

高效液相色谱法在电子烟烟液中甜味剂检测的应用

张浩

(东莞市鸿馥生物科技有限公司, 广东 东莞 523000)

摘要: 创建了使用高效液相色谱仪蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 测试电子烟烟液中甜味剂 (三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮、爱德万甜) 的检测方法。通过对含有甜味剂的电子烟烟液样品采用 80% 甲醇水溶液振荡萃取后, 采用 C18 反向色谱柱进行分离, 采用水、甲醇和乙腈为流动相, 进行梯度洗脱, 高效液相色谱仪蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 进行对应的样品检测, 经过测试, 在曲线浓度为 20mg/L-200mg/L 的范围内, 建立双对数的校准曲线, 其相关系数 R^2 均大于 0.999, 方法的回收率为: 95%-110%, 对应测试的相对标准偏差 (RSD) 0.500%-1.70%, 为整个检测方法简单、测试准确, 适用于电子烟烟液中四种甜味剂的测定。

关键词: 高效液相色谱仪蒸发光散射检测器; 梯度洗脱; 电子烟烟液; 甜味剂

Application Of High Performance Liquid Chromatography To The Detection Of Sweetener In Electronic Cigarette Liquid

ZHANG Hao

(Dongguan Hongfu Biotechnology Co., LTD., Dongguan 523000, Guangdong, China)

Abstract: A high performance liquid chromatograph evaporative Light scattering detector (HPLC-ELSD) was developed for the determination of sweeteners (sucralose, neotame, neohesperidin dihydrochalcone, edvaname) in e-cigarette liquid. The samples of electronic cigarette liquid containing sweeteners were extracted by 80% methanol aqueous solution oscillating, separated by C18 reverse chromatographic column, water, methanol and acetonitrile were used as mobile phase, gradient elution was carried out, and the corresponding samples were detected by high performance liquid chromatographic evaporative Light scattering detector (HPLC-ELSD). In the range of curve concentration of 20mg/L-200mg/L, a double-logarithmic calibration curve was established, and its correlation coefficients R^2 were all greater than 0.999. The recovery rate of the method was as follows: 95%-110%, corresponding to the relative standard deviation (RSD) of 0.644%-1.70%, the whole detection method is simple and accurate, and is suitable for the determination of four sweeteners in e-cigarette liquid.

Keywords: High performance liquid chromatograph evaporative light scattering detector; Gradient elution;; E-cigarette liquid; Sweetening agent;

电子烟烟液是指液体形态的雾化物，即可被电子装置全部或部分雾化为可吸入气溶胶的混合物及辅助物质^[1]。电子烟烟液是配合电子烟烟具使用的雾化物，主要化学成分有丙二醇、丙三醇、烟碱及各类香精组成，甜味剂在传统烟草和新型烟草领域均有着广泛的应用，不同风味的电子烟烟液成分十分复杂，烟液里面含有尼古丁，香精香料，甜味剂等^[3-6]，甜味剂^[10]是指能赋予食物甜味的食品添加剂，目前最常见的合成甜味剂中，三氯蔗糖^[11]是含有五个羟基和三个氯原子的极性氯化糖，纽甜^[12]是二肽化合物的衍生物，新橙皮苷二氢查尔酮（NHDC）是由柑橘类水果中发现的类黄酮通过碱性加氢而成^[7]。爱德万甜为白色粉末，是一种 20000 倍蔗糖甜度的超高倍甜味剂，当达到相同的甜度，爱德万甜的用量可以远低于现有市场上的蔗糖和其他高倍甜味剂^[8]。甜味剂属于食品、饮料及药品中应用较为广泛的食品添加剂类型，主要功能在于给产品添加甜美口感，从而促进消费者的口感享受^[9]。因此，合理使用甜味剂是安全的，不会对消费者的健康产生风险，但超限量、超范围或者使用劣质的人工合成甜味剂，会对消费者的身体健康产生一定的负面影响^[6]。本研究结合电子烟烟液中甜味剂（三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮、爱德万甜）的物理特征和化学性质，以及高效液相色谱仪蒸发光散射检测器高灵敏度的特性，通过优化色谱分析条件，开发了快速测定电子烟烟液中甜味剂（三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮、爱德万甜）的高效液相色谱法。该方法具有前处理萃取快速、检测灵敏度和准确度高的特点，适用于电子烟烟液中甜味剂含量的批量检测，可视为甜味剂来料和成品电子烟烟液中甜味剂纯度及含量的方法储备，保障消费者健康权益。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

标准物质与试剂

标准物质：爱德万甜（浓度：1000mg/L），新甲基橙皮苷二氢查尔酮（纯度：99.7%），三氯蔗糖（纯度：99.8%），坛墨质检科技股份有限公司；纽甜（纯度：1000mg/L），北方伟业计量集团有限公司。

试剂：乙腈（HPLC 级），甲醇（HPLC 级），上海星可高纯溶剂有限公司；实验室纯水仪自制超纯水。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪（1260 InfinityII），蒸发光散射检测器（1260 InfinityII ELSD），安捷伦科技有限公司；电子天平，梅特勒托利多科技（中国）有限公司；混匀仪（JOANLAB VM 500PRO），艾科迈科学仪器浙江有限公司。

1.3 实验检测方法

1.3.1 标准工作溶液的配制

储备液的配制：使用电子天平称取新甲基橙皮苷二氢查尔酮、三氯蔗糖标准品各 100mg，置于 10mL 容量瓶中。使用 80%甲醇水溶液定容至刻度线，振荡混匀后，待用，此时得到两种甜味剂的浓度为 10.0mg/mL

的混合标准储备液。

中间液的配制：移取浓度为 10mg/mL 的储备液于 10mL 的容量瓶中，使用 80%的甲醇水溶液定容至刻度线，振荡混匀后，待用，此时得到新甲基橙皮苷二氢查尔酮、三氯蔗糖的浓度为 1.0mg/mL。

混合标准工作溶液的配制：移取 1.0mg/mL 中间液、纽甜标准溶液、爱德万甜标准溶液 20 μ L、50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L 和 980 μ L、950 μ L、900 μ L、850 μ L、800 μ L 的 80%甲醇水溶液于 1.5mL 的样品瓶中，混匀，待用，得到三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜的工作溶液浓度分别是 0.02mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL。

1.3.2 样品前处理

称取 1.0g（精确至 0.001g）样品于 10mL 的容量瓶中，使用 80%甲醇水溶液定容至刻度线，在转速为 2000r/min 的振荡上振荡 2min 后混匀，过 0.22 μ m 滤膜过滤，取滤液上机分析。

1.3.3 色谱条件

液相色谱柱：ZORBAX SB-C18（150mm $\times$ 4.6mm $\times$ 5 μ m）或者等柱效；色谱柱柱温：35 $^{\circ}$ C；进样量 5 μ L；色谱柱流速：1.0mL/min；液相色谱 A 流动相为：实验室纯水仪自制超纯水；液相色谱 B 流动相为：甲醇（色谱级）；液相色谱 C 流动相为：异丙醇（色谱级）；洗脱梯度为：0-5min 90%A，5%B,5%C；5-8min 70%A，30%C；8-22min 25%A，75%C；22-24min 90%A，5%B,5%C；24-26min 90%A，5%B,5%C；雾化气体：氮气；蒸发管温度：80 $^{\circ}$ C；漂移管温度：65 $^{\circ}$ C。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件及四种甜味剂出峰时间的确定

对流动相的柱流速和流动相的分配比例进行调整，从而提升三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜在液相色谱柱中的分离效果，当流速为 1.0mL/min，按照上述的洗脱梯度，可以使 4 种物质更好的分离，并且有比较好的分离度，如图 1、图 2 所示。

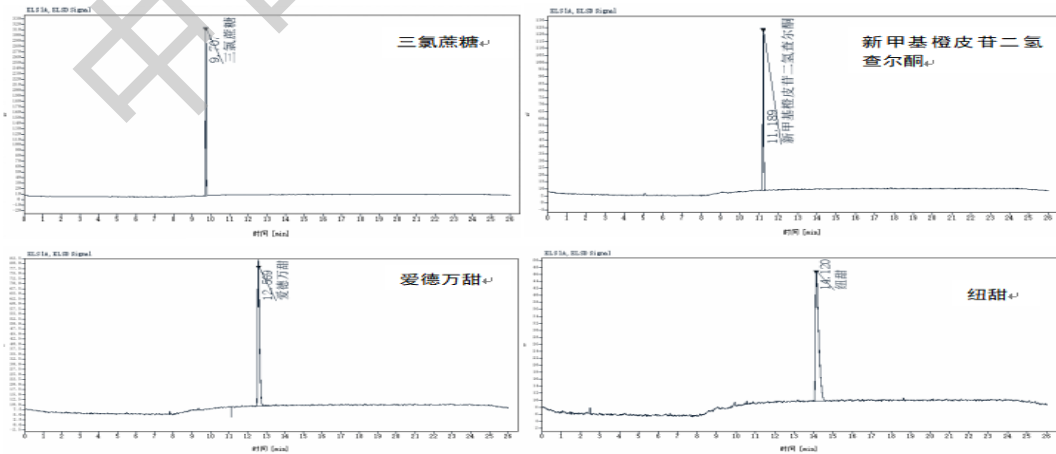


图 1 四种甜味剂 单标准物质图

Fig 1 Diagram of four single standard substances for sweeteners

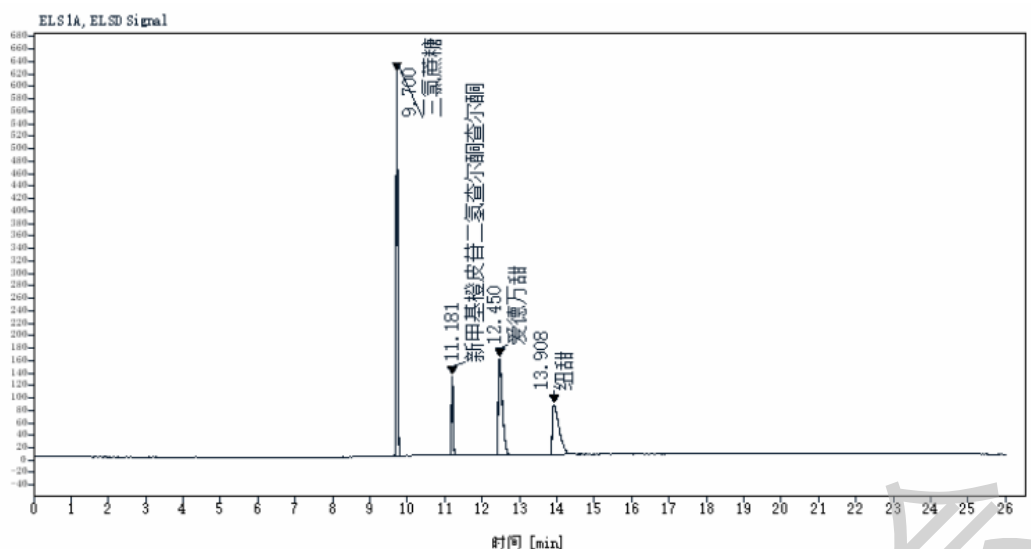


图 2 四种甜味剂混合标准溶液图

Fig 2. Diagram of four kinds of sweeteners mixed with standard solution

2.2 标准工作曲线浓度、曲线线性和检出限

通过 1.3.3 色谱条件和方法，将配制的三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜的混合标准工作溶液，通过高效液相色谱仪（HPLC-ELSD）进样 5 μ L 的样品溶液进行分析测试，以各个目标物的实际峰面积为坐标轴的纵坐标，以各个物质标准工作溶液的浓度为坐标轴的横坐标，绘制双对数曲线^[2]，即： $\log(y)=\log(x)+b$ 以各个物质的信噪比 (S/N 值) ≥ 3 时，各个物质的进样浓度为各种甜味剂的检出限 (LOD)，结果表明，各个甜味剂在 20~200mg/L 的工作溶液浓度范围内表现出较好的线性，其相关系数 R^2 大于 0.999，可以满足实验室对电子烟烟液中甜味剂含量定量分析的要求，详见表 1。

表 1 三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜的标准工作曲线浓度、相关系数 R^2 和检出限

Table 1 Standard working curve concentration, correlation coefficient R^2 and detection limit of sucralose, neotame, neohesperidin dihydrochalcone and Edvaname

化合物	工作曲线浓度(mg/L)	标准工作曲线	相关系数 R^2	检出限(mg/g)
三氯蔗糖	20~200	$\log(y)=1.7712\log(x)-1.5748$	0.9999	0.2
新甲基橙皮苷查尔酮	20~200	$\log(y)=1.8329\log(x)-1.6398$	0.9995	0.2
爱德万甜	20~200	$\log(y)=1.6891\log(x)-1.5237$	0.9994	0.2
纽甜	20~200	$\log(y)=1.5913\log(x)-1.4083$	0.9997	0.2

2.3 方法准确度和精密度

通过对不含目标物的电子烟烟液样品进行添加四种甜味剂混合标准溶液不同浓度，即 0.2mg/g、1.0mg/g、1.5mg/g 的加标回收来验证方法的准确度，且每个水平重复测试 6 次验证其方法的稳定性，计算样品中各种甜味剂的加标回收率和平行测试的相对标准偏差(RSD)，通过回收率和相对标准偏差值(RSD)

值来评估该检测方法的准确度和精密度，详细结果结果见表 2。回收率在 99.0% ~110%之间， 相对标准偏差(RSD)值在 0.500%~1.70%，实验数据体现了该检测方法比较好的准确度和重复性，且其测试方法的可行性，满足实验室对三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜含量检测的测试需求。

表 2 三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜的准确度和精密度测试实验

Table 2 Accuracy and precision test of sucralose, neotame, neohesperidin dihydrochalcone and Edvaname

化合物	mg/g			回收率(%)	RSD(%)
	样品浓度	加标水平浓度	平均测试浓度		
三氯蔗糖	0	0.2	0.199	99.5	1.32
		1.0	1.03	103	0.578
		1.5	1.55	104	1.55
新甲基橙皮苷查尔酮	0	0.2	0.202	101	2.60
		1.0	1.04	104	0.870
		1.5	1.58	105	1.38
爱德万甜	0	0.2	0.199	99.5	1.16
		1.0	1.05	105	0.754
		1.5	1.56	104	1.44
纽甜	0	0.2	0.204	102	1.67
		1.0	1.07	107	0.620
		1.5	1.57	104	1.68

3 结论

通过使用高效液相色谱仪蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)同时测定电子烟烟液中的甜味剂三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮、爱德万甜的检测方法。在 0.02mg/mL~0.2mg/mL 的浓度范围内，表现出较好的线性，且曲线的相关系数已高于 0.999，加标的回收率在 99.0%~110%之间，重复测试的相对标准偏差（RSD）在 0.500%~1.70%之间，具有较为出色的重现性和稳定性。此研究方法的实验条件及步骤简单易操作，测试分析过程中使用流动相和梯度洗脱程序较为简练，提升检测效率，为电子烟烟液中三氯蔗糖、纽甜、新橙皮苷二氢查尔酮和爱德万甜的添加量以及添加种类的判断检测提供了更有效的方法和途径，从而更有效的体现新方法的值。

参考文献:

- [1]国家市场监督管理总局国家标准化委员会;中华人民共和国国家标准 电子烟;GB 41700-2022[S].北京: 中国标准出版社,2022.
- [2]国家市场监督管理总局国家标准化委员会;中华人民共和国国家标准 食品安全国家标准食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定;GB 5009.298-2023[S].北京: 中国标准出版社,2023.
- [2]廖惠云, 吴洋, 马梦婕等. SPE-HPLC-MS/MS 法同时测定电子烟烟液中9种甜味剂[J],烟草科技,2020, 53(5): 33-40.
- [3]周志强,李云淼,朱小梅.电子烟雾化液化学成分分析研究[J].香料香精化妆品,2019 (2):17-26.
- [4]杨文武,况利平. 电子烟烟液中甜味剂的种类及感官评价现状探究[J]. 食品工业 2023,44(4): 200-204.
- [5]叶智莲,杨文武,况利平 HPLC-ELSD 法 同时测定电子烟烟液中 10 种甜味剂[J],云南化工,2023,51 (3): 86-90.
- [6]李小佳,杨扬,李瑞等.食品中合成甜味剂的检测方法研究进展[J],饮料工业 2023,27 (03):66-73.
- [7]汪辉,黄小贝,刘江等. 超高效液相色谱-串联质谱快速测定食品中的 新品种甜味剂爱德万甜[J], 色谱) 2018,36 (7):700-704.
- [8]黎泽江,李宁杰. 甜味剂的应用及其环境影响研究进展[J], 科技创新与应用 2023,13 (29):149-152.
- [9]王晓韵.添加剂的研究进展与前景——以甜味剂为主[J], 现代食品 2024,30 (04): 24-26.
- [10]张贺,刘雪,吕春峰.高效液相色谱仪不同检测器测定食品中三氯蔗糖的比较研究[J],广东化工 2023,,50(23):1-5.
- [11]王颖,代仕梅,韦靖婧,陈长安. HPLC 法测定白酒甜味剂纽甜含量[J].中国食品工业 2022 (01):114-117.