

白酒类饮料中9种甜菊糖苷的液质快速检测方法

Simultaneous Determination of 9 kinds of Steviol Glycosides in Chinese Liquor and Beverages by QTRAP® System

李广宁, 孙小杰, 刘冰洁, 李立军, 郭立海

Li Guangning, SunXiaojie, Liu Bingjie, Li Lijun, Guo Lihai

SCIEX China

Key Words : QTRAP; Chinese liquor; Steviol glycosides

引言

甜菊糖苷是一类以甜叶菊干叶为原料, 经提取、精制而得的食物添加剂。其主要成分为四环二萜类化合物, 包括甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷D、瑞鲍迪苷F、甜茶苷、杜克苷、甜菊双糖苷等。它们具有相同的苷元: 甜菊醇(见图1), 在C19和C13位上连接不同数量的葡萄糖基, 鼠李糖基或木糖基, 从而形成味质、理化性能各异的甜菊糖苷。甜菊糖苷可在饮料中可按生产需要适量使用。在蒸馏酒中, 我国《食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014)中明确规定中不允许添加甜味剂, 配制酒和饮料中的甜味剂的使用也不得超过限量。

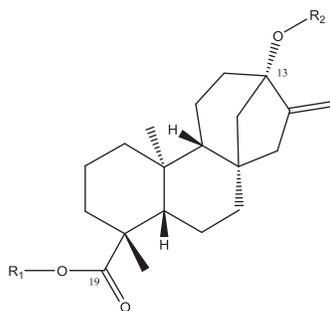


图1. 甜菊糖苷的结构式

目前, 针对食品中甜味剂的检测, 研究较多的主要为人工合成甜味剂, 甜菊糖苷等天然甜味剂报道较少。在我国, 甜菊糖苷食品添加剂安全标准(GB8270-2014)中采用的是容量法和HPLC法, 由于此类甜味剂结构类似, 故采用HPLC不能得到很好地分离。

我们通过QTRAP® 系统建立了白酒及饮料中常见9种甜菊苷的精确定量方法, 并通过QTRAP® 系统的线性离子阱功能建立了其二级碎片谱库, 可用于后期的筛查分析。该方法具有以下特点:

1. 本方法覆盖目前食品添加剂安全标准(GB8270-2014)中9种甜菊糖苷的检测。
2. 抗基质干扰, 特异性强, 保证结果可靠性。
3. 10 min内完成9种甜菊糖苷的检测, 快速方便。
4. 结合QTRAP®系统的EPI功能, 通过SCIEX OS软件建立其二级谱库, 便于后期筛查和鉴定。

仪器设备

SCIEX ExionLC™ 系统 + QTRAP® 系统



SCIEX ExionLC™ 系统 + QTRAP® 系统

样品处理:

取样约1 g左右, 使用90% 乙腈水溶液稀释5-10倍, 离心5min, 过滤, 上机分析。

色谱方法:

色谱柱: BEH Amide Column, 1.7 μ m, 2.1 mm X 100 mm

流动相: A: 10 mmol/L 甲酸铵水溶液

B: 乙腈

梯度洗脱:

时间 [min]	流速 [mL/min]	B[%]
0.00	0.4000	90
0.50	0.4000	90
5.00	0.4000	50
6.00	0.4000	50
6.10	0.4000	90

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 5 μ L

质谱方法:

扫描方式: 负模式

离子源: ESI

离子对列表见附表

实验结果

化合物提取离子流色谱图 (图2)

1. 色谱质谱条件优化

分别使用C18, 氟苯基柱, 及氨基柱优化条件, 发现当时用氨基柱正相色谱模式分析时, 各甜菊糖苷可以得到较好分离, 但此模式色谱峰型受样品溶剂影响较大, 使用90% 乙腈水溶液作为样品溶剂, 峰型较好。另外分别使用0.1% 甲酸水, 2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L甲酸铵水溶液作为流动相测试, 发现当使用10 mmol/L甲酸铵水溶液作为流动相时, 灵敏度最好。

本实验在QTRAP® 系统上进行, 使用正负模式分别测试, 发现甜菊糖苷类均有均有响应, 但负模式减氢峰响应更好, 故采用负模式进行分析。

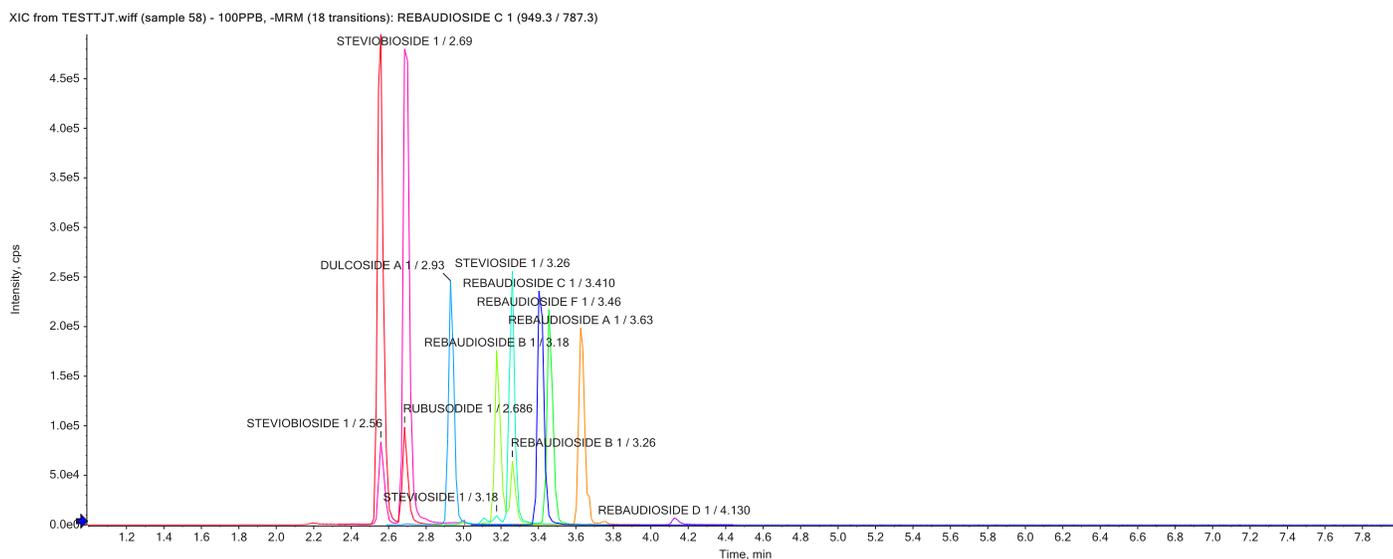


图2. 9种甜菊糖苷的提取离子流色谱图

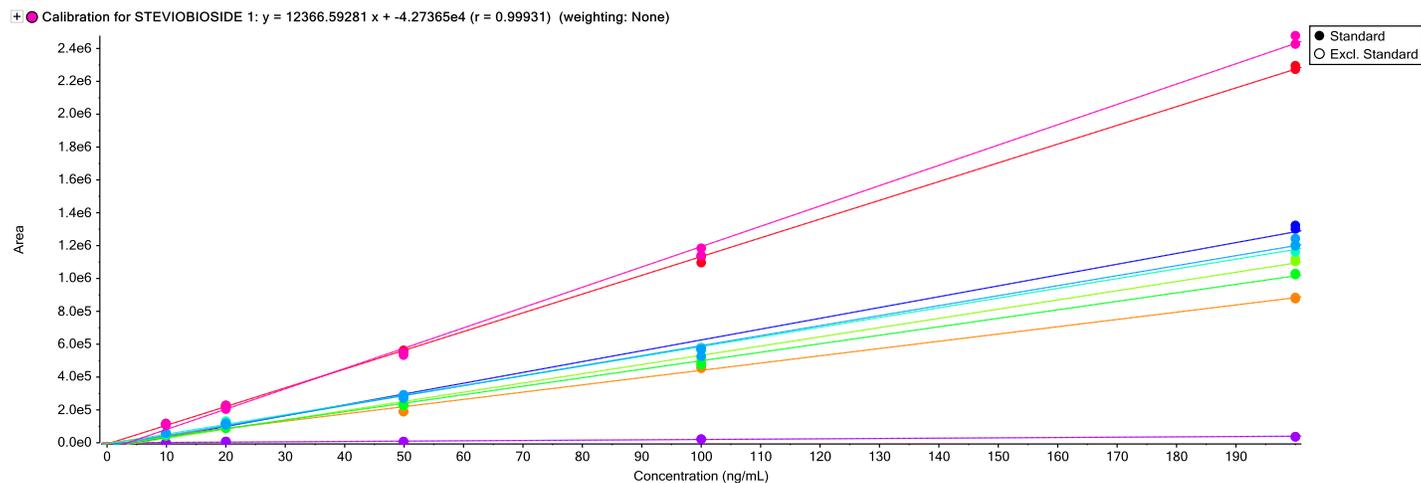


图3. 9种甜菊糖苷的校准曲线

2. 方法学验证结果

线性范围

使用空白白酒基质，在1 ng/mL-200 ng/mL范围内进行线性实验，发现所有甜菊糖苷类均有很好的的线性，线性相关系数r在0.99543-0.99575之间。

3. 重现性实验

使用空白基质考察实验的重现性，添加浓度为5 ng/mL，连续进样6针，所有化合物RSD值均小于3.5 %。

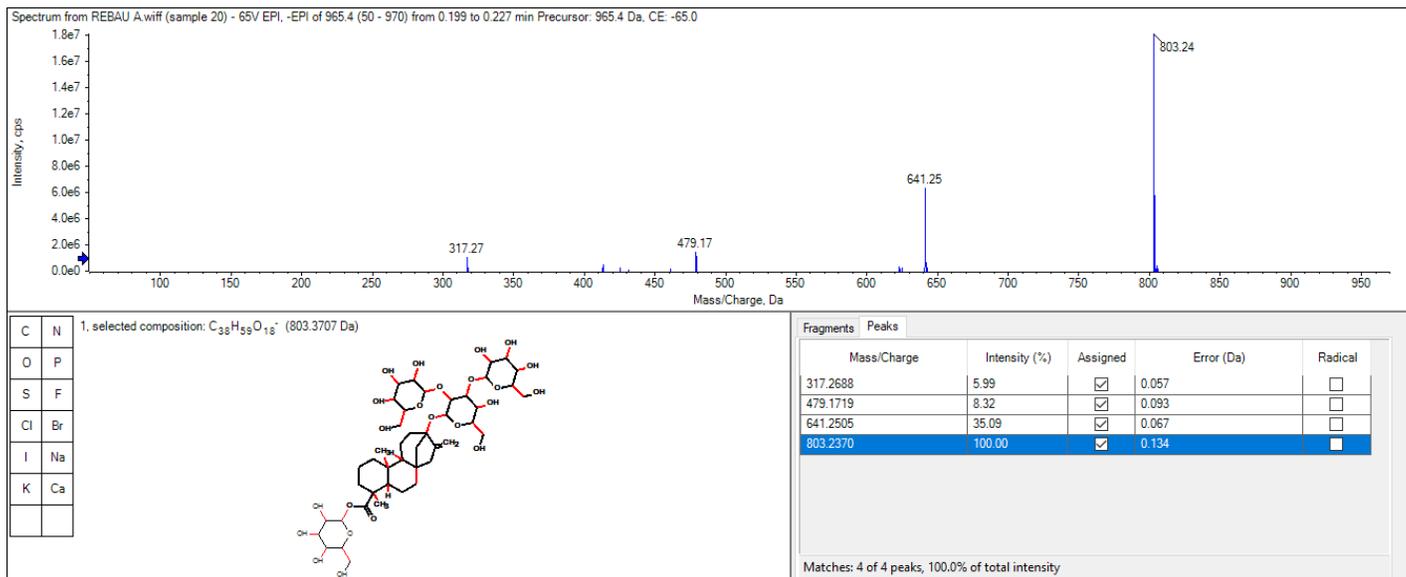
化合物名称	RSD% (n=6)	化合物名称	RSD% (n=6)
瑞鲍迪昔A	2.36	甜菊苷	2.51
瑞鲍迪昔B	2.18	杜克甙	2.79
瑞鲍迪昔C	1.59	甜茶苷	1.93
瑞鲍迪昔D	3.22	甜菊双糖苷	-
瑞鲍迪昔F	2.94	-	-

4. 回收率

使用空白白酒基质进行回收率考察，取样1 g配制成20 ng/mL的基质试剂，上机测试，各种甜菊糖苷回收率在91%-97%之间，可直接白酒类饮料中甜菊糖苷类的定量或筛查。

5. 定性分析

在QTRAP®系统上，使用MRM-IDA-EPI模式采集数据，可同时得到用于定量的MRM数据及化合物的二级碎片数据，从而同时进行定性及定量分析。以瑞鲍迪昔A为例，对其采集到的EPI谱图，利用SCIEX OS软件进行分析，发现m/z 317.3的碎片为甜菊糖苷类均具有的苷元甜菊醇，而m/z 479.2由甜菊醇在C19位结合一个葡萄糖得到，而m/z 641.3及m/z 803.2分别为C13位上分别结合两个和三个葡萄糖单元得到。使用MRM-IDA-EPI结合SCIEX OS软件可准确匹配其质谱碎片信息对应的结构，为化合物鉴定提供依据。



总结

本实验在 QTRAP® 系统上,建立了9种甜菊糖苷类的 LC-MS/MS 方法,该方法可用于白酒类饮料中的甜菊糖苷类化合物的快速筛查和定量。方法具有快速简便重现性好的优点,使用MRM-IDA-EPI 模式得到的二级碎片图谱可为定性鉴定提供可靠依据,从而实现同时定量与定性分析。

参考文献:

- 《食品安全国家标准》食品添加剂甜菊糖苷, GB 8270-2014
- 《食品安全国家标准》食品添加剂使用标准, GB 2760-2014

附录: 9种甜菊糖苷的质谱离子对参数

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
瑞鲍迪苷A	Rebaudioside A	965.4	803.4	-165	-44
			641.1	-165	-82
瑞鲍迪苷B	Rebaudioside B	803.4	641.4	-176	-65
			479.3	-176	-65
瑞鲍迪苷C	Rebaudioside C	949.323	787.3	-160	-34
			625.3	-160	-78
瑞鲍迪苷D	Rebaudioside D	1127.4	803.3	-245	-68
			641.4	-245	-86
瑞鲍迪苷F	Rebaudioside F	935.342	773.2	-155	-40
			479.3	-155	-90
甜菊苷	Stevioside	803.4	641.4	-142	-37
			479.3	-142	-80
杜克甙	Dulcoside A	787.4	625.4	-140	-32
			479.3	-140	-77
甜茶苷	Rubusoside	641.302	479.3	-135	-42
			317.2	-135	-62
甜菊双糖苷	Steviolbioside	641.222	479.3	-175	-56
			317.2	-175	-62

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息,请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标,也包括相关的标识、标志的所有权,归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12865-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)