

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2010.00749

高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄酒中的 5 种人工合成甜味剂

嵇超^{1,2}, 冯峰², 陈正行¹, 孙利², 储晓刚^{2*}

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214036;
2. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100123)

摘要: 建立了测定葡萄酒中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜和纽甜等 5 种人工合成甜味剂的高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱(HPLC-ESI MS/MS) 分析方法。采用 Ultimate C18 色谱柱,对流动相的组成、柱温以及质谱的各种参数进行了优化和探讨。结果表明,以含 0.1% (体积分数) 甲酸的 20 mmol/L 甲酸铵缓冲液(pH 3.8) 和甲醇为流动相,梯度洗脱,柱温为 45 °C 下,可以在 5 min 内完成 5 种人工合成甜味剂的基线分离。在 ESI 负离子模式下,采用多反应监测模式进行测定时,安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜和纽甜的检出限分别为 0.6、5、1、0.8 和 0.2 μg/L,回收率为 87.2%~103%,相对标准偏差均不高于 1.2%。该方法快速、准确,灵敏度高,可用于葡萄酒及其他复杂基质食品中低剂量、复合甜味剂的测定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 安赛蜜; 糖精钠; 甜蜜素; 阿斯巴甜; 纽甜; 人造甜味剂; 葡萄酒

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2010)08-0749-05

Determination of five synthetic sweeteners in wines using
high performance liquid chromatography-
tandem mass spectrometry

Ji Chao^{1,2}, FENG Feng², CHEN Zhengxing¹, SUN Li², CHU Xiaogang^{2*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036, China;
2. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI MS/MS) method for the determination of five synthetic sweeteners (acesulfame, sodium saccharin, sodium cyclamate, aspartame and neotame) in wines has been developed. The HPLC separation was carried out on an Ultimate C18 column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm). Several parameters, including the composition and pH of the mobile phase, column temperature and the monitor ions, were optimized for improving the chromatographic performance and the sensitivity of determination. The results demonstrated that the separation can be completed in less than 5 min by gradient elution with 20 mmol/L ammonium formate and 0.1% (v/v) formic acid (pH 3.8) and methanol as the mobile phase. The column temperature was kept at 45 °C. When the analytes were detected by ESI⁻-MS/MS under multiple reaction monitoring mode, the detection limits were 0.6, 5, 1, 0.8 and 0.2 μg/L for acesulfame, sodium saccharin, sodium cyclamate, aspartame and neotame, respectively. The average recoveries ranged from 87.2% to 103%. The relative standard deviations were not more than 1.2%. This method is rapid, accurate, highly sensitive and suitable for the quality control of low concentration of the synthetic sweeteners, which are illegally added to wines and other foods with complex matrices.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); acesulfame; sodium saccharin; sodium cyclamate; aspartame; neotame; synthetic sweeteners; wines

葡萄酒是由新鲜葡萄或葡萄汁经发酵而成的饮料,富含有机酸、糖类、黄酮类、酚类和原花青素等功能成分,适量饮用能预防多种疾病^[1]。随着我国人民生

活水平的提高,葡萄酒的消费量呈现了快速增长的趋势^[1]。为了保障葡萄酒的饮用安全,国家标准 GB2760-2007《食品添加剂使用卫生标准》对葡萄酒中允许添加

* 通讯联系人: 储晓刚,教授,博士生导师. Tel: (010) 85791012, E-mail: xgangchu@163.com.

基金项目: 北京市科委科技计划支持课题(编号: D08050200310803)。

收稿日期: 2010-03-19

的食品添加剂种类和浓度作了明确规定,其中规定不允许人工合成甜味剂添加到葡萄酒中。然而,一些不法生产者向葡萄酒中非法添加人工合成甜味剂的情况却时有发生^[1],因此发展一种快速、准确、灵敏地测定葡萄酒中甜味剂的分析方法,对于保障葡萄酒的饮用安全尤为重要。

目前食品中经常使用的人工合成甜味剂包括糖精钠(saccharin sodium, SA)、甜蜜素(sodium cyclamate, SC)、安赛蜜(acesulfame, AK)、阿斯巴甜(aspartame, ASP)和纽甜(neotame, NTM)等。针对这些甜味剂,已报道的检测方法有高效液相色谱-紫外分光光度法^[4-7]、离子色谱法^[8,9]、毛细管电泳法^[10]、高效液相色谱-质谱法^[11-14]等。其中高效液相色谱-紫外分光光度法较为常用,但由于受到紫外分光光度法灵敏度的限制,部分甜味剂可能因含量较低而无法检出;而且该方法不能提供结构信息,在实际样品分析时容易受到基质干扰而产生假阳性现象。近来,采用高效液相色谱-质谱法对食品中的甜味剂进行分析已有一些报道,但是这些方法尚存在分析种类少^[11,12]、消耗时间长^[13]、分离度差^[4]等不足。鉴于此,本研究建立了一种检测葡萄酒中5种人工合成甜味剂的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法。该方法处理样品方式简单,分析速度快,灵敏度高,适用于葡萄酒中人工合成甜味剂的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),串联 API 5000 三重四极杆质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司),配备 Agilent 自动进样器,Agilent 柱温箱。数据采集由 Analyst 1.5 软件完成(美国 Applied Biosystems 公司)。

糖精钠、安赛蜜、阿斯巴甜(美国 Supelco 公司);甜蜜素、纽甜(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。甲酸、甲酸铵、乙酸、乙酸铵(美国 Sigma 公司);实验室用水由 Millipore 纯水仪制备。11 份葡萄酒实际样品购自超市,类型均为干型,其中高档酒 3 份,中档酒 3 份,低档酒 5 份。

1.2 标准溶液的配制

准确称取安赛蜜、糖精钠、甜味素、阿斯巴甜及纽甜标准品,用水溶解并定容,配制成质量浓度为 1.0

g/L 的单标准储备液;准确移取各标准储备液 0.5 mL,混合于 100 mL 容量瓶中,用水稀释配制成 5 mg/L 的混合标准工作液。将此标准工作液用水稀释,最终制成质量浓度范围为 0.01 ~ 1.25 mg/L 的系列混合标准溶液。

1.3 样品溶液的制备

取葡萄酒样品 10 mL 置于 50 mL 烧杯中,超声脱气 10 min 后,取 1.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中,用水定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜,滤液供 HPLC-MS/MS 分析。

1.4 HPLC 条件

色谱柱为 Ultimate C18 柱(100 mm × 2.1 mm, 3.0 μm, Welch Materials)。流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 20 mmol/L 甲酸铵缓冲液(含 0.1% (v/v,下同)甲酸, pH 3.8);流速 0.3 mL/min;梯度洗脱程序:0 ~ 1.9 min, 30% A; 1.9 ~ 2.0 min, 30% A 线性增加到 95% A; 2.0 ~ 5.0 min, 95% A。进样体积 2 μL。柱温 45 °C。

1.5 MS/MS 条件

Turbo Ionspray 电喷雾电离源(ESI),负离子模式,多反应监测(MRM);实验中所用的气体均为高纯液氮,碰撞气(CAD)压力为 41 kPa,气帘气(CUR)压力为 170 kPa,雾化气(GS1)压力为 450 kPa,辅助气(GS2)压力为 410 kPa,电喷雾电压(IS)为 -4.5 kV,去溶剂温度(TEM)为 500 °C, Q0 入口电压(EP)为 -10 V,碰撞室出口电压(CXP)为 -15 V,5 种甜味剂的定性/定量离子对、碰撞电压(CE)及去簇电压(DP)见表 1。

2 结果与讨论

2.1 流动相条件的优化

我们在之前使用超高效液相色谱-紫外分光光度法对安赛蜜、糖精钠、甜味素、纽甜 4 种甜味剂进行检测的过程中发现,4 种甜味剂在使用乙腈-磷酸二氢钠水溶液作为流动相时的分离度要优于使用乙腈-乙酸铵水溶液作为流动相时的分离度^[1]。但由于磷酸二氢钠不易挥发,不能用于质谱分析,所以本研究中我们选择易挥发的流动相体系进行 5 种甜味剂的 HPLC-MS/MS 分析。李传慧等^[14]报道采用乙腈-水体系作为流动相检测 5 种甜味剂的快速液相色谱-串联质谱法,尽管在分离时使用 1.8 μm 的细粒径色谱柱,但由于在分离过程中没有使

表 1 5 种甜味剂检测的质谱条件
Table 1 MS/MS conditions for the detection of 5 synthetic sweeteners

Analyte	Molecular formula	Parent ion (<i>m/z</i>)	Daughter ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential/V	Collision energy/V
Acesulfame (AK)	C ₄ H ₄ KNO ₄ S	162.1	82.0*	-40	-25
			78.0		-34
Sodium saccharin (SA)	C ₇ H ₄ NO ₃ SNa • 2H ₂ O	182.1	106.0*	-20	-27
			62.0		-42
Sodium cyclamate (SC)	C ₆ H ₁₂ NNaO ₃ S	178.2	80.0*	-80	-40
			96.0		-27
Aspartame (ASP)	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	293.2	200.1*	-110	-21
			146.1		-25
Neotame (NTM)	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅	377.3	200.1*	-100	-24
			230.4		-30

* quantitative ion.

用缓冲液,导致安赛蜜、糖精钠和甜蜜素这 3 种极性较强的甜味剂仍然无法达到基线分离,而且完成 5 种甜味剂的分析时间长达 7 min。本研究分别考察了甲醇-20 mmol/L 乙酸铵(含 1% 乙酸,pH 3.8)体系和甲醇-20 mmol/L 甲酸铵(含 0.1% 甲酸,pH 3.8)体系下 5 种甜味剂的分离情况。由图 1 可以看出,在相同的洗脱条件下,5 种甜味剂在两种缓冲液体系下均可以较好分离,但采用甲醇-20 mmol/L 甲酸铵/甲酸体系时分离度更好。

对于质谱分析来说,流动相的离子强度对检测灵敏度有重要的影响,过高的离子强度会对分析物的电离产生抑制效应,进而会降低检测的灵敏度。在本研究中,考虑到使用甲酸调节 pH 时,维持流动相同样的 pH 需要的甲酸量要比乙酸少 10 倍,这可能会对检测的灵敏度产生一定的影响,因此本研究对两种体系下 5 种甜味剂的信号强度和灵敏度进行了比较,其中信号强度以峰高来表征,灵敏度通过计算信噪比(*S/N*)获得。

由图 2 可以看出,在两种缓冲液体系中,当分别以同样的进样体积和浓度对 5 种甜味剂进行色谱分析时,尽管在使用甲醇-甲酸铵/甲酸体系时各个组分的信号强度相对于甲醇-乙酸铵/乙酸体系增加不多,甚至纽甜的信号强度在甲醇-乙酸铵/乙酸体系中更高,

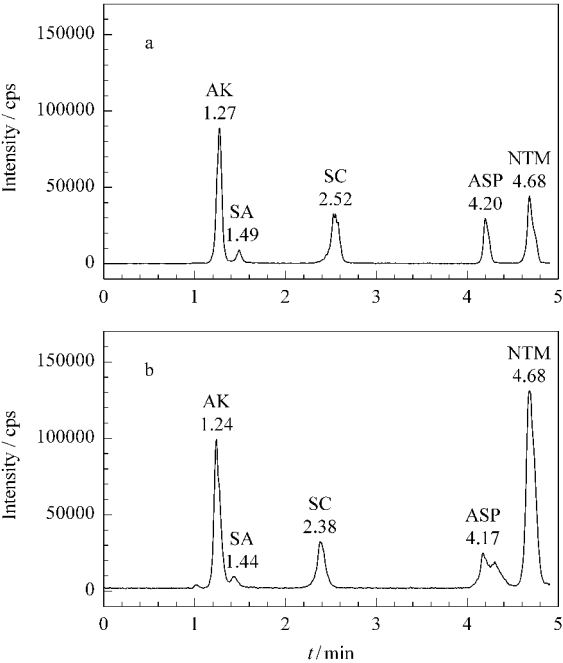


图 1 5 种甜味剂在(a) 甲醇/甲酸铵体系及(b) 甲醇/乙酸铵体系下分离的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of 5 synthetic sweeteners under the conditions of (a) methanol/ammonium formate and (b) methanol/ammonium acetate as mobile phases

The MS/MS system was operated in negative electrospray ionization mode, and recorded in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The injection volume was 2 μ L, and the concentration for each analyte was 0.2 mg/L.

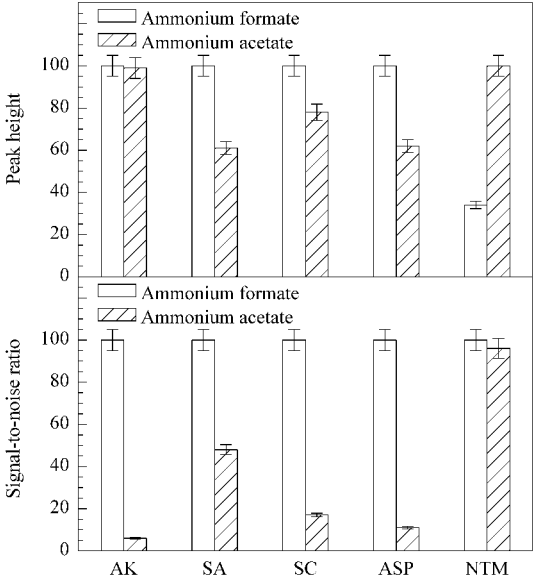


图 2 5 种甜味剂在甲酸铵体系及乙酸铵体系下分离的峰高及信噪比比较

Fig. 2 Effects of ammonium formate buffer and ammonium acetate buffer on the peak heights and signal-to-noise ratios in the separation of 5 sweeteners

但是对信噪比的计算表明,所有甜味剂的信噪比在甲醇-甲酸铵/甲酸体系下都更高,其中安赛蜜甚至高 15 倍以上。这说明,在甲醇-乙酸铵/乙酸体系中,乙酸根的离子强度偏高,过高的离子强度使得背景噪声升高,进而降低了信噪比。纽甜的信噪比没有太大的变化,可能是因为在其出峰时(4. 68 min) 缓冲液的比例仅占 5%,如此低浓度的离子强度不会对其背景噪声造成显著的影响。综上所述,本研究最后选择甲醇-甲酸铵/甲酸体系作为 5 种甜味剂的分离体系。

2.2 分离温度的优化

一般认为提高柱温虽然可以缩短分析物的分离时间,但是分析物的分离度可能随之下降。本研究分别考察了 25、35、45 ℃ 3 个温度条件下 5 种甜味剂的分离情况。结果表明,5 种甜味剂的分离时间随着温度的增加而缩短,当温度增加到 45 ℃ 时,尽管甜蜜素的保留时间相对于 35 ℃ 时有所减少,但是纽甜的保留时间已无变化,因此最终将分离温度确定为 45 ℃。45 ℃ 柱温下 5 种甜味剂的分离色谱图见图 3。

2.3 方法的线性关系、回收率、精密度及检出限

在优化条件下,考察了 5 种人工合成甜味剂在 10 ~ 625 μg/L 质量浓度范围内的线性关系和相关系数,并以 5 种甜味剂的 $S/N = 3$ 时的进样浓度定义为检出限。回收率和精密度的测定通过向阴性葡萄酒样品中添加高、低 2 个浓度水平的甜味剂混合标准溶液来进行,每个浓度样品平行分析 5 次。结果见表 2。

2.4 方法的应用

对北京市市售的 11 种葡萄酒进行了测定,根据各甜味剂的保留时间及两对子离子峰高的比进行定性。结果表明,11 个样品中有 2 个样品添加了人工合成甜味剂,且这两个样品均为低档干型红葡萄酒,其中 7 号样品添加了阿斯巴甜和纽甜,其质量浓度分别为 50. 7 和 11 000 μg/L; 10 号样品添加了安赛蜜和甜蜜素,其质量浓度为 16. 5 和 11. 8 μg/L。需要说明的是,对于 10 号样品中检出的低浓度水平的甜味剂,本研究不仅仅是以两个碎片离子的保留时间、峰面积比进行确证,而且还通过在此样品中加入已知浓度水平的甜味剂标

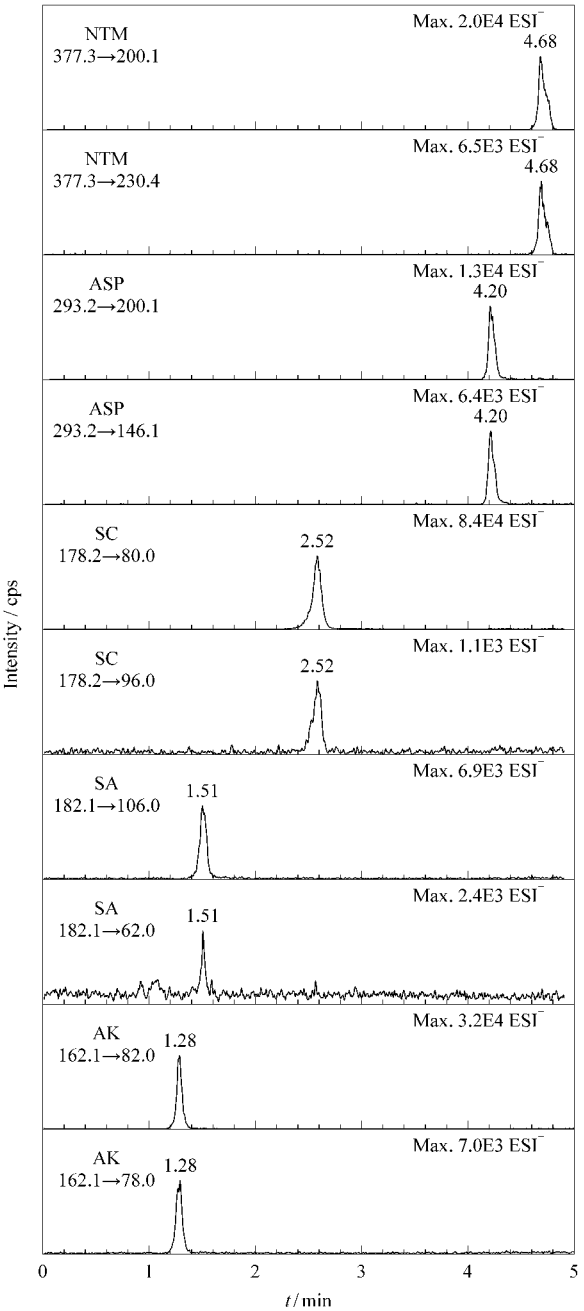


图 3 优化条件下 5 种甜味剂标准品的 MRM 色谱图
Fig. 3 MSR chromatograms of 5 synthetic sweetener standards under optimum conditions

The injection volume was 2 μL, and the injection concentration was 40 μg/L.

表 2 5 种甜味剂的线性范围、线性方程、相关系数、添加回收率、精密度及检出限($n = 5$)
Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (r), recoveries, precisions and limits of detection (LOD, $S/N = 3$) of the 5 synthetic sweeteners ($n = 5$)

Analyte	Linear range/ (μg/L)	Regression equation	r	LOD/ (μg/L)	Spiked 50 μg/L		Spiked 200 μg/L	
					Recovery / %	RSD / %	Recovery / %	RSD / %
AK	10 - 312	$y = 4640x + 4170$	0.9997	0.6	88.7	1.1	93.5	0.6
SA	20 - 625	$y = 302x + 858$	0.9992	5	92.8	1.2	99.3	0.7
SC	20 - 156	$y = 5940x + 6630$	0.9996	1	87.2	0.7	94.1	0.5
ASP	10 - 625	$y = 2060x + 1690$	0.9991	0.8	103	0.9	91.2	0.8
NTM	10 - 625	$y = 4690x + 699$	0.9998	0.2	95.3	1.1	97.3	0.2

x : mass concentration of sweetener, μg/L; y : peak area.

准品,进而观察有无新色谱峰出现,以及计算添加的标准品的回收率等方式进行了确证。显然,正是因为本方法可以获得极高的灵敏度,才使得 10 号葡萄酒样品中添加了极低浓度水平的人工合成甜味剂得以检出和定量。图 4 为 7 号和 10 号样品的色谱图。

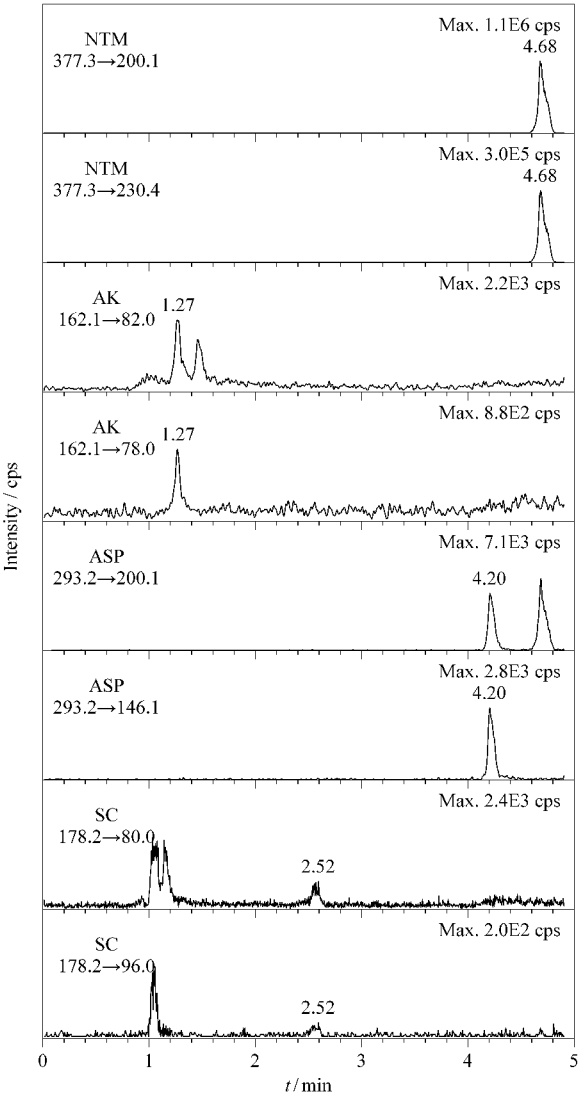


图 4 葡萄酒阳性样品的色谱图
Fig. 4 Chromatograms of positive wine samples
ASP and NTM in Sample 7; AK and SC in Sample 10.

如前所述,GB 2760-2007《食品添加剂使用卫生标准》规定在葡萄酒中不允许添加人工甜味剂。目前市售的葡萄酒类型包括干型、半干型及甜型等。考虑到半干型及甜型中的含糖量较高,人为添加甜味剂的可能性不大,因此本研究着重选择了干型葡萄酒进行分析。从检测结果可以看出,有人工合成甜味剂检出的样品占总样品数的 18%。考虑到检出的样品均为低档的葡萄酒,说明在市售的低档葡萄酒中更有可能非法添加人工合成甜味剂。另外,值得注意的是,所检出的 2 个样品均使用的是复合甜味剂,且这些甜味剂还不相

同,说明在市场上已存在将低浓度的多种人工合成甜味剂非法添加到葡萄酒当中以逃脱监管的现象,这应引起食品安全监管部门足够的重视,以应对可能潜在的食品安全风险。

3 结论

本文建立了葡萄酒中安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、纽甜 5 种人工合成甜味剂的高效液相色谱-串联质谱检测方法。该方法快速、准确、灵敏度高。将该方法用于葡萄酒中低含量、复合甜味剂的测定,前处理步骤简单,回收率符合要求。该方法有望在保障食品安全过程中发挥重要的作用。

参考文献:

[1] Wang J F, Luan L, Wang Z Q, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王金芳, 栾鸾, 王正全, 等. 分析化学), 2007, 35(10): 1430

[2] Zhou Y Q. China Brewing (周艳琼. 中国酿造), 2006(6): 80

[3] Xie Y L, Chen X X, Feng Y, et al. Modern Food Science and Technology (谢娅黎, 陈欣欣, 冯勇, 等. 现代食品科技), 2009, 35(12): 1482

[4] He Y Y, Lu Y Y. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (何云亚, 陆昱养. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(4): 655

[5] Chen Q C, Yu W L, Wang J. Chinese Journal of Chromatography (陈青川, 于文莲, 王静. 色谱), 2001, 19(2): 105

[6] Yang L H, Wang L, Sun C J. Chinese Journal of Analysis Laboratory (杨柳桦, 王林, 孙成均. 分析试验室), 2007, 26(7): 79

[7] Ji C, Sun Y Y, Li X Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (嵇超, 孙艳艳, 李秀琴, 等. 色谱), 2009, 27(1): 111

[8] Chen Q C, Mou S F, Liu K N, et al. J Chromatogr A, 1997, 771: 135

[9] Zhu Y, Guo Y Y, Ye M L, et al. J Chromatogr A, 2005, 1085: 143

[10] Frazier R A, Inns E L, Dossi N, et al. J Chromatogr A, 2000, 876: 213

[11] Sheng X, Chen C J, Ding Z H, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (盛旋, 陈昌骏, 丁振华, 等. 分析试验室), 2006, 25(7): 75

[12] Qin F, Wang L X, Tao G J. Liquor-Making Science & Technology (秦昉, 王林祥, 陶冠军. 酿酒科技), 2005, 21(9): 84

[13] Koyama M, Yoshida K, Uchibori N, et al. J Food Hyg Soc Japan, 2005, 46(3): 72

[14] Li C H, Li S J, An J, et al. Science and Technology of Food Industry (李传慧, 李淑娟, 安娟, 等. 食品工业科技), 2009, 30(8): 319