



中华人民共和国国家标准

GB xxxx—xxxx

食品安全国家标准 食品中纽甜的测定 (征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

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 发布

前 言

本标准代替GB 5009.247-2016《食品安全国家标准 食品中纽甜的测定》。

本标准与GB 5009.247-2016相比，主要变化如下：

- 适用范围更改为食品中纽甜的测定；
- 优化了样品前处理、净化和检测的条件；
- 增加了液相色谱-质谱/质谱法。

食品安全国家标准公开征求意见

食品安全国家标准

食品中纽甜的测定

1 范围

本标准规定了食品中纽甜的液相色谱和液相色谱-质谱/质谱测定方法。
本标准适用于食品中纽甜的测定。

第一法 液相色谱法

2 原理

试样中的纽甜，经混合提取液提取，含胶基样品经水浴溶解，高脂肪样品经正己烷脱脂，蛋白沉淀剂沉淀蛋白，固相萃取柱净化后，采用液相色谱分离、紫外检测器检测，外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。
- 3.1.2 甲酸(HCOOH)：色谱纯。
- 3.1.3 三乙胺(C₆H₁₅N)。
- 3.1.4 乙酸铵(CH₃COONH₄)：色谱纯。
- 3.1.5 冰乙酸(CH₃COOH)：色谱纯。
- 3.1.6 亚铁氰化钾[K₄Fe(CN)₆·3H₂O]。
- 3.1.7 乙酸锌[Zn(CH₃COO)₂·2H₂O]。
- 3.1.8 氨水(NH₃·H₂O)。
- 3.1.9 正己烷(C₆H₁₄)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 甲酸-三乙胺缓冲液：分别吸取0.8 mL甲酸和2.5 mL三乙胺，加水定容至1 L，pH值约为4.5。
- 3.2.2 混合提取液：量取甲醇400 mL至1 L烧杯，加500 mL甲酸-三乙胺缓冲液，混匀，用甲酸调pH值到4.5，转移至1 L容量瓶，用甲酸-三乙胺缓冲液定容至刻度。
- 3.2.3 混合洗脱液：量取甲醇700 mL至1 L容量瓶，用甲酸-三乙胺缓冲液定容至刻度。
- 3.2.4 乙酸铵溶液(20 mmol/L)：称取1.54 g乙酸铵，用500 mL水溶解，加入1.0 mL冰乙酸，加水定容至1 L。
- 3.2.5 亚铁氰化钾溶液(92 g/L)：称取106 g亚铁氰化钾，加入适量水溶解，用水定容至1 L。

3.2.6 乙酸锌溶液(183 g/L)：称取 220 g 乙酸锌，加入适量水溶解，加入 30 mL 冰乙酸，用水定容至 1 L。

3.2.7 氨水溶液(20%)：量取200 mL氨水至1 L容量瓶，用水定容至刻度。

3.3 标准品

3.3.1 纽甜标准品 ($C_{20}H_{30}N_2O_5$, CAS 号:165450-17-9)：纯度 $\geq 99.0\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液 (1.00 mg/mL)：准确称取100 mg (精确至0.0001 g) 标准品，用甲酸-三乙胺缓冲液溶解并定容至100 mL容量瓶中，摇匀，于4℃下避光保存，有效期3个月。

3.4.2 标准工作液：分别吸取适量标准储备液 (1.00 mg/mL)，用甲酸-三乙胺缓冲液配制成浓度分别为 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作液，临用现配。

3.5 材料

3.5.1 固相萃取柱 (500 mg/6 mL，聚苯乙烯吡咯烷酮聚合物填料，或性能相当者)。

3.5.2 微孔滤膜：有机系，0.45 μm 。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：带紫外检测器。

4.2 天平：感量分别为 0.01 g 和 0.0001 g。

4.3 pH 计：精度为 0.01。

4.4 涡旋混合器。

4.5 离心机：转速 ≥ 4000 r/min。

4.6 氮吹仪。

4.7 超声波清洗器。

4.8 粉碎机。

4.9 水浴锅。

4.10 固相萃取装置。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

5.1.1 试样制备

液态样品摇匀待提取；基质均匀的半固态样品和粉状样品待提取；其他样品需匀浆或粉碎均匀待提取，制备好的试样于 0℃~5℃保存待检测。

5.1.2 试样提取

食品安全国家标准公开征求意见

5.1.2.1 含胶基的糖果、果冻及鸡精等样品

准确称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 25 mL 混合提取液, 于 60 °C 水浴加热 30 min, 冷却至室温, 用甲酸或氨水溶液(20 %)调 pH 值至 4.5, 超声 30 min, 加入 1 mL 亚铁氰化钾溶液(92 g/L)和 1 mL 乙酸锌溶液(183 g/L), 漩涡混匀, 4000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 50 mL 容量瓶。残渣加入 20 mL 混合提取液, 振荡 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 合并上清液。用混合提取液定容至刻度, 滤纸过滤待净化。

5.1.2.2 油脂类调味料、巧克力及奶油等样品

准确称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 25 mL 混合提取液, 于 60 °C 水浴加热并超声 30 min, 加 5 mL 正己烷, 振荡 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层, 之后的操作同 5.1.2.1 中“用甲酸或氨水溶液(20 %)调 pH 值至 4.5”后续步骤相同。

5.1.2.3 其余样品

准确称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 25 mL 混合提取液, 涡旋 5 min, 之后的操作同 5.1.2.1 中“用甲酸或氨水溶液(20 %)调 pH 值至 4.5”后续步骤相同。

5.1.3 试样净化

固相萃取柱使用前依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水进行活化, 保持柱体湿润。取 10.0 mL 的上述滤液通过活化后的固相萃取柱, 5 mL 甲酸-三乙胺缓冲液淋洗, 弃去全部流出液。用 8 mL 混合洗脱液洗脱, 收集洗脱液于 60 °C 水浴氮吹浓缩至约 1 mL, 用甲酸-三乙胺缓冲液定容至 2.0 mL, 经 0.45 μm 滤膜过滤后待进样。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱: C₁₈, 150 mm×4.6 mm, 5 μm, 或相当者。

5.2.2 柱温: 30 °C。

5.2.3 流动相: A 相: 甲醇; B 相: 乙酸铵溶液(20 mmol/L)。梯度洗脱程序见表 1。

5.2.4 流速: 1.0 mL/min。

5.2.5 检测波长: 210 nm。

5.2.6 进样量: 50 μL。

表 1 流动相洗脱参考梯度表

时间 (min)	流动相 A/ (%)	流动相 B/ (%)
0.00	10	90
4.00	60	40
20.00	60	40
20.01	10	90
25.00	10	90

5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中, 测定相应的峰面积, 以标准系列工作液中纽甜的浓度为横坐标, 以峰面积的响应值为纵坐标, 绘制标准曲线。纽甜标准溶液的色谱图参见附录 A 中图 A。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中, 保留时间定性, 峰面积定量, 根据标准曲线得到待测液中纽甜的浓度。

6 分析结果的表述

试样中纽甜的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times V_1 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X ——试样中纽甜的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
 - ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中纽甜的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
 - V ——试样浓缩后的定容体积，单位为毫升（mL）；
 - V_1 ——试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；
 - V_2 ——吸取用于净化的滤液的体积，单位为毫升（mL）；
 - m ——试样的取样量，单位为克（g）；
 - 1000 ——换算系数；
- 计算结果保留三位有效数字。

7 精密度

计算结果在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

8 其他

当称样量为5 g时，本方法的检出限为1 mg/kg，定量限为5 mg/kg。

第二法 液相色谱-质谱/质谱法

9 原理

试样中的纽甜，经混合提取液提取，含胶基样品经水浴溶解，高脂肪样品经正己烷脱脂，蛋白沉淀剂沉淀蛋白，固相萃取柱净化后，采用液相色谱-质谱/质谱法测定，基质校准曲线外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 试剂

- 10.1.1 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。
- 10.1.2 甲酸(HCOOH)：色谱纯。
- 10.1.3 三乙胺($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$)。
- 10.1.4 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)：色谱纯。
- 10.1.5 冰乙酸(CH_3COOH)：色谱纯。
- 10.1.6 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。
- 10.1.7 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 。
- 10.1.8 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 10.1.9 正己烷(C_6H_{14})。

10.2 试剂配制

同 3.2。

10.3 标准品

10.3.1 纽甜标准品 ($C_{20}H_{30}N_2O_5$, CAS 号:165450-17-9)：纯度 $\geq 99.0\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.4 标准溶液配制

10.4.1 标准储备溶液 (1.00 mg/mL) 准确称取 100 mg (精确至 0.0001 g) 标准品，用甲酸-三乙胺缓冲液溶解，并定容至 100 mL 容量瓶中，摇匀，于 4 °C 下避光保存，有效期 3 个月。

10.4.2 标准中间溶液 (10.0 $\mu\text{g/mL}$)：吸取适量标准储备液 (1.00 mg/mL)，用甲酸-三乙胺缓冲液配制成浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准中间溶液，临用现配。

10.4.3 标准中间溶液 (1.00 $\mu\text{g/mL}$)：吸取适量标准中间液 (10.0 $\mu\text{g/mL}$)，用空白样品基质液配制成浓度为 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 标准中间溶液，临用现配。

10.4.4 标准工作溶液：分别吸取适量标准中间液 (1.00 $\mu\text{g/mL}$)，用空白样品基质液配制成浓度为 5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL 和 100 ng/mL 的系列标准工作液，临用现配。

10.5 材料

10.5.1 固相萃取柱 (500 mg/6 mL，聚苯乙烯吡咯烷酮聚合物填料，或性能相当者)。

10.5.2 微孔滤膜：有机系，0.22 μm 。

11 仪器和设备

11.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪：带电喷雾离子源(ESI)。

11.2 天平：感量分别为 0.01 g 和 0.0001 g。

11.3 pH 计：精度为 0.01。

11.4 涡旋混合器。

11.5 离心机，转速 ≥ 4000 r/min。

11.6 超声波清洗器。

11.7 粉碎机。

11.8 水浴锅。

11.9 固相萃取装置。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

12.1.1 试样制备

同 5.1.1。

12.1.2 试样提取

同 5.1.2。

12.1.3 试样净化

固相萃取柱使用前依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水进行活化，保持柱体湿润。取 10.0 mL 的上述滤液通过活化后的固相萃取柱，5 mL 甲酸-三乙胺缓冲液淋洗，弃去全部流出液。用 8 mL 混合洗脱液洗脱，收集洗脱液，用甲酸-三乙胺缓冲液定容至 10.0 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后待进样。

12.2 仪器参考条件

12.2.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱： C_{18} ，150 mm \times 3.0 mm，3 μm ，或相当者。
- 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 流动相：A 相：甲醇；B 相：乙酸铵溶液(5 mmol/L)。梯度洗脱程序见表 2。
- 流速：0.3 mL/min。
- 进样量：5 μL 。

表 2 流动相洗脱参考梯度表

时间 (min)	流动相 A/ (%)	流动相 B/ (%)
0.00	10	90
2.00	80	20
11.00	80	20
11.01	10	90
15.00	10	90

12.2.2 质谱参考条件

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：负离子模式；
- 检测方式：多反应监测(MRM)；
- 碰撞气(CAD)：Medium；
- 电喷雾电压(IS)：-4500 V；
- 离子源温度(TEM)：550 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 定性离子对、碰撞能量、去簇电压、碰撞室出入口电压和碰撞室出口电压见附录 B 中表 B。

12.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱-质谱/质谱联用仪，测定相应的峰面积。以标准系列工作液中纽甜的浓度为横坐标，定量离子峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。纽甜标准溶液的色谱图参见附录B中图B。

12.4 试样溶液的定性测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪中，保留时间定性。所选择的离子对均出现，各定性离子的相对丰度与标准品离子的相对丰度相比，偏差不超过表3规定的范围，则可判断样品中存在纽甜。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的相对偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

12.5 试样溶液的定量测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪中，得到纽甜定量离子峰面积，根据标准曲线计算试样溶液中纽甜的浓度。

13 分析结果的表述

试样中纽甜的含量按公式（2）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times V_1 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- X ——试样中纽甜的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
 - ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中纽甜的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 - V ——试样净化后的定容体积，单位为毫升（mL）；
 - V_1 ——试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；
 - V_2 ——吸取用于净化的滤液体积，单位为毫升（mL）；
 - m ——试样的取样量，单位为克（g）；
 - 1000 ——换算系数；
- 计算结果保留三位有效数字。

14 精密度

计算结果在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

15 其他

当称样量为5 g时，本方法的检出限为0.03 mg/kg，定量限为0.1 mg/kg。

食品安全国家标准公开征求意见

附录 A

纽甜液相色谱图

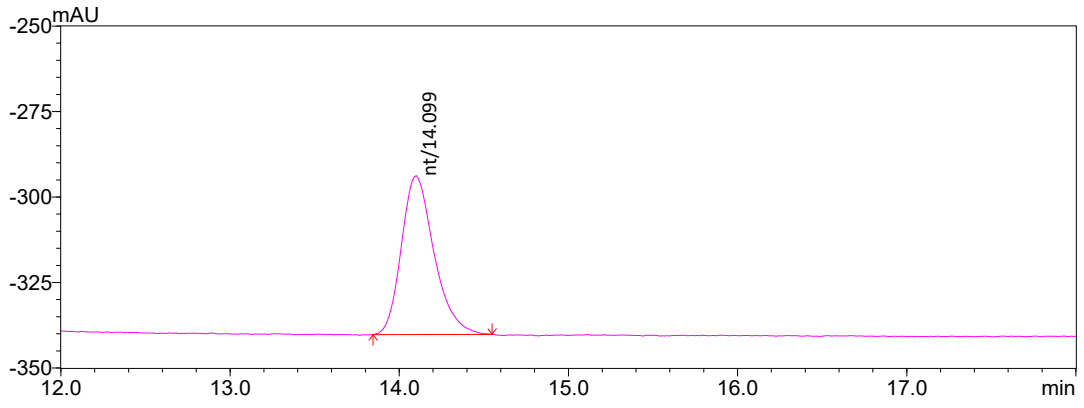


图 A 纽甜标准溶液液相色谱图 (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

食品安全国家标准公开征求意见

附录 B

液相色谱-质谱/质谱法质谱参数及特征离子质谱图

表 B 质谱参数

化合物	参考保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压(DP) V	碰撞能量(CE) eV
纽甜	9.99	377.4	200.3*	-65	-26
			345.3		-19

注：带“*”为定量离子

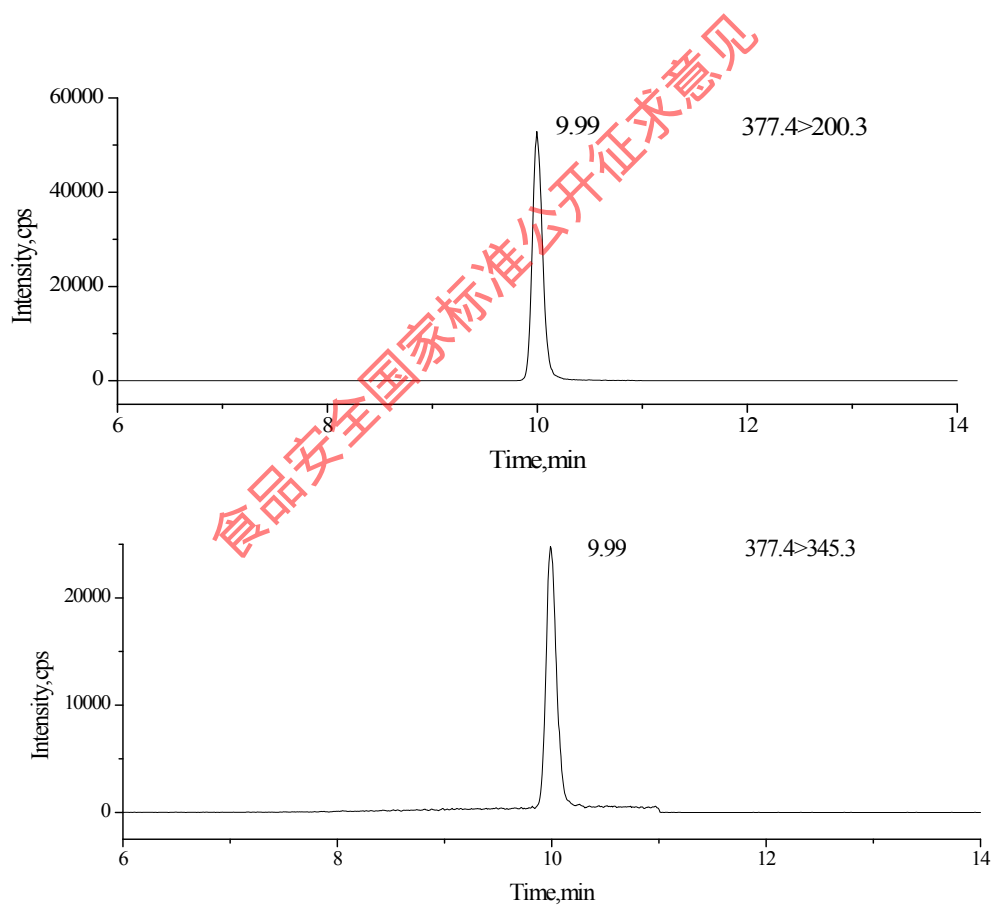


图 B 纽甜标准溶液液相色谱-质谱/质谱图 (20 ng/mL)