

应用纪要

## 采用配备PDA检测器的Arc HPLC系统在不 受阿斯巴甜降解物干扰的条件下分析软饮料 添加剂

---

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation



---

摘要

软饮料中可能含有咖啡因、苯甲酸盐、山梨酸酯、乙酰磺胺酸钾、糖精和阿斯巴甜等添加剂。检查这些添加剂在软饮料产品中的浓度是否符合目标浓度要求是饮料生产厂的重要质控环节。但软饮料分析存在一个潜在问题：阿斯巴甜降解，其降解物可能与目标添加剂共流出，进而干扰定量。本研究介绍了对阿斯巴甜降解的调查以及对应的方法优化，旨在消除阿斯巴甜降解物产生的一切色谱干扰。此外还调查了Arc HPLC系统的进样线性和准确度，并将其性能与胖肚移液管比较。本研究中经过优化的饮料分析是一种快速、简单并且准确的HPLC方法，可提升软饮料生产环境的整体生产率。

## 优势

- 在12 min等度运行时间内分析软饮料添加剂
- 不受阿斯巴甜降解物干扰
- 对于添加剂含量较高的样品可降低进样体积，从而大幅减少样品手动稀释操作
- 预配制流动相、清洗溶剂和标准品，便于设置和制备
- 基于乙醇的流动相和清洗溶剂可降低危险废液处置成本

---

## 简介

软饮料中常含有作为兴奋剂或调味剂的咖啡因、作为防腐剂的苯甲酸钠和山梨酸钾以及作为人造甜味剂的乙酰磺胺酸钾(Ace-K)、阿斯巴甜和糖精等。要进行质量控制(QC)，检查这6种常用添加剂在最终产品中的浓度是否在指定范围内非常重要。但软饮料分析存在一个潜在问题：阿斯巴甜降解<sup>1</sup>，其降解物可能与目标添加剂共流出，进而干扰定量。本研究调查了阿斯巴甜的降解并优化了现有饮料分析方法，结合Arc HPLC系统，对饮料添加剂实现了快速、简单、准确的分析，并消除了阿斯巴甜降解物对添加剂定量的干扰。本方法采用沃特世饮料分析试剂盒，其中包含环保的预配制流动相、清洗溶剂和标准品。Arc HPLC系统改进了进样器设计且操作压力上限高于之前的HPLC技术，因此能够提升常规检测方法的精密度和准确度以及分析速度。本应用纪要重点介绍了将Arc HPLC系统用于饮料分析的优势。

---

## 实验

### 标样制备

将1瓶沃特世饮料分析标准溶液（部件号186006008 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006008-beverage-analysis-5-standards-solution.html> ) 倒入1瓶沃特世饮料分析标准固体 (部件号186006010 <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006010-beverage-analysis-standard-solid.html> ) 中。拧紧这瓶混合物溶液的瓶盖并用力振荡, 直至阿斯巴甜完全溶解。采用单点校正法定量样品。配制的标准溶液浓度为: 乙酰磺胺酸钾150 mg/L, 糖精100 mg/L, 苯甲酸盐200 mg/L, 山梨酸酯100 mg/L, 咖啡因100 mg/L, 阿斯巴甜500 mg/L<sup>2</sup>。

## 样品前处理

在本地商店购买各大软饮料品牌生产的2种健怡可乐和1种普通可乐。将这些软饮料样品超声处理1 min除去碳酸, 然后使用0.2 μm PVDF过滤器 (部件号WAT200806 <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html> ) 过滤。上述过程为仅有的样品前处理步骤。

## 方法条件

### 液相色谱条件

系统:	Arc HPLC系统
样品定量环:	标配(50 μL)
色谱柱:	XBridge BEH Phenyl XP 色谱柱, 130Å, 2.5 μm, 4.6 mm x 100 mm (部件号 186006075)
样品瓶:	通过LCGC认证的透明玻璃 回收样品瓶 (部件号 186003270)
温度:	35 °C
流动相:	沃特世饮料流动相试剂 (部件号186006006)

样品管理器清除溶剂:	沃特世饮料流动相试剂 (部件号186006006)
样品管理器清洗溶剂:	沃特世饮料分析清洗溶剂 (部件号186006007)
密封清洗溶剂:	沃特世饮料分析清洗溶剂 (部件号186006007)
流速:	1.6 mL/min (等度)
运行时间:	12.0 min
进样体积:	5 $\mu$ L
检测器:	2998 PDA检测器
检测条件:	UV, 波长214 nm
软件:	Empower 3色谱数据软件

---

## 结果与讨论

### 进样线性和准确度

图1 (A)所示为Arc HPLC系统中软饮料添加剂峰面积与进样体积之间的关系 (进样体积范围0.2~20  $\mu$ L)。数据集包含以不同进样体积重复进样得到的结果 (n=6, 进样顺序随机)。这些添加剂的过零点拟合线通过最小二乘回归 (未加权) 得到。所有拟合线均具有出色的线性 ( $R^2 > 0.9999$ )。图1 (B)所示为图1 (A)中拟合线的残差图, 指示不同进样体积下的进样体积准确度。图1 (B)中还绘制了胖肚移液管的ISO最大容许系统误差<sup>3</sup>用于比较。(无进样体积小于1  $\mu$ L时的ISO限值。) 实测的进样体积相对误差均在移液管的ISO限值范围内。此外, 还发现该系统的体积准确度水平优于使用胖肚移液管的食物检测实验室获得的水平<sup>4</sup>。这些结果表明Arc HPLC系统在体积递送方面的准确度高于胖肚移液管 (至少在进样体积大于等于2.5  $\mu$ L时是如此)。

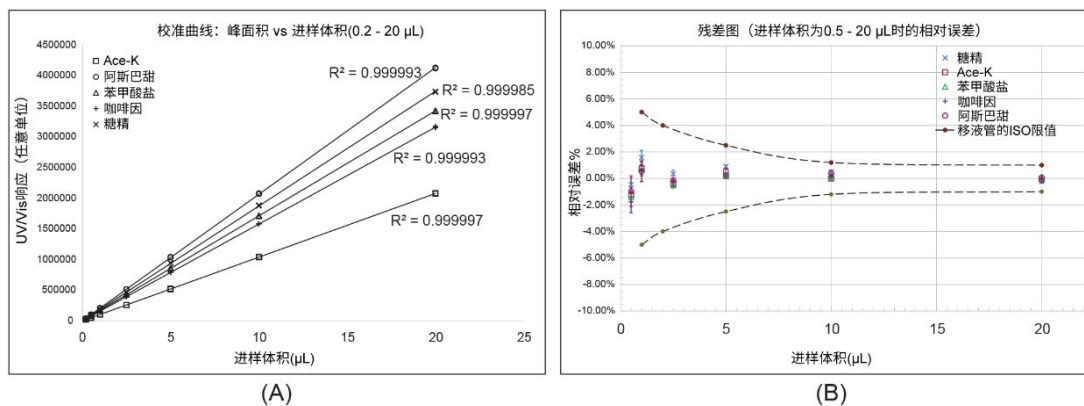


图1. 饮料分析中Arc HPLC的进样线性和准确度。(A)峰面积与进样体积之间的关系（进样体积范围0.2~20  $\mu\text{L}$ ）。(B)不同进样体积下实测峰面积的相对误差（相对于拟合线）。数据点代表6次进样的平均值，误差条柱代表 $\pm$  RSD。用虚线表示的曲线为胖肚移液管的ISO最大容许系统误差(ISO 8655-2)。

## 阿斯巴甜降解

阿斯巴甜不稳定，在一定条件下可降解为5-苄基-3,6-二氧-2-咪唑乙酸（咪唑二酮衍生物，或称DKP）、天冬氨酰-苯丙氨酸(Asp-Phe)、苯丙氨酸(Phe)及其他化合物<sup>1</sup>。这些阿斯巴甜降解物可能与添加剂共流出，进而干扰定量。图2比较了加热（60  $^{\circ}\text{C}$ 持续5 h和30 h）和未加热状态下标准溶液的色谱图。从图中可以看出，保留时间(RT) 1.51 min处未知峰7和RT 3.16 min处未知峰8的强度随标准溶液加热时长的增加而增加。DKP、Phe和Asp-Phe标准品的分离条件相同，其RT和UV/Vis谱图已用于构建PDA UV/Vis谱库。根据Empower谱库匹配结果，峰7的归属为Asp-Phe，峰8的归属为DKP。图3所示为Empower UV/Vis谱库匹配结果的屏幕截图。苯丙氨酸的RT也与峰7相同，但其UV/Vis谱图与峰7不相符。该结果与软饮料稳定性研究中发现少量Phe这一结果相符<sup>1</sup>。

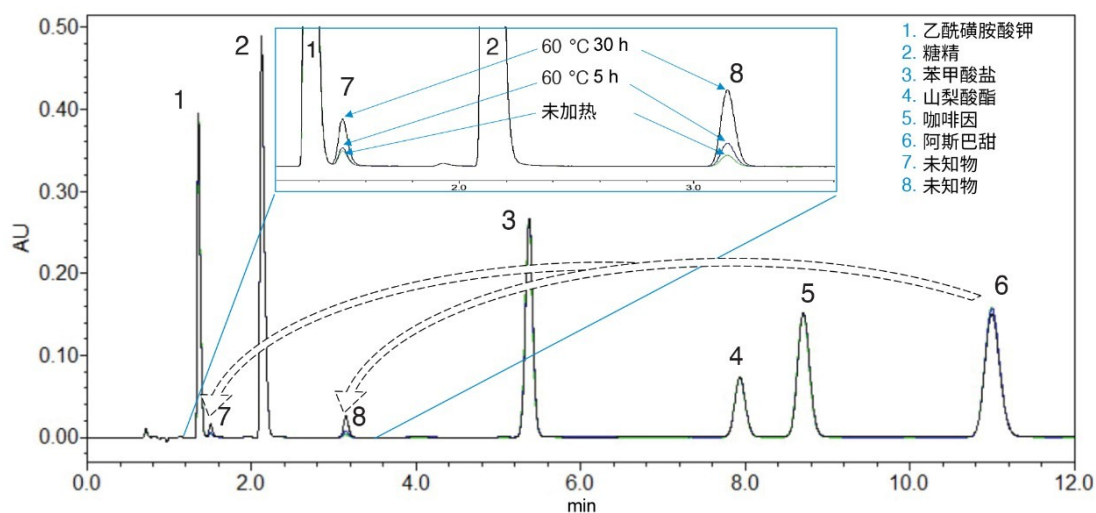


图2.比较加热与未加热的标准溶液

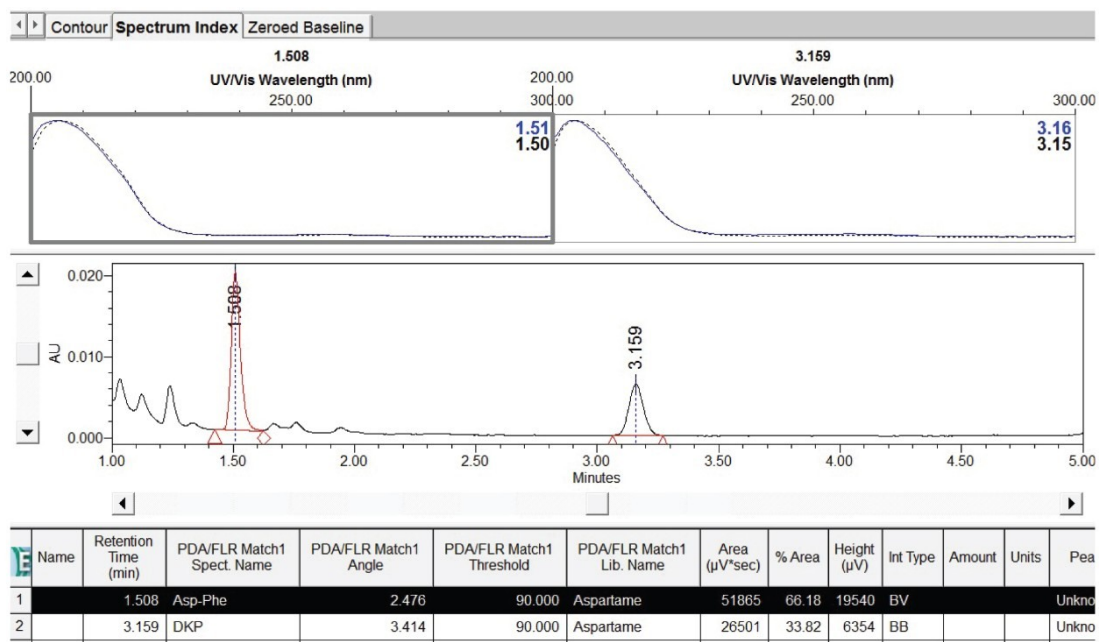


图3.阿斯巴甜降解物峰的Empower UV/Vis谱库匹配结果

## 方法优化

许多软饮料生产厂均选用沃特世饮料分析试剂盒<sup>5</sup>。本研究在Arc HPLC系统上以不同流速筛选了不同粒径、不同尺寸的XBridge BEH Phenyl色谱柱，以实现理想分离效果。评估的主要优化标准是运行时间、Ace-K与阿斯巴甜降解物(Phe)之间的分离度和溶剂用量。根据FDA指南将最小分离度值达到2.0作为分离标准( $R_s > 2.0$ )<sup>6</sup>



。表1所示为5  $\mu\text{m}$  4.6 x 150 mm色谱柱和2.5  $\mu\text{m}$  4.6 x 100 mm色谱柱对应的筛选结果。2.5  $\mu\text{m}$  4.6 x 100 mm色谱柱和流速1.6 mL/min被选为理想条件，原因是该条件下运行时间短、分离度出色并且溶剂用量少。5  $\mu\text{m}$  4.6 x 150 mm色谱柱和流速2.50 mL/min条件下的运行时间和分离度也较为理想，但其溶剂用量过高并且塔板数相对较低。此外，还筛选了尺寸更小的XBridge BEH Phenyl 2.5  $\mu\text{m}$ 色谱柱（例如3 x 100 mm和4.6 x 75 mm），但该条件下Ace-K与Phe的分离度小于2.0（结果未纳入表1）。值得一提的是，Arc HPLC的操作压力限值(9000 psi)使其能够在较高流速下运行分析（见表1），因此运行时间更短(12 min)。

色谱柱:		XBridge BEH Phenyl 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm				
流速 (mL/min)	分离度		塔板数		压力 (psi)	保留时间 (min)
	Ace-K/Phe	山梨酸酯/咖啡因	糖精	咖啡因		
1.00	2.81	1.71	8281	12246	2100	30
1.20	2.71	1.85	7902	11660	2500	24
1.40	2.63	1.99	7475	10862	2900	20
1.60	2.53	2.10	7175	10491	3300	18
2.00	2.34	2.28	6515	9419	4100	15
2.50	2.19	2.49	5814	8307	5000	12

色谱柱:		XBridge BEH Phenyl 2.5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 100 mm				
流速 (mL/min)	分离度		塔板数		压力 (psi)	保留时间 (min)
	Ace-K/Phe	山梨酸酯/咖啡因	糖精	咖啡因		
1.00	2.22	2.65	9858	18758	3600	20
1.20	2.15	2.85	9537	18491	4300	16
1.40	2.09	2.98	9161	17621	5000	14
1.60	2.03	3.03	8620	16358	5600	12
2.00	1.91	3.02	7612	13693	6900	10

表1.在Arc HPLC系统上进行饮料分析方法优化的色谱柱筛选结果

## 软饮料样品分析

图4所示为3种软饮料样品（SD1、SD2和SD3）的色谱图以及测得的添加剂浓度。表2所示为3种软饮料样品的分析结果。测得的咖啡因含量为产品包装上标示咖啡因值的98.5%~100%。所有测定结果的RSD<sub>r</sub>（重现性精密度）均小于0.4%，RSD<sub>ir</sub>（中间精密度）均小于1.16%。

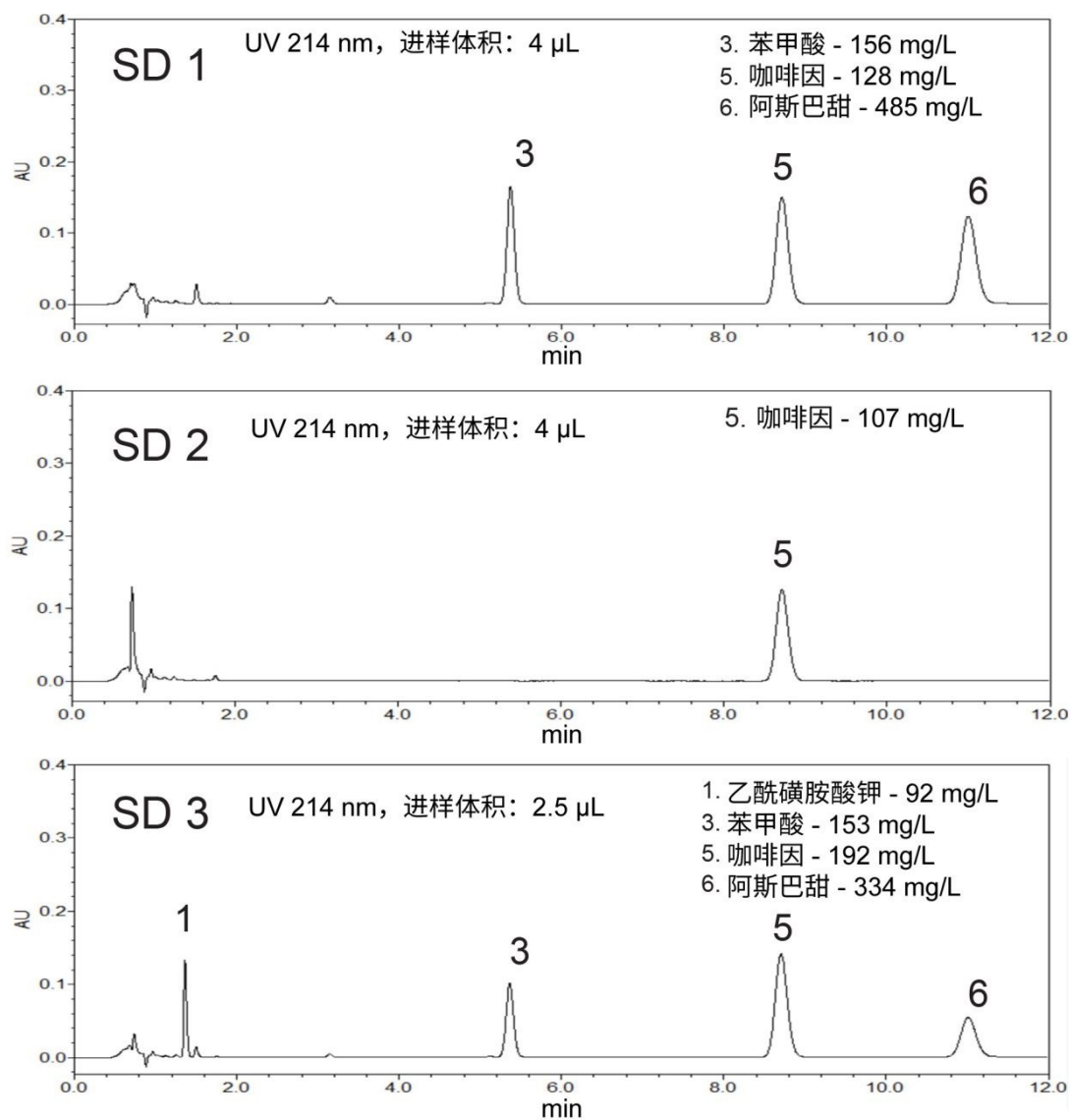


图4.软饮料的色谱图以及测得的添加剂浓度



样品		Ace-K	糖精	苯甲酸盐	山梨酸酯	咖啡因	阿斯巴甜
SD1	平均值(mg/L)	ND	ND	156	ND	128	485
	RSD <sub>r</sub> <sup>1</sup> (n = 6)			0.17%		0.14%	0.18%
	RSD <sub>ir</sub> <sup>2</sup> (n = 10)			0.73%		0.97%	0.88%
	标示值%					99.2%	
	标示值(mg/L)					129	
SD2	平均值(mg/L)	ND	ND	ND	ND	107	ND
	RSD <sub>r</sub> <sup>1</sup> (n = 6)					0.06%	
	RSD <sub>ir</sub> <sup>2</sup> (n = 10)					0.55%	
	标示值%					100.0%	
	标示值(mg/L)					107	
SD3	平均值(mg/L)	92	ND	153	ND	192	334
	RSD <sub>r</sub> <sup>1</sup> (n = 6)	0.12%		0.08%		0.17%	0.42%
	RSD <sub>ir</sub> <sup>2</sup> (n = 10)	1.16%		0.42%		0.59%	0.94%
	标示值%					98.5%	
	标示值(mg/L)					195	

注： 1) RSD<sub>r</sub>: 重复性精密度。一天内使用同一根色谱柱测定的RSD。  
2) RSD<sub>ir</sub>: 中间精密度。在多天使用多批次色谱柱测定的RSD。

表2. 软饮料样品分析结果

这些软饮料样品的咖啡因水平介于107 mg/L~192 mg/L之间，高于饮料分析标准品的咖啡因水平。通常情况下，需要稀释样品使样品的咖啡因峰面积处于校准范围内。而本研究利用Arc HPLC系统出色的进样体积准确度（如图1所示），通过降低软饮料样品的进样体积（SD1和SD2为4 μL，SD3为2.5 μL）使样品的咖啡因峰面积处于校准范围内（见图4）。这样不但提升了工作流程效率，而且消除了手动稀释样品可能引入的人为误差。样品和标准品在进样体积上的细微变化不影响分离和定量。

## 结论

本应用纪要展示了一种软饮料添加剂分析方法，该方法采用配备PDA检测器的Arc HPLC系统以及沃特世饮料分析试剂盒，具有快速、简单、准确的特点。在优化条件下，阿斯巴甜降解物峰得到鉴定，其对目标添加剂的潜在干扰也得以消除。Arc HPLC系统出色的进样准确度达到了胖肚移液管的ISO要求，因此能够将降低样品进样体积作为样品稀释的替代方法，使响应值处于校准范围内。在Arc HPLC系统上使用沃特世饮料分析试剂盒开展饮料分析能够提升软饮料生产环境的整体生产率，而且具有以下主要优势：

- 在12 min等度运行时间内对软饮料添加剂进行质量控制。

- 使添加剂定量不受阿斯巴甜降解物干扰。
- 对于添加剂含量较高的样品可降低进样体积，从而大幅减少样品手动稀释操作。
- 预配制流动相、清洗溶剂和标准品，便于设置和制备。
- 基于乙醇的流动相和清洗溶剂可降低处置成本。

---

## 参考资料

1. Van Vliet K, Melis ES, de Blaauw P, van Dam E, Maatman RGJ, Abeln D, van Spronsen FJ, Heiner-Fokkema MR. Aspartame and Phe-Containing Degradation Products in Soft Drinks across Europe. *Nutrients* 2020, 12, 1887.
2. 如果需要测定糖精钠、苯甲酸钠和山梨酸钾的浓度，则相应浓度为113 mg/L糖精钠、238 mg/L苯甲酸钠和135 mg/L山梨酸钾（根据不同形式化合物间的分子量比率换算）。
3. International Organization for Standardization. (2002). Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes (ISO Standard No. 8655-2:2002(E)).  
<https://www.iso.org/standard/29727.html>. <<https://www.iso.org/standard/29727.html>>
4. Liu K, Pointer B, Yang J, Skinner N, Toerber S, Karote D. 在食品分析中自动完成标准品制备 – 实际评估. 沃特世应用纪要720007126ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/automate-standard-preparations-for-food-analyses-a-real-world-evaluation.html>> , 2021年1月.
5. 确保软饮料生产时的原料成分准确. 沃特世商业解决方案720004489ZH <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134717488&lcid=134717487>> , 2012年12月.
6. FDA Center for Drug Evaluation and Research. (November 1994). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods <https://www.fda.gov/media/75643/download> <<https://www.fda.gov/media/75643/download>> .

---

## 特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007219ZH, 2021年4月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.