UPLC–Q/Orbitrap–HRMS技术筛查及测定饮料中11种人工和天然甜味剂

龚羽婷[1]，郭研研[1]，冯竟[1*]，杨飞[1]，陈文豪[1]，黄钰圣[1]，黄国锋[2]，董浩[3*]，梁明[4]
（1.广州市天河区疾病预防控制中心，广东广州 510000)(2.佛山市顺德区伦教社区卫生服务中心，广东佛山 528308）
（3.仲恺农业工程学院轻工食品学院，农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室，广东广州 510225）
（4.广州质量监督检测研究院，广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心，广州市食品安全检测技术重点实验室，广东广州 511447）

摘要：为了探究饮料中人工和天然甜味剂的添加状况，建立了超高效液相色谱 - 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱（UPLC-Q/Orbitrap HRMS）筛查和测定饮料中 11 种人工和天然甜味剂的方法，并对甜味剂的质谱裂解规律进行了解析。饮料样品经体积比 1:1 的甲醇 – 水溶液稀释，过滤膜后滤液经 HSS T3 色谱柱分离，UPLC-Q/Orbitrap HRMS 检测。质谱同时采集一级母离子和二级碎片离子，以保留时间、母离子和二级碎片离子进行定性确证，母离子的峰面积进行定量。通过质谱裂解规律的解析，发现甜菊糖苷类甜味剂具有共性碎片离子 *m/z* 641.316 3、479.265 0 和 317.211 9，通过母离子和共性碎片离子可实现对样品中未知甜菊糖苷类化合物的定性识别。方法学结果表明，11 种甜味剂在相应浓度范围内线性关系良好，平均回收率为 77.29%~98.82%，相对标准偏差为 1.5%~9.6%（*n*=5），芦荟苷的方法检出限为 150.0 μg/L，其他 10 种甜味剂的检出限为 1.0~15.0 μg/L。实际样品检测发现 2 款果饮料中筛查出甜蜜素（质量浓度分别为 0.8 mg/L 和 190.9 mg/L），1 款茶饮料中筛查出甜菊糖苷和瑞鲍迪苷（质量浓度分别为 94.2 μg/L 和 62.1 μg/L），未筛查出含有其他未知的甜菊糖苷类甜味剂。研究结果表明所测饮料中甜味剂的含量虽未超过标准规定的最大允许使用量，但存在标签内容不全的现象，应加强对食品标签的监督管理。

关键词：超高效液相色谱 – 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱；饮料；甜味剂；定性筛查
文章编号：1673-9078(2025)12-323-333 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1098

Screening and Determination of 11 Types of Artificial and Natural Sweeteners in Beverages by UPLC-Q/Orbitrap-HRMS Technology

GONG Yuting[1], GUO Yanyan[1], FENG Jing[1*], YANG Fei[1], CHEN Wenhao[1], HUANG Yusheng[1], HUANG Guofeng[2], DONG Hao[3*], LIANG Ming[4]
(1.Guangzhou Tianhe District Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510000, China)(2.Lunjiao Community Health Service Center, Shunde 528308, China)(3.Key Laboratory of Green Processing and Intelligent

引文格式：
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, 41(12):323-333.
GONG Yuting, GUO Yanyan, FENG Jing, et al. Screening and determination of 11 types of artificial and natural sweeteners in beverages by UPLC-Q/Orbitrap-HRMS technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(12): 323-333.

收稿日期：2024-07-29；修回日期：2024-12-18；接受日期：2024-12-23
基金项目：中国博士后科学基金面上项目（2023M740759）
作者简介：龚羽婷（1989-），女，学士，主管技师，研究方向：营养与食品安全方向，E-mail：twinsgyt@qq.com
通讯作者：冯竟（1981-），男，硕士，研究方向：公共卫生与食品安全，E-mail：fengjing@thnet.gov.cn；共同通讯作者：董浩（1989-），博士，副教授，研究方向：食品加工与质量安全控制，E-mail：donghao@zhku.edu.cn

Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)(4.Guangzhou Quality Supervision and Testing lnstitute, Guangzhou City Research Center of Risk DynamicDetection and Early Waring for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou 511447, China)

Abstract: In order to explore the status of adding artificial and natural sweeteners to beverages, an ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q/Orbitrap HRMS) method was established for the screening and determination of 11 types of artificial and natural sweeteners in beverages, and the MS fragmentation pathways of the sweeteners were profiled. The beverage samples were diluted with a methanol-water solution in a volume ratio of 1:1, and after filtration through a membrane, the filtrate was separated using an HSS T3 column then detected by UPLC-Q/Orbitrap HRMS. Mass spectrometry simultaneously collected primary parent ions and secondary fragment ions for qualitative confirmation based on the retention time, parent ion and secondary fragment ions ,while the peak areas of the parent ions were used for quantification. Through profiling of the MS fragment pathways, it was found that the steviol glycosides had common fragment ions *m*/*z* 641.316 3, 479.265 0 and 317.211 9, allowing for qualitative identification of the unknown steviol glycoside compounds in the samples using the parent ion and common fragment ions. The method validation results showed a good linear relationship for the 11 sweeteners within the corresponding concentration ranges, with average recoveries of 77.29%~98.82% and relative standard deviations (RSDs) in the range of 1.5%~9.6% (*n*=6), limit of detection of aloin being 150.0 μg/L, and limits of detection of other 10 sweeteners in the range of 1.0~15.0 μg/L. The testing of real samples revealed that sodium cyclamate was detected in two fruit beverages (at concentrations of 0.8 mg/L and 190.9 mg/L, respectively), and stevioside and rebaudioside A were detected in one tea beverage (at concentrations of 94.2 μg/L and 62.1 μg/L, respectively), with no other unknown steviol glycoside sweeteners being detected. The results showed that although the contents of the sweeteners in the tested beverages did not exceed the maximum allowable limit specified in the standards, there were instances of incomplete labeling contents, suggesting a need for stronger supervision and management of food labeling.

Key words: UPLC-Q/Orbitrap-HRMS; beverages; sweeteners; qualitative screening

甜味剂作为一种能有效增加食品口感及风味的食品添加剂，因具有低热量、高甜度等优点，在食品工业中应用日益广泛[1]。甜味剂根据来源可以分为人工甜味剂和天然甜味剂，人工甜味剂如阿斯巴甜、糖精钠、安赛蜜、甜蜜素等主要通过化学合成途径制备，生产成本较低，比较受生产企业青睐，但人工甜味剂的安全性仍存在争议，其过量食用可能会影响人体健康[2]。为此，GB 2760-2024[3]中也规定了常见人工甜味剂（如安赛蜜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素等）在不同食品类别中的最大使用量。天然甜味剂如甜菊糖苷、新橘皮苷二氢查尔酮等主要由植物提取，这类甜味剂通常被认为比合成甜味剂更加健康安全[4]。但由于相关标准的滞后性，目前 GB 2760-2024 仅规定了甜菊糖苷在食品中的最大使用量，其他天然甜味剂并未规定其最大使用量[3]，这可能导致一些食品企业使用天然甜味剂代替人工甜味剂以规避风险，牟取不正当利益。而且，无论是什么类型的甜味剂，一旦过量食用，都可能对消费者的身体健康造成不利影响，如引发肥胖、糖尿病、心血管疾病或其他代谢性疾病[5-8]。因此，对食品中人工和天然甜味剂同时进行检测不仅可以提高检测效率，也有利于企业和消费者了解饮料中甜味剂的实际添加水平。

饮料是常添加甜味剂的一类食品，当前的标准和研究大都聚焦于饮料中人工甜味剂的检测，主要采用色谱法[9-11]、质谱法[12,13]、及毛细管电泳法[14,15]等，其中色谱法和毛细管电泳法通常只能测定少数甜味剂混合物，难以同时测定多类不同的甜味剂。此外，天然甜味剂异构体多且成分复杂，利用常规色谱技术直接进行分离检测较为困难；普通质谱法虽然可以同时检测人工和天然甜味剂，但前提需要有相应的标准物质才能进行定性和定量，故对于新型的或缺乏标准品的甜味剂识别存在局限。相比之下，静电场轨道阱高分辨质谱（Orbitrap HRMS）凭借其超高的分辨率（高达 120 000 FWHM）以及超宽的扫描范围，能够在单次扫描下准确获得多种物质的精确母离子和碎片离子信息，在识别假阳性和削减基质干扰上有着很强的优势[16]，因此，Orbitrap HRMS 在近年来已成为复杂样品中多组分定性筛查领域的热门工具。

鉴于此，本研究通过运用超高效液相色谱－四极杆／静电场轨道阱高分辨质谱，针对饮料中人工及天

然甜味剂展开定性甄别与定量分析。该方法不仅能够实现对 11 种甜味剂的精确鉴定与定量测定，还通过深入解析甜味剂的质谱特征，获得可识别甜菊糖苷类化合物的共性碎片离子，进而在样品中实现该类甜味剂的非靶向筛查。本方法操作简单、快速、准确度高，可为饮料中甜味剂的监测提供坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

安赛蜜、阿斯巴甜、糖精钠、甜蜜素、阿力甜、纽甜等人工甜味剂（纯度≥98%），上海安谱实验科技股份有限公司；芦荟苷、甜菊糖苷、瑞鲍迪苷 A、瑞鲍迪苷 C、瑞鲍迪苷 F（纯度≥97%）等天然甜味剂，购自曼哈格（上海）生物科技有限公司；甲醇和乙腈（均为色谱纯），德国默克公司；甲酸和乙酸铵（均为色谱纯），德国 CNW 公司；超纯水由实验室超纯水仪制备；30 款饮料样品（包括 6 款饮用水、5 款碳酸饮料、7 款茶饮料、5 款果汁饮料、4 款功能饮料、3 款乳饮料）主要从网上商场和广州线下超市购买。

1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 超高效液相色谱系统串联 Q Exactive Focus 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱，美国赛默飞世尔科技公司；MS3 digital 涡旋混合器，德国 IKA 公司；KDC-40 低速离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；BCE224i-1CCN 万分之一电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；Milli-Q 超纯水仪，美国 Millipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

对于无固体颗粒的饮料样品直接量取 1.0 mL 于 15 mL 离心管中，加入 4 mL 体积比为 1:1 的甲醇水溶液，涡旋混匀 3 min，吸取约 1 mL 溶液过 0.22 μm 滤膜，滤液直接上机测试；对于含固体颗粒或块状料的饮料样品，先以 4 200 r/min 的速率离心 3 min，取 1.0 mL 上清液于 15 mL 离心管中，再添加 4 mL 体积比为 1:1 的甲醇水并涡旋 3 min，吸取约 1 mL 溶液过 0.22 μm 滤膜，上机待测。

1.3.2 标准溶液配置

分别称取 11 种甜味剂标准物质溶解于等体积的甲醇－水混合溶液中，配制成质量浓度约为 1 000 mg/L 的标准储备液。分别吸取适量标准储备液于 10 mL 容量瓶中，用等体积的甲醇－水定容配制成质量浓度为 10 mg/L 的混合标准中间溶液，再用等体积的甲醇 - 水溶液分别配制系列标准工作液（其中芦荟苷的质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L；其他 10 种甜味剂的质量浓度分别为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 μg/L）。

1.3.3 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；柱温：30 ℃；进样体积 5 μL；流量：0.3 mL/min；流动相 A：水，流动相 B：乙腈，梯度洗脱程序：0.0~0.5 min，10% B；0.5~3.0 min，10% B~30% B；3.0~5.0 min，30% B~95% B；5.0~8.0 min，95% B；8.0~8.5 min，95% B~10% B；8.5~10.0 min，10% B。

1.3.4 质谱条件

离子源配套为加热电喷雾离子源（HESI），负离子模式采集；毛细管温度：320 ℃；辅助气温度：350 ℃；喷雾电压：−3.2 kV；鞘气和辅助气均采用氮气，压力和流量分别设置为 280 kPa 和 3.5 L/min；质谱模式：一级质谱全扫描和数据依赖的二级质谱全扫描（Full MS/dd-MS^2）；扫描范围：*m/z* 100~1 000；全扫描（Full MS）分辨率设为 70 000 FWHM；触发阈值为 1×10^6；二级子离子扫描分辨率设置为 17 500 FWHM；触发阈值为 5×10^4；最大注入时间：60 ms；分离窗口：*m/z* 3.0；糖精钠的归一化碰撞能设置为 70%、90%，其他 10 种甜味剂的归一化碰撞能设置为 20%、40%、60%。11 种人工和天然甜味剂的信息和仪器采集的参数见表 1。

1.3.5 数据分析

采用 Xcalibur 软件对原始谱图进行分析和处理，获得各目标分析物的母离子、碎片离子、保留时间和标准曲线等信息；采用 TraceFinder 软件搭建各甜味剂的质谱筛查数据库，并对饮料中的甜味剂进行定性筛查；使用 Excel 作图优化前处理条件，并计算加标回收率、日内精密度和样品中甜味剂的含量，所有待测样品和加标样品均重复测试 3 次，实验结果以平均值表示。

1.4 质量数相对偏差的计算

质量数相对偏差 E（parts-per-million, ppm）是评估化合物定性准确度的重要参数之一，其计算公式如式（1）[17,18]：

$$E=\left|\frac{M-M_0}{M_0}\right| \quad (1)$$

式中：

E——质量数相对偏差，

M——实测母离子质量数，

M_0——理论精确母离子质量数。

表 1 11种人工和天然甜味剂的信息和仪器参数

Table 1 Chemical information, instrument parameters of 11 artificial and natural sweeteners

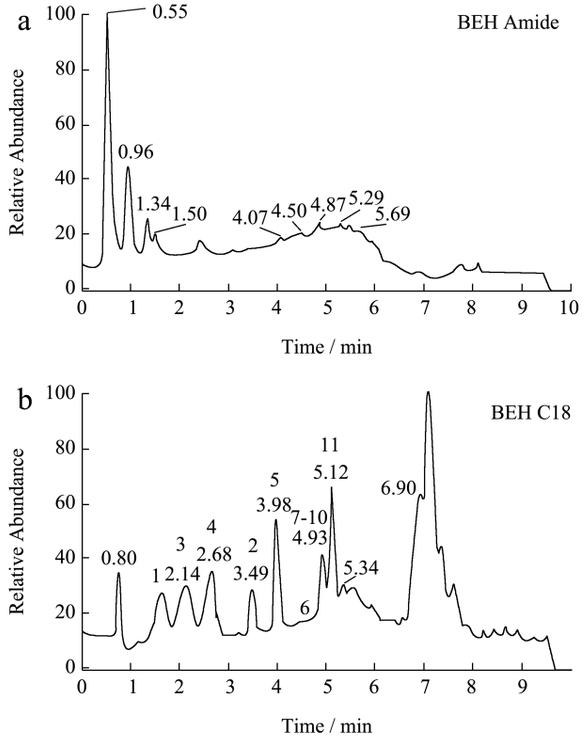
序号	化合物	英文名	化学式	CAS 号	保留时间/min	理论精确母离子 (*m*/*z*)	实测母离子 (*m*/*z*)	碎片离子 (*m*/*z*)	*E* /ppm
1	安赛蜜	Acesulfame	$C_4H_5NO_4S$	33665-90-6	3.54	161.98665[M-H]$^-$	161.98625 [M-H]$^-$	82.02973; 77.96562	2.47
2	阿斯巴甜	Aspartame	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	22839-47-0	3.82	293.11429[M-H]$^-$	293.11288 [M-H]$^-$	200.07144; 97.04050	4.81
3	糖精钠	Saccharin Sodium	$C_7H_4NO_3SNa$	128-44-9	3.84	181.99174[M-Na]$^-$	181.99171[M-Na]$^-$	61.97055; 105.96013	0.16
4	甜蜜素	Sodium cyclamate	$C_6H_{12}NNaO_3S$	68476-78-8	4.13	178.05434[M-Na]$^-$	178.05426 [M-Na]$^-$	79.95748; 95.97599	0.45
5	阿力甜	Alitame	$C_{14}H_{25}N_3O_4S$	80863-62-3	4.29	330.14930[M-H]$^-$	330.15024 [M-H]$^-$	312.13812; 87.05622	2.85
6	芦荟苷	Aloin	$C_{21}H_{22}O_9$	1415-73-2	4.84	417.11911[M-H]$^-$	417.11840[M-H]$^-$	297.07629; 268.07437	1.70
7	瑞鲍迪苷 A	Rebaudioside A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	58543-16-1	4.96	965.42351[M-H]$^-$	965.42421 [M-H]$^-$	803.36963; 641.31714	0.73
8	甜菊糖苷	Stevioside	$C_{38}H_{60}O_{18}$	57817-89-7	4.98	803.37069[M-H]$^-$	803.37061 [M-H]$^-$	641.31592; 317.21240	0.10
9	瑞鲍迪苷 F	Rebaudioside F	$C_{43}H_{68}O_{22}$	438045-89-7	5.00	935.41295[M-H]$^-$	935.41382[M-H]$^-$	773.36029; 317.21182	0.93
10	瑞鲍迪苷 C	Rebaudioside C	$C_{44}H_{70}O_{22}$	63550-99-2	5.03	949.42859[M-H]$^-$	949.42741[M-H]$^-$	787.37610; 625.32452	1.24
11	纽甜	Neotame	$C_{20}H_{30}N_2O_5$	165450-17-9	5.19	377.20819[M-H]$^-$	377.20715 [M-H]$^-$	200.07130; 118.06597	2.76

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

本研究评估了 11 种人工和天然甜味剂在三种色谱柱，包括 ACQUITY UPLC HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）、ACQUITY UPLC BEH C18（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）、ACQUITY UPLC BEH Amide（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）上的峰型和的保留效果。结果如图 1 所示，安赛蜜、甜蜜素和糖精钠在 Amide 柱上无保留（保留时间均为 0.54 min），其他甜味剂的出峰时间也较早（1.5~2.73 min）。而采用 HSS T3 和 C18 柱时，11 种甜味剂在色谱柱上都能有很好的保留，其中 HSS T3 上 11 种甜味剂的保留时间为 3.54~5.19 min，C18 柱上 11 种甜味剂的保留时间为 1.67~5.12 min。甜菊糖苷类甜味剂由于性质非常相似，优化了不同流动相和梯度，从保留时间上均无法实现完全分离，但对于这些物质的定性除了保留时间，还可以根据母离子和碎片离子。因此，虽然部分甜味剂从保留时间上无法区分，但最终也能根据母离子和子离子实现准确定性。此外，大部分甜味剂在 HSS T3 柱上比 C18 柱具有更好的响应，且峰型优良[2]，鉴于此，本研究选择 HSS T3 色谱柱进行后续的实验分析。



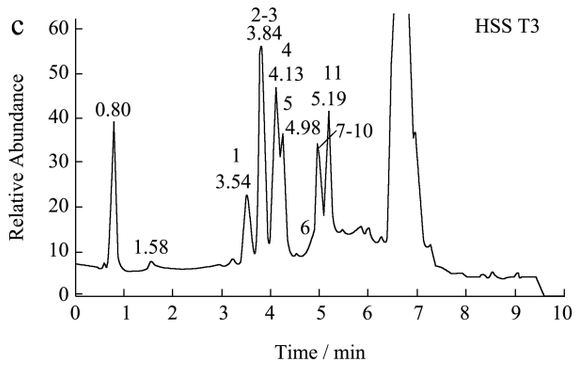


图 1 不同色谱柱下 11 种甜味剂的总离子色谱图

Fig.1 Total ion chromatograms of 11 sweeteners on different columns

注:(1)安赛蜜;(2)阿斯巴甜;(3)糖精钠;(4)甜蜜素;(5)阿力甜;(6)芦荟苷;(7)瑞鲍迪苷 A;(8)甜菊糖苷;(9)瑞鲍迪苷 F;(10)瑞鲍迪苷 C;(11)纽甜。

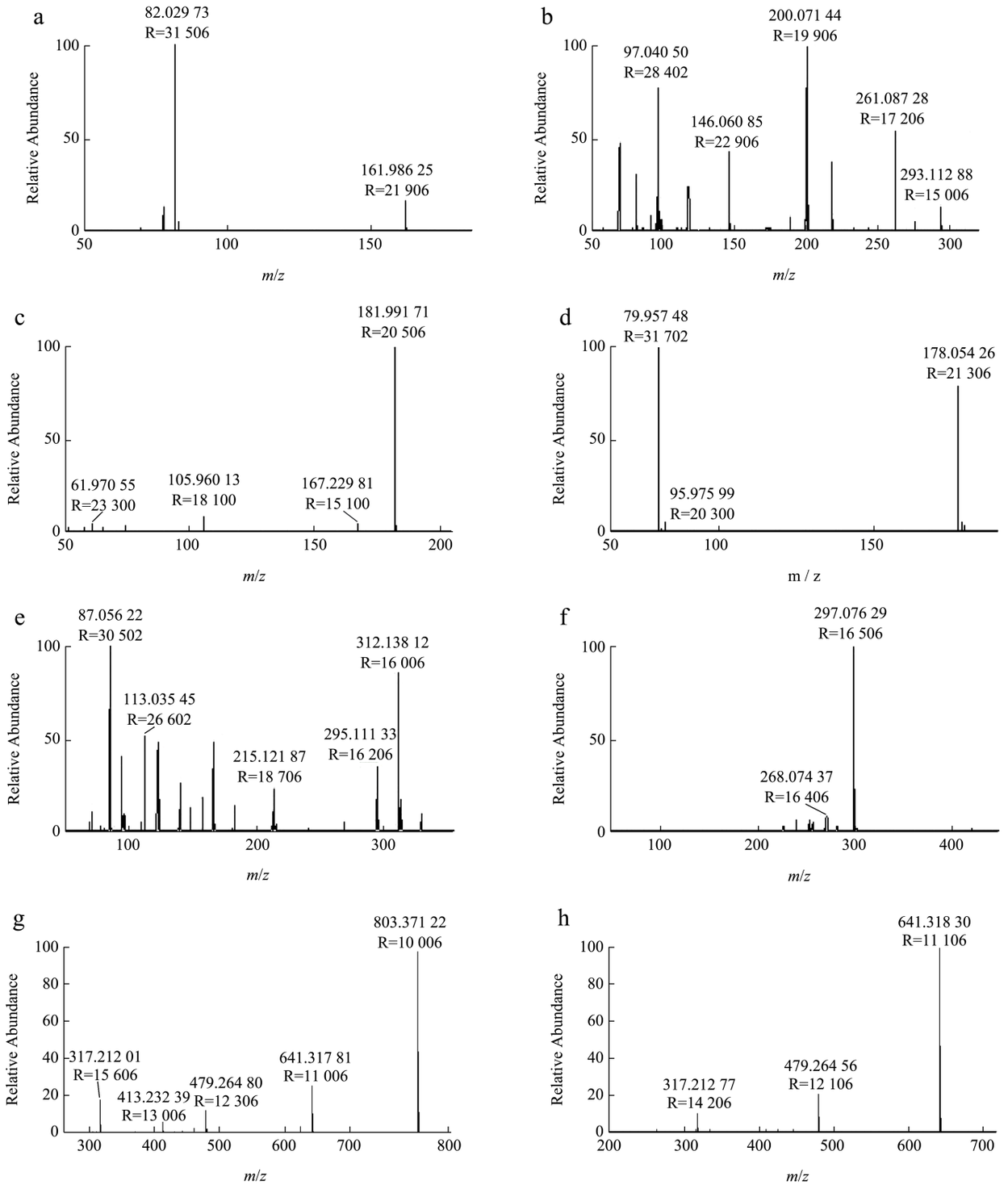
2.1.2 流动相的优化

本研究探讨了四种流动相组合体系：乙腈－水、乙腈 -0.1% 甲酸水、乙腈 -0.1% 甲酸 -5 mmol/L 乙酸铵、甲醇－水对 11 种甜味剂峰型和响应强度的影响。结果发现有机溶剂采用乙腈时，各目标物的峰面积响应比甲醇作为有机溶剂时要高。水相采用纯水时，各目标物峰型均较好且响应也较高，加入甲酸后，发现部分甜味剂响应值降低，说明甲酸可能会对甜味剂在质谱中的电离产生抑制作用，从而减弱了响应信号[19]。而继续加入乙酸铵后，发现安赛蜜、甜蜜素等多种人工甜味剂峰宽增加，并且其响应值相较于纯水流动相系统也有所降低。基于上述结果，本研究选用乙腈－水作为流动相组合体系。

2.1.3 甜味剂的质谱裂解规律解析

图 2 展示了 11 种甜味剂的二级质谱图，其中图 2g~2j 为 4 种典型甜菊糖苷类甜味剂的二级碎片质谱图。根据甜菊糖苷的化学结构可知，甜菊糖苷类甜味剂均具有相同的基础结构即甜菊醇（$C_{20}H_{30}O_3$），在甜菊醇的 C-13（R_2）和 C-19（R_1）两个位置上接入不同数量的基团如木糖基（-Xyl，$-C_5H_9O_5$）、鼠李糖基（-Rha，$-C_6H_{11}O_5$）、葡萄糖基（-Glc，$-C_6H_{11}O_6$）等，就会形成不同种类的甜菊糖苷类甜味剂[20]，如在甜菊醇的 C-13 位上接入 *β*-Glc-*β*-$(Glc)_2$，C-19 位上接入 *β*-Glc 即形成瑞鲍迪苷 A；在 C-13 位上接入 *β*-Glc-Glc-α-Rha，C-19 位上接入 *β*-Glc 即形成瑞鲍迪苷 C；在 C-13 位上接入 *β*-Glc-*β*-Glc-α-Xyl，C-19 位上接入 *β*-Glc 即形成瑞鲍迪苷 F；在 C-13 位上接入 *β*-Glc-*β*-Glc，C-19 位上接入 *β*-Glc 即形成甜菊糖苷。从甜菊糖苷类甜味剂的二级质谱图可看到，这类甜味剂具有一些共性碎片离子如 *m/z* 641.316 3、479.265 0、317.211 9 等，其中 *m/z* 317.211 9 即甜菊醇的分子离子峰，甜菊醇经历脱羟基过程则转化为内－贝壳杉烯酸，内－贝壳杉烯酸与葡萄糖基结合即形成碎片离子 *m/z* 479.265 0，内－贝壳杉烯酸－葡萄糖基与 -Xyl、-Rha、-Glc 脱水结合则分别形成 *m/z* 611.306 4、*m/z* 625.322 1 和 *m/z* 641.316 3，其中 *m/z* 611.306 4、*m/z* 625.322 1 分别对应了瑞鲍迪苷 F 图 2i、瑞鲍迪苷 C 图 2j 的碎片离子。所以对于这类物质的质谱裂解规律，以瑞鲍迪苷 A 为例如图 2g，瑞鲍迪苷 A 结构式中有 4 个 -Glc，首先在负离子模式下脱氢形成分子离子 *m/z* 965.424 21，母离子在能量轰击下脱去 1 个 -Glc 形成 *m/z* 803.371 22，脱去 2 个 -Glc 形成 *m/z* 641.317 81、脱去 3 个 -Glc 形成 *m/z* 479.264 80、脱去 4 个 -Glc 形成 *m/z* 317.212 01。这些质谱裂解规律可为推导其他甜菊糖苷类甜味剂提供依据。文献指出，尽管现在已从甜叶菊中鉴别出超过 30 种甜菊糖苷类甜味剂，但由于缺乏相应的标准物质，很多化合物的定性定量分析仍面临挑战[21]。而通过对甜菊糖苷类甜味剂二级质谱裂解规律进行解析，获得其共性碎片离子，再结合相应化合物的化学式得出精确母离子，即可初步推导出其他目前尚无法定性识别的甜菊糖苷甜味剂。安赛蜜（$C_4H_5NO_4S$）在负离子模式下脱氢形成分子离子 *m/z* 161.986 25（$[M-H]^-$），分子离子在能量轰击下磺酰胺键（$-SO_2NH-$）和碳氧键断裂，形成碎片离子 *m/z* 82.029 73（$C_4H_4ON^-$）；酰胺键（-O=C-NH-）和氧硫键断裂，则形成碎片离子 *m/z* 77.965 62（SO_2N^-）。阿斯巴甜（$C_{14}H_{18}N_2O_5$）含有羧基，负离子模式下容易失去一个 H 形成带电负离子 *m/z* 293.112 88（$[M-H]^-$），酰胺键（-O=C-NH-）断裂形成天冬氨酰基（$C_4H_5NO_3^-$）和 L-苯丙氨酸甲酯，天冬氨酰基失去一分子水即形成碎片离子 *m/z* 97.040 50（$C_4H_3NO_2^-$）；L-苯丙氨酸甲酯脱去 CH_3COOH 和一个 H 后形成碎片离子 *m/z* 118.065 97（$C_8H_8N^-$）；分子离子上天冬氨酰基的 C-C 键断裂失去 $CH_2C=O-O$，再继续失去 NH_2 后和 =O 后则形成 *m/z* 200.071 44（$C_{12}H_{10}O_2N^-$）。糖精钠（$C_7H_4NO_3SNa$）在负离子模式下失去钠离子形成分子离子 *m/z* 181.991 71（$[M-Na]^-$），在高能量下含氮和硫的五元环中 C-S 键和 C-N 键断裂，分别形成碎片离子 *m/z* 105.960 13（$C_7H_6O^-$）和 $CH_2SO_3N^-$，$CH_2SO_3N^-$ 继续裂解形成碎片离子 *m/z* 61.970 55（S=O-N$^-$）。甜蜜素也是含钠盐，且含有磺酰胺键，负离子模式下容易失去钠离子形成分子离子 *m/z* 178.054 26（$[M-Na]^-$），随后在能量轰击下磺酰胺键断裂形成碎片离子 *m/z* 79.957 48（SO_3^-），环己基和氨基的结合键较为稳定，高能量下可能

断裂形成碎子 *m/z* 95.975 99（$SO_3NH_2^-$）。阿力甜（$C_{14}H_{25}N_3O_4S$）含有羧基，容易失去一个 H 形成分子离子 *m/z* 330.150 24（[M-H]$^-$），分子离子脱去一个 H_2O 则形成碎片离子 *m/z* 312.138 12（$C_{14}H_{22}N_3O_3S^-$），$C_{14}H_{22}N_3O_3S^-$ 中的 C-N 键断裂形成碎片离子 *m/z* 113.035 45（$C_4H_5O_2N_2^-$），-O=C-NH- 和 -HC-NH- 中的 C-N 键分别断裂则形成碎片离子 *m/z* 87.056 22（$C_3H_7ON_2^-$）。纽甜（$C_{20}H_{30}N_2O_5$）含有羧基，容易失去一个 H 形成分子离子 *m/z* 377.207 15（[M-H]$^-$），酰胺键（-O=C-NH-）断裂形成碎片离子 *m/z* 200.071 30（$C_{10}H_{18}O_3N^-$）和 L-苯丙氨酸甲酯，L-苯丙氨酸甲酯脱去 CH_3COOH 和一个 H 后形成碎片离子 *m/z* 118.065 97（$C_8H_8N^-$）。



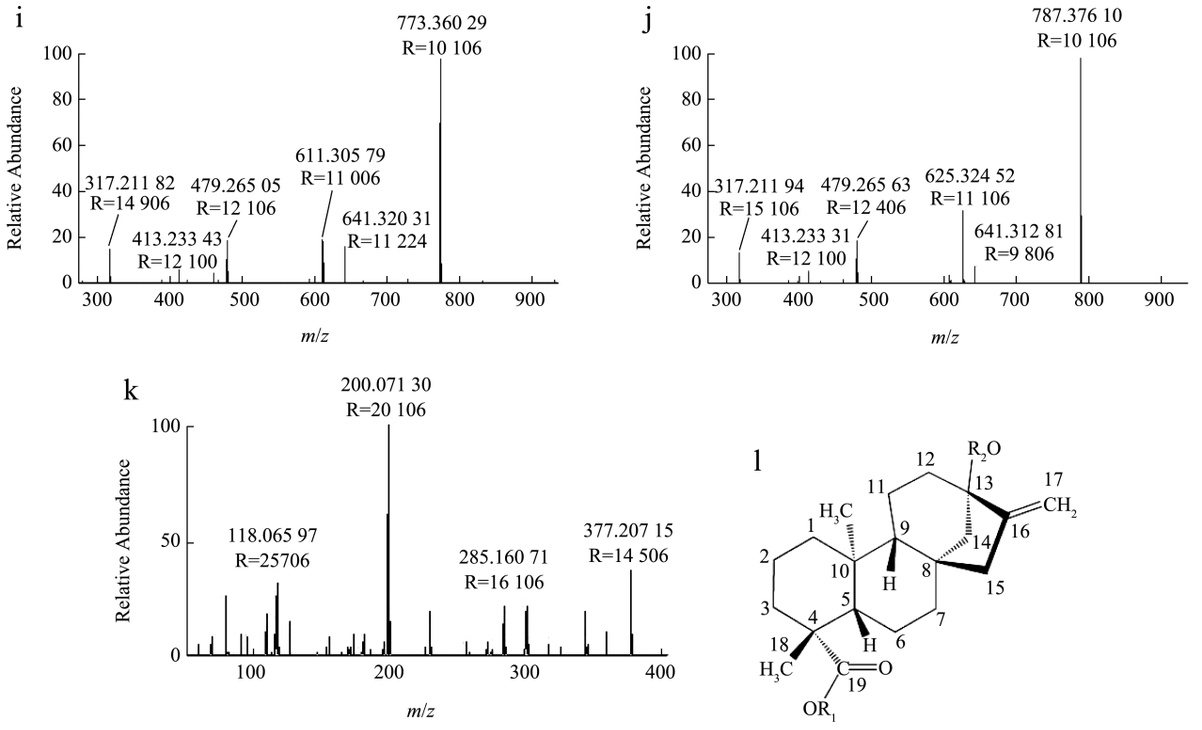


图 2 11 种甜味剂的二级质谱图

Fig.2 The MS^2 spectra of 11 sweeteners

注：(a) 安赛蜜；(b) 阿斯巴甜；(c) 糖精钠；(d) 甜蜜素；(e) 阿力甜；(f) 芦荟苷；(g) 瑞鲍迪苷 A；(h) 甜菊糖苷；(i) 瑞鲍迪苷 F；(j) 瑞鲍迪苷 C；(k) 纽甜；(l) 甜菊糖苷类甜味剂的结构式。

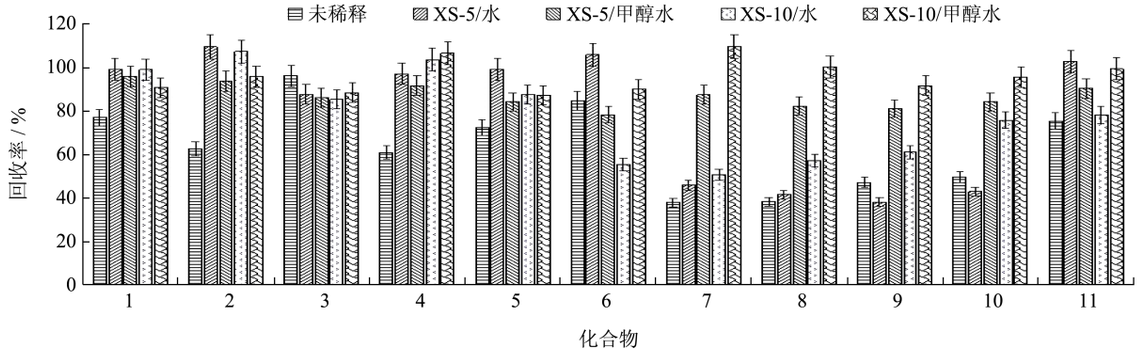


图 3 稀释倍数和稀释溶剂对饮料中 11 种甜味剂回收率的影响

Fig.3 Effects of dilution multiplicity and dilution solvent on the recovery of 11 sweeteners in beverages

2.2 样品前处理条件优化

鉴于本研究涉及的甜味剂均具有良好的水溶性，水系提取液即可很好的提取出目标分析物。为减少基质干扰作用，本研究对比了未稀释、甲醇－水（体积比 1:1）和纯水分别稀释 5 倍、甲醇－水（体积比 1:1）和纯水分别稀释 10 倍对样品加标回收率（加标质量浓度：芦荟苷 1.0 mg/L，其他甜味剂 100 μg/L）的影响，如图 3 所示，未稀释的饮料样品直接测定时，有 6 种甜味剂的加标回收率均小于 70%，尤其芦荟苷和三种瑞鲍迪苷的回收率仅 37.88%~49.61%；在稀释 5 倍或 10 倍后，各甜味剂的加标回收率明显增大，但采用纯水稀释时，三种瑞鲍迪苷的回收率仍小于 70%，相比之下，采用 1:1 的甲醇－水稀释 5 倍和 10 倍时，11 种所测甜味剂的回收率均较好，虽然稀释 10 倍时，回收率要略优于稀释 5 倍，但同样会导致方法检出限变大，因此，为平衡方法检出限和回收率，本研究采用 1:1 的甲醇水对样品稀释 5 倍，此时 11 种甜味剂的加标回收率为 78.31%~95.87%。

2.3 定性筛查

采用 Orbitrap HRMS 进行定性筛查时，可通过建立质谱数据库进行非靶向筛查，数据库主要包含化合物名称、CAS 登记号、主要母离子（分子离子、质子化离子 / 去质子化离子或加成离子）、2~5 个碎片离子（精确质量、化学式）、保留时间等信息。按照欧盟方法学标准 EU 2021/808，涉及到质谱仪的分析方法需要达到至少四个鉴别点（Identification Points, IP）的鉴别要求，其中色谱分离技术为 1 个 IP，高分辨质谱因可以精确测定质荷比，其全扫描离子为 1.5 个 IP，产物离子为 2.5 个 IP[22]，且相对丰度超过基峰强度 10% 的离子均视为有效定性离子。此外，根据欧盟 SANTE/11312/2021 (V2) 标准[18]要求，高分辨质谱定性确证需要 2 个离子（至少包含 1 个碎片离子）的质量数相对误差的绝对值不超过 5 ppm。首先，按照优化好的色谱方法对质量浓度为 1 mg/L（芦荟苷为 10 mg/L）的 11 种甜味剂混合标准溶液进行测定，获取并录入化合物信息、保留时间、母离子和碎片离子至 Trace Finder 软件中，搭建筛查数据库。随后，建立定性筛查方法，以甜味剂的保留时间和母离子作为筛查依据，碎片离子作为确证依据，若测试样品中识别出的化合物保留时间与数据库中误差在 ±0.1 min 内，且母离子和主要碎片离子质量数的相对误差不超过 5 ppm，则可确定样品中含有该种甜味剂成分。

2.4 方法学的建立

2.4.1 基质效应（Matrix Effect, ME）

为探究饮料样品基质对甜味剂在质谱中的影响，分别以空白饮料样品溶液和等体积的甲醇－水作为溶剂制备甜味剂标准溶液。基质效应（ME）通过计算样品基质中标准溶液的峰面积与纯甲醇－水溶液中标准溶液峰面积的比值后再乘以 100% 来量化，其中 ME 等于 100% 时，表明无明显基质效应；80%≤ME≤120%，基质效应轻微，可认为不影响结果测定；若 ME 低于 80%，则说明存在显著的基质抑制作用；相反 ME 超过 120%，则意味着基质具有增加效应[23,24]。本研究对比了样品未稀释，甲醇－水（体积比 1:1）稀释 5 倍和 10 倍对 11 种甜味剂基质效应的影响，如图 4 所示，未稀释样品对大部分甜味剂表现出强烈的基质抑制，而用甲醇－水稀释 5 倍或 10 倍后，11 种待测甜味剂的基质效应为 80.9%~110.9%，此时基质效应可视为不显著，故本研究推荐采用纯溶剂甲醇－水配制标准溶液以进行定量分析。

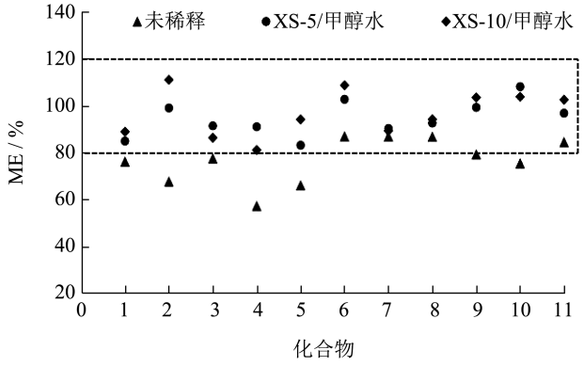


图 4 不同稀释倍数下样品中 11 种甜味剂的基质效应

Fig.4 Matrix effects of 11 sweeteners in samples at different dilutions

2.4.2 线性关系、方法检出限和定量限

在优化的仪器条件下，采用等体积甲醇－水制备系列标准工作溶液，绘制标准曲线，得到 11 种甜味剂的线性关系。通过逐步稀释标准溶液，得到各目标物 3 倍信噪比（*S/N*=3）和 10 倍信噪比（*S/N*=10）所对应的浓度值，分别界定为仪器检出限（ILOD）和仪器定量限（ILOQ），考虑到样品稀释倍数为 5，进一步得到方法检出限（MLOD）和方法定量限（MLOQ）。具体结果展示于表 2 中，11 种甜味剂在各自适宜的浓度区间内展现了优异的线性关系，相关系数 R^2 均大于 0.998，表明了高度的线性拟合度。芦荟苷的方法检出限相对较高，为 150.0 μg/L，方法定量限为 500.0 μg/L；其他 10 种甜味剂的方法检出限为 1.0~15.0 μg/L，方法定量限为 5.0~50.0 μg/L，优于文献报道的其他方法，如 Phungsiangdee 等[25]采用 UHPLC-MS/MS 测定了饮料中 10 种甜菊糖苷类化合物，检出限为 3.0~78.0 μg/kg。说明本研究的方法除芦荟苷外对其他所测甜味剂具有很好的灵敏度。

2.4.3 方法回收率和精密度

在空白饮料样本中实施三浓度加标试验，加标浓度点设为 MLOQ、2×MLOQ 和 10×MLOQ，每个加标浓度平行测试 5 次（*n*=5），计算平均回收率和相对标准偏差（RSD，%），结果见表 2，11 种甜味剂的平均回收率为 77.29%~98.82%，日内精密度 RSD（*n*=5）为 1.5%~9.6%，表明本方法具有优良的回收率和精密度，准确度高。

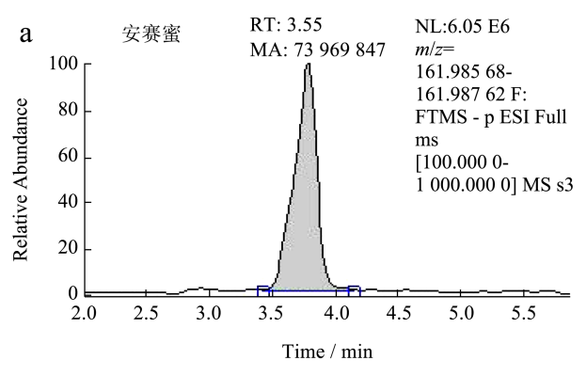
表 2 11种甜味剂的线性范围和线性方程、相关系数、方法检出限和定量限、回收率和精密度

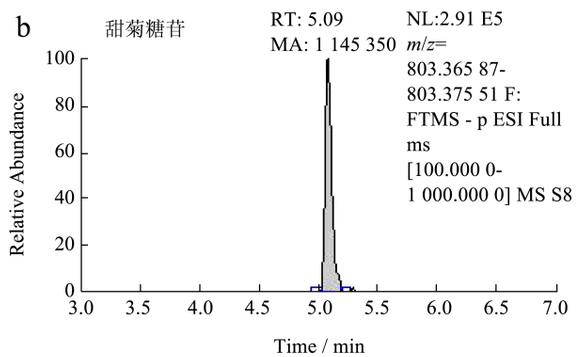
Table 2 Linear ranges, regression equations, MLOD, MLOQ, recoveries and precision for 11 sweeteners

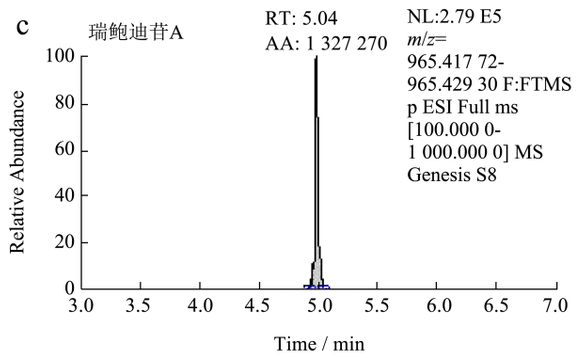
化合物	线性范围/(μg/L)	线性方程	R^2	MLOD /(μg/L)	MLOQ /(μg/L)	加标水平/(μg/L)	平均回收率（RSD，n=5）/%
安赛蜜	2.0~500.0	y=477 014x−148 416	0.999 8	3.0	10.0	10.0, 20.0, 100.0	89.31 (1.5), 91.98 (1.7), 98.82 (3.7)
阿斯巴甜	5.0~500.0	y=124 229x+1 074 571	0.999 6	8.0	25.0	25.0, 50.0, 250.0	86.80 (7.4), 90.11 (8.8), 93.21 (3.9)
糖精钠	1.0~500.0	y=805 769x+380 476	0.999 5	1.0	5.0	5.0, 10.0, 50.0	90.82 (3.2), 91.20 (4.1), 93.90 (7.8)
甜蜜素	1.0~500.0	y=704 353x+1 335 158	1.000 0	1.0	5.0	5.0, 10.0, 50.0	89.21 (3.1), 97.45 (8.6), 96.98 (6.2)
阿力甜	5.0~500.0	y=326 211x−635 631	0.999 6	8.0	25.0	25.0, 50.0, 250.0	91.02 (2.8), 88.40 (2.1), 90.55 (7.6)
芦荟苷	100.0~1 0000.0	y=1 421.8x+144 693	0.999 4	150.0	500.0	500.0, 1 000.0, 5 000.0	79.28 (4.3), 90.00 (2.7), 79.14 (3.9)
瑞鲍迪苷 A	10.0~1 000.0	y=14 035x+129 034	0.999 9	15.0	50.0	50.0, 100.0, 500.0	93.24 (5.8), 95.54 (6.5), 89.08 (4.0)
甜菊糖苷	10.0~1 000.0	y=14 671x+236 057	0.998 3	15.0	50.0	50.0, 100.0, 500.0	81.42 (2.3), 89.50 (5.5), 87.77 (6.5)
瑞鲍迪苷 F	10.0~1 000.0	y=10 710x+90 673	1.000 0	15.0	50.0	50.0, 100.0, 500.0	78.78 (6.3), 92.61 (3.9), 89.30 (9.6)
瑞鲍迪苷 C	10.0~1 000.0	y=24 369x+74.551	0.998 5	15.0	50.0	50.0, 100.0, 500.0	77.29 (3.2), 92.27 (4.1), 90.63 (9.0)
纽甜	2.0~500.0	y=337 065x+781 645	0.998 1	3.0	10.0	10.0, 20.0, 100.0	87.81 (2.8), 96.53 (3.2), 93.09 (4.1)

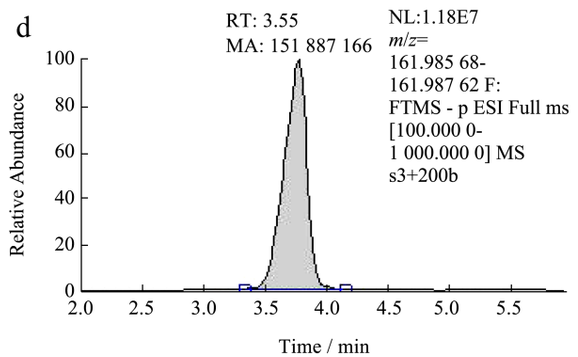
2.5 实际样品的测定

采用本研究所建立的方法对所购买的 30 款饮料样品进行筛查分析，所测饮料样品的配料表中均未写明含有待测甜味剂，结果发现在 2 款水果味饮料中筛查出含有安赛蜜，质量浓度分别为 0.8 和 190.9 mg/L、1 款茶饮料中筛查出含有甜菊糖苷和瑞鲍迪苷 A，质量浓度分别为 94.2 和 62.1 μg/L，未筛查出含有未知甜菊糖苷类甜味剂的共性碎片离子。阳性样品和阳性加标样品中检出物质的提取离子色谱图如图 5 所示。虽然这些饮料中检出的甜味剂含量均未超过 GB 2760-2024[8]（2025 年 2 月 8 日开始实施）中所规定的的最大允许使用量，但存在食品标签内容不全的问题。这个问题在其他研究中也有过报道，如 Yu 等[26]采用液相色谱法测定了 100 款液态乳制品和含乳饮料中的阿斯巴甜和阿力甜，在 43 份样品中检出有阿斯巴甜，含量均低于国家标准。但阳性样品中仅 21 份样品在标签中标有相应甜味剂，大部分样品均未标出。这说明相关部门除了关注样品中甜味剂的含量，还应加强对食品标签的监督管理，以保护消费者的合法权益。









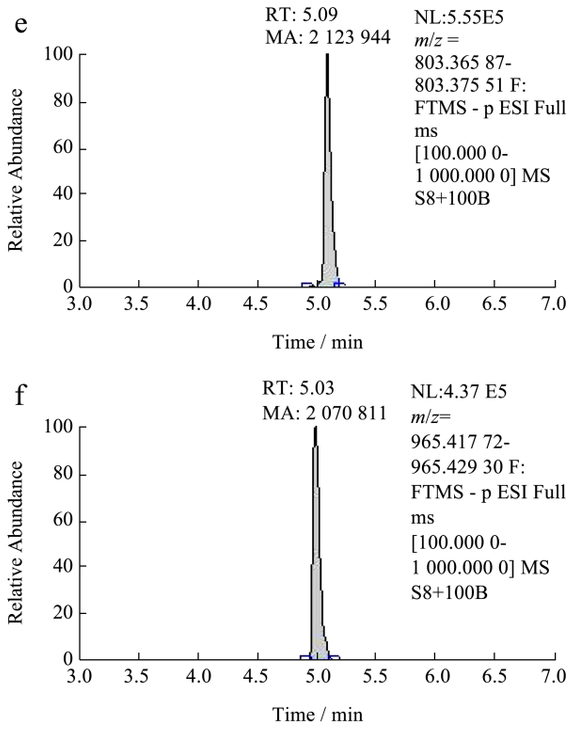


图 5 阳性样品和阳性加标样品提取离子色谱图

Fig.5 Extracted ion chromatograms of positive samples and positive spiked samples

注：a、b、c 为阳性样品；e、d、f 为阳性加标样品。

3 结论

本研究采用超高效液相色谱－四极杆 / 静电场轨道肼高分辨质谱技术，建立了一种针对饮料中 11 种合成及天然甜味物质的定性筛查与定量检测方法。方法可以在无标准品的情况下实现对甜味剂的准确定性，同时通过对甜菊糖苷类甜味剂质谱规律的解析，识别出这类甜味剂都具有 2 个共性碎片离子，可以结合化合物分子式实现对饮料中甜菊糖苷类甜味剂的非靶向筛查。此外，实际样品检测发现虽然饮料中检出有部分甜味剂，但均未超过标准规定的最大使用量。本方法简便快捷、可信度高，为饮料中甜味剂的科学鉴定与定量评估提供了有力支持及依据。

参考文献

[1] 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: 464533.

[2] 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.

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局.GB 2760-2024,食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].北京,中国标准出版社,2024.

[4] 罗庆云,印敏.甜菊糖苷类化合物的质谱行为分析及定量策略初探[J].中国糖料,2022,44(2):28-36.

[5] FOREYT J, KLEINMAN R, BROWN R J, et al. The use of low-calorie sweeteners by children: implications for weight management [J]. Journal of Nutrition, 2012, 142: 1155S-1162S.

[6] AZEEZ O H, ALKASS S Y, PERSIKE D S. Long-term saccharin consumption and increased risk of obesity, diabetes, hepatic dysfunction, and renal impairment in rats [J]. Medicina (B Aires), 2019, 55: 681.

[7] MOSSAVAR-RAHMANI Y, KAMENSKY V, MANSON J E, 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.

[8] GREEN C H, SYN W K. Non-nutritive sweeteners and their association with the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: a review of the literature [J]. European Journal of Nutrition, 2019, 58: 1785-1800.

[9] 解楠.高效液相色谱法同时测定饮料和果冻中9种食品添加剂[J].食品安全质量检测学报,2021,12(4):1524-1530.

[10] YU S, ZHU B, LV F, et al. Rapid analysis of cyclamate in foods and beverages by gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD) [J]. Food Chemistry, 2012, 134: 2424-2429.

[11] 李雪春,林野.气相色谱法测定酱油中甜蜜素[J].理化检验(化学分册),2017,53(2):230-232.

[12] GREIBE E, LETH-MØLLER M, STAMPS S, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of artificial sweeteners in human matrices [J]. Biomedical Chromatography, 2022, 36: 5350.

[13] 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.

[14] HORIE M, ISHIKAWA F, OISHI M, et al. Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1154: 423-428.

[15] 张静,杨鸿斌,谢娟,等.毛细管电泳法同时测定饮料中的阿斯巴甜、糖精钠和安赛蜜[J].现代预防医学,2014,41(20):3768-3770.

[16] 胡巧茹,曹鹏,丛中笑,等.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱对粮谷产品中20种真菌毒素的快速筛查和确证[J].色谱,2019,37(11):1241.

[17] 古飞燕,梁明,段宁馨,等.UPLC-Q-Orbitrap HRMS法筛查动物肌肉组织中16种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂[J].分析试验室,2023,42(7):944-950.

[18] SANTE/11312/2021 (V2), Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed [M]. SANTE, 2021, 11312.

[19] 杨志敏,陈源,刘淑坡,等.UPLC-QTOF-MS法直接检测碳酸饮

料和茶饮料中8种甜味剂[J].实验室研究与探索,2022,41(5):8-11,17.

[20] MOLINA-CALLE M, PRIEGO-CAPOTE F, de CASTRO M D L. Characterization of Stevia leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts [J]. Food Chemistry, 2017, 219: 329-338.

[21] 冯峰,李伟明,孙燕,等.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱非靶标筛查测定白酒和饮料中甜菊糖苷[J].色谱,2019,37(1):87-92.

[22] European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC [S]. Official Journal of the European Union, 2021, 180 (401): 84-109.

[23] WU Y L, LIANG M, XIAN Y P, et al. Fragmentation pathway of hypophosphite ($H_2PO_2^-$) in mass spectrometry and its determination in flour and flour products by LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2022, 377: 132060.

[24] HU J P, LIANG M, XIAN Y P, et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkrekic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method [J]. Food Chemistry, 2022, 395: 133598.

[25] PHUNGSIANGDEE Y, CHAOTHONG P, KARNPANIT W, et al. Validation of UHPLC-ESI-MS/MS method for determining steviol glycoside and its derivatives in foods and beverages [J]. Foods, 2023, 12: 3941.

[26] YU J, HU W, XU D, et al. Determination of aspartame and alitame in liquid dairy products and milk-containing beverages in the Chinese market [J]. Italian Journal of Food Science, 2022, 34(3): 91-98.