

蒸发光散射检测器和示差检测器应用于 食品中三氯蔗糖测定的比较

孙晓娟, 李彦博, 高广慧*

(辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110015)

摘要: 目的 比较高效液相色谱示差检测法和高效液相色谱法蒸发光散射检测法检测多种食品中三氯蔗糖含量的分析方法。**方法** 样品经甲醇溶液提取后, 除蛋白、脂肪后, 经亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙基吡咯烷酮固相萃取小柱净化, 富集后采用高效液相色谱仪进行检测。仪器条件如下: 示差检测器: 等度洗脱, 检测池温度 35 °C; 灵敏度: 16; 蒸发光散射检测器: 梯度洗脱, 雾化器温度: 30 °C; 雾化器压力: 1 psi; 蒸发室温度: 80 °C; 增益: 1; N₂ 流量: 1.0 L/min。**结果** 三氯蔗糖在 5、10 和 50 mg/kg 添加水平的示差检测器回收率的结果为 84.3%~99.6%, 相对标准偏差小于 6.9%(n=6); 蒸发光散射检测器: 回收率的结果为 85.6%~98.9%, 相对标准偏差小于 8.1%(n=6); 方法检出限为 2 mg/kg, 定量限为 5 mg/kg。**结论** 2 种方法均可有效检出食品中的三氯蔗糖, 蒸发光散射检测器采用双对数线性回归。

关键词: 三氯蔗糖; 高效液相色谱法; 示差检测器; 蒸发光检测器

Comparison between evaporative light scattering detector and refractive index detector for the determination of sucralose in food

SUN Xiao-Juan, LI Yan-Bo, GAO Guang-Hui*

(Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: Objective To compare the determination of sucralose in multiple categories of food by high performance liquid chromatography-refractive index detector (HPLC-RID) method and high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) method. **Methods** The sample was extracted by methanol solution and purified by solid phase extraction cartridge (HLB) after removal of protein and fat. After enrichment, the sample was detected by high performance liquid chromatography. The instrument conditions are as follows: refractive index detector: elution method was isocratic, detection cell temperature was 35 °C, sensitivity was 16; evaporative light scattering detector: gradient elution, nebulizer temperature was 30 °C, evaporation chamber temperature was 80 °C, gain value was 1, N₂ flow was 1.0 L/min. **Results** At 3 spiked levels of 5, 10 and 50 mg/kg, the recoveries of refractive index detector were ranged from 84.3% to 99.6%, the relative standard deviations (RSDs) were less than 6.9% (n=6), the recoveries of evaporative light scattering detector were ranged from 85.6% to 98.9%, RSDs were less than 8.1% (n=6), the limits of quantitation (LOD) for sucralose was 2 mg/kg, and the limit of quantitative was 5 mg/kg. **Conclusion** Both two methods can effectively detect sucralose in food, and the evaporative

*通讯作者: 高广慧, 主任药师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: gghggh2000@163.com

*Corresponding author: GAO Guang-Hui, Chief Pharmacist, Liaoning Institute For Food Control, Shenyang 110015, China E-mail: gghggh2000@163.com

light scattering detector adopts double logarithmic linear regression.

KEY WORDS: sucralose; high performance liquid chromatography; refractive index detector; evaporative light scattering detector

1 引言

三氯蔗糖又称蔗糖素(sucralose), 结构式见图 1, 是经蔗糖卤化而成的一种蔗糖衍生物, 化学名为 4,1'6' - 三氯 - 4,1'6' - 三脱氧半乳蔗糖, 其甜度是蔗糖的 600~800 倍, 白色粉末状物质, 无臭, 无吸湿性, 其熔点为 125 °C, 易溶于水、乙醇和甲醇溶剂, 由于其具有甜度高(甜度为蔗糖的 600~800 倍)、甜味纯正等特点, 被人们认为是目前最优秀的功能性甜味剂之一, 代表了目前强力甜味剂研究的最高水平^[1,2]。1991 年, 加拿大率先批准三氯蔗糖在根啤、橙子糊和餐用甜味剂中使用, 随后美国、日本、欧盟、澳大利亚和新西兰等国家也确认了三氯蔗糖的安全性并批准其使用^[3]。我国于 1997 年 7 月 1 日正式批准三氯蔗糖作为食品添加剂使用, 并在 GB 2760-2014《食品添加剂使用卫生标准》中对三氯蔗糖的使用范围和限量进行详细规定^[4]。

文献报道三氯蔗糖检测方法有高效液相色谱法^[5-8]、离子色谱法^[9,10]、液相色谱-质谱联用法^[11,12]、毛细管电泳法^[13]、化学滴定法^[14]等。我国国家标准 GB 22255-2014 中制定了高效液相色谱-蒸发光检测器法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)检测三氯蔗糖的分析方法^[15]。本研究拟用高效液相-蒸发光散射检测器和示差检测器进行检测, 对比 2 种检测器的特点, 为检验人员在日常监督检测工作时选择适合的检测方法提供依据。

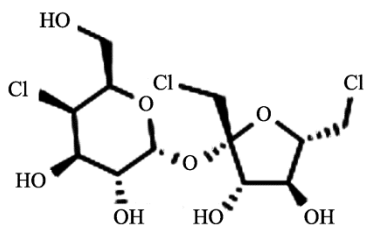


图 1 三氯蔗糖的结构式
Fig. 1 Structures of sucralose

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

HPLC-1260 高效液相色谱仪(配有蒸发光检测器, 安捷伦公司); HPLC-e2695 高效液相色谱仪(沃特斯公司, 配有示差检测器); N1 氮吹仪(屹尧公司); CR21N 离心机

(日本日立公司)。

三氯蔗糖(sucralose, 纯度为 99.0%, 德国 DR.E 公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 正己烷、乙酸锌、亚铁氰化钾、中性氧化铝(分析纯, 国药集团试剂有限公司); HLB 固相萃取柱(6 mL, 200 mg, 美国 Waters 公司); 0.45 μm 水系滤膜(天津津滕公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

三氯蔗糖标准储备溶液配制: 精确称三氯蔗糖 0.10100 g, 置 50 mL 烧杯中, 加入 5 mL 的水使溶解后, 定量转移至 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。加入适量水使溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀。浓度为 10 mg/mL

乙酸锌溶液: 称取乙酸锌 21.91 g, 置 250 mL 烧杯中, 加 3 mL 乙酸, 加水约 50 mL, 超声使溶解, 放置至室温, 定量转移至 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。

亚铁氰化钾溶液: 称取亚铁氰化钾 10.62 g, 置 250 mL 烧杯中, 加水约 50 mL, 超声使溶解, 放置至室温, 定量转移至 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.2.2 样品制备

将样品混匀, 精密称取 5.00 g 于 50 mL 离心管中, 加水 5 mL(果冻样品用 80 °C 水), 涡旋 2 min, 加入 1 g 中性氧化铝, 涡旋 30 s, 加入甲醇 15 mL, 涡旋 2 min, 超声 10 min, 水平振荡 10 min(速度 200 Moti/min), 在 -10 °C 下 10000 r/min 离心 8 min; 转移上清液, 加入亚铁氰化钾溶液 1 mL 和乙酸锌溶液 1 mL, 涡旋 2 min, 在 -10 °C 下 10000 r/min 离心 5 min; 转移上清液至另一 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 正己烷, 涡旋混合 2 min, 在 4300 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层(重复 3 遍), 下层 80 °C 水浴中用氮气吹至 5 mL 以下, 放至室温, 用水定容至 5 mL, 摇匀, 经 HLB 6cc 200 mg 固相萃取柱(6 mL 甲醇, 6 mL 水,)纯化, 先后用 5 mL 水和 5 mL 10% 甲醇淋洗, 抽干, 6 mL 甲醇洗脱, 洗脱液在 80 °C 水浴中用氮气吹干, 加入 1 mL 10% 乙腈溶解残渣, 用 0.45 μm 的滤膜, 过滤, 作为样品溶液。

2.2.3 仪器条件

(1) 高效液相色谱-示差检测器

色谱柱: 资生堂 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 85%水(A)-15%乙腈(B), 等度洗脱; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C; 示差检测器条件: 检测池温度 35 °C; 灵敏度: 16。

(2) 高效液相色谱-蒸发光检测器

色谱柱: 资生堂 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相: 90 水 (A)-10 乙腈(B); 液相色谱梯度洗脱程序: 0~8.0 min, 10%~30% B; 8.0~12.0 min, 30%~60% B; 12.0~16.0 min, 60%~95% B; 16.0~20.0 min, 95% B; 20.0~30 min, 95%~10% B。进样量: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 蒸发光散射检测器仪器条件: 雾化器温度: 30 $^{\circ}$ C; 雾化器压力: 1 psi; 蒸发室温度: 80 $^{\circ}$ C; 增益: 1; N_2 流量: 1.0 L/min;

3 结果与分析

3.1 仪器条件优化

示差检测器是连续检测样品流路与参比流路间液体折光指数差值的检测器; 蒸发光检测器首先将柱洗脱液雾化形成气溶胶, 然后在加热的漂移管中将溶剂蒸发, 最后余下的不挥发性溶质颗粒在光散射检测池中得到检测。两者检测器均属于通用型检测器, 蒸发光检测器较示差检测器的灵敏度高, 流动相可用于梯度洗脱。由于蒸发光检测器需要雾化和蒸发等步骤, 因此重复性较示差检测器差。蒸发光检测器的雾化和蒸发属于关键步骤, 因此, 优化这两个参数十分必要, 当蒸发温度设为 60 $^{\circ}$ C 时, 目标化合物的灵敏度低, 检出限水平为 10 mg/kg(RSD=5.2%), 当蒸发温度设为 100 $^{\circ}$ C 时, 检出限水平为 1 mg/kg(RSD=14.4%), 目标化合物的重复性较差, 当蒸发温度设为 80 $^{\circ}$ C 时, 检出限水平为 2 mg/kg(RSD=6.9%), 能够满足检测要求。

3.2 样品前处理条件优化

GB 2760-2014《食品添加剂使用卫生标准》^[4]规定允许添加三氯蔗糖的食品中有固体、半固体和液体。液体食品有配制酒、饮料、酱油和醋、乳制品; 半固体食品有酱及酱制品、腐乳、沙拉酱、蛋黄酱、果酱和果冻。固体食品有炒货、冷冻饮品、糖果、焙烤食品、方便米面食品、蔬菜水果干制品等。所以, 样品的基质差别较大, 可以根据食品基质不同, 增加不同的步骤, 如不含蛋白和脂肪的果蔬汁饮料、果冻、配制酒的食品, 提取后, 将提取液挥发至 5 mL 以下, 直接采用固相萃取小柱进行净化; 含有蛋白和脂肪的样品, 需要进行去除蛋白和脂肪后, 再进行固相萃取小柱的净化。

3.2.1 提取溶剂的选择

三氯蔗糖易溶于水、乙醇和甲醇, 因此, 本研究考察了水、甲醇、乙醇及不同比例的甲醇对固体及半固体样品的提取效率, 通过实验, 上述溶剂的提取效率基本一致, 均能达到 90% 以上, 因此, 提取溶剂选择了先加入 5 mL 的水充分浸润, 然后加入甲醇。其原因有二: (1) 由于三氯蔗糖可以应用于多类食品中, 基质的差别较大, 而且水有良好的浸润, 先加入 5 mL 的水充分浸润, 然后加入甲醇, 不仅能够充分提取, 还可以初步去除蛋白质; (2) 先加入温水能够充分溶解果冻类样品。

3.2.2 除去蛋白方法选择

本文比较了分别加入 0.5、1、2、5 mL 亚铁氰化钾溶

液和乙酸锌溶液, 以调味乳为例, 添加量为 50 mg/kg($n=3$), 进行蛋白沉淀实验的考察。从外观看, 当沉淀剂加入 2 mL 以上时, 沉淀物质增加, 上清液特别澄清, 无絮状物, 沉淀层也较为结实; 实验结果表明, 4 种不同体积的平均回收率分别为 93.2%、91.9%、84.5% 和 81.2%。加入 1 mL, 能够使沉淀层更加结实, 离心后倾倒方便, 而 0.5 mL 的沉淀试剂沉淀后, 比较松散, 不利于后续操作。综合考虑, 选择了亚铁氰化钾溶液和乙酸锌溶液 1 mL。

3.2.3 除去脂肪方法选择

对于脂肪含量高的样品, 如果不进行去脂, 在固相萃取时流速较慢, 并且容易堵柱子。本文比较了正己烷和石油醚(沸程 30~60 $^{\circ}$ C)对脂肪的提取, 结果表明, 采用正己烷去除脂肪更为彻底, 并且三氯蔗糖的提取回收率不受影响, 因此, 本文采用正己烷去除脂肪。

3.2.4 净化条件优化

淋洗液和洗脱液是固相萃取技术的关键, 直接影响目标物的回收率, 淋洗液的选择原则是去除杂质, 使目标物吸附在固相萃取柱上, 而洗脱液的选择使目标物全部从固相萃取柱中洗脱下来。

淋洗液的选择, 本文分别用水、10% 甲醇进行淋洗, 当用 5 mL 水和 5 mL 10% 甲醇依次淋洗时, 将淋洗液按照“2.2.3 仪器条件”进行测定, 结果未测出目标物, 当淋洗液增加到 6 mL 时, 按照“2.2.3 仪器条件”进行测定, 10% 甲醇的淋洗液中有极少量的目标物, 因此淋洗液为 5 mL 水和 5 mL 10% 甲醇。

洗脱液的选择, 本文采用甲醇进行洗脱, 当甲醇为 6 mL 时, 目标物的洗脱率接近 100%, 因此, 将洗脱液的体积设为 6 mL, 可满足实验的需要。

3.3 方法的线性范围及检出限

将三氯蔗糖配制为 20、40、100、200 和 400 mg/L 的系列溶液, 按照“2.2.3 仪器条件”分别用 2 种检测器进行检测, 以待测物浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果表明三氯蔗糖在 20~400 mg/L 范围内线性关系良好, 可满足样品的定量分析的需要。检出限($S/N=3$)及定量限($S/N=10$)见表 1。

3.4 回收率及精密度实验

以空白基质为样品, 在 5、10 和 50 mg/kg 3 个水平下进行加标回收实验, 平行测定 6 个样品, 计算加标回收率。结果见表 2, 由表 2 的结果可知示差检测器的低浓度点的回收率与蒸发光检测器比较结果偏低, 但采用示差检测器所测结果的 RSD 小于蒸发光检测器测定的 RSD。

3.5 实际样品测定

应用本方法测定了配制酒类、乳制品及含乳制品、炒货类、调味品、冰淇淋等食品中的三氯蔗糖含量, 结果满意, 样品结果见表 3。

表 1 三氯蔗糖线性方程、相关系数、检出限和定量限
Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r), limits of detection and limits of quantity of sucralose

检测器名称	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数(r)	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
示差检测器	20~400	$Y=973.5X+838.1$	0.9998	2	5
蒸发光检测器	20~400	$Y=7412X^{1.244}$	0.9990	2	5

表 2 样品中三氯蔗糖的加标回收率及精密度(n=6)
Table 2 Recovery rates and precisions of sucralose in samples (n=6)

样品	加入量 (mg/kg)	示差检测器		蒸发光检测器	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
配制酒	5	95.7	3.2	96.2	6.8
	10	98.6	3.5	95.4	5.4
	50	99.1	2.1	98.3	3.4
酱 油	5	84.3	6.9	86.8	7.6
	10	97.1	3.1	96.9	2.9
	50	99.6	1.3	94.2	4.2
果 冻	5	88.6	5.7	90.2	6.4
	10	97.8	3.1	95.6	6.8
	50	99.2	3.9	93.8	5.2
调制乳	5	85.2	4.9	88.8	7.4
	10	91.4	4.7	89.3	6.4
	50	95.7	3.4	94.6	4.2
冰淇淋	5	90.4	5.6	94.1	6.9
	10	93.7	4.1	96.8	5.4
	50	97.4	3.4	95.9	4.1
面 包	5	89.1	6.8	85.6	7.1
	10	95.4	3.8	94.4	7.6
	50	98.4	3.3	98.9	5.3
炸花生	5	85.4	5.9	88.1	8.1
	10	90.6	3.1	93.5	6.4
	50	96.7	2.2	92.3	3.9
黄豆酱	5	86.1	5.1	87.2	7.5
	10	95.5	4.2	94.6	6.1
	50	97.6	3.8	97.8	4.3

表 3 样品中三氯蔗糖的测定结果
Table 3 Determination results of sucralose in samples

样品名称	含量/(mg/kg)	
	示差检测器	蒸发光检测器
配制酒	ND	ND
酱 油	47.6	43.2
果 冻	77.1	79.9
瓜 子	100.2	96.6
调制乳	32.3	30.6
冰淇淋	55.3	52.5
黄豆酱	40.1	37.6
面 包	19.4	21.7

4 结 论

本文所建立的方法快速、准确、简单, 可对各类食品中的三氯蔗糖准确定量。实验中发现当样品基质较为复杂时, 采用蒸发光检测器进行检测时, 建议用基质标准曲线进行定量。从回收率的结果可以看出, 样品含量较低(定量限附近), 建议采用蒸发光散射检测器; 由于示差检测器的重复性高, 所以对于三氯蔗糖含量较高的样品, 采用示差检测器更为合适。

参考文献

[1] 于振云. 三氯蔗糖的合成与应用研究[J]. 化工中间体, 2003, 15(16): 20-21.
Yu ZY. Progress in the synthesis and application of sucralose [J]. Chem Intermed, 2003, 15(16): 20-21.

[2] 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
Ling GT. Handbook of food additives [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.

[3] 张玉, 吴慧明, 徐丽红, 等. 三氯蔗糖的安全性研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 472-474.
Zhang Y, Wu HM, Xu LH, et al. Research advancement on the safety of sucralose [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(11): 472-474.

[4] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for uses of food additives [S].

[5] 张伟清, 张玉婷, 曹进, 等. 酱油及酱制品中三氯蔗糖的测定[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 237-240.
Zhang WQ, Zhang YT, Cao J, et al. Determination of sucralose in soy sauce and soybean paste [J]. Food Sci, 2013, 34(20): 237-240.

[6] 方光伟, 何建仁, 陈忍, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定食品中 9 种甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4741-4746.
Fang GW, He JR, Chen R, et al. Simultaneous determination of 9 kinds of sweeteners in food by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(12): 4741-4746.

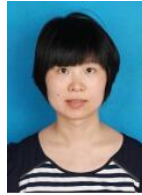
[7] 李桑, 刘嘉飞, 王立亚, 等. 高效液相色谱法测定饮料中三氯蔗糖的含量的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2998-3003.
Li S, Liu JF, Wang LY, et al. Optimization the method of determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 2998-3003.

[8] 张莉. 高效液相色谱法测定饮料中三氯蔗糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 10(17): 1784-1786.
Zhang L. Determination of sucralose in drink by high performance liquid

- chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 10(17): 1784-1786.
- [9] Hanko VP, Rohrer JS. Determination of sucralose in splenda and a sugar-free beverage using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(14): 4375-4379.
- [10] Kishi H, Kawana K. Determination of sucralose in foods by anion-exchange chromatography and reverse-phase chromatography [J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2001, 42(2): 133-138.
- [11] 周莉莉, 杨颖, 刘艳明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的三氯蔗糖[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1175-1178.
Zhou LL, Yang Y, Liu YM, *et al.* Determination of sucralose in foodstuffs by ultra performance liquid chromatography-electrospray negative ionization mass spectrometry [J]. J Instum Anal, 2011, 30(10): 1175-1178.
- [12] 马作江, 柏雪, 蔡学, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法快速测定酒类中的4种甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报 2013, 4(4): 1185-1189.
Ma ZJ, Bai X, Cai X, *et al.* Rapid determination of 4 sweeteners content in liquor by ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(4): 1185-1189.
- [13] Stroka J, Dossi N, Anklam E. Determination of the artificial sweetener sucralose by capillary electrophoresis [J]. Food Addit Contam, 2003, 20(6): 524-527.
- [14] 陈玉宏, 陈炳灿. 滴定法测定食品添加剂中三氯蔗糖含量[J]. 预防医学论坛, 2007, 13(5): 445-446.
Chen YH, Chen BC. Determination of the content of trichlorosucrose in food additive with titration [J]. Prev Med Tribune, 2007, 13(5): 445-446.
- [15] GB 22255-2014 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定[S].
GB 22255-2014 Determination of sucralose (sucrose) in food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



孙晓娟, 主管药师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: gghggh2000@163.com

高广慧, 主任药师, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: gghggh2000@163.com

“粮油质量安全检测与分析”专题征稿函

民以食为天, 食以安为先。粮油作为食品的主要来源, 与人民的生活息息相关。我国作为粮食生产大国和人口大国, 粮油质量安全问题也不同程度的存在, 近年来受到社会各界越来越多的关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“**粮油质量安全检测与分析**”专题, 由国家粮食局科学研究院王松雪研究员担任专题主编, 主要围绕**粮油质量安全检测技术和仪器研究、快速检测方法开发及其产品评价、粮油检测方法的标准化和分析质量控制技术以及粮油质量安全管理技术**等方面展开论述和研究, 本专题计划在2018年12月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及专题主编王松雪研究员特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在2018年11月10日前通过网站或E-mail投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com(注明专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部