

LC-MS/MS 法测定口服液类保健食品中多种人工合成甜味剂

傅小红^{1,2*}, 李芳³, 姜伟¹, 骆瑜¹

- (1. 南昌市食品药品检验所, 江西 南昌 330029;
2. 南昌市中药质量控制与安全性评价重点实验室, 江西 南昌 330029;
3. 南昌市食品药品稽查支队, 江西 南昌 330038)

摘要:建立了ESI负离子模式液相色谱-质谱串联法(LC-MS/MS)同时快速测定口服液类保健食品中糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、三氯蔗糖7种人工合成甜味剂的方法。采用亲水性良好的ZORBAX SB-Aq(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)为分离柱,以0.1%甲酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相按梯度进行洗脱分离。实验结果表明,建立的实验方法在10~500 μg/L范围内相关性良好;方法检出限(S/N≥3)为0.05~0.5 μg/L,定量限(S/N≥10)为0.1~1.5 μg/L。在空白样品中选择3个不同浓度的标准溶液进行加标回收实验,得平均回收率为94.4%~101.2%,相对标准偏差为0.9%~3.2%。所建立的实验方法具有灵敏度高、准确性高且简单快速的优点,适用于口服液类保健食品中7种不同人工合成甜味剂的测定。

关键词:LC-MS/MS;人工合成甜味剂;口服液;保健食品

中图分类号:O0652.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2018)09-0233-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.09.053

Determination of a variety of artificial sweeteners in oral liquid health foods by LC-MS/MS

FU Xiao-hong^{1,2*}, LI Fang³, JIANG Wei¹, LUO Yu¹

- (1. Nanchang Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330029, China; 2. Nanchang Key Laboratory of Quality Control and Safety Evaluation for Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330029, China;
3. Nanchang Food and Drug Inspection Detachment, Nanchang 330038, China)

Abstract: An ESI⁻ mode liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method is developed for rapidly determining 7 kinds of artificial sweeteners such as saccharin sodium, sodium cyclamate, acesulfame-K, neotame, aspartame, alitame and sucralose in oral liquid series health food. The hydrophilic ZORBAX SB-Aq (3×100 mm, 1.8 μm) is used as the separation column, and 0.1% carboxylic acid solution (A)-methanol (B) is used as the mobile phase to separate with gradient elution. Experimental results show that the established experimental method has a good linear relationship in the range of 10–500 μg/L; the detection limits (S/N≥3) is in the range of 0.05–0.5 μg/L and the quantitation limits (S/N≥10) is in the range of 0.1–1.5 μg/L. Three standard solutions with different concentrations are selected from blank samples to be reclaimed. The average recoveries range from 94.4% to 101.2% and the relative standard deviation is 0.9%–3.2%. The established method is verified to be sensitive, accurate and simple, suitable for the detection of 7 kinds of artificial sweeteners in oral liquid health foods.

Key words: LC-MS/MS; artificial sweeteners; oral liquid; health foods

人工合成甜味剂是通过化学合成的方式获得但同样能赋予食物甜味的食品添加剂,具有稳定性好、水溶性好,通过化学合成的方式获得但同样能赋予食物甜味的食品添加剂。目前常用的人工合成甜味剂主要有糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、三氯蔗糖等。该类物质因其高甜度、低热

量、价格低的特性,受到了广大肥胖症及糖尿病患者的青睐,在食品生产中得到了广泛地应用^[1-2]。然而,近年大量实验表明,人工合成甜味剂能致使某些动物产生肿瘤,过量食用人工合成甜味剂对人体带来一定的伤害^[3-4]。GB 16740—2014《食品安全国家标准 保健食品》中明确规定^[5],食品添加剂的

收稿日期:2018-02-02;修回日期:2018-07-04

基金项目:南昌市指导性科技计划项目[洪科发计字(2016)96号第82项]

作者简介:傅小红(1987-),女,硕士,化学工程师,研究方向为分析化学,通讯联系人,370249004@qq.com。

使用应遵照中国卫生部发布的 GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》执行^[6],其中严格规定了各甜味剂在不同食品基质中的限量,但未对口服液类保健食品做更具体的规定。许多不法商人为了节约成本,在消费者不知情的情况下过量添加人工合成甜味剂,其中还包括一些儿童用口服类保健食品,严重侵害了消费者的权益及身体健康。

近几年食品中甜味剂的检测方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法等^[7-11]。高效液相色谱-质谱串联法可根据化合物离子的精确分子质量对其进行准确定性分析,可进一步对未知样品中的化合物进行准确定性。目前国内没有使用高效液相色谱-质谱法检测口服液类保健食品中甜味剂的报道。故笔者建立了同时测定口服液类保健食品中 7 种人工合成甜味剂的高效液相色谱-质谱串联法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AB SCIEX 4000 QTRAP 超高效液相色谱串联质谱仪(LC-MS/MS),美国 AB SCIEX 公司生产;ME204E 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司生产;BT25S 电子天平,赛多利斯生产;KQ3200DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产。

阿斯巴甜(纯度 97.2%)、糖精钠(纯度 99.0%)、甜蜜素(纯度 99.0%)、安赛蜜(纯度 99.0%),德国 Dr. Ehrenstofer GmbH 公司生产;纽甜

(纯度 98.6%)、三氯蔗糖(纯度 99.6%)、阿力甜(纯度 99.8%),上海安谱实验科技股份有限公司生产;甲醇、乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司生产;甲酸、乙酸铵,优级纯,美国 Sigma-Aldrich[®] 试剂公司生产;实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 混合标准溶液的配制

分别准确称取阿斯巴甜、糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、纽甜、三氯蔗糖、阿力甜 10 mg(精确至 0.1 mg)标准品,用水溶解并定容,配制成质量浓度为 100 μg/mL 的单标储备液。准确移取各标准储备液 2 mL,混合于 100 mL 容量瓶中,用流动相稀释配制成 2 μg/mL 的混合标准混合溶液。然后再逐级稀释成 10、20、50、100、300、500 μg/L 的系列混合标准工作溶液。

1.2.2 样品制备

取保健口服液样品 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用流动相定容,混匀,过 0.22 μm 滤膜,滤液供测定。

1.3 LC-MS/MS 条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-Aq 600 Bar; 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm; 流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-甲醇(B),色谱分离液相梯度条件见表 1。按表 1 所述的条件进行梯度洗脱;流速为 0.2 mL/min;柱温为 30℃;进样量为 10 μL。

(上接第 232 页)

- [8] 郭慧玲,邓文怡,李晓英.基于近红外光谱技术的常见塑料快速分类方法研究[J].现代科学仪器,2012,5:28-44.
- [9] Ren Jie, Yuan Hong-fu, Song Chun-feng, et al. Rapid determination of reactivity of natural cellulose pulp for viscose rayon by diffuse reflectance near infrared spectroscopy [J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2015, 23: 311-316.
- [10] 赵清华.基于主成分分析报废车用塑料近红外识别技术研究[D].上海:上海交通大学,2014.
- [11] 李文环,金尚忠,陈玲玲,等.基于近红外光谱结合主成分分析和 BP 神经网络的常用塑料快速鉴别[J].塑料工业,2016,44: 124-137.
- [12] 廖婷,陈永峰,杨行,等. AOTF-NIR 光谱仪在液态奶快速检测中的研究[J].压电与声光,2014,36:999-1003.
- [13] 李颖娜,吴楠,王宇亮,等.近红外光谱-系统聚类法快速测定煤炭品质[J].兰州理工大学学报,2012,38:59-62.
- [14] Katrul N B, Mutia N H, Jamilah B, et al. Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 173: 335-342.
- [15] 励建荣,俞启,王丽.近红外光谱技术检测鱼丸凝胶温度的方法研究[J].中国食品学报,2013,13:188-192.
- [16] Jose F Q, Pereira Carolina S, Silveira Maria Julia L, Veirab, et al. Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy [J]. Microchemical Journal, 2017, 133: 561-566.
- [17] 马惠玲,王若琳,蔡骋.基于高光谱成像的苹果品种快速鉴别[J].农业机械学报,2017,48:305-312.
- [18] 邹婷婷,窦英,王莹,等.近红外光谱法结合 C-SVM 及 ν-SVM 方法快速无损鉴别淀粉种类[J].食品工业科技,2013,34:317-319.
- [19] 田永超,张娟娟,姚霞,等.基于近红外光谱的土壤有机质含量定量建模方法[J].农业机械学报,2012,28:145-151.
- [20] Asmund Rinnan, Frans van den Berg, Søren Balling Engelsen. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(10): 1201-1222.
- [21] 褚小立.化学计量学方法与分子光谱分析技术[M].北京:化学工业出版社,2011:260-262. ■

表1 色谱分离液相梯度条件

时间/min	0	4	18	22	23	30
流动相 A/%	90	90	40	40	90	90
流动相 B/%	10	10	90	90	10	10

1.3.2 质谱条件

离子源:ESI⁻;离子源喷雾电压:-4 500 V;离子源温度:450℃;检测模式:多反应监测(MRM);辅助气、雾化气、碰撞气:均为氮气。采用流动注射直接连续进样方式进行质谱负离子全扫描模式,得到目标分析物一级质谱图,后用氮气轰击该母离子,得到其二级质谱图,再用多反应监测(MRM)模式对各被测物的定性和定量离子对进行质谱参数优化,所得最佳质谱条件参数如表2所示。

表2 7种甜味剂质谱测定参数

化合物	保留时间/ min	母离子	子离子	碰撞 电压/V	碰撞能/ eV
安赛蜜	5.73	161.7	81.9 ^①	-19	-45
			77.7	-36	-45
甜蜜素	8.20	177.9	79.9 ^①	-36	-80
			96.0	-31	-80
糖精钠	9.64	181.9	42.1 ^①	-42	-65
			106.0	-26	-65
三氯蔗糖	11.59	396.9	361.0 ^①	-15	-82
			395.1	359.1	-15
阿斯巴甜	11.86	293.1	200.0 ^①	-21	-70
			260.8	-15	-70
阿力甜	13.43	330.1	312.2 ^①	-19	-88
			294.9	-25	-80
纽甜	20.12	377.3	200.0 ^①	-24	-95
			230.1	-29	-90

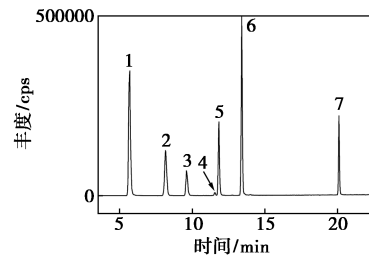
注:①为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 色谱和质谱条件的优化

根据这7个化合物的结构特点,选择了负离子模式,选择ESI源进行实验。实验中发现,三氯蔗糖响应较低,在选择MRM离子对时,在参阅文献[12]后选择2个母离子来优化实验,得到了较好的色谱图。人工合成甜味剂是一类水溶性良好的化合物,十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂柱较为广泛,然而应用该柱需用缓冲盐才能得到较好的分离效果。因

此,对比使用了亲水性较好的ZORBAX SB-Aq柱来进行实验,优化后选择流动相:0.1%甲酸溶液-甲醇按梯度洗脱,各化合物得到了更好的分离,如图1所示。



1—安赛蜜;2—甜蜜素;3—糖精钠;4—三氯蔗糖;
5—阿斯巴甜;6—阿力甜;7—纽甜

图1 7种人工合成甜味剂(质量浓度为200 μg/L)混合标准溶液的总离子流图

2.2 方法的线性范围和检出限

取1.2.1中配置好的混合标准工作溶液,按1.3中所述的液相质谱色谱条件进行实验。各化合物在10~500 μg/L范围内相关系数均在0.99以上,标准曲线方程及相关系数如表3所示。称取不同质量浓度水平的加标试样0.2 g(精确至0.000 1 g)于50 mL聚丙烯离心管中,按照1.2中所述的方法进行实验,并逐级稀释以最终的测定溶液中各成分的信噪比的3倍($S/N \geq 3$)作为其检出限,以信噪比的10倍($S/N \geq 10$)作为其定量限,结果如表3所示。

表3 7种甜味剂的标准曲线方程相关系数、检出限和定量限

化合物	线性范围/(μg·L ⁻¹)	线性方程	相关系数	检出限/(μg·L ⁻¹)	定量限/(μg·L ⁻¹)
安赛蜜	10~500	$Y=5014.81X-40625.8$	0.99817	0.05	0.1
甜蜜素	10~500	$Y=2713.40X-44047.1$	0.99237	0.10	0.3
糖精钠	10~500	$Y=608.033X-10162.4$	0.99337	0.10	0.3
三氯蔗糖	10~500	$Y=41.9508X-599.757$	0.99710	0.50	1.5
阿斯巴甜	10~500	$Y=949.962X-14678.0$	0.99161	0.10	0.2
阿力甜	10~500	$Y=4105.58X-78976.0$	0.99315	0.05	0.1
纽甜	10~500	$Y=2569.85X-17854.2$	0.99589	0.05	0.1

2.3 稳定性

取200 ng/mL的对照样品溶液,平行制备好3份样品分别放置0、2、4、6、8、12 h后取样进行试验并记录峰面积。各化合物的相对偏差如表4所示。结果表明,该方法稳定性良好。

表 4 7 种甜味剂精密度、稳定性及方法回收率

化合物	稳定性(RSD/%)	回收率/%	精密度(RSD/%)
安赛蜜	1.2	94.4	1.7
甜蜜素	2.3	96.5	2.2
糖精钠	0.8	101.2	3.2
三氯蔗糖	2.4	100.4	1.7
阿斯巴甜	2.5	101.2	2.4
阿力甜	0.6	94.7	0.9
纽甜	1.6	96.4	1.5

2.4 精密度与回收率

取空白样品,精密称定 18 份样品至 50 mL 量瓶中,平均分成 3 组,分别加入制备好的对照品储备液适量使得每瓶含对照溶液的质量浓度分别为 20、100、500 ng/mL,每个质量浓度平行测定 6 次,分别测得的回收率及相对偏差如表 4 所示,7 种甜味剂的平均回收率为 94.4%~101.2%,相对标准偏差为 0.9%~3.2%。

2.5 实际样品的测定

按所建立的实验分析方法对从各大药房采购的 20 个品牌保健口服溶液(涵盖儿童型、中老年型、未添加中药成分型和添加中药成分型)进行一定的稀释后进行处理分析,每个样品重复 3 次。结果表明,其中有 14 种保健口服溶液检测出一定量的安赛蜜、

表 5 20 种样品中 7 种人工合成甜味剂的检测结果($n=3$)

样品编号	安赛蜜	甜蜜素	阿斯巴甜	纽甜
2	—	0.02	—	—
4	—	—	1.57	—
6	—	—	0.05	—
7	0.96	4.41	—	—
8	—	—	2.62	—
9	—	—	3.72	—
10	—	—	4.41	—
11	0.57	0.02	—	0.04
12	0.93	0.02	—	0.04
14	—	—	0.80	—
15	0.58	—	—	0.03
17	—	—	3.02	—
18	0.02	—	—	—
20	—	0.05	—	—

g·L⁻¹

注:—为未检出,未列出的化合物标示均未检出,未标出的样品编号 1,3,5,13,16,19 为均未检出。

甜蜜素、阿斯巴甜和纽甜,而在商品成分标准中均未注明,其余 3 种甜味剂均未检出,结果如表 5 所示。

3 结语

建立了 7 种人工合成甜味剂的高效液相色谱-质谱法,并首次用于测定保健口服溶液。实验结果表明,该方法得到了较高的回收率和重现性,具有简单、高效、准确、快速等优点。同时将所建立的实验方法用于各大药房随机采购的保健口服溶液样品的检测,结果表明,许多样品在未注明的情况下添加了不同种类的人工合成甜味剂,其中还包含了儿童型口服溶液,且不乏有些商家添加的量非常大。该项研究为建立相应的检验标准及标准规定提供了一定的数据支撑,对提升我国保健口服溶液的安全监管具有一定的意义。

参考文献

- [1] 李晓瑜.非营养型甜味剂的安全性研究进展及管理现状[J].中国食品卫生杂,2002,14(4):43-45.
- [2] 齐峰,邢宇,孙伟.甜味剂的现状及发展趋势[J].化学工程师,2005,117(6):46-47.
- [3] Cohen S M. Cell proliferation in the bladder and implications for cancer risk assessment[J].Toxicology,1995,102:149-159.
- [4] Jaydip D, Ruth A E, Angie D, et al. Enhancement of rat bladder contraction by artificial sweeteners via increased extracellular Ca²⁺ influx[J].Toxicology and Applied Pharmacology,2006,217:216-224.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 16740—2014《食品安全国家标准 保健食品》[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 2760—2014《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,2014.
- [7] 杨双春,刘慧芳,王健,等.国内外人工合成的非能量型甜味剂研究现状[J].食品工业,2013,34(4):181-184.
- [8] 杨君,王建华,刘靖靖,等.食品中甜味剂的检测技术研究进展[J].化学分析计量,2013,22(5):100-103.
- [9] 朱国强,林滢.气相色谱法测定乳制品饮料中甜蜜素含量[J].理化检验:化学分册,2010,(11):1353-1354.
- [10] 刘丽敏,彭敬东.五种甜味剂的反相高效液相色谱法同时测定[J].分析测试学报,2008,27(5):549-552.
- [11] Scotter M J, Castle L, Roberts D P T, et al. Development and single-laboratory validation of an HPLC method for the determination of cyclamate sweetener in foodstuffs[J].Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess,2009,26(5):614-622.
- [12] 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.■