

超高效液相色谱-串联质谱法检测白酒中 9 种甜味剂含量

李丽萍, 范 赛, 刘 伟, 张 楠, 王莉莉, 赵 榕, 吴国华*

(北京市疾病预防控制中心, 北京市预防医学研究中心, 北京 100013)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时检测白酒中爱德万甜、甜菊糖苷等 9 种甜味剂的分析方法。**方法** 白酒样品经水浴加热除去乙醇、定容、过 0.22 μm 滤膜后, 采用体积分数 0.1% 甲酸水溶液和纯甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 色谱柱选用迪马 Endeavorsil C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 质谱(ESI⁺、ESI⁻)采用多反应监测模式(multiple response monitoring, MRM), 对 9 种甜味剂的定量、定性离子进行检测。**结果** 本方法在 10 min 内可完成 9 种目标化合物的分离分析。9 种甜味剂分别根据检出限在 20、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 等 2 个添加水平的回收率范围为 84.8%~102.4%, 相对标准偏差范围 3.6%~8.3%($n=6$), 各个甜味剂组分方法定量限范围 1.0~15 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法简单快、快速、结果准确、灵敏度高, 适合测定白酒中爱德万甜、甜菊糖苷等 9 种甜味剂。

关键词: 甜味剂; 超高效液相色谱-串联质谱法; 白酒; 检测方法

Simultaneous determination of 9 kinds of sweeteners in liquor by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Li-Ping, FAN Sai, LIU Wei, ZHANG Nan, WANG Li-Li, ZHAO Rong, WU Guo-Hua*

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 9 sweeteners in liquor by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The liquor samples were heated in water bath to remove ethanol before adding water making constant volume. The solution passed the 0.22 μm filter membrane and was separated on a reversed phase using a gradient elution program of 0.1% (V/V) formic acid aqueous solution and menthol solution through Endeavorsil C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm) and detected by MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode. Using MS/MS (ESI⁺, ESI⁻) with multiple reactions monitoring (MRM), identification of the major components of 9 sweeteners was performed based upon the intensities of fragments. **Results** In this method, 9 target compounds were isolated and analyzed within 10 min. The recovery rates of the 9 sweeteners were 84.8% to 102.4% according to the detection limits of 20, 50, 100, 500 $\mu\text{g/L}$. The relative standard deviations (RSDs) were less than 8.3% ($n=6$), and the limits of quantitation (LOQ) for the 9

*通讯作者: 吴国华, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: wugh0410@163.com

*Corresponding author: WU Guo-Hua, Senior Technologist, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China. E-mail: wugh0410@163.com

sweeteners were 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for detecting 9 sweeteners in wine.

KEY WORDS: sweeteners; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; liquor; detection method

1 引言

白酒是中国传统特色蒸馏酒,品质优良的白酒味道醇厚,后味绵甜,它与威士忌、伏特加、白兰地、朗姆酒、金酒并称为世界6大蒸馏酒^[1]。白酒工业是中国食品工业发展速度快、规模大、经济贡献率高的行业^[2]。随着白酒行业不断的发展,国内白酒行业各类安全隐患和事件凸显,甜味剂问题等多种白酒事件频发,这些问题在一定程度上制约了白酒行业的发展^[3]。

甜味剂是指赋予食品甜味的食品添加剂。按其来源可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂,按其化学结构和性质又可分为糖类和非糖类甜味剂^[4]。人工合成甜味剂有甜蜜素、糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜、三氯蔗糖等。人工合成甜味剂由于其可能引起如皮肤病、头痛、情绪改变、行为变化、呼吸困难、癫痫、过敏、癌症等而成为最具争议的食品添加剂之一^[5]。大部分被批准用于食品中的甜味剂是人工合成甜味剂,但是越来越多的天然的无热量的甜味剂允许加入食品中,如甜菊糖苷类^[6]。

食品中甜味剂的分析方法有液相色谱法^[7-10]、气相色谱法、离子色谱法^[11]、液相色谱串联质谱法^[12-14]等,食品中甜味剂国家标准检测方法中,一般采用液相色谱和气相色谱法,且每次只能最多检测2种。色谱法检测存在灵敏度、分离度低、多种甜味剂同时检测分离效果不佳等问题,液相色谱串联质谱法具有定性结果可靠、灵敏度高、能同时快速测定多种甜味剂的特点而成为甜味剂检测领域的研究热点。国家标准 GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》中规定白酒中禁止添加任何添加剂^[15]。目前两个地方标准 DB 34/T 2498-2015《白酒中四种甜味剂的测定—超高效液相色谱串联质谱法》^[16]和 DBS 52/007-2014《食品安全地方标准白酒中甜蜜素、糖精钠、安赛蜜和三氯蔗糖四种甜味剂的测定方法液相色谱-串联质谱法》^[17]都是采用液相色谱串联质谱法检测白酒中的甜味剂,但是检测方法包含的甜味剂种类较少。近年来随着新增批准的甜味剂的增加,如爱德万甜等,故有必要开发多种甜味剂同时检测的高通量检测方法。本研究通过超高效液相色谱-串联质谱法检测白酒中爱德万甜、甜菊糖苷等9种甜味剂,希望为准确、快速的测定白酒中新型和常用甜味剂提供技术支持,促进行业健康发展。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪、Xevo TQS 三重四极杆液质联用仪(美国 Waters 公司); XPE105 电子天平(梅特勒-托利多公司)。

9种甜味剂标准物质:安赛蜜:纯度>98.0%、阿斯巴甜:纯度>98.0%、糖精钠:纯度>98.0%、甜蜜素:纯度>98.0%、阿力甜:纯度>98.0%、纽甜:纯度>98.0%、三氯蔗糖:纯度>99.7%、甜菊糖苷:纯度>98.0%、爱德万甜:纯度>98.0%,全部购自德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司。

乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准储备溶液:精确称取标准品各 0.0100 g,分别用水溶解并定容至 10 mL,浓度为 1000 mg/L,1~4 °C 冰箱中保存;混合标准使用液:用水将标准储备溶液逐级稀释配制浓度 1.0 mg/L 的混合标准工作液。1~4 °C 冰箱中保存;0.1%甲酸水溶液:取 0.1 mL 甲酸于 100 mL 容量瓶中,定容至 100 mL。

2.2.2 样品前处理

称取 5 g(精确至 0.01 g)白酒样品水浴除乙醇,转移至 50 mL 容量瓶中,超纯水定容至刻度,混匀,过 0.22 μm 滤膜后经超高效液相色谱串联质谱仪分析。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

迪马 Endeavorsil C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相:0.1%水(B1)-甲醇(A1),流速:0.3 mL/min,进样体积:5 μL ,柱温:35 °C。液相色谱梯度洗脱程序:0~0.5 min, 95% B; 0.5~2.5 min, 95%~10% B; 2.5~6.0 min, 10% B; 6.0~6.5 min, 10%~95% B; 6.5~7.5 min, 95% B。

(2) 质谱条件

离子源:电喷雾电离 ESI(-)/ESI(+);毛细管电压:3.5 kV[ESI(+)], 1.5 kV[ESI(-)];碰撞气:氩气;脱溶剂气温度:500 °C;脱溶剂气流量:1000 L/h;扫描模式:多反应监测模式 MRM。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

将9种甜味剂化合物的标准溶液配制成100 μg/L浓度的流动注射溶液,注入质谱仪中,分别在正离子和负离子模式下进行一级质谱扫描。结果表明,爱德万甜在正离子模式下有较强的质谱信号,其他8种甜味剂在负离子模式下有较强的质谱信号。为满足所有化合物的最佳检测条件,本研究选择正负离子切换扫描模式,确定化合物的分子离子峰,将分子离子作为母离子,再进行二级质谱扫描,选取丰度较强、干扰较小的两个子离子分别作为定性及定量离子,并优化锥孔电压和碰撞能量,9种甜味剂化合物质谱参数优化结果见表1,对应表1的9种甜味剂的标

准溶液 MRM 色谱图见图1和图2。

3.2 方法的线性范围及检出限

按照各目标组分的质谱响应特性,配制混合标准溶液系列,在优化后的色谱和串联质谱条件下进行测定,以各待测物的色谱峰面积对其在溶液中的含量进行线性回归,线性回归方程、相关系数和线性范围见表2。由表2可见,各甜味剂在各自的测定范围内均有良好的线性,相关系数(r^2)均大于0.995。采用在空白基质中添加目标组分的方法,以信噪比为3($S/N=3$)计算检出限(LOD),信噪比为10($S/N=10$)计算检出限(LOQ),三氯蔗糖、糖精钠较同种类型甜味剂的定量限高,安赛蜜、阿力甜、甜蜜素等甜味剂定量限低,9种组分的检出限和定量限见表2。

表 1 化合物质谱多反应监测参数
Table 1 Monitoring parameters of multireaction spectra of combined substances

编号	化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V	电离模式
1	安赛蜜(acesulfame)	161.9	82.0*	32	14	ESI(-)
		161.9	77.9	32	30	ESI(-)
2	甜蜜素(sodium cyclamate)	177.8	80.5*	70	22	ESI(-)
		177.8	96.4	70	24	ESI(-)
3	糖精钠(saccharin sodium)	181.7	106.4*	8	16	ESI(-)
		181.7	42.7	8	18	ESI(-)
4	阿斯巴甜(aspartame)	293.2	261.1*	34	10	ESI(-)
		293.2	200.1	34	16	ESI(-)
5	阿力甜(alitame)	329.9	311.9*	36	12	ESI(-)
		329.9	294.9	36	22	ESI(-)
6	纽甜(neotame)	377.3	199.9*	48	18	ESI(-)
		377.3	345.1	48	12	ESI(-)
7	三氯蔗糖(sucralose)	394.7	359*	58	12	ESI(-)
		396.7	361	56	12	ESI(-)
8	甜菊糖苷(stevioside)	803.3	641.5*	45	24	ESI(-)
		803.3	479.5	45	60	ESI(-)
9	爱德万甜(advantame)	459.2	101.8*	50	28	ESI(+)
		459.2	83.8	44	42	ESI(+)

注: *为定量离子。

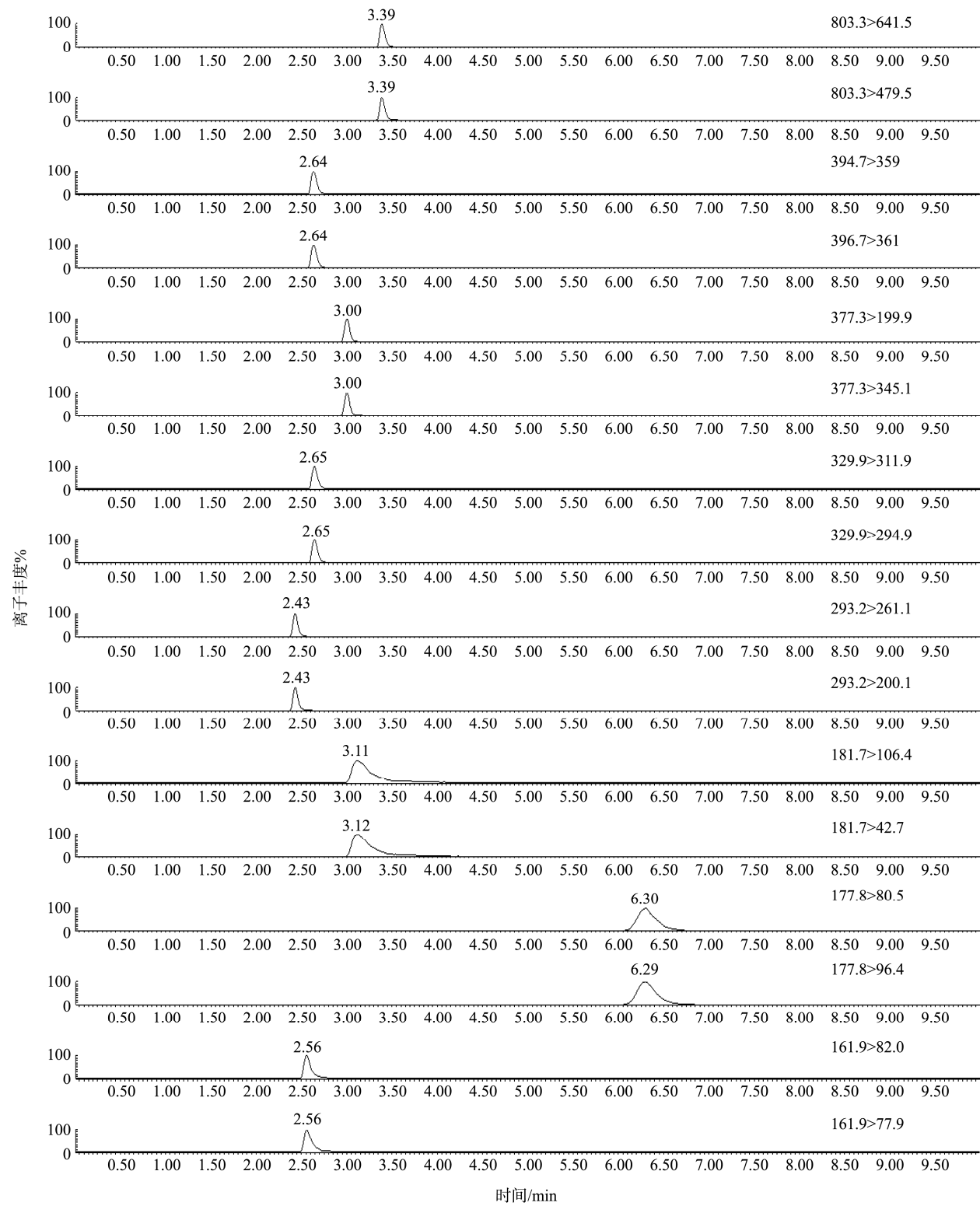


图 1 8 种甜味剂的标准溶液 MRM 色谱图(ES-)
Fig.1 Chromatogram (MRM) of standard solution of 8 sweeteners (ES-)

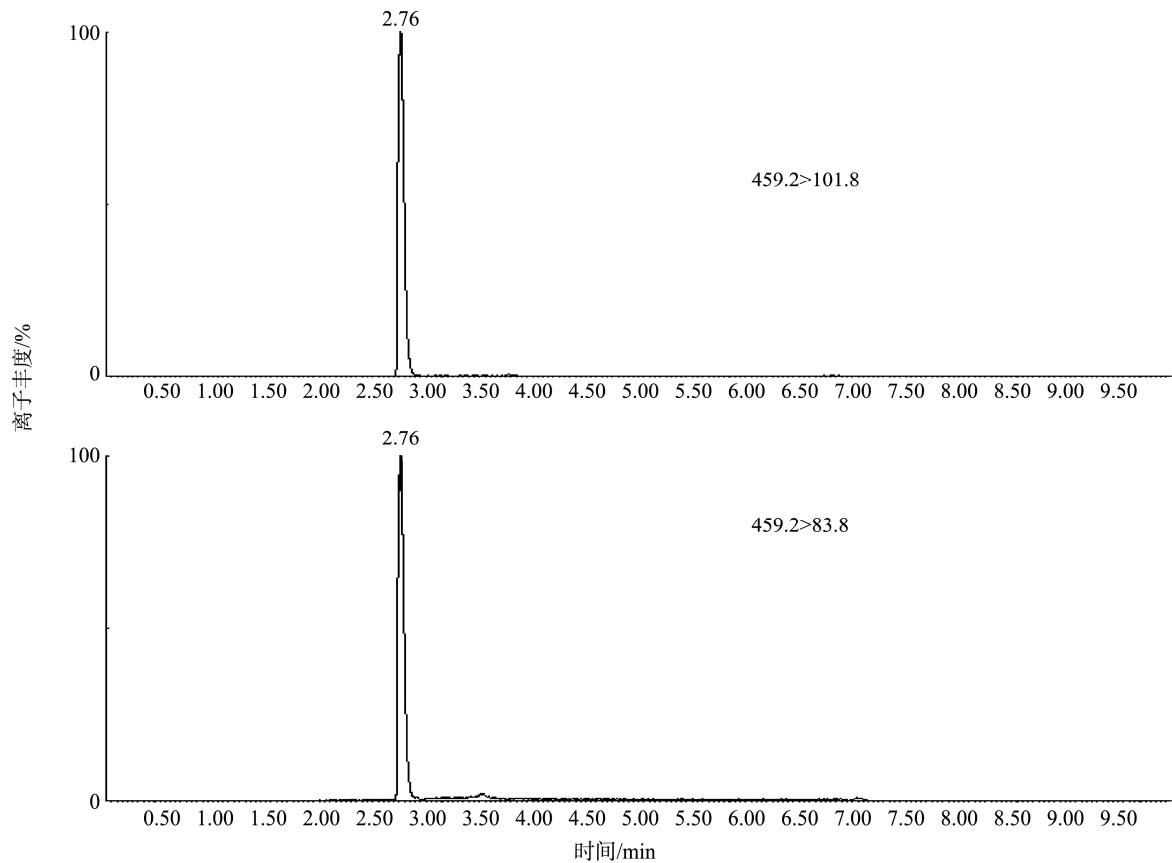


图 2 爱德万甜标准溶液 MRM 色谱图(ES+)
Fig.2 Chromatogram (MRM) of standard solution of advantame (ES+)

表 2 9 种甜味剂的标准曲线及检出限
Table 2 Linear equation and detection limits of nine sweeteners

编号	化合物	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
1	安赛蜜	1~500	$Y=1951.35X+23438.9$	0.9979	1.0	3.0
2	甜蜜素	0.5~500	$Y=6596.46X+31883.9$	0.9967	0.3	1.0
3	糖精钠	2~500	$Y=413.722X+5477.17$	0.9958	2.0	6.0
4	阿斯巴甜	1~500	$Y=2404.98X+9197.99$	0.9994	1.0	3.0
5	阿力甜	0.5~500	$Y=9915.57X+29969.9$	0.9993	0.3	1.0
6	纽甜	0.5~500	$Y=1594.85X+8035.1$	0.9991	0.3	1.0
7	三氯蔗糖	10~1000	$Y=191.83X+57030.3$	0.9950	5.0	15
8	甜菊糖苷	0.5~500	$Y=1352.02X+4186.89$	0.9962	0.5	1.5
9	爱德万甜	1~200	$Y=2049.08X+1493.41$	0.9997	1.0	3.0

3.3 回收率及精密度实验

按 2.2.2 样品前处理方法, 根据不同甜味剂的检出限在空白样品中添加标准溶液的方法, 选择高、低 2 种浓度进行加标回收实验, 各做 6 次平行实验, 得到方法的回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 详见表 3。由表 3 可知, 2 个添加水平下的爱德万甜、甜菊糖苷等甜味剂的回收率范围 84.8%~102.4%, 相对标准偏差小于 8.3%。表明方法的准确度和精密度较好。

表 3 酒中 9 种甜味剂的回收率 Table 3 Recoveries of nine sweeteners in liquor			
化合物	加标量/(μg/L)	回收率范围/%	RSD/%
安赛蜜	20	88.7~95.8	6.9
	100	90.1~97.2	4.8
甜蜜素	20	88.9~96.2	7.7
	100	91.1~98.5	5.1
糖精钠	50	84.8~93.6	8.3
	500	89.9~94.8	6.1
阿斯巴甜	20	87.9~95.4	6.2
	100	92.6~95.3	5.9
阿力甜	20	91.5~99.1	5.5
	100	94.3~102.4	4.7
纽甜	20	92.6~97.6	6.8
	100	97.1~100.7	4.5
三氯蔗糖	100	86.3~95.8	7.7
	500	90.2~94.4	7.2
甜菊糖苷	50	94.8~97.6	5.8
	200	93.3~98.2	4.3
爱德万甜	20	95.7~99.6	4.7
	100	96.5~100.2	3.6

4 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱检测白酒中爱德万甜和甜菊糖苷等 9 种甜味剂的分析方法。白酒样品经过水浴除乙醇、水定容后, 10 min 内完全分离, 在 2 个不同加标水平下, 回收率范围为 84.8%~102.4%, 相对标准偏差范围 3.6%~8.3% ($n=6$), 各个甜味剂组分方法定量限范围 1.0~15 μg/kg。结果表明, 该方法准确、灵敏度高, 适合测定白酒中爱德万甜、甜菊糖苷等 9 种甜味剂。

参考文献

[1] 刘松, 赵振宇, 江锋, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分

辨质谱测定白酒 16 种甜味剂[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 166~170.

Liu S, Zhao ZY, Jiang F, *et al.* Determination of 16 sweeteners in liquor by super high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field track trap high resolution mass spectrometry [J]. China Brew, 2019, 38(10): 166~170.

[2] 杜翠荣, 宋连君, 李兴权. 白酒行业质量问题调研结果及分析[J]. 食品与发酵科技, 2019, 55(1): 90~100.

Du CR, Song LJ, Li XQ. Research results and analysis of quality problems in liquor industry [J]. Food Fermentation Sci Technol, 2019, 55(1): 90~100.

[3] 兰达友. 垫江县散装白酒质量现状调查与分析[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2019.

Lan DY. Investigation and analysis on quality statue of bulk liquor in Dianjiang country [D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2019.

[4] 杨双春, 刘慧芳, 王健, 等. 国内外人工合成的非能量型甜味剂研究现状[J]. 食品工业, 2013, 34(4): 181~183.

Yang SC, Liu HF, Wang J, *et al.* The State of domestic and international synthetic non-energy sweetener by spray drying [J]. Food Ind, 2013, 34(4): 181~183.

[5] Agata Z, Andrzej W, Jacek N. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in food stuffs [J]. Trends Anal Chem, 2009, 28(9): 1082~1102.

[6] Szimonetta L, Ingrid T, Joerg J. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: Analysis of the research landscape [J]. Nut J, 2017, 16: 55.

[7] 邵林, 姚元滋, 李跃, 等. 液相色谱检测低度浓香型酒中的安赛蜜, 糖精钠和阿斯巴甜[J]. 酿酒, 2019, 46(3): 66~67.

Shao L, Yao YZ, Li Y *et al.* Determination of low alcohol luzhou flavor liquor by HPLC acesulfame potassium, saccharin sodium and aspartame [J]. Liquor Making, 2019, 46 (3): 66~67.

[8] 马雪丰, 向彩彬, 张庆, 等. 高效液相色谱法同时测定白酒中 6 种甜味剂[J]. 应用化工, 2019, 48(2): 497~500.

Ma XF, Xiang CB, Zhang Q, *et al.* Simultaneous determination of six sweeteners in liquor by high performance liquid chromatography [J]. Appl Chem Ind, 2019, 48(2): 497~500.

[9] 刘刚, 雷激, 钟红霞, 等. 高效液相色谱蒸发光散射法测定白酒中 8 种甜味剂的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(7): 300~304.

Liu G, Lei J, Zhong HX, *et al.* Determination of eight sweeteners in distilled spirits by HPLC evaporative light scattering detector [J]. Food Sci Technol, 2017, 42(7): 300~304.

[10] 包懿, 石金娥, 刘斌, 等. 高效液相色谱/二极管阵列法快速测定白酒、配制酒与葡萄酒中 5 种人工合成甜味剂[J]. 分析测试学报, 2017, 36(5): 674~678.

Bao Y, Shi JE, Liu B *et al.* Rapid determination of five artificial sweeteners in white spirit, mixed liquor and wine by high performance liquid chromatography/diode array detector [J]. J Inst Anal, 2017, 36(5): 674~678.

[11] 沈燕飞, 朱仙娜, 姚澄, 等. 阀切换离子色谱技术同时检测饮料中的糖类、甜味剂和防腐剂[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 311~316.

Shen YF, Zhu XN, Yao C, *et al.* Simultaneous determination of sugars, edulcorants, and preservatives in beverages using ion chromatography coupled with valve switching [J]. Food Sci, 2018, 39(16): 311~316.

[12] 唐吉旺, 袁列江, 肖泳, 等. 固相萃取-高效液相色谱-质谱联用法同时测定食品中 9 种人工合成甜味剂[J]. 色谱, 2019, 37(6): 619~625.

- Tang JW, Yuan LJ, Xiao Y, *et al.* Simultaneous determination of nine artificial sweeteners in food by solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(6): 619–625.
- [13] 周玉, 唐艳荣, 余义, 等. LC-ESI-MS/MS 测定白酒中甜味剂三氯蔗糖的方法研究[J]. *酿酒科技*, 2018, 12: 120–123.
- Zhou Y, Tang YR, Yu Y, *et al.* Determination of sucralose content in liquor by LC-ESI-MS/MS [J]. *Liquor-Making Sci Technol*, 2018, 12: 120–123.
- [14] 周玉, 董孝元, 余义, 等. LC-ESI-MS/MS 测定白酒中甜味剂甜菊的方法研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(10): 143–146.
- Zhou Y, Dong XY, Yu Y, *et al.* Research on detection of sweetener neotame in liquor by LC-ESI-MS/MS [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(10): 143–146.
- [15] 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].
- [16] DB 34/T 2498 – 2015 安徽省地方标准 白酒中四种甜味剂的测定—超高效液相色谱串联质谱法[S].
- DB 34/T 2498 – 2015 DB of Anhui province method for determination of the four kinds of sweetener in liquor-Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [17] DBS 52/007 – 2014 贵州省地方标准 食品安全地方标准白酒中甜蜜

素、糖精钠、安赛蜜和三氯蔗糖四种甜味剂的测定方法液相色谱—串联质谱法[S].

DBS 52/007 – 2014 DB of Guizhou province local food safety standards—Determination of sodium cyclamate, sacchar in so dium, acesulfame and sucralose in Chinese spirits-LC-MS/MS method [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

李丽萍, 主管技师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: lkf666@yeah.net

吴国华, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: wugh0410@163.com

“发酵技术在食品中的应用及安全性评价”专题征稿函

作为众多食品种类的一种, 发酵食品因其独特的风味受到消费者的普遍欢迎。发酵是一种传统的食品储存与加工方法, 是指利用有益微生物加工制造的一类食品, 包括发酵乳制品、酒类、泡菜、酱油、食醋、豆豉等。由于其独特的加工方式, 发酵食品或存在一定的安全隐患, 可能会影响人体健康。

鉴于此, 本刊特别策划“发酵技术在食品中的应用及安全性评价”专题, 特别邀请江南大学生物工程学院吴敬教授担任专题主编, 围绕(1) 菌种的选育和保藏; (2) 发酵工艺的条件优化, 发酵机制, 发酵工程动力学; (3) 发酵食品的分析与检测; (4) 发酵食品的安全性评价及风险评估类等问题展开讨论, 计划在 2020 年 6~7 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及专题主编吴敬教授特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 05 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明 2020 专题: 发酵技术在食品中的应用及安全性评价)

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“2020 专题: 发酵技术在食品中的应用及安全性评价”)

邮箱投稿: E-mail: jfoods@126.com(备注: 2020 专题: 发酵技术在食品中的应用及安全性评价专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部