

超高效液相色谱法快速测定饮料中的阿斯巴甜

LC-082

摘要：本文使用岛津 LC-30A 液相色谱仪，建立了饮料中阿斯巴甜含量测定的方法。本方法采用 C₁₈ 色谱柱，水/甲醇 = 65/35(v/v) 为流动相，紫外检测器的检测波长为 208 nm。阿斯巴甜在 0.4–250 µg/mL 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数为 0.9999。对阿斯巴甜浓度为 10 µg/mL、50 µg/mL、250 µg/mL 的六个平行标准品进行分析，重复性结果 (RSD% 表示)：阿斯巴甜在三个不同浓度下的保留时间 RSD 范围为 0.0163%–0.0770%，峰面积 RSD 范围为 0.0845%–0.578%，仪器精密度良好。阿斯巴甜方法检出限为 0.072 µg/mL，定量限为 0.29 µg/mL。实际样品添加低中高不同浓度，回收率为 89.10%–116.9%，结果表明方法准确可靠。

关键词：饮料 阿斯巴甜 超高效液相色谱 紫外检测

在人们日常所食用的食品中，甜味剂是常用食品添加剂之一。阿斯巴甜 (Aspartame) 又名甜味素、天冬甜母、天冬甜精，化学名称为天门冬酰苯丙氨酸甲酯 (分子式为 C₁₄H₁₈N₂O₅，相对分子质量为 294.31)。于 1965 年由美国 Searle 公司在合成四肽的研究时偶然发现，其甜味特征几乎与蔗糖相同，甜度是蔗糖的 200 倍，甜味纯正。目前已有 80 个国家批准使用，我国规定除罐头食品外可用于各类食品，其用量按生产需要适量使用。20 世纪 80 年代以来，全球阿斯巴甜的年消费增长率超过 20%，远远超过其他人工合成甜味剂平均增长率 5% 的速度。但是目前国际上对阿斯巴甜的安全性存在很大的争议，2005 年 7 月，意大利科学家公布的一份研究结果称，动物实验证明，阿斯巴甜可导致大鼠肿瘤。因此严格控制食品中阿斯巴甜的含量并要对其进行检测是很有必要的。

本文结合国家标准 GB/T 22254–2008《食品中阿斯巴甜的测定》，采用纯水超声提取饮料样品，微孔滤膜过滤后直接进样测定，简化了操作步骤，建立一种超高效液相色谱紫外检测法测定饮料中阿斯巴甜的分析方法，该方法具有简便、快速，适合食品中阿斯巴甜的日常检测。

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂：

甲醇：HPLC 级；水：超纯水

阿斯巴甜储备液：精密称取阿斯巴甜 10.0 mg，置于 10 mL 容量瓶中，超纯水 (用甲醇调节 pH 6.3) 稀释至刻度，作为储备液。

1.1.2 仪器：

LC-30A，包括 CBM-20A 系统控制器，LC-30AD 高精度溶液输送泵 × 2，DGU-20A₃ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，SPD-20A 紫外检测器。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack ODS II 3.0 mm I.D. × 100 mmL, 2.2 µm

流动相：A – 水，B – 甲醇，A/B=65/35 (v/v)

流速：0.4 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

柱温：40°C

紫外检测波长：208 nm

进样量：10 µL

1.3 样品处理

1.3.1 阿斯巴甜标准溶液的配制

取不同量的阿斯巴甜储备液，用超纯水稀释，配制成浓度为 0.4、2、10、25、50、125 及 250 µg/mL 的标准系列，储存在棕色小瓶中，于 4°C 冰箱中存放。

1.3.2 试样的制备

浓缩果汁类：称取 0.5 g 试样 (精确到 0.001 g)，用水定容到 25 mL，超声提取 2 min，静置，上清液经 0.45 µm 水系滤膜过滤，滤液直接过滤到液相专用样品瓶中用于 HPLC 分析。

碳酸饮料类：称取 10 g 试样 (精确到 0.01 g)，50 °C 微温除去 CO₂，用纯水定容至 25 mL，超声提取 2 min，静置，上清液经 0.45 µm 水系滤膜过滤，滤液直接过滤到液相专用样品瓶中用于 HPLC 分析。

结果与讨论

2.1 阿斯巴甜标准谱图及标准曲线

阿斯巴甜浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液色谱图如图 1 所示。由图 2 可以看出在 0.4–250 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，线性相关性良好，线性相关系数为 0.9999。

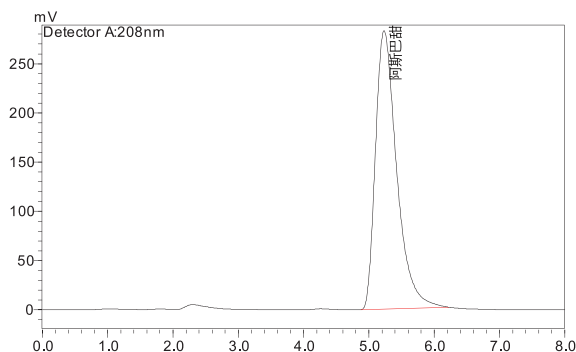


图 1 阿斯巴甜标准溶液 250 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图

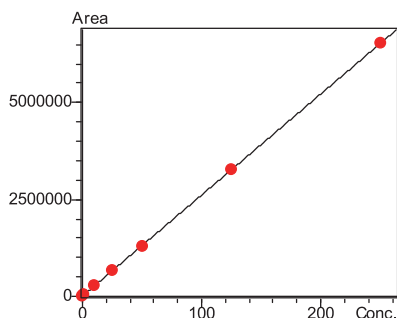


图 2 阿斯巴甜 0.4–250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的校准曲线

$$Y = (26090.0)X + (6787.74) \quad R=0.9999$$

2.2 检出限和定量限

配制阿斯巴甜浓度为 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 的测试样品 7 份，平行进样 7 次，色谱图如图 3 所示。由 7 次进样测定的标准偏差 (S) 计算出检出限和定量下限，此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$ ，定量下限 $LOQ = 4 \times MDL$ 。测定结果如表 1 所示。

表 1 阿斯巴甜的检出限和定量下限

No.	名称	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	标准偏差 (S)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量下限 ($\mu\text{g/mL}$)
1	阿斯巴甜	0.40	0.023	0.072	0.29

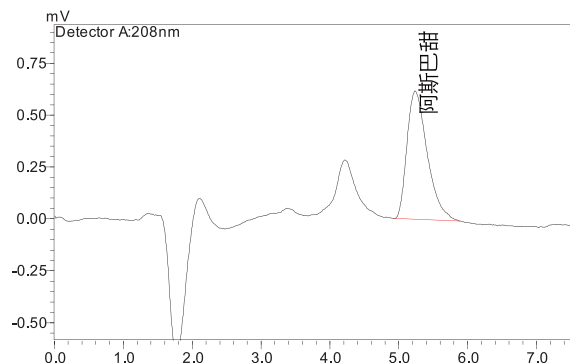


图 3 测试样品 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图

2.3 精密度实验

为了进一步考察该方法的重复性，本文分别对阿斯巴甜浓度为 10、50、250 $\mu\text{g/mL}$ 标准样品进行了 6 次重复实验，重复性结果用 RSD% 表示：阿斯巴甜浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的保留时间 RSD 为 0.0770%，峰面积的 RSD 为 0.578%；50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下的保留时间 RSD 为 0.0377%，峰面积的 RSD 为 0.270%；250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下的保留时间 RSD 为 0.0163%，峰面积的 RSD 为 0.0845%，结果汇总如表 2 所示。

表 2 阿斯巴甜在不同浓度下的保留时间和峰面积的重复性

NO.	10 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$		250 $\mu\text{g/mL}$	
	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
1	281189	5.242	1259115	5.232	6538590	5.232
2	280116	5.232	1252728	5.228	6531208	5.231
3	282353	5.233	1256517	5.230	6535236	5.234
4	280611	5.233	1257487	5.234	6533497	5.233
5	282084	5.233	1262280	5.230	6524701	5.232
6	277884	5.231	1260808	5.231	6525361	5.232
RSD (%)	0.578	0.0770	0.270	0.0377	0.0845	0.0163

2.4 基质加标实验

按照 1.3.2 所述步骤处理饮料，检测 2 种饮料中的阿斯巴甜含量。

图 4 为果汁饮料样品色谱图，可以看出该样品没有检出阿斯巴甜。图 5 为上述空白果汁样品加标 10 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图。2 种饮料添加不同浓度标样计算回收率结果见表 3。

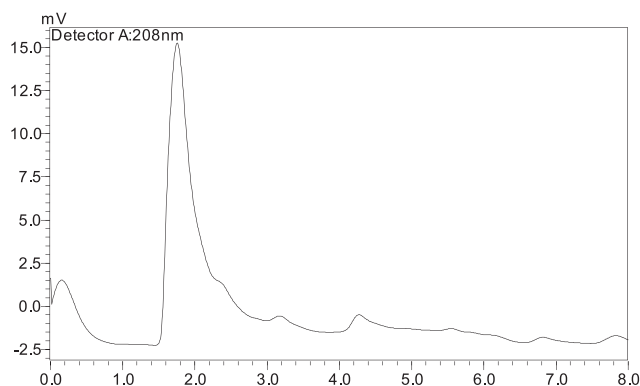


图 4 果汁饮料色谱图

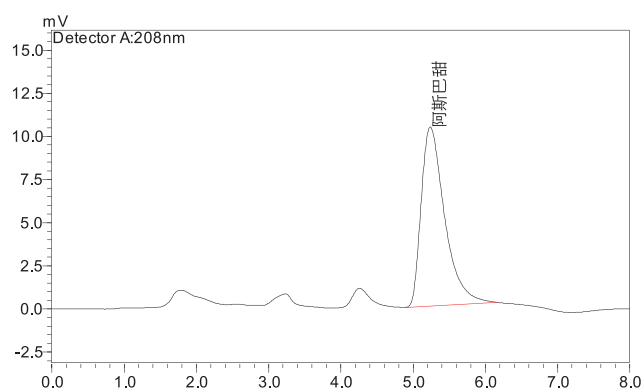


图 5 果汁饮料加标 10 $\mu\text{g/mL}$ 阿斯巴甜的色谱图

表 3 饮料加标不同浓度回收率结果

样品名称	样品编号	检出浓度	回收率 (%) (n=3)		
		$\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
果汁饮料	1	N.D.	106.9	96.90	96.92
	2	N.D.	108.1	97.03	98.17
	3	N.D.	102.1	99.46	97.26
碳酸饮料	1	N.D.	116.9	89.71	100.7
	2	N.D.	113.2	92.01	102.6
	3	N.D.	116.4	89.10	105.8

(N.D.: Not Detected)

讨论

本实验中使用超高效液相色谱仪 (LC-30A)，建立了饮料中阿斯巴甜含量测定的方法。阿斯巴甜在 0.4–250 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数为 0.9999，方法检出限为 0.072 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 0.29 $\mu\text{g/mL}$ 。两种饮料基质加标低中高不同浓度的标准溶液，回收率范围为 89.10%~116.9%。本法具有简便、快速、灵敏度高和重复性好等优点，适合于食品中阿斯巴甜的常规检测。