

高效液相色谱串联质谱法测定白酒中 甜蜜素的含量

张福, 张周莉*, 李焱辛

(南充市食品药品检验所, 南充 637000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱串联质谱法检测白酒中甜蜜素的分析方法。**方法** 白酒样品经水浴加热后, 用超纯水定容, 经 0.22 μm 水相过滤后, 采用 10 mmol/L 乙酸铵(A)和甲醇(B)作为流动相进行等度洗脱, 采用高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪测定白酒中甜蜜素含量。**结果** 甜蜜素在 0.01~0.50 μg/mL 范围内线性关系良好($r^2=0.9999$), 检出限为 0.015 mg/kg, 3 个浓度下的加标回收率分别为 96.18%、98.44%、92.69%, 相对标准偏差为 1.94%~2.11%。**结论** 该方法灵敏度高、回收率高、检测限低, 适用于白酒中甜蜜素的检测。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 白酒; 甜蜜素

Determination of sodium cyclamate content in liquor by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Fu, ZHANG Zhou-Li*, LI Yao-Xin

(Nanchong Institute for Food and Drug Control, Nanchong 637000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of sodium cyclamate in liquor by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The liquor samples were heated in water bath, fixed volume with ultrapure water, filtered by 0.22 μm water phase, then 10 mmol/L ammonium acetate (A) and methanol (B) were used as mobile phase for isocratic elution. The content of cyclamate in liquor was detected by high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry. **Results** Sodium cyclamate had good linear relationships in the range of 0.01-0.50 μg/mL ($r^2=0.9999$), the limit of detection was 0.015 mg/kg. The recoveries at 3 spiked levels were 96.18%, 98.44%, 92.69%, respectively, with the relative standard deviations of 1.94%-2.11%. **Conclusion** This method has high sensitivity, high recovery, low limit of detection, which is suitable for the determination of sodium cyclamate in liquor.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; liquor; sodium cyclamate

1 引言

甜蜜素(sodium cyclamate), 学名为环己基氨基磺酸钠, 是一种无营养的合成甜味剂, 因其具有适口感强、价格低廉、高甜度的特点^[1], 广泛应用于饮料^[2]、蜜饯^[3]、酱腌菜

^[4]等食品行业。白酒作为中国传统酿造酒, 深受消费者喜爱。随着酒类消费市场扩大, 一些不良生产商为改善白酒风味和感官性状, 降低生产成本, 擅自在白酒中添加甜蜜素。有研究^[5]表明摄入过量甜蜜素对小鼠精子具有一定的致畸效应, 食用过量甜蜜素增加患癌症风险^[6], 抑制成骨

*通讯作者: 张周莉, 助理工程师, 主要研究方向为食品、保健食品及化妆品检验检测。E-mail: 646367716@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Zhou-Li, Assistant Engineer, Nanchong Institute for Food and Drug Control, Nanchong 637000, China. E-mail: 646367716@qq.com

细胞的增殖和分化^[7],对骨细胞造成损伤。GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》^[8]对其在食品中添加量有明确的限定,配制酒中最大使用量为 0.65 g/kg,甜蜜素不得使用在蒸馏酒和发酵酒中,因此监测和评估甜蜜素的风险非常重要。目前对甜蜜素的检测方法主要有比色法^[9]、分光光度法^[10]、毛细管电泳法^[11]、气相色谱法^[12]、气质联用法^[13]、液相色谱法^[14]和固相分散法^[15]。但是由于酒中成分复杂,存在的干扰物质较多,使得检测结果容易出现假阳性^[16]。目前 SN/T 1948-2007《进出口食品中环己基氨基磺酸钠的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》^[17]中采用的乙酸水:甲醇作为流动相,而本方法采用乙酸铵:甲醇作为流动相,提高了检测的灵敏度;GB 5009.97-2016《食品安全国家标准 食品中环己基氨基磺酸钠的测定》^[18]中液相条件采用的梯度洗脱程序,而本方法采用等度洗脱程序,节省了检测时间,提高了工作效率。本研究对高效液相色谱串联质谱法的液相条件和质谱条件进行优化,拟建立一种可靠的检测白酒中甜蜜素的分析方法,以期简便、高效的测定白酒中的甜蜜素提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Agilent 6420 三重串联四极杆液质联用仪(美国 Agilent 公司);ML203/02 分析天平(0.001 g)(上海 Mettler Toledo 公司);HH-8 恒温水浴锅(金坛区西城新瑞仪器厂)。

甲醇、乙酸铵(色谱纯,美国 Fisher 公司);环己基氨基磺酸标准溶液(10000 μg/mL,北京坛墨质检科技有限公司);ZORBAX-SB-C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 3.5μm, 美国 Agilent 公司);0.22 μm 水系滤膜(美国 Ameritech 公司);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

白酒,抽检。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

准确吸取甜蜜素标准品 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,得 100 μg/mL 甜蜜素标准工作溶液;称取空白样品 6 份,分别加入标准工作溶液 10、20、50、100、200、500 μL,余下按照样品处理步骤操作,即得最终浓度的标准工作系列。

2.2.2 样品前处理

称取酒样 10.0 g,置于 50 mL 烧杯中,于 60 °C 水浴上加热 30 min,残渣全部转移至 100 mL 容量瓶中,用超纯水定容并摇匀,经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用(若样品浓度过高,应进行适当稀释)。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

安捷伦 ZORBAX-SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm,

3.5μm),流动相:10 mmol/L 乙酸铵(A)-甲醇(B),流速:0.3 mL/min,进样体积:10 μL,柱温:40 °C。液相色谱洗脱程序:A:B=1:1(0~2.5 min)

(2) 质谱条件

① 负离子模式

离子源:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI);检测方式:多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);保留时间:1.406 min;定性离子对:178 > 79.9 m/z, 202/122 m/z;定量离子对:178 > 79.9 m/z;干燥气温度:300 °C;干燥气流量:10 L/min;雾化气压力:40 psi;毛细管电压:3500 V;碎裂电压:24 V;碰撞能量:2 V;碰撞池加速电压:2。

② 正离子模式

离子源:ESI;检测方式:MRM;干燥气温度:300 °C;干燥气流量:10 L/min;雾化气压力:40 psi;毛细管电压:4000 V;碎裂电压:130 V;碰撞能量:80 V;碰撞池加速电压:2;Delta EMV(+):100。

2.2.4 回收率和精密度

称取空白样品 3 份,分别加入标准工作溶液 10、20、100 μL,其他按 2.2.2 中样品前处理步骤操作。

2.2.5 检出限溶液制备

取标准曲线第一个点的标准溶液注入 HPLC-MS/MS,测得信噪比,按照 S/N=3,计算检出限。

2.2.6 样品测定

数据采集采用 Analyst Software 工作站进行采集处理,采用 Quantitative Analysis 软件进行数据处理,使用外标法进行数据分析,得出样品溶液中甜蜜素的质量浓度。再根据以下公式得出检测结果。

$$\text{结果计算公式: } X = \frac{c \times V}{m} \times f$$

式中: X 为样品中甜蜜素(以环己基氨基磺酸计)的含量,mg/kg; c 为测得浓度,μg/mL; V 为定容体积,mL; m 为称样量; f 为稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

将标准曲线注入液相质谱仪中,以相对质量浓度为横坐标 X,以峰面积为纵坐标 Y 进行线性回归建立标准曲线,结果见图 1。结果表明,浓度在 0.01~0.50 μg/mL 范围内线性关系良好,其回归方程为 $Y=10.724084X+27.333806$, $r^2=0.9999$ 。

3.2 判断依据

试样中化合物质量色谱峰的保留时间与标准溶液的保留时间一致(变化范围在±2.5%以内),且同时检测到相应化合物的 2 对离子;试样定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液中定性离子的相对丰度,其偏差不得超过表 1 的规定,则可判定样品中存在环己基氨基磺酸钠。

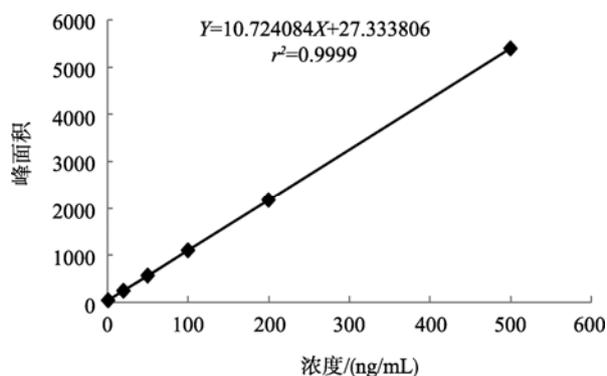


图 1 甜蜜素标准曲线图

Fig.1 Standard curve of sodium cyclamate

表 1 定性判断依据

Table 1 Qualitative judgment basis

编号	相对离子丰度/%	允许的相对偏差/%
1	> 50	±20
2	20~50	±25
3	10~20	±30
4	< 10	±50

将含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 的甜蜜素标准溶液分别在正离子和负离子模式下进行多反应监测, 找到最佳的电离模式。结果表明在正负离子模式下, 各有一对离子响应较强, 分别选择 $[\text{M}-\text{Na}]$ 以及 $[\text{M}+\text{H}]$ 作为母离子, 进行碰撞能量的优化。以 178/79.9⁽⁻⁾ 离子对作为定量离子对, 178/79.9⁽⁻⁾、202/122⁽⁺⁾ 离子对作为定性离子对。

3.3 重复性实验

有研究表明^[19], 重复性测定和液相色谱串联质谱仪稳定性是用液相色谱串联质谱仪测定白酒中甜蜜素含量时影响合成不确定度结果的主要因素。按照 2.2.2 样品前处理方

法制备 6 份样品溶液, 每份样品溶液重复进样 6 次, 测定其甜蜜素浓度, 取 6 次测定平均值计算样品中甜蜜素的含量, 各甜蜜素含量的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 1.51%~2.55%之间, 表明方法重复性良好。

3.4 精密度和空白样品加样回收率

将浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液平行测定 6 次, 通过对比测得峰面积的 RSD, 结果在 1.51%~2.43%之间, 表明该方法的精密度良好。称取空白样品 3 份, 分别加入标准工作溶液 10、20、100 μL , 余下按 2.2.2 中样品前处理步骤处理后, 平行测定 6 次, 计算平均回收率及 RSD, 结果如表 2 所示。

甜蜜素的加样回收率在 92.69%~98.44%之间, 与相关研究结果接近^[20-23], 相对标准偏差在 1.94%~2.11%之间, 略优于张卫军等的研究^[24]。由此表明, 本方法具有较高的精密度和回收率, 可用于白酒中甜蜜素的常规检测。

3.5 检出限测定

取标准曲线第一个点的标准溶液注入 HPLC-MS/MS, 分别测得在正离子和负离子模式下信噪比图, 如图 2 所示。

按照 $S/N=3$, 以负离子模式信噪比为响应, 计算检出限为 0.015 mg/kg 。GB 5009.97-2016 《食品中环己基氨基磺酸钠的测定》^[18]中第三法液相色谱-质谱/质谱法的检出限为 0.03 mg/kg 。本方法通过对液相色谱和质谱条件进行优化, 得到的检出限远远低于国家安全标准中的检出限。

3.6 样品检测结果

采集 10 份白酒进行检测, 对样品进行前处理, 然后进行分析。外标法进行定量, 并通过定性定量离子丰度比对结果进行判定, 计算白酒样品中甜蜜素(以环己基氨基磺酸计)的含量, 见表 3。

表 2 方法的加样回收率及相对标准偏差结果($n=6$)Table 2 Test results of recovery rate and RSD value ($n=6$)

序号	取样量/g	加入量/(ng/mL)	平均测得浓度/(ng/mL)	平均回收率/%	RSD/%
1	10.103	10	9.6184	96.18	2.11
2	10.205	50	49.2202	98.44	1.94
3	10.044	100	92.6919	92.69	2.08

表 3 白酒中甜蜜素含量测定结果

Table 3 Test results of sodium cyclamate content in liquor

样品编号	称样量 m/g	定容体积 V/mL	测得浓度 $c/(\mu\text{g/mL})$	稀释倍数	样品含量 $X/(\text{mg/kg})$
样品 1	10.071	100	0.05286	1	0.5249
样品 2	10.008	100	0.07215	1	0.7209
样品 3	10.014	100	0.13592	1	1.357
样品 4	10.021	100	0.10823	1	1.082
样品 5	10.015	100	0.2018	1	2.015
样品 6	10.014	100	0.05621	10	5.613
样品 7	10.004	100	0.38532	100	385.2
样品 8	10.033	100	0.40887	100	407.5
样品 9	10.016	100	0.41865	100	418.0
样品 10	10.009	100	0.04753	1000	474.8

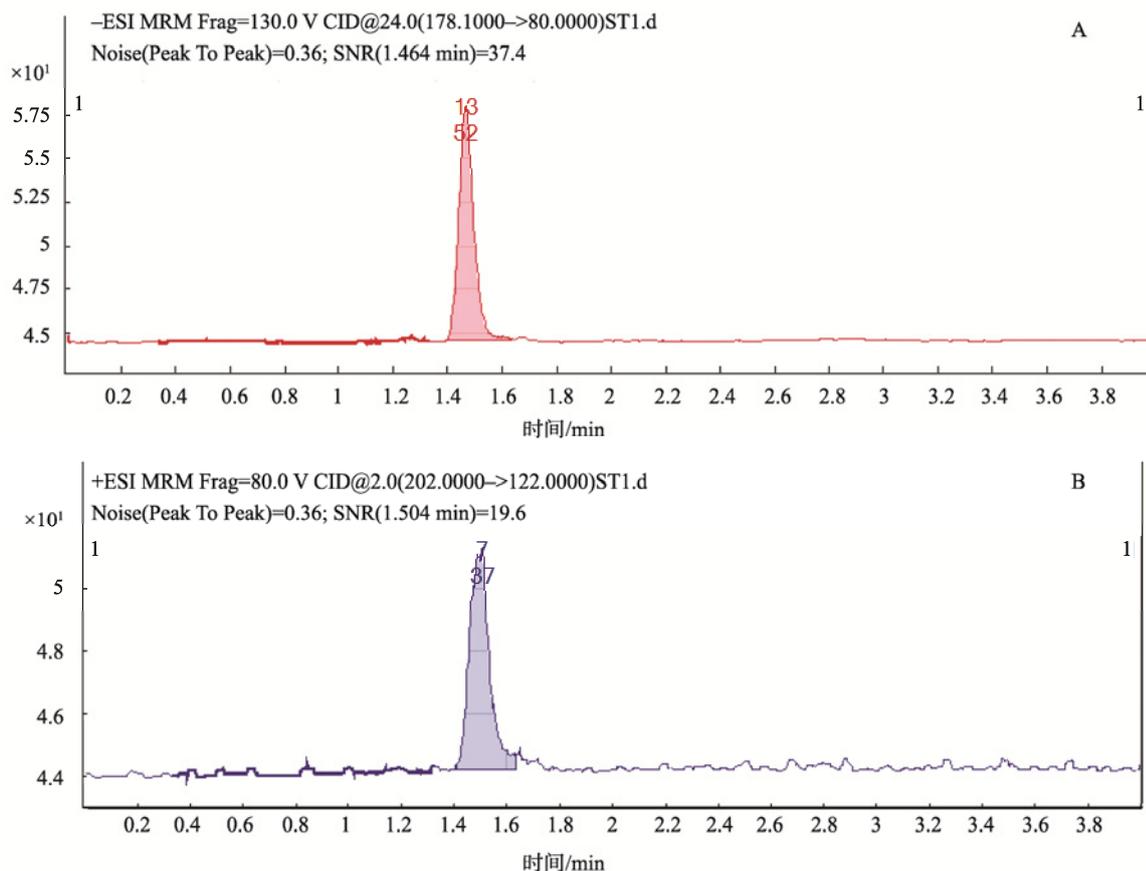


图2 正离子(A)及负离子(B)模式下信噪比

Fig. 2 Signal to noise ratio in positive mode (A) and anion mode (B)

4 结论

本研究采用高效液相色谱-质谱检测方法对白酒中甜蜜素进行检测并对实际样品进行检测,优化了洗脱程序、流动相组成。结果表明,该方法操作简便,具有精密度和精确性良好、回收率高、检测限低等优点,检测结果准确可靠,符合分析要求,满足白酒中甜蜜素的分析测定,为白酒中甜蜜素的检测提供更有效的保证。

参考文献

- [1] 袁超,王玉军. 浅析食品中甜蜜素的检测方法[J]. 中国调味品, 2016, (2): 151-154.
Yuan C, Wang YJ. Analysis of detection methods of cyclamate in food [J]. China Cond, 2016, (2): 151-154.
- [2] 尹华. 高效液相色谱-串联质谱法测定饮料中6种食品添加剂[J]. 卫生研究, 2017, 46(6): 116-119, 125.
Yin H. Simultaneous determination of 6 kinds of food additives in drink by HPLC-MS/MS [J]. J Hyg Res, 2017, 46(6): 116-119, 125.
- [3] 王琼. 气相色谱法检测蜜饯中环己基氨基磺酸钠[J]. 中国计量, 2014, (7): 87-88.
Wang Q. Determination of sodium cyclohexyl aminosulfonate in preserves by GC [J]. China Metrol, 2014, (7): 87-88.
- [4] 许士明, 李林林, 康兆广, 等. 食品酱腌菜中甜蜜素的气相色谱法检测条件的优化[J]. 中国食品添加剂, 2016, (6): 187-189.
Xu SM, Li LL, Kang ZG, *et al.* Optimization of cyclamate in food pickles by gas chromatography [J]. China Food Addit, 2016, (6): 187-189.
- [5] 王虹, 童婷婷, 杨静. 甜蜜素与蛋白糖染毒小鼠精子畸形率与骨髓微核率的变化[J]. 毒理学杂志, 2014, 28(3): 256-258.
Wang H, Tong TT, Yang J. Comparison of pretreatment methods of β -agonists residues in pig liver and their simultaneous determination [J]. J Toxicol, 2014, 28(3): 256-258.
- [6] Roe FJC, Levy LS, Carter RL. Feeding studies on sodium cyclamate, saccharin and sucrose for carcinogenic and tumor-promoting activity [J]. J Occupat Environ Med, 1971, 13(4): 212.
- [7] Chen ZH, Chen G, Zhou K, *et al.* Toxicity of food sweetener-sodium cyclamate on osteoblasts cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, (2): 507-511.
- [8] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for uses of food additives [S].
- [9] 侯晓燕, 李永芳, 李俊玲. 比色管色谱法测定食品中甜蜜素的探讨[J]. 安阳师范学院学报, 2003(5): 67-68.
Hou XY, Li YF, Li JL. A probe into determination of saccharin in food by gag chromatography in colorimetric synder [J]. J Anyang Teach Coll, 2003, (5): 67-68.

- [10] 申科敏, 胡晓琴. 快速判别食品中甜蜜素含量的方法探索[J]. 江苏调味品, 2017, (1): 33-36.
Shen KM, Hu XQ. Determination of ractopamine in the feed by enzyme-linked immunoassay assay [J]. Jiangsu Condiment Subsidiary Food, 2017, (1): 33-36.
- [11] 薛洪宝, 张晖, 梁丽丽, 等. 高效毛细管电泳法测定食品中5种甜味剂含量[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(3): 315-320.
Xue HB, Zhang H, Liang LL, *et al.* Simultaneous determination of 5 sweeteners in food by HPCE [J]. J Food Sci Biotechnol, 2014, 33(3): 315-320.
- [12] 李雪春, 林野. 气相色谱法测定酱油中甜蜜素[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(2): 230-232.
Li XC, Lin Y. Determination of cyclamate in soy sauce by GC [J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part B:Chemical Analysis), 2017, 53(2): 230-232.
- [13] 江改青. GC-MS法测定食品中甜蜜素定性定量分析的探讨[J]. 现代食品, 2017, (15): 119-122.
Jiang GQ. Study on qualitative and quantitative analysis of sodium cyclamate in food by GC-MS [J]. Mod Food, 2017, (15): 119-122.
- [14] 尹华. 高效液相色谱-串联质谱法测定饮料中6种食品添加剂[J]. 卫生研究, 2017, 46(6): 971-974.
Yin H. Simultaneous determination of 6 kinds of food additives in drink by HPLC-MS/MS [J]. J Hyg Res, 2017, 46(6): 971-974.
- [15] Li J, Liu Y, Liu Q, *et al.* On-cartridge derivatisation using matrix solid phase dispersion for the determination of cyclamate in foods [J]. Anal Chim Acta, 2017, (972): 46-53.
- [16] 计丹婷. HPLC-DAD 联用技术在食品添加剂假阳性检测方面的应用[D]. 南京: 南京理工大学, 2014.
Ji DT. HPLC-DAD method for the false-positive determination in food additives [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2014.
- [17] SN/T 1948-2007 进出口食品中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].
- [18] GB 5009.97-2016 食品安全国家标准 食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].
GB 5009.97-2016 National food safety standard-Determination of sodium cyclamate in food [S].
- [19] 盛静, 向春燕. 液质联用法测定白酒中甜蜜素含量的不确定度评定[J]. 现代食品, 2018, (2): 90-92, 95.
Sheng J, Xiang CY. Evaluation of uncertainty for detection of sodium N-cyclohexylsulfamate in liquor by HPLC-MS [J]. Mod Food, 2018, (2): 90-92, 95.
- [20] 梅婕, 司冠儒, 张温清, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定白酒中6种甜味剂[J]. 酿酒科技, 2016, (3): 122-124.
Mei J, Si GR, Zhang WQ, *et al.* Ping determination of six kinds of sweeteners in liquor by HPLC-MS [J]. Liquor Mak Sci Technol, 2016, (3): 122-124.
- [21] 牛之瑞, 王秀君, 于毅涛, 等. 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): 178-181.
Niu ZR, Wang XJ, Yu YT, *et al.* Determination of 8 sweeteners in spirits by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2016, 37(2): 178-181.
- [22] 王凤芹, 伊芳, 汪秀月. 液质联用检测白酒中的微量甜蜜素[J]. 现代农业科技, 2017, (4): 246-247, 254.
Wang FQ, Yi F, Wang XY. Determination of trace sodium cyclamate in liquor by HPLC-MS/MS [J]. Mod Agric Sci Technol, 2017, (4): 246-247, 254.
- [23] 张卫军, 毛周平. 高效液相色谱法对白酒中甜蜜素含量的测定[J]. 酿酒, 2016, 43(5): 86-88.
Zhang WJ, Mao ZP. Determination of cyclamate content in liquor by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Liquor Mak, 2016, 43(5): 86-88.
- [24] 陈海元, 王永健. 液相色谱-质谱/质谱联用技术在测定白酒中甜蜜素含量中的应用[J]. 现代食品, 2017, (21): 121-123.
Chen HY, Wang YJ. Application of liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry in determination of sweetness content in liquor [J]. Mod Food, 2017, (21): 121-123.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



张福, 主管药师, 主要研究方向为食品、保健食品、药品及化妆品检验检测。
E-mail: 409619833@qq.com



张周莉, 助理工程师, 主要研究方向为食品、保健食品及化妆品检验检测。
E-mail: 646367716@qq.com