

高效毛细管电泳法测定食品中 5 种甜味剂含量

薛洪宝¹, 张 晖^{*1}, 梁丽丽¹, 杨俊松¹, 申 林², 陶兆林¹

(1. 蚌埠医学院 化学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 2. 蚌埠医学院 科研中心, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 采用高效毛细管电泳-紫外可见检测法同时测定食品中 5 种人工合成甜味剂纽甜、阿斯巴甜、甜蜜素、糖精钠、安赛蜜的含量。内壁未涂层熔融石英毛细管(50 μm ×75 cm, 有效长度 60 cm), 毛细管温度为 25 $^{\circ}\text{C}$; 缓冲液为 0.2 mol/L 硼酸盐(pH=8.29), 分离电压+23 kV, 进样压力 3.45 kPa, 进样时间 3.0 s, UV-Vis 检测器检测波长 200 nm。结果显示: 5 种甜味剂线性回归方程相关系数 r 在 0.999 21~0.999 89 之间, 定量限在 2.2~552.6 mg/L 之间, 样品加标回收率在 96.29%~102.31% 范围内, 相对标准偏差在 3.81%~6.40% 范围内。表明该方法简便、灵敏、快速、可靠、重现性好, 能用于食品中 5 种甜味剂的同时测定。

关键词: 高效毛细管电泳; 合成甜味剂; 定量分析

中图分类号: R 155.5 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)03—0315—05

Simultaneous Determination of 5 Sweeteners in Food by HPCE

XUE Hongbao¹, ZHANG Hui^{*1}, LIANG Lili¹, YANG Junsong¹, SHEN Lin², TAO Zhaolin¹

(1. Teaching and Research Section of Chemistry, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 2. Scientific Research Center, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract: The method of simultaneous determination of five kinds of artificial sweetener neotame, aspartame, sodium cyclamate, sodium saccharin, acesulfame content was established by HPCE with UV-Vis detector in this manuscript. The fused silica capillary with uncoated inner wall (50 μm ×75 cm, effective length 60 cm) was used, and the capillary was kept at 25 $^{\circ}\text{C}$. 0.2 mol/L borate (pH=8.29) was adopted as electrophoresis buffer at +23 kV separation voltage. The sample was injected under 3.45 kPa pressure for 3.0 seconds, and detection wavelength being set at 200 nm. The linear regression equation correlation coefficient r for five kinds of sweeteners was between 0.999 21 and 0.999 89. The detection limit of five kinds of sweeteners was in the range of 2.2~552.6 mg/L. The spiked recoveries were within the range from 96.29% to 102.31%, and the relative standard deviation was kept between 3.81% and 6.40%. Conclusion The method is simple, sensitive, rapid, reliable and well reproducible, it can be used for the determination of five sweeteners in food simultaneously.

Keywords: high performance capillary electrophoresis (HPCE), artificial sweeteners, quantitative analysis

收稿日期: 2013-05-22

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1308085QB24); 安徽省高校省级优秀青年人才基金重点项目(2013SQRL051ZD); 安徽省生化药物工程技术研究中心开放课题(BYEC1202, BYEC1301)。

作者简介: 薛洪宝(1979—), 男, 河北秦皇岛人, 讲师, 主要从事生物分析技术研究。E-mail: hongbaoxueqhd@126.com

* 通信作者: 张 晖(1966—), 男, 安徽蚌埠人, 讲师, 主要从事色谱分析研究。E-mail: zhanghuicysu688@163.com

随着全球食品工业的日益发展,消费者对食品安全提出的要求越来越高,但近些年国内外食品安全恶性事件屡有发生,对人类健康威胁严重,食品安全问题已经成为当今世界关注的热点之一^[1]。高效毛细管电泳(HPCE)拥有色谱和电泳技术的共同优点,具有诸多高效分离模式,可以在很大程度上满足基体复杂的食品分析要求^[2]。因此,HPCE在食品分析方面的应用日趋广泛。

纽甜、阿斯巴甜、甜蜜素、糖精钠、安赛蜜等人工合成甜味剂由于甜度高、用量少,具有高效、经济等优点,常用以代替蔗糖添加到食品中^[3];此类食品添加剂具有热值小,多不参与代谢,口味好,尤其博得肥胖、糖尿病、高血压、龋齿等患者的青睐^[4]。为了改善食品口味、风味等,生产商往往在一种食品中同时添加多种甜味剂。但每种甜味剂都有一定的使用范围和添加限量,如果过量使用会影响身体健康^[5-6],长期摄入可能造成机体损伤^[7]。目前,检测食品中甜味剂的常用方法有:高效液相色谱法、高效离子色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、流动注射分析法、电化学法、光谱分析法等^[8-9],上述方法往往存在样品前处理过程复杂、分析时间长、准确度偏低等缺点。为了准确、快速地检测食品中的甜味剂,做到有效合理利用人工合成甜味剂,以确保食品安全和人类健康,作者对样品的前处理和上述甜味剂测定进行了深入研究,建立了检测5种甜味剂的HPCE法,旨在为HPCE同时检测食品中多种甜味剂提供一定的参考依据。该方法样品前处理简单、操作简易、分离效率高、分析速度快、线性关系好、线性范围宽、重现性好,定量测定5种食品中的上述甜味剂含量,结果令人满意。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 P/ACE™ MDQ 毛细管电泳系统(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA),紫外-可见吸收检测器,内壁未涂层熔融石英毛细管(50 μm×75 cm,有效长度60 cm),32Karat 电泳分析软件,均由河北永年锐沣色谱器件有限公司提供;FA/JA 系列精密电子天平(精度:0.000 1 g),天津天马衡仪器有限公司制造;KQ-100DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司制造;800 型电动离心机,金坛市杰瑞尔电器有限公司制造;DZF-6050B 型真空干燥

箱,上海齐欣科技仪器有限公司制造;0.22 μm 水相混合纤维素酯膜,上海半岛实业有限公司净化器材厂制造。

1.1.2 试剂 纽甜、阿斯巴甜、甜蜜素、糖精钠、安赛蜜标准样品(纯度>99%),美国 Sigma 公司产品;乙腈(色谱纯),江苏汉邦科技有限公司产品;浓 HCl(分析纯),蚌埠市生原精细化工有限责任公司产品;三氯乙酸(分析纯),济南市荣盛化工有限公司产品;无水乙醇(分析纯),安徽安特食品股份有限公司产品;二次蒸馏水,“好吃点”、“西梅”、“亲嘴烧”、素牛味棒、草莓味酸奶,均购买于本地超市。

1.2 混合标准溶液的配制

将标准样品经 100 ℃减压烘干 4 h 至恒质量后,分别准确称取纽甜 5.5 mg、阿斯巴甜 5.1 mg、甜蜜素 12.7 mg、糖精钠 9.0 mg、安赛蜜 40.3 mg 于 10 mL 容量瓶中,加适量二次蒸馏水完全溶解后再定容至刻度,混匀,得 5 种样品的原标准混合溶液。取上述原标准溶液分别稀释 5 倍、10 倍、20 倍、40 倍、60 倍,即得不同质量浓度系列的 5 种混合标准溶液;采用上述方法分别配制 5 种甜味剂的单一标准溶液,备用待分析。

1.3 样品处理

分别将固体食品“好吃点”、西梅、“亲嘴烧”、素牛味棒等食品粉碎,称取适量(准确至 0.000 1 g),分别置于 25 mL 的比色管中,加 1 mL 无水乙醇,再加 15 mL 二次蒸馏水,超声振荡 1 h,静置 24 h,再超声振荡 1 h,加水至刻度,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤,得滤液;取一定量的液体食品酸奶,采用 3 mL 100 g/L 的三氯乙酸除蛋白质^[10-11],过滤,得滤液。待分析。

1.4 实验方法

1.4.1 电泳条件 电泳毛细管:熔融石英毛细管 75 cm(60 cm 处检测窗口)×50 μm;缓冲液:0.2 mol/L 硼酸盐(pH=8.29);分离电压+23 kV,进样压力 3.45 kPa,进样时间 3.0 s,分离温度 25 ℃,UV-Vis 检测器检测波长 200 nm。每次电泳分析之前要依次运行如下冲洗程序:0.1 mol/L NaOH 溶液冲洗 1 min,0.1 mol/L HCl 溶液冲洗 1 min,二次蒸馏水冲洗 1 min,缓冲溶液冲洗 2 min。

1.4.2 标准曲线绘制及样品测定 分别取按 1.2 法配制的不同质量浓度系列的标准溶液,在上述选定电泳分离条件下进样测定分析,以峰面积(y)对相

应的质量浓度(x)进行线性回归,作出标准曲线。实际样品经预处理后,按同样电泳条件进行分析。按标准曲线计算样品中各甜味剂含量。

1.5 数据处理

试验所得数据采用 Origin 8.0 软件处理、统计、分析、作图。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的优化

通过以下实验确定最佳电泳条件为:电泳缓冲溶液:0.2 mol/L 硼酸盐(pH=8.29);分离电压+23 kV,UV-Vis 检测器检测波长 200 nm。文中未特别指明之处皆为此实验条件。实验步骤具体分析如下。

2.1.1 缓冲溶液 pH 值的选择 以电渗流(EOF)为驱动力的毛细管电泳法,其 EOF 对缓冲溶液的 pH 值十分敏感。因缓冲溶液 pH 值影响毛细管表面的 ζ 电势,进而影响 EOF 方向及大小;pH 值也影响样品中各组分分子表面电荷数量,从而影响组分迁移速度及分离效果;pH 值改变影响组分电离程度,影响其与管壁表面作用,影响组分的迁移速度,最终影响分离度^[12]。因此,pH 值对分离效果影响较大。本实验中考察了硼酸盐缓冲溶液 pH 值在 7.34~10.00 之间对组分迁移时间的影响,见图 1。结果表明:当缓冲溶液 pH=8.29 时,分离效果最佳。

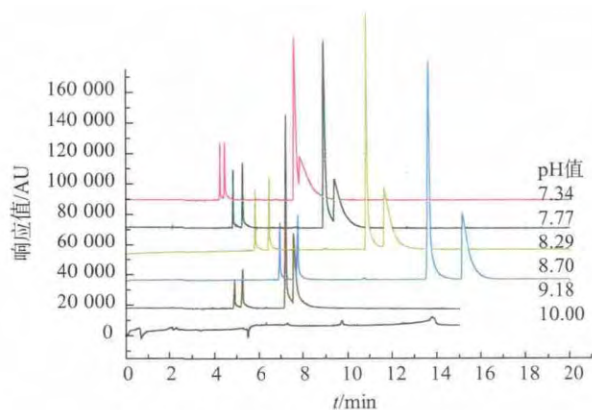


图 1 不同缓冲液 pH 值下 5 种甜味剂电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms of 5 kinds of artificial sweeteners at different pH values of buffer

2.1.2 分离电压的选择 在高效毛细管电泳中,分离电压是分离的动力,对分离度有较大影响。分离电压决定电场强度,而电场强度影响 EOF 大小及带电粒子迁移速率,从而决定组分迁移时间。本实验在+14~+29 kV 范围内考察了分离电压对各组分迁

移时间的影响,见图 2。可知:分离电压越高,组分的迁移时间越短。当分离电压为+23 kV 时,各组分均达到基线分离,且保留时间较短;当分离电压超过+23 kV 时,虽各组分出峰时间较短,但分离度降低;当分离电压低于+23 kV 时,分离度改变不明显,但由于电压较低造成的组分峰拖尾现象严重,不利于样品的精确定量分析。故选择+23 kV 作为分离电压。

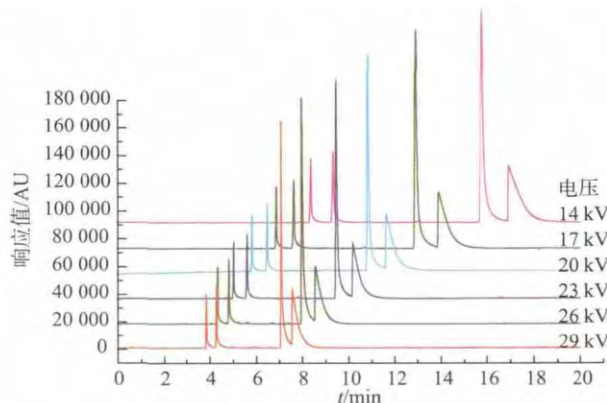


图 2 不同电压下 5 种甜味剂电泳图

Fig. 2 Electrophoretograms of 5 kinds of artificial sweeteners in different voltages

2.1.3 检测波长的选择 采用紫外-可见吸收检测器分别对 200、214、254、280 nm 等 4 个检测波长进行考察,得电泳图。由图 3 知:254 nm 和 280 nm 时,各组分吸收值均较低,不宜作为最佳检测波长;214 nm 时,虽安赛蜜对应电泳峰较高,但纽甜、阿斯巴甜、甜蜜素、糖精钠 4 组分电泳峰较低,不够灵敏,亦不宜作为最佳检测波长。甜蜜素由于本身无共轭结构,上述波长下紫外吸收均较弱,灵敏度较低。综合考虑,选择 200 nm 作为最佳检测波长。

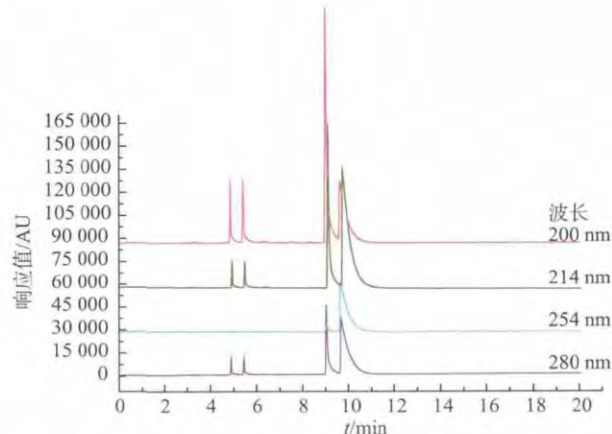


图 3 不同波长下 5 种甜味剂电泳图

Fig. 3 Electrophoretograms of 5 kinds of artificial sweeteners at different wavelengths

2.2 5种甜味剂的定性分析

分别取 1.2 中 5 种标准样品单一溶液和其混合溶液,在最佳电泳条件下测定,得电泳图。从图 4 可

以看出,此 5 种甜味剂在 11 min 内能有效分离。出峰顺序依次为:纽甜、阿斯巴甜、甜蜜素、糖精钠、安赛蜜。

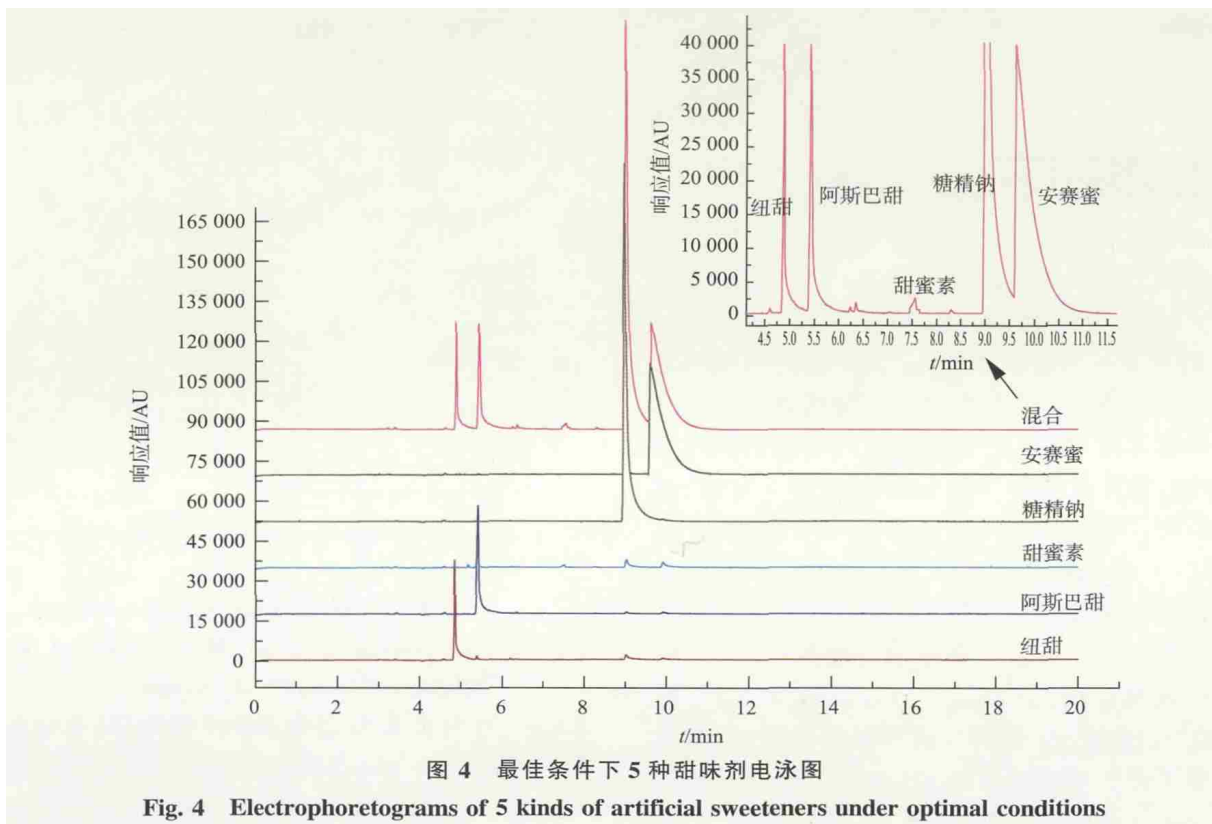


图 4 最佳条件下 5 种甜味剂电泳图
Fig. 4 Electrophoretograms of 5 kinds of artificial sweeteners under optimal conditions

2.3 定量分析方法的建立

2.3.1 线性范围、检出限和定量限 根据各组分的峰面积(y)对相应的质量浓度(x)的线性回归标准曲线,得出回归方程、相关系数及线性范围;以各组分的信噪比 S/N=3 时相应质量浓度确定为最低检出

限(LOD);以各组分的信噪比 S/N=10 时相应质量浓度确定为最低定量限(LOQ),所得定量分析参数见表 1。结果表明:5 种组分在较宽范围内有良好的线性关系,能够满足定量分析的要求。

表 1 定量分析参数 (LOD, S/N=3)

Table 1 Parameters of HPLC quantitative analysis (LOD, S/N=3)

检测物	线性回归方程	r	线性范围/(mg/L)	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
A	$y = (-2\ 120.161\ 33 \pm 2\ 099.079\ 27) + (936.832\ 40 \pm 9.838\ 25) \times x$	0.999 67	10.7~550.0	3.2	10.7
B	$y = (-4\ 873.022\ 62 \pm 1\ 727.310\ 79) + (1\ 473.089\ 34 \pm 8.730\ 76) \times x$	0.999 89	6.8~510.0	2.0	6.8
C	$y = (-114.400\ 75 \pm 144.994\ 58) + (18.169\ 91 \pm 0.294\ 31) \times x$	0.999 21	552.6~1 270.0	165.8	552.6
D	$y = (-2\ 2488.303\ 54 \pm 15\ 709.762\ 98) + (4\ 669.846\ 01 \pm 44.996\ 52) \times x$	0.999 72	2.2~900.0	0.6	2.2
E	$y = (-36\ 641.107\ 85 \pm 16\ 754.836\ 90) + (856.090\ 77 \pm 10.717\ 34) \times x$	0.999 53	11.7~4 030.0	3.5	11.7

注:A. 纽甜, B. 阿斯巴甜, C. 甜蜜素, D. 糖精钠, E. 安赛蜜; 以下各表同。

2.3.2 重复性实验 采用 1.2 原混合标准溶液进行重复实验 5 次, 求出相应电泳峰面积及均值, 计算出相对标准偏差(RSD), 所得结果见表 2。可知: 5 种甜味剂的 RSD 在 3.81%~6.40% 之间, 精密度符合方法学要求, 能够用于食品中上述甜味剂的定量分析。

2.3.3 加标回收率 准确称量一定质量的西梅, 按照 1.3 样品处理方法处理, 然后在测定线性范围内加入适量的 5 种甜味剂标准物质进样检测。连续分析 5 次, 5 种标准物质加标回收率测定结果见表 3。结果表明: 5 种甜味剂的加标回收率在 96.29%~

102.31%,回收率适中,可用于食品中甜味剂的检测。

表 2 重复性实验结果 (n=5)

Table 2 Results of repeated experiment (n=5)

检测物	1	2	3	4	5	均值	标准偏差	RSD/%
A	5 481 55.0	581 087.0	609 308.0	618 417.0	649 651.0	601 323.6	38 496.4	6.40
B	783 655.0	828 282.0	854 801.0	867 357.0	852 731.0	837 365.2	33 192.3	3.96
C	23 830.0	25 373.0	21 142.0	22 978.0	23 240.0	23 312.6	1 528.2	6.56
D	4 022 350.0	4 414 620.0	4 478 100.0	4 601 230.0	4 585 780.0	4 420 420.0	235 508.2	5.33
E	3 492 960.0	3 728 100.0	3 765 380.0	3 821 020.0	3 852 860.0	3 732 060.0	142 127.8	3.81

表 3 加标回收率结果 (n=5)

Table 3 Results of spiked recoveries (n=5)

检测物	加标样 1	加标样 2	加标样 3	加标样 4	加标样 5	加标均值	标样	西梅	回收率/%
A	254 368.0	245 639.0	341 766.0	338 393.0	329 649.0	301 963.0	609 308.0	10 903.0	97.33
B	446 390.0	395 803.0	440 920.0	428 797.0	406 714.0	423 724.8	854 801.0	0.0	99.14
C	25 552.0	23 242.0	22 159.0	19 795.0	22 224.0	22 594.4	21 142.0	23 689.0	101.69
D	2 461 135.0	2 264 981.0	2 425 971.0	2 349 983.0	2 254 286.0	2 351 271.2	4 478 097.0	120 882.0	102.31
E	1 753 644.0	2 143 928.0	1 886 657.0	1 730 998.0	2 148 568.0	1 932 759.0	3 765 380.0	239 895.0	96.29

2.4 5种样品中甜味剂含量的测定

分别对 1.3 所得 5 种样品溶液中的甜味剂进行定量分析检测,每种样品平行测定 6 次,所得电泳图见图 5。根据所测峰面积及线性回归方程计算样品中甜味剂含量,其结果见表 4。

3 结论

建立了同时测定食品中 5 种甜味剂的高效毛细管电泳法,该方法样品前处理简单、灵敏度高、准确可靠、精密度高,所得定量分析参数均能满足测定要求。通过实验分析,5 种甜味剂的加标回收率为 96.29%~102.31%,相对标准偏差为 3.81%~6.40%,表明此方法能够满足食品中多种甜味剂的同时检

测,操作简捷易行。

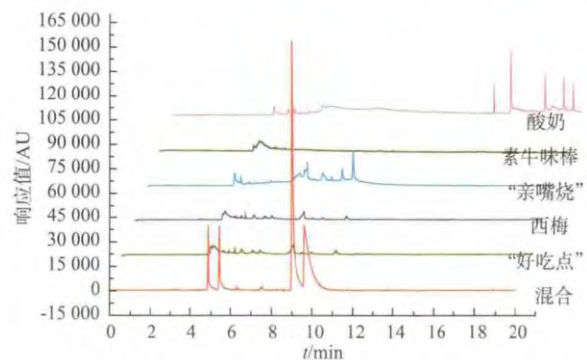


图 5 5 种甜味剂加标回收率电泳图

Fig. 5 Electrophoretograms of 5 kinds of artificial sweeteners for spiked recoveries

表 4 5 种食品中甜味剂测定结果 (n=6)

Table 4 Determination results of sweeteners in 5 samples (n=6)

检测物	A			B			C			D			E		
	峰面积	质量浓度/(mg/L)	质量分数/(mg/g)	峰面积	质量浓度/(mg/L)	质量分数/(mg/g)	峰面积	质量浓度/(mg/L)	质量分数/(mg/g)	峰面积	质量浓度/(mg/L)	质量分数/(mg/g)	峰面积	质量浓度/(mg/L)	质量分数/(mg/g)
“好吃点”	323 498.0	347.6	1.6	8 328.0	9.0	0.1	0.0	Nd	Nd	15 162.0	8.1	0.1	0.0	Nd	Nd
西梅	10 903.0	13.9	0.1	0.0	Nd	Nd	23 689.0	1 310.0	5.3	120 882.0	30.7	0.1	239 895.0	323.0	1.3
“亲嘴烧”	20 846.0	24.5	0.2	63 651.0	46.5	0.3	21 854.0	1 209.1	8.2	60 328.0	17.7	0.1	14 086.0	59.3	0.4
素牛味棒	15 662.0	19.0	0.1	69 393.0	50.4	0.3	28 387.0	1 568.6	9.1	74 960.0	20.9	0.1	14 456.0	59.7	0.3
草莓味酸奶	155 481.0	168.2	0.2	53 281.0	39.5	0.1	0.0	Nd	Nd	0.0	Nd	Nd	62 813.0	116.2	0.1

注:Nd 表示未检出。

参考文献:

- [1] 董亚蕾,陈晓皎,胡敬,等. 高效毛细管电泳在食品安全检测中的应用进展[J]. 色谱, 2012, 30(11):1117-1126.
DONG Yalei, CHEN Xiaojiao, HU Jing, et al. Recent advances in the application of high performance capillary electrophoresis for food safety[J]. **Chinese Journal of Chromatography**, 2012, 30(11):1117-1126.(in Chinese)
- [2] 高文惠,杨桂君. 毛细管电泳法测定食品中 8 种添加剂[J]. 食品科学, 2010, 31(18):377-380.
GAO Wenhui, YANG Guijun. Determination of eight food additives in different matrices by capillary electrophoresis [J]. **Food Science**, 2010, 31(18):377-380.(in Chinese)
- [3] 郑鹏然,周树南. 食品卫生全书[M]. 北京:红旗出版社, 1996:642-643.
- [4] 高文惠,裴红,杨桂君. 毛细管电泳在食品添加剂检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3):326-330.
GAO Wenhui, PEI Hong, YANG Guijun. The application of capillary electrophoresis in food additive detection [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3):326-330.(in Chinese)
- [5] Galletti Guido C, Bocchini Paola. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection of aspartame with a post-column photochemical reactor[J]. **Journal of Chromatography A**, 1996, 729(1/2):393-398.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准/食品添加剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2011.
- [7] 蒋晓彤,陈国松,姜玲玲,等. 高效液相色谱法同时检测 6 种甜味剂[J]. 食品科学, 2011, 32(6):165-168.
JIANG Xiaotong, CHEN Guosong, JIANG Lingling, et al. Simultaneous HPLC determination of 6 sweeteners [J]. **Food Science**, 2011, 32(6):165-168.(in Chinese)
- [8] 杨大进. 食品中甜味剂和合成防腐剂的检测方法及其保健食品限量标准的研究[D]. 长沙:湖南师范大学, 2009.
YANG Dajin. Study on analytical methods of sweeteners and synthetic preservatives in foods and limits standard in health foods [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2009.(in Chinese)
- [9] 鲁琳,杭义萍,高燕红,等. 食品甜味剂分类及其检测技术现状[J]. 现代预防医学, 2009, 36(11):2033-2035.
LU Lin, HANG Yiping, GAO Yanhong, et al. Classification of food sweeteners and the status quo of its detection technology[J]. **Modern Preventive Medicine**, 2009, 36(11):2033-2035.(in Chinese)
- [10] 丁晓静,杨媛媛,李芸,等. 原料奶、婴儿配方奶粉及酸奶中蛋白质去除效果的研究[J]. 分析化学, 2010, 38(1):77-81.
DING Xiaojing, YANG Yuanyuan, LI Yun, et al. Investigation of removal of proteins in raw milk, infant formula and yogurt[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2010, 38(1):77-81.(in Chinese)
- [11] 龚强,丁利,朱绍华,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测乳制品中 10 种氨基糖苷类抗生素残留 [J]. 色谱, 2012, 30(11):1143-1147.
GONG Qiang, DING Li, ZHU Shaohua, et al. Determination of ten aminoglycoside residues in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **Chinese Journal of Chromatography**, 2012, 30(11):1143-1147.(in Chinese)
- [12] XUE Hongbao, JIAO Yanna, LI Hui. Capillary electrophoresis separation of the six pairs of chiral pharmaceuticals enantiomers [J]. **Asian Journal of Chemistry**, 2013, 25(5):2742-2746.