

食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定

陈卿卿, 金字雨, 陈宇洋

(浙江福立分析仪器股份有限公司, 浙江省温岭市 317500)

摘要: 试样中三氯蔗糖用甲醇水溶液提取, 除蛋白、脂肪, 经固相萃取柱净化、富集后用高效液相色谱仪、反相 C18 色谱柱分离, 蒸发光散射检测器, 根据色谱峰的保留时间定性, 面积外标法定量。

关键词: 液相色谱; 三氯蔗糖; 检测

1 检测方法

依据国家标准: 食品安全国家标准 食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定 液相色谱法 (GB 22255-2014)。

2 试剂和材料

2.1 试剂

- 1) 乙腈: 色谱纯。
- 2) 甲醇: 色谱纯。
- 3) 正己烷: 色谱纯。
- 4) 三氯蔗糖: 99.6%
- 5) 乙酸锌: 分析纯
- 6) 亚铁氰化钾: 分析纯
- 7) 水: 娃哈哈纯净水。
- 8) 乙酸: 分析纯

2.2 试剂的配置

- 1) 乙酸锌溶液(219g/L): 称取 2.19g 乙酸锌, 加 3mL 乙酸, 加水溶解至 10mL。
- 2) 亚铁氰化钾溶液(106g/L): 称取 1.06g 亚铁氰化钾, 加水溶解至 10mL。
- 3) 甲醇水溶液(75+25): 量取 75mL 甲醇, 加 25mL 水, 混匀。
- 4) 乙腈水溶液(11+89): 量取 11mL 乙腈, 加 89mL 水, 混匀。

2.3 仪器和装置

- 1) 高效液相色谱仪: 福立 LC5090 高效液相色谱仪, 配备 LC5090 在线脱气机、LC5090 等度

输液泵、LC5090 自动进样器、LC5090 柱温箱、ELSD 蒸发光检测器。

2) 色谱柱: Sunniest C18 色谱柱, 4.60 mm * 150 mm, 粒径为 5.0 μm 。

3) 天平: 精度为 0.0001g。

4) 蒸发皿

5) 水浴锅

6) 涡旋混合器

7) 离心机

8) 超声波清洗仪

9) 固相萃取柱

10) 针头过滤器: 0.45 μm 有机滤膜。

3 仪器条件

1) 色谱柱: Sunniest C18, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm ;

2) 流动相: 水+乙腈=89+11;

3) 流速: 1.0 mL/min;

4) 蒸发光散射器条件:

雾化压力: 3.5 Bar; 流量: 3.00 L/min; 蒸发温度: 40°C;

5) 柱温: 30°C;

6) 进样量: 20 μL (满环进样)

4 溶液配制

4.1 三氯蔗糖标准贮备液:

准确称取 0.0099 g (精确至 ± 0.0001 g) 三氯蔗糖 (3.3) 用水溶解后, 全量转入 10mL 容量瓶中, 用水稀释定容至刻度线, 摇匀, 配制成浓度为 0.99mg/mL 的三氯蔗糖标准储备液, 于 4°C 以下冷藏、避光和密封可保存三个月, 使用时应恢复至室温并摇匀。

4.2 三氯蔗糖标准使用液:

1) 一级标准溶液 (0.3960 mg/mL)

准确移取标准储备液 (6.1) 4mL 至 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成三氯蔗糖浓度为 0.3960 mg/mL 的三氯蔗糖一级标准溶液。

2) 二级标准溶液 (0.1980 mg/mL)

准确移取一级标准溶液 (6.2.1) 5 mL 至 10mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成三氯蔗糖

浓度为 0.1980 mg/mL 的三氯蔗糖二级标准溶液。

3) 三级标准溶液 (0.0990mg/mL)

准确移取二级标准溶液 (6.2.2) 5 mL 至 10mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成三氯蔗糖浓度为 0.0990 mg/mL 的三氯蔗糖三级标准溶液。

4) 四级标准溶液 (0.0495mg/mL)

准确移取三级标准溶液 (6.2.3) 5 mL 至 10mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成三氯蔗糖浓度为 0.0495 mg/mL 的三氯蔗糖四级标准溶液。

5) 五级标准溶液 (0.0198mg/mL)

准确移取四级标准溶液 (6.2.4) 4 mL 至 10mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成三氯蔗糖浓度为 0.0198 mg/mL 的三氯蔗糖五级标准溶液。

5 样品的制备

5.1 样品制备

1) 含蛋白脂肪试样

称取混匀后纯牛奶试样 2.0302g, 置于 50mL 离心管中, 加入 5mL 水, 涡旋混合器上振荡 3min 后加入 15mL 甲醇, 0.5mL 乙酸锌溶液、0.5mL 亚铁氰化钾溶液, 继续振荡 30s, 超声波提取 20min, 以 3000r/min 离心 10min, 将上清液移入 50mL 离心管中。沉淀物加入 5.0mL 甲醇水溶液(75+25), 玻棒搅拌均匀后涡旋混合器上振荡 30s, 以 3000r/min 离心 10min, 重复提取 2 次, 将上清液合并于 150mL 分液漏斗中。

在 150mL 分液漏斗内, 加入 30mL 正己烷, 振摇 2min。静置分层 20min 后, 下层水相移置于 50mL 蒸发皿。蒸发皿于沸水浴上蒸发, 当蒸发皿中液体在 1mL 左右时用 9mL 水分三次冲洗蒸发皿, 冲洗液合并移置于 15mL 离心管中, 超声波处理 5min, 以 3000r/min 离心 10min。取全部上清液移入已活化的固相萃取柱, 控制液体流速不超过每秒 1 滴, 柱上液面为 2mm 左右时加入 1mL 水, 继续保持液体流速为每秒 1 滴, 到柱中液体完全排出后, 用 3mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液。洗脱液置于 50mL 蒸发皿内, 于沸水浴上蒸干, 残渣用 1mL 乙腈水溶液(11+89)溶解(如溶液有浑浊现象可将其移入离心管 10000r/min 离心 5min)溶液过 0.45 μ m 滤膜, 滤液为制备的试样溶液, 备用。

2) 酱及酱制品、醋、酱油

称取混匀后醋试样 2.0207g, 置于 15mL 离心管中, 加入 5mL 水, 涡旋混合器上振荡 30s。以 3000r/min 离心 10min。以下步骤按 7.1.1.3 处理。

3) 含酒精的试样（发酵酒、配制酒）

称取混匀后白酒试样 5.0101g，置于 50mL 蒸发皿中，将蒸发皿置于沸水浴上蒸干，残渣用 1.00mL 乙腈水溶液(11+89) 溶解，溶液过 0.45 μ m 滤膜，滤液为制备的试样溶液，备用。

4) 饮料

称取混匀后饮料试样 5.0075g，置于 15mL 离心管中，加入 5mL 水，涡旋混合器上振荡 30s。以 3000r/min 离心 10min。以下步骤按 7.1.1.3 处理。

5) 风味发酵乳、奶茶

称取混匀后试样 2.0246g，置于 50mL 离心管中，加入 5mL 水，涡旋混合器上振荡 3min 后加入 15mL 甲醇、0.5mL 乙酸锌溶液、0.5mL 亚铁氰化钾溶液，以下步骤自 7.1.1.1 “继续振荡 30s，超声波提取 20min，以 3000r/min 离心 10min”开始，到 7.1.1.3 “滤液为制备的试样溶液，备用。”为止依次处理。

5.2 加标样品制备：

1) 含蛋白脂肪试样

称取混匀后纯牛奶试样 2.0100g、2.0032g、2.0042g，分别置于 50mL 离心管中，再准确移取标准贮备液（6.1）100 μ L 于离心管中，加入 5mL 水，后续步骤同 7.1.1 的试样步骤一致。

2) 酱及酱制品、醋、酱油

称取混匀后醋试样 2.0207g、2.0001g、2.0096g，分别置于 15mL 离心管中，再准确移取标准贮备液（6.1）100 μ L 于离心管中，加入 5mL 水，涡旋混合器上振荡 30s。以 3000r/min 离心 10min。以下步骤按 7.1.1.3 处理。

3) 含酒精的试样（发酵酒、配制酒）

称取混匀后白酒试样 5.0070g、5.0097g、5.0113g，分别置于 50mL 蒸发皿中，再准确移取标准贮备液（5.1.1）100 μ L 于蒸发皿中，将蒸发皿置于沸水浴上蒸干，残渣用 1.00mL 乙腈水溶液(11+89) 溶解，溶液过 0.45 μ m 滤膜，滤液为制备的试样溶液，备用。

4) 饮料

称取混匀后饮料试样 5.0095g、5.0086g、5.0131g，分别置于 15mL 离心管中，再准确移取标准贮备液（6.1）100 μ L 于离心管中，加入 5mL 水，涡旋混合器上振荡 30s。以 3000r/min 离心 10min。以下步骤按 7.1.1.3 处理。

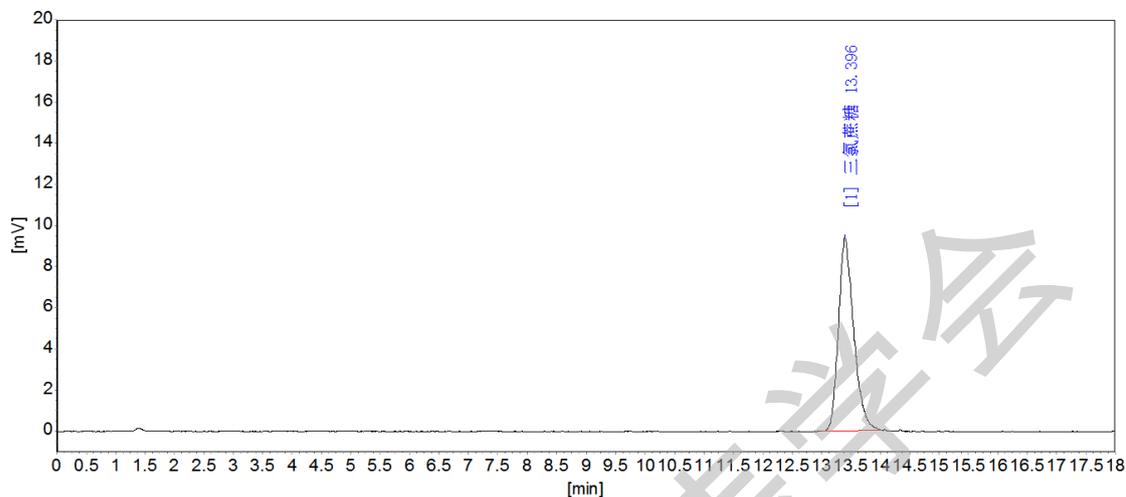
5) 风味发酵乳、奶茶

称取混匀后试样 2.0217g、2.0088g、2.0089g，分别置于 50mL 离心管中，再准确移取标准

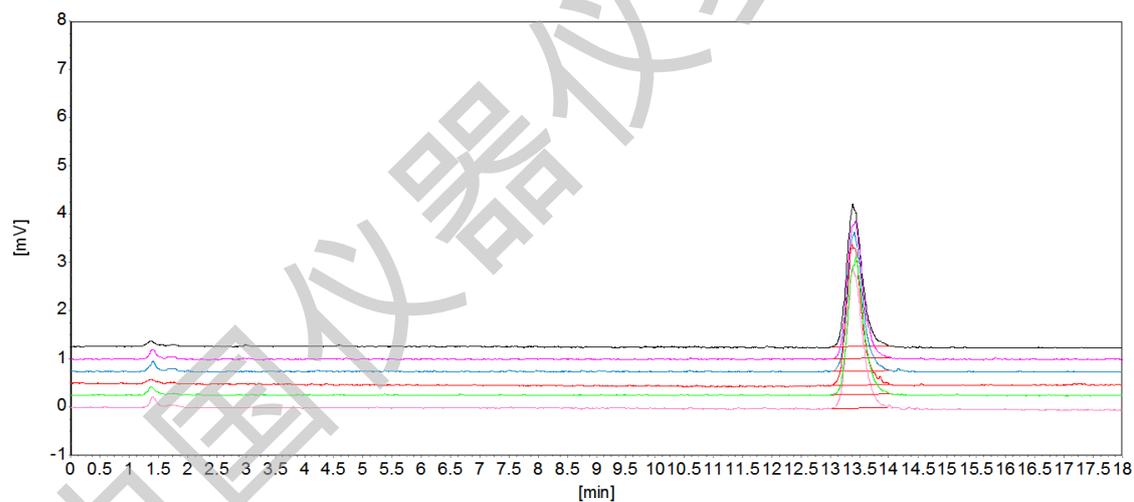
贮备液 (6.1) 100 μ L 于离心管中, 加入 5mL 水, 后续步骤同 7.1.1 的试样步骤一致。

6 分析结果

6.1 三氯蔗糖标准溶液典型谱图及结果 (二级标准溶液)



6.2 三氯蔗糖标准溶液六针重复性谱图及结果 (三级标准溶液)



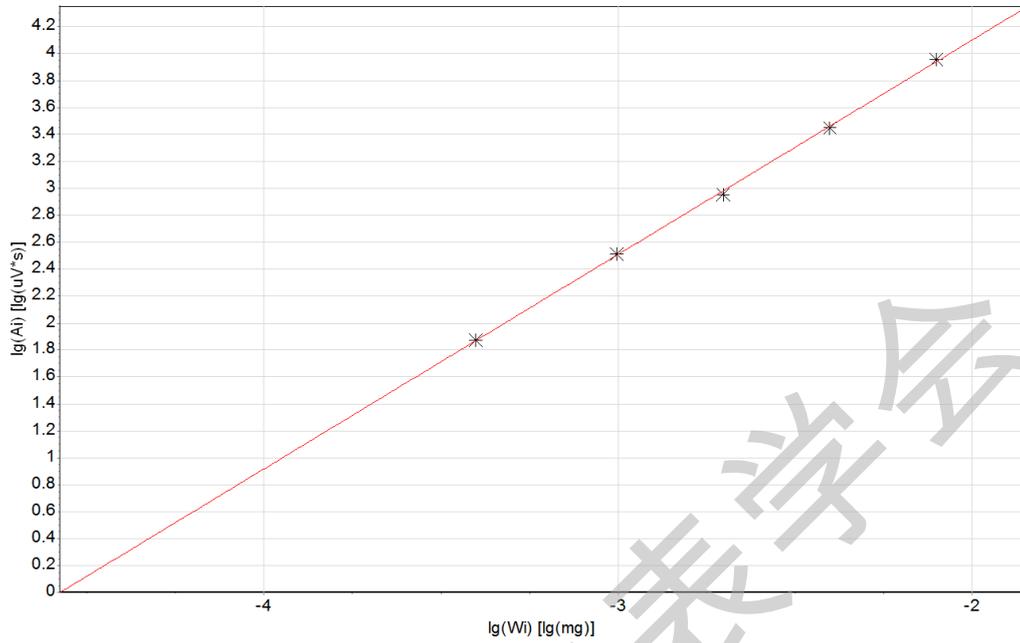
峰序	组分名	保留时间 平均值 /min	保留时 间 RSD/%	面积平均 值 /uAU*min	面积 RSD/%	峰高平 均值/uV	峰高 RSD/%	谱图数
1	三氯蔗糖	13.402	0.191	902	0.394	2893	1.543	6

6.3 标准曲线

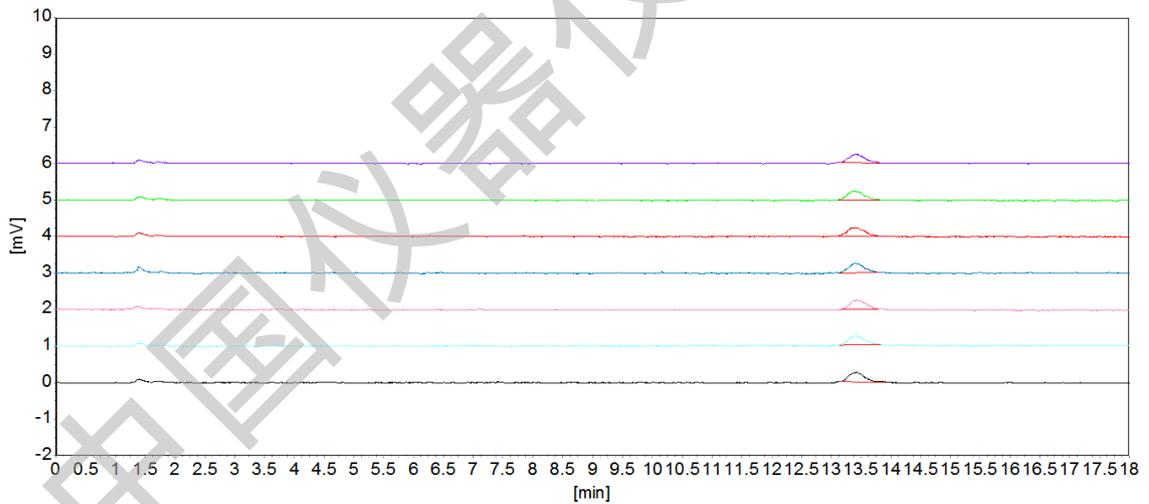
标准曲线的绘制进样浓度(以三氯蔗糖计)为 0.0198 mg/mL、0.0495 mg/mL、0.0990 mg/mL、0.1980mg/mL、0.3960mg/mL 的标准系列溶液各 20 μ L, 进行 HPLC 分析。然后以峰面积为纵

坐标，以目标物的含量为横坐标，绘制标准曲线。

组分[三氯蔗糖]: 曲线方程: $\lg(W_i) = -4.57672 + 0.628538 * \lg(A_i)$
 校正因子: $f_0 = -4.57672$, $f_1 = 0.628538$ 相关系数: $r^2 = 0.99951$



6.4 检出限

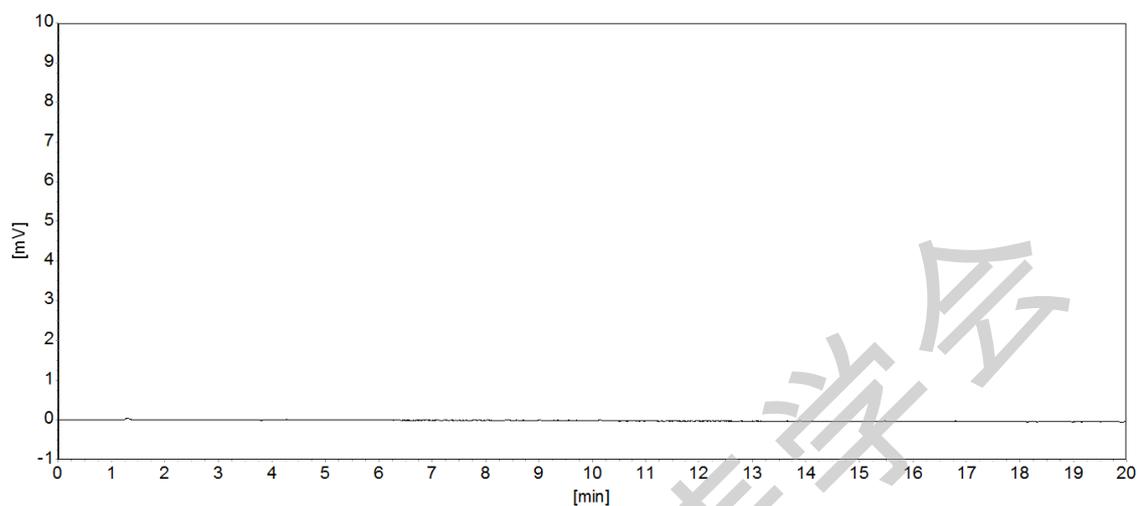


峰序	平行测定	1/ mg/mL	2/ mg/mL	3/ mg/mL	4/ mg/mL	5/ mg/mL	6/ mg/mL	7/ mg/mL	检出限/ g/kg	定量限/ g/kg
1	三氯蔗糖	0.0204	0.0205	0.0202	0.0201	0.0200	0.0208	0.0204	0.0005	0.0015

注：按称样量 2g，定容体积 1mL 计

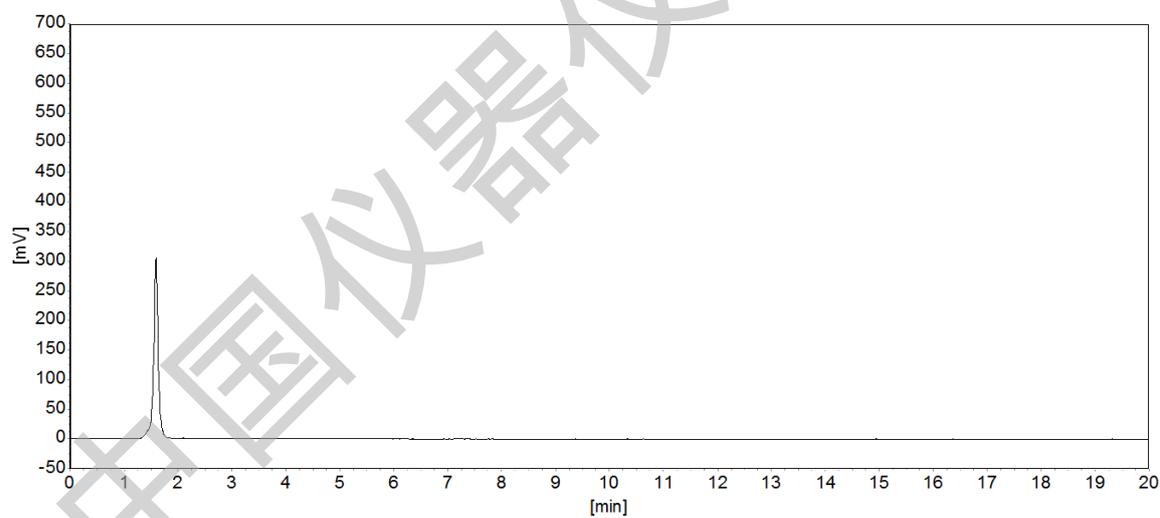
6.5 样品典型谱图及结果

1) 空白谱图



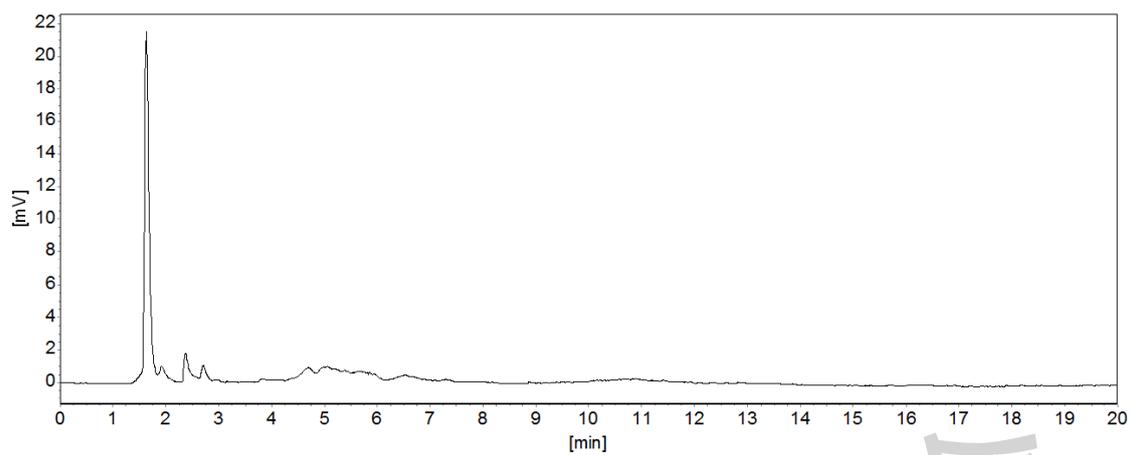
2) 样品典型谱图及测定结果

白酒样品典型谱图及测定结果



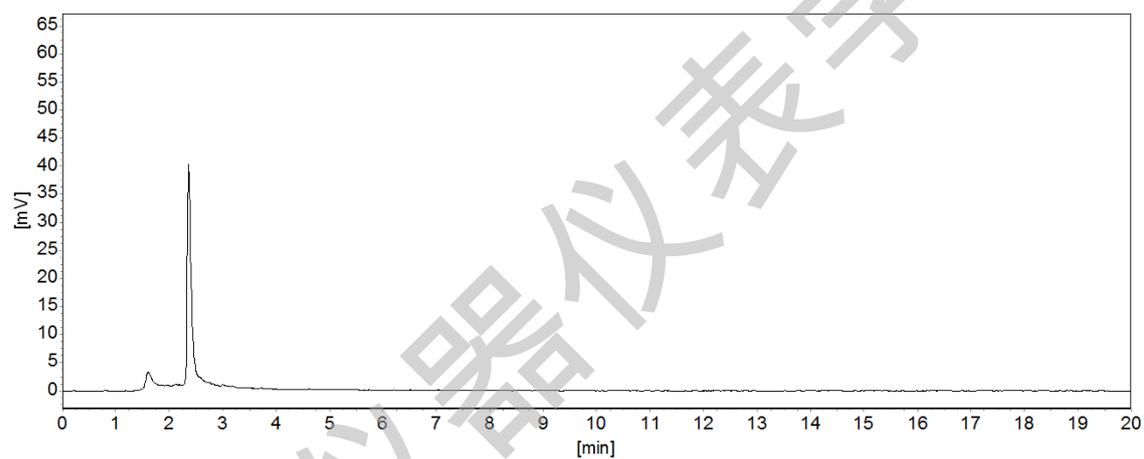
白酒中未检出三氯蔗糖。

牛奶样品典型谱图及测定结果



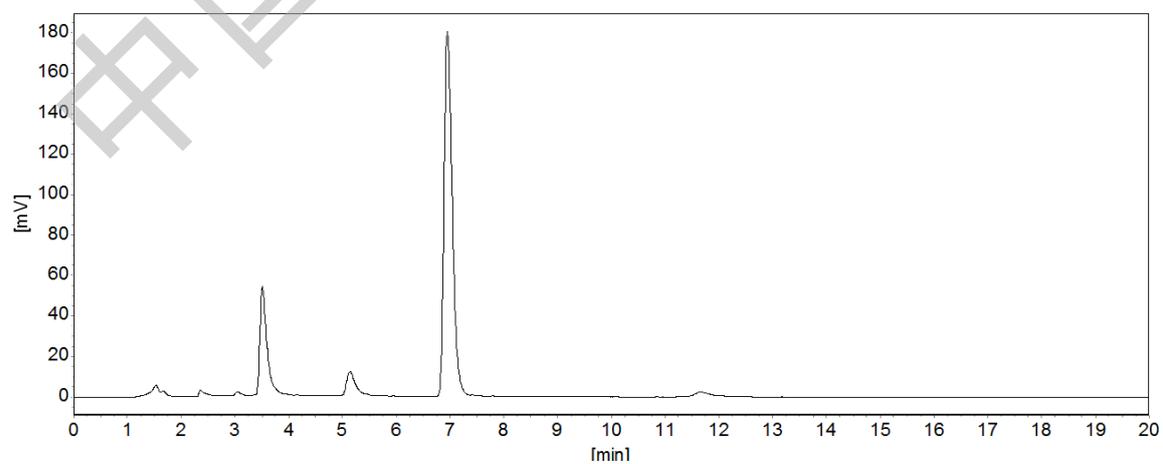
牛奶样品中未检出三氯蔗糖。

醋样品典型谱图及测定结果



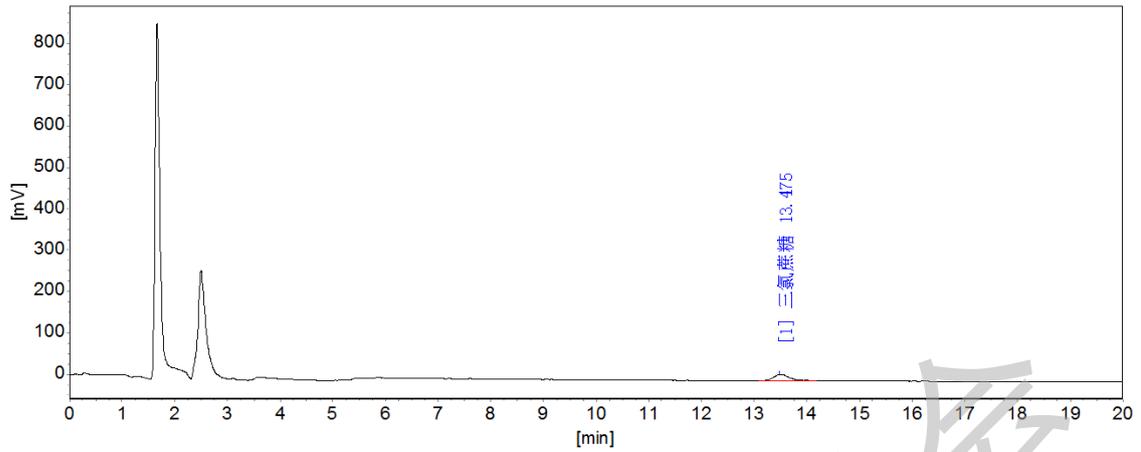
醋中未检出三氯蔗糖。

饮料样品典型谱图及测定结果



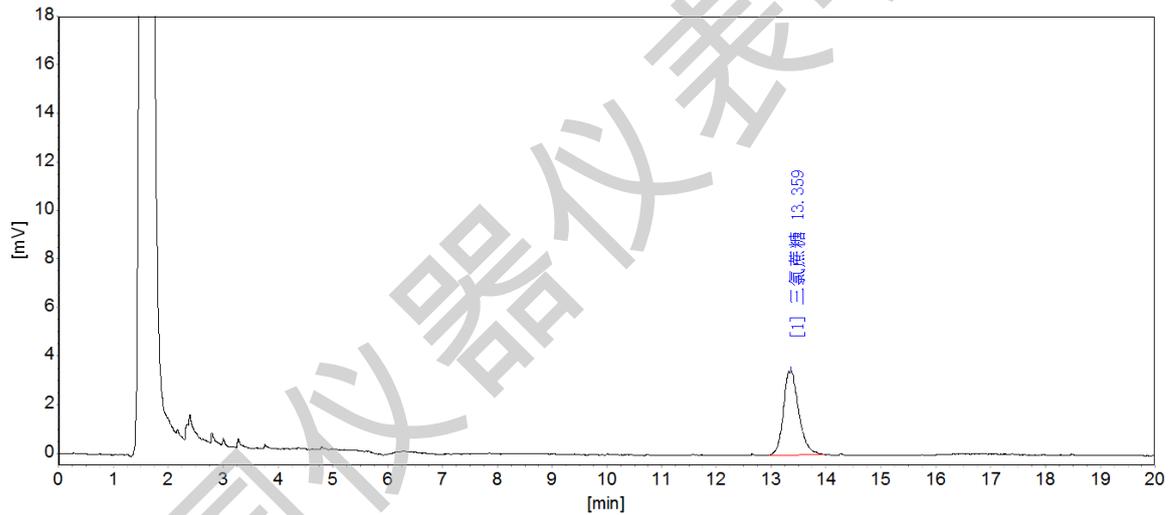
饮料中未检出三氯蔗糖。

乳酸菌样品典型谱图及测定结果



乳酸菌中检出三氯蔗糖 0.0544 g/kg，低于国家风味发酵乳中三氯蔗糖使用限量（0.3g/kg）。

3) 加标典型谱图及回收率



组分名称	样品名称	样品中三氯蔗糖含量 (g/kg)	加标量 (mg)	样品质量 (g)	测量值 (g/kg)	加标回收率 (%)	平均加标回收率范围 (%)
三氯蔗糖	牛奶	未检出	0.0990	2.0100	0.0544	110.4	110.2-113.6
				2.0136	0.0542	110.2	
				2.0232	0.0556	113.6	
三氯蔗糖	醋	未检出	0.0990	2.0207	0.0547	111.6	109.7-111.6
				2.0001	0.0543	109.7	

				2.0096	0.0545	110.6	
三氯蔗糖	白酒	未检出	0.0990	5.0113	0.0212	107.3	104.2-107.3
				5.0097	0.0206	104.2	
				5.0070	0.0209	105.8	
三氯蔗糖	饮料	未检出	0.0990	5.0095	0.0211	106.8	102.7-108.4
				5.0086	0.0203	102.7	
				5.0131	0.0214	108.4	
三氯蔗糖	乳酸菌	0.0544	0.0990	2.0217	0.1010	97.7	94.4-97.7
				2.0088	0.1021	98.4	
				2.0089	0.0979	94.4	

7 实验结果

方法验证结论：三氯蔗糖的精密度、线性相关系数、检出限、回收率结果汇总如下：

方法验证汇总表

化合物	保留时间 (min)	峰面积 RSD (%)	标准曲线线性相关 系数	检出限 (g/kg)	加标回收率范 围 (%)
三氯蔗糖	13.402	0.394	0.999	0.0005	94.4-113.6

由以上实验结果可知，采用福立 LC5090 测定食品中三氯蔗糖(蔗糖素)，方法稳定可靠，目标物线性范围良好，灵敏度较高，有很好的重现性，能够对样品进行准确性定量。