

实验技术与方法

高效毛细管区带电泳-间接紫外法测定食品中三氯蔗糖

陈桐^{1,2,3}, 鞠昭函⁴, 李疆², 赵珊², 丁晓静^{2,3}

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029; 2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013;
3. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 4. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083)

摘要:目的 建立利用毛细管区带电泳-间接紫外法测定食品中三氯蔗糖的方法。方法 样品用超纯水提取, 离心所得的上清液直接进样, 以未涂层熔融石英毛细管 (50 μm × 60.2 cm) 为分离柱, 3 mmol/L 3,5-二硝基苯甲酸 + 10 mmol/L 磷酸钠 + 12 mmol/L 氢氧化钠 (pH = 12.58) + 0.5 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵为分离缓冲液; 检测波长 200 nm, 分离电压 -20 kV。采用校正峰面积外标法进行定量。结果 方法检出限为 10 mg/L, 定量限为 30 mg/L, 线性范围为 30 ~ 300 mg/L, 线性相关系数 $r = 0.999\ 1$ 。低、中、高 3 个质量浓度 (40、60 及 80 mg/L) 的加标回收率分别为 108.1%、102.6%、103.5%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.3%、1.3% 及 1.0%, 方法精密密度为 2.0%。结论 本研究样品前处理操作简单, 20 min 之内即可完成三氯蔗糖的含量分析 (预清洗 6 min, 分离 13 min), 实现了与其结构相似但又同时存在于食品中蔗糖的分离, 且试剂及样品消耗量少, 适用于实验室对于食品中三氯蔗糖的检测。

关键词: 高效毛细管区带电泳; 三氯蔗糖; 间接紫外法; 3,5-二硝基苯甲酸; 食品添加剂; 食品安全
中图分类号: R155; O614 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456 (2016) 01-0065-05
DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.015

Determination of sucralose in foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection

CHEN Tong, JU Zhao-han, LI Jiang, ZHAO Shan, DING Xiao-jing

(Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To develop a new method for the determination of sucralose in foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Methods** Samples were extracted with ultrapure water and then centrifuged. The separation was carried out using an uncoated fused-silica capillary. The separation buffer consisted of 3 mmol/L 3,5-dinitrobenzoic acid, 10 mmol/L sodium phosphate, 12 mmol/L sodium hydroxide (pH = 12.58) and 0.5 mmol/L hexadecyltrimethylammonium bromide. The separation voltage was -20 kV and the detection wavelength was 200 nm. Quantification was made by external calibration between the corrected peak areas and the concentrations of sucralose. **Results** The limit of detection and limit of quantitation were 10 and 30 mg/L, respectively. The linear range between the corrected peak area and the concentration was from 30 to 300 mg/L with a correlation coefficient of 0.999 1. The average spiked recoveries of five replicates at three levels (40, 60 and 80 mg/L) were 108.1%, 102.6% and 103.5% with relative standard deviations of 1.3%, 1.3% and 1.0%, respectively. The precision of the method was 2.0%. **Conclusion** The method is simple with minimal sample and reagent consumption. The analysis could be completed within 20 min (6 min for rinsing and 14 min for separation). Sucralose could be baseline separated from sucrose with similar structure. Five kinds of food samples (a total of eight) were analyzed by the current method. No sample was found to exceed the permitted level.

Key words: High performance capillary zone electrophoresis; sucralose; indirect ultraviolet detection; 3,5-dinitrobenzoic acid; food additive; food safety

近年来, 食品工业已开发出一些质量好、安全

性高的非营养性甜味剂, 三氯蔗糖就是其中一种有代表性的甜味剂^[1], 其优点是高甜度 (蔗糖甜度的 600 倍以上)、口感与蔗糖相似、无后苦味、储存期长、无毒副作用、抗龋齿等^[2]; 三氯蔗糖具有低热值, 不参与人体新陈代谢, 不会引起肥胖及血糖波动等特点^[3]。因此, 世界各国均已批准其在食品加工中使用, 我国也允许在约 30 种食品中限量添加^[4], 添加量一般在 0.25 ~ 1.5 g/kg 之间^[5]。其中

收稿日期: 2015-06-29
基金项目: 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目 (2013-2-036)
作者简介: 陈桐 女 初级临床营养师 研究方向为临床营养
E-mail: chentong900@163.com
通信作者: 丁晓静 女 主任技师 研究方向为色谱技术在医药、卫生领域中应用 E-mail: dxj666@aliyun.com

典型的食品包括焙烤糕点、罐头、果酱、饮料、蜜饯凉果、调味料、配制酒等。因此建立食品中三氯蔗糖的检测方法十分必要^[6]。

三氯蔗糖水溶性好,且与性质极其相似的蔗糖总是同时存在于食品中,给色谱分离带来困难,因此文献报道的高效液相色谱法(HPLC)^[7-11]或离子色谱法(IC)^[12]大多采用梯度洗脱进行分离而使得分离时间一般在 30 ~ 50 min,不利于大量样品分析^[10-11]。气相色谱法(GC)的样品前处理需 12 ~ 24 h,前处理时间越长,测定结果带来误差越大^[13]。此外还有高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[14]、高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)^[7,15-16]、高效液相色谱-紫外衍生法^[6],但基本原理都是采用 HPLC 进行分离。而高效毛细管电泳(HPCE)以其较 HPLC 高 2 ~ 3 个数量级的分离效率而适合糖分析。然而,三氯蔗糖因甜度高,添加较少的量即可获得所需的甜味,因此对方法的检测灵敏度提出了较高要求。目前国内外文献报道的三氯蔗糖的 HPCE 分析方法的检出限一般在 28 mg/L 甚至更高^[17-18]。为进一步提高检测灵敏度,本研究在文献基础上,采用新的分离缓冲体系,建立了高效毛细管区带电泳-间接紫外法测定食品中三氯蔗糖的新方法,提高了检测灵敏度,使检出限可达 10 mg/L。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

食品样品均购于北京市某超市,分为罐头类、话梅类、乳饮料类、八宝粥类及固体果珍 5 类共 8 份样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪(配备紫外检测器,美国 Beckman)、内径 50 μm 未涂层熔融石英毛细管(河北永年锐泽色谱配件有限公司)、A11B S25 型均质仪(德国 IKA)、F-50A 型酸度计(北京北研兴电力仪表有限责任公司)、超纯水器、高速离心机、旋涡混合器。

苯甲酸钠(分析纯)、3,5-二硝基苯甲酸(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司,十二水合磷酸钠(优级纯,中国医药公司北京采购供应站),NaOH(优级纯),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,纯度 $\geq 99\%$,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司),三氯蔗糖标准品(HOK281, USP 参考标准,美国 ROCRVILLE),甜蜜素标准品(A0242083,纯度 = 99%,美国 Acros Oranics),糖精钠(G1331006,纯度

= 98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),蔗糖标准品(298-128C,纯度 = 99%)、果糖标准品(198-50B,纯度 = 99%)、葡萄糖标准品(234-15B,纯度 = 98%)均购自美国 Chemservice,柠檬酸标准品(BCBL M0135V,纯度 = 99%,美国 Sigma),山梨酸钾标准品(EPN1B-HE,纯度 $\geq 99\%$,梯希爱上海化成工业发展有限公司),试验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

3,5-二硝基苯甲酸储备液配置(7 mmol/L):称取 0.074 g 3,5-二硝基苯甲酸置于 50 ml 试剂瓶中,加入 50 ml 超纯水,放置在装有水(约 100 $^{\circ}\text{C}$)的 100 ml 烧杯中,超声溶解 15 min,摇匀后于室温放置备用,注意室温低时会有析晶现象,用前可置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中快速加热溶解。

三氯蔗糖标准储备液配置:称取 100 mg 三氯蔗糖标准品于 10 ml 容量瓶中,用超纯水溶解定容至 10 ml,配成质量浓度为 10 g/L 三氯蔗糖标准储备液,转移至 10 ml 塑料离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.2 样品前处理

液体样品(如水果罐头)用移液器移取 1 ml 罐头中的液体(同时称取其质量),置于 10 ml 塑料离心管中,加水定容至 5 ml,摇匀后取上清液 1 ml,过 0.45 μm 滤膜,置于 1.5 ml 离心管中备用,进样前转移至 200 μl PCR 管中进样测定。固体样品先用均质仪粉碎或剪刀剪碎,然后称取 0.3 g 于 10 ml 塑料离心管中,加入 5 ml 超纯水,超声提取 15 min,9 000 r/min 离心 10 min。将上清液取出,过 0.45 μm 滤膜后直接进样。

1.2.3 毛细管的预处理

新的毛细管分别用 1 mol/L NaOH 洗 20 min、水洗 5 min 及分离缓冲液洗 5 min。每次进样前,用 1 mol/L NaOH、超纯水及分离缓冲液分别洗 2 min,以保证迁移时间及校正峰面积的重现性。

1.2.4 仪器条件

毛细管(50 μm $\times$ 60.2 cm),分离缓冲液:3 mmol/L 3,5-二硝基苯甲酸 + 10 mmol/L 磷酸钠 + 12 mmol/L 氢氧化钠(pH = 12.58) + 0.5 mmol/L CTAB;分离电压-20 kV,检测波长 200 nm,样品室温度 15 $^{\circ}\text{C}$,进样压力 3.45 kPa,进样时间 20 s,工作电流约 24.8 μA 。

2 结果与分析

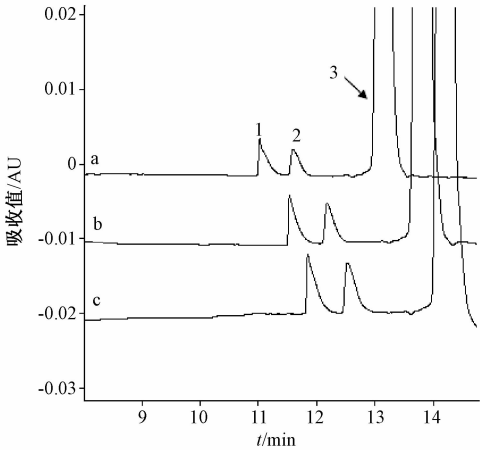
2.1 探针及检测波长的选择

三氯蔗糖属高倍甜味剂,在食品中添加较少的量,即可达到甜味效果,因此,对检测方法的灵敏度

有较高要求。由于它无特征紫外吸收,故本试验采用间接紫外法进行测定,其中探针(添加到分离缓冲液中且有紫外吸收的物质)及检测波长的选择是关键。山梨酸是糖分析中比较好的探针^[19],然而并不是三氯蔗糖分析的较好探针。根据文献^[17-18],以3,5-二硝基苯甲酸为探针,238 nm为检测波长,实现了食品中三氯蔗糖的测定。考虑到200 nm处附近的检测波长,可获得绝大多数物质的高灵敏度检出,故本研究仍以3,5-二硝基苯甲酸为探针。分别比较了200、238、254 nm处波长的检测灵敏度,结果表明200 nm处检测灵敏度更高。故本试验选用200 nm为检测波长。

2.2 探针浓度的选择

探针的浓度越低,检测的灵敏度就越高^[20],但必须注意的是若浓度过低,电迁移扩散而导致待测物的峰展宽^[21],从而影响待测物的灵敏度。本试验由于探针本身的水溶性不理想,通过预试验能完全溶解的浓度为8 mmol/L,故探针浓度一般选择2~8 mmol/L之间。保持分离缓冲液中其他组分的浓度不变,3,5-二硝基苯甲酸的浓度为2~5 mmol/L时,三氯蔗糖的峰迁移时间逐渐增加,并与蔗糖峰达基线分离,由于2 mmol/L 3,5-二硝基苯甲酸浓度过低,使得待测物峰展宽,影响灵敏度结果。当浓度增加至5 mmol/L时,三氯蔗糖与蔗糖的峰分离变差,但峰高略有增加。故本试验将3,5-二硝基苯甲酸的浓度定为3 mmol/L,见图1。



注:1为三氯蔗糖;2为蔗糖;3为未知化合物;a、b、c表示3,5-二硝基苯甲酸的浓度分别为2、3、5 mmol/L

图1 3,5-二硝基苯甲酸浓度对三氯蔗糖与蔗糖间分离的影响

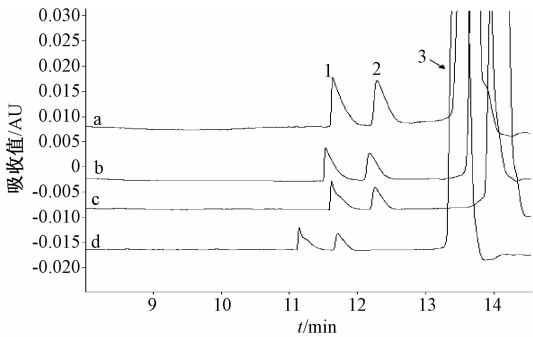
Figure 1 Effects of the concentration of 3,5-dinitrobenzoic acid on the separation of sucralose and sucrose

2.3 分离缓冲体系及其浓度的选择

糖的解离常数 pK_a 通常在12~14之间,磷酸盐的紫外吸收低,其 $pK_{a3} = 12.36$,缓冲pH范围在

11.36~13.36之间,是较理想的分离糖的缓冲体系。间接紫外法需选用低浓度盐作为缓冲溶液,浓度通常控制在5~10 mmol/L之间^[19]。此外,分离缓冲溶液具有缓冲能力的最低浓度一般为10 mmol/L^[22]。

本试验考察了浓度为5、10、12、15 mmol/L磷酸钠对三氯蔗糖与蔗糖分离的影响,随着磷酸钠浓度的增加,三氯蔗糖与蔗糖间的分离度逐渐增加,但灵敏度逐渐下降。当磷酸钠浓度达15 mmol/L时,三氯蔗糖与蔗糖峰展宽,故磷酸钠的最佳浓度为10 mmol/L,见图2。



注:1为三氯蔗糖;2为蔗糖;3为未知化合物;a、b、c、d表示磷酸钠的浓度分别为5、10、12、15 mmol/L

图2 磷酸钠浓度对三氯蔗糖与蔗糖分离的影响

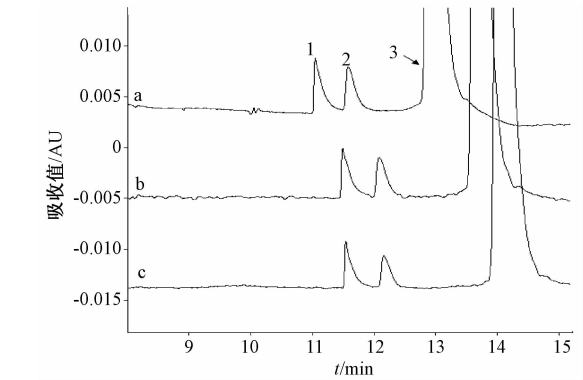
Figure 2 Effects of the concentration of sodium phosphate on the separation of sucralose and sucrose

2.4 分离缓冲溶液pH或NaOH浓度的优化

分离缓冲溶液pH影响电渗流及待分析物所带电荷,从而影响分析物的迁移时间和分离效率。在其他试验条件不变的情况下,考察了10、12、15 mmol/L NaOH对三氯蔗糖及蔗糖间分离的影响,见图3。随着NaOH浓度的增加,三氯蔗糖及蔗糖的灵敏度逐渐降低,但分离度增加。当NaOH浓度增至15 mmol/L,三氯蔗糖峰形略有变形且三氯蔗糖与蔗糖之间的分离度比加入12 mmol/L NaOH时略有降低。故12 mmol/L NaOH为最优试验条件,相应 $pH = 12.58$,符合磷酸钠体系的最佳缓冲范围($pH = 11.3 \sim 13.3$)的要求,根据文献^[17-18]所用分离缓冲体系为3 mmol/L 3,5-二硝基苯甲酸及20 mmol/L NaOH($pH = 12.1$),该体系的pH超出了3,5-二硝基苯甲酸的缓冲范围($pH = 1.77 \sim 3.77$),而单一的氢氧化钠溶液也不是缓冲溶液,故本试验获得了更理想的准确性及重现性。

2.5 工作曲线、线性范围、检出限和精密度

将三氯蔗糖的储备液用水逐级稀释成30、70、110、150、190、230、270、300 mg/L标准工作液,在优化的电泳条件下依次进样分析,校正峰面积外标法定量。校正峰面积(y)与质量浓度(x , mg/L)间呈



注:1 为三氯蔗糖;2 为蔗糖;3 为未知化合物;a、b、c 表示
氢氧化钠的浓度分别为 10、12、15 mmol/L

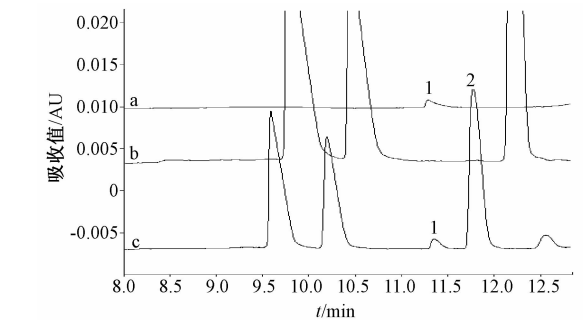
图 3 氢氧化钠浓度对三氯蔗糖与蔗糖分离的影响
Figure 3 Effects of the concentration of sodium hydroxide
on the separation of sucralose and sucrose

良好线性关系,线性回归方程为 $y = 2.8559x + 24.774$,相关系数 $r = 0.9991$,线性范围为 30 ~ 300 mg/L,检出限为 10 mg/L ($S/N = 3$),定量限为 30 mg/L ($S/N = 10$)。

将 70、150、230 mg/L 三氯蔗糖标准溶液分别连续进样 7 次,以考察仪器精密度 (RSD)。校正峰面积的 RSD 分别为 3.6%、3.9%、2.1%。按 1.2.2 部分中的方法平行处理 7 份样品进样测定,由于未能检测到样品中的三氯蔗糖,故将加标样品 (35 mg/L) 作为阳性样品,以考察方法精密度,其 RSD 为 2.0%。

2.6 回收率试验

以罐头样品为空白样品,按 1.2.2 前处理方法,分别添加 40、60、80 mg/L 3 个水平进行加标回收试验,电泳图见图 4。每个加标水平平行处理 5 份样品进行测定,结果见表 1。



注:1 为三氯蔗糖;2 为蔗糖;a 为 80 mg/L 三氯蔗糖标准;
b 为空白样品;c 为空白样品加 80 mg/L 三氯蔗糖标准

图 4 空白样品加标的电泳图
Figure 4 Electrophoregrams of spiked blank sample

表 1 方法的加标回收率结果 ($n = 5$)		
Table 1 Results of the method recovery test		
加标水平/(mg/L)	平均回收率/%	RSD /%
40	108.1	1.3
60	102.6	1.3
80	103.5	1.0

2.7 样品分析及干扰试验

对罐头类、话梅类、乳饮料类、八宝粥类及固体果珍 5 类食品共计 8 份样品进行检测分析,均未检出三氯蔗糖。

分别将质量浓度均为 500 mg/L 的食品中常见防腐剂 (山梨酸、脱氢乙酸及苯甲酸) 及甜味剂 (蔗糖、果糖、葡萄糖、阿斯巴甜) 进行干扰试验,均未见干扰,显示了本方法的高选择性。

3 小结

本文所建立的采用 3,5-二硝基苯甲酸为探针的高效毛细管区带电泳-间接紫外法检测食品中三氯蔗糖的方法,仅采用简单的无机盐分离缓冲体系,实现了三氯蔗糖与蔗糖的同时分离,消除了蔗糖干扰。在灵敏度、分离度及定量重现性方面较文献方法均有很大提高,且食品中共存的常见防腐剂及甜味剂等不干扰三氯蔗糖的测定。该法样品前处理简单,无需使用有机溶剂,适用于食品中三氯蔗糖的日常检测。

参考文献

[1] 胡莉蓉. 新型甜味剂三氯蔗糖[J]. 化工时刊, 2005, 19(3): 50-55.

[2] 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): 235-238.

[3] 余飞. 三氯蔗糖的检测方法对比研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(5): 69-71.

[4] 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): 214-218.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.

[6] 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, 2014, 45(5): 836-838.

[7] Buchgraber M, Wasik A. EUR 22726 EN Validation of an analytical method for the simultaneous determination of nine intense sweetens by HPLC-ELSD[S]. 2007.

[8] 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.

[9] WU M, QIAN Y, Boyd J M, et al. Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water[J]. J Chromatogr A, 2014, 1359(7): 156-161.

[10] 熊雨蓓, 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, 17(4): 156-158.

[11] Ferrer I, Thurman E M. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(25): 4127-4134.

[12] 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]. 农业机械,2013(3):65-67.

[13] Farhadi A, Keshavarzian A, Holmes E W, et al. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose; application to the assessment of intestinal permeability [J]. J Chromatogr B,2003,784(1):145-154.

[14] 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.

[15] 刘芳,王彦,王玉红,等. 固相萃取-高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时检测食品中 5 种人工合成甜味剂[J]. 色谱,2012,30(3):292-297.

[16] 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.

[17] Stroka J, Dossi N, Ankla m E. Determination of the artificial sweetener sucralose by capillary electrophoresis [J]. Food Additives and Contaminants,2003,20(6):524-527.

[18] Mccourt J, Stroka J, Ankla m E. Experimental design-based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralose in food matrices [J]. Anal Bioanal Chem, 2005,382(5):1269-1278.

[19] 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006.

[20] Johns C, Macka M, Haddad P R. Enhancement of detection sensitivity for indirect photometric detection of anions and cations in capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2003, 24(12/13):2150-2167.

[21] Macka M, Johns C, Philip D A, et al. Indirect photometric detection in CE using buffered electrolytes-part I, Principles [J]. LC-GC North America,2001,19(1):38-46.

[22] Schellinger A P, Carr P W. Solubility of buffers in aqueous-organic eluents for reversed-phase liquid chromatography [J]. LC-GC North America,2004,22(6):544-548.

实验技术与方法

建立同时快速测定动物源性食品中 17 种农药的
在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱联用法

吕飞¹,李华东¹,叶英²,卓晓娟¹,朱事康¹,黄刚¹

(1. 惠州出入境检验检疫局综合技术中心,广东 惠州 516006;
2. 岛津企业管理(中国)有限公司,广东 广州 510010)

摘要:目的 建立猪肉、鸡蛋、牛奶、猪脂肪等动物源性食品中同时检测 17 种农药残留的在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱联用法(GPC-GC-MS)。**方法** 样品用正己烷饱和乙腈溶液均质提取,加入氯化钠盐析,离心分层,取部分乙腈层经固相萃取(NH₂)柱净化,利用在线 GPC-GC-MS 测定。**结果** 在 0.85~30 μg/L 范围内相关系数均在 0.95 以上,回收率在 61.2%~126% 之间。17 种农药残留最低检出限范围(以信噪比 S/N≥3 计)为 0.25~3.00 μg/L,定量限范围(以信噪比 S/N≥10 计)为 0.85~10.0 μg/L。**结论** 该法有效、耐用、快速、灵敏,符合法规残留限量检测要求。

关键词:动物源性食品;农药残留;同时;在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱联用法;食品污染物;检测
中图分类号:R155.5;F767.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2016)01-0069-07
DOI:10.13590/j.cjfh.2016.01.016

Establishment of a method for the simultaneous and rapid detection of 17 pesticide residues in animal derived foods using on-line GPC-GC-MS

LV Fei, LI Hua-dong, YE Ying, ZHUO Xiao-juan, ZHU Shi-kang, HUANG Gang
(Comprehensive Technology Center of Huizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Huizhou 516006, China)

Abstract: Objective To establish an on-line GPC-GC-MS analytic method to determine 17 pesticide residues simultaneously and rapidly in animal derived foods including pork, egg, milk and fat. **Methods** The pesticide residues