

高效液相色谱法测定饼干中三氯蔗糖含量

王燕红*

(济南市食品药品检验检测中心, 济南 250000)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测饼干中三氯蔗糖含量的分析方法。**方法** 在现行国家标准基础上, 针对饼干样品特点, 优化样品前处理方法, 并进行方法学验证。**结果** 该方法工作曲线的线性范围为 0.02~0.60 mg/mL, 相关系数为 0.9999, 回收率为 96.78%~100.47%, 峰面积相对标准偏差为 0.66% ($n=6$), 方法检出限为 2.0 mg/kg。利用该方法对从市场上随机采购的 80 份饼干样本进行测定, 标识含有三氯蔗糖的样本均有检出, 未标识含有三氯蔗糖的样本均低于检出限, 按国家标准饼干中最大用量 0.25 g/kg 的限度要求, 无过量添加。**结论** 本方法简单、高效、灵敏度和准确度均较高, 适用于检验机构中三氯蔗糖含量的检测。

关键词: 饼干; 三氯蔗糖; 高效液相色谱法

Determination of sucralose content in cookies by high performance liquid chromatography

WANG Yan-Hong*

(Jinan Center for Food and Drug Control, Jinan 250000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of sucralose in cookies by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** According to the characteristics of the cookie samples, the pretreatment method of cookies was optimized based on the current national standard, and the method was experimental validated. **Results** The linear range were 0.02–0.60 mg/mL, the correlation coefficient was 0.9999, the recoveries of sucralose were 96.78%–100.47%, the relative standard deviation of peak area was 0.66% ($n=6$), and the limit of detection was 2.0 mg/kg. The method was used to measure 80 biscuit samples randomly purchased from the market. The samples labeled as containing sucralose were all detected, and the samples not labeled as containing sucralose were all below the limit of detection. The maximum dosage of 0.25 g/kg in national standard biscuits was required without excessive addition. **Conclusion** This method is simple, sensitive and accurate, which is suitable for routine test of sucralose in inspection institutions.

KEY WORDS: cookies; sucralose; high performance liquid chromatography

0 引言

三氯蔗糖(sucralose)又称三氯半乳糖, 是一种以蔗糖为原料的功能性甜味剂^[1-2], 其甜度大约为蔗糖的

600~650 倍, 具有高稳定性、零热量、不被人体吸收、不引起龋齿等优点, 被广泛应用到饮料、糕点、果冻、冷冻饮品、果酱和蜜饯等加工食品中^[3-5]。我国 GB 2760—2014《食品添加剂使用卫生标准》^[6]规定, 三氯蔗糖可以在食

*通信作者: 王燕红, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: wyh19870609@126.com

*Corresponding author: WANG Yan-Hong, Ph.D, Engineer, Jinan Center for Food and Drug Control, Building 4, Jinan Yaogu, Gangxing 3rd Road, Licheng District, Jinan 250000, China. E-mail: wyh19870609@126.com

品中限量使用,添加量一般在 0.25~1.5 g/kg 之间。但三氯蔗糖毕竟不是天然成分,在规定的剂量范围内使用可能对人无害,但若超量使用,仍可能引起各种形式的毒性表现^[7],因此必须加强对三氯蔗糖的含量监控^[8-9]。

目前,食品中三氯蔗糖的测定方法有很多,有液相色谱-质谱法^[10-13]、气相色谱-质谱法^[14]、离子色谱法^[15-16]、高效液相色谱法^[17-18]、滴定法^[19]等,其中高效液相色谱法因普及率高、准确性好而被广泛应用。现行标准 GB 22255—2014《食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》^[20]中采用液相色谱-示差检测方法或液相色谱-蒸发光散射检测方法。

饼干中三氯蔗糖的测定主要参考 GB 22255—2014《食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定》^[20]方法进行,本研究采用高效液相色谱-示差检测方法对市场随机购买的饼干中的三氯蔗糖进行测定,结合饼干的特点,参考相关文献^[1,21],对样品前处理条件进行优化,并进行方法学验证,建立三氯蔗糖含量的测定方法,以期为检验机构中三氯蔗糖含量的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

三氯蔗糖标准品(纯度≥99%)(美国 Stanford chemicals 公司);乙腈(CH₃CN, 色谱纯,德国默克股份两合公司);水来自实验室超纯水机(法国派克公司),电导率大于 18 MΩ;甲醇(分析纯,广州化学试剂厂)。

1.1.2 主要仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(配 RID-20A 示差折光检测器,日本岛津公司);MP5002 分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);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)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱为 C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);柱温:35 °C;检测器:示差检测器,池温度 35 °C;进样量:10 μL;流动相为水-乙腈(89:11, V:V),流速为 1.0 mL/min。

1.2.2 样品前处理

准确称取 2 g 研磨均匀的样品,置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 蒸馏水,于旋涡振荡器振荡 2 min 后加入 15 mL 甲醇,继续振荡 30 s,超声 20 min,然后以 4500 r/min 离心 5 min,将上清液倒出,残渣再用 75%甲醇提取一次,合并 2 次提取液(若样品中含有较多脂肪,则把提取液用 30 mL 正己烷净化一次,移取下层溶液),取全部上清液通过已活化的固相萃取小柱(依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化),再加入 1 mL 水淋洗,待柱中液体完全流出后,用 3 mL 甲醇

洗脱,收集洗脱液。洗脱液 50 °C 条件下用氮气吹至近干,残留物用 15%的乙腈定容至 1 mL,溶液涡旋振荡 20 s,滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,供液相色谱分析。

1.2.3 标准溶液的配制

称取三氯蔗糖标准品 100 mg(精确至 0.1 mg),用水溶解于 10 mL 容量瓶中,配制成 10 mg/mL 的标准储备液,4 °C 冰箱中避光保存。用水将该储备液逐级稀释为 0.02、0.05、0.10、0.40、0.60 mg/mL 的标准工作液。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的优化

GB 22255—2014^[20]在样品制备过程中离心时,其转速为 3000 r/min 离心 10 min,在实际操作中发现,将转速确定为 4500 r/min 离心 5 min 时,样品上清液经固相萃取小柱萃取时不易堵塞小柱,且能缩短前处理时间,因此将转速设为 4500 r/min 离心 5 min。GB 22255—2014^[20]中的样品转移次数较多,且样品最后于沸水浴上蒸干。本研究比较了氮吹仪吹干和用沸水浴蒸发皿蒸干对样品的影响,发现沸水浴蒸发皿蒸干,处理时间较长,容易暴沸,且不利于大批量处理,用氮吹仪吹干,可以节约时间,提高工作效率,节约检测成本,因此本研究选择氮吹来对样品进行处理。

2.2 液相色谱条件的选择

按照 GB 22255—2014^[20]对流动相比比例、流速及柱温等色谱条件进行了实验,流动相比比例为水:乙腈=89:11(V:V);流速为 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,柱温 35 °C 时,分离效果及目标物的峰形都较理想。图 1 为三氯蔗糖的液相色谱图。

2.3 校准曲线的绘制

对质量浓度为 0.02~0.60 mg/mL 的标准工作液进行测定,以浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制线性曲线。结果显示在此浓度范围内浓度和峰面积之间有良好的线性关系。三氯蔗糖的标准曲线见图 2,回归方程为 $Y=171857X-178.077$,相关系数为 0.9999,检出限为 2.0 mg/kg。

2.4 精密度的测定

取 0.60 mg/mL 的标准溶液,按选定的实验条件连续测试 6 次,结果如图 3 所示,峰面积及保留时间的相对标准偏差(RSD)分别为 0.66%和 0.012%(表 1),说明方法精密度好。

2.5 加标回收率的测定

称取适量样品,按线性范围加入一定量的三氯蔗糖标准物质,按照 1.2.2 中的方法处理后,进行加标回收实验,测定 6 次,结果如表 2 所示。图 4 为空白样品添加标准品(0.15 mg/mL)的色谱图。

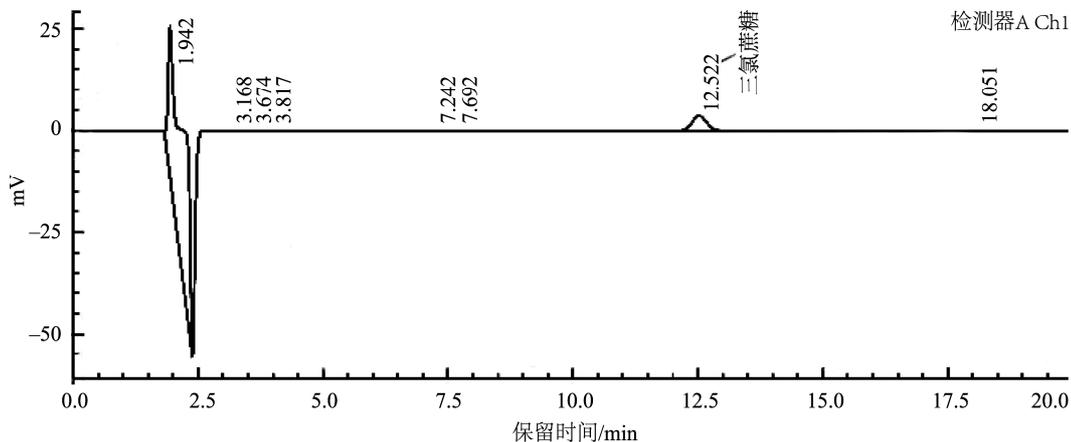


图 1 三氯蔗糖的液相色谱图
Fig.1 Chromatogram of sucralose

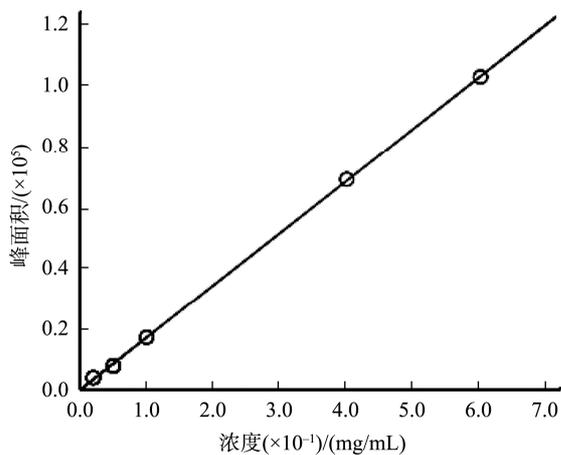


图 2 三氯蔗糖的标准曲线
Fig.2 Standard curve of sucralose

表 1 精密度实验结果
Table 1 Results of the precision test

编号	PG 测定值/(mg/mL)	保留时间/min	峰面积
1	0.60	12.523	73231
2	0.60	12.526	74047
3	0.60	12.522	74662
4	0.60	12.523	73564
5	0.60	12.523	73693
6	0.60	12.522	73767
平均值		12.523	73827
相对标准偏差(RSD)/%		0.012	0.66

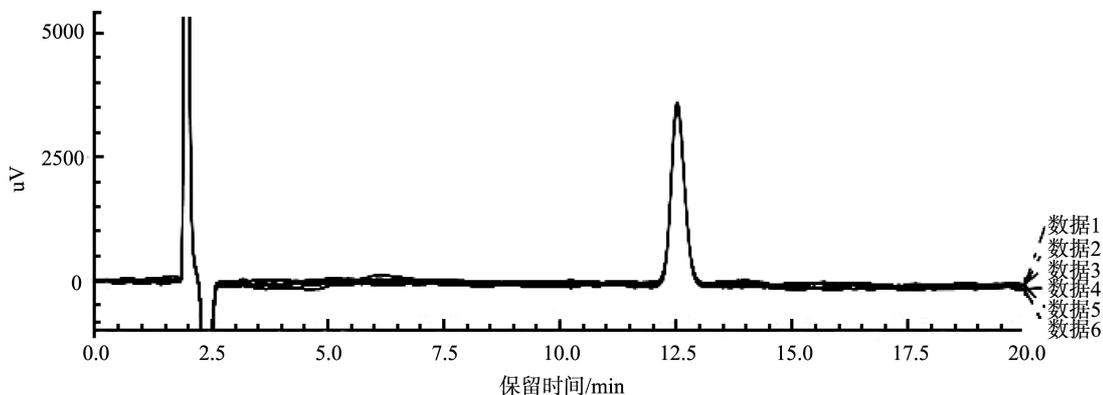


图 3 三氯蔗糖的精密度测定
Fig.3 Precision determination of sucralose

表2 加标回收实验
Table 2 Recovery experiment

样品编号	测量本底值/(mg/mL)	加标量/(mg/mL)	实测值/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.0000	0.0300	0.0293	97.67		
2	0.0000	0.0600	0.0591	98.50		
3	0.0000	0.1500	0.1507	100.47	98.60	1.31
4	0.0000	0.3000	0.2982	99.40		
5	0.0000	0.4500	0.4355	96.78		
6	0.0000	0.5500	0.5431	98.75		

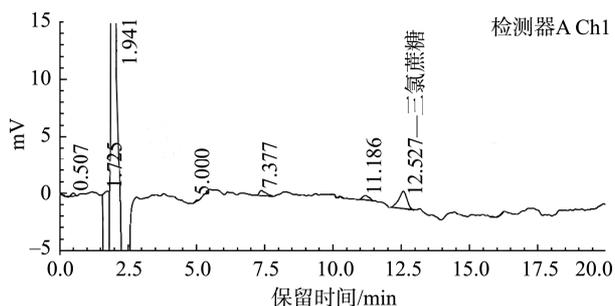


图4 样品添加标准品色谱图(0.15 mg/mL)
Fig.4 Chromatogram of spiked sample(0.15 mg/mL)

从表2结果中可以看出,在该分析条件下三氯蔗糖的平均加标回收率为98.60%,相对标准偏差(RSD)为1.31%,测定结果准确可靠,满足日常检测要求。

2.6 样品测定

本研究的样品采购于超市等场所,共计80份饼干样品,在被测样品中,标识含有三氯蔗糖的样本均有检出(图5),未标识含有三氯蔗糖的样品均低于检出限,按照GB 2760—2014^[6]最大使用量为0.25 g/kg的限度要求,无过量添加。

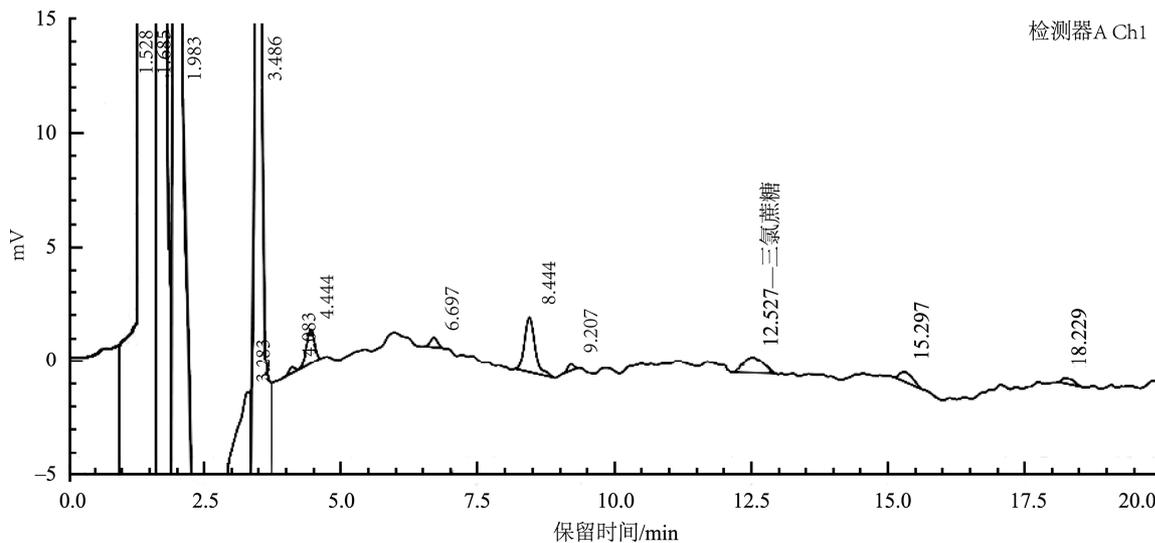


图5 饼干样品的液相色谱图
Fig.5 Chromatogram of cookie sample

3 结论与讨论

该研究中采用优化后的国标方法检测饼干样品中的三氯蔗糖,操作稳定,其在0.02~0.60 mg/mL成线性关系,相关系数 $r=0.9999$,回收率为96.78%~100.47%,峰面积相对标准偏差为0.66%,检出限为2.0 mg/kg。与国家检测标

准相比,加快了分析速度、提高了灵敏度、分离效果好、精密度高,适用于检验机构中三氯蔗糖含量的检测。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 沈云飞, 马正智, 李慧, 等. 三氯蔗糖的特性及其在食品中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2007, (4): 132–137.
- SHEN YF, MA ZZ, LI H, *et al.* The characteristic of sucralose and its application in food [J]. *China Food Addit*, 2007, (4): 132–137.
- [4] 杨婉霜, 高婷婷, 韩婉莹. 三氯蔗糖在食品中的应用[J]. *现代食品*, 2016, (7): 5–6.
- YANG WS, GAO TT, HAN WY. The application of sucralose in food research [J]. *Mod Food*, 2016, (7): 5–6.
- [5] 赵贞, 刘丽君, 李素琴, 等. 高效液相色谱法测定乳制品中三氯蔗糖的含量[J]. *乳业科学与技术*, 2017, 40(1): 16–18.
- ZHAO Z, LIU LJ, LI SQ, *et al.* High performance liquid chromatography determination of sucralose in dairy products [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2017, 40(1): 16–18.
- [6] 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].
- [7] BIGAL M, KRYMCHANTOWSKI AV. Migraine triggered by sucralose—a case report [J]. *Headache*, 2006, 46(3): 515–517.
- [8] 康文通, 杨建民, 陈琦, 等. 新型甜味剂三氯蔗糖的研究[J]. *中国调味品*, 2007, (1): 58–61.
- KANG WT, YANG JM, CHEN Q, *et al.* The study of new kind of sweetener sucralose [J]. *China Condi*, 2007, (1): 58–61.
- [9] 陈金娥. 超级甜味剂三氯蔗糖的开发与研究[J]. *酿酒科技*, 2007, (2): 90.
- CHEN JE. Development of super edulcorant—Trichlorosaccharose [J]. *Liquor-making Sci Tech*, 2007, (2): 90.
- [10] 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(3): 72–78.
- [11] 周莉莉, 杨颖, 刘艳明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的三氯蔗糖[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(10): 1175–1178.
- ZHOU LL, YANG Y, LIU YM, *et al.* Determination of sucralose in foodstuffs by ultra performance liquid chromatography–electrospray negative ionization mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(10): 1175–1178.
- [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]. *China Food Addit*, 2011, (2): 235–237.
- [13] 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): 171–180.
- 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): 171–180.
- [14] QIU WL, WANG ZF, NIE WL, *et al.* GC–MS determination of sucralose in splenda [J]. *Chromatographia*, 2007, 66(12): 935–939.
- [15] 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]. *China Food Addit*, 2013, (5): 214–216.
- [16] 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.
- [17] 袁河, 肖晓义, 夏延斌, 等. 高效液相色谱法测定槟榔中三氯蔗糖的含量[J]. *广州化工*, 2019, 47(5): 109–111, 114.
- YUAN H, XIAO XY, XIA YB, *et al.* Quantitative determination of sucralose in areca catechu L by high performance liquid chromatography [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2019, 47(5): 109–111, 114.
- [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 trichlorosucralose 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—2008 National food safety standard—National standard determination of sucralose in food [S].
- [21] 李桑, 刘嘉飞, 王立亚, 等. 高效液相色谱法测定饮料中三氯蔗糖含量的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(12): 2998–3003.
- LI S, LIU JF, WANG LY, *et al.* Optimization the method of determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(12): 2998–3003.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



王燕红, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测。
E-mail: wyh19870609@126.com