink 4. drink containing milk 5. powdered drink 6. preserved fruit 7. caffeine and sodium benzoate tablet. 2) ND : not detectable.

表 3 实际样品的加标回收率结果

Table 3 Recoveries of spiked samples

Sample*	Added amount (mg/kg)								Recovery \pm SD (%)							
	AK	SA	TB	TP	CA	BA	ASP	SOR	AK	SA	TB	TP	CA	BA	ASP	SOR
1	100	50	50	50	50	200	200	200	106.1 \pm 2.2	105.5 \pm 3.6	97.5 \pm 0.6	99.0 \pm 0.9	106.6 \pm 2.1	98.7 \pm 1.4	97.2 \pm 0.7	94.4 \pm 0.3
2	100	50	50	50	50	200	200	200	103.2 \pm 0.7	91.8 \pm 2.2	98.9 \pm 0.4	99.5 \pm 0.6	99.4 \pm 0.4	101.9 \pm 1.1	100.3 \pm 0.2	98.4 \pm 0.4
3	40	20	20	20	20	80	80	80	107.2 \pm 2.1	98.1 \pm 2.1	101.9 \pm 0.6	100.6 \pm 0.8	101.0 \pm 1.7	103.0 \pm 1.0	102.6 \pm 1.3	103.5 \pm 0.5
4	200	100	100	100	100	400	400	400	88.9 \pm 4.4	96.9 \pm 3.1	97.0 \pm 0.7	94.4 \pm 0.8	94.5 \pm 0.8	100.3 \pm 1.0	85.2 \pm 0.8	100.8 \pm 3.1
5	10000	5000	5000	5000	5000	20000	20000	20000	90.2 \pm 1.5	103.7 \pm 0.3	94.0 \pm 1.2	96.6 \pm 1.1	97.6 \pm 0.5	99.0 \pm 0.4	94.3 \pm 0.4	96.5 \pm 0.6
6	5000	2500	2500	2500	2500	10000	10000	10000	91.4 \pm 1.5	98.2 \pm 3.5	100.4 \pm 0.5	98.0 \pm 0.6	98.0 \pm 0.6	99.2 \pm 0.5	96.8 \pm 1.7	98.0 \pm 0.5
8	200	100	100	100	100	400	400	400	95.0 \pm 1.2	102.5 \pm 0.8	96.3 \pm 1.4	87.6 \pm 1.8	92.8 \pm 1.3	96.2 \pm 0.9	78.5 \pm 1.9	93.4 \pm 1.2

* Sample 8 is vegetable protein drink, others are the same as note 1 in Table 2.

参考文献:

- [1] Chen Q Ch, Mou S F, Hou X P, et al. Anal Chim Acta, 1998, 371(2-3):287-296
- [2] Webb N G, Beckman D D. J Assoc Off Anal Chem, 1984, 67(3):510-513
- [3] Tyler T A. J Assoc Off Anal Chem, 1984, 67(4):745-747
- [4] Tsang W S, Clarke M A, Parrish F W. J Agric Food Chem, 1985, 33(4):734-738
- [5] Veerabhadrarao M, Narayan M S, Kapur O, et al. J Assoc Off Anal Chem, 1987, 70(3):578-582
- [6] Prodoliet J, Bruelhart M. J AOAC Int, 1993, 76(2):268-274
- [7] Prodoliet J, Bruelhart M. J AOAC Int, 1993, 76(2):275-282
- [8] Ostermeyer U. Dtsch Lebensm -Rundsch, 1995, 91(10):307-311
- [9] Kobayashi C, Nakazato M, Ushiyama H, et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 1999, 40(2):166-171
小林千种, 中里光男, 牛山博文, 等. 食品卫生学杂志(日), 1999, 40(2):166-171
- [10] Chen Q Ch, Mou Sh F, Liu K N, et al. J Chromatogr A, 1997, 771(1-2):135-143
- [11] Boyce M C. J Chromatogr A, 1999, 847(1-2):369-375
- [12] SUN Bao-guo, HOU Peng-liang, LIN Yan-fei, et al. Journal of Analytical Science, 1999, 15(2):124-127
孙保国, 侯鹏亮, 林雁飞, 等. 分析科学学报, 1999, 15(2):124-127
- [13] GB 10789-1996
- [14] Windholz M. The merck index. 9th ed. Rahway: Merck, 1976. 142-1 126
- [15] Martell A E, Smith R M. Critical stability constants, Vol 5. New York: Plenum Press, 1982. 111
- [16] Khan R. Low-calorie foods and food ingredients. London: Blackie Academic & Professional, 1993. 146

Simultaneous Determination of Various Food Additives by High Performance Liquid Chromatography

CHEN Qing-chuan, YU Wen-lian, WANG Jing

(China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025, China)

Abstract: A novel method is proposed for the simultaneous separation and determination of eight food additives, acesulfame potassium (AK), aspartame (ASP), benzoic acid (BA), caffeine (CA), saccharin sodium (SA), sorbic acid (SOR), theobromine (TB) and theophylline (TP) by reversed-phase high performance liquid chromatography. The separation was achieved within 23 min by using an Alltech Econosphere C₁₈ column with 10 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 4.00)-acetonitrile (90:10, V/V) as mobile phase. The qualification and quantitation were accomplished by using a photodiode array detector. The detection limits (S/N=3) for all analytes were below mg/L level. Under the experimental conditions, other common food additives and organic acids such as cyclamate, citric acid, malic acid, tartaric acid and ascorbic acid, did not interfere with the determination. The method has been successfully applied to the analysis of various foods as well as pharmaceutical preparation, and the average recoveries for real samples ranged from 78.5% to 107.2%.

Key words: high performance liquid chromatography; food additive; synthetic sweetener; preservative; caffeine; theobromine; theophylline