

中华人民共和国国家标准

GB 5009.247—2025

食品安全国家标准 食品中纽甜的测定

2025-03-16 发布

2025-09-16 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:

- 修改了标准的适用范围;
- 修改了样品前处理方法;
- 增加了第二法 液相色谱-串联质谱法。

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-串联质谱测定方法。

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

试样用混合提取液提取,含胶基试样经水浴溶解、高脂肪试样经正己烷脱脂,蛋白沉淀剂沉淀蛋白,固相萃取净化后液相色谱仪测定,保留时间定性,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(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。
- 3.1.3 三乙胺($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$)。
- 3.1.4 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):色谱纯。
- 3.1.5 冰乙酸(CH_3COOH):色谱纯。
- 3.1.6 亚铁氰化钾 [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]。
- 3.1.7 乙酸锌 [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]。
- 3.1.8 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.9 正己烷(C_6H_{14})。

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 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,用甲酸调 pH 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

纽甜标准品($C_{20}H_{30}N_2O_5$, CAS 号:165450-17-9);纯度 $\geqslant 99.0\%$,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 0.000 1 g)标准品,甲酸-三乙胺缓冲液溶解并定容至 100 mL。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质量浓度为 0.500 μ g/mL、1.00 μ g/mL、5.00 μ g/mL、10.0 μ g/mL、50.0 μ g/mL 和 100 μ g/mL 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 μ m。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪:带紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.2 天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

4.3 pH 计:精度为 0.01。

4.4 涡旋混合器。

4.5 离心机:转速 $\geqslant 4\,000$ 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 试样前处理

5.1.1 试样制备

液态试样摇匀待提取;基质均匀的半固态试样和粉状试样待提取,其他样品需匀浆或粉碎均匀待提取,制备好的试样 0 ℃~5 ℃保存待检测。

5.1.2 试样提取

5.1.2.1 含胶基的糖果、果冻及鸡精等试样

准确称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 25 mL 混合提取液,于 60 ℃水浴振荡 30 min。冷却至室温,用甲酸或氨水溶液(20%)调 pH 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),涡旋混匀,4 000 r/min离心5 min。上清液经滤纸过滤并转移至50 mL容量瓶。残渣加入20 mL混合提取液,振荡5 min,4 000 r/min离心5 min,上清液经滤纸过滤合并,用混合提取液定容至刻度,作为试样提取液待净化。

5.1.2.2 油脂类调味料、巧克力及奶油等试样

准确称取5 g试样(精确到0.01 g)于50 mL离心管中,加入25 mL混合提取液,于60 ℃水浴振荡30 min。加5 mL正己烷,振荡5 min,4 000 r/min离心5 min,弃去正己烷层。之后的操作同5.1.2.1“用甲酸或氨水溶液(20%)调pH至4.5”后续步骤。

5.1.2.3 其余试样

准确称取5 g试样(精确到0.01 g)于50 mL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“用甲酸或氨水溶液(20%)调pH至4.5”后续步骤。

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水活化,保持柱体湿润。取10.0 mL上述试样提取液过固相萃取柱,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 ℃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,作为试样溶液待上机测定。

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 ℃。

5.2.3 流动相:A相为甲醇;B相为乙酸铵溶液(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

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

将系列标准工作液分别注入液相色谱仪,测定相应的峰面积。以系列标准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见附录A中图A.1。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液经0.45 μm滤膜过滤后注入液相色谱仪。保留时间定性,峰面积定量,根据标准曲线得到试样溶液中纽甜的浓度。

5.5 空自试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

6 分析结果的表述

试样中纽甜含量按公式(1)计算：

式中：

X ——试样中纽甜含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

——由标准曲线得到的试样溶液中纠甜的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL)。

V_1 ——试样提取液定容体积, 单位为毫升(mL);

1 000 ——换算系数：

m ——试样质量, 单位为毫克(g);

V_0 ——用毛净化的试样提取液体积, 单位为毫升(mL)

计算结果保留三位有效数字

7 精密度

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-串联质谱法

9 原理

试样用混合提取液提取,含胶基试样经水浴溶解、高脂肪试样经正己烷脱脂,蛋白沉淀剂沉淀蛋白,固相萃取净化后液相色谱-串联质谱仪测定,保留时间和特征离子丰度比定性,基质标准曲线外标法定量。

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。

- 10.1.4 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

乙酸铵溶液(5 mmol/L)：称取 0.385 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。其余同 3.2。

10.3 标准品

同 3.3。

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 0.000 1 g)标准品，用甲酸-三乙胺缓冲液溶解并定容至 100 mL。于 4 ℃下避光保存，有效期 3 个月。

10.4.2 标准中间溶液(10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：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为质量浓度 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间溶液，临用现配。

10.4.3 标准中间溶液(1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：吸取适量标准中间液(10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，用空白样品基质液配制成为质量浓度 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间溶液，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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，用空白样品基质液配制成为质量浓度为 5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 和 500 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-串联质谱仪：配电喷雾离子源(ESI)。
- 11.2 天平：感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 11.3 pH 计：精度为 0.01。
- 11.4 涡旋混合器。
- 11.5 离心机，转速 $\geq 4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。
- 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 试样前处理

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 水活化,保持柱体湿润。取 10.0 mL 上述试样提取液过固相萃取柱,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,作为试样溶液待上机测定。

12.2 仪器参考条件

12.2.1 液相色谱参考条件

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

表 2 流动相洗脱参考梯度

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

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:负离子模式;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 碰撞气(CAD):中等;
- e) 电喷雾电压(IS):-4 500 V;

- f) 离子源温度(TEM): 550 °C;
 g) 参考保留时间、母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量, 见附录 B 中表 B.1。

12.3 标准曲线的制作

将系列标准工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪,测定相应的峰面积。以系列标准工作液中纽甜浓度为横坐标,以定量离子峰面积响应值为纵坐标,绘制标准曲线。纽甜标准溶液色谱图见附录 B 中图 B.1。

12.4 试样溶液的定性测定

试样溶液经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后注入液相色谱-串联质谱仪,保留时间定性,变化范围应在 $\pm 2.5\%$ 之内。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,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(含)	10~20(含)	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

12.5 试样溶液的定量测定

试样溶液经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后注入液相色谱-串联质谱仪, 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。若检测样品浓度超出线性范围, 应进行相应地稀释, 使之在线性范围内再检测。

12.6 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

13 分析结果的表述

试样中纽甜的含量按公式(2)计算:

式中：

X ——试样中纽甜含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——由标准曲线得到的试样溶液中纽甜的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样溶液的定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——试样提取液定容体积, 单位为毫升(mL);

1 000——換算系数。

m ——试样质量 单位为克(g)；

V ——用于净化的试样提取液体积，单位为毫升(mL)

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。

附录 A
纽甜标准溶液液相色谱图

纽甜标准溶液液相色谱图见图 A.1。

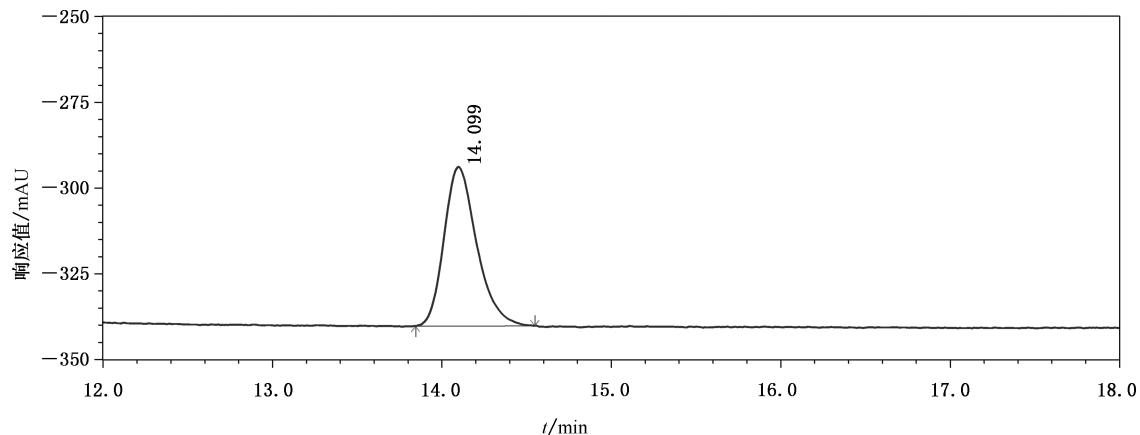


图 A.1 纽甜标准溶液(10.0 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图

附录 B
液相色谱-串联质谱法质谱参数及特征离子质谱图

液相色谱-串联质谱法质谱参数见表 B.1。

表 B.1 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。

纽甜标准溶液液相色谱-串联质谱图见图 B.1。

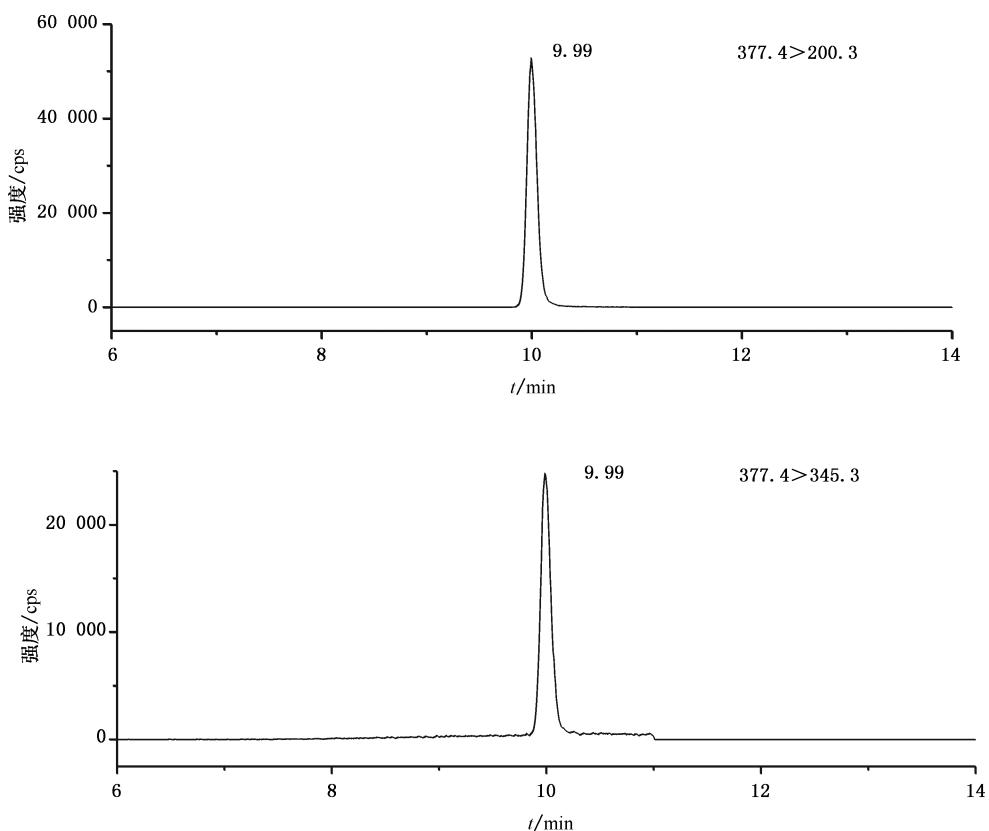


图 B.1 纽甜标准溶液(20 ng/mL)液相色谱-串联质谱图