

固相萃取-高效液相色谱法测定罐头中三氯蔗糖

王蓓蓓*, 李 敏, 张 凡, 张亚锋

(西安市食品药品检验所, 西安 710054)

摘 要: **目的** 建立固相萃取-高效液相色谱法测定罐头食品中三氯蔗糖含量的分析方法。**方法** 样品采用乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白, 经过 HLB 固相萃取小柱净化浓缩, 再经 C_{18} 色谱柱分离, 采用蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD)检测。**结果** 该方法在 20.26~405.2 $\mu\text{g/mL}$ 范围内以三氯蔗糖浓度的对数和相应峰面积的对数做标准曲线, 相关性良好($r^2=0.9996$)。平均加标回收率为 99.6%~105.3%, 检出限为 0.48 mg/kg。**结论** 该方法准确、灵敏, 能有效、快速的测定罐头食品中的三氯蔗糖。

关键词: 高效液相色谱法; 三氯蔗糖; 蒸发光检测器; 罐头

Determination of sucralose content in canned food by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography

WANG Bei-Bei*, LI Min, ZHANG Fan, ZHANG Ya-Feng

(Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of sucralose content in canned food by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). **Methods** Samples were deproteinized by adding zinc acetate and potassium ferrocyanide, and purified by solid-phase extraction column. The separation was analyzed on a C_{18} column and the analyte was detected with an evaporative light-scattering detector (ELSD). **Results** The relationship between logarithmic peak area and logarithmic sucralose concentration showed good linear over the range of 20.26-405.2 $\mu\text{g/mL}$, with a correlation coefficient (r^2) of 0.9996. The average recoveries of sucralose were between 99.6%-105.3%. The limit of detection was 0.48 mg/kg. **Conclusion** This method is accurate and sensitive, which is effective and suitable for the detection of sucralose in canned food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; sucralose; evaporative light scattering detectors; canned food

1 引 言

三氯蔗糖(sucralose)是以蔗糖为原料经氯代而制得的一种非营养型强力甜味剂。三氯蔗糖是纯天然产物蔗糖的衍生物, 分子量为 397.5, 低热值, 甜度是蔗糖的 600~700 倍^[1-3], 且甜味纯正, 性质稳定, 耐酸, 耐高温, 耐贮藏, 无任何异味, 是目前为止甜味特性最接近蔗糖的一种强力甜味剂。且三氯蔗糖在人体内几乎不被吸收, 是一种非营养

性甜味剂^[4]。

目前世界上常用的甜味剂主要有: 蔗糖、糖精、甜蜜素、甜味菊苷、阿斯巴甜等, 三氯蔗糖作为一种新型甜味剂具有突出的优点, 备受食品专家的推崇与厚爱。1990 年 6 月, 联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(food and agriculture organization of the united nations/world health organization, FAO/WHO)食品添加剂联合专家委员会批准了三氯蔗糖的永久性每日容许摄入量(allowable daily

*通讯作者: 王蓓蓓, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析检测。E-mail: 309282133@qq.com

*Corresponding author: WANG Bei-Bei, Master, Engineer, Xi'an Institute for Food and Drug Control, No.26, Yanta Road, Xi'an 710054, China. E-mail: 309282133@qq.com

intake, ADI)值为 15 mg/kg^[5,6]。第 16 次全国食品添加剂标准化技术委员会讨论通过, 允许三氯蔗糖在饮料、酱菜、配制酒、糕点、饼干、罐头、蜜饯等食品中使用^[7]。

目前在我国三氯蔗糖广泛用于罐头、浓缩果汁、果酱、乳制品、酱油、保健食品等各行业^[8-11]。食品中三氯蔗糖的测定方法有很多, 包括液相色谱-质谱法^[12,13]、离子色谱法^[14-16]、高效液相色谱法^[17,18]、滴定法^[19]等, 其中高效液相色谱法普及率高、准确性好而被广泛应用。

GB 22255-2014《食品安全国家标准 食品中的三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》^[20]并没有给出蒸发光检测条件, 且前处理较复杂耗时。本研究参照 GB 22255-2014, 主要采用固相萃取结合高效液相色谱-蒸发光散射检测器, 首先用乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液沉淀蛋白质, 沉淀效果很好, 再经 HLB 固相萃取小柱, 除去样品中糖、脂等物质, 最后对样品进行净化浓缩, 减少了杂质峰的干扰, 并确定蒸发光检测器条件, 建立了一种快速、准确且灵敏度高的罐头食品中三氯蔗糖含量的测定方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Ultimate3000 高效液相色谱仪(Thermo SCIENTIFIC 赛默飞世尔科技); 蒸发光散射检测器(ELSD 6000)、ME204E 分析天平(瑞士梅特勒-多利多仪器有限公司); HH-S8 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); HC-3018 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); KQ-700VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

三氯蔗糖标准品(纯度 99.0%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL); 色谱柱 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 150 Å)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸锌、亚铁氰化钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

进样体积: 20 μL; 柱温: 35 °C; 蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度: 106 °C; 气流速 2.6 L/min; 雾化压力: 3.0 bar。流动相乙腈:超纯水=11:89(V:V), 等速洗脱; 流速: 1.0 mL/min。

2.2.2 样品前处理

罐头食品: 称取混匀后试样 5 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 水, 涡旋振荡 3 min 后加入 15 mL 甲醇、0.50 mL 乙酸锌溶液、0.50 mL 亚铁氰化钾溶液, 涡旋振荡 30 s, 离心, 取上清液于分液漏斗中。再加入 30 mL 正己烷, 振摇 2 min, 静置分层, 取下层水相于蒸发皿。将蒸发皿置于沸水浴上蒸发, 当液体在 1 mL 左右时, 用 9 mL 水分 3 次冲

洗蒸发皿, 并将冲洗液置于 15 mL 离心管中, 超声 5 min, 离心, 上清液备用。

2.2.3 固相萃取

将上述上清液全部移至已活化的固相萃取柱(用 4 mL 甲醇和 4 mL 水活化萃取柱), 保持流速在每秒 1 滴, 待柱中液体完全排出后, 用 3 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 并将洗脱液置于蒸发皿内, 沸水浴蒸干, 残渣用 1.00 mL 乙腈水(11:89, V:V)溶解, 溶液过 0.45 μm 滤膜, 备用。

2.2.4 标准溶液配制

标准储备液: 精密称取三氯蔗糖标准品 10.23 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用水溶液溶解并定容至刻度。摇匀, 浓度为 1.013 mg/mL。置于 4 °C 冰箱中保存备用。

2.2.5 标准工作曲线绘制

线性指在适当的浓度范围内, 测定响应值与试样中被测物质浓度成比例关系的程度。用同一对照品贮藏液经精密稀释, 或者分别精密称取对照品, 制备一系列对照品溶液的方法进行测定, 至少制备 5 份不同浓度的对照品溶液。以测得的响应信号对被测物的浓度作图, 观察是否呈线性, 再用最小二乘法进行线性回归。

本实验是精密移取三氯蔗糖标准储备液稀释为以下浓度: 20.26、50.65、101.3、202.6、405.2 μg/mL, 进样量为 20 μL, 以三氯蔗糖浓度对数为横坐标、以峰面积的对数为纵坐标制作标准曲线, 即 $\lg S = b + \lg C$ 。

2.2.6 检出限和定量限

检出限是指试样中被测物能被检出的最低量。常用的方法有: 直观法、信噪比法、基于响应值标准偏差和标准曲线斜率法。本实验采用信噪比法, 信噪比法指把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较, 计算出能被可靠地检测出被测物质的最低浓度或量。一般以信噪比为 3:1 或 2:1 时相应浓度或注入仪器的量确定检出限。

定量限是指试样中被测物能被定量测定的最低量。常用的方法有: 直观法、信噪比法、基于响应值标准偏差和标准曲线斜率法。本实验采用信噪比法, 信噪比法指把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较, 计算出能被可靠地定量被测物质的最低浓度或量。一般以信噪比为 10:1 时相应浓度或注入仪器的量确定定量限。

2.2.7 精密度实验

精密度指在规定条件下, 同一份均匀供试品, 经多次取样测定所得结果之间的接近程度。精密度一般用偏差、标准偏差或相对标准偏差表示。在规定的范围内, 取同一浓度的供试品, 用至少测定 6 份的结果进行评价。

本实验采用相对标准偏差进行评价实验的准确性, 精密度越小, 平行性越好, 准确度相对越高。将浓度为 101.3 μg/mL 三氯蔗糖标准溶液重复进样 6 次, 分别计算保留时间和峰面积的相对标准偏差, 评价重复性。

2.2.8 加标回收实验

加标回收实验是化学分析中常用的分析方法,也是重要的质控手段,回收率是判定分析结果准确度的量化指标。加标回收包括空白加标回收和样品加标回收。本实验采用空白加标回收,即在没有被测物质的空白样品基质中加入定量的标准物质,按照样品的处理步骤进行分析,得到的结果与理论值的比值为空白回收率。

本实验精密称取 5 g 样品共 9 份,置于 50 mL 离心管中,分成 3 组,每组 3 份,加入高、低、中 3 种不同梯度浓度的三氯蔗糖标准溶液,按照上述样品处理方法处理,残渣用 1.00 mL 乙腈水(11:89, V:V)溶解,溶液过 0.45 μm 滤膜,备用。根据公式计算得出平均回收率。

3 结果与分析

3.1 标准曲线、线性范围、检出限和定量限

线性实验结果如图 1 所示,该方法的浓度范围为 20.26~405.2 $\mu\text{g/mL}$,线性方程为 $Y=1.7613X-2.5047$,相关系数 $r^2=0.9996$,呈现良好线性。

三氯蔗糖标准品的色谱图如图 2 所示,分析方法的检出限定义为信噪比(S/N)为 3 时对应的待分析浓度。当浓度为 2.422 mg/L 的三氯蔗糖标准溶液,进样量为 20 μL 时,测得信噪比为 2.6,该浓度即为测定方法的检测浓度,色谱峰如图 3 所示,按实际样品处理过程计算,检出限为 0.48 mg/kg,比标准 GB 22255-2014 中方法检出限(2.5 mg/kg)提高 5 倍,说明该方法有较高的灵敏度。

定量限取信噪比为 10:1,是检出限的 3.3 倍,则定量限为 1.6 mg/kg。

3.2 样品的测定

按照上述的实验方法对罐头食品进行前处理、过固相萃取小柱、上高效液相色谱仪进行检测,测定结果见下表 1。由结果看出在 4 种罐头食品中检出三氯蔗糖,且精密度在 0.59%~6.8%之间,均小于标准^[20]规定 10%。

3.3 精密度实验

将浓度为 101.3 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液,重复进样 6 次,计算保留时间和峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.015%和 1.5%,具有良好精密度。精密度越小,说明准确度越高,实验数据越可靠。结果见表 2。

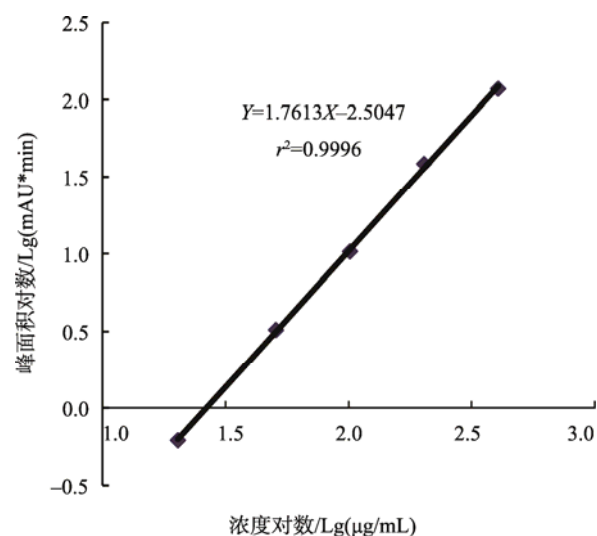


图 1 三氯蔗糖的相关系数和回归方程图

Fig.1 Correlation coefficient and regression equation of sucralose

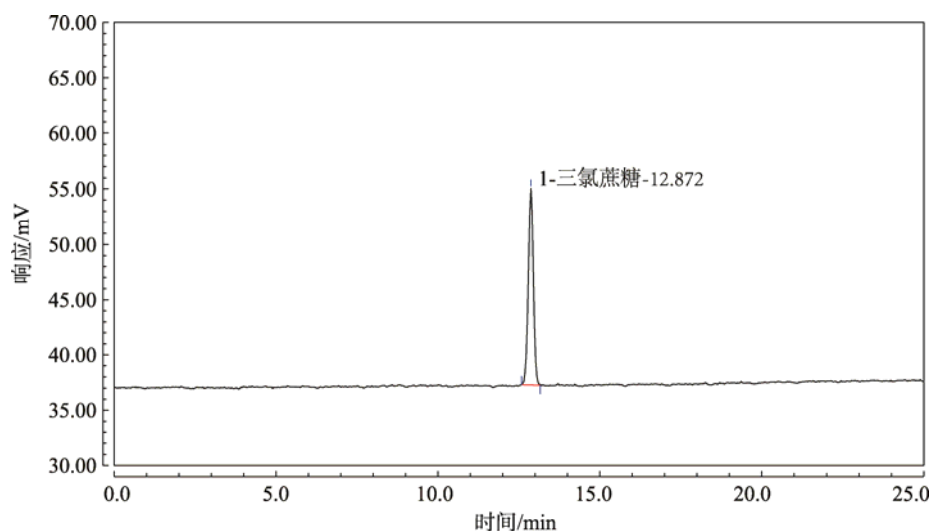


图 2 三氯蔗糖标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of sucralose standard solution

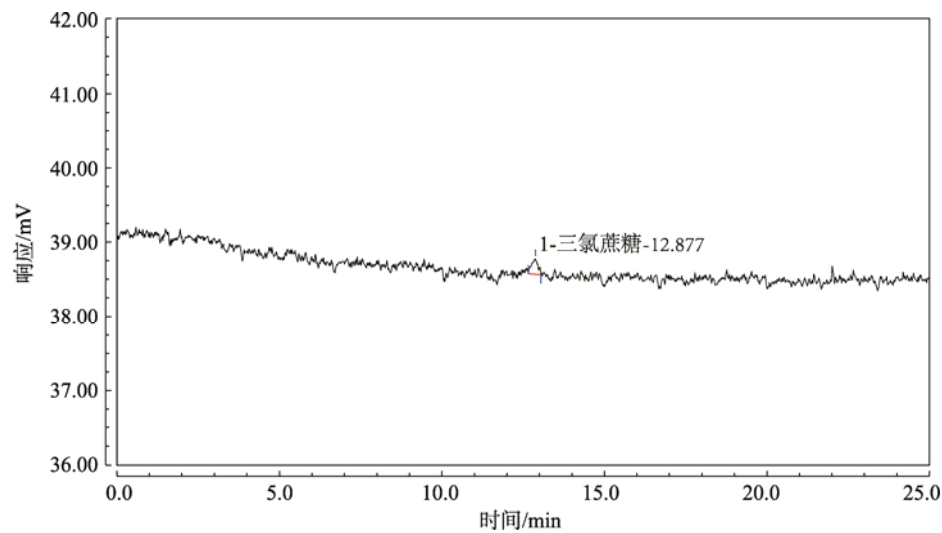


图 3 三氯蔗糖检出限色谱图

Fig.3 Chromatogram of sucralose's detection limit

表 1 样品中的三氯蔗糖的测定

Table 1 The determination of sucrose in samples

样品名称	样品量/g	测得浓度/($\mu\text{g/mL}$)	含量/(g/kg)	平均值/(g/kg)	RSD/%
木糖醇营养八宝粥	5.0025	264.129	0.0528	0.053	1.1
	5.0069	267.236	0.0534		
银鹭桂圆莲子八宝粥	5.0567	42.734	0.0085	0.0088	6.8
	5.0348	45.452	0.0091		
低糖莲子八宝粥	5.0611	175.311	0.0346	0.036	5.3
	5.1223	186.741	0.0365		
银鹭桂圆莲子八宝粥	5.0325	85.935	0.0171	0.017	0.59
	5.0659	85.955	0.0170		
梨罐头	0	0	0	0	—
	0	0	0		
黄头罐头	0	0	0	0	—
	0	0	0		

表 2 精密度的实验结果

Table 2 Precision of the experimental results

编号	保留时间/min	峰面积
1	12.872	10.7190
2	12.873	10.5240
3	12.872	10.4735
4	12.877	10.3007
5	12.875	10.6404
6	12.873	10.4131
平均值/min	12.874	10.4118
标准偏差/%	0.00197	0.152
相对标准偏差(RSD)/%	0.015	1.5

3.4 加标回收实验

在空白样品中加入低、中、高 3 个水平标准溶液,从表 3 中可知回收率的范围为 99.6%~105.3%,平均值为 102.4%,回收率较高,均在 80%~120%之间,说明该方法对罐头中三氯蔗糖的测定能起到很好的质量控制目的。

3.5 检测器的选择

GB 22255-2014《食品安全国家标准 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》中有 2 种检测方法,蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)和示差折光检测器。蒸发光散射检测器是质量型检测器,检测灵敏度高,抗本底干扰能力强,主要应用于大多数非挥发和半挥发性物质领域,尤其适用于糖类和脂类物质分析^[21]。示差折光检测器属于浓度型检测器,对温度极其敏感使得基线很不稳定,灵敏度不高,不适于梯度洗脱。

表 3 梨罐头中三氯蔗糖的回收率
Table 3 Recoveries of sucralose from canned pears

样品名称	质量/g	本底值/(μg/mL)	加标浓度/(μg/mL)	测得浓度/(μg/mL)	回收率/%	平均值/%
梨罐头	5.1025	0.000	25.32	25.208	99.6	100.8
	5.0986			25.387	100.3	
	5.0122			25.983	102.6	
	5.1560		50.65	53.339	105.3	104.5
	5.1275			52.296	103.2	
	5.0658			53.218	105.1	
	5.0325		101.3	103.335	102.0	101.8
	5.0918			102.972	101.7	
	5.0682			103.015	101.7	

三氯蔗糖在示差检测器和蒸发光散射检测器都有响应, 由于在蒸发光散射检测器上响应值大, 灵敏度高, 为达到方法的检出限, 故选择蒸发光散射检测器。

4 结 论

经过优化选择, 确定蒸发光散射检测器检测条件: 漂移管温度 106 ℃, 气流速 2.6 L/min, 雾化压力 3.0 bar; 高效液相色谱条件: 乙腈-水(11:89, V:V)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 经 HLB 固相萃取柱净化, 蒸干定容, C₁₈ 柱分离, 对罐头食品中三氯蔗糖含量进行测定。通过测定线性范围、检出限、精密度和加标回收实验, 均得到满意结果。本方法检出限为 0.48 mg/kg, 明显优于标准检出限 2.5 mg/kg, 说明该方法灵敏度、准确性均较高, 能很好的测定罐头食品中三氯蔗糖的含量。

参考文献

[1] Staff Report. Future ingredients-focus of OVIFT meeting: Properties and applications of sucralose, isomalt, crystalline maltitol, and cyclodextrins discussed by company spokesmen [J]. Food Technol, 1998, (10): 60–64.

[2] Richard LB. Stability of sucralose in baked goods [J]. Food Technol, 1990, (1): 62–65.

[3] Khan RA. Processfor the preparation of 4,1',6'-Trichloro-4,1',6'-Trideoxygalactosucrose (TGS) [J]. Eur Patent Appl, 1990.

[4] 凌关庭, 唐述朝, 陶民强. 食品添加剂手册[Z]. 北京: 化学工业出版社, 1997: 197–199.

Ling GT, Tang SC, Tao MQ. Handbook of food additives [Z]. Beijing: Chemical Industry Press Co., Ltd, 1997:197–199.

[5] 孟慧琴, 官萍, 郝鹏飞, 等. 红外光谱和质谱法鉴定三氯蔗糖及其合成中间体的结构[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3808–3817.

Meng HQ, Gong P, Hao PF, *et al.* Identification of molecular structure of sucralose and its intermediates by infrared spectrometry and mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(12): 3808–3817.

[6] 黄少虹, 吴小平. 食品添加剂三氯蔗糖的含量测定[J]. 中国食品添加剂, 2003, (2): 112–113.

Huang SH, Wu XP. Determination of contents of sucralose in food additive [J]. Chin Food Addit, 2003, (2): 112–113.

[7] 陈晓霞, 游景水, 杨祖伟. 高效液相色谱法测定保健食品中三氯蔗糖的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1883–1888.

Chen XX, You JS, Yang ZW. Determination of sucralose content in health food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1883–1888.

[8] 韩秋珍, 周芳梅. HPLC-ELSD 法测定蛋白粉中三氯蔗糖的含量[J]. 现代食品, 2016, (13): 90–93.

Han QZ, Zhou FM. Determination of sucralose content in protein powder by HPLC-ELSD [J]. Mod Food, 2016, (13): 90–93.

[9] 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.

[10] 杜彦山, 杨刚, 夏静, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定乳制品中三氯蔗糖[J]. 乳业科学与技术, 2013, 36(2): 27–29.

Du YS, Yang G, Xia J, *et al.* Determination of sucralose in dairy foods by SPE-HPLC [J]. J Dairy Sci Technol, 2013, 36(2): 27–29.

[11] 陈璐莹, 刘亚攀, 冉雪琴, 等. 紫外衍生-高效液相色谱法测定保健食品和饮料中的三氯蔗糖[J]. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(5): 836–838.

Chen LY, Liu YP, Rang XQ, *et al.* Determination of sucralose in foods and beverages by ultraviolet derivatization-high performance liquid chromatography [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Ed), 2014, 45(5): 836–838.

[12] 倪炜华, 郑丹. LC-MS 法测定饮料中的三氯蔗糖[J]. 中国食品添加剂, 2011, (2): 235–237.

Ni WH, Zheng D. Determination of sucralose in drink by LC-MS [J]. Chin Food Addit, 2011, (2): 235–237.

[13] 牛之瑞, 王秀君, 于毅涛. 液相色谱-质谱联用同时测定白酒中 8 种甜味剂[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 171–180.

Niu ZR, Wang XJ, Wang YT. Determination of 8 sweeteners in spirits by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2016, 37(2): 171–180.

[14] 林立, 王琳琳, 钱聪. 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): 214–216.

- Lin L, Wang LL, Qian C. Determination of sucralose in food by ion chromatography with amperometric detection [J]. Chin Food Addit, 2013, (5): 214–216.
- [15] 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.
- [16] 赵丹霞, 王力清, 黄秋研, 等. 果汁饮品中三氯蔗糖离子色谱脉冲安培检测法的测定[J]. 食品工程, 2013, (1): 65–66.
- Zhao DX, Wang LQ, Huang QY, *et al.* Determination of sucralose in juice beverages by amperometric detection with ion chromatography [J]. Food Eng, 2013, (1): 65–66.
- [17] 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, 2005, 17(4): 156–158.
- Xiong LB, Dai CB, He QQ. Method for quantitative determination of sucralose in food [J]. Shanghai J Prev Med, 2005, 17(4): 156–158.
- [18] 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, 17(10): 1784–1786.
- Zhang L. Determination of sucralose in drink by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(10): 1784–1786.
- [19] 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 Trib, 2007, 13(5): 445–446.
- [20] GB/T 22255-2014 食品安全国家标准 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定[S].
- GB/T 22255-2014 National food safety-Determination of sucralose in food [S].
- [21] 鲁琳, 杭义萍, 高燕红. 高效液相色谱-蒸发光检测器测定食品中的三氯蔗糖[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1628–1629.
- Lu L, Hang YP, Gao YH. Determination of sucralose in food by HPLC-ELSD [J]. Chin Trop Med, 2008, 8(9): 1628–1629.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



王蓓蓓, 硕士, 主要研究方向为食品安全分析检测。
E-mail: 309282133@qq.com