

食品中甜味劑之檢驗方法－多重分析

Method of Test for Sweeteners in Foods - Multiple Analysis

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中醋磺內酯鉀(acesulfame potassium)等13品項甜味劑(品項見附表)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3.5 μm ，內徑2.1 mm \times 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達2200 \times g以上者。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；甲酸銨採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；醋磺內酯鉀、alitame、阿斯巴甜(aspartame)、對位乙氧苯脲(dulcin)、甘草素(glycyrrhizin)、新橘皮苷二氫查爾酮(neohesperidin dihydrochalcone, NHDC)、紐甜(neotame)、rebaudioside A、rebaudioside B、環己基(代)磺醯胺酸鈉(sodium cyclamate)、糖精鈉(sodium saccharin)、甜菊糖(stevioside)及蔗糖素(sucralose)等共13品項對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、50 mL及100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.01 M甲酸銨溶液：

稱取甲酸銨6.3 g，以去離子水溶解使成100 mL。取10 mL，再加去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.2. 50% 甲醇溶液：

取甲醇500 mL，加去離子水使成1000 mL。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取0.01 M甲酸銨溶液與甲醇以9：1 (v/v)比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取0.01 M甲酸銨溶液與甲醇以1：9 (v/v)比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之調製：

取相當於含環己基(代)磺醯胺酸鹽及糖精各約10 mg之環己基(代)磺醯胺酸鈉及糖精鈉對照用標準品，醋磺內酯鉀、alitame、阿斯巴甜、對位乙氧苯脲、甘草素、NHDC、紐甜、rebaudioside A、rebaudioside B、甜菊糖及蔗糖素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以50% 甲醇溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時分別量取適量各標準原液混合，以10% 甲醇溶液稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 一般檢體：

2.7.1.1. 液體檢體：

將檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，以50% 甲醇溶液定容至100 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，作為檢液原液。取檢液原液100 μ L (a)，以10% 甲醇溶液定容至1000 μ L (b)，供作檢液。

2.7.1.2. 固體檢體：

將檢體細切均質後，取約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50% 甲醇溶液40 mL，經超音波振盪15分鐘後，以2200 \times g離心10分鐘，取上清液，殘留物再加入50% 甲醇溶液40 mL，重複上述步驟1次，合併上清液，以50% 甲醇溶液定容至100 mL，經濾膜過濾後，作為檢液原液。取檢液原液100 μ L (a)，以10% 甲醇溶液定容至1000 μ L (b)，供作檢液。

2.7.2. 高油脂檢體：

2.7.2.1. 液體檢體：

將檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，以50% 甲醇溶液定容至100 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，取2 mL至離心管中，加入正己烷2 mL，充分混合後，以2000 \times g離心1分鐘，

取下層液作為檢液原液。取檢液原液100 μ L (a)，以10% 甲醇溶液定容至1000 μ L (b)，供作檢液。

2.7.2.2. 固體檢體：

將檢體細切均質後，取約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50% 甲醇溶液40 mL，超音波振盪15分鐘，以2200 \times g離心10分鐘，取上清液，殘留物再加入50% 甲醇溶液40 mL，重複上述步驟1次，合併上清液，以50% 甲醇溶液定容至100 mL，經濾膜過濾後，取2 mL至離心管中，加入正己烷2 mL，充分混合後，以2000 \times g離心1分鐘，取下層液作為檢液原液。取檢液原液100 μ L (a)，以10% 甲醇溶液定容至1000 μ L (b)，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節調製空白檢液原液，分別量取100 μ L (a)，加入標準溶液10~150 μ L，以10% 甲醇溶液定容至1000 μ L (b)，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各甜味劑之波峰面積，與對應之各甜味劑添加濃度，分別製作成10~150 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Eclipse Plus Phenyl-Hexyl，3.5 μ m，內徑2.1 mm \times 15 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

| 時間(min) | A (%) | B (%) |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 0.0 \rightarrow 0.5 | 90 \rightarrow 90 | 10 \rightarrow 10 |
| 0.5 \rightarrow 4.5 | 90 \rightarrow 80 | 10 \rightarrow 20 |
| 4.5 \rightarrow 5.0 | 80 \rightarrow 60 | 20 \rightarrow 40 |
| 5.0 \rightarrow 10.0 | 60 \rightarrow 54 | 40 \rightarrow 46 |
| 10.0 \rightarrow 11.0 | 54 \rightarrow 41 | 46 \rightarrow 59 |
| 11.0 \rightarrow 17.0 | 41 \rightarrow 32 | 59 \rightarrow 68 |
| 17.0 \rightarrow 18.0 | 32 \rightarrow 0 | 68 \rightarrow 100 |
| 18.0 \rightarrow 18.9 | 0 \rightarrow 0 | 100 \rightarrow 100 |
| 18.9 \rightarrow 19.0 | 0 \rightarrow 90 | 100 \rightarrow 10 |
| 19.0 \rightarrow 22.0 | 90 \rightarrow 90 | 10 \rightarrow 10 |

移動相流速：0.35 mL/min。

注入量：5 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

ESI正離子：4 kV；ESI負離子：3.5 kV。

噴嘴電壓(Nozzle voltage)：

ESI正離子：0.5 kV；ESI負離子：1 kV。

乾燥氣溫度(Gas temperature)：300°C。

乾燥氣流量(Gas flow)：8 L/min。

霧化氣體壓力(Nebulizer gas pressure)：45 psi。

鞘氣溫度(Sheath gas temperature)：350°C。

鞘氣流量(Sheath gas flow)：11 L/min

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、碎裂電壓(fragmentor voltage)及碰撞能量(collision energy)如附表。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8節條件進行分析，就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中各甜味劑之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中各甜味劑之含量(g/kg)} = \frac{C \times V \times F}{M} \times 10^{-6}$$

C：由基質匹配檢量線求得各甜味劑之濃度(ng/mL)

V：檢體定容之體積(100 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

註：相對離子強度由定性離子與定量離子之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

| 相對離子強度(%) | 容許範圍(%) |
|-----------|---------|
| > 50 | ± 20 |
| > 20~50 | ± 25 |
| > 10~20 | ± 30 |
| ≤ 10 | ± 50 |

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，醋磺內酯鉀等13品項均為0.01 g/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

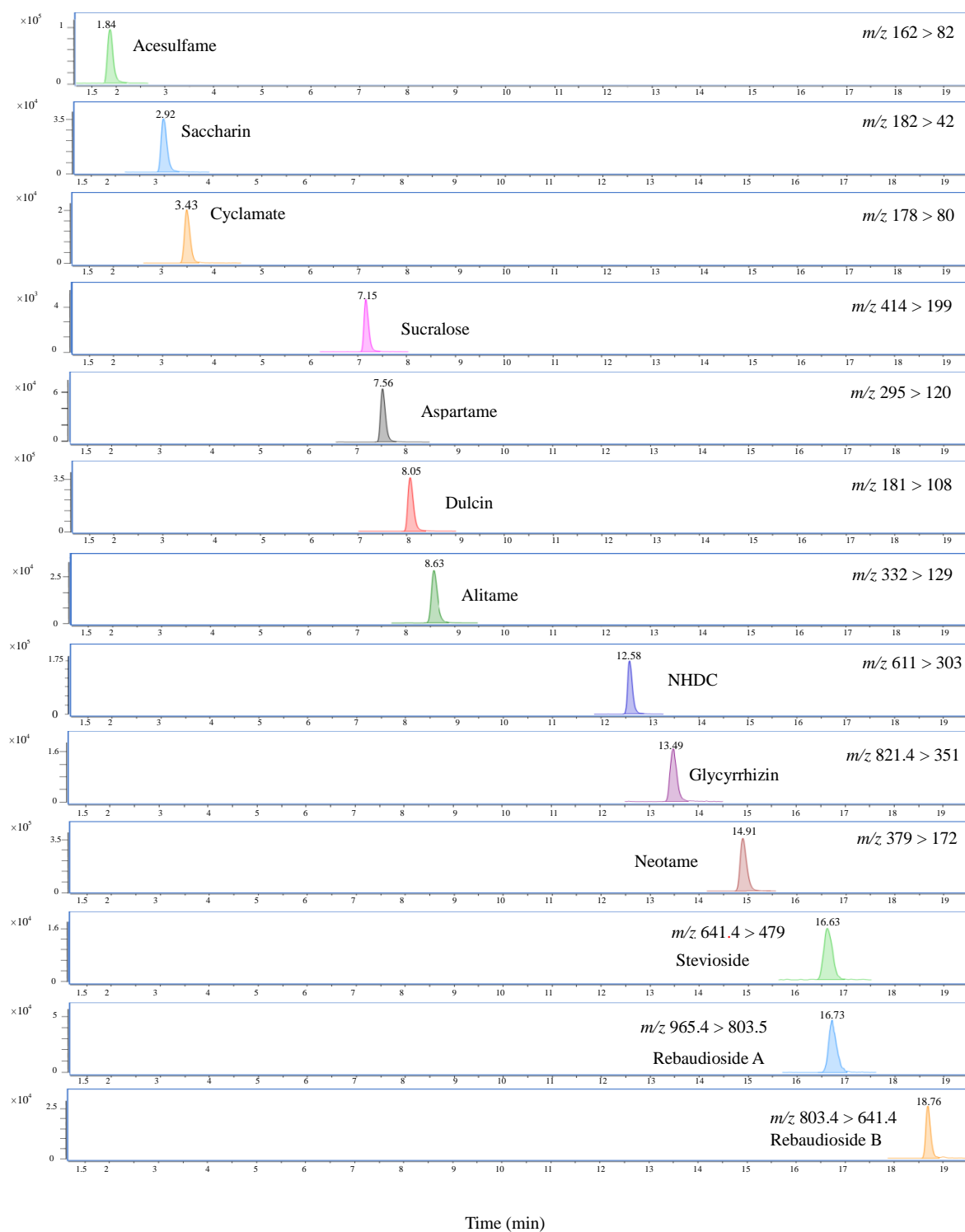
參考文獻：

Koyama, M., Yoshida, K., Uchibori, N., Wada, I., Akiyama, K. and Sasaki, T. 2005. Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. J. Food Hyg. Soc. Japan 48: 72-78.

附表、醋磺內酯鉀等13項甜味劑之多重反應偵測模式參數

| 分析物 | | CAS # | 離子化 模式 | 定量離子對 | | | 定性離子對 | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
| 英文名 | 中文名 | | | 前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z) | 碎裂 電壓 (V) | 碰撞 能量 (eV) | 前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z) | 碎裂 電壓 (V) | 碰撞 能量 (eV) |
| Acesulfame potassium | 醋磺內酯鉀 | 55589-62-3 | ESI ⁻ | 162 > 82 | -102 | 9 | 162 > 78 | -102 | 37 |
| Alitame | — | 80863-62-3 | ESI ⁺ | 332 > 129 | 105 | 16 | 332 > 159 | 105 | 20 |
| Aspartame | 阿斯巴甜 | 22839-47-0 | ESI ⁺ | 295 > 120 | 102 | 25 | 295 > 180 | 102 | 9 |
| Dulcin | 對位乙氧苯脲 (甘精) | 150-69-6 | ESI ⁺ | 181 > 108 | 102 | 25 | 181 > 136 | 102 | 13 |
| Glycyrrhizin | 甘草素 | 1405-86-3 | ESI ⁻ | 821.4 > 351 | -240 | 48 | 821.4 > 113 | -240 | 60 |
| Neohesperidin dihydrochalcone (NHDC) | 新橘皮苷 二氫查爾酮 | 20702-77-6 | ESI ⁻ | 611 > 303 | -226 | 33 | 611 > 125 | -226 | 49 |
| Neotame | 紐甜 | 165450-17-9 | ESI ⁺ | 379 > 172 | 102 | 21 | 379 > 319 | 102 | 13 |
| Rebaudioside A | — | 58543-16-1 | ESI ⁻ | 965.4 > 803.5 | -190 | 28 | 965.4 > 641.4 | -190 | 72 |
| Rebaudioside B | — | 58543-17-2 | ESI ⁻ | 803.4 > 641.4 | -270 | 56 | 803.4 > 317 | -270 | 68 |
| Sodium cyclamate | 環己基(代)磺醯胺 酸鈉 | 139-05-9 | ESI ⁻ | 178 > 80 | -135 | 28 | 178 > 95 | -135 | 36 |
| Sodium saccharin | 糖精鈉 | 128-44-9 | ESI ⁻ | 182 > 42 | -160 | 28 | 182 > 106 | -160 | 17 |
| Stevioside | 甜菊糖 | 57817-89-7 | ESI ⁻ | 641.4 > 479 | -300 | 45 | 641.4 > 317 | -300 | 49 |
| Sucralose | 蔗糖素 | 56038-13-2 | ESI ⁺ | 414 > 199 | 102 | 9 | 414 > 216 | 102 | 5 |

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析醋磺內酯鉀等13項甜味劑標準品之MRM圖譜