DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250911003
引用格式: 刘芸, 张晓燕, 柳菡, 等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时测定巧克力中 9 种禁限用甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(3): 326–334.
LIU Y, ZHANG XY, LIU H, *et al*. Simultaneous determination of 9 kinds of prohibited and restricted sweeteners in chocolate by high performance liquid chromatography-quadrurpole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(3): 326–334. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时测定巧克力中 9 种禁限用甜味剂

刘　芸[#], 张晓燕[#], 柳　菡, 殷　耀[*], 李青飞, 赵晓霞, 倪家玮, 刘　莹

(南京海关动植物与食品检测中心, 南京　210001)

摘　要: 目的　建立高效液相色谱-四级杆/静电场轨道肼高分辨率质谱法同时测定巧克力中 9 种甜味剂(纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、爱德万甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、三氯蔗糖和甜菊糖苷)的方法。**方法**　巧克力样品经 1 mol/L 盐酸在 60 ℃条件下水解 1 h 后, 过 HLB 固相萃取柱, 洗脱液氮吹后, 用水溶解残渣并定容至 1.0 mL, 充分涡旋混合后过 0.45 μm 滤膜。采用 Phenomenex C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm)色谱柱进行分离, 以乙腈-水溶液为流动相进行梯度程序洗脱。质谱采用负离子模式, 扫描范围: 100~1000 *m*/*z*, 二级采用 fullMS-ddMS 扫描模式, 外标法定量。**结果**　在所建立的色谱条件下, 9 种甜味剂能够得到较好的分离。9 种甜味剂的检出限均为 7.0 μg/kg, 定量限均为 20.0 μg/kg, 在 20~200 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99。通过加标验证, 3 个添加水平的平均回收率范围为 75.3%~110.2%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 3.2%~9.2%。**结论**　该方法样品前处理高效、快速, 可以用于高通量测定巧克力中 9 种甜味剂。该方法的建立为食品中甜味剂的痕量检测提供了可靠而准确的技术手段, 对规范食品添加剂在食品中的使用行为具有重要意义。

关键词: 甜味剂; 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道肼高分辨率质谱法; 巧克力

Simultaneous determination of 9 kinds of prohibited and restricted sweeteners in chocolate by high performance liquid chromatography-quadrurpole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry

LIU Yun[#], ZHANG Xiao-Yan[#], LIU Han, YIN Yao[*], LI Qing-Fei, ZHAO Xiao-Xia, NI Jia-Wei, LIU Ying

(*Animal*, *Plant and Food Inspection Center*, *Nanjing Customs*, *Nanjing* 210001, *China*)

收稿日期: 2025-09-11
基金项目: 南京海关科研项目(2024KJ25)
#刘芸和张晓燕为共同第一作者
第一作者: 刘芸(1985—), 女, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品农兽药残留分析和食品掺假鉴别研究。E-mail: 412502603@qq.com
张晓燕(1981—), 女, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全和质量控制。E-mail: zhangxiaoyan@163.com
***通信作者:** 殷耀(1986—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品农兽药残留分析和食品掺假鉴别研究。E-mail: yinyao2300@126.com

ABSTRACT: Objective　To establish a method for the simultaneous determination of 9 kinds of sweeteners (neotame, aspartame, alitame, aspartame, sodium cyclamate, acesulfame potassium, saccharin sodium, sucralose and stevioside) in chocolate by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital hydrazine high resolution mass spectrometry. **Methods**　The chocolate samples were hydrolyzed with 1 mol/L hydrochloric acid at 60 ℃ for 1 h, then passed through an HLB solid-phase extraction column. The eluate was nitrogen-blown, and the residue was dissolved in water and made up to 1.0 mL. After thorough vortex mixing, it was filtered through a 0.45 μm filter membrane. Separation was performed on a Phenomenex C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm) chromatographic column using a gradient elution program with acetonitrile-water solution as the mobile phase. Mass spectrometry was conducted in negative ion mode, with a scanning range of 100–1000 *m*/*z*. The secondary scan mode was fullMS-ddMS, and quantification was carried out by the external standard method. **Results**　Under the established chromatographic conditions, 9 kinds of sweeteners could be well separated. The limits of detection for the 9 kinds of sweeteners were 7.0 μg/kg, and the limits of quantitation were 20.0 μg/kg. The linear relationship was good within the concentration range of 20–200 ng/mL, and the correlation coefficients were all greater than 0.99. Through spiked verification, the average recovery range of the 3 levels was in the range of 75.3%–110.2%, with a relative standard deviations in the range of 3.2%–8.9%. **Conclusion**　This method is efficiency and rapid for sample pretreatment. It can be used for high-throughput determination of 9 kinds of sweeteners in chocolate. The established method provides a reliable and accurate technical means for trace detection of sweeteners in food, and is of great significance for regulating the use of food additives in food.

KEY WORDS: sweeters; high performance liquid chromatography-quadrurpole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry; chocolate

0　引　言

随着人们食品健康和食品安全意识的提高, 消费者对食品添加剂的关注点也在不断增加。甜味剂作为一类常见的用于替代糖分的食品添加剂, 具有较高的甜度和较低的热量, 深受消费者的喜欢, 但其安全性问题也一直备受关注。近年来, 滥用食品甜味剂的食品安全事件频发[1–3]。大部分甜味剂主要是通过人工合成的, 如阿斯巴甜、三氯蔗糖、糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、阿力甜、纽甜等[4–5]。巧克力及其制品企业中某些无良厂家为了降低成本、使产品有更好的口感, 不惜违规滥用甜蜜素等人工合成甜味剂[6], 直接危害消费者的利益。通常情况下, 产品按照规定使用甜味剂对人体健康基本无害。然而, 过量或不适当使用甜味剂可能导致一定的副作用, 引发一系列健康问题。近年来研究发现, 长期大量摄入甜味剂可能会增加肥胖风险、影响血糖控制致、损害肝脏、诱发龋齿等疾病[7–9]。

GB 2760—2024《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定了各类食品中允许使用的添加剂种类和限量。巧克力及其制品中允许使用的甜味剂有纽甜、阿斯巴甜、爱得万甜和甜菊糖苷, 且每种甜味剂的最大使用限量均不同, 具体如表 1 所示。阿力甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠和三氯蔗糖这 5 种甜味剂属于禁用物质, 不允许在巧克力及其制品中添加和使用。且国家标准中规定了每种甜味剂的检测方法, 但目前尚无同时检测 9 种甜味剂的标准方法。因此建立同时检测巧克力制品中 9 种甜味剂的方法对于标准方法的制定具有指导意义。

目前, 文献报道的食品中甜味剂的检测方法主要有液相色谱法[10–12]和液相色谱-串联质谱法[13–16]。液相色谱法存在基质干扰强、分析时间长、检测灵敏度低、不能用于方法确证等多种问题, 而液相色谱-质谱法可以弥补液相色谱方法的不足, 可以同时检测多种分析物质[17–20]。也有文献报道了香肠、发酵面制品、茶饮料、水果和酒等基质中甜味剂的检测方法[21–27], 但针对巧克力基质中甜味剂的检测方法还鲜见报道。对于高糖高脂肪样品的前处理方法, 标准或者文献[28–30]中绝大部分采用溶剂提取直接进样, 也有过 HLB 固相萃取柱或者 C_{18} 固相萃取柱的前处理方式。直接提取进样明显会引入更多杂质, 影响结果准确性, 需要进一步前处理净化基质以达到满意的结果。因此, 本研究采用高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱仪, 通过 HLB 固相萃取小柱净化, 建立了一种同时测定巧克力中纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、爱德万甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、三氯蔗糖、甜菊糖苷等 9 种甜味剂的定性定量方法, 以期为巧克力产品的市场监督抽检及风险评估提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

巧克力样品共计 20 份, 黑巧克力、白巧克力、干果巧克力、牛奶巧克力各 5 份, 分别购于南京市各大超市和企业送检样品。

表 1 甜味剂的使用规定及标准方法

Table 1 Regulations and standard methods for the use of sweeteners

目标物	GB 2760—2024 的规定	检测标准	方法	前处理方法
纽甜	最大使用量 0.1 g/kg	GB 5009.247—2016《食品安全国家标准 食品中纽甜的测定》	液相色谱法	甲酸和三乙胺提取、过 C_{18} 柱
阿斯巴甜	最大使用量 3.0 g/kg	GB 5009.263—2016《食品安全国家标准 食品中阿斯巴甜和阿力甜的测定》	液相色谱法	水提取、正己烷脱脂
阿力甜	禁用	GB 5009.263—2016	液相色谱法	水提取、正己烷脱脂
爱德万甜	最大使用量 0.0005 g/kg	BJS 202201《食品中爱德万甜的测定》	液相色谱-质谱法	乙腈提取、加 C_{18} 粉末
甜蜜素	禁用	GB 5009.97—2023《食品安全国家标准 食品中环己基氨基磺酸盐的测定》	液相色谱法/液相色谱-质谱法	水提取、衍生
安赛蜜	禁用	GB 5009.140—2023《食品安全国家标准 食品中乙酰磺胺酸钾的测定》	液相色谱法	水提取、亚铁氰化钾/乙酸锌沉蛋白或中性氧化铝固相萃取柱
糖精钠	禁用	GB 5009.28—2016《食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》	液相色谱法	水提取、正己烷脱脂
三氯蔗糖	禁用	GB 5009.298—2023《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/液相色谱-质谱法	甲醇-水提取、过 HLB 柱
甜菊糖苷	最大使用量 0.83 g/kg	SN/T 3854—2014《出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定 高效液相色谱法》	液相色谱法	0.1%甲酸的乙腈水溶液超声

纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、爱德万甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、三氯蔗糖、甜菊糖苷共 9 种甜味剂的标准品(纯度均大于等于 99.5%, 天津阿尔塔科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津科密欧公司); 甲酸铵(色谱纯, 南京化学试剂股份有限公司); 盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 试验用水均为超纯水(自制)。

1.2 仪器与设备

Dionex 3000 高压液相色谱-Q-Exactive 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪、HERAEUS Multifuge X1R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KH-500B 超声波仪(昆山禾创超声仪器有限公司); WH-86 型涡旋混合器(太仓华利达实验室设备公司); SMATR 高纯水发生器(上海和泰仪器有限公司); PB-20 水浴控温振荡器(上海珂淮仪器有限公司); Auto Vap s60 氮吹仪(美国 ATR 公司); HLB 固相萃取柱(规格为 3CC, 60 mg, 美国沃特世科技有限公司); C_{18} 固相萃取柱(规格为 3 mL, 500 mg, 上海安谱实验科技股份有限公司); Phenomenex C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm, 美国 Phenomenex 公司); MSE 125P 分析天平[感量 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 标准溶液的配制

标准储备液(1 mg/mL): 分别称取纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、爱德万甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、三氯蔗糖和甜菊糖苷 9 种标准品各 10.00 mg(精确至 0.01 mg), 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液, 于 4 ℃冰箱中保存, 有效期 6 个月。

标准中间溶液(1 μg/mL): 分别移取上述标准储备溶液各 100 μL 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容, 制得质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准中间溶液。

标准工作溶液: 吸取标准中间溶液体积分别为 5、10、20、50、100、200 μL, 用水稀释并定容至 1 mL, 配成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的系列标准溶液, 现用现配。

1.4 样品前处理

称取 1.0 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液, 涡旋混合后, 放入 60 ℃±2 ℃的水浴振荡器中水解 1 h。水解结束后, 将水解液冷却至室温, 加入 5 mL 水, 混匀, 以 8000 r/min 离心 3 min, 收集上清液待用。

净化: C_{18} 固相萃取小柱使用前依次用 10 mL 甲醇、10 mL 水通过, 静置活化 30 min。取全部上清液过柱, 弃去流出液。加入 10 mL 超纯水淋洗, 弃去淋洗液。量取 10 mL 甲醇洗脱, 并收集洗脱液至氮吹管中。在氮吹仪中吹干后, 用 1.0 mL 的水溶解样品管中剩余的残渣, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 供仪器测试; HLB 固相萃取小柱使用前依次用 10 mL 甲醇、10 mL 水通过, 静置活化 30 min。取全部上清液过柱, 弃去流出液。加入 10 mL 超纯水淋洗, 弃去淋洗液。量取 10 mL 甲醇洗脱, 并收集洗脱液至氮吹管中。在氮吹仪中吹干后, 用 1.0 mL 的水溶解样品管中剩余的残渣, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 供仪器测试。

1.5 实验方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm); 柱温: 25 ℃; 进样量: 5 μL; 流动相: A 相为水; B 相为乙

腈; 流速: 0.6 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 5% B; 1.5~5.0 min, 5%~95% B; 5.0~8.5 min, 95% B; 8.5~9.0 min, 95%~5% B; 9.0~10.0 min, 5% B。

1.5.2　质谱条件

可加热的电喷雾离子源; 毛细管温度为 320 ℃, 鞘气(N_2)流速 50 L/min, 辅助气(N_2)流速 15 L/min, 吹扫气(N_2)流速 2 L/min; 采用负离子扫描模式; 全扫描的分辨率 *R*=70000, 扫描范围: 100~1000 *m*/*z*, 二级采用 fullMS-ddMS 扫描模式, 分辨率 *R*=35000。其他参数如表 2 所示。

1.6　数据处理

所有表格和图均采用 Office 2024 版本自带的 Word(版本号: 14.0.7268.5000)、Excel(版本号: 14.0.7268.5000)完成; 数据均采用 6 平行。

2　结果与分析

2.1　仪器条件的优化

2.1.1　质谱条件的优化

采用流动注射的方式, 将质量浓度为 1 μm/mL 的 9 种甜味剂的单个标准溶液打入质谱, 分别进行一级质谱全扫描, 并根据母离子的响应强度选择合适的离子扫描模式。结果发现, 安赛蜜和糖精钠在正离子扫描时完全没有母离子信号, 当切换为负离子扫描时才出现了母离子, 这与分子结构有关(如图 1 所示), 离子化后带负电荷; 甜蜜素虽然也容易电离, 但分子中含有杂原子氮, 使得在正离子模式下有微弱的响应, 但在负离子模式下响应更高; 其他 6 种化合物在正负离子模式下均有响应, 且响应值在负离子模

表 2　9 种甜味剂的质谱参数

Table 2　Mass spectrometry parameters of the 9 kinds of sweeteners

目标物	保留时间/min	母离子(*m*/*z*)	碰撞能/V	子离子*(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)
纽甜	5.55	377.20859	25	200.07098	301.19226
阿斯巴甜	4.82	293.11533	40	200.07144	261.08875
阿力甜	4.92	330.14963	20	312.13919	295.11218
爱德万甜	5.31	457.19965	20	200.07135	337.19370
甜蜜素	6.98	178.05344	40	79.95583	158.93745
安赛蜜	6.97	161.98578	15	82.02844	77.96411
糖精钠	7.12	181.99103	35	105.95900	81.95184
三氯蔗糖	4.87	395.00821	25	302.90475	206.91644
甜菊糖苷	5.16	803.37069	35	479.26584	317.21271

注: *为定量离子。

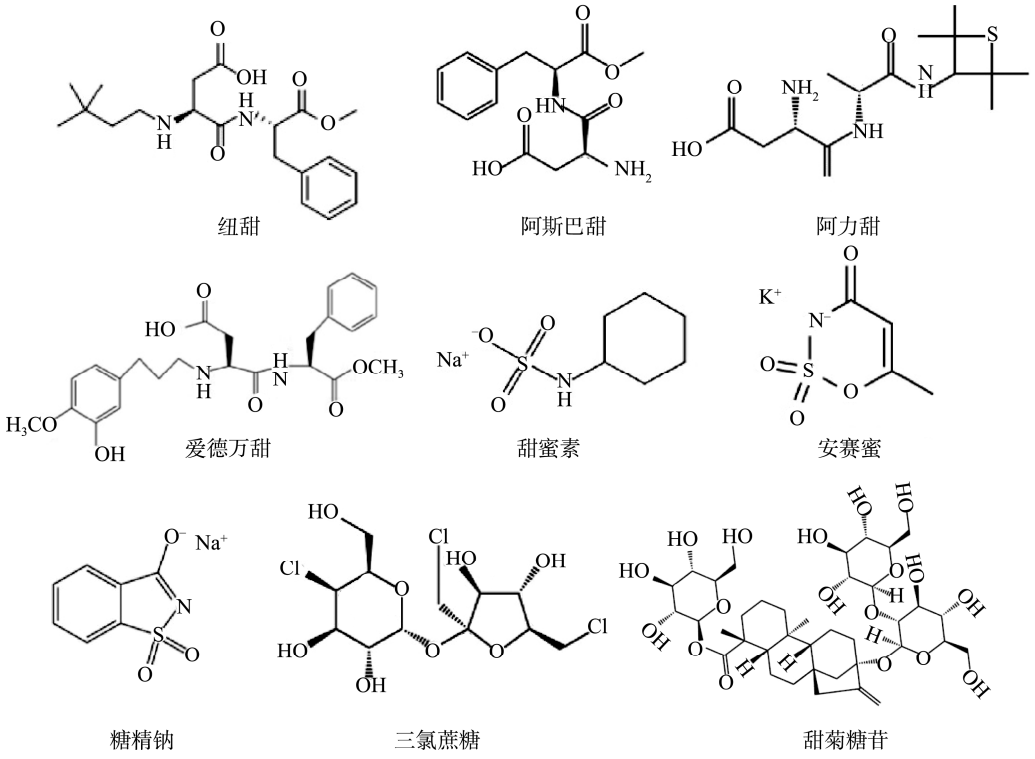


图 1　9 种甜味剂的结构

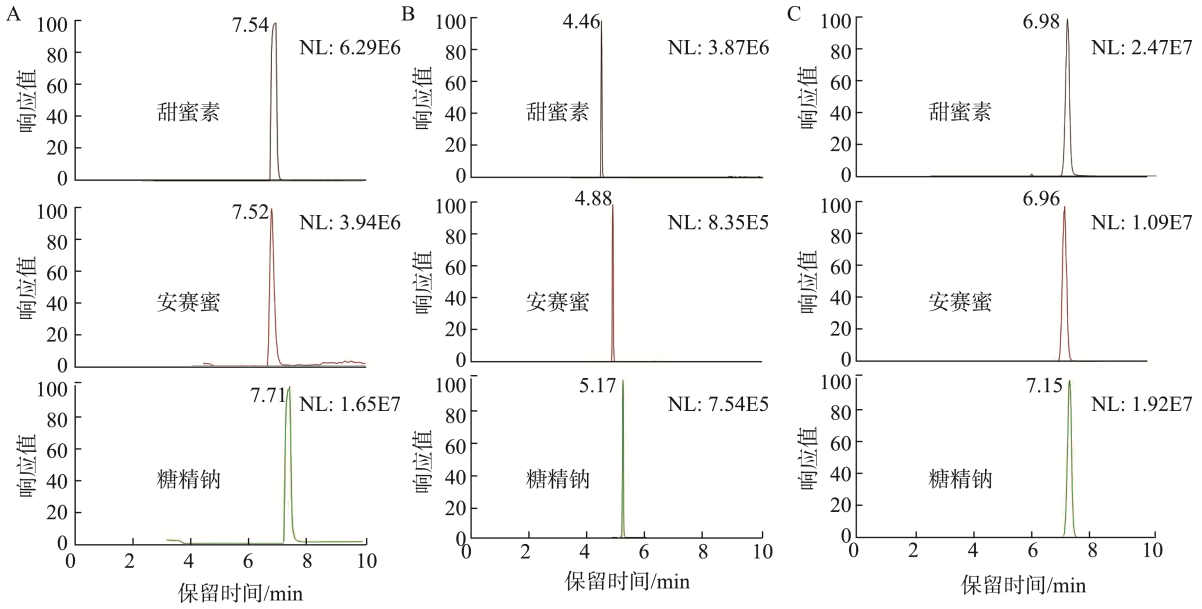
Fig.1　Structure of 9 kinds of sweeteners

式时均较强。仪器在正负离子同时扫描时，可能会存在扫描点数过少的情况，影响灵敏度。因此，最终 9 种化合物均选择负离子模式下分析。继而进行二级质谱条件优化，通过确定的母离子，利用碰撞电压对其进行轰击，选取相对强度较高的两个离子作为定性定量离子。最终确定的质谱参数如表 2 所示。

2.1.2 色谱条件的优化

通过对 9 种甜味剂的化学结构进行分析(图 2 所示)，分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-2 mol/L 乙酸铵为流动相进行分析研究。在不同流动相下的提取色谱图如图 2 所示。结果发现甲醇-水做流动相时，甜蜜素、安赛蜜和糖精钠峰形较差，换做乙腈-水做流动相后，这 3 种物质峰形明显改善。又比较了乙腈-水和乙腈-2 mol/L 乙酸铵对目标物分析的影响，发现当选用乙酸铵做流动相后，甜蜜素和糖精钠两个化合物的峰形会稍微改善，但目标物的响应值均降低 1~2 个数量级。

综合考虑后，最终选用乙腈-水做为流动相，甜蜜素和糖精钠的峰形虽然不如乙腈-2 mol/L 乙酸铵流动相时半峰宽小，但也在可以接受范围内。而且乙腈-水作为流动相时，所有化合物的质谱响应值较高，会明显提高检测灵敏度。在最终优化的色谱条件下，9 种目标物的提取离子流图如图 3 所示。



注: A. 甲醇-水; B. 乙腈-2 mol/L 乙酸铵; C. 乙腈-水。NL 为归一化响应水平(normalized response level)。

图 2 不同流动相下的色谱图

Fig.2 Chromatograms under different mobile phases

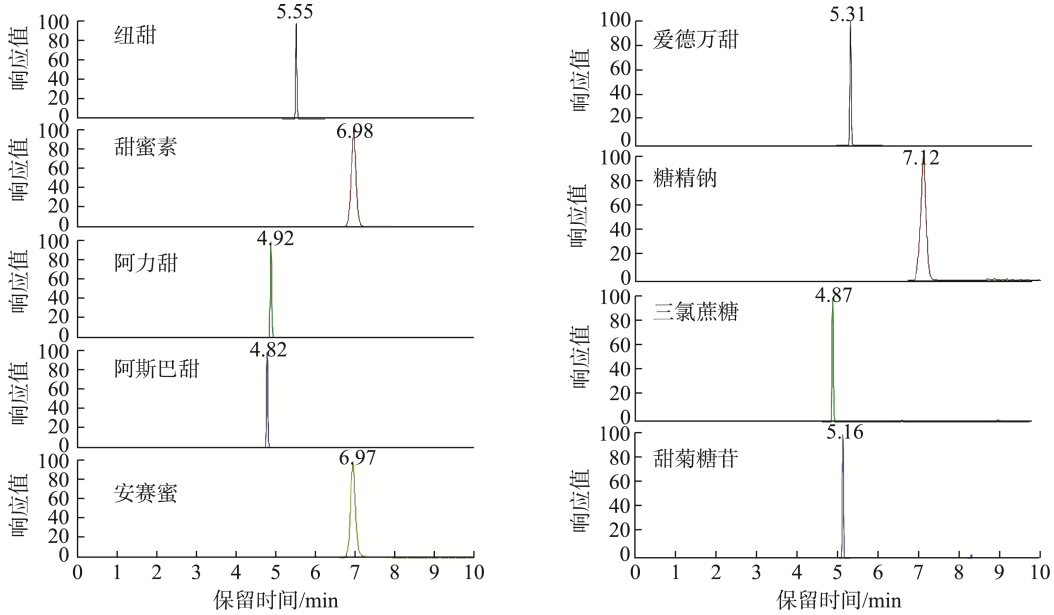


图 3 9 种甜味剂在优化条件下的色谱图

Fig.3 Chromatograms of 9 kinds of sweeteners under optimized conditions

2.2　前处理条件的优化

巧克力中含有较多糖类和可可脂类, 用水直接提取, 巧克力容易结块, 成颗粒渣状。巧克力中可可脂的熔点约为 34~38 ℃, 当超声温度升至 40 ℃时, 可观察到可可脂慢慢溶解; 当温度在 40 ℃时, 超声 0.5 h 后, 发现巧克力溶解成咖啡色液体。但当温度降低时, 巧克力又会凝固, 上层析出固体可可脂, 下层为咖啡色粘稠溶液。下层溶液中由于含有较多糖类, 无法通过 0.45 μm 的尼龙滤膜。因此考虑先对巧克力样品进行水解, 水解后再进行提取。

2.2.1　水解试剂和浓度的选择

考察了 5 mL 1 mol/L 盐酸溶液和 5 mL 1mol/L NaOH 溶液对巧克力的水解差异。选择黑巧克力样品作为研究对象, 在 60 ℃条件下, 水浴振荡水解 1 h 后, 加入 5 mL 水定容。水解液离心后发现, 经盐酸水解的巧克力样品颜色较浅, 经氢氧化钠水解的巧克力颜色较深。且在碱性条件下, 巧克力并未水解完全, 冷却后仍有少量可可脂析出。因此选用盐酸作为水解试剂。

考察 5 mL 盐酸浓度分别为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 mol/L 时, 在 60 ℃左右条件下水解 1 h 的效果。发现随着盐酸浓度增加, 9 种甜味剂的回收率整体上逐渐提高, 当使用 1.0 mol/L 盐酸进行水解时, 回收率范围可达 89%~96%, 具体结果见表 3; 当盐酸浓度大于 1.0 mol/L, 9 种甜味剂的回收率不再明显增加。因此最终选用 1.0 mol/L 盐酸做为水解试剂。

表 3　盐酸浓度的优化

Table 3　Optimization of hydrochloric acid concentration

化合物	回收率/%				
	0.2 mol/L	0.5 mol/L	0.8 mol/L	1.0 mol/L	1.5 mol/L
纽甜	33.5	50.4	76.8	94.2	94.0
阿斯巴甜	35.6	51.7	82.7	93.3	91.9
阿力甜	20.4	42.6	80.0	89.0	89.2
爱德万甜	37.3	48.9	77.4	92.1	92.8
甜蜜素	29.5	42.6	76.5	86.3	86.7
安赛蜜	48.1	62.8	81.4	89.1	89.3
糖精钠	36.6	60.5	84.5	90.7	91.8
三氯蔗糖	28.9	45.9	76.8	92.6	92.3
甜菊糖苷	32.6	53.6	78.9	95.7	95.8

2.2.2　水解温度和水解时间的选择

考察温度对巧克力样品水解效果的影响, 以加标回收率为评价指标。选择了 20、40、60、80 ℃条件下对样品使用 5 mL 1 mol/L 盐酸水解 1 h 的影响, 结果表明, 随着温度升高, 9 种甜味剂的回收率逐渐增加, 当达到 60 ℃后, 回收率不再明显增加。因此, 选择 60 ℃作为酸水解的温度。

本研究也考察了水解时间的影响, 考察了 60 ℃下对巧克力样品使用 5 mL 1 mol/L 盐酸, 分别水解 15、30、45、60、75 min 的影响, 结果表明, 随着水解时间的增加, 9 种甜味剂的回收率随之提高, 当水解时间为 60 min 时, 回收率均能达到 80%以上。因此, 选择 60 min 作为水解时间。

2.2.3　固相萃取柱的选择

9 种甜味剂均属于极性化合物, 本研究中比较了常用的前处理柱子 HLB 固相萃取柱和 C_{18} 固相萃取柱的效果, 以加标量 100 μg/kg 的回收率作为评价指标。结果如图 4 所示, HLB 固相萃取柱能有效去除杂质的干扰, 对所有甜味剂的回收率更高。虽然 C_{18} 固相萃取柱对安赛蜜和甜蜜素的选择性最强, 但 HLB 固相萃取柱适用的 pH 范围更宽, 对极性化合物都有更好的保留。由于 9 种甜味剂的极性差异较大, 因此也更适合用 HLB 固相萃取柱进行分析。用水进行淋洗、甲醇洗脱就能取得较好的效果, 回收率在 80%以上。

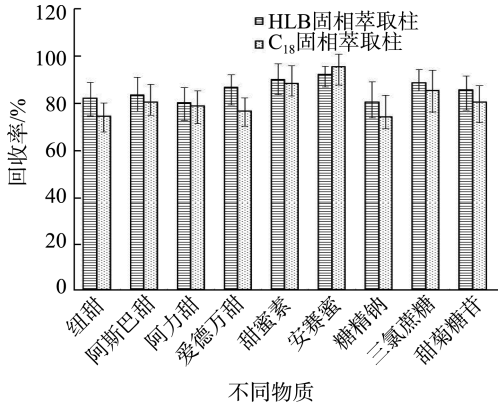


图 4　不同固相萃取小柱对甜味剂的回收率差异

Fig.4　Differences in recovery rates of sweetener with different solid-phase extraction columns

2.3　方法学评价

2.3.1　线性范围及检出限

配制标准工作溶液, 对 9 种甜味剂进行测定, 采用

外标法定量。以各标准物质的质量浓度为横坐标(X, ng/mL)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。可以看出, 9 种甜味剂在 20~200 ng/mL 范围内的线性关系良好, 相关系数(r^2)大于 0.99。以信噪比为 3 和 10 分别为检出限和定量限。选择空白巧克力, 对检出限和定量限浓度下的信噪比进行验证, 检出限均为 7.0 μg/kg, 定量限均为 20.0 μg/kg, 9 种甜味剂的信噪比均满足要求。具体结果如表 4 所示。信噪比的满足表明该方法能够在实际样品中准确地检测和定量这些甜味剂, 可以确保分析方法的灵敏度和可靠性。

2.3.2 回收率和精密度

选取空白的两种巧克力样品进行添加回收和精密度实验, 根据 GB 27404—2008《实验室质量控制规范》中选取定量限、中间浓度和残留限量 3 个浓度水平进行加标实验, 每个水平重复测定 6 次。在 9 种添加剂中, 有限量要求的有纽甜、阿斯巴甜、爱德万甜和甜菊糖苷, 其他 5 种物质均为禁用。其中爱德万甜的残留限量最低, 为 0.0005 g/kg, 所以最终确定的添加水平分别为 20、100、500 μg/kg。具体结果如表 5 所示, 在巧克力基质中, 9 种甜味剂在 3 个添加

表 4 9 种甜味剂的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 Regression equations, correlation coefficients, limit of detection and limit of quantitation of 9 kinds of sweeteners

化合物	线性方程	相关系数	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
纽甜	Y=73493+12275.4X	0.9957	7.0	20.0
阿斯巴甜	Y=40240+51165.7X	0.9977	7.0	20.0
阿力甜	Y=49230+72738.3X	0.9942	7.0	20.0
爱德万甜	Y=54832+81021.3X	0.9984	7.0	20.0
甜蜜素	Y=51078+74223.3X	0.9989	7.0	20.0
安赛蜜	Y=19112+34279.3X	0.9945	7.0	20.0
糖精钠	Y=70240+78206.9X	0.9929	7.0	20.0
三氯蔗糖	Y=15677+12356.6X	0.9925	7.0	20.0
甜菊糖苷	Y=25443+24677.5X	0.9966	7.0	20.0

表 5 巧克力样品中甜味剂加标回收率和精密度结果(n=6)

Table 5 Recovery rates and precision results of sweeteners spiked in chocolate samples (n=6)

分析物	添加水平/(μg/kg)	黑巧克力		白巧克力	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
纽甜	20	78.5	8.4	80.5	9.2
	100	82.3	7.2	83.9	9.1
	500	88.5	6.8	89.7	5.7
阿斯巴甜	20	90.2	7.7	75.9	8.8
	100	95.6	6.8	80.4	7.6
	500	100.8	4.3	83.5	5.6
阿力甜	20	87.8	7.9	85.8	8.3
	100	97.4	7.0	93.5	6.8
	500	103.5	5.4	99.8	5.2
爱德万甜	20	92.4	5.2	94.3	5.3
	100	95.0	4.6	97.4	4.9
	500	108.7	4.8	104.3	4.1
甜蜜素	20	82.3	6.9	85.6	6.3
	100	88.7	6.1	89.6	5.9
	500	98.7	5.4	97.4	4.8
安赛蜜	20	79.4	6.3	76.4	7.8
	100	84.5	5.5	79.4	6.9
	500	88.9	4.9	83.5	5.8
糖精钠	20	87.4	5.4	88.6	5.8
	100	94.5	4.5	96.4	4.4
	500	106.4	3.9	108.9	3.2
三氯蔗糖	20	92.1	5.4	90.4	6.0
	100	98.4	4.8	100.3	5.2
	500	107.9	4.0	110.2	4.6
甜菊糖苷	20	75.3	7.8	77.9	8.9
	100	78.9	6.9	80.3	8.1
	500	83.2	6.0	83.5	7.6

水平的平均回收率范围为 75.3%~110.2%, 相对标准偏差为 3.2%~9.2%。这些数据表明所建立的方法具有较好的准确性和精密度, 重复性和稳定性较好。

2.4　实际巧克力样品中甜味剂的检测

为验证本方法, 对超市和企业送检的 20 份巧克力样品进行分析, 仅发现一份样品中检出有甜菊糖苷, 含量为 0.08 μg/kg, 不超过 GB 2760—2024 中的规定限值, 其他样品均未发现使用上述 9 种甜味剂的情况, 可能是本研究样品都来自正规厂家生产的巧克力, 因此没有超范围或者超量使用甜味剂情况。以后将重点针对三无产品进行检测。本研究此次对巧克力中甜味剂的摸底筛查, 也是为监管部门数据支持。

3　结　论

本研究建立高效液相色谱-四级杆/静电场轨道肼高分辨率质谱法测同时测定巧克力中 9 种甜味剂(纽甜、阿斯巴甜、阿力甜、爱德万甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠、三氯蔗糖、甜菊糖苷)的方法, 并对该方法进行了优化。优化了流动相、质谱条件、水解溶剂、水解温度、水解时间和固相萃取柱等条件, 最大可能降低样品中基质对目标物测定的影响。该方法可以用于巧克力样品中甜味剂的日常检测。该分析方法的建立, 可以高效、快速、高通量的测定巧克力中的甜味剂, 大大提高了样品的检测分析效率; 也可以为巧克力中的甜味剂使用情况提供数据支撑, 为市场监管提供有力的技术支持。

参考文献

[1] 路杨, 王丽英, 刘印平, 等. 超高效液相色谱法测定焙烤食品中 9 种甜味剂及防腐剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1725–1730.
LU Y, WANG LY, LIU YP, *et al*. Determination of 9 sweeteners and preservatives in baked foods by ultra performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(5): 1725–1730.

[2] 孙群, 刘川, 郭添荣, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定无糖糕点中 9 种甜味剂[J]. 化学研究与应用, 2024, 36(9): 2169–2178.
SUN Q, LIU C, GUO TR, *et al*. Determination of nine sweeteners in sugar free cakes by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chemical Research and Application, 2024, 36(9): 2169–2178.

[3] MOSSAVAR-RAHMANI Y, KAMENSKY V, MANSON JE, *et al*. Artificially sweetened beverages and stroke, coronary heart disease, and all-cause mortality in the women's health initiative [J]. Stroke, 2019, 50: 555–562.

[4] 童兰艳, 代政华, 肖昭竞, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定食品中 9 种甜味剂[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(2): 121–126.
TONG LY, DAI ZH, XIAO ZJ, *et al*. Simultaneous determination of 9 sweeteners in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(2): 121–126.

[5] CHENG S, WANG S, ZHENG M, *et al*. Simultaneous analysis of natural and artificial sweeteners in sugar-free drinks and urine samples by column-switching UHPLC-charged aerosol detection method [J]. Journal of Chromatography A, 2024, 1713: 464–473.

[6] SUN YY, LIANG J, ZHANG ZR, *et al*. Extraction, physicochemical properties, bioactivities and application of natural sweeteners: A review [J]. Food Chemistry, 2024, 457: 140103.

[7] 高玉婷, 张鹏, 杜刚, 等. 人造甜味剂对人体健康的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 285–290.
GAO YT, ZHANG P, DU G, *et al*. The impact of artificial sweeteners on human health [J]. Food Science, 2018, 39(7): 285–290.

[8] 毛伟峰, 宋雁. 食品中常见甜味剂使用方面存在的主要问题及危害[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(6): 914–191.
MAO WF, SONG Y. The main problems and hazards of using common sweeteners in food [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(6): 914–191.

[9] 朱运恒. 非营养性甜味剂会影响人体微生物组并改变血糖代谢[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 442–447.
ZHU YH. Non nutritive sweeteners can affect the human microbiome and alter blood glucose metabolism [J]. Chinese Journal of Food Science, 2022, 22(8): 442–447.

[10] 孙立臻, 周禹君, 尹丽丽, 等. 高效液相色谱法同时测定饮料中 10 种天然甜味剂[J]. 食品工业, 2019, 40(10): 344–348.
SUN LZ, ZHOU YJ, YIN LL, *et al*. Simultaneous determination of 10 natural sweeteners in beverages by high performance liquid chromatography [J]. Food Industry, 2019, 40(10): 344–348.

[11] 宋闰英, 许莉萍, 张静静, 等. 基于高效液相色谱法的糖浆剂中多种甜味剂同时测定研究[J]. 现代食品, 2024, 10: 202–204.
SONG RY, XU LP, ZHANG JJ, *et al*. Study on simultaneous determination of multiple sweeteners in syrup based on high-performance liquid chromatography [J]. Modern Food, 2024, 10: 202–204.

[12] 汪辉, 曹阳, 曹雄杰, 等. 高效液相色谱法测定食品中的爱德万甜[J]. 分析测试学报, 2018, 37(5): 635–638.
WANG H, CAO Y, CAO XJ, *et al*. High performance liquid chromatography method for the determination of Edvant in food [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2018, 37(5): 635–638.

[13] 钟永生, 万承波, 朱钦, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食用农产品(水果)中 14 种甜味剂含量[J]. 食品科技, 2024, 49(4): 315–321.
ZHONG YS, WAN CB, ZHU Q, *et al*. Simultaneous determination of 14 sweeteners in edible agricultural products (fruits) by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Technology, 2024, 49(4): 315–321.

[14] 孙莉, 周玉, 余义, 等. LC-AJS ESI-MS/MS 测定酒中七种甜味剂和氨基甲酸乙酯[J]. 食品工业, 2023, 10: 213–217.
SUN L, ZHOU Y, YU Y, *et al*. LC-AJS ESI-MS/MS determination of seven sweeteners and ethyl carbamate in wine [J]. Food Industry, 2023, 10: 213–217.

[15] DUENASMAS J, BALLESTEROS GOMEZ A, RUBIO S. Characterization of a new sustainable supramolecular solvent and application to the determination of oxy-PAHs in meat, seafood and fish tissues [J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134–137.

[16] 陈丽娟, 费晓庆, 谭梦茹, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法测定蜂蜜中的苯甲酸、山梨酸、安赛蜜与糖精钠[J]. 分析测试学报, 2016, 35(9):

1142–1146.
CHEN LJ, FEI XQ, TAN MR, *et al*. Determination of benzoic acid, sorbic acid, acesulfame, and saccharin sodium in honey by ultra high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(9): 1142–1146.

[17] 谢雯丽, 王舒蓓, 何金格, 等. 高效液相色谱法同时测定加工食品中 5 种添加剂含量[J]. 食品安全质量检测学报,2025, 16(21): 246–254.
XIE WL, WANG SB, HE JG, *et al*. Simultaneous determination of five additives in processed foods by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(21): 246–254.

[18] 桂茜雯, 柳菡, 许蔚, 等. 葡萄酒中 26 种添加剂的高效液相色谱-高分辨质谱查法[J]. 质谱学报, 2015, 36(2): 148–155.
GUI QW, LIU H, XU W, *et al*. Screening method of 26 additives in wine by high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2015, 36(2): 148–155.

[19] SUN YY, LIANG J, ZHANG ZR, *et al*. Extraction, physicochemical properties, bioactivities and application of natural sweeteners: A review [J]. Food Chemistry, 2024, 457: 140103.

[20] GUO F, RAO Z, ZHAN N, *et al*. An automatic and sensitive method for simultaneous determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons and four derivatives by online solid-phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with online solvent filtration [J]. Analytical Methods, 2016, 8(43): 7721–7730.

[21] PAPETTI A, COLOMBO R. High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation [M]. Amsterdam: Elsevier, 2019.

[22] 龚羽婷, 郭研研, 冯竟, 等. UPLC-Q/Orbitrap-HRMS 技术筛查及测定饮料中 11 种人工和天然甜味剂[J]. 现代食品科技, 2025, DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1098
GONG YT, GUO YY, FENG J, *et al*. UPLC-Q/Orbitrap HRMS technology screening and determination of 11 artificial and natural sweeteners in beverages [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1098

[23] 彭碧宁, 蔡德玲, 杨晨, 等. UPLC-MS/MS 同时测定固体饮料中 9 种甜味剂及筛查数据库的建立[J]. 中国口岸科学技术, 2020, 7: 456–462.
PENG BN, CAI DL, YANG C, *et al*. Simultaneous determination of 9 sweeteners in solid beverages by UPLC-MS/MS and establishment of screening database [J]. China Port Science and Technology, 2020, 7: 456–462.

[24] SUN SJ, BIN LS, HYE LJ, *et al*. Simultaneous determination of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and ethylparaben in foods by high-performance liquid chromatography [J]. Food Science and Biotechnology, 2023, 32(9): 1173–1183.

[25] NGUYEN TH, WATERHOUSE AL. A production-accessible method:Spectrophotometric iron speciation in wine using ferrozine and ethylenediaminetetraacetic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(2): 680–687.

[26] 冯俊富, 朱飞如, 梁国华, 等. 高效液相色谱法同时测定饮料中 19 种食品添加剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 315–321.
FENG JF, ZHU FR, LIANG GH, *et al*. Simultaneous determination of 19 food additives in beverages by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 315–321.

[27] AISWARYA PS, DITTO AT, LOUIS G, *et al*. Food additives and evolved methods of detection: A review [J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2024, 1: 1–20.

[28] YANG C, WANG Y, DONG PZ, *et al*. Determination of bisphenols in food and its contact materials migration by magnetic solid-phase extraction coupled with LC-MS/MS [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104179.

[29] 胡平, 朱梦旭, 丰荣鹏. 食品中甜味剂分类及检测技术研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019, 32(18): 75–78.
HU P, ZHU MX, FENG RP. Research progress on classification and detection technology of sweeteners in food [J]. China Food Safety Magazine, 2019, 32(18): 75–78.

[30] 田双双, 张琪, 庄美慧, 等.分散固相萃取-高效液相色谱法同时测定巧克力糖果中 4 种增香剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(14): 133–138.
TIAN SS, ZHANG Q, ZHUANG MH, *et al*. Simultaneous determination of four flavor enhancers in chocolate candies by dispersed solid phase extraction high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 133–138.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)