

# 超高效液相色谱-串联质谱快速 筛查葡萄酒中的 14 种禁用食品添加剂

冯峰<sup>1</sup> 杨烁<sup>2</sup> 凌云<sup>1</sup> 江桂斌<sup>3</sup> 储晓刚\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100123)   <sup>2</sup>(哈尔滨医科大学, 哈尔滨 150081)

<sup>3</sup>(中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学重点实验室, 北京 100085)

**摘要** 建立了同时测定葡萄酒中 14 种禁用食品添加剂的超高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)分析方法。采用 UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm × 2.1 mm × 1.7 mm) 色谱柱, 对流动相的组成、缓冲液离子强度及质谱的各种参数进行了优化。结果表明, 流动相的离子强度对食品添加剂的质谱检测有重要影响, 以含 1 mmol/L 甲酸铵-甲酸缓冲液(pH 3.9)-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 可以在 6 min 内完成 14 种食品添加剂的分离和检测。在 ESI 负离子模式下, 采用选择离子监测方法进行测定时, 除三氯蔗糖、日落黄和酸性红 13 的检出限分别为 10、2 和 2 ng/L 外, 其它 11 种的检出限在 0.01~ 1.0 mg/L 之间。回收率为 93.8%~ 106%, 相对标准偏差小于 3.1%。本方法快速、准确、灵敏度高, 可用于葡萄酒及其它复杂基质食品中的低剂量、多种禁用食品添加剂的同时筛查。

**关键词** 超高效液相色谱; 串联质谱; 食品添加剂; 葡萄酒

## 1 引言

葡萄酒是新鲜葡萄或葡萄汁经发酵而成, 富含有机酸、糖类、黄酮类、酚类和原花青素等功能成分, 适量饮用能够预防多种疾病<sup>[1,2]</sup>。国家标准 GB2760-2007《食品添加剂使用卫生标准》在葡萄酒中仅允许添加焦糖色作为着色剂, 三氯蔗糖作为甜味剂, 除此之外禁止添加任何种类的着色剂和甜味剂<sup>[3]</sup>。近年来, 在葡萄酒中添加非法着色剂和甜味剂的情况时有发生, 为了保障葡萄酒的饮用安全, 有必要建立一种快速、准确、灵敏的方法对葡萄酒中的禁用食品添加剂进行测定。

目前, 检测食品中着色剂和甜味剂的方法有高效液相色谱<sup>[4,5]</sup>、紫外分光光度法<sup>[6]</sup>、离子色谱法<sup>[7]</sup>、毛细管电泳法<sup>[8-10]</sup>及液相色谱-质谱法<sup>[11-15]</sup>等。由于使用液相色谱-紫外分光光度法不能提供结构信息, 而葡萄酒成分又较复杂, 因而在检测微量成分时容易发生假阳性或假阴性现象。近年来, 质谱技术已在食品中添加剂的筛查方面显现出显著优势<sup>[13,14]</sup>。然而目前所报道的质谱方法多采用传统的色谱条件, 其中所用的醋酸铵或是甲酸铵溶液缓冲液浓度多大于 20 mmol/L<sup>[12-14]</sup>。研究表明, 过高的离子浓度对分析物的电离具有较强的抑制作用<sup>[16,17]</sup>。因此, 为提高检测的灵敏度, 增强对食品中禁用物质的筛查能力, 有必要对质谱分析时缓冲液的浓度进行优化。本研究建立了同时高灵敏、快速筛查葡萄酒中 14 种禁用甜味剂和着色剂的超高效液相色谱(UPLC)-串联三重四极杆质谱(QQQ)方法, 对色谱分离中缓冲液的浓度对质谱检测的灵敏度的影响进行了探讨。本方法已成功用于葡萄酒中禁用添加剂的快速检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(UPLC, 美国 Waters 公司); 串联 API 5500 三重四极杆质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司), 配备 Waters UPLC 自动进样器, 柱温箱, 数据采集由 Analyst 1.5.1 软件完成。

糖精钠(Sodium saccharin)、安赛蜜(Acesulfame)、阿斯巴甜(Aspartame), 购自美国 Supelco 公司; 甜蜜素(Sodium cyclamate)、纽甜(Neotame)、丽春红 2R(Ponceau 2R)、丽春红 3R(Ponceau 3R)、丽春红

2011-02-18 收稿; 2011-05-05 接受

本文系北京市科委科技计划项目(No. D08050200310803)和科技部科技支撑计划项目(No. 2011BAK10B04)资助

\* E-mail: xgangchu@163.com

SX(Ponceau SX), 购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 三氯蔗糖(Sucralose)、日落黄(Sunset Yellow FCF)、诱惑红(Allura Red)、红色 2G(Acid Red 1)、酸性红 13(Acid Red 13)、赤藓红(Erythrosine)、甲酸、甲酸铵, 购自美国 Sigma 公司; 实验室用水由 Millipore 纯水仪制备。10 份葡萄酒样品购自超市。

## 2.2 标准溶液的配制

准确称取适量上述标准品, 用水溶解并定容, 配制成 1000 mg/L 的单标储备液; 准确移取各标准储备液 0.5 mL, 混合于 100 mL 容量瓶中, 用水定容, 配制成 5 mg/L 的混合标准工作液。用水逐级稀释, 制成浓度范围为 0.1~500 ng/L 的系列混合标准溶液。

## 2.3 样品溶液制备

取葡萄酒样品 10 mL 于 50 mL 烧杯中, 超声脱气 10 min; 取脱气后的样品 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 用水定容至 10 mL, 过 0.22 μm 滤膜后分析。

## 2.4 色谱-质谱条件

UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, 美国 Waters 公司)。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 1 mmol/L 甲酸铵-甲酸缓冲液(pH 3.9)。流速 0.3 mL/min, 进样体积 2 μL, 柱温 35 °C; 梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 7% A; 1.5~7.0 min, 7%~90% A; 7.0~10.0 min, 90% A。

电喷雾电离源, 负离子模式, 多反应监测(MRM); 实验所用气体均为高纯液氮, 碰撞气(CAD)压力为 41.4 kPa, 气帘气(CUR)压力为 138 kPa, 雾化气(GS1)压力为 448 kPa, 辅助气(GS2)压力为 414 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) -10 V, 碰撞室出口电压(CXP)为 -11 V, 14 种添加剂的定性/定量离子对、碰撞电压(CE)及去簇电压(DP)见表 1。

表 1 14 种食品添加剂检测的最优质谱参数

Table 1 Optimum parameters and selected fragment ions for 14 food additives

序号 No	分析物 Analyte	分子式 Molecular formula	母离子 Precursor ion (m/z)	产物离子 Product ion (m/z)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞能 Collision energy (eV)
1	安赛蜜 Acesulfame	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNO <sub>4</sub> S	162.1	82.0* 78.0	-40	25 34
2	糖精钠 Sodium Saccharin	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> SNa · 2H <sub>2</sub> O	182.1	106.0* 62.0	-20	27 42
3	甜蜜素 Sodium Cyclamate	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NNaO <sub>3</sub> S	178.2	80.0* 96.0	-80	40 27
4	日落黄 Sunset Yellow FCF	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	407.1	207.1* 327.1	-152	45 30
5	诱惑红 Allura Red	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	451.2	207.1* 371.1	-80	47 32
6	红色 2G Acid Red 1	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	232.1	179.0* 291.2	-65	15 22
7	酸性红 13 Acid Red 13	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	457.1	206.8* 377.2	-130	44 34
8	三氯蔗糖 Sucralose	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	395.0	359.0* 200.1*	-100	15 21
9	阿斯巴甜 Aspartame (ASP)	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	293.2	146.1	-110	25
10	丽春红 2R Ponceau 2R	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	435.2	302.1* 355.1	-80	40 35
11	丽春红 SX Ponceau SX	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	435.2	355.1* 171.0	-80	28 35
12	丽春红 3R Ponceau 3R	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	449.2	369.2* 302.1	-80	37 39
13	纽甜 Neotame (NTM)	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	377.3	200.1* 230.4	-100	24 30
14	赤藓红 Erythrosine	C <sub>20</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	834.8	663.0* 537.0	-60	52 54

\* 定量离子(Quantifying ion)。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 流动相条件优化

文献[12]报道,采用高效液相色谱串联质谱检测葡萄酒中 5 种甜味剂时,这些甜味剂在甲醇-20 mmol/L 甲酸铵-甲酸体系的保留时间与甲醇-20 mmol/L 醋酸铵-醋酸体系一致,同时部分甜味剂的灵敏度提高了 15 倍以上,这说明甲酸铵体系可以获得比醋酸铵体系更高的灵敏度。Storm 等<sup>[16]</sup>的研究表明,溶液中的  $\text{NH}_4^+$  浓度严重影响质谱检测的灵敏度。Miniotti 等<sup>[5]</sup>的研究表明,使用乙腈分离着色剂可以获得比甲醇更好的峰对称性。因此,本研究以乙腈-20 mmol/L 甲酸铵(含 0.1% 甲酸, pH 3.9)为流动相,对所研究的 14 种食品添加剂的分离条件进行了优化,14 种添加剂可以在 6 min 内得到较好分离(见图 1)。

考察了缓冲液的浓度对添加剂的信号强度的影响。选用的甲酸铵-甲酸(pH 3.9)缓冲液的离子浓度分别为 20, 10, 5, 2.5 和 1 mmol/L。研究表明,随着缓冲液浓度的降低,溶液中的离子强度相应降低(图 2),但各添加剂的保留时间基本不变,这说明离子强度的降低并未对待分析物的分离度产生影响。然而,待分析物的峰高却显著提高(见图 3)。由于部分着色剂未实现基线分离,为避免相互间的竞争抑制效应对分析结果的影响,在此仅以 6 种甜味剂的峰高的变化对其进行表征。从图 3 可见,6 种甜味剂的信号强度随流动相离子强度的降低而不断提高,这说明过高的离子强度确实对添加剂的质谱检测有离子抑制作用。为取得最高的灵敏度,本研究选择乙腈-1 mmol/L 甲酸铵-甲酸体系作为 14 种添

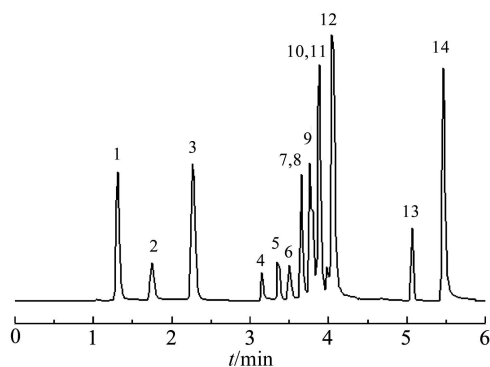


图 1 优化条件下 14 种添加剂的多反应监测色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of 14 food additives under optimum separation conditions

各编号对应分析物见表 1 (Numbers of analytes are same as in Table 1)。

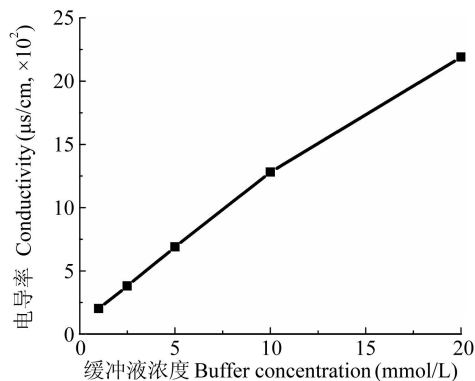


图 2 不同浓度甲酸铵缓冲液的电导率

Fig. 2 Electric conductivity of ammonium formate buffer under different concentration

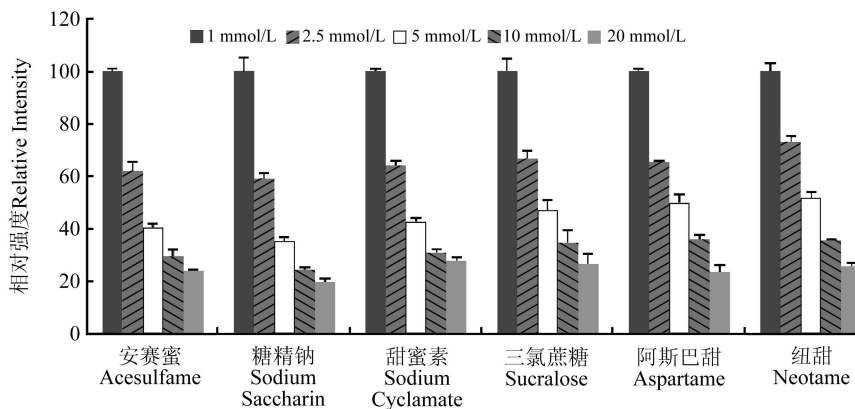


图 3 6 种甜味剂在流动相中不同离子强度下峰高比较

Fig. 3 Comparison of the effect of ammonium concentration in mobile phase on the Peak heights of 6 sweeteners

加剂的分离体系。需要说明的是, 考虑到葡萄酒中的禁用添加剂一般浓度较低, 加标分析也表明低于 1 mg/L 浓度水平的添加剂不会产生过载现象, 所以本研究选择了此浓度水平的缓冲液。在对确定含有较高浓度水平的甜味剂或是着色剂进行检测时, 则需要选择较高浓度水平的缓冲液。

### 3.2 方法线性、回收率、精密度及检出限

在上述实验条件下, 考察 14 种添加剂在 0.1~ 500 ng/L 浓度范围内的线性关系和相关系数, 并以 14 种添加剂的信噪比为 3 时的进样浓度为检出限。回收率和精密度的测定通过向阴性葡萄酒样品中添加 10 ng/L 甜味剂混合标准溶液进行, 每个浓度样品平行分析 3 次。结果见表 2。

表 2 14 种添加剂的线性范围、线性方程、相关系数、添加回收率、精密度及检出限 (n= 3)  
Table 2 Linear range, correlation coefficients, limits of detection (LOD), recoveries and relative standard deviations (RSD) of 14 food additives. The recoveries were evaluated by controlling the fortification level of each dye in negative wine samples at 10 ng/L (n= 3)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	线性范围 Linear range (ng/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(r)	检出限 LOD (ng/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, n= 3)
1	1.30	0.2~ 100	Y= 1.17E4X+ 203	0.9997	0.05	98.2	1.5
2	1.74	0.4~ 200	Y= 2.84E3X- 151	0.9995	0.1	95.4	2.0
3	2.27	0.1~ 50	Y= 4.36E4X+ 6.82E3	0.9998	0.01	96.1	0.5
4	3.15	10~ 100	Y= 265X- 809	0.9949	2.0	106	2.5
5	3.36	5~ 50	Y= 331X- 779	0.9959	1.0	100.4	3.1
6	3.50	1~ 500	Y= 733X- 257	0.9993	0.1	95.6	2.4
7	3.64	10~ 100	Y= 583X- 3.77E3	0.9955	2.0	95.7	3.1
8	3.65	50~ 500	Y= 243X+ 538	0.9994	10	96.7*	0.5
9	3.76	2~ 50	Y= 7.9E3X- 7.61E3	0.9982	0.8	103	1.9
10	3.87	1~ 500	Y= 9.23E3X- 6.98E3	0.9991	0.1	94.7	3.1
11	3.88	1~ 500	Y= 1.2E4X- 6.25E3	0.9998	0.1	97.6	2.3
12	4.06	1~ 500	Y= 3.93E3X- 1.87E3	0.9992	0.1	102	0.5
13	5.06	5~ 100	Y= 6.24E3X- 1.82E3	0.9931	0.05	95.8	1.2
14	5.47	1~ 100	Y= 1.48E3X- 2.91E3	0.9901	0.2	93.8	0.3

序号代表分析物名称同表 1 (Numbers of analytes are same as in Table 1); \* 添加浓度为 100 ng/L (Spiked concentration was 100 ng/L)。

### 3.3 方法应用

对北京市市售 10 种低价格的红葡萄酒样品进行测定, 根据各添加剂的保留时间及选择的两对子离子峰高的比值进行定性分析。结果表明, 有 5 个样品含有禁用添加物, 且均为甜味剂(表 3)。除了允许添加的三氯蔗糖外, 还含有糖精钠、甜蜜素和纽甜 3 种甜味剂(图 4)。其中对于糖精钠, 由于其定量离子和定性离子的强度相差约 60 倍, 而其在样品中的浓度又较低, 因此, 通过对其进行加标回收, 根据保留时间和回收率进行了确证。

表 3 实际葡萄酒样品的检测结果

Table 3 Quantification results of food additives in positive wine samples by UPLC-MS/MS

样品编号 Sample No.	添加剂 Additives	浓度 Concentration (ng/L)	RSD (%, n= 3)
1	糖精钠 Sodium Saccharin	8.1	3.4
	甜蜜素 Sodium Cyclamate	12.6	1.2
3	纽甜 Neotame	16.8 (mg/L)	0.4
	三氯蔗糖 Sucralose	55.8(mg/L)	0.2
6	糖精钠 Sodium Saccharin	5.2	2.1
7	糖精钠 Sodium Saccharin	4.3	5.1
10	糖精钠 Sodium Saccharin	14.0	0.6
	甜蜜素 Sodium Cyclamate	30.7	0.2

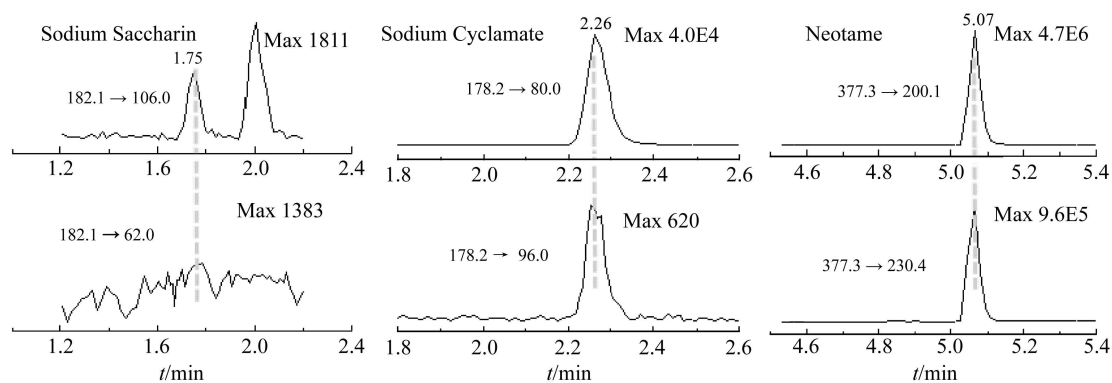


图 4 葡萄酒阳性样品色谱图

Fig. 4 Chromatograms of positive samples in wines

## References

- ZHAO Ren-Jun (赵任军). *Sino-overseas Grapevine and Wine* (中外葡萄与葡萄酒), **2006**, 2(5): 51~ 53
- XIE Ya-Li, CHEN Xi-Xin, FENG Yong, YANG Bin (谢娅黎, 陈欣欣, 冯勇, 杨彬). *Modern Food Science and Technology* (现代食品科技), **2009**, 35(12): 1482~ 1483
- GB2760-2007. *Hygienic Standards for Uses of Food Additives* (食品添加剂使用卫生标准). National Standards of the People's Republic of China (中华人民共和国国家标准). Beijing (北京): Standards Press of China (中国标准出版社), **2007**
- Minioti K S, Sakellariou C F, Thomaidis N S. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 583(1): 103~ 110
- YANG Liu-Hua, WANG Lin, SUN Cheng-Jun (杨柳桦, 王林, 孙成均). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2007**, 26(7): 79~ 82
- ZHUO Jing, WANG Jing, CHEN Xiao-Xia, TANG Xi-Hua, QIU Bin, ZHU Er-Yi, CHEN Xi (卓婧, 王静, 陈小霞, 邱彬, 朱尔一, 陈曦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2011**, 39(2): 283~ 287
- Chen Q C, Mou S F, Liu K N, Yang Z Y, Ni Z M. *J Chromatogr. A*, **1997**, 771(1): 135~ 143
- Zhu Y, Guo Y Y, Ye M L, James F S. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1085(1): 143~ 146
- Dossi N, Toniolo R, Pizzariello A, Susmel S, Perennes F, Bontempelli G. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, 601(1-2): 1~ 2
- Ryvolov M, Tlborisky P, Vlbel P, Krlensky P, Preisler J. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1141(2): 206~ 211
- SHENG Xuan, CHEN Chang-Jun, DING Zhen-Hua, SUN Jian-Wen, DING Yan-Sheng, ZHENG Ping (盛旋, 陈昌骏, 丁振华, 孙建文, 丁袁生, 郑屏). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2006**, 25(7): 75~ 78
- JI Chao, FENG Feng, CHEN Zheng-Xing, SUN Li, CHU Xiao-Gang (嵇超, 冯峰, 陈正行, 孙利, 储晓刚). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), **2010**, 28(8): 749~ 753
- QIN Fang, WANG Lin-Xiang, TAO Guan-Jun (秦昉, 王林祥, 陶冠军). *Liquor-Making Science & Technology* (酿酒科技), **2005**, 21(9): 84~ 86
- Ma M, Luo X, Chen B, Su S, Yao S. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103(1): 170~ 176
- Sun H W, Wang F C, Ai L F. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1164(1-2): 120~ 128
- Storm T, Reemtsma T, Jekel M. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 854(1-2): 175~ 185
- Holapek M, Jandera P, Zderadika P. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 926(1): 175~ 186

# Simultaneous Screening of 14 Illegal Food Additives in Wines Using Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

FENG Feng<sup>1</sup>, YANG Shuo<sup>2</sup>, LING Yun<sup>1</sup>, JIANG Gu+Bin<sup>3</sup>, CHU Xia-Gang\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123)

<sup>2</sup>(Harbin Medical University, Harbin 150081)

<sup>3</sup>(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Eco-toxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

**Abstract** An ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric (UPLC-ESI-MS/MS) method for the simultaneous screening 14 illegal food additives (acesulfame, sodium saccharin, sodium cyclamate, aspartame, neotame, sucralose, ponceau 2R, ponceau 3R, ponceau SX, sunset yellow FCF, allura red, acid Red 1, acid red 13, erythrosine) in wines has been developed. The HPLC separation was carried out using an UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm × 2.1 mm × 1.7 nm) as solid phase. Several parameters, including the compositions and ion strength of the mobile phase, and the monitor ions were optimized for improving the chromatographic performance and the sensitivity. The results demonstrated that the sensitivity could be significantly influenced by the amine concentration in the eluent. The separation could be completed in less than 6 min when using 1 mmol/L ammonium formate-formic acid buffer (pH 3.9) and acetonitrile as the mobile phases, gradient elution. The column temperature was kept at 35 °C. When the analytes were detected by ESI<sup>-</sup>MS under selected ion monitoring mode, the detection limits were 0.01–1.0 ng/L except sucralose, sunset yellow FCF, acid red 13 which were 10, 2 and 2 ng/L, respectively. The average recoveries ranged from 93.8% to 106%. The relative standard deviations were less than 3.1%. This method is rapid, accurate, highly sensitive and suitable for the quality control of low concentration and mixtures of food additives which were illegally added to wines and other foods.

**Keywords** Ultra performance liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Food additives; Wines

(Received 18 February 2011; accepted 5 May 2011)

## 《色谱在材料分析中的应用》

该书为《色谱技术丛书》之一,系统介绍了材料分析中应用的各种色谱方法与技术,内容包括气相色谱、高效液相色谱、离子色谱、凝胶渗透色谱、毛细管电泳以及一些联用技术在无机材料中的金属元素和非金属元素的分析、无机材料和高分子材料结构分析、聚合物中可挥发物质的分析、高分子材料定性定量分析以及高分子材料分子量分布分析中的应用,并综述了色谱法在材料分析中的应用进展。书中列举了大量的应用实例,便于读者在实际工作中参考。该书可供材料、冶金、高分子科学与工程、环境保护等领域中从事材料分析的技术人员参考。

该书(ISBN 978-7-122-10567-7)由化学工业出版社,胡净宇、梅一飞、刘杰民等编著,定价 42.0。