

# 超高效液相色谱-串联质谱测定饮料和酒中防腐剂与甜味剂

王震\*, 石丽珠

(徐州市产品质量监督检验中心, 徐州 221000)

**摘要:** **目的** 建立同时测定饮料和酒类中苯甲酸、糖精钠、脱氢乙酸、甜蜜素、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯丙酯添加剂的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。**方法** 样品经超高效 C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以乙腈:乙酸铵溶液(20 mmol·L<sup>-1</sup>)为流动相进行梯度洗脱, 在质谱负离子模式下进行检测。**结果** 经过系统优化, 测得 6 种食品添加剂在 0.1~100 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内呈现良好的相关性, 线性回归系数均大于 0.996, 其中苯甲酸检出限 0.005 μg·mL<sup>-1</sup>; 糖精检出限为 0.008 μg·mL<sup>-1</sup>, 甜蜜素检出限为 0.04 μg·mL<sup>-1</sup>, 脱氢乙酸检出限为 0.003 μg·mL<sup>-1</sup>, 对羟基苯甲酸乙酯检出限为 0.08 μg·mL<sup>-1</sup>, 对羟基苯丙酯检出限为 0.003 μg·mL<sup>-1</sup>, 回收率为 98.1~102.1%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏度高, 为饮料中防腐剂和甜味剂检测提供了实用的技术手段。**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱; 饮料; 酒; 防腐剂; 甜味剂

## Determination of preservative and sweetener in drink and wine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

WANG Zhen\*, SHI Li-Zhu

(Xuzhou Center for Products Quality Supervision and Inspection, Xuzhou 221000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a UPLC-MS/MS method of detecting benzoic acid, saccharin sodium, dehydrogenation acetic acid, sodium cyclamate, Ethyl p-hydroxybenzoate, Propyl p-hydroxybenzoate simultaneously in drink and wine. **Methods** The chromatographic separation was performed on a C<sub>18</sub> column with gradient elution, using acetonitrile and ammonium acetate (20 mmol·L<sup>-1</sup>) as mobile phase. The analyte was detected by MS in negative ion mode. **Results** Under the optimal conditions, the calibration curves of six food additives were a linear in the range of 0.1~100 μg/mL<sup>-1</sup>, with correlation coefficient more than 0.996. The limit of detection was found in the range of 0.005 μg·mL<sup>-1</sup> for benzoic acid, saccharin sodium for 0.008 μg·mL<sup>-1</sup>, sodium cyclamate for 0.04 μg·mL<sup>-1</sup>, dehydrogenation acetic acid for 0.003 μg·mL<sup>-1</sup>, ethyl p-hydroxybenzoate for 0.08 μg·mL<sup>-1</sup>, propyl p-hydroxybenzoate for 0.003 μg·mL<sup>-1</sup>. The spiked recoveries were between 98.1~102.1%. **Conclusion** The method was rapid, accurate, highly sensitive, providing practical techniques for the preservatives and sweeteners detection of beverage.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; drink; wine; preservative; sweetener

\*通讯作者: 王震, 工程师, 主要研究方向为食品检测技术。E-mail: 6933967@qq.com

\*Corresponding author: WANG Zhen, Engineer, Xuzhou Center for Products Quality Supervision and Inspection, Shangju Road, Xincheng district, Xuzhou 221000, China. E-mail: 6933967@qq.com

## 1 引言

中国作为第二大饮料生产国, 饮料市场已成为中国食品行业发展最快的市场之一<sup>[1]</sup>, 食品添加剂在推动饮料市场发展作出重要贡献<sup>[2]</sup>。根据食品安全国家标准《食品添加剂使用标准》规定能用于饮料和酒中的食品添加剂有: 苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、甜蜜素、对羟基苯甲酸酯类等添加剂, 并规定了具体适用范围和限量要求<sup>[3]</sup>。鉴于目前食品添加剂滥用现象严重, 本研究建立了同时分析6种添加剂的方法。

防腐剂和甜味剂目前常用方法有气相色谱法<sup>[4-6]</sup>, 液相色谱法<sup>[7-10]</sup>和质谱联用技术<sup>[11]</sup>, 洪爱萍等<sup>[12]</sup>建立了超高效液质联用技术同时测定饮料中苯甲酸的测定方法, 罗志刚等<sup>[13]</sup>建立了高效液相色谱技术同时测定饮料中合成色素、甜味剂和防腐剂的检测方法, 这些方法在测定食品添加剂有独到之处, 但由于方法本身的局限性, 每次仅能检测一种物质, 或者物质定性方面存在缺陷, 为了更准确、简便地测定饮料中的食品添加剂, 应用质谱分析方法可以解决由于单纯的色谱法通过保留时间进行定性, 专属性和特异性较差, 易产生假阳性或假阴性结果的现象<sup>[14]</sup>。本研究应用超高效液相色谱-质谱联用技术, 建立了能够同时测定饮料和酒中常用的6种甜味剂和防腐剂的方法, 对监管饮料和酒中添加剂提供技术支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与设备

TSQ Quantum Access MAX型三重四极杆液质联用仪, 配 Accela 高速液相色谱系统(美国赛默飞世尔公司); AB265-S型电子分析天平(美国梅特勒托利多); BS210S型电子天平(美国赛多利斯); AS-3120型超声清洗仪(浙江石浦海天电子仪器厂); 纯水仪(美国MILIPORE Milli-Q)。

### 2.2 试剂和标准品

甲醇(色谱纯), 德国 Merck 公司; 氨水(分析纯), 天津科密欧化学试剂开发中心; 乙酸铵(优级纯), 美国 Tedia 公司; 甲酸(色谱纯), 天津市光复精细化工研究所; 超纯水, 实验室自制。

标准品: 甜蜜素、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、糖精钠(均购于中国

家标准物质研究中心提供)。标准溶液配制: 精密称取0.05000 g 的标准物质, 用乙醇溶解, 配制成 1000 mg·L<sup>-1</sup> 的单标储备液, -18 °C 避光保存, 实验时根据仪器响应值大小配制成不同浓度单一标准溶液和混合标准溶液。

### 2.3 方法

分别量取20.0~40.0 mL 不同饮料, 含乳饮料, 放入 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙腈溶液, 以 7000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 收集滤液上机测定; 含二氧化碳或酒精样品放入 100 mL 烧杯中, 加小碎瓷片数片, 加热驱除二氧化碳或乙醇, 待其冷却后用流动相定容至 100 mL, 过 0.45 μm 滤膜直接上机测定, 进样体积 20 μL, 外标法定量, 同时做空白实验。

### 2.4 色谱条件

色谱柱: 超高效 C<sub>18</sub> 柱(10×0.21 cm, 1.9 μm); 流动相: A-乙腈, B-20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液(pH=4)(梯度洗脱程序见表 1); 柱温: 30 °C; 流量: 0.2 mL/min; 样体积: 10 μL。各色谱峰与相邻色谱峰之间分离度均大于 1.5, 拖尾因子均介于 0.95~1.05 之间, 混合标准溶液色谱图和样品色谱图分别见图 1 和图 2。

表 1 梯度洗脱条件  
Table 1 Gradient elution conditions

时间 (min)	A %	B %
0	20	80
2	20	80
10	85	15
12	85	15
15	20	80
18	20	80

### 2.5 质谱条件

质谱条件: 电喷雾电离(ESI), 负离子模式, 碰撞能量 20~50 V, 选择反应监测(SRM), 分辨率 Q1=0.7M, Q3=0.7M, 喷雾电压(Spray volt-age)3000 V, 鞘气(Sheath gas, N<sub>2</sub>)压力 39 psi, 毛细管加热温度(capillary temperature)270 °C, 辅助气(Aux gas pressure, Ar)压力 10 psi。载气: 氮气; 总离子流图扫描范围: 10~400 u; 选择监测离子见表 2。

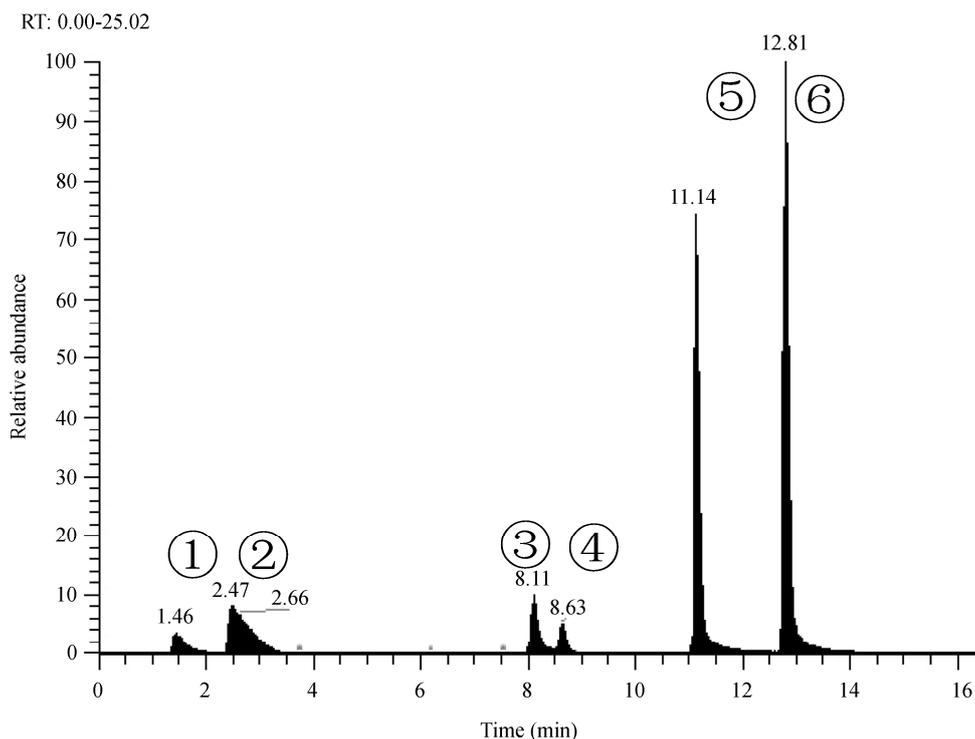


图 1 6 种食品添加剂标样液相色谱图

Fig. 1 LC-chromatogram of standard mixture of six food activities

注: ①糖精钠 saccharin sodium; ②甜蜜素 sodium cyclamate; ③苯甲酸 benzoic acid; ④脱氢乙酸 dehydrogenation acetic acid; ⑤对羟基苯甲酸乙酯, Ethyl p-hydroxybenzoate; ⑥对羟基苯甲酸丙酯 Propyl p-hydroxybenzoate

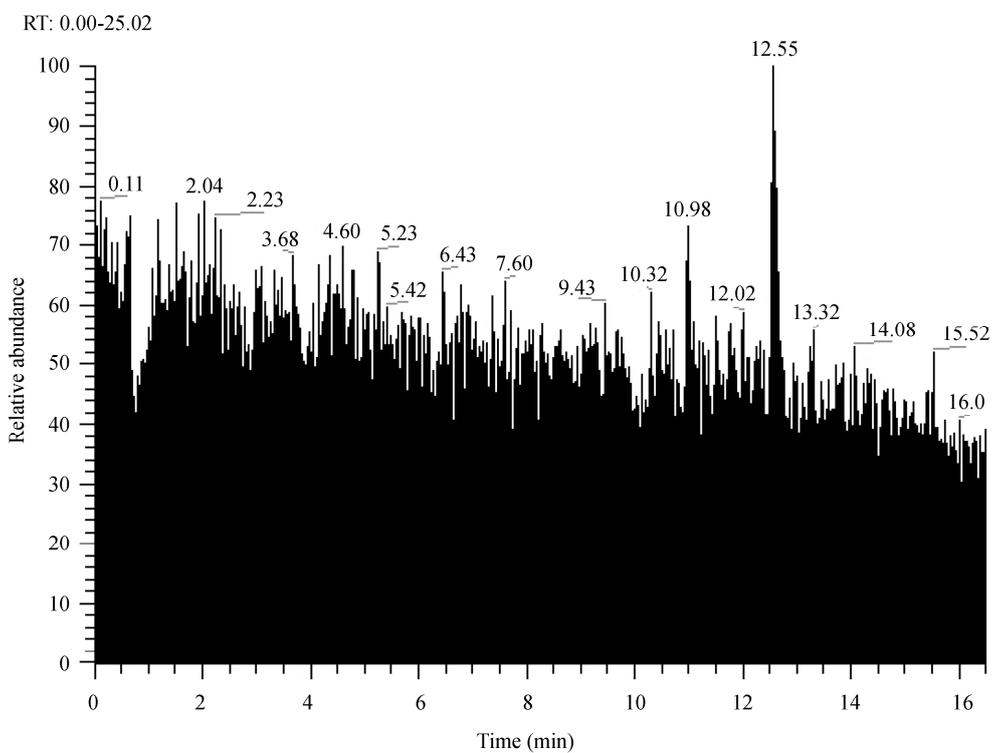


图 2 样品液相色谱图

Fig. 2 Sample LC-chromatograms

表 2 6 种食品添加剂定性和定量离子  
Table 2 Parent and daughter ions of six food additives

项目	母离子(m/z)	子离子(m/z)
脱氢乙酸	167	83,123
对羟基苯甲酸乙酯	165	92,137
对羟基苯甲酸丙酯	179	92,136
甜蜜素	178	80,96
苯甲酸	121	59,77
糖精钠	182	42,106

### 3 结果与讨论

#### 3.1 色谱、质谱条件的选择和优化

比较了乙腈-乙酸铵缓冲液、乙腈-甲酸溶液两种流动相体系对 6 种化合物色谱分离的影响, 结果表明采用乙腈-乙酸铵缓冲液作为流动相时的分离效果较好, 且基质干扰较少, 质谱响应信号较强。进一步优化了乙酸铵缓冲液的浓度, 以  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵缓冲液(用乙酸调节  $\text{pH}=4.0$ ) 和乙腈作为流动相, 流速为  $0.2 \text{ mL}/\text{min}$  时, 目标分析物的分离效果较好, 色谱峰对称。

通过 6 通阀的转换, 设置样品进入质谱的时间, 可以减少内源性杂质进入质谱影响分析, 同时空白样品按照待测样品的方法处理后, 利用待测样品的同样的梯度洗脱条件, 通过 HPLC 进行色谱洗脱, 同时用针泵将混合标准物质以恒定的速度注入, 两种溶液一并通过 T 型阀进入质谱仪, 进行待测物离子信号强度测定, 根据相应信号的变化, 进行色谱条件的优化, 大大降低基质和背景的干扰。

采用流动注射泵连续直接质谱进样, 对 6 种目标分析物标准品的质谱条件进行优化, 通过对质谱 ESI 离子源正离子和负离子模式进行 Q1 全扫, 结果表明, 各色素的负离子模式响应值均高于正离子模式相应值, 因此选择负离子检测模式, 同时在负离子模式下

进行全扫描以选择适当的电离方式, 根据不同化合物的响应和保留时间的差异, 对不同化合物的碰撞能量进行了优化。上述色谱-质谱条件下 6 种防腐剂和甜味剂混合标准溶液( $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 MRM 谱图见图 1。以上述准分子离子峰做相应目标物的选择性离子, 通过对峰面积积分, 外标法进行含量测定, 方法灵敏高。以保留时间及准分子离子峰而进定性, 减少假阳性现象<sup>[14]</sup>。6 种物质均采用负离子模式, 多反应监测(MRM), 对其进行扫描, 其全扫描质谱图及主要子离子和母离子见表 2。

#### 3.2 方法的线性、精密度和回收率

用标准储备液, 配制如下浓度的标准使用液: 苯甲酸  $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 糖精钠  $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 甜蜜素  $3 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 脱氢乙酸  $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对羟基苯甲酸乙酯  $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对羟基苯甲酸丙酯  $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , 置冰箱中保存, 进行色谱分析。将得到的混合标准溶液按照 2.4 的色谱条件进行分析, 以丰度和质量浓度分别为纵横坐标做图, 得到线性回归分析, 信噪比  $S/N=3$  计算检出限, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 本方法的检出限明显优于目前现行有效的国家标准检测方法, 满足国家对该类产品中 6 种添加剂的检测要求。

对同一样品进行 6 次平行测定, 计算含量和精密度, 向样品中加入一定量的 6 种标准溶液, 按实验方法处理测定, 计算回收率(见表 4)。精密度和回收率均满足定量要求。

#### 3.3 样品测定

对市场上销售的 40 种葡萄酒及饮料类进行检测, 3 份样品检出了糖精钠和甜蜜素, 其含量均在国家食品添加剂卫生标准中规定的含量范围内。具体样品测定结果见表 5。

表 3 方法的线性回归方程、线性范围及检出限 ( $S/N=3$ )  
Table 3 Regression equations, linear range and detection limit ( $S/N=3$ )

色素名称	回归方程	浓度范围( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	相关系数 $r$	检出限( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
				本研究	国标
苯甲酸	$y = 58558x + 5072.4$	0.1~100	0.9969	0.005	1.8 <sup>[15]</sup>
糖精钠	$y = 75511x - 73817$	0.1~100	0.9996	0.008	1.2 <sup>[16]</sup>
甜蜜素	$y = 6350617x - 3999494$	0.1~100	0.9977	0.04	4 <sup>[17]</sup>
脱氢乙酸	$y = 381313x + 456362$	0.1~100	0.9981	0.003	5 <sup>[18]</sup>
对羟基苯甲酸乙酯	$y = 4457511x - 1138426$	0.1~100	0.9984	0.08	1 <sup>[19]</sup>
对羟基苯甲酸丙酯	$y = 4\text{E}+06x - 8\text{E}+06$	0.1~100	0.9972	0.003	1 <sup>[19]</sup>

表 4 方法的精密度和回收率  
Table 4 The precision and recoveries of method

项目	样品本底 (mg)	RSD (% , n=6)	添加量 (mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)
苯甲酸	5.41	0.8	10.0	15.22	98.1
糖精钠	4.37	1.1	10.0	14.43	100.6
甜蜜素	4.78	0.9	10.0	14.68	99.0
脱氢乙酸	0.00	0.4	10.0	9.81	98.1
对羟基苯甲酸乙酯	0.00	1.1	10.0	10.21	102.1
对羟基苯甲酸丙酯	0.00	0.5	10.0	9.88	98.8

表 5 样品测定结果  
Table 5 Concentrations of food additives in different samples

单位: g/L  
unit: g/L

样品	苯甲酸	糖精钠	脱氢乙酸	对羟基苯甲酸乙酯	对羟基苯甲酸丙酯	甜蜜素
葡萄酒 A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
葡萄酒 B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
葡萄酒 C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
饮料 A	ND	ND	ND	ND	ND	0.42
饮料 B	ND	0.42	ND	ND	ND	ND
饮料 C	ND	0.35	ND	ND	ND	0.53

注: ND 未检出

## 4 结 论

建立了一种以超高效液相色谱-串联质谱技术同时检测饮料中国内外允许使用的 6 种防腐剂和甜味剂的方法, 与国标相比, 减少了前处理的步骤, 缩短了实验时间, 提高了回收率, 通过对定量离子和定性离子比例来定性, 提高物质定性的准确度, 减少了假阳性和假阴性的现象。本方法快速、准确、灵敏度高, 为饮料中防腐剂和甜味剂检测提供了实用的技术手段, 对监测食品中添加剂使用情况具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 饮料行业分析精辟版[EB/OL]. <http://wenku.baidu.com/view/631334da80eb6294dd886c0f.html>  
Beverage industry analysts incisive version[EB/OL].<http://wenku.baidu.com/view/631334da80eb6294dd886c0f.html>
- [2] 陈建文, 厉华明, 周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法[J]. 中国酿造, 2008, 185(8): 4-6.  
Chen JW, Zhang Y, Zhou RR. Utilization and detection method of P-hydroxybenzoate in food-stuff[J]. China Brewing, 2008, 185(8): 4-6.
- [3] GB2760-2011. 食品安全国家标准 食品添加剂卫生标准[S]. 2011.  
GB2760-2011. The National food safety standard-standards for uses of food additives[S]. 2011.
- [4] 宗万里, 曲淑霞, 鲁刚. 毛细管气相色谱法测定果汁饮料中对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯的含量[J]. 饮料工业, 2012, 15(8): 37-39.  
Zong WL, Qu SX, Lu G. Determination of 4-hydroxybenzoic acid ethyl ester and 4-hydroxybenzoic acid propyl ester in fruit juice beverages by CGC[J]. Beverage Ind, 2012, 15(8): 37-39.
- [5] 陈利国, 曹小严, 黄辉, 等. 毛细管气相色谱法直接测定食品中 4 种对羟基苯甲酸酯[J]. 食品与机械, 2010, 16(1): 67-70.  
Chen LG, Cao XY, Huang H, *et al.* Directly determination of 4 Para-hydroxybenzoic acid esters in foods by capillary gas chromatography[J]. Food Machinery, 2010, 26(1).
- [6] 杨玉. HPLC-UV 法快速检测食品中的环己基氨基磺酸钠[J]. 长江大学学报(自然科学版). 2012, 9(5): 32-35.  
Yang Y. Rapid determination of sodium cyclamate in food by HPLC-UV[J]. J Yangtze Univ (Nat Sci Edit), 2012, 9(5): 32-35.
- [7] 张均娟, 刘伟娟, 薛刚. 含乳饮料中甜蜜素的测定[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 136-138.  
Zhang JM, Liu WJ, Xue G. The determination of sodium cyclamate in lactated beverages by HPLC[J]. Food Research and Development, 2005, 26(1): 136-138.

- mate in milk beverage[J]. Food Res Development. 2005, 26(1): 136-138.
- [8] 王峰. 超高效液相色谱法测定食品中的脱氢乙酸[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 88-91.  
Wang F. Determination of dehydroacetic acid in food by UPLC[J]. Food Res Development, 2013, 34(16): 88-91
- [9] 罗成玉. 果冻中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠、脱氢乙酸同时检测方法[J]. 上海计量测试, 2013, 1: 34-38.  
Luo CY. Simultaneous determination of acesulfame, benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium and dehydroacetic acid in jelly[J]. Shanghai Measurement Testing, 2013, 1: 34-38.
- [10] 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 foods [S].
- [11] 凌云, 储晓刚, 张峰. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定调味料中的 17 种防腐剂和抗氧化剂[J]. 色谱, 2011, 29(8): 723-730.  
Ling Y, Chu X, Zhang F, *et al.* Simultaneous determination of 17 preservatives and antioxidants in condiments using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(8): 723-730.
- [12] 洪爱华, 尹平河, 马义. 高效液相色谱-质谱联用法测定饮料中的苯甲酸含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(2): 970-972.  
Hong AH, Yin PH, Ma Y, *et al.* Determination of benzoic acid in drink by HPLCMS/MS[J]. Chin J Spectrosc Lab, 2011, 28(2): 970-972.
- [13] 罗志刚, 唐昊天, 孙伯文. 高效液相色谱法同时测定饮料中合成色素、甜味剂和防腐剂[J]. 实用预防医学, 2010, (8): 1656-1658.  
Luo ZG, Tang HT, Sun BW. HPLC Method for simultaneous determination of synthetic pigments, sweeteners and preservatives in drink[J]. Pract Prev Med, 2010, 17(8): 1656-1658.
- [14] 李明春, 张莹, 尹礼国. 白酒中甜蜜素测定方法的研究进展[J]. 酿酒科技, 2010, 193(7): 93-95.  
Li MC, Zhang Y, Yin LG. Research advance in the determination of sodium cyclamate in liquor[J]. Liquor-Making Sci Technol, 2010, 193(7): 93-95.
- [15] GB/T 5009.29-2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].  
GB/T 5009.29-2003 Determination of sorbic acid and benzoic acid in foods[S].
- [16] GB/T 23495-2009 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定 高效液相色谱法[S].  
GB/T 23495-2009 Determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in foods-High performance liquid chromatography method[S].
- [17] 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 beverages[S].
- [18] GB/T 23377-2009 食品中脱氢乙酸的测定 高效液相色谱法[S].  
GB/T 23377-2009 Determination of dehydroacetic acid in food-High performance liquid chromatography[S].
- [19] GB/T 5009.31-2003 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定[S].  
GB/T 5009.31-2003 Determination of p-hydroxybenzoic acid esters in foods[S].

(责任编辑: 邓伟)

## 作者简介



王震, 工程师, 主要研究方向为食品检测技术。  
E-mail: 6933967@qq.com