

实验技术

超高效液相色谱 – 串联质谱法测定 食品中的三氯蔗糖

周莉莉*, 杨颖, 刘艳明, 王骏, 张卉, 祝建华

(山东省产品质量监督检验研究院 国家加工食品质量监督检验中心, 山东 济南 250100)

摘要: 建立了食品中三氯蔗糖的超高效液相色谱 – 电喷雾串联质谱 (UPLC – MS/MS) 测定方法。样品中的三氯蔗糖用水提取, 简单除杂后根据样品基质选用 HLB 柱净化或用沉淀剂去除样品中的脂肪和蛋白质, 用甲醇 – 水定容。经反相色谱柱分离后, 采用多反应监测 (MRM) 负离子模式检测, 定性离子对为 m/z 395.07/358.90 和 397.07/360.90, 其中 m/z 395.07/358.90 用于外标法定量。方法的定量下限为 0.4 mg/kg; 线性范围为 0.2 ~ 20 mg/L; 在 0.4、4、10 mg/kg 3 个加标水平下, 白酒、调制乳和油炸花生 3 种样品中三氯蔗糖的回收率为 85% ~ 98%, 相对标准偏差 ($n=6$) 为 1.7% ~ 5.0%。

关键词: 三氯蔗糖; 超高效液相色谱串联质谱; 食品

中图分类号: O657.63; Q533.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 – 4957 (2011) 10 – 1175 – 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.10.019

Determination of Sucralose in Foodstuffs by Ultra Performance Liquid Chromatography – Electrospray Negative Ionization Mass Spectrometry

ZHOU Li-li*, YANG Ying, LIU Yan-ming, WANG Jun, ZHANG Hui, ZHU Jian-hua

(National Center for Quality Supervision and Inspection of Processed Food (Shandong), Shandong Supervision and Inspection Institute for Product Quality, Jinan 250100, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was developed for the determination of sucralose in foodstuffs. The sample was extracted with water. Different purificatory methods like HLB cartridge purification or precipitators removing fat and protein were chosen according to different sample matrixes. The extract was separated with reversed-phase UPLC column using a binary eluent under isocratic conditions, and determined by tandem mass spectrometry under negative electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. m/z 395.07/358.90 and m/z 397.07/360.90 were selected as two precursor-product ion pairs, in which m/z 395.07/358.90 was used for quantization. Under the optimal conditions, the calibration curve was linear over sucralose concentration in the range of 0.2 – 20 mg/L with quantitation limit of 0.4 mg/kg. The average recoveries of sucralose from Chinese spirit, modified milk and fried peanut kernels at three spiked levels of 0.4, 4, 10 mg/kg ranged from 85% to 98% with relative standard deviations ($n=6$) of 1.7% – 5.0%. The method showed good simplicity, sensitivity and stability, and was suitable for the rapid determination of sucralose in foodstuffs.

Key words: sucralose; UPLC – MS/MS; foodstuffs

三氯蔗糖 (Sucralose) 又称三氯半乳糖, 1976 年由英国 Tate 和 Lyle 公司用蔗糖乳化而成^[1], 其分子式为 $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$, 分子量为 396.01。与等量的蔗糖相比, 三氯蔗糖的甜度是蔗糖的 600 倍, 且具有高稳定性、零热量、不被人体吸收、不引起龋齿等优点^[2]。FAO/WHO 于 1990 年确定三氯蔗糖的 ADI (每人每天允许摄入量) 值为 15 mg/kg^[3]。国外有学者对三氯蔗糖可能存在的危害性进行了系统研

收稿日期: 2011 – 05 – 19; 修回日期: 2011 – 07 – 07

* 通讯作者: 周莉莉, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全分析及风险预警, Tel: 0531 – 89701895, E – mail: sdqizhoulili@126.com

究^[4-6]。目前,国际市场上采用三氯蔗糖为甜味剂的食品已达4 000多种^[7]。根据我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760-2011)^[8]规定,三氯蔗糖可作为甜味剂在调味乳、糖果、果酱、冷冻饮品、水果干、酱、醋、配制酒、浓缩果汁等食品中限量使用。

现有国家标准推荐使用配有蒸发光散色检测器的液相色谱法对食品中三氯蔗糖进行测定^[9]。另有文献报道采用二极管阵列检测器^[10]或示差检测器^[11]的液相色谱法进行测定。但对于含脂肪、蛋白质较高的食品如含乳饮料、冰激凌、饼干、面包、油炸花生以及其它含糖量高的食品,上述方法因受复杂基质的影响,在191 nm处可能受到干扰,难以对三氯蔗糖精确定量。因此有必要建立一种灵敏、简便、快捷的食品中三氯蔗糖的检测方法。基于高效液相色谱的分离能力和质谱的高灵敏度、高选择性^[12-14],本文建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定食品中三氯蔗糖的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC-Quattro Premier XETM质谱联用仪,配有电喷雾离子源及Masslynx 4.1数据处理系统(美国Waters公司);Sigma 3-18K高速冷冻离心机(德国Sigma公司);电子天平(瑞士Sartorius公司);SIR漩涡混合器(德国IKA公司);HLB固相萃取小柱(3 mL/60 mg,美国Waters公司)。

三氯蔗糖对照品购于Sigma-Aldrich公司;甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);其余试剂均为分析纯(北京化工厂);水为超纯水(18.2 MΩ·cm);0.22 μm有机滤膜(美国Agilent公司):使用前需先用标样测试是否有膜吸附三氯蔗糖现象。

1.2 标准溶液的配制

精密称取10 mg三氯蔗糖对照品,用甲醇溶解并定容至10 mL,配成1.0 g/L的标准储备液(4℃避光保存)。临用时用甲醇-水(体积比45:55)逐级稀释成适当浓度的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 酒类样品 称取适量均匀样品,准确加入15 mL甲醇-水(体积比45:55),漩涡混合1 min,超声提取15 min,以10 000 r/min冷冻离心10 min,上清液经0.22 μm有机滤膜过滤后,上机测定。

1.3.2 果蔬汁、乳制品、乳饮料样品 称取适量均匀样品,加入15 mL超纯水,漩涡混合1 min,超声提取15 min,以10 000 r/min冷冻离心10 min,取全部上清液过Oasis HLB小柱(柱预先用3 mL甲醇、5 mL水活化),上样后用3 mL超纯水淋洗,弃去淋洗液,真空抽干HLB柱2 min,用4.5 mL甲醇洗脱,洗脱液中加入5.5 mL超纯水,混匀,经0.22 μm有机滤膜过滤后,上机测定。

1.3.3 坚果类、炒货类、饼干、面包及冰激凌样品 称取适量均匀样品,加入15 mL超纯水,漩涡混合1 min,超声提取15 min,加入1 mL 0.5 mol/L氢氧化钠溶液,漩涡混匀后加入1.5 mL 0.42 mol/L硫酸锌溶液,漩涡混匀,再加入1.5 mL 0.5 mol/L氢氧化钠溶液,漩涡混匀后静置或以10 000 r/min冷冻离心10 min,取上清液用甲醇稀释至终试样中甲醇与水的体积比为45:55,经0.22 μm有机滤膜过滤后,上机测定。

1.4 色谱条件

色谱柱:BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm(i.d.),1.7 μm);流动相为甲醇-水(体积比45:55);流速:0.2 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL;保留时间:1.8 min。

1.5 质谱条件

电喷雾离子源(ESI-),毛细管电压2.0 kV,萃取电压3.0 V,源温110℃,脱溶剂温度450℃,脱溶剂气流速700 L/h,锥孔反吹气流速50 L/h,多离子反应监测(MRM),定性离子对(*m/z*) 395.07>358.90(碰撞能量12 eV)和(*m/z*) 397.07>360.90(碰撞能量12 eV),定量离子对(*m/z*) 395.07>358.90。采用溶剂延迟技术,运行开始时,色谱柱流出液经六通切换阀切换至废液中直至0.5 min,质谱从0.5 min开始采集数据直至3.0 min结束,同时六通切换阀将柱流出液切换至废液中。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

三氯蔗糖的分子结构中含有 5 个活泼羟基, 另有 3 个羟基被氯取代, 所以更适合用负离子模式进行检测。以流动注射方式在电喷雾负离子模式下进行一级扫描及参数优化, 得到三氯蔗糖的一级质谱图如图 1 所示。由图 1 可知, 该模式下主要生成 $[M - H]^-$ m/z 395 的准分子离子峰及 m/z 397、 m/z 399 的氯同位素峰。选择 $[M - H]^-$ 准分子离子峰 m/z 395.07 进行子离子扫描, 生成的主要碎片离子为 $[M - H - Cl]^-$ m/z 358.90, 改变碰撞能量等参数仍无其他明显碎片峰, 故再选择 $[M - H]^-$ 准分子离子峰 m/z 397.07 进行子离子扫描, 生成的主要碎片离子为 $[M - H - Cl]^-$ m/z 360.90, 改变碰撞能量等参数仍无其他明显碎片峰。由两个关联的母离子和相应子离子进行监测, 并以丰度较大的一对为定量离子对, 可满足分析要求。通过溶剂延迟技术可有效减少质谱污染干扰, 提高分析的准确度。

2.2 色谱条件的优化

通常阴离子在反相色谱柱上的保留较弱, 虽采用了高选择性的质谱检测器, 仍需要良好的色谱分析为前提。实验分别选用甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸、甲醇-10 mmol/L 乙酸铵、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-10 mmol/L 乙酸铵体系为流动相。结果表明, 当流动相为甲醇-水时, 三氯蔗糖的色谱保留行为优于其它体系。在该条件下, 三氯蔗糖的保留时间适中(约为 1.8 min), 峰形良好, 各类食品提取液中无明显干扰物。

2.3 基质效应的考察

根据各类食品基质特点, 选择白酒、调制乳和油炸花生作为 3 种典型基质进行前处理条件优化及方法学考察。白酒中的主要成分为乙醇和水, 另有微量的高级醇、脂类、醛类等芳香族化合物, 对于液质系统基本无基质效应。调制乳是以不低于 80% 的生牛(羊)乳或复原乳为主要原料, 添加其他原料或食品添加剂或营养强化剂, 采用适当的杀菌、灭菌等工艺制成的液体产品^[7], 含有脂肪、蛋白质、添加剂等。用水提取三氯蔗糖, 通过 HLB 固相萃取柱可去除盐、糖、极性脂质、蛋白质等, 从而达到满意的提取、净化效果。花生富含油脂和蛋白质以及维生素 K、白藜芦醇等功能活性物质^[8], 油炸花生类炒货通常还含有植物油、调味品、辣椒、香辛料等成分, 对于该类含有高脂肪、高蛋白的食品基质, 用氢氧化钠-硫酸锌体系可以很好地除去干扰成分。

2.4 方法的线性范围与检出限

用空白样品提取液配制了 5 个不同浓度的标准工作溶液, 在优化条件下进行测定, 进样量 5 μ L, 得到的质量色谱图如图 2 所示。以基质匹配标准工作溶液中三氯蔗糖的质量浓度(X , μ g/L)为横坐标, 定量离子对的峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 1\ 897.7X - 2.22$, $r = 0.999\ 8$ 。结果表明, 在 0.2 ~ 20 mg/L 范围内具有良好的线性关系。以定性离子对与定量离子对的峰面积比值作为确证依据, 当空白样品中添加三氯蔗糖含量为 0.4 mg/kg 时, 信噪比 S/N 为 20.15, 故将此浓度作为定量下限。方法的灵敏度完全满足食品中三氯蔗糖的检测要求。

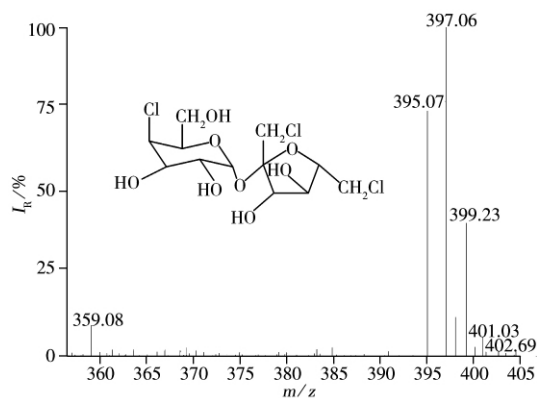


图 1 三氯蔗糖的分子结构式及一级质谱图

Fig. 1 Sketch map of molecular structure and negative ESI MS spectrum of sucralose

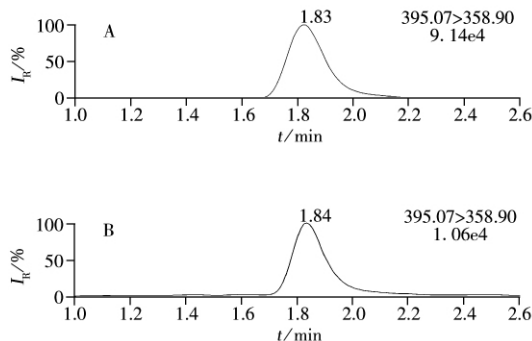


图 2 加标(A)及市售(B)白酒样品的质量色谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of spiked Chinese spirit(A) and commercial Chinese spirit(B)

2.5 方法的回收率与精密度

以不含目标分析物的样品进行加标回收率和精密度实验。样品添加不同浓度标准物质后, 放置 0.5 h, 使标准物质被样品充分吸收, 然后按本方法进行提取、净化和测定, 其回收率和精密度结果见表 1。从表 1 可见, 加标水平为 0.4、4、10 mg/kg 时, 三氯蔗糖的回收率为 85%~98%, 相对标准偏差为 1.7%~5.0%。表明本方法的回收率稳定, 可满足实际样品的检测要求。

表 1 食品中三氯蔗糖的回收率和精密度 ($n=6$)
Table 1 Recovery and precision of sucralose in foodstuffs ($n=6$)

Sample	Added $w/(mg \cdot kg^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Chinese spirit(白酒)	0.4, 4, 10	94, 96, 98	3.6, 1.7, 2.3
Modified milk(调制乳)	0.4, 4, 10	86, 86, 89	5.0, 4.1, 3.4
Fried peanut kernels(油炸花生)	0.4, 4, 10	85, 90, 94	4.0, 3.8, 3.3

3 结 论

本文所建立的方法快速、准确、简单, 可对食品中的三氯蔗糖准确定性和定量, 应用本法测定了酒类、乳制品及含乳制品、炒货类等食品中的三氯蔗糖含量, 结果满意。实验中还发现多个厂家的微孔滤膜会吸附样液中的三氯蔗糖, 使用前需先进行预测试, 以防止给测定结果带来较大误差。本文的前处理方法也适用于食品中三氯蔗糖、甜蜜素、糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜和纽甜等多种甜味剂的同时测定。

参考文献:

- [1] Huang X Y, Wang G H. *Guangxi J. Light Ind.* (黄雪影, 王桂华. 广西轻工业), 2009, (6): 12-14.
- [2] Liu K, Rong X Y. *Hebei J. Ind. Sci. Technol.* (刘魁, 戎欣玉. 河北工业科技), 2004, 21(4): 50-54.
- [3] JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants, Thirty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Group on Food Additives. WHO Technical Report Series 806, WHO, Geneva, 1991.
- [4] Goldsmith L A. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38: 53-69.
- [5] Cricel H C, Goldsmith L A. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38: 1-6.
- [6] Mann S W, Yuschak M M, Amyes S J. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38: 71-89.
- [7] Liang N. *Guangdong Chem. Ind.* (梁宁. 广东化工), 2010, 37(7): 74-75.
- [8] GB 2760-2011. Hygienic standards for uses of food additives. National standards of the People's Republic of China(食品添加剂使用卫生标准. 中国人民共和国国家标准).
- [9] GB/T 22255-2008. Determination of sucralose in foods. National Standards of the People's Republic of China(食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定. 中国人民共和国国家标准).
- [10] Zhao H L, Zhan D J, Shi X B. *Guangzhou Chem. Ind.* (赵海凉, 战东江, 史新斌. 广州化工), 2009, 37(8): 172-173.
- [11] Yu F. *Sichuan Food Ferment.* (余飞. 食品与发酵科技), 2009, 45(5): 69-71.
- [12] Zhou P, Li Y H, Niu L L, Wang L H, Zhao W, Luo A, Hu F L. *J. Instrum. Anal.* (周萍, 李英华, 钮灵铃, 王立华, 赵薇, 罗安, 胡福良. 分析测试学报), 2010, 29(6): 539-543.
- [13] Peng T, Chen D D, Dai H H, Li X J, Li N, Ding S Y, Jiang H Y, Deng X J. *J. Instrum. Anal.* (彭涛, 陈冬东, 代汉慧, 李晓娟, 李娜, 丁双阳, 江海洋, 邓晓军. 分析测试学报), 2010, 29(7): 645-651.
- [14] Zhou L L, Liu Z Q, Yan C Y, Song F R, Liu S Y, Zhu J H. *Chin. J. Mass Spectrom. Soc.* (周莉莉, 刘志强, 闫存玉, 宋凤瑞, 刘淑莹, 祝建华. 质谱学报), 2008, 29(6): 332-334.
- [15] Yue H, Pi Z F, Song F R, Liu Z Q, Liu S Y. *Acta Chim. Sin.* (越皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 刘志强, 刘淑莹. 化学学报), 2008, 66(2): 211-215.
- [16] Zhou L L, Liu Z Q, Wu G G, Song F R, Liu S Y. *Acta Chim. Sin.* (周莉莉, 刘志强, 吴国光, 宋凤瑞, 刘淑莹. 化学学报), 2008, 66(24): 2712-2716.
- [17] GB/T 25191-2010. National food safety standard Modified milk. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 调制乳. 中国人民共和国国家标准).
- [18] Zhou Q, Yang M, Huang F H. *Food Ind. Sci. Technol.* (周琦, 杨湄, 黄凤洪. 食品工业科技), 2010, 31(7): 401-405.