

# 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定饮料中 22种添加剂

刘印平, 路 杨, 杨立新, 常凤启, 王丽英\*

(河北省疾病预防控制中心, 石家庄 050021)

**摘要:** **目的** 建立了超高效液相色谱-串联质谱法(ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)同时测定饮料中 22 种食用添加剂的方法, 包括 6 种防腐剂, 5 种甜味剂, 5 种抗氧化剂和 6 种着色剂。**方法** 试样经乙腈/水溶液超声提取, 离心, 上清液用水稀释后液相色谱-串联质谱仪直接测定, 外标法定量, 整个过程可在 0.5 h 内完成。**结果** 在 5~320  $\mu\text{g/L}$  的线性范围内, 各物质线性相关系数均大于 0.995。加标回收率范围为 63.3%~107.9%, 方法检测限在 0.05~0.4 mg/kg 之间, 相对标准偏差在 7.0%~14.8%之间。**结论** 将本方法用于实际样品分析, 简便快速, 灵敏度高, 可以满足对饮料中多种食品添加剂的同时测定。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 饮料; 添加剂; 快速测定

## Simultaneous determination of 22 additives in beverage by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Yin-Ping, LU Yang, YANG Li-Xin, CHANG Feng-Qi, WANG Li-Ying\*

(Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 22 food additives, including 6 preservatives, 5 sweeteners, 5 antioxidants and 6 colorants in beverage by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) simultaneously. **Methods** Samples were extracted by acetonitrile/water and the extract was centrifuged at 10000 r/min for 10 min. Then supernatant was diluted and injected directly into the mass spectrometer. The whole procedure could be completed within 0.5 h. Quantification was based on external calibration. **Results** The correlation coefficient was higher than 0.995 in the range of 5~320  $\mu\text{g/L}$ . The average recovery of 22 food additives in fruit juice was 63.3%~107.9%. The limit of quantitation was from 0.05 mg/kg to 0.4 mg/kg and the relative standard deviation was between 7.0% and 14.8%. **Conclusion** This quantitative method has many advantages including simple pretreatment, rapid determination and high sensitivity, which can be applied to the real determination.

**KEY WORDS:** ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; beverage; additives; fast determination

基金项目: 河北省科技厅平台建设项目(JB0011966123D)

**Fund:** Supported by the Platform Construction in Science and Technology Department of Hebei Province (JB0011966123D)

\*通讯作者: 王丽英, 博士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: article88@163.com

\*Corresponding author: WANG Li-Ying, Associate Professor, Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, No.97, Huai'an East Road, Yuhua District, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: article88@163.com

## 1 引言

在饮料中加入一些添加剂,以此来改善其品质,延长储存时间,提高饮料的色、香、味等感官质量。虽然高品质的饮料离不开食品添加剂的应用,国家对饮料中的食品添加剂也有着严格的控制标准,但若食品添加剂本身存在质量问题,或者过量添加和长期饮用,就会给人体健康带来极大危害<sup>[1-4]</sup>。因此,加强对饮料制品中的食品添加剂的检验,保证其规范使用有重要意义。

随着我国对添加剂添加要求越来越严格<sup>[5]</sup>,市场上出现了越来越多的食用添加剂多成分复合添加情况,主要有防腐剂、甜味剂、酸味剂、着色剂、抗氧化剂、香精香料等,而且多是化学合成的食品添加剂。基于质谱的分析成本较高,近年来虽然有很多高效液相色谱检测饮料中多种添加剂的报道<sup>[6-9]</sup>,但由于传统的液相色谱紫外检测器的通用性,有时会因为杂质的干扰造成假阳性样品的误判,已不能满足分析需要。因此,有必要发展一种前处理简便快速、仪器方法高效灵敏、定性定量准确可靠的多种添加剂同时分析方法。

超高效液相色谱(ultra high-performance liquid chromatography, UHPLC)分析速度快,分离效率高,质谱灵敏度高,专一性强。因此超高效液相色谱质谱联用逐渐成为分析微量、痕量禁用成分的首选方法<sup>[10-14]</sup>。李晶等<sup>[15]</sup>利用 SPE 固相萃取柱净化样品,富集目标物质,超高效液相色谱串联质谱同时检测饮料中13种禁用食品添加剂。

本研究进一步降低了分析成本,样品经超声萃取并离心后,上清液直接进入超高效液相色谱-串联质谱仪分析,建立了饮料中22种痕量添加剂的分析技术,包括6种防腐剂,5种甜味剂,5种抗氧化剂和6种着色剂。方法快速准确,灵敏度满足检测要求,为饮料安全监管和质量评定提供了更为简便快速、科学准确的检验方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

液相色谱-串接三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司); TDL-5-A 型离心机(上海安亭); AE200

分析天平(瑞士 METTLER 公司); Waters Acquity UPLC™ Hss T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司)。

标准物质:日落黄、喹啉黄、诱惑红、专利蓝、亮蓝、赤藓红、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、阿斯巴甜、纽甜、没食子酸丙酯、没食子酸辛酯、没食子酸月桂酯、特丁基对苯二酚(TBHQ)、丁羟基茴香醚(BHA)购自 Dr. E GmbH (德国 Augsburg 公司); 苯甲酸、山梨酸、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯购自 Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (德国 Steinheim 公司)。乙腈(色谱级, Fisher 公司); 冰乙酸(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 乙酸铵(优级纯, 天津永大化学试剂有限公司)。

### 2.2 样品前处理

准确称取 5.0 g 样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈-水溶液(8:2, v:v),充分混合。超声萃取 10 min, 10000 r/min 离心 10 min(温度 4 °C), 将上清液转移至 50 mL 聚丙烯离心管中,用水定容至刻度。取 1 mL 用于超高效液相色谱-串联质谱法(ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)直接测定。

### 2.3 液相色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC™ Hss T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。

流动相: A, 乙腈; B, 20 mmol/L 乙酸铵溶液(1.544 g 乙酸铵, 蒸馏水溶解并定容至 1000 mL)。

梯度淋洗条件见表 1, 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件  
Table 1 Gradient elution of liquid chromatography

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	5	95
1.5	5	95
5.5	55	45
7.0	99	1
9.0	99	1
9.1	5	95

## 2.4 串接质谱仪操作条件

毛细管电压: 3.0 kV; 源温度: 100 °C; 脱溶剂气(高纯氮, >99.999%)温度: 350 °C; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气体流量: 600 L/h; 锥孔反吹气 60 L/h; 碰撞气: 高纯氩 Ar。

## 2.5 标准储备液和标准工作溶液的配制

准确称取标准品各 20 mg(精确至 0.1 mg), 分别用 50% 甲醇水溶解并定容至 10 mL, 配制成一定浓度的标准储备液。

将以上各标准储备液用自制橙汁的提取液稀释, 配成混合标准工作溶液。

## 3 结果与讨论

### 3.1 质谱条件优化

根据化合物的化学性质, 在两种电离模式下(ESI+和 ESI-), 通过直接进样法确定目标物的母离子和特征子离子。通过质谱条件优化, 结合色谱条件, 其保留时间、电离模式, 质谱优化参数见表 2, 色谱图见图 1 和图 2(图 1 和图 2 分别为正离子和负离子模式下 22 种食品添加剂的色谱图)。

### 3.2 方法的线性范围和检出限

在优化的条件下, 对所配制的 5、20、80、160、

表 2 主要参考质谱参数  
Table 2 Parameters for the UHPLC-MS/MS analysis of 22 additives

化合物	保留时间(min)	电离模式	定性(定量)离子	碰撞能量(eV)	定量限(mg/ kg)
安赛蜜	1.52	ESI-	161.8>77.8 (81.8)	25,15	0.15
糖精钠	2.34	ESI-	181.9>105.9(41.9)	20,20	0.15
甜蜜素	3.06	ESI-	177.9>79.8(95.9)	25,30	0.15
阿斯巴甜	3.97	ESI-	293>200(261)	15,13	0.15
苯甲酸	4.68	ESI-	121>77	10	0.1
山梨酸	4.71	ESI-	111>67	9	0.1
尼泊金丙酯	4.77	ESI-	211>123.9(168.9)	22,22	0.1
尼泊金甲酯	4.80	ESI-	150.9>91.8(135.9)	20,16	0.1
尼泊金乙酯	5.43	ESI-	165>91.8(135.9)	20,16	0.1
纽甜	5.50	ESI-	377>200(345)	18,12	0.05
BHA	6.03	ESI-	179>91.8(136)	20,18	0.1
尼泊金丁酯	6.55	ESI-	193 >91.8(136)	20,18	0.1
没食子酸丙酯	6.81	ESI-	179 >149(163.9)	15,25	0.05
TBHQ	6.81	ESI-	164.9>109(149.9)	20,28	0.05
没食子酸辛酯	7.00	ESI-	281>123.9(168.9)	28,20	0.05
没食子酸月桂酯	7.90	ESI-	337>123.9(168.9)	28,28	0.05
日落黄	3.47	ESI+	429>207(171)	38,40	0.4
喹啉黄	3.60	ESI+	432>352(288)	28,36	0.1
诱惑红	3.69	ESI+	473>415(181.8)	30,30	0.1
亮蓝	4.45	ESI+	747>170(561)	60,45	0.2
赤藓红	4.84	ESI+	834.5>127(663.3)	60,30	0.1
专利蓝	5.34	ESI+	559>435(479)	49,33	0.2

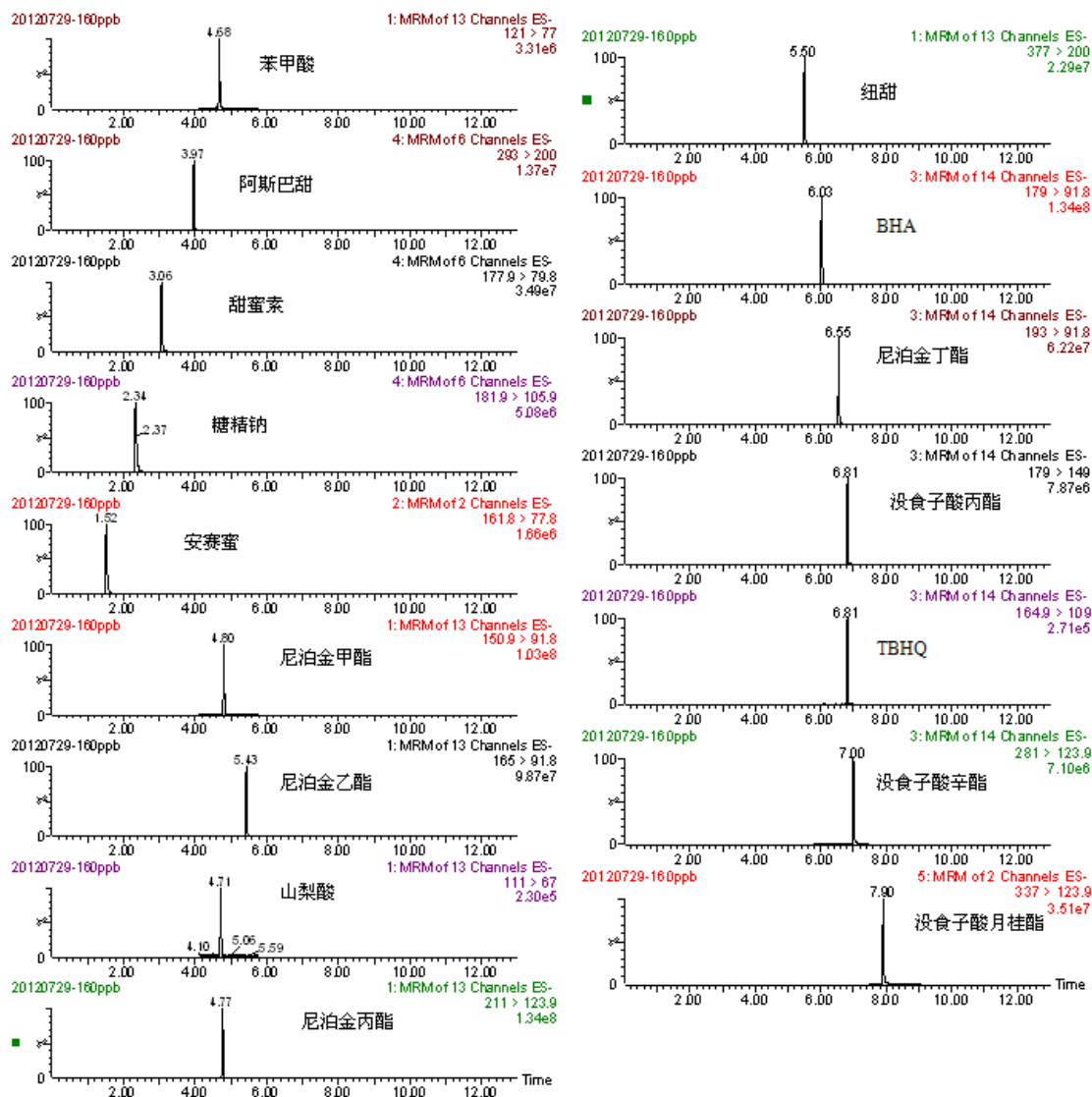


图 1 添加剂(防腐剂, 甜味剂和抗氧化剂)标准色谱图(ESI-电离模式下)

Fig. 1 The chromatogram of preservatives, sweeteners and antioxidants (160 ng/mL, ESI-)

320  $\mu\text{g/L}$  系列浓度的混合标准溶液进行测定, 以目标物质的色谱峰面积对其质量浓度进行线性回归拟合, 发现 22 种食用添加剂物质在相应浓度范围内, 线性相关关系良好, 相关系数均大于 0.995, 定量限为 0.05~0.4 mg/kg。

### 3.3 回收率和精密度

在确定的实验条件下, 向自制的橙汁样品中添加高(2 mg/kg)、中(1 mg/kg)、低(0.1 mg/kg)三水平的混合标准溶液, 每个添加水平重复 6 次, 进行加标回收率和精密度的测定。结果见表 3, 加标回收率范围为 63.3%~107.9%, 相对标准偏差(RSDs)在 7.0%~14.8%之间, 说明方法准确可靠, 重现性高。

### 3.4 实际样品测定

对超市和市场随机购买的 13 份饮料进行了测定, 一个样品检出亮蓝, 含量为 0.46 mg/kg。2 个样品检出安赛蜜, 含量分别为 0.65 mg/kg 和 0.77 mg/kg。虽然含量不高, 但如果长期饮用, 对于一些敏感人群, 如青少年儿童的身体健康还是有一定风险的。

## 4 结论

本研究建立的高效液相色谱-串联质谱联用法测定饮料中 22 种痕量添加剂, 方法简单快速, 灵敏度高, 适用于饮料中多种添加剂的确认和定量, 可以在饮料产品的监管及监督中发挥重要作用。

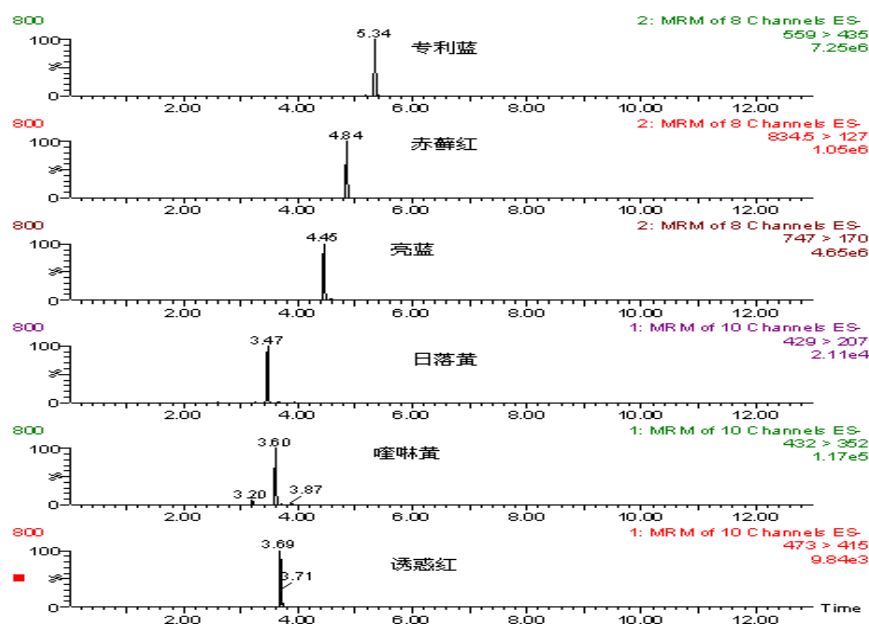


图2 添加剂(着色剂)标准色谱图(ESI+电离模式下)

Fig. 2 The chromatogram of colorant standard solution (800 ng/mL, ESI+)

表3 加标回收结果

Table 3 Recovery results

化合物	加标量 0.1 mg/kg		加标量 1 mg/kg		加标量 2 mg/kg	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
安赛蜜	71.5	10.8	78.1	11.9	93.2	13.6
糖精钠	72.3	8.3	79.2	9.6	104.1	10.8
甜蜜素	65.5	9.7	76.0	14.2	89.7	8.1
阿斯巴甜	67.1	11.5	69.9	10.5	83.4	14.6
苯甲酸	67.6	13.5	75.5	13.1	82.8	14.6
山梨酸	69.1	10.6	72.9	11.5	80.6	12.4
尼泊金丙酯	63.6	12.8	73.7	14.5	104.4	8.4
尼泊金甲酯	72.0	9.8	73.9	13.6	96.4	14.1
尼泊金乙酯	64.1	14.3	82.2	13.4	78.0	10.1
纽甜	73.5	9.9	77.7	13.6	80.3	14.6
BHA	74.2	13.1	80.5	13.1	83.9	9.1
尼泊金丁酯	65.0	7.6	89.1	9.3	98.8	8.2
没食子酸丙酯	67.2	8.3	73.5	11.5	86.3	9.4
TBHQ	63.6	8.8	93.7	7.0	104.7	14.6
没食子酸辛酯	64.6	13.1	79.6	14.1	95.0	9.1
没食子酸月桂酯	68.4	7.6	77.4	9.3	86.7	8.2
日落黄	64.2	8.3	74.0	11.5	86.3	9.4
喹啉黄	68.9	8.8	88.6	8.3	107.9	14.8
诱惑红	63.4	11.3	73.3	7.1	90.5	14.0
亮蓝	63.3	10.1	82.0	9.7	90.7	13.1
赤藓红	66.2	11.6	73.8	11.4	97.1	10.1
专利蓝	77.1	14.1	70.6	14.3	91.2	13.4

## 参考文献

- [1] Lubick N. Artificial sweetener persists in the environment [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 3125–3125.
- [2] 鲁琳, 杭义萍, 高燕红. 高效液相色谱法快速检测乳饮料中常用甜味剂[J]. *食品科学*, 2009, 10: 166–168.  
Lu L, Hang YP, Gao YH. Rapid determination of common sweeteners in milk beverage by HPLC [J]. *Food Sci*, 2009, 10: 166–168.
- [3] 汪辉, 曹小彦, 陈利国, 等. 高效液相色谱法同时测定蜜饯中5种常见食品添加剂[J]. *分析实验室*, 2007, 26(11): 119–122.  
Wang H, Cao XY, Chen LG, *et al.* Simultaneous determination of five food additives in succade by HPLC [J]. *Anal Lab*, 2007, 26(11): 119–122.
- [4] 陈晓红, 李小平, 姚浔平. 高效液相色谱-质谱联用法测定饮料中人工合成色素的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 8(15): 941–942.  
Chen XH, Li XP, Yao XP. Determination of synthetical pigments in drinks by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 8(15): 941–942.
- [5] GB 2726-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].  
GB 2726-2011 National food safety standards -Standards for use of food additives [S].
- [6] 邓立刚, 李增梅, 赵善仓. 高效液相色谱法测定乳饮料和果汁饮料中的安赛蜜和糖精钠[J]. *山东农业科学*, 2007, (3): 102–103.  
Deng LG, Li ZM, Zhao SC. Determination of acesulfame and sodium saccharin in milk drink and fruit drink by high performance liquid chromatography [J]. *Shandong Agric Sci*, 2007, (3): 102–103.
- [7] 马康, 蒋孝雄, 赵敏, 等. 高效液相色谱法同时测定软饮料中20种食品添加剂[J]. *分析化学*, 2012, 40(11): 1661–1667.  
Ma K, Jiang XX, Zhao M, *et al.* Simultaneous determination of 20 food additives in drinks by high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array detector [J]. *Anal Chem*, 2012, 40(11): 1661–1667.
- [8] 李颖. 高效液相色谱法测定调味品和饮料中常见17种食品添加剂[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(11): 2738–2740.  
Li Y. Determination of seventeen food additives in spice and drink by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(11): 2738–2740.
- [9] 汪辉, 曹小彦, 李林, 等. 反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中14种常见食品添加剂的快速测定[J]. *分析测试报*, 2009, 28(10): 1194–1197.  
Wang H, Cao XY, Li L, *et al.* Determination of fourteen familiar food additives in fruit and vegetable drink by fast reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2009, 28(10): 1194–1197.
- [10] Berset JD, Ochsenbein N. Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. *Chemosphere*, 2012, 88: 563–569.
- [11] Kim JW, Ramaswamy BR, Chang KH, *et al.* Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 3511–3520.
- [12] Koyama M, Yoshida K, Uchibori N, *et al.* Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS [J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2005, 46: 72–78.
- [13] 柯润辉, 王丽娟, 安红梅, 等. 超高压液相-质谱/质谱法快速测定饮料中8种甜味剂[J]. *饮料工业*, 2013, 16(9): 35–37.  
Ke RH, Wang LJ, An HM, *et al.* Simultaneous determination of 8 sweeteners in beverage by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Bev Ind*, 2013, 16(9): 35–37.
- [14] 李帮锐, 冯家力, 潘振球, 等. 高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定饮料中的人工合成色素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(4): 579–585.  
Li BR, Feng JL, Pan ZQ, *et al.* Determination of synthetical pigments in drinks by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(4): 579–585.
- [15] 李晶, 徐济仓, 缪明明, 等. 固相萃取-超高效液相色谱/串联质谱同时检测饮料中13种禁用食品添加剂[J]. *分析科学学报*, 2013, 29(4): 488–492.  
Li J, Xu JC, Miao MM, *et al.* Solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tradem mass spectrometry for simultaneous determination of 13 restricted food additives in beverage [J]. *J Anal Sci*, 2013, 29(4): 488–492.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



刘印平, 硕士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: liuyinping1983@163.com



王丽英, 博士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: article88@163.com

---

## “食源性致病微生物”专题征稿

食源性致病微生物的危害一直是食品安全关注的焦点之一, 微生物污染造成的食源性疾病是世界食品安全中最突出的问题。常见的食源性致病微生物主要包括细菌、病毒、寄生虫等, 食源性病原体的种类仍在增加, 对食品安全以及人类自身健康已经构成了不容忽视的威胁。

鉴于此, 本刊特别策划了“食源性致病微生物”专题, 由南昌大学的许杨教授

担任专题主编。许教授为国务院特殊津贴专家, 国家重点学科食品科学学科带头人, 兼任中国营养学会第七届理事会理事, 中国微生物学会微生物毒素专业委员会委员, 国家自然科学基金评审委员会委员, 江西省营养学会理事长。

“专题”将紧紧围绕以下 8 个问题进行论述, 计划在 2015 年 7 月出版。

- 1、食源性致病微生物的分离和检测新技术的研究;
- 2、主要食源性致病微生物控制的研究;
- 3、食源性致病菌的毒力特征与耐药性的研究;
- 4、低水分活度食品微生物安全的研究;
- 5、亚致死食源性致病菌的多重修复的研究;
- 6、食品生产过程中食源性致病微生物的防控研究;
- 7、食源性致病微生物的市场监控和溯源;
- 8、食源性致病微生物流行病学的调查与分析。

本刊编辑部及许杨教授特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、实验报告、研究论文均可, 请在 2014 年 6 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部