

# 高效液相色谱法 同时测定饮料中多种添加剂方法研究

林奕芝 刘奋 戴京晶 梁伟 深圳市福田区卫生防疫站 518033

**摘 要** 研究HPLC同时测定饮料中多种添加剂方法的最佳分离条件及最佳波长程序。在流动相甲醇-0.02mol/L乙酸铵(梯度洗脱: 甲醇: 5%, 保持4min; 5%~35%, 10%/min; 35%~70%, 17.5%/min); 流速1.0ml/min;  $C_{18}$ 反相柱, 柱温20℃; 波长程序: 0~5min, 230nm; 5~7.5min, 400nm; 7.5~9.25min, 520nm; 9.25~9.9min, 285nm; 9.9~11min, 630nm条件下, 同时测定饮料中苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、亮蓝、咖啡因。9种组分得以有效分离, 并得到浓度与峰面积成正比的工作曲线, 相关系数 $r>0.9993$  其变异系数 $CV<1.6\%$  ( $n=6$ ), 检出限 $\leq 0.3ng$ , 回收率范围为93.8~109.2% 用本法与国标法分别测定样品15份, 其结果无显著性差异( $P>0.05$ ) 该法具有灵敏、准确、精密、样品处理简单、工作效率高等优点, 多种添加剂的测定可一次完成。

**关键词** 高效液相色谱法 饮料 添加剂

**Abstract** To study the optimum conditions for simultaneous determination of additives in drink, the reversed phase high performance liquid chromatography and the optimum determination wavelength were applied. The Benzoic Acid, Sorbic Acid, Saccharin Sodium, Tartrazine, Amaranth, Ponceau 4R, Sunset Yellow, Brilliant Blue, Caffeine in drink were assayed on  $C_{18}$  reversed-phase column using methanol-0.02mol/L as the mobile phase. The ammonium acetate solution was: methanol: 5%, holding 4min; 5%~35%, 10%/min; 35%~70%, 17.5%/min at a flow rate of 1ml/min and detected by DAD at 0~5min, 230nm; 5~7.5min, 400nm; 7.5~9.25min, 520nm; 9.25~9.9min, 285nm; 9.9~11min, 630nm. Good separation was achieved in the 9 components and the standard curve showing a direct ratio between the concentration and the peak area was obtained, as  $r>0.999$ ,  $CV<1.6\%$  ( $n=6$ ). The detection limits were below 0.3ng. Recovery percent was found between 93.8% and 109.2%. Both the method and GB method as were used to determine 15 samples respectively. For comparison, the results did not show appreciable difference ( $P>0.05$ ). The method proved to be satisfactory in precision, accuracy and sensitivity. The preparation of sample was simple and the work efficiency was high.

**Key words** HPLC Drink Additives

国家标准测定方法中把苯甲酸、山梨酸、糖精钠与着色剂分开检测<sup>[1]</sup>, 对于饮料来说, 烦琐又费时, 工作效率低, 并且亮蓝灵敏度极低。杨元等<sup>[2]</sup>应用HPLC法测定了糖精钠、苯甲酸、山梨酸、柠檬黄、日落黄, 但日落黄与山梨酸分离不完全。仲渝民等<sup>[3]</sup>介绍了非梯度HPLC法测定柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄, 并同时测定了糖精、苯甲酸, 但糖精与柠檬黄分离不完全。本文应用HPLC-DAD的程序可变波长功能, 在同一检测通道, 选择最佳波长程序, 最佳淋洗梯度, 同时测定饮料中多种添加剂, 具有灵敏、准确、精密、样品处理简单、工作效率高等优点。本文就高效液相色谱程序波长法同时测定饮料中多种添加剂的波长程序、洗脱梯度、柱温、测定方法的回收率、精密度、线性范围、检出限进行了研究, 选择最合适的色谱条件, 准确测定样品。

## 1 材料与方法

1.1 仪器及条件: AP-01真空压力泵(奥特赛恩斯); HP-1100系列液相色谱仪[四元梯度泵、真空在线脱气

机、自动进样器、恒温柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、惠普化学工作站]; 色谱柱: Hpersul, ODS5  $\mu m$ ,  $125 \times 4mm$ ; 保护柱: Hpersul ODS5  $\mu m$   $4 \times 4mm$ ; 柱温: 40℃; 流动相: 甲醇-0.02mol/L乙酸铵(梯度洗脱: 甲醇: 5%, 保持4min; 5%~35%, 10%/min; 35%~70%, 17.5%/min); 流速: 1.0ml/min; 波长程序: 0~5min, 230nm; 5~7.5min, 400nm; 7.5~9.25min, 520nm; 9.25~9.9min, 285nm; 9.9~11min, 630nm。

1.2 试剂: 甲醇为色谱纯, 并经0.45  $\mu m$ 有机相滤膜抽滤脱气; 0.02mol/L乙酸铵溶液 称取乙酸铵1.54g, 加水定容至1000ml, 经0.45  $\mu m$ 水相滤膜抽滤脱气; Carrez试剂I: 称取15g  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ , 用水溶解并稀释至100ml; Carrez试剂II: 称取30g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 用水溶解并稀释至100ml; 多种添加剂标准混合液 准确称取在干燥器过夜的咖啡因0.1000g, 加水定容至100ml, 再从中吸取10.0ml, 并分别吸取GBW(E)100001~100005, 浓度均为1.000mg/ml的柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、亮蓝各2.50ml及GBW(E)

100007~100009, 浓度均为1.000mg/ml的苯甲酸、山梨酸、糖精钠各10.0ml, 于100ml容量瓶中, 加水定容至刻度, 此标准混合液浓度分别为柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、亮蓝各25.0  $\mu$ g/ml, 苯甲酸、山梨酸、糖精钠、咖啡因各100  $\mu$ g/ml。

1.3 方法: 样品处理: 称取样品10.0g, 微温搅拌除去二氧化碳, 用氨水(1+1)调pH约7, 加Carrez试剂I和II各0.5ml, 再加水定容至25.0ml, 经0.45  $\mu$ m水相滤膜抽滤脱气(饮料中含有亮蓝时, 先把试样用氨水调到碱性经0.45  $\mu$ m水相滤膜抽滤后, 再用乙酸调pH约7)。测定: 在柱温: 20℃; 流动相: 甲醇-0.02mol/L乙酸铵(梯度洗脱: 甲醇: 5%, 保持4min; 5%~35%, 10%/min; 35%~70%, 17.5%/min); 流速: 1.0ml/min; 波长程序: 0~5min, 230nm; 5~7.5min, 400nm; 7.5~9.25min, 520nm; 9.25~9.9min, 285nm; 9.9~11min, 630nm条件下, 分别取标准混合液0.50、1.0、2.0、4.0  $\mu$ l及试样液2.0  $\mu$ l依次注入HPLC, 将色谱峰保留时间与标准峰比较及峰纯度检测进行定性, 用标准曲线进行定量。

1.4 计算公式:  $X=25C/10V$

X- 样品含量 (mg/kg)

C- 试样相当于标准的量 (ng)

V- 进样体积 ( $\mu$ l)

## 2 结果与讨论

2.1 流动相的选择: 流动相是色谱分离中最重要的步骤, 直接关系到分析的灵敏度、检出限, 决定着能否将样品的组分一一洗脱分离, 在ODS柱中, 甲醇、0.02mol/L乙酸铵溶液是添加剂理想的洗脱液, 本试验通过改变二者之间的比例, 得到苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、胭脂红、苋菜红、日落黄、咖啡因、亮蓝有效分离的梯度洗脱程序(见表1)。

2.2 流速的选择: 流速的大小直接影响柱及系统的

表1 本法梯度洗脱程序

分析时间 (min)	0.02mol/L 乙酸铵 (%)	甲醇 (%)
0.00	95	5.0
4.00	95	5.0
7.00	65	35
9.00	30	70

压力、各组分分离度、洗脱时间, 在流动相固定之后, 选择最佳分离度和最短分析时间的流速。流速太小, 分析时间太长, 流速太大, 系统的压力太高, 容易冲塌柱, 因此, 本试验以0.5ml/min、1.0ml/min、1.5ml/min流速进行试验, 得到流速在1.0ml/min为佳。

2.3 柱温的选择: 柱温是影响组分分离度因素之一, 本试验在流动相及流速固定下, 以柱温为20℃、25℃、30℃、40℃进行试验, 结果表明, 柱温为20℃时为宜。

2.4 波长程序的选择: 在分离条件固定下, 利用DAD的程序可变波长功能, 在同一检测通道, 在各组分的出峰时间区间, 分别用其最佳检测波长进行检测, 以选择最佳检测波长程序, 最大限度地提高检测灵敏度, 有效克服基线漂移, 减小共存干扰物的影响。图1、图2为两种波长程序的检测结果, 其检测灵敏度都很高, 本法选择图1的波长程序。

2.5 本法线性范围、相关性 & 检出限试验: 结果见表2, 其线性范围上限还可延长。

2.6 本法精密度试验: 用标准混合液进样2  $\mu$ l, 进行6次分析, 其峰面积、变异系数结果见表3, 9种添加剂的变异系数均小于1.6%。

2.7 本法准确度试验: 以美年达饮料为本底, 在高、中、低三个添加水平测定回收率, 其回收率范围为93.8%~109.2%。结果见表4。

2.8 样品的分析结果 用本法与国标法(GB/T5009.29-1996 及 GB/T5009.35-1996) 分别测定样品15份, 其结果无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

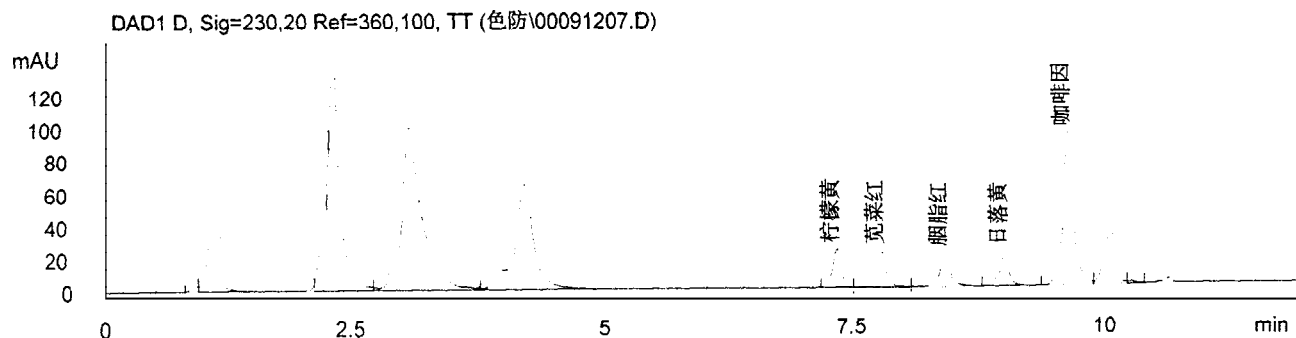


图1 波长程序

0~5min, 230nm; 5~7.5min, 400nm; 7.5~9.25min, 520nm; 9.25~9.9min, 285nm; 9.9~11min, 630nm

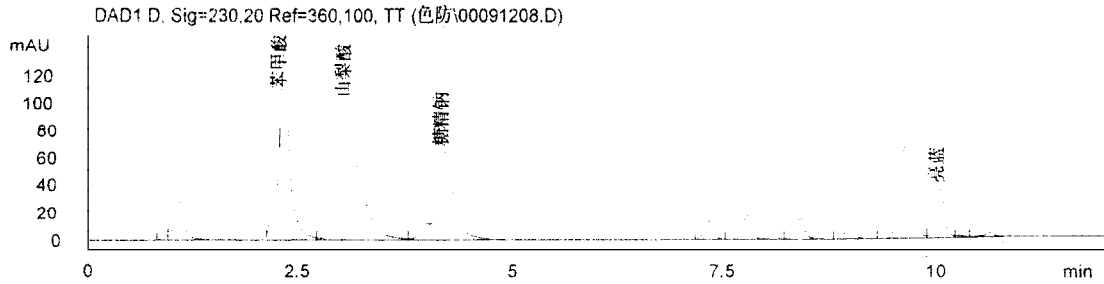


图2 波长程序

0~5min, 230nm; 5~9.9min, 254nm; 9.9~11min, 630nm

表2 本法线性范围、相关性及检出限

组分名称	保留时间 (min)	线性范围 (ng)	回归方程 Y (Area) X (ng)	相关系数 r	检出限 (ng)
苯甲酸	2.288	0~1000	$Y=3.13546X+2.88021$	0.99999	0.1
山梨酸	3.078	0~1000	$Y=3.63055X+1.92121$	0.99999	0.1
糖精钠	4.244	0~1000	$Y=2.17963X+1.18930$	0.99999	0.2
柠檬黄	7.317	0~250	$Y=1.51197X-0.38691$	0.99998	0.3
苋菜红	7.757	0~250	$Y=1.55525X+0.74320$	0.99982	0.3
胭脂红	8.398	0~250	$Y=1.49265X-0.03472$	0.99995	0.3
日落黄	8.966	0~250	$Y=1.20355X-0.01220$	1.00000	0.3
咖啡因	9.603	0~1000	$Y=1.69549X+1.32962$	0.99999	0.2
亮蓝	10.019	0~250	$Y=2.45319X+3.69872$	0.99935	0.1

表3 9种组分峰面积测定的精密度

次序	苯甲酸	山梨酸	糖精钠	柠檬黄	苋菜红	胭脂红	日落黄	咖啡因	亮蓝
1	653.84	745.99	450.54	78.05	86.82	78.29	62.16	352.70	279.75
2	655.80	739.53	442.52	78.07	87.19	74.54	63.10	357.78	286.91
3	658.22	742.15	446.96	78.01	86.40	76.96	63.55	358.57	279.20
4	654.31	743.26	448.63	78.03	86.64	76.31	63.29	354.62	280.65
5	656.01	741.62	449.31	78.09	86.92	77.16	62.96	356.1	281.91
6	655.96	742.10	447.98	78.03	86.40	76.98	63.06	355.31	280.63
CV%	0.27	0.29	0.62	0.04	0.36	1.6	0.75	0.60	1.0

表4 样品加标回收率试验结果

组分名称	测得值 $\mu\text{g/ml}$	加标量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	加标量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	加标量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %
苯甲酸	146.93	50.0	104.2	200	107.2	400	102.5
山梨酸	0.00	50.0	101.2	200	99.7	400	100.5
糖精钠	0.00	50.0	100.4	200	96.5	400	107.5
柠檬黄	0.00	12.5	100.2	50.0	100.5	100	99.8
苋菜红	0.00	12.5	98.0	50.0	95.7	100	101.1
胭脂红	0.00	12.5	99.5	50.0	93.8	100	99.9
日落黄	66.81	12.5	103.3	50.0	109.2	100	101.2
咖啡因	0.00	50.0	103.8	200	97.5	400	103.7
亮蓝	0.00	12.5	97.5	50.0	95.8	100	98.6

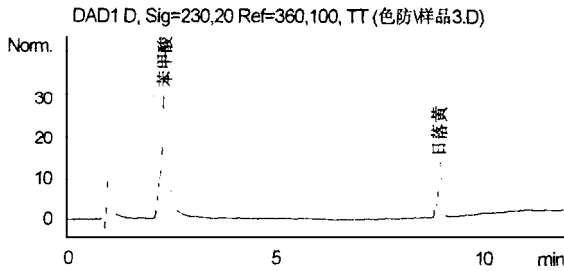


图3 美年达饮料色谱图

# 参 考 文 献

- 1 中华人民共和国国家标准·食品卫生检验方法理化部分·北京: 标准出版社, GB/T5009·29-1996 141-142 GB/T5009·35-1996 166~168.
- 2 杨元等. 中国卫生检验杂志, 1993, 3 (5): 271.
- 3 仲渝民等. 中国卫生检验杂志, 1992, 2 (5): 276.