

高效液相色谱法测定食品中的爱德万甜

汪辉, 曹阳, 曹雄杰, 曹雯婷

(长沙市食品药品检验所, 湖南 长沙 410016)

摘要: 建立了食品中爱德万甜检测的高效液相色谱分析方法。样品经甲醇-水(50:50, 体积比)溶液提取10 min, 离心后取上清液进行分析。采用 Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(53:47, 体积比)等度洗脱, 在280 nm 波长下检测, 外标法定量。结果表明, 目标化合物在1.0~200.0 mg/L 范围内呈良好的线性, 相关系数(*r*)为0.999 8, 饮料、酸奶和蛋糕的检出限(*S/N*≥3)分别为0.6、1.5、9.0 mg/kg。方法的回收率为90.9%~103.4%, 相对标准偏差(RSD, *n*=5)为1.1%~4.5%。该方法的色谱分离效果好, 干扰少, 准确度高, 可用于实际样品中爱德万甜的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 测定; 食品; 爱德万甜

中图分类号: O657.72; TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)05-0635-04

Determination of Advantame in Foods by High Performance Liquid Chromatography

WANG Hui, CAO Yang, CAO Xiong-jie, CAO Wen-ting

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410016, China)

Abstract: A method for the determination of advantame in foods using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The samples were extracted with methanol-water (50:50, by volume) in ultrasonic condition for 10 min. The supernatant was analyzed after centrifugation. Target compound was separated on an Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column at 280 nm, with methanol-0.02 mol/L ammonium acetate (53:47, by volume) as mobile phase by isocratic elution. The quantitative analysis was carried out by the external standard method. The results showed that the calibration curves were linear in the range of 1.0-200.0 mg/L with correlation coefficients of 0.999 8. The limits of detection (*S/N*≥3) of the method for the analytes in beverage, yoghurt and cake were 0.6, 1.5 and 9.0 mg/kg, respectively. The average recoveries ranged from 90.9% to 103.4% with relative standard deviations (RSDs, *n*=5) of 1.1%-4.5%. With the advantages of good separation, few impurity disturbances and high accuracy, this method could be applied in the analysis of advantame in real samples.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); determination; food; advantame

爱德万甜, 化学名为 N-[N-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)丙基]-L-α-天冬氨酸]-L-苯丙氨酸-1-甲酯, 分子式为 C₂₄H₃₀N₂O₇·H₂O, 由香兰素和阿斯巴甜经化学反应制得^[1]。欧洲食品安全局和美国食品药品监督管理局均对爱德万甜的每日允许摄入量作了规定, 分别为不超过 5 mg/kg·bw 和 32.8 mg/kg·bw^[2]。2017年10月20日, 国家卫生计生委发布《关于爱德万甜等6种食品添加剂新品种、食品添加剂环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)等6种食品添加剂扩大用量和使用范围的公告》, 允许爱德万甜作为新品种的食品添加剂添加至部分食品中, 同时规定了限量。因此, 开发食品中爱德万甜的检测方法可为食品监管及时提供技术支撑, 促进食品安全健康发展。

目前, 国内外关于甜味剂如安赛蜜、糖精钠、甜蜜素和阿斯巴甜等的研究较多, 分析方法有高效液相色谱法^[3-5]、液相色谱-串联质谱法^[6-7]、气相色谱法^[8]等, 其中液相色谱-串联质谱法由于价格昂贵, 难以在一般实验室普及, 而气相色谱法需衍生后测定, 前处理较复杂, 且很少有关于爱德万甜检测方法的报道。本文根据爱德万甜的物理特性和化学性质, 建立了食品中爱德万甜的高效液相色谱测定方法。该方法前处理简单、分析快速, 准确度高, 干扰因素少, 适用于饮料、发酵乳和糕点中

爱德万甜的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪配有 G1329B 自动进样器, G1311C 四元泵、G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列检测器(美国安捷伦科技有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CT140 台式高速离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司)。

爱德万甜($\geq 97.0\%$, HPLC 级, Sigma 公司); 甲醇($\geq 99.9\%$, 色谱纯, 德国 Merck KGaA 公司); 乙酸铵($\geq 98.0\%$, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。实验用水为 Millipore Intergral 3 超纯水仪制备的超纯水。

精确称取爱德万甜标准品 50.0 mg(精确至 0.01 mg)于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇-水(50:50, 体积比)溶解, 配制成质量浓度为 500.0 mg/L 的标准储备液, 冷藏储存。临用时, 用水逐级稀释成适当浓度的标准工作液。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(53:47, 体积比), 等度洗脱; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL。

1.3 实验方法

精确称取饮料样品 5.0 g(精确至 0.1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 加纯甲醇溶液稀释, 并定容至刻度, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。

精确称取发酵乳样品 2.0 g(精确至 0.1 mg)于 50 mL 离心管中, 加 8 mL 甲醇-水(50:50)溶液超声提取 10 min, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液至 10 mL 容量瓶中, 加甲醇-水(50:50)溶液定容至刻度, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。

精确称取糕点样品 2.0 g(精确至 0.1 mg)于 50 mL 离心管中, 加 20 mL 甲醇-水(50:50)溶液超声提取 10 min, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇-水(50:50)溶液定容至刻度, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

采用二极管阵列检测器全波长扫描模式, 在 190 ~ 400 nm 波长范围内对爱德万甜进行紫外扫描, 发现爱德万甜在 230 nm 和 280 nm 处有最大吸收峰, 考虑到低波长下较多物质均有吸收, 可能干扰目标化合物测定, 且 230 nm 采集的色谱图基线明显高于 280 nm 采集的色谱图基线(见图 1), 故选择 280 nm 为检测波长。

C₁₈ 色谱柱是实验室最常见的色谱柱, 适用于中性、极性、酸性和碱性以及螯合化合物的分离。爱德万甜是中等极性物质。因此本实验选择最常用的 Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱分离目标化合物。

考察了甲醇-水和甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵两种流动相体系, 结果发现, 爱德万甜在甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵流动相体系中峰形尖锐且对称, 无拖尾现象, 因此实验采用该流动相体系。实验进一步考察了不同体积比(80:20、70:30、60:40、50:50、40:60)的甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵流动相对分离结果的影响。结果发现, 目标化合物的保留时间随着有机相比例的减少而增大, 且变化显著, 响应值随着有机相的减少而变小。当流动相比例为 60:40 时, 目标化合物保留时间在 10 min 内, 流动相比例为 50:50 时, 保留时间在 15 min 左右, 而当比例

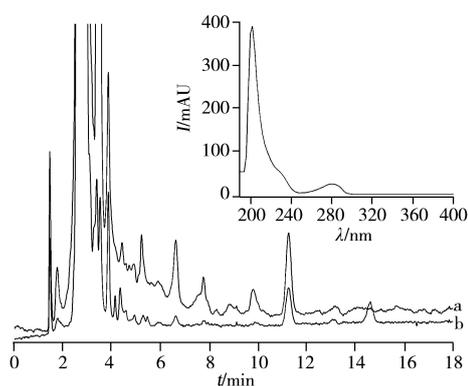


图 1 加标样品(1.0 mg/mL)的色谱图和爱德万甜(100.0 mg/L)的光谱图
Fig. 1 Chromatograms of spiked sample(1.0 mg/mL) at different wavelengths and spectrum of advantame(100.0 mg/L)
a. 230 nm; b. 280 nm

为 40 : 60 时, 则保留时间在 20 min 以后, 已不适合食品的批量分析; 而目标化合物的保留时间在 10 min 内可能会受到其他物质干扰。因此实验选择体积比为 50 : 50 的甲醇 - 0.02 mol/L 乙酸铵并进行比例微调(50 : 50、51 : 49、52 : 48、53 : 47、54 : 46), 对色谱图进行比较后, 最终确定流动相甲醇 - 0.02 mol/L 乙酸铵的最佳比例为 53 : 47。

考察了柱温(25、30、35、40 °C)对目标化合物分离的影响(图 2)。结果表明: 目标化合物的响应值随柱温的升高而增强, 保留时间则减小。由于色谱柱一般在 40 °C 以下工作能够达到最佳使用寿命, 同时兼顾最佳响应值, 选择柱温为 35 °C。

最终确定采用 Agilent TC - C₁₈(2)(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱在柱温为 35 °C 时, 以甲醇 - 0.02 mol/L 乙酸铵(53 : 47)为流动相, 对爱德万甜进行分离测试。

2.2 前处理方法的优化

爱德万甜标准品不溶于水, 需加入适当比例的甲醇溶液才会溶解, 所以提取样品溶液必须采用一定比例的甲醇 - 水溶液。考察了体积比为 30 : 70、40 : 60、50 : 50、60 : 40 的甲醇 - 水溶液作为提取剂的效果, 结果发现随着提取液中甲醇比例的提高, 提取率相应升高, 但差距甚微, 采用体积比为 30 : 70 和 40 : 60 的甲醇 - 水提取样品时提取液较浑浊, 可能是因为低比例甲醇沉淀蛋白质的效果不佳, 而采用高比例(60 : 40)甲醇 - 水提取样品时, 可能会提取更多的干扰物。综合考虑提取率和蛋白质沉淀效果, 最终采用体积比为 50 : 50 甲醇 - 水溶液提取样品。

2.3 方法的检出限、定量下限与线性范围

将分别按“1.3”实验方法处理的饮料、酸奶和蛋糕空白样品溶液稀释爱德万甜标准储备溶液至 1.0 mg/L, 采用优化的色谱条件测定, 以信噪比 $S/N \geq 3$ 计算得检出限分别为 0.6、1.5、9.0 mg/kg, 以 $S/N \geq 10$ 计算定量下限分别为 2.0、5.0、30.0 mg/kg。配制质量浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 mg/L 的爱德万甜标准溶液, 采用高效液相色谱分析, 以质量浓度 (x , mg/L) 为横坐标, 峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明: 爱德万甜在 1.0 ~ 200.0 mg/L 质量浓度范围内呈良好的线性, 回归方程为 $y = 3.9x - 5.7$, 相关系数 (r) 为 0.999 8。

2.4 方法的回收率与精密度

分别取饮料、酸奶和蛋糕的空白样品进行加标回收实验, 添加低、中、高 3 个浓度水平的爱德万甜标准溶液, 每个浓度平行实验 5 次, 根据测定结果计算回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明, 不同加标浓度下爱德万甜的回收率为 90.9% ~ 103.4%, RSD 为 1.1% ~ 4.5% (见表 1), 说明方法具有较高的准确度和精密度, 可满足实验要求^[9]。

表 1 爱德万甜的回收率与相对标准偏差($n=5$)

Table 1 Recoveries and relative standard deviations of advantame($n=5$)

Sample	Spiked(mg/kg)	Found(mg/kg)	Recovery(%)	RSD(%)
Beverage	2.0, 4.0, 20.0	1.970, 3.989, 19.78	98.5, 99.7, 98.9	2.3, 1.1, 3.6
Yoghourt	5.0, 10.0, 50.0	4.732, 9.689, 46.92	94.6, 96.9, 93.8	2.2, 1.2, 1.3
Cake	30.0, 60.0, 300.0	30.06, 62.06, 272.6	100.2, 103.4, 90.9	2.1, 4.5, 1.9

同时选取低、中、高浓度的加标溶液进行精密度连续测试实验, 每个浓度重复测定 5 次, 同时选取一浓度的加标溶液进行日内精密度测试, 测定 7 次, 进行日间精密度测试, 连续测定 5 d。结果表明, 连续测定峰面积的精密度(RSD, $n=5$)为 0.5% ~ 2.4%, 日内 RSD($n=7$)为 0.9%, 日间 RSD($n=5$)为 0.6%, 定量重复性 $\leq 3.0\%$; 保留时间的连续精密度(RSD, $n=5$)为 0.1% ~ 0.2%, 日内

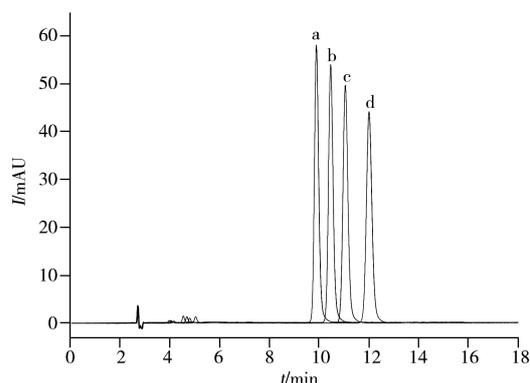


图 2 爱德万甜在不同柱温下的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of advantame at different column temperatures
a. 40 °C; b. 35 °C; c. 30 °C; d. 25 °C

RSD($n=7$)为0.7%，日间RSD($n=5$)为0.9%，定性重复性 $\leq 1.0\%$ ，表明仪器具有良好精密度，满足实验要求^[10]。

2.5 干扰实验

GB2760-2014《食品添加剂使用标准》允许部分食品添加剂可用于饮料、发酵乳和糕点的生产加工，因此本文考察了质量浓度均为20.0 mg/L的苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、新红、赤藓红、亮蓝、靛蓝15种食品添加剂对爱德万甜(2.0 mg/L)测定的影响。结果发现，使用本方法测定爱德万甜，以上15种物质均不干扰测定(图3)。

2.6 实际样品的测定

采用本方法对市售的12个饮料样品、7个发酵乳样品和6个糕点样品进行测定，结果表明，25个样品均未检出爱德万甜(饮料 < 0.6 mg/kg、发酵乳 < 1.5 mg/kg，糕点 < 9.0 mg/kg)，未发现超范围、超限量添加爱德万甜的情况。

3 结论

本文采用甲醇-水(50:50)超声提取样品，以甲醇-0.02 mol/L乙酸铵(53:47)为流动相，Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱分离爱德万甜，二极管阵列检测器检测，外标法定量。实际样品测定和干扰实验结果显示，目标化合物保留时间处无干扰。方法学验证参数均符合GB/T27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求。该方法具有良好的准确度、精密度且操作简单。

参考文献:

- [1] No. 8 Proclamation of National Health and Family Planning Commission in 2017. A Proclamation on Expanding Consumption and Range of Application of 6 New Varieties of Food Additives, such as Advantame and 6 Kinds of Food Additives, such as Sodium Cyclamate(国家卫生计生委2017年第8号公告. 关于爱德万甜等6种食品添加剂新品种、食品添加剂环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)等6种食品添加剂扩大用量和使用范围的公告. 国家卫生计生委第8号公告).
- [2] Lohner S, Toews I, Meerpohl J J. *Nutri J.*, **2017**, 16: 55.
- [3] Bao Y, Shi J E, Liu B, Wang Q F, Li N, Liu Y. *J. Instrum. Anal.* (包懿, 石金娥, 刘斌, 王庆峰, 李宁, 刘洋. 分析测试学报), **2017**, 36(5): 674-678.
- [4] Tan J L, Feng L, Feng J M, Niu Z R, Wang J X, Wang S B, Wang Y Q, Zhang X H. *J. Food Saf. Qual.* (谭建林, 冯雷, 俸金梅, 牛之瑞, 王吉祥, 王世波, 王亚琴, 张晓红. 食品安全质量检测学报), **2016**, 7(10): 4101-4105.
- [5] Yang Y Y, Ying G G, Zhao J L, Liu Y S, Liu W R. *J. Instrum. Anal.* (杨愿愿, 应光国, 赵建亮, 刘有胜, 柳王荣. 分析测试学报), **2017**, 36(7): 876-881.
- [6] Guan Y Y, Qiu Z C, Song Y, Jin M, Lin H D, Chen Y F, Xie Y S, Zhong Y. *Chin. Dairy Ind.* (官咏仪, 邱志超, 宋阳, 金梦, 林海丹, 陈毓芳, 谢玉珊, 钟钰. 中国乳品工业), **2016**, 44(12): 45-47.
- [7] Niu Z R, Wang X J, Yu Y T, Feng L, Yang F, Tan J L, Yan L. *Food Sci.* (牛之瑞, 王秀君, 于毅涛, 冯雷, 杨凡, 谭健林, 晏龙. 食品科学), **2016**, 37(2): 178-181.
- [8] Li X C, Lin Y. *Phys. Test. Chem. Anal.: Chem. Anal.* (李雪春, 林野. 理化检验: 化学分册), **2017**, 52(2): 230-232.
- [9] GB/T27404-2008. Criterion on Quality Control of Laboratories - Chemical Testing of Food. Standards of the People's Republic of China(实验室质量控制规范 食品理化检测. 中华人民共和国国家标准).
- [10] JJG 705-2014. Liquid Chromatography. Regulation of Metrological Verification of the People's Republic of China(液相色谱. 中华人民共和国国家计量检定规程).

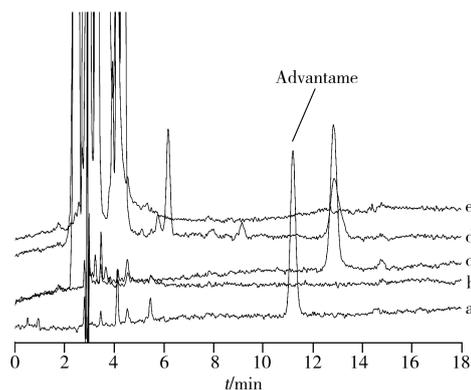


图3 干扰实验色谱图

Fig. 3 Chromatograms of interference tests
 a. advantame(2.0 mg/L); b. sodium cyclamate and aspartame (20.0 mg/L); c. new red, erythrosine and indigo(20.0 mg/L); d. lemon yellow, sunset, amaranth, carmine and light blue (20.0 mg/L); e. acesulfame K, soluble saccharin, benzoic acid, sorbic acid and dehydroacetic acid(20.0 mg/L)