

# 高效液相色谱法测定饮料中三氯蔗糖的含量的优化

李 桑\*, 刘嘉飞, 王立亚, 齐春艳, 曾雪芳

(广东省食品检验所, 广州 510435)

**摘要:** **目的** 优化高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测饮料中三氯蔗糖的含量。**方法** 采用配备示差折光检测器的高效液相色谱仪, 使用  $C_{18}$  反相色谱柱, 选择甲醇: 0.125%磷酸氢二钾=40:60(V/V)作为流动相, 在 0.8 mL/min 的流速下进行检测。**结果** 该方法在 20~400 mg/L 范围内, 三氯蔗糖的浓度与峰面积的相关性良好, 标准曲线为  $Y=207.99X+274.1$ ,  $r=0.9999$ , 改进后方法回收率在 94.28%~107.16%之间, 改进后检出限为 0.0024 g/kg。**结论** 该方法不仅能够达到国家标准的要求, 并且快速、灵敏、环保, 提高了高效液相色谱检测饮料中三氯蔗糖的检测效率和安全性。

**关键词:** 饮料; 三氯蔗糖; 高效液相色谱法; 示差检测器

## Optimization the method of determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography

LI Sang\*, LIU Jia-Fei, WANG Li-Ya, QI Chun-Yan, ZENG Xue-Fang

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the method for determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** According to the GB 22255-2014, the sucralose content in samples was determined by HPLC with refractive index detector (RID), using  $C_{18}$  reversed phase as chromatograph column. The methanol and 0.125% potassium hydrophosphate (40:60, V/V) was as mobile phase, and the samples was measured at a flow rate of 0.8 mL/min. **Results** In the range of 20-400 mg/L, there was a good correlation between the concentration of sucralose and the peak area. The standard curve was  $Y=207.99X+274.1$  with  $r=0.9999$ . At the spiked levels, the recoveries were 94.28%-107.16%. The limit of detection of sucralose was 0.0024 g/kg. **Conclusion** This method can not only meet the requirements of national standard, but it is fast, sensitive and environmentally friendly, which improves the detection efficiency and safety of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography.

**KEY WORDS:** beverage; sucralose; high performance liquid chromatography; refractive index detector

\*通讯作者: 李桑, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 215236031@qq.com

\*Corresponding author: LI Sang, Master, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: 215236031@qq.com

## 1 引 言

三氯蔗糖又名三氯半乳糖<sup>[1]</sup>、蔗糖素, 是一种白色或近白色结晶性粉末的蔗糖衍生物, 其甜度约为蔗糖的 600 倍。由于食糖是一种高热量、低甜度的食品添加剂<sup>[2]</sup>, 长期服用易导致肥胖、高血脂等健康问题, 因此低热量、高甜度的三氯蔗糖越来越普遍用于食品添加剂中。但是, 三氯蔗糖对人体健康也可能产生一些危害<sup>[3]</sup>, 所以我国对三氯蔗糖的添加有一定的限量。

食品中三氯蔗糖测定方法包括离子色谱法<sup>[4-6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7-13]</sup>、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[14]</sup>等, 其中以高效液相色谱法为主。现有的食品安全国家标准 GB 22255-2014《食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》<sup>[15]</sup>中对于饮料中的三氯蔗糖的测定, 经实际实验发现, 具有检测过程长、灵敏度不高、实验试剂毒副作用大等缺点。随着人们日益增长的食品需求, 检测样品的数量也急剧升高, 国家标准的检测效率低下, 对检测人员的工作提出了挑战, 所以需要对现有分析方法进行优化改进。

本研究对 GB 22255-2014<sup>[15]</sup>规定的食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的高效液相色谱法进行改进, 对仪器分析条件进行优化, 通过比较不同流动相和流速的分离效果, 提高了方法的检测速度、灵敏度和环保性。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(配 RID-20A 示差折光检测器, 岛津企业管理(中国)有限公司); MS 105DU 分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AutoEVA-60 氮吹仪(美国 Reeko 公司)。

Oasis HLB 固相萃取柱(200 mg, 类型为 *N*-乙基吡咯烷酮和二乙烯苯亲水亲脂平衡型填料, 使用前依次用 4 mL 甲醇、4 mL 水活化)(美国 Waters 公司); 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜(美国 Agilent Technologies 公司);  $\text{C}_{18}$  反相色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 日本 GL Sciences 公司)。

三氯蔗糖标准品(纯度为 98.8%, 北京曼哈格生物科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 甲醇、磷酸氢二钾(分析纯, 广州化学试剂厂)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 色谱条件

本研究的实验方法参考国标方法<sup>[15]</sup>,  $\text{C}_{18}$  反相色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测池温度 35 $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 检测器: 示差检测器。

国标方法: 流速: 1.0 mL/min, 流动相: 乙腈:水

=89:11(*V:V*)。

改进后实验方法: 流速: 0.8 mL/min, 流动相: 甲醇:0.125%磷酸氢二钾=40:60(*V:V*)。

#### 2.2.2 标准储备液配制

精确称取三氯蔗糖标准品 0.100 g 于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解完全后, 定容至刻度, 浓度约为 10 mg/mL, 放入 2~8  $^{\circ}\text{C}$  箱中储存备用, 保质期 6 个月。

#### 2.2.3 标准工作曲线绘制

分别精确移取三氯蔗糖标准储备液稀释成以下系列浓度: 20、50、100、200、400 mg/L。进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。以浓度(*X*, mg/L)为横坐标, 峰面积(*Y*)为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

#### 2.2.4 样品前处理方法

精确称取 5 g(精确到 0.001 g)试样, 置于 25 mL 塑料离心管中, 加入 5 mL 超纯水稀释, 涡旋混合器上振荡 30 min, 以 3000 r/min 离心 10 min。取全部上清液移入预先活化的固相萃取柱, 控制液体流速为每秒 1 滴, 柱上液面为 2 mm 左右时加入 1 mL 的超纯水, 继续保持液体流速不超过每秒 1 滴, 到柱中液体完全排出后, 用 3 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液。将洗脱液置于氮吹仪中吹干, 残渣用 1.00 mL 流动相溶解后, 溶液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 滤液为制备的试样溶液, 备用。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件的优化

为了将出峰时间提前, 实验从流动相和流速上进行了优化。GB 22255-2014《食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》的方法中流动相为乙腈:水=89:11(*V:V*), 流速为 1.0 mL/min; 本研究使用甲醇:0.125%磷酸氢二钾=40:60(*V:V*)为流动相, 流速为 0.8 mL/min, 进行分析。检测图谱如图 1。

由图 1(a)、(b)可以看出, 国标方法的出峰时间较晚, 且响应值较低。本研究比国标方法的目标峰出峰时间早, 缩短了 1 倍多的时间, 且响应值显著高于国标方法。

通过 *t*-检验 2 种方法得出的样品浓度无显著性差异( $P>0.05$ )。根据表 1~表 4 可以看出, 2 种方法在阴性样品与样品的加标回收率均在 90%以上, 具有良好的回收率。本研究在加入定量限与检出限浓度的样品中均具有良好的回收率。通过 *t*-检验 2 种方法, 在相同的前处理条件下, 本研究方法的响应值(峰面积)显著大于国标方法的响应值( $P<0.05$ )。GB 22255-2014《食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》中规定, 当取样量 2.00 g, 定容至 1.00 mL 时, 检出限均为 0.0024 g/kg, 定量限均为 0.0075 g/kg。在本对比实验中, 由表 1 和表 3 可以看出, 在阴性样品中加入检出限与定量限值的标准物质, 国标方法并无响应, 本研究方法具有较好的回收率。国标方法直至加入 4 倍检出限值才有响应。由此可见, 本研究方法完全能够达到国标方法的要求。

3.2 检出限及定量限

浓度为 20 mg/L 的三氯蔗糖标准品溶液, 进样量为 20  $\mu$ L 时, 测得的信噪比为 49.61, 以 3 倍信噪比计算, 本研究方法的检出限为 0.0024 g/kg, 与国标方法中的检出限 0.0025 g/kg 基本一致, 样品最低检出浓度为 0.0025 g/kg, 可以满足测定的需要。以 10 倍信噪比进行计算, 定量限为 0.0081 g/kg。

3.3 线性结果

取样 20  $\mu$ L 浓度为 20、50、100、200、400 mg/L 的标准品溶液进样检测。以浓度( $X$ , mg/L)为横坐标, 峰面积( $Y$ )为纵坐标, 绘制标准工作曲线见图 2, 由图 2 可知, 在线性范围 20~400 mg/L 区间内, 三氯蔗糖的浓度与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为  $Y=207.99X+274.1$ , 相关系数为 0.9999。

表 1 国标方法茶饮料(阴性样品)中三氯蔗糖回收率实验( $n=4$ )  
Table 1 Recoveries of sucralose by national standard in tea drink (negative sample)( $n=4$ )

| 加标浓度/(mg/L) | 面积   | 浓度/(mg/L) | 平均值/(mg/L) | 加标回收率/% | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% |
|-------------|------|-----------|------------|---------|---------|----------|
| 2.5         | 0    | 0         | 0          | -       | -       | -        |
| 7.5         | 0    | 0         | 0          | -       | -       | -        |
| 10          | 877  | 10.02     | 10.06      | 100.22  | 100.6   | 0.29     |
| 10          | 882  | 10.05     |            | 100.53  |         |          |
| 10          | 887  | 10.08     |            | 100.85  |         |          |
| 10          | 886  | 10.08     |            | 100.80  |         |          |
| 20          | 2416 | 20.01     | 20.032     | 100.05  | 100.16  | 0.16     |
| 20          | 2417 | 20.02     |            | 100.10  |         |          |
| 20          | 2426 | 20.08     |            | 100.39  |         |          |
| 20          | 2417 | 20.02     |            | 100.09  |         |          |
| 30          | 3961 | 30.04     | 30.01125   | 100.14  | 100.04  | 0.094    |
| 30          | 3950 | 29.97     |            | 99.91   |         |          |
| 30          | 3957 | 30.02     |            | 100.06  |         |          |
| 30          | 3956 | 30.01     |            | 100.04  |         |          |

注: 加标浓度 2.5 mg/L 与 7.5 mg/L 均做了 4 个样品。

表 2 国标方法碳酸性饮料(阳性样品)中三氯蔗糖加标回收率实验( $n=4$ )  
Table 2 Recoveries of sucralose by national standard in carbon acidic drink (positive sample) ( $n=4$ )

| 加标浓度/(mg/L) | 面积     | 浓度/(mg/L) | 平均值/(mg/L) | 加标回收率/% | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% |
|-------------|--------|-----------|------------|---------|---------|----------|
| 原样品         | 81048  | 432.65    | 433.03     | -       | -       | -        |
|             | 81015  | 432.48    |            | -       |         |          |
|             | 81220  | 433.57    |            | -       |         |          |
|             | 81195  | 433.43    |            | -       |         |          |
| 200         | 119114 | 634.77    | 633.66     | 100.87  | 100.32  | 0.38     |
|             | 118828 | 633.25    |            | 100.11  |         |          |
|             | 118807 | 633.14    |            | 100.05  |         |          |
|             | 118872 | 633.48    |            | 100.23  |         |          |
| 400         | 152537 | 812.24    | 812.71     | 94.80   | 94.92   | 0.15     |
|             | 152748 | 813.36    |            | 95.08   |         |          |
|             | 152526 | 812.18    |            | 94.79   |         |          |
|             | 152692 | 813.06    |            | 95.01   |         |          |

表 3  本研究方法茶饮料(阴性样品)中三氯蔗糖回收率(n=4)  
Table 3  Recoveries of sucralose by this study in tea drink (negative sample) (n=4)

| 加标浓度/(mg/L) | 面积   | 浓度/(mg/L) | 平均值/(mg/L) | 加标回收率/% | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% |
|-------------|------|-----------|------------|---------|---------|----------|
| 2.5         | 783  | 2.45      | 2.41       | 97.96   | 96.53   | 2.1      |
| 2.5         | 787  | 2.47      |            | 98.72   |         |          |
| 2.5         | 769  | 2.38      |            | 95.16   |         |          |
| 2.5         | 764  | 2.36      |            | 94.28   |         |          |
| 7.5         | 1850 | 7.58      | 7.59       | 101.05  | 101.24  | 0.53     |
| 7.5         | 1846 | 7.56      |            | 100.80  |         |          |
| 7.5         | 1865 | 7.65      |            | 102.01  |         |          |
| 7.5         | 1851 | 7.58      |            | 101.08  |         |          |
| 10          | 2356 | 10.01     | 10.04      | 100.09  | 100.37  | 0.34     |
| 10          | 2357 | 10.01     |            | 100.13  |         |          |
| 10          | 2371 | 10.08     |            | 100.83  |         |          |
| 10          | 2363 | 10.04     |            | 100.44  |         |          |
| 20          | 4448 | 20.07     | 20.12      | 100.34  | 100.60  | 0.29     |
| 20          | 4451 | 20.08     |            | 100.41  |         |          |
| 20          | 4462 | 20.14     |            | 100.68  |         |          |
| 20          | 4475 | 20.20     |            | 100.98  |         |          |
| 30          | 6513 | 29.99     | 30.04      | 99.98   | 100.14  | 0.17     |
| 30          | 6533 | 30.09     |            | 100.31  |         |          |
| 30          | 6531 | 30.08     |            | 100.27  |         |          |
| 30          | 6514 | 30.00     |            | 100.01  |         |          |

表 4  本研究方法碳酸性饮料(阳性样品)中三氯蔗糖加标回收率(n=4)  
Table 4  Recoveries of sucralose by this study in carbon acidic drink (positive sample) (n=4)

| 项目  | 面积     | 浓度/(mg/L) | 平均值/(mg/L) | 加标回收率  | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% |
|-----|--------|-----------|------------|--------|---------|----------|
| 原样品 | 85682  | 433.00    | 432.90     | -      | -       | -        |
|     | 85793  | 433.56    |            | -      |         |          |
|     | 85681  | 433.00    |            | -      |         |          |
|     | 85499  | 432.07    |            | -      |         |          |
| 200 | 128137 | 647.22    | 646.83     | 107.16 | 106.96  | 0.14     |
|     | 128036 | 646.71    |            | 106.90 |         |          |
|     | 128064 | 646.85    |            | 106.97 |         |          |
|     | 128005 | 646.55    |            | 106.82 |         |          |
| 400 | 167026 | 843.45    | 844.31     | 102.64 | 102.85  | 0.16     |
|     | 167188 | 844.27    |            | 102.84 |         |          |
|     | 167282 | 844.74    |            | 102.96 |         |          |
|     | 167291 | 844.79    |            | 102.97 |         |          |

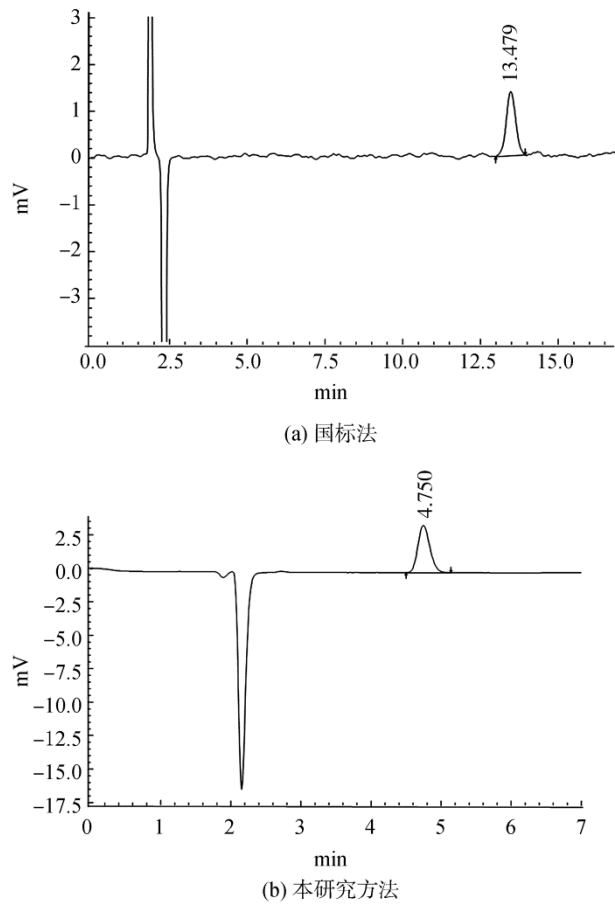


图 1 200 mg/L 三氯蔗糖标品色谱图  
Fig. 1 Chromatogram of sucralose standard at 200 mg/L

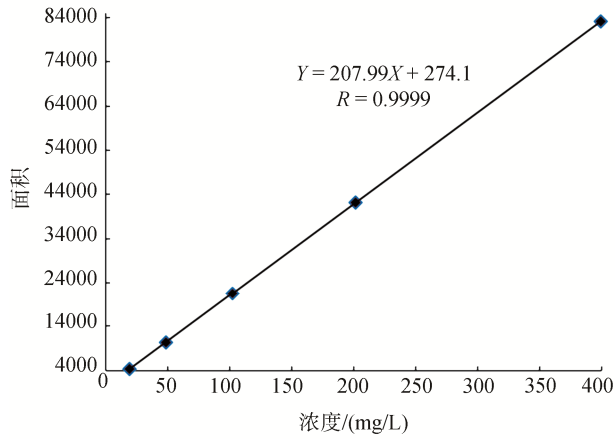


图 2 线性实验结果图  
Fig. 2 Calibration curve of sucralose

3.4 精密度结果

对同一含量样品用新方法进行 6 次测定, 结果见表 5, 其 RSD 为 3.6%, 说明优化后的方法精密度较好。

表 5 本研究方法精密度实验( $n=6$ )  
Table 5 Precision of the method for sucralose content in this study ( $n=6$ )

| 加标浓度<br>/(mg/L) | 面积    | 浓度<br>/(mg/L) | 平均值<br>/(mg/L) | 相对标准<br>偏差/% |
|-----------------|-------|---------------|----------------|--------------|
| 200             | 41917 | 200.22        | 200.25         | 3.6          |
|                 | 41925 | 200.25        |                |              |
|                 | 41917 | 200.21        |                |              |
|                 | 41921 | 200.23        |                |              |
|                 | 41934 | 200.30        |                |              |
|                 | 41932 | 200.29        |                |              |

4 结 论

该研究中采用优化后的国标方法检测饮料中的三氯蔗糖, 操作稳定, 在精密度、准确度、检出限等方面都能完全满足日常分析的需要, 与国家检测标准<sup>[15]</sup>及一些学者<sup>[11,16,17]</sup>的研究结果相比, 加快了分析速度, 提高了灵敏度, 用甲醇代替乙腈, 毒性和成本都有所降低, 加入了盐, 稳定性得到了提高, 加快了检测器的平衡, 节约了流动相的使用, 检测效率提高, 与甘宾宾等<sup>[9]</sup>的研究结果一致, 适合日常大量的饮料样品检测工作。与陈晓霞等<sup>[18]</sup>的研究相比, 降低了柱温与检测温度, 降低了对色谱柱的损耗, 延长了色谱柱的使用寿命。笔者也曾经尝试过使用与王桂华等<sup>[10]</sup>研究中同样的水性色谱柱, 虽然使用超纯水作为流动相较易配制, 但出峰时间较晚, 造成了试剂的浪费, 且水性色谱柱对前处理方法有较为严格的要求, 处理不当, 会造成水性色谱柱的损伤, 降低色谱柱的使用寿命, 不宜推广。往后的工作, 可以继续深究本研究方法是否能够运用到其他类型样品的检测, 也可以继续优化前处理方法, 减少整个实验周期的需要时间, 提高检测效率。

参考文献

[1] 凌关庭, 唐述朝, 陶民强. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997.  
Ling GT, Tang SC, Tao MQ. Handbook of food additives [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1997.  
[2] 康维民. 三氯蔗糖的特性及在食品加工中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2002, 2: 78–80.  
Kang WM. The characters and applications of the sueralose [J]. China Food Addit, 2002, 2: 78–80.  
[3] Grice HC, Goldsmith LA. Sucralose-an overview of the toxicity data [J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38(2): S1–S6.  
[4] Hunter BT. Sucralose [J]. Consumer' Res Mag, 1990, 73(10): 8–9.  
[5] 陈宁, 张培敏, 吴述超, 等. 离子色谱-柱切换技术同步测定饮料中的三氯蔗糖、葡萄糖、果糖和蔗糖[J]. 色谱, 2016, (10): 956–959.  
Chen N, Zhang PM, Wu SC, et al. Simultaneous determination of sucralose, alucose, fructose and sucrose in beverage by ion-exchange

- chromatography with column-switching [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, (10): 956–959.
- [6] 林立, 王琳琳, 钱聪, 等. 安培检测-离子色谱法测定食品中的三氯蔗糖[J]. *中国食品添加剂*, 2013, (5): 214–218.
- Lin L, Wang LL, Qian C, *et al.* Determination of sucralose in food by ion chromatography with amperometric detection[J]. *China Food Addit*, 2013, (5): 214–218.
- [7] Paul J, Lobat D. Determination of acesulfame and sucralose in oral electrolyte maintenance solution by liquid chromatography [J]. *J AOAC*, 2003, 86(1): 79–85.
- [8] Nojiri S, Nakazato M, Kasuya Y, *et al.* Determination of sucralose in foods by HPLC using pre-column derivatization [J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2002, 43(5): 289–294.
- [9] 甘宾宾, 汤艳荣, 梁川. HPLC 法测定食品中三氯蔗糖[J]. *化工技术与开发*, 2008, 37(8): 31–32.
- Gan BB, Tang YR, Liang C. Determination of sucralose in food by HPLC [J]. *Technol Dev Chem Ind*, 2008, 37(8): 31–32.
- [10] 王桂华, 郭剑雄, 柯华南, 等. 蔗糖合成甜味剂—三氯蔗糖的测定方法[J]. *广西轻工业*, 2006, (5): 18–19.
- Wang GH, Guo JX, Ke HN *et al.* Sucrose synthesis seasoning agent-determination of sucralose [J]. *Guangxi J Light Ind*, 2006, (5): 18–19.
- [11] 周维义, 邓小娟. 高效液相色谱法分析三氯蔗糖的含量[J]. *食品科学*, 2007, 28(7): 360–361.
- Zhou WY, Deng XJ. Analysis of sucralose content by HPLC [J]. *Food Sci*, 2007, 28(7): 360–361.
- [12] 粟晖, 韦昇, 张英, 等. 反相高效液相色谱法分离测定三氯蔗糖[J]. *食品科技*, 2002, 23(6): 66–67.
- Li H, Wei Y, Zhang Y *et al.* Separation and determination of sucralose by reversed-phase HPLC [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2002, 23(6): 66–67.
- [13] 熊丽蓓, 戴承兵, 何倩琼. 高效液相色谱法测定食品中三氯蔗糖含量的研究[J]. *上海预防医学杂志*, 2005, (4): 156–158.
- Xiong LB, Dai CP, He QQ. Method for quantitative determination of sucralose in food [J]. *Shanghai J Prev Med*, 2005, (4): 156–158.
- [14] Valoran PH, Jeffrey SJ. Determination of sucralose in splenda and sugar-free beverage using high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. *Food Chem*, 2004, 52(14): 4375–4379.
- [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].
- [16] 余飞. 三氯蔗糖的检测方对比研究[J]. *食品与发酵科技*, 2009, 45(5): 69–71.
- Yu F. Comparative study of sucralose determination methods [J]. *Food Ferment Technol*, 2009, 45(5): 69–71.
- [17] 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.
- [18] 陈晓霞, 游景水, 杨祖伟, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中三氯蔗糖的含量[J]. 2015, 5(6): 1883–1888.
- Chen XX, You JS, Yang ZW, *et al.* Determination of sucralose content in health food by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 5(6): 1883–1888.

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介



李 桑, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 215236031@qq.com