

文章编号: 1673 1689(2010)05-0670-06

超高压液相色谱—质谱同时测定白酒中 6 种微量甜味剂的方法研究

吴世嘉¹, 王洪新^{*1}, 陶冠军²

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122)

摘 要: 为了检测白酒中 6 种甜味剂(安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、三氯蔗糖、阿斯巴甜、纽甜), 建立了一种超高压液相色谱质谱联用的新方法。样品预处理后, 通过 BEH C-18 色谱柱分离, 以甲醇-20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相进行梯度洗脱, 在 ESI 负离子模式下检测, 一次进样分析仅需 10 min。以优化后的条件进行测定, 6 种甜味剂线性范围均在 0.05~5.0 mg/L 内, 线性相关系数均大于 0.994 5。得到安赛蜜检出限为 0.05 mg/L、糖精钠、甜蜜素、纽甜检出限为 0.01 mg/L、三氯蔗糖、阿斯巴甜检出限为 0.1 mg/L。加标水平为 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时, 回收率在 86.48%~116.90% 之间, 相对标准偏差为 0.22%~3.90%。方法准确可靠、简便快速、可达到同时检测 6 种甜味剂的目的。

关键词: 超高压液相色谱—质谱联用; 甜味剂; 白酒

中图分类号: O 657.72

文献标识码: A

Ultra-High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Six Micro-Sweeteners in Distilled Spirit

WU Shi-Jia¹, WANG Hong-Xin^{*1}, TAO Guan-Jun²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, a novel ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled with mass spectrometry (MS) method was developed for the simultaneous determination of six micro-sweeteners (acesulfame K, saccharin sodium, sodium cyclamate, sucralose, aspartame, neotame) in distilled spirit. After sample preparation, the analytes was separated on an BEH C-18 column with methanol-20 mM ammonium acetate as mobile phase for gradient elution and detected at electrospray ionisation (ESI) source operating in negative mode, along with the accurate mass of their main fragment ion. It takes only 10 minutes to finish a whole separation and detection. Under the optimized conditions the six compounds behave linearly in the 0.05-5.0 mg/L concentration range, with correlation coefficient > 0.9945. The detection limits is 0.05 mg/L for acesulfame K, 0.01 mg/L for saccharin sodium, sodium cyclamate, neotame and 0.1

收稿日期: 2009-09-10

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAK36B06)。

* 通信作者: 王洪新(1964-), 男, 江苏徐州人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品功能因子及食品安全与质量研究。Email: wanghongxin2009@yahoo.com.cn

mg/L for sucralose, aspartame. The recoveries at the tested concentrations of 0.5 and 1.0 mg/L were 86.48% ~ 116.90%, with the relative standard deviations of 0.22% ~ 3.90%. The method has been successfully applied to simultaneously detect six synthetic sweeteners in distilled spirit samples and illustrated accurate and effective.

Key words: UPLC-MS; sweeteners; distilled spirit

甜味剂是一类重要的食品添加剂,它赋予食品以甜味,提高食品的品质,有着热量低、适合糖尿病人食用等优点。甜味剂按其来源可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂。在现代食品工业中广泛应用的人工合成甜味剂主要包括乙酰磺胺酸钾(安赛蜜, acesulfame K)、邻苯甲酰磺酰胺钠(糖精钠, saccharin sodium)、环己基氨基磺酸钠(甜蜜素, sodium cyclamate)、三氯蔗糖(蔗糖素, sucralose)、天冬氨酰苯丙氨酸甲酯(阿斯巴甜, aspartame)和 N-[N-(3,3-二甲基丁基)-L-α-天门冬氨酰]-L-苯丙氨酸 1 甲酯(纽甜, neotame)。这些甜味剂的甜度是蔗糖的几十倍甚至是上万倍。人工合成甜味剂在日常食品中应用范围越来越广,使用量越来越大,同时对人工合成甜味剂的安全性一直是各国政府和相关科研机构所关注的热点。近几年有研究发现糖精钠、甜蜜素等一些甜味剂具有潜在致癌致畸、损害肾功能的副作用,我国在 2007 年制定的《食品添加剂使用卫生标准》对人工甜味剂的加入量有严格规定^[1]。因此,人工合成甜味剂在生产中合理的使用,不仅关系到产品的品质,更关系到消费者的安全与健康。

白酒是中国传统产品,有着上千年的历史,由于其风格独特,深受广大消费者喜爱,在国际上也享有盛誉。现代研究表明,优质发酵的白酒之所以具有醇甜感,是由于白酒本身含有一定的多元醇或酮等甜味物质,如: 2,3-丁二醇、丙三醇、正丁醇等。为保护我国传统产品,国家标准中明确规定其生产过程中不允许添加甜味剂^[1]。但个别生产企业为掩盖酒的苦涩,保持酒体干冽、醇厚、绵软,仍在酒的生产和勾兑过程中违规添加了甜味剂。近年来,国家质检总局在对全国白酒产品的抽检中发现,滥用甜味剂现象比较严重,且检测方法也存在着一些问题。

目前关于食品中甜味剂的检测方法较多,最普遍的是高效液相色谱—紫外检测法^[3~9],另外还有毛细管气相色谱法^[10~11]、超高压液相色谱—蒸发光散射检测法^[12]、紫外分光光度法^[13~14],也有关于利用高压液相—质谱联用检测甜味剂的报道^[15~16]。

但基本上都是针对单一甜味剂或者对两种甜味剂进行测定,检测灵敏度也有待提高,而且由于甜蜜素与三氯蔗糖的紫外吸收较弱,不适宜使用紫外检测器,使得多种甜味剂同时检测受到限制。

作者采用超高压液相色谱—质谱联用(UPLC-MS),针对白酒中的微量甜味剂,开发一种可同时检测 6 种甜味剂的检测方法,该方法快速简便,定性、定量准确,灵敏度极高。

1 材料与方法

1.1 试剂

甲醇: 色谱纯(国药集团), 20 mmol/L 乙酸铵溶液: 取 1.54 g 乙酸铵(国药集团)用超纯水溶解至 1 000 mL,再经 0.22 μm 滤膜过滤; 6 种甜味剂标样: 糖精钠, 甜蜜素, 安赛蜜: 纯度均为 99.9%; 美国 Sigma 公司产品, 阿斯巴甜, 三氯蔗糖, 纽甜: 纯度均为 99.0%, 美国 Sigma 公司产品。

1.2 实验仪器

超高压液相色谱: WATERS ACQUITY UPLC, 检测器: WATERS ACQUITY PDA, 色谱柱: BEH C18 2.1 mm × 50 mm 1.7 μm, 飞行时间质谱仪: WATERS SYNAPT MS, Masslynx 4.1 质谱色谱管理软件。

1.3 色谱条件

流量: 0.3 mL/min, 色谱柱温: 30 ℃, 压力: 5.5~9.7 kPa, 进样体积: 10 μL。

流动相 A: 甲醇, 流动相 B: 20 mmol/L 乙酸铵溶液。

1.4 质谱条件

ESI 负离子检测模式, 毛细管电压: 2.5 kV, 锥孔电压: 30 V, 二级锥孔电压: 4 V, 离子能量: 1, Detector 电压: 1 600 V, 离子源温度: 100 ℃, 脱溶剂气温度: 250 ℃, 脱溶剂气(N₂): 流量 600 L/h, 锥孔气(N₂): 流量 50 L/h, 相对质量范围: 100~1 000。

1.5 甜味剂标准溶液配制

1.5.1 甜味剂单标储备溶液 精确称取 100 mg 单个甜味剂(安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、三氯蔗糖、纽甜)标准品分别于 100 mL 容量瓶中, 用

超纯水溶解并定容, 混匀, 得到 1 mg/mL 单标储备溶液。

1.5.2 甜味剂单标工作溶液 分别精确吸取 6 种甜味剂单标储备溶液(1.5.1) 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 混匀, 得到 100 μg/mL 的甜味剂单标工作溶液。

1.5.3 标准曲线的绘制 分别取一定量安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、三氯蔗糖、阿斯巴甜、纽甜单标工作溶液(1.5.2), 用超纯水定容至 10 mL, 得到安赛蜜浓度为 0.1~5.0 mg/L; 糖精钠、甜蜜素、纽甜质量浓度为 0.05~5.0 mg/L; 三氯蔗糖、阿斯巴甜浓度为 0.2~5.0 mg/L 的混合系列标准溶液。待仪器稳定后, 分别对系列混标工作溶液取 10 μL 进样, 作 UPLC-MS 检测, 以离子流的强度为纵坐标, 样品进样量为横坐标, 绘制标准曲线(或回归方程)。

2 结果与讨论

2.1 测定结果

采用各组分准分子离子作为监测离子: 安赛蜜 $m/z = 162([M-K]^+)$, 糖精钠 $m/z = 182([M-Na]^+)$, 甜蜜素 $m/z = 178([M-Na]^+)$, 三氯蔗糖 $m/z = 395([M-H]^+)$, 阿斯巴甜 $m/z = 293([M-H]^+)$, 纽甜 $m/z = 377([M-H]^+)$ 。

2.2 测定条件的选择

2.2.1 色谱条件的选择 由于被测物极性较强, 故采用反相 C-18 柱分离, 且流动相的洗脱能力不宜过强, 又由于流动相要进入质谱仪, 所以考虑甲醇: 水、甲醇: 乙酸铵两种体系。通过实验, 选择甲醇: 20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相, 色谱峰形较好。考虑本实验要同时分离测定 6 种添加剂本方

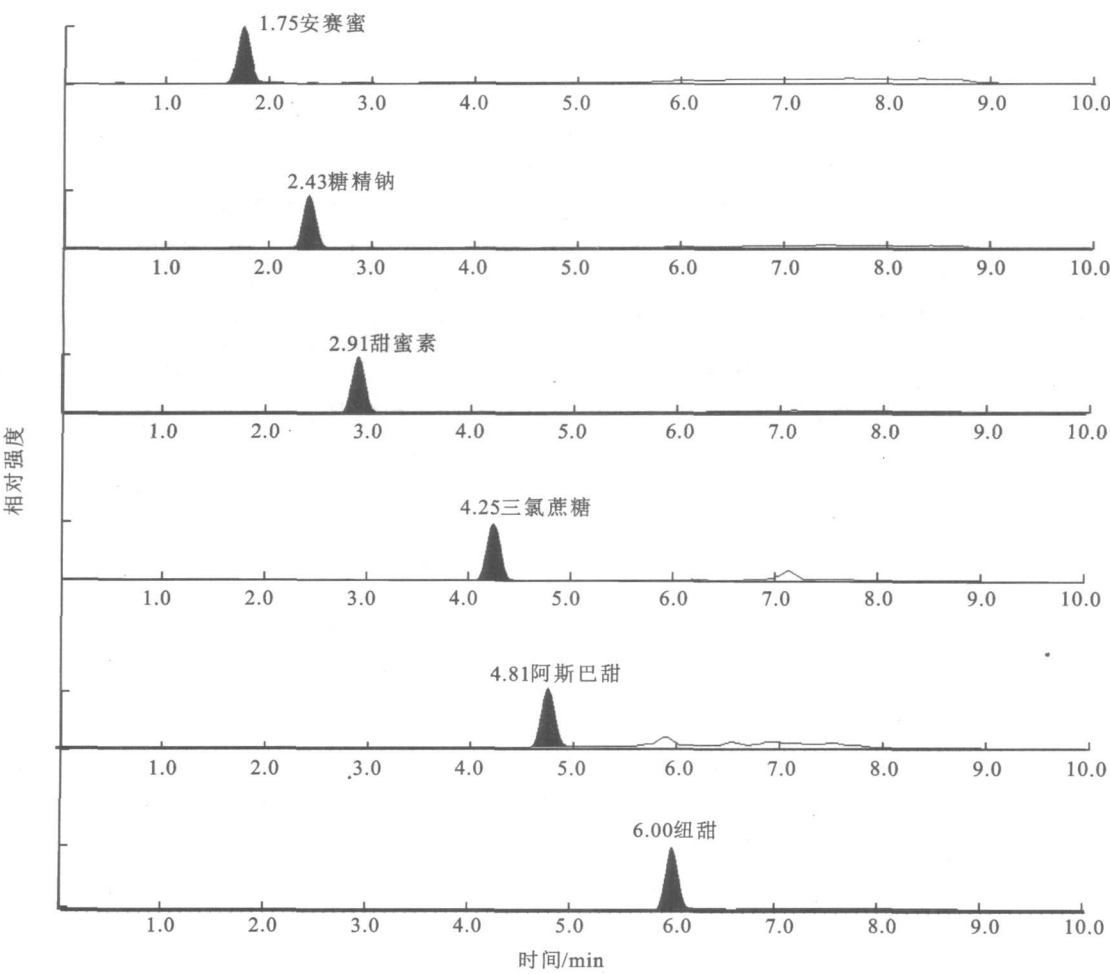


图 1 6 种甜味剂的选择离子色谱图
Fig. 1 Extraction ion chromatogram of six sweeteners

法通过对梯度变化的摸索, 选择了最佳变化梯度, 初始 $A : B$ 比例为 $(0 : 100)$, 4 min $A : B$ 比例为 $(30 : 70)$, 6-8 min $A : B$ 比例为 $(100 : 0)$, 8 min 后 $A : B$ 比例恢复到 $(0 : 100)$ 。10 min 内分析混合标样时, 6 种标准物质可完全分离, 且峰形良好。

2.2.2 质谱条件的选择 实验采用 ESI 负离子模式检测具有较高的灵敏度。调节毛细管电压, 锥孔电压, 二级锥孔电压, 脱溶剂气 (N_2) 流量, 锥孔气 (N_2) 流量等参数条件得到较强的分子离子峰, 确定最佳实验条件; 同时采用质谱的选择离子 (SIR) 采

集方式, 可使灵敏度再提高 2~3 个数量级, 有利于微量甜味剂的检出。

2.2.3 样品的前处理 由于白酒中乙醇含量较高, 在进行液相色谱分离时, 容易对甜味剂在色谱柱中的保留性能产生影响。所以将待测酒样经过旋转蒸发器脱去醇类等易挥发组分, 脱醇程度与白酒的酒精度有直接关系。再进行 UPLC-MS 检测, 与直接进样相比可减少甜味剂检测的干扰, 使峰形良好。

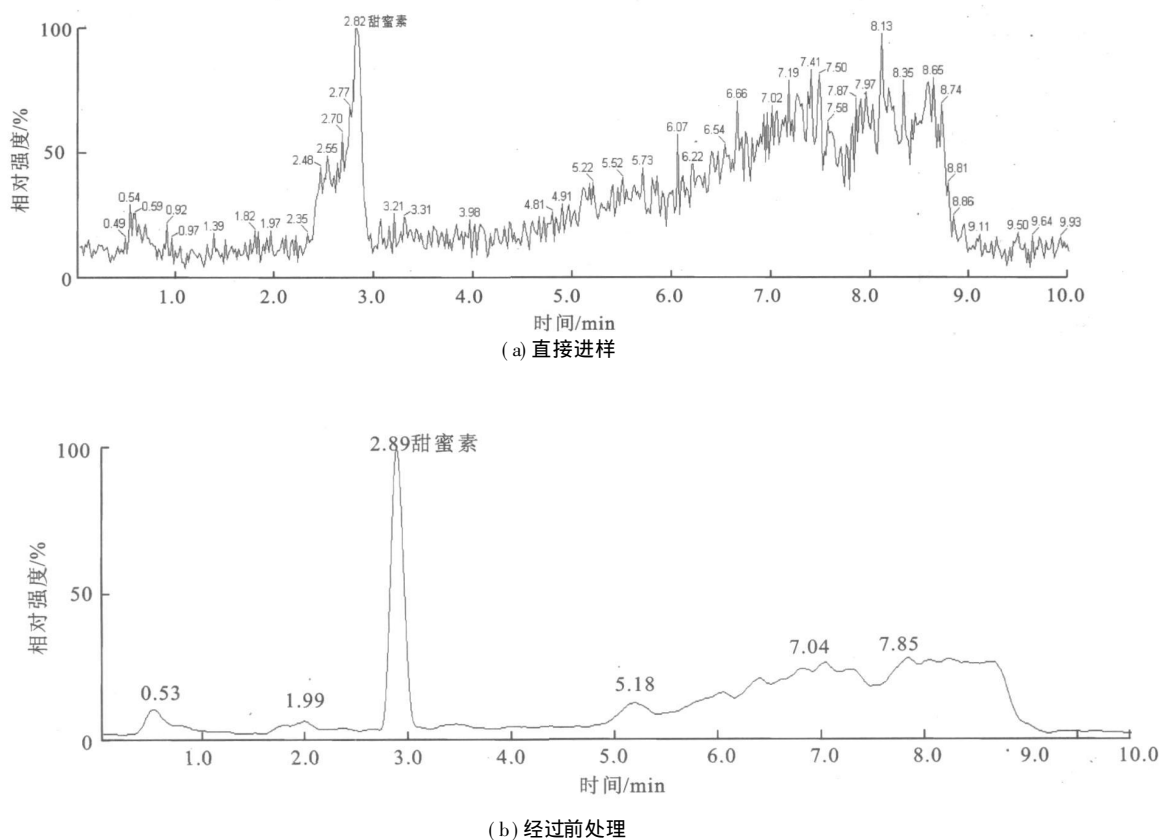


图 2 甜蜜素选择离子色谱图

Fig. 2 Extraction ion chromatogram of sodium cyclamate

以甜蜜素的检测情况为例, 图 2(a) 是样品直接进样时甜蜜素的出峰情况, 可以看出酒中其他物质在甜蜜素出峰位置有明显干扰, 图 2(b) 为样品经过旋转蒸发后进样的情况, 在甜蜜素出峰位置没有明显干扰。说明在检测之前将酒中的低沸点易挥发物质排除 (主要是醇类), 对检测的准确性, 精确度都起到了重要作用。

2.3 线性范围和检出限

配制安赛蜜质量浓度范围在 0.1~5.0 mg/L,

阿斯巴甜、三氯蔗糖质量浓度范围在 0.2~5.0 mg/L, 甜蜜素、糖精钠、纽甜质量浓度范围在 0.05~5.0 mg/L 的系列标样溶液, 按文中所述方法测定。将组分峰面积相对应质量浓度绘制工作曲线, 表明该方法对 6 种甜味剂检测的线性关系良好。当样品中安赛蜜质量浓度为 0.05 mg/L、糖精钠、安赛蜜、纽甜浓度为 0.01 mg/L、三氯蔗糖、阿斯巴甜质量浓度为 0.1 mg/L 时, 各组分响应值与噪音的峰高之比 S/N 均大于 10, 故将此浓度作为定量限。

表 1 6 种甜味剂的线性方程与检出限

Tab. 1 Linear equations and detection limit of the six sweeteners

待测组分	线性范围/ (mg/ L)	线性回归方程	线 性 相关系数 R^2	检出限/ (mg/ L)
安赛蜜	0. 1~ 5. 0	$y = 117. 52x + 5. 945\ 3$	0. 999 0	0. 05
糖精钠	0. 05~ 5. 0	$y = 161. 91x + 6. 182\ 5$	0. 999 1	0. 01
甜蜜素	0. 05~ 5. 0	$y = 209. 83x + 1. 952\ 1$	0. 999 1	0. 01
三氯蔗糖	0. 2~ 5. 0	$y = 67. 060x - 3. 456\ 0$	0. 994 5	0. 1
阿斯巴甜	0. 2~ 5. 0	$y = 69. 235x - 1. 029\ 0$	0. 999 7	0. 1
纽甜	0. 05~ 5. 0	$y = 603. 84x - 17. 623$	0. 994 7	0. 01

2 4 加标回收率和测定精密度

取经过脱醇处理的 3 种样品各 50 mL, 加入不同浓度的的标准品做加标回收实验, 每种样品做 0. 5、1. 0 mg/ L, 2 个质量浓度的添加, 每个添加量平行测定 3 次。数据表明该方法测定甜味剂精密度和回收率良好。

表 2 6 种甜味剂的加标回收率、精密度($n= 3$)

Tab. 2 Recovery of standard addition and precision of the six sweeteners($n= 3$)

甜味剂	1		2		3	
安赛蜜	108. 70	113. 40	104. 79	110. 42	106. 99	110. 43
糖精钠	93. 55	116. 73	109. 50	110. 55	100. 91	116. 42
甜蜜素	96. 73	109. 81	99. 29	116. 54	103. 72	116. 90
三氯蔗糖	98. 09	96. 59	111. 22	101. 26	111. 22	93. 73
阿斯巴甜	97. 17	87. 81	86. 48	92. 65	95. 99	100. 14
纽甜	95. 42	99. 79	93. 58	96. 74	96. 08	92. 62
安赛蜜	1. 79	0. 75	2. 45	0. 82	2. 02	0. 90
糖精钠	0. 22	0. 11	2. 08	0. 60	0. 99	0. 54
甜蜜素	0. 46	0. 34	0. 31	0. 47	0. 43	0. 57
三氯蔗糖	1. 74	0. 02	0. 27	3. 90	0. 33	2. 22
阿斯巴甜	0. 82	3. 07	0. 89	2. 45	2. 16	2. 51
纽甜	1. 83	0. 49	1. 00	2. 49	1. 76	0. 93

2 5 部分样品的检测结果

按照(2 2 3) 对样品进行前处理, 然后进样分析。根据甜味剂单标的保留时间进行定性, 最后根据标准曲线采用外标法定量, 计算出被测样品中各种甜味剂的含量。对市售白酒抽样进行检测, 12 个样品中检测出甜蜜素的有 6 个, 检出安赛蜜、阿斯巴甜的有 1 个, 检出糖精钠的有 2 个, 三氯蔗糖以及纽甜未检出。由检测结果来看, 目前在白酒中添加的甜味剂的种类主要还是集中在甜蜜素、安赛蜜、

糖精钠此类传统的人工甜味剂上, 而且同一种酒样中的甜味剂添加种类往往在一种以上, 即使用复合甜味剂的情况值得引起质量监测部门的重视。

表 3 部分白酒中甜味剂测定结果

Tab. 3 Results of sweeteners in partial distilled spirit

样品 编号	甜蜜素	安赛蜜	糖精钠	三氯 蔗糖	阿斯 巴甜	纽甜
BJ- 1	0. 82	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 2	2. 055	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 8	0. 279	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 9	0. 645	nd	3. 917	nd	nd	nd
BJ- 10	1. 582	0. 651	nd	nd	0. 712	nd
BJ- 11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BJ- 12	1. 026	nd	1. 016	nd	nd	nd

* 注: nd 为未检测出

3 结 语

通过以上实验, 初步建立了一种采用 UPLC- MS 同时检测白酒中 6 种甜味剂的方法。该方法快速、高效、准确, 可同时测定多种甜味剂, 能够在 10 min 内完成样品的分析。白酒样品只需进行脱醇, 即可进样检测, 前处理简单; 弥补了国家标准只能针对单个或两种甜味剂检测的不足之处, 对保护白酒生产企业和消费者的利益起到了很大的作用, 该方法可望在市场监测过程中发挥重要的作用。

参考文献(References):

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB2760-2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [2] 李丹红, 毛红霞. 食品中安赛蜜、甜蜜素、糖精钠、苯甲酸、山梨酸高效液相色谱测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1999, 9(4): 258-260.
LI Dair hong, MAO Hong xia. Research of HPLC method for acesulfame K, sodium cyclamate, saccharin sodium, benzoic acid, potassium sorbate in food[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 1999, 9(4): 258-260. (in Chinese)
- [3] 邵铁锋, 李雪岷. 高效液相色谱法测定酒中甜蜜素[J]. 中国酿造, 2004, 12: 31-32.
SHAO Tie feng, LI Xue min. Determination of cyclamate in the liquor with high performance liquid chromatography (HPLC) method[J]. **China Brewing**, 2004, 12: 31-32. (in Chinese)
- [4] 余涛, 叶坚, 刘昶. 高效液相色谱同时测定食品中多种甜味剂和防腐剂的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2014-2016.
YU Tao, YE Jian, LIU Chang. Simultaneous determination of sweetenings and preservatives in foods by high performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2008, 18(10): 2014-2016. (in Chinese)
- [5] 刘渭萍, 雷雅娟. 高效液相色谱法快速测定葡萄酒及果酒中的防腐剂和甜味剂[J]. 辽宁化工, 2006, 35(4): 238-239.
LIU Wei ping, LEI Ya juan. Determination of Antiseptic and Sweetener in wine by HPLC[J]. **Liaoning Chemical Industry**, 2006, 35(4): 238-239. (in Chinese)
- [6] 邓立刚, 李增梅, 赵善仓. 高效液相色谱法测定乳饮料和果汁饮料中的安赛蜜和糖精钠[J]. 山东农业科学, 2007, 3: 102-103.
DENG Li gang, LI Zeng mei, ZHAO Shan cang. Determination of Acesulfame K and Saccharin sodium in milk beverage and juice by HPLC[J]. **Shandong Agricultural Science**, 2007, 3: 102-103. (in Chinese)
- [7] 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 Li. Determination of sucralose in drink by high performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2007, 17(10): 1784-1786. (in Chinese)
- [8] 倪梅林, 谢东华. 高效液相色谱法测定食品中阿斯巴甜的含量[J]. 光谱实验室, 2009, 26(1): 23-26.
NI Mei Lin, XIE Dong Hua. Determination of Aspartame in Food by HPLC[J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**, 2009, 26(1): 23-26. (in Chinese)
- [9] 张菊华, 尚雪波. RTX-1 毛细柱气相色谱法测定饮料中的甜蜜素[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 131-133.
ZHANG Ju hua, SHANG Xue bo. Application of RTX-1 capillary column gas chromatography to test the content of sodium cyclamate in drink[J]. **Food Research and Development**, 2008, 29(1): 131-133. (in Chinese)
- [10] 岳志坚. 毛细管气相色谱法测定白酒中甜蜜素[J]. 理化检验 化学分册, 2008, 44(8): 785-787.
YUE Zhi jian. Capillary column gas chromatography to test the content of sodium cyclamate in wine. [J]. **PTCA (PART B: CHEM. ANAL.)**, 2008, 44(8): 785-787. (in Chinese)
- [11] 武金忠, 钟其顶. UPLC-ELSD 同时测定白酒中六种甜味剂方法初探[J]. 酿酒, 2008, 35(1): 65-67.
WU Jin zhong, ZHONG Qi ding. An Initial Method to Determine 6 Sweeteners in Distilled Spirit Simultaneously by UPLC-ELSD[J]. **China Brewing**, 2008, 35(1): 65-67. (in Chinese)
- [12] 黄会秋. 分光光度法间接测定白酒中甜蜜素[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(9): 1073-1074.
HUANG Hui qiu. Indirect determination of sodium cyclamate in wine by spectrophotometric [J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2006, 16(9): 1073-1074. (in Chinese)
- [13] 桑宏庆, 于秋生. 紫外分光光度法测定甜蜜素[J]. 检测与分析, 2006, 9(11): 28-29.
SANG Hong qing, YU Qiu sheng. Determination of sodium cyclamate by uv spectrophotometric [J]. **Detection and Analysis**, 2006, 9(11): 28-29. (in Chinese)
- [14] 徐春祥, 秦金平. 液相色谱—质谱联用直接测定白酒中的甜蜜素[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 106-107.
XU Chun xiang, QIN Jin ping. Determination of sodium cyclamate in wine by HPLC-MS [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32(2): 106-107. (in Chinese)
- [15] 王骏. 液相色谱—质谱联用测定食品中的微量甜蜜素[J]. 食品科技, 2008, 9: 239-241.
WANG Jun. Determination of micro sodium cyclamate in food by HPLC-MS [J]. **Food Technology**, 2008, 9: 239-241. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)