

高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素

肖锋*, 张毅, 陈沛金, 侯乐锡, 易冰清, 岳振峰

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518000)

摘要: **目的** 建立了高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的方法。**方法** 样品经 Tris 溶液和乙腈振荡提取, 离心后提取液用正己烷脱脂过滤后上机测定, 外标法定量。**结果** 3种化合物在 5.0~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 在液态奶中测定低限均为 25 $\mu\text{g/kg}$, 在奶粉中测定低限均为 50 $\mu\text{g/kg}$, 方法加标收率在 89.5%~115%之间, 相对标准偏差(RSD)小于 15.6%。**结论** 该方法简便、快速、准确, 灵敏度及精密度高, 适用于婴幼儿食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定。

关键词: 婴幼儿配方食品; 香兰素; 甲基香兰素; 乙基香兰素; 高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in infant formulas by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

XIAO Feng*, ZHANG Yi, CHEN Pei-Jin, HOU Le-Xi, YI Bing-Qing, YUE Zhen-Feng

(Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: Objective A method is presented for the quantitative determination and confirmation of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in infant formulas by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by Tris solution and acetonitrile. The supernatant was centrifuged and defatted by *n*-hexane before the 0.22 μm filter apparatus was used, finally detected by HPLC/MS/MS and quantitated by external standard method. **Results** A good linearity of three compounds was obtained in the range of 5.0~200 $\mu\text{g/L}$. The limits of detection of three compounds were 25 $\mu\text{g/kg}$ in liquid milk and 50 $\mu\text{g/kg}$ in milk powder. Mean recoveries of three compounds ranged from 89.5% to 115%. The relative standard deviation was less than 15.6%. **Conclusion** The method was proved to be a simple, rapid, accurate and sensitive method and was successfully applied to detect vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in infant formula.

KEY WORDS: infant formula; vanillin; methyl vanillin; ethyl vanillin; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAK08B01)、深圳市基础研究项目(JCY201110097、JCYJ2012061872144497)

Fund: Supported by the National Key Technology R&D Program (2012BAK08B01) and Shenzhen Basic Research Plan Project (JCY201110097, JCYJ2012061872144497)

通讯作者: 肖锋, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: mxiaofeng2003@163.com

***Corresponding author:** XIAO Feng, Engineer, Food Inspection Center of CIQ-Shenzhen, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: mxiaofeng2003@163.com

1 引言

香兰素包括甲基香兰素和乙基香兰素(化学结构见图 1), 是食品中重要的香味添加剂, 常用于冰淇淋、饮料、糖果、饼干等起助香作用。目前, 我国食品工业中使用的香兰素基本上均采用人工合成, 食用香兰素含量过多的食品可能会对肝、肾、脾等脏器产生副作用, 同时香兰素含量过多会影响食品的口感, 导致头晕、恶心等不适症状, 因此食品中香兰素的含量是评价食品安全的一个重要指标。

GB2760-2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[1]明确规定指出, 较大婴儿和幼儿配方食品中可以使用香兰素、乙基香兰素和香荚兰豆浸膏, 最大使用量分别为 5 mg/100 mL、5 mg/100 mL 和按照生产需要适量使用, 其中 100 mL 以即食食品计, 生产企业应按照冲调比例折算成配方食品中的使用量; 婴幼儿谷类辅助食品中可以使用香兰素, 最大使用量为 7 mg/100 g, 其中 100 g 以即食食品计, 生产企业应按照冲调比例折算成谷类食品中的使用量; 但凡使用范围涵盖 0 至 6 个月婴幼儿配方食品禁止添加任何食用香料。

目前我国尚无婴幼儿配方和谷类食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的标准检测方法, 香兰素的测定最常用的是高效液相色谱法^[2-4]、紫外分光光度法^[5,6]、电化学法^[7-9]、气相色谱法^[10-12]和气相色谱质谱法^[13,14], 这些检测方法的检出限较高, 过高的检出限容易对检测结果尤其是 1 段配方奶粉造成误判。近年来有液相色谱-质谱联用^[15]测定香兰素的报道, 该方法操作较复杂, 耗时长, 回收率较差, 且只测定甲基香兰素和乙基香兰素, 不适于实际样品中香兰素类化合物的快速准确检测。本文建立婴幼儿配方食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的高效液相色谱-串联质谱测定方法, 为婴幼儿食品安全质量监控

和检验提供技术支持。

2 材料与方方法

2.1 仪器与试剂

液质联用仪(API 5500), 配置 ESI 离子源和 Agilent 1290 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 万分之一电子天平(瑞士 Mettler-Toledo); Milli-Q 超纯水器(美国密理博公司); 3K18 离心机(美国 Sigma 公司); 涡旋混合器(德国 Heidolph 公司)。

香兰素(CAS: 121-33-5)、乙基香兰素(CAS: 121-32-4)、甲基香兰素(CAS: 120-14-9)(纯度 99.9%, Sigma 公司); 甲醇、甲酸、乙腈、正己烷、乙酸铵(色谱纯, Merck 公司); 水为超纯水; 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐(Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)(色谱纯, Sigma 公司)。

Tris 缓冲溶液: 准确称取相当于 484.6 mg(精确到 0.1 mg)的 Tris(需折算纯度), 以少量超纯水溶解后定容至 200 mL 容量瓶, 配制成 20 mmol/L pH 值为 10 的 Tris 缓冲溶液。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素各 50.0 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈定容配成 500 mg/L 的标准储备液。准确移取各标准储备液 1.0 mL 于 50 mL 容量瓶, 用乙腈定容得到混合标准溶液, 该溶液可在 -18 °C 下避光存放 3 个月。标准工作曲线用空白基质提取液配制。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 EC-C18(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 流动相: 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸)(A)和甲醇(B); 梯度洗脱程序: 0~2 min, 95%A; 7~8 min, 5%A; 8.5~13.5min, 95%A。柱温: 25 °C; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 10 μL。

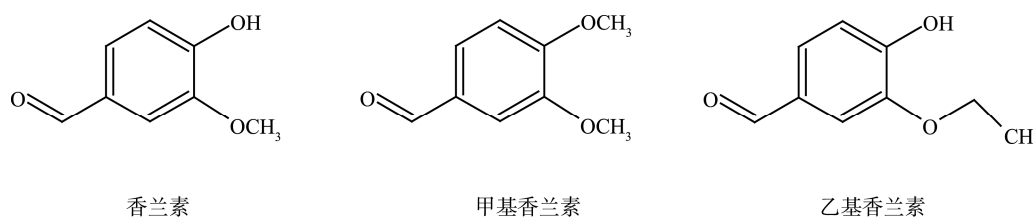


图 1 香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin

2.2.3 质谱条件

甲基香兰素在 ESI+模式下采集, 质谱条件如下: 分辨率: 单位分辨率; CUR: 40 psi; CAD: Medium; TEM: 500 °C; GS1: 40.00 psi; GS2: 60.00 psi; IS: 5000.00 V。

香兰素和乙基香兰素在 ESI-模式下采集, 质谱条件如下: 分辨率: 单位分辨率; CUR: 40 psi; CAD: Medium; TEM: 500 °C; GS1: 40.00 psi; GS2: 60.00 psi; IS: -4500.00 V。

化合物质谱参数见表 1。

2.2.4 样品前处理

称取乳粉样品 1 g(精确到 0.01 g)置于 50 mL 离心管中, 加入 3.0 mL 20 mmol/L 的 Tris 缓冲溶液充分分散; 称取液态乳样品 2 g(精确到 0.01g)置于 50 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 20 mmol/L 的 Tris 缓冲溶液充分分散。将上述样液以高速涡旋混合 1 min, 加入 7.0 mL 乙腈, 再涡旋混合 1 min, 振荡提取 20 min, 9500 r/min 离心 10 min。移取 2.0 mL 上清液至另一 15 mL 离心管, 加入 2.0 mL 正己烷, 涡旋混合 1 min, 9500 r/min 离心 5 min, 取下层清液, 过 0.22 μm 有机滤膜, 供高效液相色谱串联质谱测定。

3 结果与讨论

3.1 提取方法的选择和优化

三种香兰素类化合物均具有较强极性, 易溶于极性溶剂, 加上研究对象为乳基婴幼儿食品, 因此提取溶剂不仅要能萃取目标物, 同时也要有较好的除蛋白效果。实验比较了水-乙腈、Tris 缓冲-乙腈的提取效果。选取水-乙腈提取时发现尽管乙腈有除蛋白的作用, 但对于婴幼儿配方乳粉中的小分子蛋白和

一些采用分子包埋技术保护的营养成分, 沉淀效果不理想, 出现了不同程度的乳化现象, 无法较好地提取目标化合物。由于香兰素和乙基香兰素分子结构上其含有酚羟基, 具有在碱性条件下以酚盐形式存在、在水相中溶解度大, 酸性条件下以分子形式存在, 在有机溶剂中的溶剂度更大的性质。因此, 实验以 20 mmol/L 的 Tris 溶液(pH =10)溶解样品, 然后加入乙腈振荡提取, 离心后以正己烷脱脂。该提取方法通过回收率及重复性进行评价, 结果令人满意。

3.2 质谱分析条件优化

采用微量挤压泵连续进样的方式, 以待测物的标准溶液(5.0 mg/L)进行一级质谱全扫描(Full Scan), 确定其准分子离子。实验发现甲基香兰素在 ESI+模式下有较高的准分子离子峰 $m/z=167.0 [M+H]^+$, 香兰素和乙基香兰素在 ESI-模式下有 $m/z=151.0 [M-H]^-$ 和 $m/z=165.0 [M-H]^-$ 的准分子离子峰。以准分子离子峰为母离子进行二级质谱扫描, 选择丰度较高的两个离子为定量和定性离子, 具体见表 1。分别优化各个离子对的去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞能(collision energy, CE)和碰撞室出口电压(collision cell exit potential, CXP)。综合所有离子对获得最强响应信号时质谱条件, 优化了质谱离子源温度、气帘气压力、雾化气压力和辅助气压力。

经优化后甲基香兰素在 ESI+模式下采集, 香兰素和乙基香兰素在 ESI-模式下采集。香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的重构离子色谱图见图 2。考虑到分别在 ESI+、ESI-模式下检测三种目标化合物, 以甲醇-乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸溶液)流动相按 2.2.2 中相同的流动相梯度洗脱, 即可兼顾方法各项性能。

表 1 化合物质谱参数
Table 1 MS parameters for analysis of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间(ms)	去簇电压(V)	碰撞能量(eV)	碰撞室出口电压(V)	入口电压(V)
甲基香兰素	167	139*	100	70	18	10	13
		124	100	70	26	10	13
香兰素	151	92	100	-70	-33	-10	-12
		136*	100	-70	-28	-10	-12
乙基香兰素	165	92	100	-68	-33	-10	-12
		136*	100	-68	-28	-10	-12

*为定量离子。

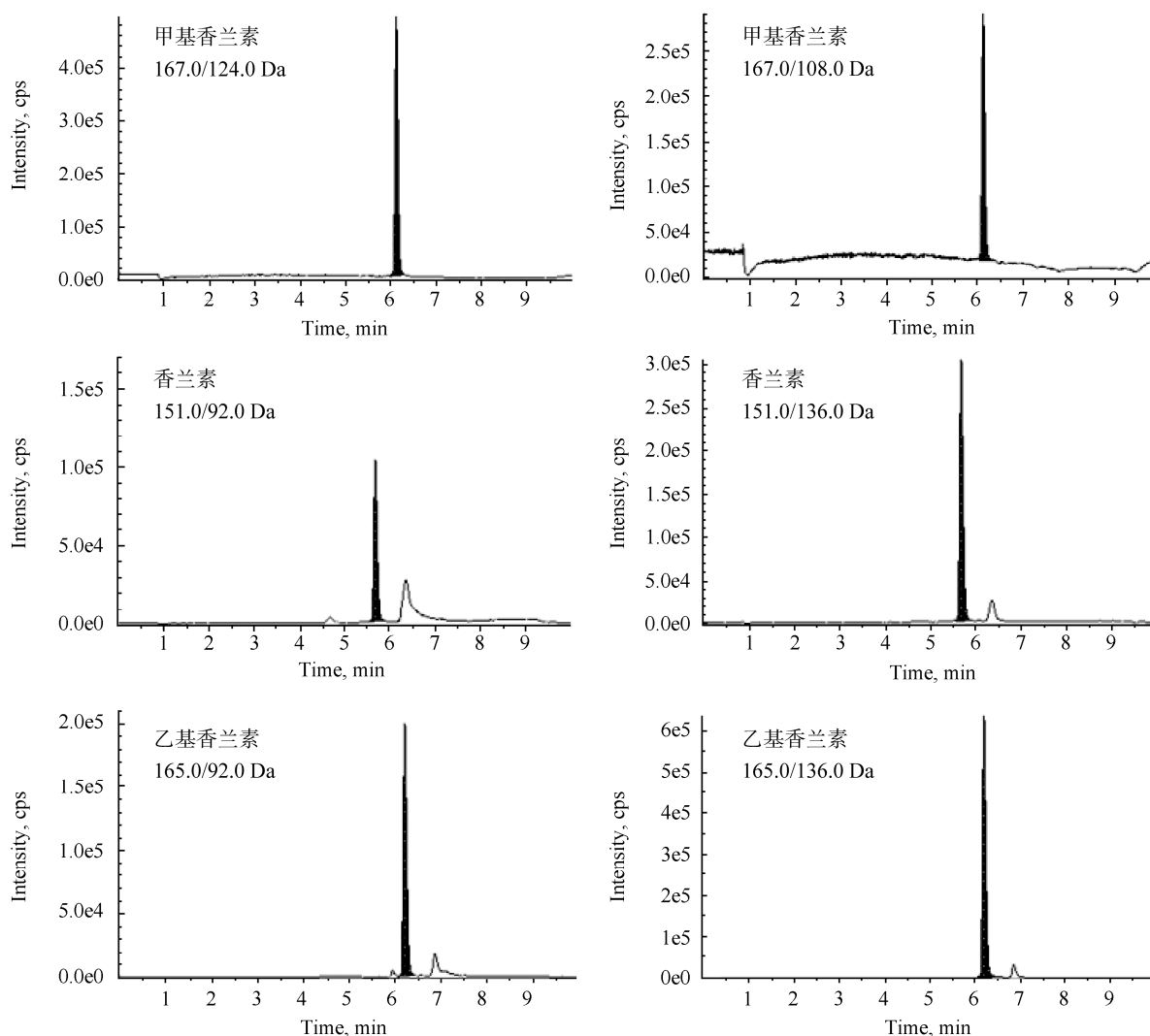


图 2 甲基香兰素、香兰素、乙基香兰素标准溶液的 MRM 重构色谱图

Fig. 2 Extracted product ion spectrum of three standard solutions

3.3 方法的线性范围和定量限

在优化条件下测定混合系列标准溶液,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X 为横坐标,计算标准曲线方程、线性范围和定量限,结果见表 2。实验结果表明,3 种化合物线性范围均为 5.0~200 $\mu\text{g/L}$,液态奶和奶粉 3 种化合物定量限分别为 25 $\mu\text{g/kg}$ 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.4 精密度及回收率

在液态奶和奶粉样品中分别加入不同水平的香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素,每个浓度水平取 6 份样品进行试验,计算平均回收率及 RSD,结果见表 3。

表 2 分析方法的线性范围及相关系数

Table 2 Linear range and correlation coefficients of analytical method

化合物	线性方程	相关系数
甲基香兰素	$Y = 1.33e+005X + 2.69e+005$	0.9996
香兰素	$Y = 8.1e+003X - 1.48e+004$	0.9949
乙基香兰素	$Y = 1.59e+004X + 2.82e+004$	0.9986

3.5 实际样品测定

应用本方法对市售 10 个不同品牌的 0~36 个月婴幼儿配方奶粉中的香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素进行测定。结果见表 4。由表 4 可知,10 个配方奶

表 3 液态奶和奶粉中的加标回收率(n=6)
Table 3 Spiked recoveries of liquid milk and milk powder (n=6)

化合物	样品种类	添加水平 μg/kg	实测值 μg/kg						平均值 μg/kg	平均回收率%	RSD %
			1	2	3	4	5	6			
甲基香兰素	液态奶	25.0	28.6	29.8	28.6	28.9	28.4	28.0	28.8	115	2.0
		50.0	56.0	54.1	55.5	56.5	57.5	57.0	56.1	112	2.2
		100.0	104	106	109	109	109	107	107	108	1.9
	奶粉	50.0	51.8	49.3	49.6	53.7	49.2	51.0	50.8	102	3.5
		100.0	118	108	118	109	109	109	112	112	4.3
		200.0	180	178	183	189	177	174	180	90.1	2.9
香兰素	液态奶	25.0	27.5	25.9	23.9	24.1	23.9	26.0	25.2	101	5.8
		50.0	51.5	49.7	47.3	39.5	50.7	46.0	47.4	94.8	9.4
		100.0	110	87.5	82.5	76	103	78.0	89.5	89.5	15.6
	奶粉	50.0	42	58.1	59.9	58	57.2	54.0	54.9	110	12.0
		100.0	84.7	119	104	102	109	109	105	105	10.9
		200.0	163	193	163	210	208	198	189	94.6	11.2
乙基香兰素	液态奶	25.0	25.9	25.6	24.6	25.6	25.2	26.0	25.4	102	1.8
		50.0	49.4	49.7	51	51.5	53.5	51.0	51.0	102	2.9
		100.0	101	103	105	104	102	77.0	98.7	98.7	10.9
	奶粉	50.0	57.1	51.7	56.5	57.3	59.4	52.0	55.6	111	5.7
		100.0	119	114	113	111	115	112	114	114	2.5
		200.0	202	200	203	231	224	227	215	107	6.7

表 4 12 个婴幼儿配方奶粉中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的检出情况
Table 4 The analytic results of 12 infant formulas

样品编号/月龄	1(0~12)	2(0~6)	3(0~12)	4(6~12)	5(6~12)	6(6~18)	7(12~36)	8(12~36)	9(0~6)	10(6~18)
香兰素/(μg/kg)	-	-	-	-	-	-	12010	-	-	-
甲基香兰素/(μg/kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乙基香兰素/(μg/kg)	-	-	-	-	-	-	-	10530	-	-

粉中有 2 个分别检出香兰素和乙基香兰素, 且均为 1~3 岁幼儿奶粉, 检出值未超过允许值; 0~6 个月、0~12 个月、6~18 个月婴幼儿配方奶粉中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素均无检出。

4 结 论

本文建立了液态奶和奶粉中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的高效液相色谱串联质谱测定及确证方法。

该方法干扰小, 灵敏度高, 操作简便快速、易于

批处理, 准确性和重复性好, 可用于婴幼儿配方食品中香兰素类香料的测定。

参考文献

- [1] GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2011 National food safety standards – Standards for uses of food additives [S].
- [2] 田艳玲, 王浩, 刘艳琴, 等. 固相萃取 HPLC 法同时测定食品中乙基麦芽酚和香兰素[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 138-140.
Tian YL, Wang H, Liu YQ, et al. A study on SPE-HPLC analysis

- of ethylmalto and vanillin in food [J]. *Food Res Devel*, 2007, 28 (11): 138–140.
- [3] 李皓, 陈长武, 张国阳, 等. HPLC 法同时测定食品中香草类香料的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(10): 522–524.
Li H, Chen CW, Zhang GY, *et al.* Study on simultaneous determination of vanilla spices in food by HPLC method [J]. *Food Sci*, 2008, 29(10): 522–524.
- [4] 孙荣华, 马玉婷, 高燕. 二极管阵列反相高效液相色谱法测定蜜饯中香兰素含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(3): 586–587.
Sun RH, Ma YT, Gao Y. Determination of vanillin in preserves by HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(3): 586–587.
- [5] Ni YN, Zhang GW, Kokot S. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks [J]. *Food Chem*, 2005, 89: 465–473.
- [6] 张国文, 倪永年. 偏最小二乘—吸光光度法同时测定食用香料香兰素和乙基香兰素[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2003, 27 (4): 341–344.
Zhang GW, Ni YN. Simultaneous spectrophotometric determination of flavor enhancer vanillin and ethyl vanillin using partial least squares [J]. *J Nanchang Univ (Nat Sci)*, 2003, 27 (4): 341–344.
- [7] 倪永年, 姜云娜. 线性扫描溶出伏安法测定食品中的乙基香兰素[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2005, 29(3): 269–271.
Ni YN, Jiang YN. Linear sweep stripping voltammetric determination of ethyl vanillin in food samples [J]. *J Nanchang Univ (Nat Sci)*, 2005, 29(3): 269–271.
- [8] Yavuz Yardim, Mehmet Gülcan, Zühre Sentürk. Determination of vanillin in commercial food product by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 1821–1827.
- [9] Matilde Luque, Encarnación Luque-Pérez, Angel Ríos, *et al.* Supported liquid membranes for the determination of vanillin in food samples with amperometric detection [J]. *Anal Chim*, 2000, 410: 127–134.
- [10] 刘玉萍. 婴幼儿乳制品中香兰素的检测方法研究[J]. *湖南文理学院学报(自然科学版)*, 2011, 23(2): 51–54.
Liu YP. Study of analysis method on vanillin in infant dairy products [J]. *J Hunan Univ Art Sci (Nat Sci Edit)*, 2011, 23(2): 51–54.
- [11] 欧菊芳, 顾秀英, 鲍忠定, 等. 气相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中香兰素和乙基香兰素[J]. *江西科学*, 2011, 29(1): 23–25.
Ou JF, Gu XY, Bao ZD, *et al.* Determination of vanillin and ethyl vanillin in baby formula by gas chromatography [J]. *Jiangxi Sci*, 2011, 29(1): 23–25.
- [12] 韩双, 杨金宝, 刘宁. 气相色谱-质谱/选择离子法测定牛奶中的香兰素[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(8): 53–55.
Han S, Yang JB, Liu N. Determination of vanillin in milk by GC-MS/MS [J]. *China Dairy Ind*, 2008, 36(8): 53–55.
- [13] 乙小娟, 朱加叶, 丁萍. 气相色谱-质谱联用法测定巧克力中的香兰素、特丁基对苯二酚、咖啡因[J]. *理化检验-化学分册*, 2009, 45(12): 1404–1406.
Yi XJ, Zhu JY, Ding P. GC-MS Determination of vanillin, TBHQ, caffeine in chocolate [J]. *Phys Test Chem Anal Part B (Chem Anal)*, 2009, 45(12): 1404–1406.
- [14] Ricardo Lo'pez, Margarita Aznar, Juan Cacho, *et al.* Determination of minor and trace volatile compounds in wine by Solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 966: 167–177.
- [15] 罗冠中, 刘祥, 孟云彩. 液相色谱串联四极杆质谱法同时测定婴幼儿配方食品中甲基香兰素和乙基香兰素[J]. *分析试验室*, 2011, 30(8): 84–87.
Luo GZ, Liu X, Meng YC. Simutaneous determination of vanillin and ethyl vanillin in infant formulas using liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, 30(8): 84–87.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



肖 锋, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: mxiaofeng2003@163.com