

液相色谱法检测蜜饯中甜蜜素含量

裴波

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽省合肥市 230088)

摘要: 本案例以乙腈为流动相, 使用 C18 色谱柱进行分离, 使用超高效液相色谱, 利用紫外检测器检测蜜饯中甜蜜素含量。

关键词: 超高效液相色谱法; 检测方法; 甜蜜素

1 实验目的

- 1) 检测蜜饯中的甜蜜素含量
- 2) 验证并重现文献中关于甜蜜素检测的方法, 并有针对性的作出改进。

2 实验原理

在酸性的介质中, 甜蜜素经次氯酸钠溶液衍生, 正己烷反相萃取衍生物 N,N-二氯环己胺, 在 314nm 波长下有最大吸收。

3 实验材料、试剂耗材及仪器设备

3.1 实验材料

淘品小栈珍珠梅

3.2 试剂耗材

1) 甜蜜素标准品乙腈 (国药色谱纯); 超纯水 (自制); 硫酸 (优级纯); 次氯酸钠 (有效氯含量超过 5%); 正己烷 (色谱纯); 针头式过滤器 (有机系和无机系)

2) 工作液

(1) 甜蜜素母液: 精确称取 1.0000g 甜蜜素标准品, 置于 100ml 容量瓶中加水定容, 配制成为 10.00mg/ml 的母液

(2) 硫酸溶液 (1: 1): 取 10ml 超纯水于 50ml 烧杯中, 另量取 10 浓硫酸小心加入到水中, 变加边搅拌, 待温度降至室温后使用 (注意不可将往浓硫酸中加水)。

(3) 甜蜜素工作液: 取甜蜜素母液, 分别用水稀释成 0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00mg/ml 的标准工作溶液。

3.3 仪器

皖仪 LC3100 梯度系统高效液相色谱仪 (可变波长紫外检测器); 超纯水器 (皖仪); 高

速离心机；超声波清洗器；漩涡混合器

4 实验方法及步骤

4.1 实验方法

- 1) 制作系列梯度的甜蜜素标准工作曲线
- 2) 样品衍生化，检测浓度
- 3) 利用高效液相色谱法检测甜蜜素含量

色谱条件如下：

色谱柱：Agilent TC-C18(2),4.6*250mm, 5um

流动相：乙腈：水=80：20 流速：1ml/min

进样量：20ul 柱温：40 摄氏度

波长：314nm

4.2 实验步骤

标准工作曲线建立

- 1) 分别精确吸取 10ml 甜蜜素标准工作液至 50ml 的带盖的玻璃瓶中
- 2) 分别加入 2ml 硫酸溶液（1：1），5ml 正己烷，1ml 次氯酸钠溶液，旋紧盖子漩涡震荡 1 分钟
- 3) 吸取上层的有机相转移到另一只玻璃瓶中，加入 30ml 超纯水，漩涡震荡 1 分钟
- 4) 重复一次水洗过程，吸取上层有机相，0.45um 滤膜过滤后进样检测
- 5) 根据检测数据，以样品浓度为横坐标，检测器的响应值为纵坐标建立标准工作曲线

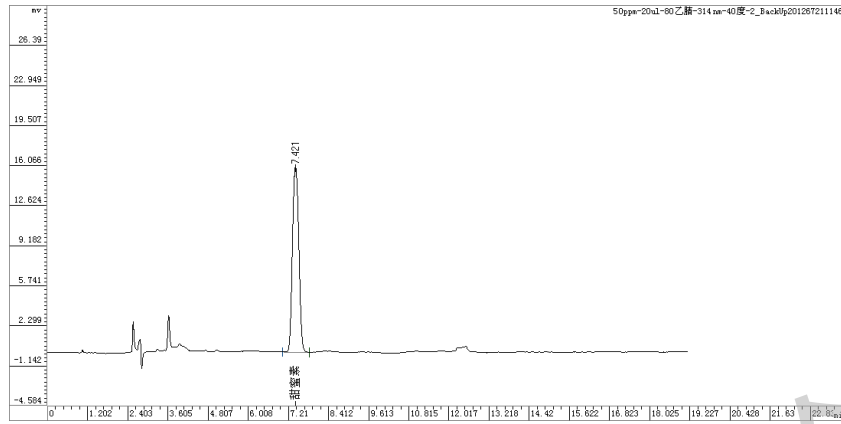
4.3 样品测定

- 1) 取 10g 的样品的果肉，用剪刀将其剪碎，置于 100ml 的烧杯中，加入 50ml 超纯水，浸泡 2 小时，在此期间每个 30 分钟用玻璃棒搅拌一次。
- 2) 取上清液高速离心或用 0.45um 的滤膜过滤
- 3) 移取 10ml 离心或过滤后的溶液按照上述标准品的衍生方法处理，如果样品中的甜蜜素含量过高可稀释至合适的浓度，本实验根据实际情况将上清液稀释 10 倍，
- 4) 吸取衍生处理后的有机相层过滤，取 20ul 注入液相色谱仪检测
- 5) 根据实验数据采用外标法定量。

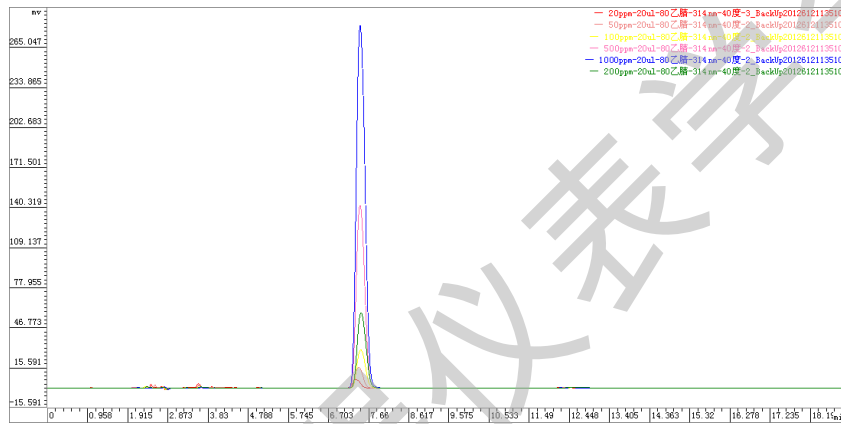
5 实验数据

5.1 甜蜜素标准品谱图相关信息

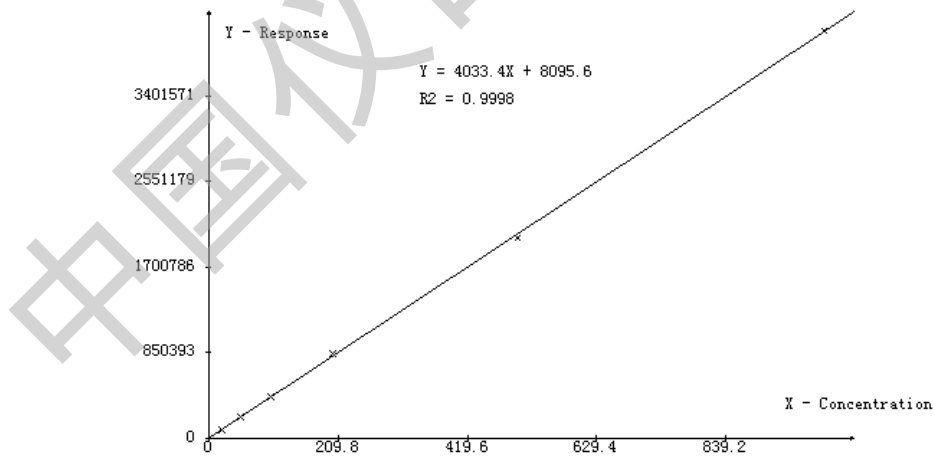
1) 标准品谱图



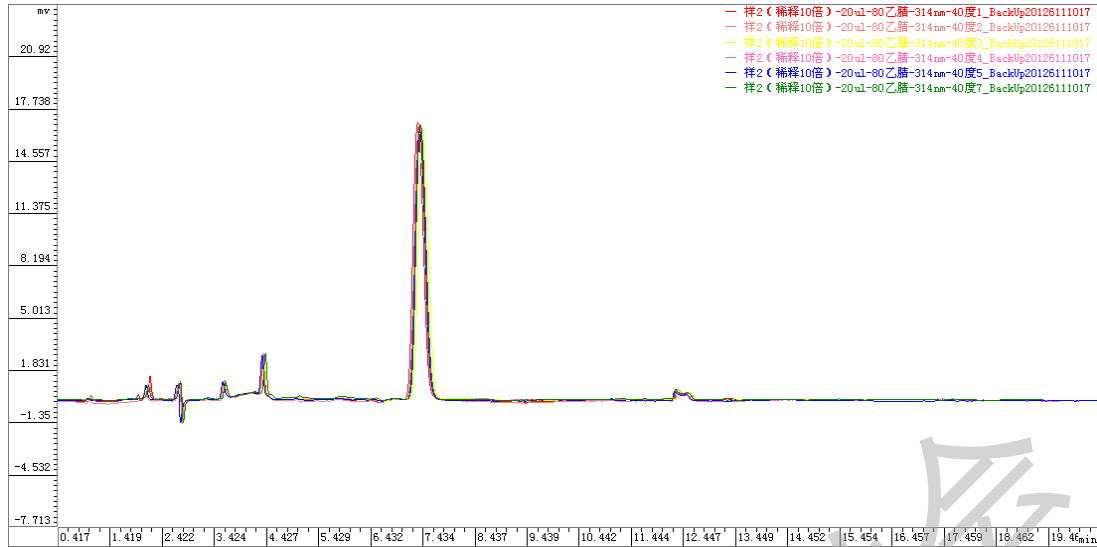
2) 甜蜜素系列浓度标准品叠加图



3) 标准工作曲线



5.2 样品谱图信息



序号	文件名	峰面积	保留时间	峰高	半高峰宽	浓度
1	样2 (稀释 10 倍) 1	232726	7.334	16852	12.967	55.73546
2	样2 (稀释 10 倍) 2	224918	7.359	16817	12.558	53.79997
3	样2 (稀释 10 倍) 3	223725	7.431	16392	12.815	53.50424
4	样2 (稀释 10 倍) 4	228120	7.378	16521	12.965	54.5937
5	样2 (稀释 10 倍) 5	224275	7.371	16437	12.812	53.64058
6	样2 (稀释 10 倍) 7	224199	7.386	16722	12.589	53.62174
7	最大值	232726	7.431	16852	12.967	55.735
8	最小值	223725	7.334	16392	12.558	53.504
9	平均值	226327.2	7.377	16623.5	12.784	54.149
10	误差	3511.6	0.032	199.1	0.177	0.87
11	RSD	1.55%	0.43%	1.20%	1.39%	1.61%

6 实验结论及分析

- 1) 根据实验结果,此方法的线性工作曲线为: $Y=4003.4X+8095.6$,线性相关系数为: $R=0.9999$
- 2) 根据样品的谱图信息,计算出珍珠梅的甜蜜素含量为: 2.8g/kg, 超出国家标准 2.8 倍(蜜饯国家标准为 1.0g/kg)

7 实验讨论

- 1) 该实验未作检出限、低浓度线性范围,但作为食品添加剂的甜蜜素来说,该线性范围及

检出限足够，如需检测更低浓度的甜蜜素含量，该实验还要进一步优化。

- 2) 该实验的优化过程中还缺少蜜饯中其他干扰物的影响，但据有的文献记载，一些常用的食品添加剂并不影响甜蜜素的检测。
- 3) 样品在采集过程中要注意将其尽量粉碎，以获得尽量充分的提取，否则测得的甜蜜素含量偏低
- 4) 色谱图中的主峰标注虽然是甜蜜素，但实际上是 N,N-二氯环己胺。
- 5) 样品在衍生化的过程需要特别注意的一点。很多样品中的成分比较复杂，在水浸提液中含有很多糖、氨基酸、蛋白质和脂类等有机化合物，这些物质在此衍生体系下可能会凝结成胶状物质影响甜蜜素衍生的回收率。应此，这种情况下，我们有两种解决方法：一是将原浸提也稀释足够的倍数，使胶状物质尽量少，但是有个缺点是可能实际被测的甜蜜素的含量也很低，多仪器的检测限的要求提高，如果采用浓缩精提还要增加前处理的步骤和成本；二是采用在衍生的中间过程超声震荡的方法消除胶状物质引起的气泡，排除大部分干扰，有利于下一步的萃取。处理过程中出现的问题可见示意图及其说明。
- 6) 需要说明的重要一点是，在进样之前一定要用有机滤膜过滤样品溶液，并且在色谱柱之前机上保护住，虽然保护住的加入会引起峰的扩散。如果不做上面的操作，色谱柱极易被堵塞而且很难冲洗。