

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

马作江*, 柏雪, 蔡学, 黄波, 谢义梅, 单长海, 刘必英

(恩施土家族苗族自治州产品质量监督检验所, 恩施 445000)

摘要: **目的** 建立酒类中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素和三氯蔗糖 4 种甜味剂的超高压液相色谱-串联质谱联用 (UPLC-MS/MS) 快速测定方法。 **方法** 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 分离, 以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇作为流动相梯度洗脱, 在电喷雾离子源 ESI 负离子模式下多重反应监测 (MRM) 定性、定量测定甜味剂。 **结果** 4 种甜味剂在 10~500 μg/L 的范围内与峰面积有良好的线性关系, 相关系数大于 0.99, 检出限为 0.5~2.4 μg/L, 加标回收率在 89.4%~104.6% 之间, RSD 小于 4%。 **结论** 该方法简便灵敏, 准确快速, 可用于酒类食品中低剂量、复合甜味剂的测定。

关键词: 超高压液相色谱-串联质谱联用; 酒; 甜味剂

Rapid determination of four sweeteners content in liquor by ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry

MA Zuo-Jiang*, BAI Xue, CAI Xue, HUANG Bo, XIE Yi-Mei, SHAN Chang-Hai, LIU Bi-Ying

(Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Product Quality Supervision and Inspection Institute, Enshi 445000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid determination method of four sweeteners (acesulfame, saccharin sodium, sodium cyclamate and suralose) in liquors by ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were separated by Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) using 0.1% formic acid water-methanol as mobile phase and analyzed by electrospray ionization (ESI) in the negative ion and multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** The method showed a good linearity over the range of 10~500 μg/L. The average recoveries were 89.4%~104.6% with RSD less than 4%. The quantitative limits of four sweeteners were 0.5~2.4 μg/L. **Conclusion** This method is accurate, rapid, and highly sensitive, and suitable for the determination of low concentration sweeteners in liquors.

KEY WORDS: ultra pressure liquid chromatography- mass spectrometry (UPLC-MS/MS); liquor; sweeteners

1 引言

甜味剂作为改善食品口味的一种添加剂, 具有低热量和低成本的好处, 但是各种甜味剂使用的安

全性仍存在争议。我国国家标准规定在一定食品范围内可限量使用^[1], 以酒类产品为例, 我国只允许在配制酒中添加几种少量甜味剂, 其他白酒等发酵酒中禁止添加任何甜味剂。不少酒类企业在酒中添加甜味

*通讯作者: 马作江, 农艺师, 主要研究方向为食品检验工作。E-mail: mazuoj@163.com

*Corresponding author: MA Zuo-Jiang, Agronomist, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Product Quality Supervision and Inspection Institute, No.357, Dongfeng Road, Enshi 445000, China. E-mail: mazuoj@163.com

剂以改善口感,或因使用含有甜味剂的酒用香精香料,造成酒类产品中甜味剂超标,给人们带来很大的食品安全隐患^[2]。酒类产品种类及生产厂家繁多,食品监管部门监控任务重,因此,建立酒类中甜味剂的快速准确测定方法对监控酒类品质具有重要意义。

甜味剂的检测方法很多^[3],我国对食品中的甜味剂也分别制定了相关的标准检测方法^[4-8]。其中液相、气相色谱法等测定方法检测限高,达不到监控酒类中甜味剂无添加或微量添加的检测要求,且易出现假阳性结果^[9],液相色谱-质谱/质谱法具有高灵敏度和高选择性,降低了检测限及假阳性几率^[10-13]。本文采用超高压液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-MS/MS)对酒类中4种甜味剂进行测定,为酒类产品质量监督抽查提供简便快速、准确可靠的科学检验依据。

2 材料与方法

2.1 仪器设备与试剂

高压液相-三重四极杆质谱联用仪 Agilent 1290/6460 LC/MS/MS (ESI 源), 美国 Agilent 公司; 氮气发生器 NM32LA, 英国 PEAK 公司; 电子天平 AU220, 岛津公司; 优普超纯水制造系统 UPH-IV-20T, 成都超纯科技有限公司; 超声波清洗仪 SB25-12D, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

安赛蜜(acesulfame)、糖精钠(saccharin sodium)、甜蜜素(sodium cyclamate)、三氯蔗糖(suralose)购自美国 Supelco 公司; 甲醇、甲酸为色谱纯, 购自 Anpel 公司; 0.22 μm 微孔滤膜购自 Ameritech 公司。

样品: 恩施州酒类生产企业的送检样品。

2.2 标准溶液的配制

分别精确称取 0.05 g 上述 4 种甜味剂标准品, 用

超纯水溶解后定容至 50 mL 容量瓶中, 制备成浓度为 1.0 mg/mL 的混合标准储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。临用前将标准储备液用超纯水分别稀释成混合标准使用液, 其中安赛蜜、糖精钠和甜蜜素浓度分别为 10、50、100、150、200、250 $\mu\text{g/L}$; 三氯蔗糖浓度为 20、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 色谱分析条件

色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 型 (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱见表 1; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 2.0 μL ; 流速为 0.3 mL/min。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions for UPLC analysis

梯度洗脱时间 t/min	流动相体积分数/%	
	A	B
0.00	85	15
1.50	60	40
2.20	85	15
4.00	85	15

2.4 质谱分析条件

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 ESI; 扫描方式: 负离子扫描; 检测方式: 多重反应监测(MRM); 干燥气温度(gas temp): 325 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流速(gas flow): 10 L/min; 雾化器压力(nebulizer): 20 psi; 鞘气温度(sheath gas temp): 300 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速(sheath gas flow): 12 L/min; 毛细管电压(capillary): 3500 V; 高纯氮气: 纯度不低 99.999%, 采用 MRM 模式外标法定量, 具体参数见表 2。

表 2 目标化合物的质谱 MRM 分析参数
Table 2 MRM conditions for target compounds

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间	提取电压(V)	碰撞能量(eV)
安赛蜜	162	82	100	60	6
糖精钠	182	106	100	100	18
甜蜜素	178	80	100	135	21
三氯蔗糖	395	359	100	135	5

2.5 样品预处理及样品测定

取 10.0 mL 酒类样品并准确称量于小烧杯中, 100 °C 水浴加热蒸发至少量液体, 转移并用超纯水定容于 10 mL 比色管中, 混匀后过 0.22 μm 水相滤膜过滤至样品瓶待测(白酒可以直接吸取 10.0 mL 样品并准确称量后, 经 0.22 μm 有机相滤膜过滤待测), 甜味剂含量高的样品用超纯水稀释至线性范围内浓度, 将上述标准使用溶液和样品在所建立的方法进行测定。

3 结果与分析

3.1 分析方法的建立

根据安赛蜜、甜蜜素、糖精钠和三氯蔗糖的分子结构, 采用负离子电喷雾模式(ESI⁻)、多重反应监测(MRM)的扫描模式进行检测。首先通过全扫描模式(scan)找到 4 种甜味剂的母离子分子离子峰分别为 m/z 162、178、182、395, 再选择离子检测(SIM 模式)确定各种甜味剂的保留时间、优化提取电压(fragmentor)及液相分离条件, 然后通过子离子扫描方式(product ion scan)找出各种甜味剂的子离子, 找到其丰度较大的子离子, 进一步优化碰撞能量(CE), 以得到最佳的子离子用于定量, 建立的 MRM 分析方法条件见表 2。4 种甜味剂的总离子流图 TIC 色谱图、定量离子对的 MRM 图分别见图 1、图 2。

3.2 方法的标准曲线、检出限、回收率及精密度对 4 种甜味剂混合标液进样测定, 绘制标准工

作曲线。根据标准工作曲线最低浓度点的响应值进行推算, 当信噪比 $S/N=3$ 时对应的目标化合物含量为方法的定性检出限, 并通过向待测酒样品中添加 100 μg/L 浓度水平的甜味剂混合标准溶液来进行回收率和精密度的测定, 平行分析 5 次。结果见表 3。

3.3 样品测定

对大量酒类样品按上述建立方法进行定性、定量分析, 结果表明, 在其中 10 个检出甜味剂酒类样品中(1~6 号样品为白酒, 7~10 号样品为配制酒), 有 4 个白酒样品检出了安赛蜜, 2 个白酒样品检出了甜蜜素, 而有 2 个配制酒样品同时检出了糖精钠和甜蜜素两种甜味剂, 有 2 个配制酒样中检出甜蜜素, 所检酒样中均未检出三氯蔗糖。有些酒样中甜味剂为低剂量添加, 甚至低于目前国家标准方法检出限, 这应引起食品安全监管部门足够的重视, 以应对可能潜在的食品安全风险。结果见表 4。

4 结论

本文建立了酒类中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、三氯蔗糖 4 种甜味剂的超高压液相色谱-串联质谱快速测定方法, 4 种甜味剂在 2.5 min 内达到完全分离, 该方法简便快速、准确、灵敏度高、检出限低, 避免了其他方法测定人工合成甜味剂假阳性的可能。该方法可为酒类食品中低含量、复合甜味剂的日常检测及食品监督抽查提供及时准确的科学依据。

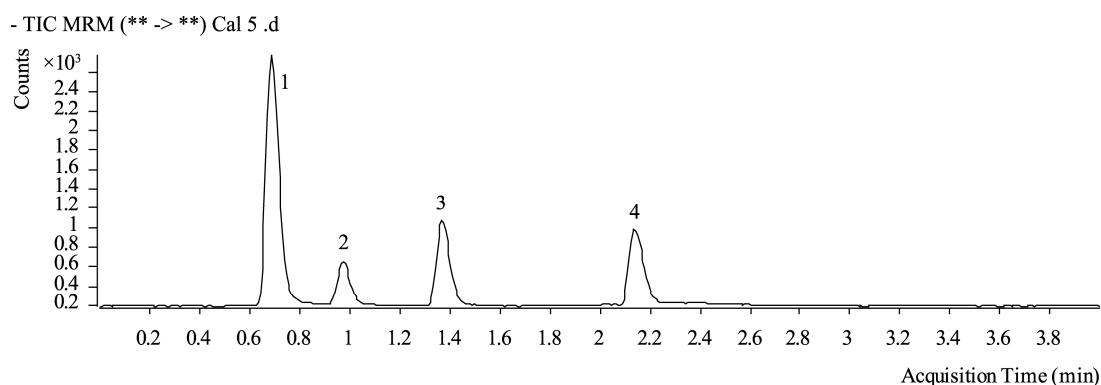


图 1 4 种甜味剂的总离子流图 TIC 色谱图(1. 安赛蜜; 2. 糖精钠; 3. 甜蜜素; 4. 三氯蔗糖)

Fig. 1 TIC chromatograms of 4 sweeteners (1. acesulfame; 2. saccharin sodium; 3. sodium cyclamate; 4. suralose)

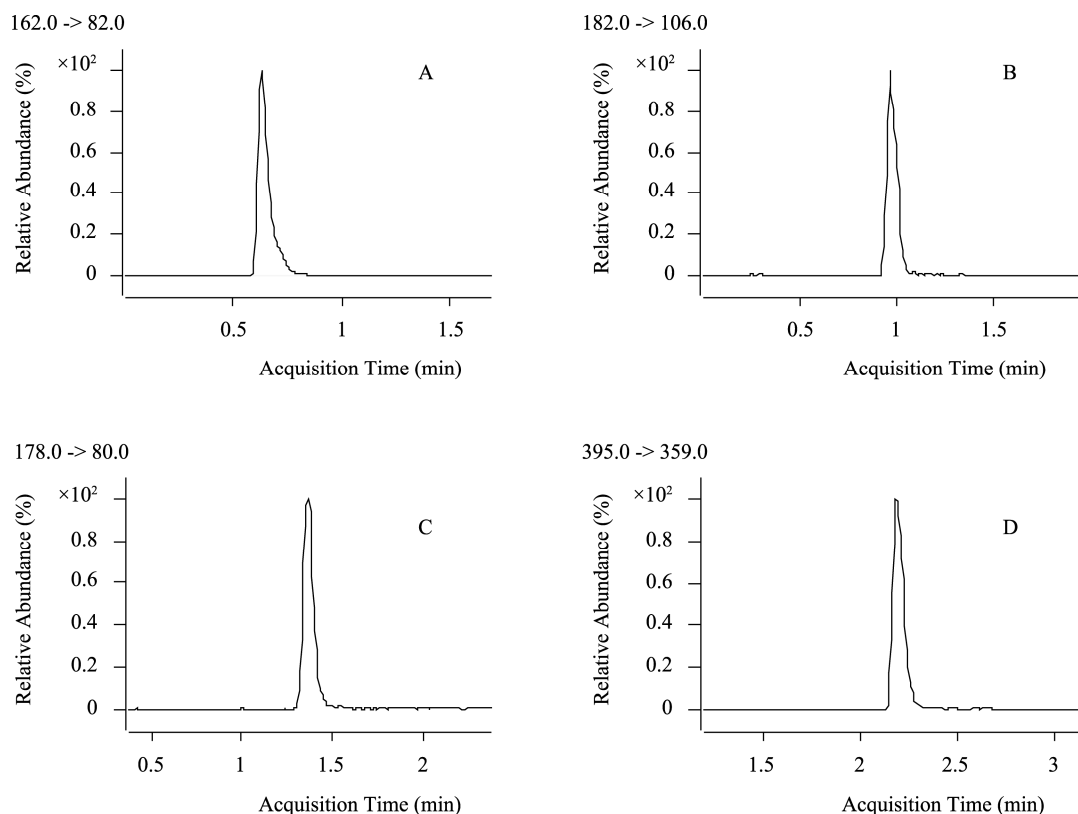


图2 4种甜味剂的MRM图谱(A. 安赛蜜; B. 糖精钠; C. 甜蜜素; D. 三氯蔗糖)

Fig. 2 MRM chromatograms of 4 sweeteners (A. acesulfame; B. saccharin sodium; C. sodium cyclamate; D. suralose)

表3 线性方程、相关系数、检出限、回收率及精密度($n=5$)Table 3 Linear regression equations, correlation coefficient, LOD, recoveries and precision($n=5$)

甜味剂	线性范围($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数 (r)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	加标量 100 $\mu\text{g/L}$	
					平均回收率%	RSD%
安赛蜜	10~250	$Y=1.5788X-16.6410$	0.99976	0.5	95.8	1.4
糖精钠	10~250	$Y=1.4069X-4.3232$	0.99940	1.0	89.4	2.7
甜蜜素	10~250	$Y=0.5258X+1.3106$	0.99989	0.8	97.5	1.8
三氯蔗糖	20~500	$Y=1.6541X-15.4500$	0.99650	2.4	104.6	3.1

表4 酒类样品甜味剂测定结果

Table 4 Determination results of 4 sweeteners in 10 liquor samples

样品序号	安赛蜜(mg/L)	糖精钠(mg/L)	甜蜜素(mg/L)	三氯蔗糖(mg/L)
1	20.06	ND	ND	ND
2	ND	ND	0.034	ND
3	14.55	ND	ND	ND
4	8.17	ND	ND	ND
5	ND	ND	0.175	ND
6	7.83	ND	ND	ND
7	ND	62.40	149.13	ND
8	ND	13.11	49.58	ND
9	ND	ND	0.326	ND
10	ND	ND	2.32	ND

注: ND 表示未检出

参考文献

- [1] GB 2760-2011 食品添加剂使用卫生标准[S].
GB 2760-2011 Food Additive Standards [S].
- [2] 钟杰, 罗健, 陈鑫. 白酒生产中甜味剂的正确选择和使用规范[J]. 酿酒科技, 2005, 8(134): 115-117.
Zhong J, Luo J, Chen X. Proper selection & use norm of sweet agent in liquor production [J]. Liquor-making Sci Technol, 2005, 8(134): 115-117.
- [3] 刘婷, 吴道澄. 食品中甜味剂的检测方法[J]. 中国调味品, 2011, 3(36): 1-12.
Liu T, Wu DC. Analytical methodologies for sweeteners in foodstuffs [J]. China Condim, 2011, 3(36): 1-12.
- [4] GB/T 5009.28-2003 食品中糖精钠的测定[S].
GB/T 5009.28-2003 Determination of saccharin sodium in food [S].
- [5] GB/T 5009.140-2003 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S].
GB/T 5009.140-2003 Determination of acesulfame K in beverage [S].
- [6] GB/T 22255-2008 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定[S].
GB/T 22255-2008 Determination of sucralose in foods [S].
- [7] GB/T 5009.97-2003 食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].
GB/T 5009.97-2003 Determination of sodium cyclamate in foods[S].
- [8] SN/T 1948-2007 进出口食品环己基氨基磺酸钠的检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].
SN/T 1948-2007 Determination of sodium cyclamate in foods for import and export-HPLC-MS/MS method [S].
- [9] 梁桂娟, 冯永渝, 田志强, 等. 超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS/MS)同时测定白酒中的微量甜味剂[J]. 酿酒科技, 2012 (008): 109-111.
Liang GJ, Feng YY, Tian ZQ, *et al.* Determination of Sweeteners Content in Liquor by UPLC-MS/MS [J]. Liquor-making Sci Technol, 2012 (008): 109-111.
- [10] 王群, 丁轶聪. 液相色谱串联质谱法测定酒类中甜蜜素含量的探讨和改进[J]. 化学分析计量, 2012, 21(4): 62-64.
Wang Q, Ding YC. Discussion and improvement for determination of sodium cyclamate in alcohol by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chem Anal Meter, 2012, 21(4): 62-64.
- [11] 曾绍东, 杜海群, 郭宏斌, 等. 超高压液相色谱-质谱法测定水果中添加的3种人工合成甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 239-244.
Zeng SD, Du HQ, Guo HB, *et al.* Determination of three synthetic sweeteners in fruits by ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(1): 239-244.
- [12] 郭莹莹, 乔善磊, 李磊, 等. 白酒和调香剂中4种人工合成甜味剂的UPLC-MS-MS测定[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 245-249.
Guo YY, Qiao SL, Li L, *et al.* Simultaneous UPLC-MS/MS determination of four artificial sweeteners in luzhou flavor liquor and flavoring agents [J]. Food Sci, 2010, 31(14): 245-249.
- [13] 夏于林, 李明春, 张莹, 等. 液相色谱串联质谱法同时测定白酒4种甜味剂方法研究[J]. 中国酿造, 2011, 3(228): 156-158.
Xia YL, Li MC, Zhang Y, *et al.* Simultaneous determination of four sweeteners in Chinese liquors by liquid chromatography mass spectrometry [J]. China Brew, 2011, 228(3): 156-158.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



马作江, 农艺师, 主要研究方向为食品检验。

E-mail: mazuoj@163.com