

QuEChERS 萃取-液相色谱法测定酱油和酱制品中三氯蔗糖

宋佳, 李锦清, 李聪, 周勇, 黄翠莉, 慕艳*

(广东产品质量监督检验研究院, 国家食品质量监督检验中心(广东), 广东 佛山, 528300)

摘 要 建立了 QuEChERS 萃取-液相色谱法测定酱油和酱制品中三氯蔗糖含量的分析方法。样品以乙腈作为萃取溶剂, 采用改进的 QuEChERS 方法进行萃取。以乙腈和水为流动相, C_{18} 色谱柱分离, 液相色谱-蒸发光散射检测器进行检测。三氯蔗糖在 20 ~ 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系, 相关系数(r^2) > 0.99; 3 个水平下的加标回收率为 83.2% ~ 95.4%; 相对标准偏差(RSD)为 4.1% ~ 6.3%; 方法检出限为 1 mg/kg, 定量限为 3 mg/kg; 方法简单、快速、准确可靠, 适用于酱油及酱制品中三氯蔗糖的快速检测。

关键词 QuEChERS; 酱油和酱制品; 三氯蔗糖; 蒸发光散射检测器

三氯蔗糖极易溶于水, 具有甜味纯正, 化学稳定性好, 高温下甜味不变, 甜度稳定, 无毒副作用等优点^[1-2], 广泛应用于酱油、饮料、乳制品、饮料酒^[3-4]和果酱等加工食品中, 在国内外允许使用的各种甜味剂中, 三氯蔗糖是特征性优点最多的一种。我国 GB 2760—2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》对酱油和酱制品中三氯蔗糖的允许添加量进行了规定, 规定其最大使用量不得超过 0.25 g/kg^[5]。

目前食品中三氯蔗糖检测标准有国家强制性标准 GB 22255—2014^[6] 和地方标准 DBS52/007—2014^[7]。GB 22255—2014 标准规定含有蛋白脂肪样品、酱及及酱制品、醋、酱油、饮料等样品采用填料为 *N*-乙基吡咯烷酮和二乙烯基苯亲水亲脂平衡型填料的固相萃取柱进行净化、富集, 含酒精的试样采用蒸干后用乙腈水溶液溶解的前处理方法。DBS52/007—2014 标准规定白酒样品采用水稀释后直接检测的前处理方法。另外, 国内文献报道的食品中三氯蔗糖提取方法有甲醇、乙醇或乙腈萃取法^[8-10]、固相萃取法^[11-12]、直接稀释法^[13-14]、沉淀蛋白后直接测定法^[15-18]等, 其中以固相萃取法为主, 使用的固相萃取柱有 HLB 柱^[19]、中性氧化铝柱^[20]、 C_{18} 固相萃取柱^[21]等。由于酱油、酱制品等含有大量色素, 上述的前处理方法去除色素效果并不明显, 其中 HLB 柱、 C_{18} 柱、中性氧化铝柱萃取时三氯蔗糖和大部分色素均被保留在固相萃取柱上, 并随洗脱液一起洗脱, 未能达到去除色素, 净化样品的目的。直接稀释法、甲

醇或乙腈萃取法、沉淀蛋白后直接测定法去除效果更差, 仅适用于色素含量低或不含色素的样品。大量存在的色素在检测过程中容易损坏色谱柱, 污染检测器, 甚至可能影响定性和定量, 因此有必要建立一种回收率高、净化效果好的前处理方法。

QuEChERS 法是一种广泛用于农产品检测的快速前处理技术, 对样品中的色素去除效果明显。目前, 尚未有应用 QuEChERS 法作为酱油、酱制品中三氯蔗糖的前处理方法的研究报道, 本研究将 QuEChERS 方法进行了改进, 用于萃取酱油和酱制品中三氯蔗糖, 建立的前处理方法具有简单、快速、回收率高、净化效果好、成本低等优点, 适用于大批量样品的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三氯蔗糖标准品(纯度 99.0%), 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 乙腈(分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯), 美国 TEDIA(天地)公司; NaCl、无水 MgSO_4 (分析纯), 广州化学试剂厂。

1.2 标准溶液配制

精密称取三氯蔗糖标准品约 15 mg(精确至 0.1 mg), 置于 10 mL 容量瓶中, 加入超纯水, 轻轻摇匀, 再用超纯水定容至 10 mL, 摇匀, 配得标准物质储备溶液为 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 。取适量体积三氯蔗糖标准储备溶液, 用超纯水逐级稀释配制标准工作曲线, 配制质量浓度为 20 ~ 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3 仪器与设备

LC-20A 岛津高效液相色谱仪(配置 ELSD-LT II

第一作者: 硕士, 助理工程师(慕艳高级工程师为通讯作者, E-mail: 191080053@qq.com)。

收稿日期: 2019-01-16, 改回日期: 2019-04-10

蒸发光散射检测器),日本岛津公司;Sigma 3-18K 高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;IKA 涡旋混合器,德国 IKA 公司;EYELA 旋转蒸发仪,日本东京理化公司;Milli-Q 去离子水发生器,美国 Millipore 公司;DT-502A 电子天平,常熟市金羊砝码仪器有限公司。

1.4 液相色谱条件

流动相为: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=14:86$,等度洗脱方式;色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速:1.0 mL/min;柱温:室温;进样量:20 μL;蒸发光检测器溶剂蒸发温度为 40~60 °C,雾化气体为氮气,氮气气体压力为 350~420 kPa。在本方法条件下,三氯蔗糖保留时间为 12.15 min。

1.5 前处理步骤

称取均匀酱油或酱制品 5 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 超纯水,摇匀,加入 20 mL 乙腈,涡旋 1 min,依次加入 NaCl 5 g、无水 MgSO₄ 2 g,立即剧烈涡旋 1 min,使样品变稠状,9 000 r/min 离心 2 min,将上层清液(乙腈层)转移至 125 mL 鸡心瓶中。离心管中的样品再用 20 mL 乙腈重复萃取 1 次,涡旋 1 min,9 000 r/min 离心 2 min,乙腈层合并于鸡心瓶中,50 °C 水浴旋转蒸发至干,用 1.0 mL 超纯水溶解,涡旋 30 s,加入 1.0 mL 正己烷脱脂,涡旋,静止分层,取下层水相过 0.45 μm 水系膜置于进样瓶中,用液相色谱-蒸发光散射检测器检测。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的选择

目前文献报道的前处理方法有甲醇或乙腈萃取法^[22]、固相萃取法、直接稀释法、沉淀蛋白后直接测定法等,其中以固相萃取法为主^[23-24]。由于酱油或酱制品含有较多油脂和大量的色素,上述的这些前处理方法对色素等杂质的去除效果较差,其中甲醇或乙腈萃取法、直接稀释法、沉淀蛋白后直接测定法均不能去除酱油样品中的黑色素。固相萃取法有 HLB 固相萃取柱、C₁₈ 固相萃取柱、中性氧化铝柱净化法,这些固相萃取柱能将大部分色素和目标物同时保留,同时被洗脱液洗脱,未能达到去除色素的目的,大量共存的色素在检测过程中容易损坏色谱柱,污染检测器,甚至可能影响定性和定量。

QuEChERS 法是水果蔬菜等农产品检测的快速前处理技术,对蔬菜中的色素净化效果明显。QuEChERS 法包括萃取过程和净化过程,萃取过程使用的试剂一般为乙腈、乙酸钠、无水 MgSO₄ 等,目的

是去除色素等杂质初步净化样品。净化过程使用 PSA 粉(乙二胺-*N*-丙基硅烷)、C₁₈ 粉末或两者混合,目的是进一步净化样品,适用于对样品净化要求较高的质谱检测。PSA 粉、C₁₈ 粉末价格较贵,大批量样品检测时使用量较大,检测成本高。

本研究将 QuEChERS 方法进行了改进,以乙腈作为萃取溶剂,NaCl 和无水 MgSO₄ 作为辅助萃取剂,不经过 PSA 粉或 C₁₈ 粉末的净化步骤,大大降低检测成本,同时也获得较好的回收率和净化效果。

试验比较了不加 NaCl 和无水 MgSO₄ 的情况下,样品直接用乙腈萃取,结果表明回收率仅有 50% 左右,原因是部分三氯蔗糖未被乙腈萃取,保留在水中。当仅加入 NaCl 时,由于乙腈层含有少量水,在旋转蒸发时容易暴沸,导致含量损失。样品中加入 NaCl 和无水 MgSO₄,样品中加入的 NaCl,起到盐析和降低乙腈和三氯蔗糖在水中的溶解度的作用。无水 MgSO₄ 去除乙腈中水分,与 NaCl 盐析作用相配合,使乙腈对三氯蔗糖的萃取回收率达到 80% 以上。则可去除乙腈中的水分,避免暴沸的同时提高了回收率和净化效果。对比使用 C₁₈ 固相萃取柱法、HLB 固相萃取柱法、中性氧化铝柱法提取三氯蔗糖的效果。刘芳等^[21]使用 C₁₈ 固相萃取柱法提取不同状态食品中的三氯蔗糖,样品平均回收率为 85.6%~108.2%;在 HLB 固相萃取柱法方面,赵贞等^[19]在乳制品中所得回收率为 94.6%~101.3%。此外,张伟清等^[25]使用中性氧化铝柱在酱油及酱制品测定三氯蔗糖回收率为 85.2%~108.8%。由于酱油或酱制品含有大量的色素与杂质,张伟清等^[25]研究发现以 3 000 r/min 处理后所得试液仍难以通过中性氧化铝柱,故使用固相萃取柱对样品处理要求高,且除色素效果不佳。而 QuEChERS 在去除色素效果显著,操作简单,回收率也可达 83.2%~95.4%,与固相萃取法相当。

2.2 线性范围和检出限

在优化的检测条件下,采用不含三氯蔗糖的酱油和酱制品样品添加标准物质方式考察本方法的检出限。结果表明,酱油和酱制品样品中三氯蔗糖的方法检出限(LOD)为 1 mg/kg,定量限(LOQ)为 3 mg/kg,低于 GB 22255—2014 标准的检出限(2.5 mg/kg)和定量限(7.5 mg/kg)。本方法三氯蔗糖的指数拟合线性范围为 20~1 500 μg/mL,指数拟合线性方程为 $Y=0.745X \times e^{-3.826}$,相关系数为 $r^2=0.998$ 。

2.3 加标回收率及精密度

采用不含三氯蔗糖的酱油和酱制品样品添加标

准物质的方式考察方法的回收率和精密度。分别添加3个水平标准物质,添加水平为4、100、250 mg/kg (MRL),每个水平平行测定6次。三氯蔗糖的平均回收率为83.2%~95.4%,精密度(RSD)为4.1%~6.3%,结果表明,建立的前处理方法具有较好的回收率和精密度。回收率和精密度数据见表1。

表1 不同样品中三氯蔗糖的加标回收率与
相对标准偏差($n=6$)

Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs)
of sucralose in different samples

序号	样品名称	添加水平/(mg·kg ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
1	酱油	4	83.2	5.7
		100	91.3	4.3
		250	95.4	4.1
2	酱制品	4	84.6	6.3
		100	92.8	4.9
		250	93.5	5.3

图1为空白酱油样品(不含三氯蔗糖的样品)的色谱图,图2为空白酱油样品添加标准品(100 mg/kg)的色谱图。比较图1和图2可知,在三氯蔗糖出峰时间附近无干扰峰,说明建立的前处理方法净化效果良好,有效去除杂质干扰。

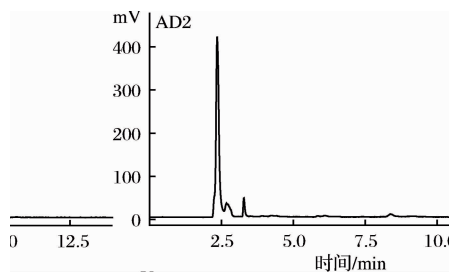


图1 空白酱油样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank sample

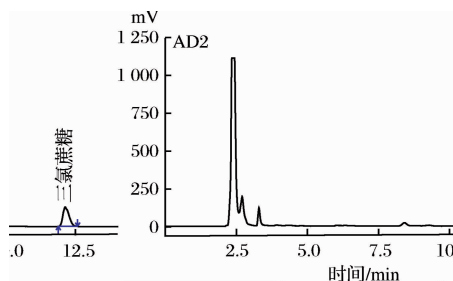


图2 空白酱油样品添加标准品(100 mg/kg)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of spiked blank sample

2.4 实际样品检测

从市场上购买40份酱油和35份酱制品,按照本方法进行检测,酱油中检出添加三氯蔗糖的样品9

份,占酱油抽样总数的22.50%;酱制品中检出添加三氯蔗糖的样品3份,占酱制品抽样总数的8.57%。在抽检的酱油和酱制品中,标签标识含有三氯蔗糖的样本均有检出,未标识含有三氯蔗糖的样本均低于方法检出限,检测添加三氯蔗糖的样品均符合GB 2760—2014最大用量为0.25 g/kg的限量要求。

验证本研究建立的前处理方法的可靠性,采用GB 22255—2014标准对上述含有三氯蔗糖的酱油或酱制品进行检测,结果表明,2种方法的三氯蔗糖检测结果的相对标准偏差不超过10%。相同样品含量及加标回收率见表2。

表2 相同样品中三氯蔗糖的含量与加标回收率

Table 2 The content and recovery of sucralose
in the same sample

预处理	平均测定含量/(mg·kg ⁻¹)	加标回收率/%
1	38.5	85.1
2	36.6	88.5

注:预处理1方法为GB 22255—2014法;预处理2方法为QuEChERS法。

本研究建立的前处理方法与国标前处理法相比,对经济成本上而言,由于QuEChERS前处理方法未使用Hilb柱,节约了实验成本;从效率上考虑,QuEChERS前处理方法操作更加简单快速,效率更高,有益于大规模分析检测。同时,国标法所得待测液,颜色深,受色素影响较大,样品基质效应影响较强。

3 结论

方法学验证和实际样品检测的结果表明本研究针对酱油及酱制品的特点,建立的改进型QuEChERS前处理方法,具有简单、快速、回收率高、净化效果好、成本低等优点,适用于大批量样品的快速检测,可作为企业在生产过程中的质量监控方法。

参考文献

- [1] KNIGHT I. The development and applications of sucralose: a new high-intensity sweetener [J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1994, 72(4): 435–439.
- [2] 高金燕, 陈红兵. 三氯蔗糖在无糖巧克力和口香糖中的应用[J]. 食品工业, 2004, 6(5): 5–6.
- [3] 戴琴, 毛锐, 王艳, 等. UPLC-MS/MS法同时检测配制酒中8种甜味剂[J]. 食品工业, 2018, 39(6): 323–326.
- [4] 刘刚, 雷激, 钟红霞, 等. 高效液相色谱蒸发光散射法测定白酒中8种甜味剂的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(7): 300–304.
- [5] 国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014, 食品安全

- 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.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会. GB 22255—2014, 食品安全国家标准食品中三氯蔗糖(蔗糖素)的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [7] DBS52/ 007—2014, 食品安全地方标准白酒中甜蜜素、糖精钠、安赛蜜和三氯蔗糖四种甜味剂的测定方法液相色谱-串联质谱法[S]. 贵州:贵州省卫生和计划生育委员会,2015.
- [8] 张伟清,张玉婷,曹进,等. 酱油及酱制品中三氯蔗糖的测定[J]. 食品科学,2013,34(20):237-240.
- [9] 陈晓霞,游景水,杨祖伟. 高效液相色谱法测定保健食品中三氯蔗糖的含量[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(5):1 883-1 888.
- [10] 王丽兰. 高效液相色谱-ELSD 法检测泡菜中三氯蔗糖的含量[J]. 中国调味品,2018,43(11):154-156.
- [11] 周莉莉,杨颖,刘艳明,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的三氯蔗糖[J]. 分析测试学报,2011,30(10):1 175-1 178.
- [12] 邹沫君,陈艳,肖燕. HPLC 检测饮料中三氯蔗糖的含量[J]. 饮料工业,2017,20(5):5-8.
- [13] 倪炜华,郑丹. LC-MS 法测定饮料中的三氯蔗糖[J]. 中国食品添加剂,2011(2):235-238.
- [14] 黄志勇,陈艳,冯慧,等. 乙酸酐衍生 GC-ECD 法测定饮料中三氯蔗糖含量[J]. 食品科学,2016,37(14):203-206.
- [15] 韩秋珍,周芳梅. HPLC-ELSD 法测定蛋白粉中三氯蔗糖的含量[J]. 现代食品,2016(13):90-93.
- [16] 顾晔,詹晟. 液态奶、乳饮料及复合蛋白饮料中三氯蔗糖含量的快速检测法[J]. 轻工科技,2016,32(8):7-8.
- [17] 周松海. 液态奶和乳饮料中三氯蔗糖含量的测定[J]. 现代食品,2017(14):125-128.
- [18] 梁桂娟,寻思颖,李清伟,等. 高效液相色谱-质谱联用法测定酱油中三氯蔗糖的不确定度评估[J]. 中国酿造,2016,35(8):66-68.
- [19] 赵贞,刘丽君,李素琴,等. 高效液相色谱法测定乳制品中三氯蔗糖的含量[J]. 乳业科学与技术,2017,40(1):16-18.
- [20] 戴承兵,熊丽蓓,何倩琼. 中性氧化铝固相萃取柱在三氯蔗糖测定中的应用[J]. 上海预防医学杂志,2006,18(1):21-22.
- [21] 刘芳,王彦,王玉红,等. 固相萃取-高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时检测食品中5种人工合成甜味剂[J]. 色谱,2012,30(3):292-297.
- [22] 马思娜,邓垦. 高效液相色谱法测定酱油、蚝油中三氯蔗糖的含量[J]. 现代食品科技,2009,25(8):982-984.
- [23] 杜彦山,杨刚,夏静,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定乳制品中三氯蔗糖[J]. 乳业科学与技术,2013,36(2):27-29.
- [24] 孙晓娟,李彦博,高广慧. 蒸发光散射检测器和示差检测器应用于食品中三氯蔗糖测定的比较[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(19):94-98.
- [25] 张伟清,张玉婷,曹进,等. 酱油及酱制品中三氯蔗糖的测定[J]. 食品科学,2013,34(20):237-240.

Determination of sucralose in soy sauce and sauce products using QuEChERS extraction and high-performance liquid chromatography

SONG Jia, LI Jinqing, LI Cong, ZHOU Yong, HUANG Cuili, QI Yan*

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, China National Quality Supervision and Testing Center for Foods (Guangdong), Foshan 528300, China)

ABSTRACT This study established a method based on QuEChERS extraction and HPLC to determine sucralose in soy sauce and sauce products. The samples were extracted with acetonitrile by improved QuEChERS method, followed by C_{18} column separation using acetonitrile and water as the mobile phase. The samples were detected by HPLC coupled with an evaporative light-scattering detector. A good linearity was obtained in the range of 20-1 500 $\mu\text{g/mL}$ sucralose with correlation coefficients (r^2) greater than 0.99. Moreover, the mean recovery rate was 83.2%-95.4%, the RSD was 4.1%-6.3%, the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 1 mg/kg and 3 mg/kg, respectively. This method was simple, rapid, accurate and reliable, therefore, it is suitable for rapid determination of sucralose in soy sauce and sauce products.

Key words QuEChERS; soy sauce and sauce products; sucralose; evaporative light-scattering detector