

超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS/MS) 同时测定白酒中的微量甜味剂

梁桂娟¹, 冯永渝¹, 田志强¹, 黄永光², 肖 洋¹, 孙 棣¹

(1.贵州省产品质量监督检验院, 贵州 贵阳 550004; 2.贵州省轻工业科学研究所, 贵州 贵阳 550007)

摘 要: 以超纯水为提取溶剂, 采用甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液的流动相体系和负离子电离模式, 用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪测定白酒中的安赛蜜、糖精钠、甜蜜素和三氯蔗糖。结果表明, 安赛蜜、糖精钠、甜蜜素和三氯蔗糖线性范围在 10~1000 ng/mL 内 R^2 大于 0.9983, 检出限分别为 0.024 mg/kg、0.06 mg/kg、0.03 mg/kg、0.1 mg/kg, 加标回收率大于 82%, RSD 小于 2.01%。该方法简便灵敏, 准确快速, 可用于白酒中微量甜味剂的快速测定。

关键词: 白酒; 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用; 甜味剂

中图分类号: TS262.3; TS261.7; O657.63 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2012)08-0109-03

Determination of Sweeteners Content in Liquor by UPLC-MS/MS

LIANG Guijuan¹, FENG Yongyu¹, TIAN Zhiqiang¹, HUANG Yongguang², XIAO Yang¹ and SUN Di¹

(1. Product Quality Supervision and Determination Institute of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550003; 2. Guizhou Provincial Light Industry Scientific Research Institute, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: A fast and accurate method for the determination of sweeteners content in liquor had been developed. Liquor samples were extracted by pure water and the content of acesulfame-K, saccharin sodium, cyclamate, and sucralose in liquor were determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The calibration curve of these four compounds showed a good linearity in the range of 10.0~1000 ng/mL, and the correlation coefficients were better than 0.9983. The limits of detection (LODs) of the method were 0.024 mg/kg for acesulfame-K, 0.06 mg/kg for saccharin sodium, 0.03 mg/kg for cyclamate and 0.1 mg/kg for sucralose, respectively. The average recoveries were higher than 82% and the relative standard deviations (RSD) of the method were lower than 2.01%.

Key words: liquor; ultra performance liquid chromatography- spectrometry (UPLC-MS/MS); sweeteners

我国白酒有几千年的历史, 是我国优秀而宝贵的民族遗产, 与白兰地、威士忌、伏特加、朗姆酒和金酒并列为世界上著名的六大蒸馏酒^[1]。在酒类产品中, 白酒行业所创造的效益一直名列前茅, 并带动了相关产业的发展。白酒行业已成为我国国民经济中的一个重要组成部分。我国白酒之独特, 不仅在于品种繁多、香型各异, 而且其工艺各不相同, 物质组成各具特点, 形成了组成复杂、口感多变的各香型类别, 满足了不同的消费需求。在国标 GB/T2760—2011《食品添加剂卫生标准》中, 明确规定白酒中不得添加任何甜味剂。但一些白酒生产企业为迎合消费者需求, 在白酒中加入甜味剂以增加酒体甜味和回甜感, 改善口感, 从而赚取高额利润。因此, 建立白酒中甜味剂的检测方法对监控白酒品质具有重要意义。

检测食品中甜味剂的方法主要有气相色谱法^[2-3]、高效液相色谱法^[4-7]、高效液相色谱-质谱联用法^[8-12]等。国标中甜味剂的检测方法主要是气相色谱法和高效液相色谱法, 但这些方法检测限高, 且易出现假阳性结果, 而企业加到白酒中的甜味剂仅需微量甚至痕量即可改善白酒的口感。因此, 传统的色谱法并不能有效地对白酒中的微量甜味剂进行监控。液质联用方法是一种高灵敏度、高选择性的检测方法, 特别是液相色谱-串联质谱系统通过多反应监测模式可提高检测的灵敏度和选择性, 从而大大降低了检测限和假阳性检测结果的出现几率。目前尚未见到用液相色谱-串联质谱方法同时测定食品中安赛蜜、甜蜜素、糖精钠和三氯蔗糖 4 种甜味剂的文献报道。本实验采用超高压液相色谱-质谱联用仪对白酒中的上述 4 种

基金项目: 国家质检总局科技计划项目, 计划编号 2011QK356。

收稿日期: 2012-05-21

作者简介: 梁桂娟(1972-), 女, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 研究方向: 食品分析与检测。

甜味剂进行同时检测,拟建立一种简便、快速、灵敏高效的检测方法,为日常及大规模的白酒监督抽查提供及时准确可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

安赛蜜、甜蜜素、糖精钠、三氯蔗糖标准品(纯度大于98.5%,购自 Dr.Ehrensforfer GmbH Germany);甲醇(色谱纯),Merck 公司;超纯水,milli-Q Academic 超纯水系统制备。

0.02 mol/L 乙酸铵溶液:称取 1.54 g 色谱纯乙酸铵,用二次超纯水溶解后定容至 1000 mL。

样品:各个白酒企业的送检样品。

仪器设备:4000QTRAP 三重四极杆质谱联用仪,AB Sciex 公司;配 Agilent1260 高效液相色谱仪,Agilent 公司;氮气发生器,PEAK 公司;Mnltireax 振荡混匀器,Heielloph 公司;milli-Q Academic 超纯水系统,密理博中国有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准储备溶液和使用溶液的配制

称取 0.1 g(精确至小数点后 4 位)上述 4 种甜味剂标准品,用超纯水溶解后定容至 100 mL 容量瓶中,制备成浓度为 1 mg/mL 的混合标准储备液,在 4 °C 下保存。

将上述混合标准储备液逐级稀释,用水定容成浓度分别为 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的混合标准使用溶液。

1.2.2 样品前处理

取 10.0 g(精确至小数点后 2 位)样品,置于 100 mL 比色管中,加入 20 mL 蒸馏水涡旋混匀后,用水定容至刻度,混匀后过 0.22 μm 滤膜待测。

1.2.3 仪器条件

质谱条件:电喷雾采用负离子模式(ESI^-),离子监测采用多反应监测模式(MRM),喷雾电压(IS)-5500 V,喷雾气(GS1)、辅助气(GS2)、气帘气(CUR)流量分别为 60 L/Hr、60 L/Hr、35 L/Hr。喷雾气温度为 650 °C。去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)见表 1。

表1 检测4种甜味剂的质谱条件

化合物名称	离子对 (母离子/子离子)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
安赛蜜	161.9/81.9	-46	-18
甜蜜素	177.9/79.9	-70	-33
糖精钠	181.8/106.0	-72	-27
三氯蔗糖	394.6/359.1	-86	-15

液相条件:色谱柱:Agilent 3.0×50 mm,EC-C₁₈2.7 μm;流动相:0.02 mol/L 乙酸铵/甲醇=80/20;流速:0.35 mL/min;

柱温:35 °C;进样量:5 μL。

1.2.4 样品测定

将上述标准使用溶液和样品溶液在 1.2.3 方法下,用 LC-MS-MS 进行测定。

1.2.5 定性及定量

在 1.2.3 的仪器条件下对混合标准溶液和样品溶液进行测定,根据目标化合物的保留时间定性,要求待测化合物定量离子对的保留时间与标准溶液中相对应化合物的保留时间一致(标准偏差小于 20 %),以标准溶液浓度对定量离子对的峰面积绘制标准曲线,外标法定量。样品中目标化合物的含量按下式计算。

$$A = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

式中:A——样品中目标化合物的含量,mg/kg;

C——从标准曲线中得到的待测组分的浓度,ng/mL;

V——样品定容体积,mL;

M——样品取样量,g。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的确定

对比了直接进样、稀释 10 倍后进样及样品挥干后用水定容 3 种前处理方式,从前处理时间、结果的重现性、保留时间的稳定性及对色谱柱的影响等因素进行综合考察,最终选择稀释进样作为本实验的前处理方法。比较结果见表 2。

表2 前处理方法比较结果

进样方式	前处理 时间	结果重现性 (RSD%, n=5)	保留时间	对色谱柱 的影响
直接进样	快	0.67~1.29	易漂移	柱效下降快
稀释进样	<5 min	0.82~1.90	稳定	柱效稳定
挥干进样	>30 min	2.03~3.36	稳定	柱效稳定

2.2 质谱方法的建立

根据安赛蜜、甜蜜素、糖精钠和三氯蔗糖的分子结构,采用负离子电喷雾模式(ESI^-)、多反应监测(MRM)的扫描模式进行检测。准分子离子峰分别为 m/z161.9、177.9、181.8、394.6。对准分子离子进行二级质谱扫描,发现碎片离子主要是 81.9、79.9、106.1 和 358.8,因此选择 161.9/81.9、177.9/79.9、181.8/106.1 和 394.6/358.8 进行监测。通过流动注射方式对去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)进行优化,得到各离子对的最佳 DP 和 CE。进一步对喷雾电压、喷雾气、辅助气、气帘气流量及喷雾气温度等参数进行调节,得到优化的质谱条件如 1.2.3。

标准品及样品的总离子流图、定量离子对的 MRM 图分别见图 1~图 5。

2.3 色谱方法的选择

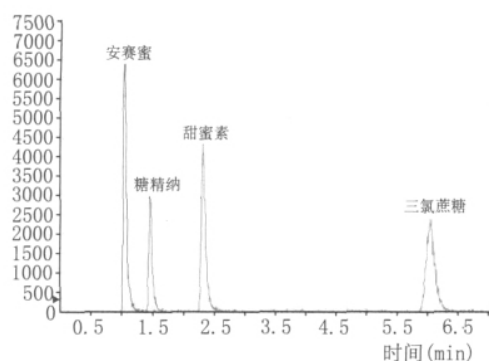


图1 4种甜味剂的总离子流图(TIC)

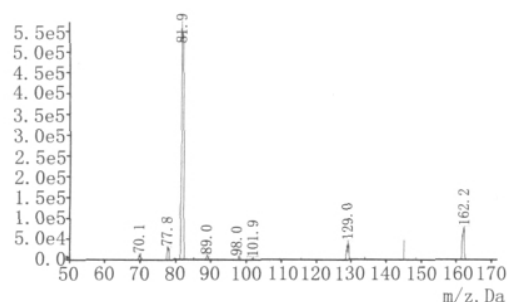


图2 安赛蜜的多反应监测(MRM)图

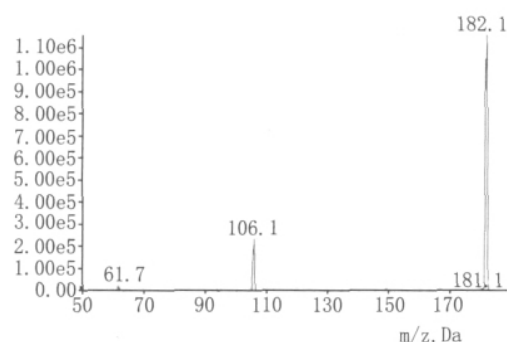


图3 糖精钠的多反应监测(MRM)图

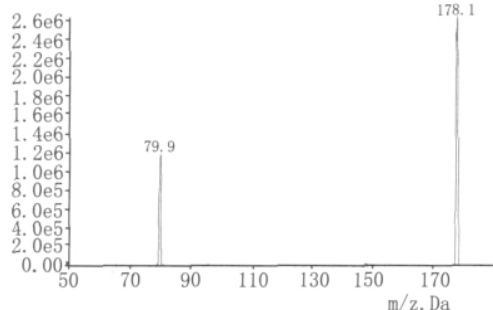


图4 甜蜜素的多反应监测(MRM)图

以不同流动相对待测物质在色谱柱上的分离度、峰形、灵敏度等的影响为考察指标,对水-甲醇体系和乙酸铵-甲醇体系进行了比较,发现用乙酸铵-甲醇体系时分离度、峰形、灵敏度以及保留时间的稳定性均优于水-甲醇体系。这是由于乙酸铵是缓冲溶液,可提高待测物质的离子化效率,同时又可作为离子对试剂提高待测物质在

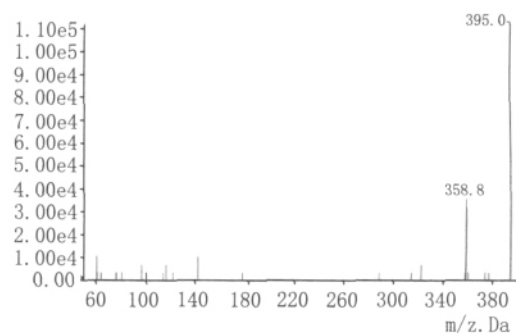


图5 三氯蔗糖的多反应监测(MRM)图

反相色谱柱上的保留时间,从而改善其在液相色谱中的保留行为。因此,本实验选择乙酸铵-甲醇体系作为流动相。

2.4 标准曲线及检出限

对 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的混标液进样测定,绘制标准工作曲线。并根据标准工作曲线最低浓度点的响应值进行推算,当信噪比 $S/N=3$ 时对应的目标化合物含量为方法的定性检出限。结果见表 3。

表3 线性方程及检出限

甜味剂	线性方程	相关系数(r^2)	检出限(mg/kg)
安赛蜜	$y=131x+409$	0.9999	0.024
糖精钠	$y=56.8x+24$	0.9999	0.060
甜蜜素	$y=103x-66.7$	0.9998	0.030
三氯蔗糖	$y=101x+1790 \times 10^3$	0.9983	0.100

2.5 方法精密度及回收率

分别进行了高、低 2 个浓度水平,每个水平作 5 次加标实验,得到方法的回收率、精密度见表 4。

表4 方法回收率及精密度 (mg/kg)

化合物	加标量	本底	平均测定值	平均回收率 (%)	RSD (% $n=5$)
安赛蜜	0.5	0.0	0.46	92.0	1.47
	2.0		1.82	91.0	1.29
糖精钠	0.5	0.0	0.41	82.0	1.92
	2.0		1.69	84.5	1.98
甜蜜素	0.5	0.0	0.48	96.0	0.86
	2.0		1.87	93.5	0.98
三氯蔗糖	0.5	0.0	0.42	84.0	2.01
	2.0		1.72	86.0	1.89

2.6 样品的测定

对 10 个白酒样品按上述方法进行测定,检测结果见表 5。

3 结论

用该方法对白酒中的微量甜味剂进行检测,前处理简单快速、结果灵敏可靠,可为白酒的日常检测及监管部

(下转第 115 页)

参考文献:

- [1] 王延才.中国葡萄酒行业现状及发展方向[J].中外葡萄及葡萄酒,2008(1):4-6.
- [2] 赵任军.葡萄酒的功能与营销[J].中外葡萄及葡萄酒,2006(5):51-53.
- [3] 周艳琼.我国葡萄酒市场的发展[J].中国酿造,2006(6):80-81.
- [4] 食品伙伴网.进口红酒到岸均价 15 元卖 562 元[N/OL].http://www.foodmate.net/news/guonei/2012/03/201786.html
- [5] 王金芳.微液液提取和固相萃取净化、强项色谱-质谱联用检测葡萄酒中 19 中农药多残留[J].分析化学,2007(35):1430-1434.
- [6] 王亚钦.设立葡萄酒农残限量的必要性和可行性分析[J].中外葡萄及葡萄酒,2011(3):76-80.
- [7] Lian Y J, Pang G F, Shu H R, et al. Simultaneous determination of 346 multiresidue pesticides in grapes by PSA-MSPD and GC-MS-SIM[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58: 9428-9453.
- [8] Wong J W, Webster MG, Halverson C A, et al. Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51: 1148-1161.
- [9] Dasgupta S, Banerjee K, Patil S H, et al. Optimization of

- two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 3881-3889.
- [10] Oliva J, Navarro S, Barba A, Navarro G. J. Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography[J]. Chromatogr. A, 1999, 833: 43-51.
- [11] Zamboni C G, Cilenti A, Palmisano F. J. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries[J]. Chromatogr. A, 2002, 967: 255-260.
- [12] Nozal M J, Bernal J L, Jimenez J J, Martin M T, Bernal J. J. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. Chromatogr. A, 2005, 1076: 90-96.
- [13] 胡媛, 刘文民, 周艳明, 关亚风. 固相微萃取-气相色谱法测定红葡萄酒中残留的有机磷农药[J]. 色谱, 2006, 24 (3): 290-293.
- [14] 葛宝坤, 高建会, 左国华. 高效液相色谱法测定葡萄酒中 6 种防腐剂的残留量[J]. 色谱, 2003, 21 (3): 296.
- [15] 淑英, 王华. 高效液相色谱法测定葡萄酒中多菌灵的残留量[J]. 酿酒科技, 2006(2): 94-96.

(上接第 111 页)

表 5 样品测定结果 (mg/kg)

序号	安赛蜜	糖精钠	甜蜜素	三氯蔗糖
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	0.8	1.3	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	0.5	2.6	ND
6	1.2	0.4	0.8	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	1.2	3.7	ND
9	ND	ND	ND	0.3
10	0.5	ND	ND	ND

门大规模的监督检查提供及时准确的科学依据。

参考文献:

- [1] 胡承, 沈才洪. 对中国白酒发展中一些问题的思考(提要)[J]. 酿酒, 2003(2): 6-9.
- [2] 洪家敏, 陈俊波, 白怡平. 毛细管气相色谱法测定食品中环己基氨基磺酸钠研究[J]. 安徽预防医学杂志, 2004(6): 352-354.

- [3] GB/T5009.97—2003, 食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].
- [4] 李芸瑛, 黄丽华, 等. 高效液相色谱法同时快速测定饮料中的 3 种食品添加剂[J]. 肇庆学院学报, 2003, 24(2): 31-35.
- [5] GB/T5009.28—2003, 食品中糖精钠的测定[S].
- [6] GB/T5009.140—2005, 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S].
- [7] GB/T22255—2008, 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定[S].
- [8] 秦 昉, 王林祥, 陶冠军, 等. 液质联用法同时测定黄酒中糖精钠和甜蜜素[J]. 酿酒科技, 2005(9): 84-86.
- [9] 王骏. HPLC/MS 测定白酒中的微量甜味剂[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 152-154.
- [10] 刘家常, 李欣, 李明. LC-MS 法同时测定食品中 9 种甜味剂[J]. 口岸卫生控制, 2006, 11(2): 58-62.
- [11] 盛 旋, 陈昌骏, 丁振华, 等. 固相萃取-液相色谱/质谱法同时测定食品中磺胺类人工合成甜味剂[J]. 分析试验室, 2006, 25(7): 75-78.
- [12] SN/T1948—2007, 进出口食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].

西凤酒上半年销售收入同比增长 190.2 %

本刊讯 据近日陕西西凤酒集团股份有限公司上半年生产经营总结分析大会公布的数据显示, 今年 1~6 月, 西凤酒集团公司销售收入同比增长 190.2 % 利润同比增长 4.9 倍。据了解, 今年上半年西凤酒集团公司主要经济指标创历史最好成绩。(小小)