31-33.
[9] 朱家琦,刘泽嵌,王颖. 3-硝基丙酸的代谢研究[J]. 卫生研究,1993,22(2):93-96.
[10] 陈晓明,胡文娟,陈君石,等. 天然毒素 3-硝基丙酸的研究现状[J]. 国外医学-卫生学分册, 1998,17(3): 158-161.
[11] 刘勇,吴南,吴永宁,等. 3-硝基丙酸的气相色谱-热能检定器测定法及其在大鼠体内的毒物代谢动力学研究[J].卫生研究,1993,22(1): 35-38.
[12] MUIR A D, MAJAK W. Quantitative determination of 3-nitropropionic acid and 3-nitropropanol in plasma by HPLC[J]. Toxicol Leftt,1984,20(2):133-136.
[13] MAJAK W, MCDIARMID R E. Detection and quantitative determination of 3-nitropropionic acid in bovine urine[J]. Toxicol Lett, 1990,50(2/3):213-220.
[14] 刘红河,刘桂华,康莉,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定中毒样品中 3-硝基丙酸[J]. 卫生研究,2016,45(1):56-60.
[15] 桂建业,孙威,张辰凌,等. 离子色谱-串联质谱法分析环境水体中痕量人工甜味剂[J]. 分析化学,2016,44(3):361-366.
[16] 熊治渝,董英,周洪斌,等. 在线富集离子色谱-质谱联用法同时测定饲料添加剂中的 16 种有机酸[J]. 色谱, 2014, 32(2):145-150.
[17] 杜利君,刘晓琳,李晓雨,等. 分散固相萃取-离子色谱质谱法测定乳制品中硫氰酸盐含量[J]. 中国食品添加剂,2017(6):190-194.
[18] 杜利君,花锦,赵悠悠,等. 分散固相萃取-离子色谱质谱法测定水果和蔬菜中的草甘膦残留量[J]. 分析试验室, 2017, 36(11): 1277-1280.
[19] CAI M Q, DONG X Y, CHEN X H, et al. An assay for identification and determination of toxic rodenticide valone in serum by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with ion trap detector [J]. Talanta,2009,78(1): 242-247.
[20] BAYGILDIEV T, ZATIRAKHA A, RODIN I, et al. Rapid IC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2017,1058(5):32-39.
[21] 张晓艺,张秀尧,蔡欣欣,等. 稳定同位素稀释离子色谱-三重四极杆质谱法测定血浆和尿液中的氟乙酸[J]. 色谱,2018,36(10):979-984.
[22] 张璐,乐爱山,郑玲,等. 固相萃取/超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测酶制剂中 3-硝基丙酸[J]. 分析测试学报,2013,32(6):747-752.
[23] 李兵,吴国华,刘伟,等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法检测甘蔗中 3-硝基丙酸的方法研究[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(2):127-132.
[24] 邵国健,姚建花,朱文涛. 固相萃取-离子色谱法测定甘蔗中 3-硝基丙酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(15): 2154-2156.
[25] ADAMS S, GUEST J, DICKINSON M, et al. Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food[J]. J Agric Food Chem,2017,65(34):7294-7304.
[26] 江涛,张庆林,罗雪云. 3-硝基丙酸的高效液相色谱分析[J]. 卫生研究,1999,28(5):300-302.
[27] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定白酒中 9 种甜味剂

王丽英,任贝贝,路杨,刘梦颖,刘印平,常凤启
(河北省疾病预防控制中心,河北 石家庄 050021)

摘 要:目的 建立准确、快速检测白酒中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、三氯蔗糖、纽甜、阿力甜、甜菊糖苷和甜菊双糖苷 9 种甜味剂的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。**方法** 样品经沸水浴加热除去乙醇,采用超高效液相色谱-串联质谱法进行检测。以水(含 10 mmol/L 乙酸铵)和甲醇为流动相, HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行分离,电喷雾离子化多反应监测模式检测。**结果** 9 种甜味剂在相应线性范围内关系良好,相关系数均≥0.999;方法回收率为 85.2%~102.8%,相对标准偏差(*RSD*)为 3.8%~7.3%;检出限为 0.3~1.5 μg/kg。**结论** 该方法操作简单快速、重现性好,可用于白酒中 9 种甜味剂的检测。

关键词:甜味剂;糖精钠;甜蜜素;白酒;超高效液相色谱-串联质谱
中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2020)02-0154-06
DOI:10.13590/j.cjfh.2020.02.009

收稿日期:2020-01-13
作者简介:王丽英 女 副主任技师 研究方向为食品安全检测 E-mail: wangliying2011@163.com
通信作者:常凤启 男 主任技师 研究方向为食品质量与安全 E-mail: hbweisheng2@163.com

Determination of 9 sweeteners in spirits by using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Liying, REN Beibei, LU Yang, LIU Mengying, LIU Yinping, CHANG Fengqi

(Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050021, China)

Abstract: Objective To establish an analysis method for detecting 9 sweeteners including acesulfame, sodium saccharin, cyclamate, aspartame, sucralose, neotame, alitame, stevioside and steviobioside in spirits by using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** After the sample was heated by boiling water bath to remove ethanol, it was detected by UPLC-MS/MS. The sweeteners were separated by UPLC with water (containing 10 mmol/L ammonium acetate) -methanol gradient elution in a HSS T3 chromatography column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), and qualified/quantified by mass spectrometry with electron spray ionization multiple reaction monitoring mode. **Results** The linearity of the 9 sweeteners in the range was good, and the correlation coefficient was above 0.999. The recovery of the method was 85.2%-102.8%, the relative standard deviation (*RSD*) was 3.8%-7.3%. The detection limit was 0.3-1.5 μg/kg. **Conclusion** The method is simple, rapid and reproducible, and can be used for the detection of 9 sweeteners in spirits.

Key words: Sweeteners; sodium saccharin; sodium cyclamate; spirits; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

甜味剂是一类重要的食品添加剂,用以改善食品口感和风味,非糖类甜味剂由于其低热量、高甜度、适合糖尿病患者食用等特点而成为蔗糖替代品。白酒是中华民族特有的传统产品,白酒产品在我国受到广大消费者钟爱。我国白酒属于蒸馏酒,GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》[1]不允许在白酒中添加任何甜味剂。实际生产中,个别生产企业为了降低成本、改善口感、提高甜度,仍违规添加甜味剂,而且往往是两种以上的甜味剂复合使用,因此有必要开发一种可同时检测多种甜味剂的检测方法,以利于白酒中多种甜味剂的筛查。

目前,食品中甜味剂的检测方法主要有离子色谱(IC)法[2]、气相色谱(GC)法[3]、高效液相色谱(HPLC)法[4-7]、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)法[8-15]等。近年来采用高效液相色谱-串联质谱法对食品中的甜味剂进行分析的报道逐渐增多。本试验建立了白酒中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、三氯蔗糖、纽甜、阿力甜、甜菊糖苷和甜菊双糖苷共9种甜味剂的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法,可同时对9种甜味剂进行准确的定性、定量分析。该方法操作简单快速、重现性好,适用于白酒中9种甜味剂的同时检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品从市场上随机进行采样,主要采样于超市和农贸市场。样品采集后编号并记录,常温下避光保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

Waters TQS 高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(美国 Waters),DK-98-Ⅱ水浴锅。

甲醇、乙腈、甲酸铵、乙酸铵均为色谱纯;安赛蜜(C10010800,0.25 g,纯度99.1%)、糖精钠水合物(C16901010, 0.25 g, 纯度 99.9%)、甜蜜素(C11830800, 0.25 g, 纯度 99.4%)、阿斯巴甜(C10304940,0.25 g,纯度97.7%)标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer;三氯蔗糖(CDAA-261202,100 mg,纯度99.2%)、纽甜(CDAA-240006,100 mg,纯度98.5%)、阿力甜(CDAA-240002,100 mg,纯度99.2%)、甜菊糖苷(CDAA-261301, 20 mg, 纯度98.6%)、甜菊双糖苷(CDAA-280422,20 mg,纯度98.8%)标准品均购自上海安谱公司;试验用水均为蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

准确称取5.0 g样品,置于10 ml玻璃管中,沸水浴加热30 min,放置室温后,用纯水定容至5.0 ml,样液过0.22 μm滤膜,待测。

1.2.2 空白基质溶液的配制

分别称取与待测样品基质相同且不含待测成分的样品,按1.2.1步骤操作,制备空白基质溶液。

1.2.3 仪器条件

色谱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 液相色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流速为0.3 ml/min;

进样量 5 μl，柱温 30 ℃；流动相 A 为水（含 10 mmol/L乙酸铵），B 为甲醇；洗脱梯度：0～1.5 min，5%B；1.5～5.5 min，5%～90%B；5.5～8.0 min，90%B；8.0～8.5 min，90%～5%B；8.5～10.0 min，5%B。

质谱：电喷雾离子源 ESI^-；毛细管电压：ESI^- 2.5 kV；离子源温度 150 ℃；锥孔反吹气流速 150 L/h；脱溶剂气温度 450 ℃；脱溶剂气流速 800 L/h；碰撞气为氩气；碰撞气流量 0.16 ml/min；检测方式：多反应离子监测（MRM）。9 种甜味剂锥孔电压、碰撞能量、离子化方式等质谱参数见表 1。

表 1　9 种甜味剂的质谱参数

Table 1　Mass spectral parameters of 9 sweeteners

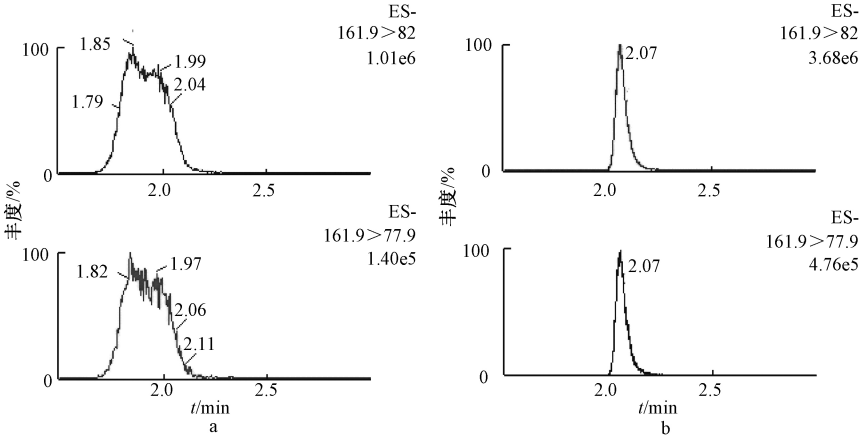
化合物	母离子 /(m/z)	特征离子 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
安赛蜜	161.9	77.9*	30	25
		82.0*	30	15
甜蜜素	178.2	80.0*	30	22
		96.0	30	22
糖精钠	182.0	62.0	30	20
		106.0*	30	18
阿斯巴甜	293.0	200.0	30	15
		261.1*	30	10
阿力甜	330.1	295.0	30	20
		312.1*	30	15
三氯蔗糖	394.9	358.9*	30	10
	397.0	361.0	30	10
纽甜	377.2	200.1*	30	25
		345.2	30	15
甜菊双糖苷	641.2	317.2	30	45
		479.2*	30	40
甜菊糖苷	803.1	479.2	30	50
		641.1*	30	20

注：* 表示定量离子

2　结果与分析

2.1　样品前处理条件的选择

白酒基质相对较简单，但其中含有高比例的乙醇，会影响极性较大的化合物安赛蜜在 HSS T3 柱上的保留时间和峰形，导致保留时间偏移，峰形变宽，出现分叉等现象。为了减小乙醇对安赛蜜的影响，本试验采用沸水浴加热的方法降低白酒中乙醇的含量，减小乙醇对色谱峰的影响，减弱基质效应。乙醇对安赛蜜的影响如图 1 所示。从图中可以看出，采用沸水浴加热后，安赛蜜的峰型窄而对称，能明显提高检测结果的准确性和重现性。本试验同时对沸水浴加热时间进行了考察，结果表明，沸水浴加热 30 min 后，白酒中乙醇的含量对色谱峰的影响基本不再发生变化，因此，本试验选用沸水浴加热时间为 30 min。



注：a 为未采用沸水浴加热的安赛蜜 MRM 色谱图；b 为采用沸水浴加热后的安赛蜜 MRM 色谱图

图 1　不同前处理方法的安赛蜜 MRM 色谱图

Figure 1　MRM chromatograms of acesulfame by different pretreatment methods

2.2　液相条件的优化

本试验分别考察了 BEH C_{18}柱和 HSS T3 柱对 9 种甜味剂的分离效果，结果发现二者均能较好地分离 9 种被测物，但在相同的分离条件下，HSS T3 柱的分离效果更好，考虑到某些被测物极性较强，本试验选用 HSS T3 柱进行分析。同时，本方法对流动相的种类进行了考察，比较了水-乙腈、水（含 10 mmol/L 甲酸铵）-乙腈、水（含 10 mmol/L 乙酸铵）-乙腈、水-甲醇、水（含 10 mmol/L 甲酸铵）-甲醇、水（含 10 mmol/L 乙酸铵）-甲醇作为流动相时各化合物的分离情况，结果表明流动相加入乙酸铵后，各目标化合物的保留时间稳定、分离效果较好。由于乙腈的洗脱能力较强，从各物质分离度、峰形、响应值以及保留时间的稳定性等指标进行综合衡量，本试验选用水（含 10 mmol/L 乙酸铵）-甲醇为流动相进行梯度洗脱。

2.3　质谱条件的优化

将 9 种甜味剂分别配成 500 ng/ml 的标准溶

液,根据各化合物分子的化学电离性质,采用直接进样法,在优化质谱参数的基础上,分别确定 9 种甜味剂母离子和子离子的质量数。结果发现各目标化合物在 ESI^- 模式下,可获得较高的灵敏度。9 种甜味剂母离子和子离子的质荷比、锥孔电压、碰撞能量、离子化方式见表 1,其空白基质加标溶液的 MRM 色谱图见图 2。

2.4 方法的回收率和精密度

本试验采用空白基质添加不同浓度的目标化合物的混合标准溶液,在已优化的色谱与质谱条件下,对目标化合物进行定量。以 3 倍信噪比($S/N=3$)和 10 倍信噪比($S/N=10$)分别计算对应目标化合物的浓度,得出目标化合物的检出限和定量限,见表 2。9 种甜味剂在相应线性范围内关系良好,相关系数 $r\geqslant0.999$,检出限为 0.3~1.5 μg/kg,定量限为 1.0~5.0 μg/kg。

在不含目标化合物的阴性样品中添加高、中、低三个浓度水平的目标化合物,每个加标水平平行测定 6 次,计算目标化合物的回收率和相对标准偏差(*RSD*),结果见表 3。结果表明,方法回收率为 85.2%~102.8%,*RSD* 为 3.8%~7.3%。

2.5 实际样品的测定

采用本方法测定市售 28 份白酒样品中 9 种甜味剂的含量,其中 2 份样品检出甜蜜素,1 份样品检出糖精钠,2 份样品检出纽甜,1 份样品检出三氯蔗糖、甜菊糖苷和甜菊双糖苷;其余样品中 9 种甜味剂均未检出。阳性样品中 9 种甜味剂具体检出情况见表 4。6 号样品中 9 种甜味剂 MRM 色谱图见图 3。

本试验中 9 种甜味剂均为 GB 2760—2014[1] 中允许使用的食品添加剂品种,且均有具体使用范围以及最大使用量,但均不允许在白酒中添加使用,因此,白酒中检出甜味剂的问题值得关注。

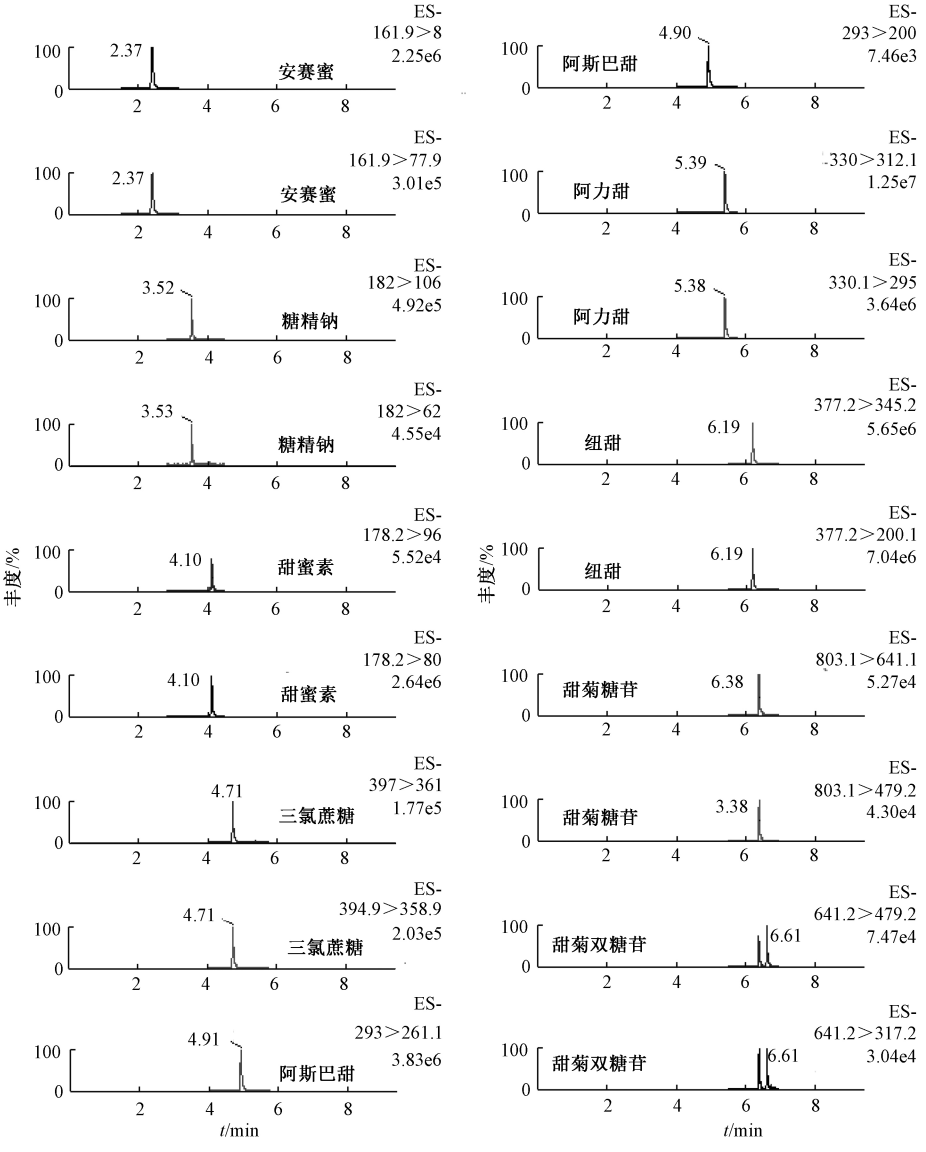


图 2 9 种甜味剂空白基质加标溶液 MRM 色谱图

Figure 2 MRM chromatograms of standards of 9 sweeteners

表 2 9 种甜味剂的线性方程、线性范围、相关系数、检出限与定量限

Table 2 Linear equation, linear range, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit

化合物	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数 r	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
安赛蜜	1.5~200.0	$y=135.1x-26.6$	0.999 7	0.5	1.5
甜蜜素	1.5~200.0	$y=549.4x+286.7$	0.999 7	0.5	1.5
糖精钠	3.0~400.0	$y=109.6x-9.1$	0.999 6	1.0	3.0
阿斯巴甜	1.5~200.0	$y=1185.7x+480.8$	0.999 5	0.5	1.5
阿力甜	1.5~200.0	$y=2682.4x-889.5$	0.999 5	0.5	1.5
三氯蔗糖	5.0~600.0	$y=64.9x-13.9$	0.999 0	1.5	5.0
纽甜	1.0~200.0	$y=1432.3x+1216.5$	0.999 4	0.3	1.0
甜菊糖苷	3.0~400.0	$y=118.2x+264.8$	0.999 1	1.0	3.0
甜菊双糖苷	5.0~600.0	$y=32.9x+171.6$	0.999 5	1.5	5.0

表 3 白酒中 9 种甜味剂添加水平、回收率及 *RSD*($n=6$)

Table 3 Spiked levels, recovery and *RSD* of 9 sweeteners in spirit samples

目标化合物	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	*RSD*/%	目标化合物	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	*RSD*/%
安赛蜜	1.5	85.2	5.5	三氯蔗糖	5.0	97.4	5.8
	50.0	94.7	4.8		50.0	99.9	4.9
	200.0	100.8	5.4		200.0	101.9	6.0
甜蜜素	1.5	89.8	4.3	纽甜	1.0	96.5	5.0
	50.0	96.5	3.8		50.0	100.1	5.3
	200.0	102.8	4.2		200.0	97.8	4.2
糖精钠	3.0	97.2	6.7	甜菊糖苷	3.0	89.3	7.1
	50.0	98.3	5.0		50.0	96.9	7.0
	200.0	102.8	4.6		200.0	97.8	7.3
阿斯巴甜	1.5	93.8	5.9	甜菊双糖苷	5.0	90.8	6.3
	50.0	95.1	6.8		50.0	98.1	6.9
	200.0	101.9	4.9		200.0	100.6	5.2
阿力甜	1.5	96.0	6.4				
	50.0	97.1	5.8				
	200.0	101.3	5.5				

表 4 阳性样品中 9 种甜味剂检出结果(μg/kg)

Table 4 Detection of 9 sweeteners in positive samples

样品编号	安赛蜜	糖精钠	甜蜜素	阿斯巴甜	三氯蔗糖	纽甜	阿力甜	甜菊糖苷	甜菊双糖苷
1	—	—	14.08	—	—	—	—	—	—
2	—	—	7.39	—	—	—	—	—	—
3	—	2.65	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	5.55	—	—	—
5	—	—	—	—	—	2.34	—	—	—
6	—	—	—	—	5.98	—	—	40.36	43.35

注:—表示未检出

3 小结

本试验建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定白酒中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、三氯蔗糖、纽甜、阿力甜、甜菊糖苷和甜菊双糖苷 9 种甜味剂的检测方法,并对市售的 28 份白酒样品进行了检测。所检白酒样品中,部分样品检出少量甜蜜素、糖精钠、纽甜、三氯蔗糖、甜菊糖苷和甜菊双糖苷,存在违规添加甜味剂的现象。实际样品检测表明本方法简单快速、重现性好,可以高效、快速、准确地测定白酒中 9 种甜味剂的违法添加,为提升白酒中甜味剂的安全监管提供了技术支持。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014 [S].北京:中国标准出版社,2014.

[2] 卜宇宏, 李明, 李静. 离子色谱测定白酒中甜蜜素、糖精钠和安赛蜜 [J].酿酒, 2011,38(5):71-73.

[3] 张雅珩, 周围, 李斌. 衍生化毛细管气相色谱法同时测定无糖食品中的多种糖醇类甜味剂 [J]. 分析化学, 2013, 41(6): 911-916.

[4] 方光伟, 何建仁, 陈忍, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定食品中 9 种甜味剂 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8 (12): 4741-4746.

[5] 赵贞, 万鹏, 刘春霞, 等. 高效液相色谱法检测乳品中 3 种甜味剂 [J].中国酿造, 2014, 33(1):147-149.

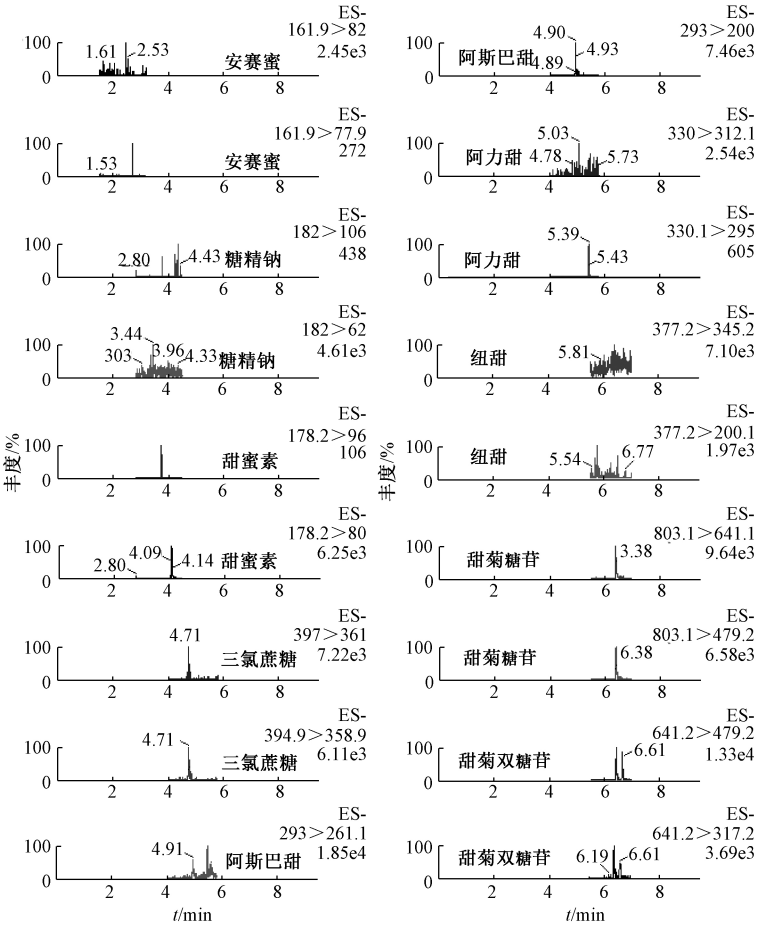


图 3 样品中 9 种甜味剂 MRM 色谱图

Figure 3 MRM chromatograms of 9 sweeteners in the sample

[6] 赵志磊, 谢飞, 贾克军, 等. 高效液相色谱法测定无糖乳制品中 4 种高倍甜味剂的含量 [J].食品科技, 2013, 38(2): 301-303.

[7] 杨小琪, 黎源倩, 邹晓莉. 食品中甜味剂的离子对高效液相色谱法测定 [J].现代预防医学, 2017, 44(22):4081-4085.

[8] 阮丽萍, 蔡梅, 吉文亮, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定调味品中 8 种人工合成甜味剂 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4):331-335.

[9] 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.

[10] 阳曦, 刘玮.液相色谱-串联质谱法同时测定糕点中 6 种甜味剂 [J]. 食品工业, 2019(6): 316-319.

[11] 柯润辉, 王丽娟, 安红梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法直接测定白酒中 8 种甜味剂 [J]. 酿酒科技, 2016(5): 107-109.

[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.

[13] 刘佟, 杨悠悠, 王浩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饮品中 7 种人工合成甜味剂 [J]. 分析测试技术与仪器, 2015, 21(4):218-224.

[14] 柯润辉, 王丽娟, 安红梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定白酒中氨基甲酸乙酯和 8 种甜味剂 [J].食品与发酵工业, 2016, 42(4):174-178.

[15] 刘红, 王林, 胡博, 等. 超高效液相色谱-串联质谱快速测定饮料中 2 种生物碱和 6 种甜味剂 [J].食品与发酵工业, 2019,45(17):247-251.