

高效液相色谱法同时测定豆浆中麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素5种香料

迟秋池, 李晓雯, 何家今, 王 柯, 刘 畅*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定豆浆中麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素5种香料的含量。**方法** 样品经沉淀蛋白后用水稀释, 采用 Thermo Hypersil-Gold C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 在 273 nm 波长下进行高效液相色谱检测。**结果** 在 1~100 μg/g 浓度线性范围内, 麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素呈现良好的线性关系, 相关系数大于 0.999, 在 2、5、10 和 20 μg/g 4 个添加水平下, 加标回收率为 63.39%~88.73%, RSD 为 0.9%~4.5% (n=6), 检出限在 0.04~0.18 μg/g 之间。**结论** 该方法灵敏度高、重复性好, 可应用于实际样品的测定。

关键词: 麦芽酚; 乙基麦芽酚; 香兰素; 甲基香兰素; 乙基香兰素; 豆浆; 高效液相色谱法

Simultaneous determination of maltol, ethyl maltol, vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in soya bean milk by high performance liquid chromatography

CHI Qiu-Chi, LI Xiao-Wen, HE Jia-Jin, WANG Ke, LIU Chang*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of maltol, ethyl maltol, vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in soya bean milk by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** After protein deposition, the samples were diluted by water, separated by Thermo Hypersil-Gold C₁₈ column with the mobile phase of 0.1% formic acid-methanol for gradient elution, and detected at the wavelength of 273 nm by HPLC. **Results** Maltol, ethyl maltol, vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin had good linear relationships in the range of 1~100 μg/g with correlation coefficients higher than 0.999. The individual average recoveries spiked at 4 levels of 2, 5, 10 and 20 μg/g were ranged from 63.39% to 88.73%, while the relative standard deviations (RSD) were 0.9%~4.5% (n=6). The limits of detection were 0.04~0.18 μg/g. **Conclusion** The established method has high sensitivity and good repeatability, which can be applied for testing actual samples.

KEY WORDS: maltol; ethyl maltol; vanillin; methyl vanillin; ethyl vanillin; soya bean milk; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 刘畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品安全质量控制。E-mail: ccchangchang@hotmail.com

*Corresponding author: LIU Chang, Associate Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, 1500 Zhangheng Road, Shanghai 201203, China. E-mail: ccchangchang@hotmail.com

1 引言

豆浆是我国城镇居民早餐摄入蛋白质及其他营养成分的主要来源之一。中国豆制品专业委员会统计,2012年全国用于豆浆的大豆消费量约为60~70万吨(该数据不包括自制和散装豆浆),占传统豆制品消费总量的10%~20%^[1]。豆浆分为豆浆、调制豆浆和豆浆饮料^[2],在我国其贩售范围很广,但豆浆行业的管理目前较为混乱,名称和产品属性混淆、产品标识混乱,散装产品更没有相应标识。近年来媒体不断曝光部分不法商贩向豆浆中添加“豆浆香精”,却不标以明示,以次充好、以假乱真事件频被曝光。麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素等香料物质被广泛应用于食品工业中^[3,4],但欧盟专家委员会研究表明,长期大剂量使用香兰素会导致肝肾损伤,同时麦芽酚具有弱致突变活性和诱导细胞死亡的毒性作用^[5]。因此豆浆作为我国居民日常传统饮食,建立相关香料检测方法具有重要意义。

目前,针对香精检测的方法主要有高效液相色谱法^[6,7]、分光光度法、电化学法^[8-10]、液相色谱-串联质谱法^[11]、气相色谱法^[12-13]、离子色谱法^[14]及气相色谱-串联质谱法^[15]等,但文献中检测成分过于单一,且没有针对豆浆的检测方法。本研究建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对豆浆中麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素5种香料同时进行测定。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 材料与试剂

甲基香兰素(美国 Sigma, 批号: P500194, 纯度: 99.9%); 乙基香兰素(美国 Sigma, 批号: BCBL5750V, 纯度: 100%); 香兰素(美国 Sigma, 批号: P500245, 纯度: 99.9%); 乙基麦芽酚(美国 Sigma, 批号: LRAA0003, 纯度: 99.96%); 麦芽酚(美国 Sigma, 批号: BCBN6236V, 纯度: 98.2%); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司, 批号: JB034007); 五水合硫酸铜(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20131202); 氢氧化钠(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20140814); 无水乙醇(色谱纯, 德国 Merck 公司, 批号: K45600727421)。若无特别说明, 所用水均为去离子水。

2.1.2 仪器与设备

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国沃特世公司); Sartorius CP225D/ME235S 天平(美国赛多利斯公司); IKA VIBRAX-VXR 振荡器(美国艾卡公司); Thermo ST40R

离心机(美国赛默飞公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

(1) 标准储备液的配制

精密称取麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素各10 mg(精确至0.1 mg), 分别置于10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到相应标准储备液, 浓度为1 mg/mL, 于4 °C 冰箱保存。

(2) 混合标准中间溶液的配制

精密量取麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素标准储备液各1.0 mL, 置同一10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得到混合标准中间溶液浓度为100 µg/mL, 现配现用。

(3) 混合标准工作溶液的配制

分别精密量取标准中间溶液适量, 置于10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度为1、2、4、10、20、50 和100 µg/g 的系列线性标准工作溶液, 供高效液相色谱仪测定。

2.2.2 样品前处理

精密称取5 g 样品置10 mL 容量瓶中, 加入1.0 mL 100.0 g/L 硫酸铜溶液和0.5 mL 40.0 g/L 氢氧化钠溶液, 摇匀, 静置10 min 后用水稀释并定容至刻度, 混匀, 以4600 r/min 离心后, 取上清液经0.45 µm 滤膜过滤, 滤液供高效液相色谱仪测定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱为 Thermo Hypersil-Gold C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 µm)。流动相 A: 0.1%甲酸溶液, 流动相 B: 甲醇, 梯度洗脱程序: 0~35 min, 22%B; 35~36 min, 22%~90%B, 维持5 min; 41~42 min, 90%~22%B, 维持7 min。流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 µL; 柱温: 30 °C; 检测波长: 273 nm。

3 结果与分析

3.1 方法的线性范围和检出限

将2.2.1(3)系列线性标准工作溶液(浓度范围为1~100 µg/g)在2.2.3 仪器条件下进行分析, 建立标准曲线。经测定, 麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的相关系数 r 均大于0.999, 线性关系良好。以逐渐降低样品中标准溶液添加量的方法进行实验, 以峰面积相当于基线噪音的3倍($S/N=3$)计算检出限(limit of detection, LOD)。麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的线性范围、相关系数及检测限结果见表1。

3.2 回收率和精密度

在空白豆浆中添加4种不同浓度的标准溶液, 按2.2.2

项下进行前处理后,按2.2.3项下色谱条件进行测定,每个加标水平平行测定6次,结果见表2。本方法在4种不同浓度添加水平下的回收率为63.39%~88.73%,RSD为0.9%~4.5%,可操作性强,重现性好。

3.3 样品测定

本方法应用于豆浆及豆浆饮品中5种香精成分的测定,共计112批样品,标准品和样品色谱图见图1、图2。其中17批样品检出5种香料物质,结果见表3。

表1 检出限及相关系数
Table 1 LODs and correlation coefficients

化合物	线性范围($\mu\text{g/g}$)	线性方程	相关系数	检出限($\mu\text{g/g}$)
麦芽酚	1~100	$Y=1.865e^4 X + 0.00236$	0.9997	0.04
乙基麦芽酚	1~100	$Y=1.672e^4 X + 0.00038$	0.9997	0.09
香兰素	1~100	$Y=1.542e^4 X + 0.0129$	0.9999	0.08
甲基香兰素	1~100	$Y=1.647e^4 X + 0.00198$	0.9999	0.15
乙基香兰素	1~100	$Y=1.467e^4 X + 0.00056$	0.9999	0.18

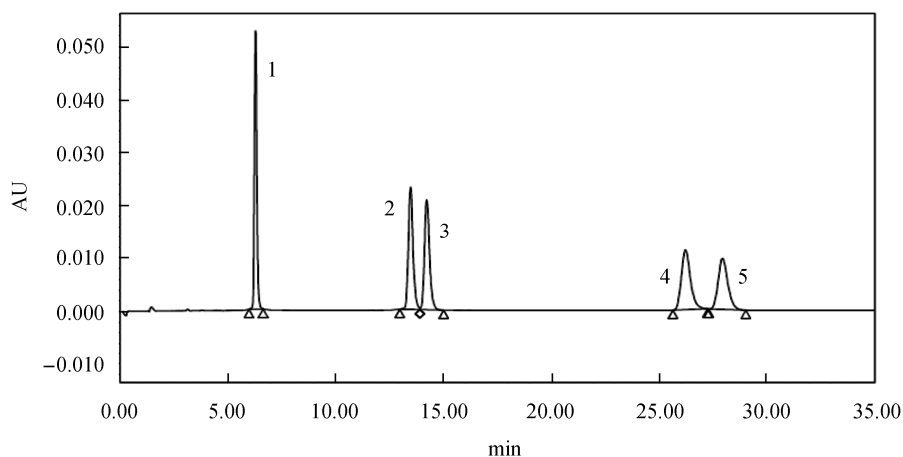


图1 标准品溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

注:1为麦芽酚,2为乙基麦芽酚,3为香兰素,4为甲基香兰素,5为乙基香兰素。

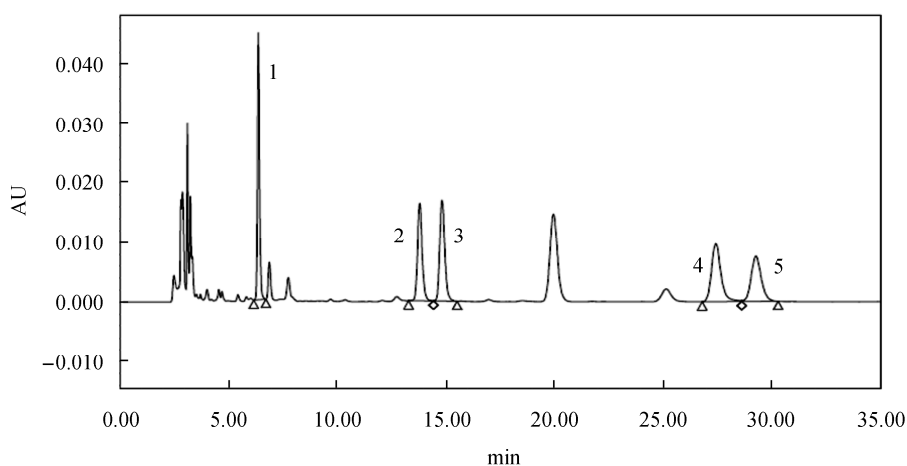


图2 样品加标色谱图

Fig. 2 Chromatogram of spiked sample

注:1为麦芽酚,2为乙基麦芽酚,3为香兰素,4为甲基香兰素,5为乙基香兰素。

表 2 空白样品加标回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Recoveries and RSDs of blank samples spiked standard ($n=6$)

化合物	加标量($\mu\text{g/g}$)	回收率(%)	RSD(%)
麦芽酚	2.0	70.09 \pm 2.7	2.6
	5.0	74.48 \pm 2.1	2.4
	10.0	76.83 \pm 1.7	2.0
	20.0	76.57 \pm 1.4	1.7
乙基麦芽酚	2.0	67.81 \pm 1.3	1.9
	5.0	67.09 \pm 2.1	3.1
	10.0	71.26 \pm 1.9	2.7
	20.0	70.42 \pm 1.2	1.7
香兰素	2.0	73.56 \pm 0.7	0.9
	5.0	78.26 \pm 2.1	2.7
	10.0	81.98 \pm 1.8	2.1
	20.0	82.52 \pm 1.1	1.3
甲基香兰素	2.0	70.47 \pm 0.8	1.2
	5.0	81.73 \pm 1.7	2.1
	10.0	85.59 \pm 1.9	2.2
	20.0	86.23 \pm 1.2	1.4
乙基香兰素	2.0	77.00 \pm 2.9	3.7
	5.0	80.94 \pm 3.6	4.5
	10.0	80.44 \pm 1.3	1.6
	20.0	80.86 \pm 1.0	1.3

表 3 样品检出结果
Table 3 Results of samples

编号	麦芽酚($\mu\text{g/g}$)	乙基麦芽酚($\mu\text{g/g}$)	香兰素($\mu\text{g/g}$)	甲基香兰素($\mu\text{g/g}$)	乙基香兰素($\mu\text{g/g}$)
1	/	65.06	2.11	/	/
2	/	71.24	1.76	/	/
3	33.98	2.65	109.38	/	/
4	1.03	15.50	/	/	/
5	/	5.36	1.40	/	/
6	0.70	/	3.37	/	/
7	1.07	3.28	11.08	/	/
8	1.60	22.24	41.99	/	/
9	1.34	11.10	0.98	/	/
10	1.12	4.37	16.44	/	/
11	0.76	/	3.16	/	1.50
12	1.57	19.75	38.33	/	/
13	0.90	11.52	1.05	/	/
14	0.98	3.53	/	0.82	/
15	0.58	29.51	60.37	/	/
16	6.64	/	10.72	/	/
17	0.94	10.96	1.08	/	1.00

3.4 结果分析与讨论

我国目前没有豆浆中香料类物质的检测国标或其他标准,也基本没有针对豆浆这类食品基质的相关文献。根据豆浆这类食品基质的自身特点,在实际操作中,通过实验比较了3种前处理方法:①有机试剂沉淀蛋白;②乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白;③CuSO₄和NaOH沉淀蛋白。其中CuSO₄和NaOH沉淀蛋白的方法在是3种方法中回收率相对较高、净化效果相对较好的,故针对豆浆这种食品基质本文研究选用了CuSO₄和NaOH沉淀蛋白的前处理方法。但沉淀蛋白的方法会导致待测组分被部分吸附,在实际操作中,根据豆浆的取样量对蛋白沉淀剂的加入量作出了相应的调整,最终以5g样品添加1.0mL 100.0g/L硫酸铜溶液和0.5mL 40.0g/L氢氧化钠溶液的比例最为理想。在实际样品检测中,如果采取在标准溶液中加入蛋白沉淀剂同样品操作,作为标准曲线,则低浓度加标水平回收率会提高10%以上。

4 结论

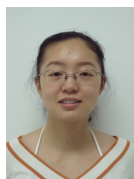
本研究建立了高效液相色谱法同时测定豆浆中麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素5种香精成分,此法前处理方法简单、灵敏度高,回收率和重现性好,为豆浆中相关色素的检测提供了一种操作性强的可靠方法。

参考文献

- [1] 吴月芳. 我国豆浆行业现状及日美豆浆市场与标准[J]. 中国食品工业, 2014, (3): 26-31.
Wu YF. The situation of soy milk industry in our country and the standards of Japan and the US [J]. China Food Ind, 2014, (3): 26-31.
- [2] SB/T 10633-2011 豆浆[S].
SB/T 10633-2011 Soymilk [S].
- [3] 陶保华, 储小军, 赖世云, 等. 婴幼儿配方粉中香兰素和乙基香兰素的检测方法比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 421-426.
Tao BH, Chu XJ, Lai SY, et al. Comparison of quantification methods of vanillin and ethyl vanillin in infant formulas [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(2): 421-426.
- [4] 杨海燕. 多功能增香剂-麦芽酚与乙基麦芽酚[J]. 配料, 1998, 5(11): 28-30.
Yang HY. Multi-functional flavor enhancers-veltol and veltelplus [J]. Ingredients, 1998, 5(11): 28-30.
- [5] 杨华梅, 杭莉. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中4种常用香精[J]. 色谱, 2015, 33(3): 250-255.
Yang HM, Hang L. Determination of four frequently-used essences in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(3): 250-255.
- [6] 任呼博, 别振英, 蔚亦沛, 等. HPLC法同时测定烟用添加剂中的香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚[J]. 分析实验室, 2014, 33(8): 950-954.
Ren HB, Bie ZY, Wei YP, et al. Simultaneous determination of vanillin, ethyl-vanillin, maltol and ethylmaltol in cigarette additives by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(8): 950-954.
- [7] 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 ethylmaltol and vanillin in food [J]. Food Res Dev, 2007, 28(11): 138-140.
- [8] 彭少华, 马文华, 狄俊伟. 分光光度法、高效液相色谱法和伏安法测定麦芽酚和乙基麦芽酚[J]. 光谱实验室, 2005, 22(4): 680-682.
Peng SH, Ma WH, Di JW. Determination of maltol and ethyl maltol by spectrophotometry, HPLC and voltammetry [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2005, 22(4): 680-682.
- [9] 张国文, 倪永年. 多元校正-光度法同时测定食品中香兰素和乙基麦芽酚[J]. 分析科学学报, 2005, 21(1): 20-23
Zhang GW, Ni YN. Simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and ethyl maltol in food by multivariate calibration approach [J]. J Anal Sci, 2005, 21(1): 20-23
- [10] 邱萍, 倪永年. 微分脉冲溶出伏安法测定食品中的香兰素[J]. 南昌大学学报(理科版), 2002, 26(2): 124-127.
Qiu P, Ni YN. Differential pulse stripping voltammetric determination of vanillin in food samples [J]. J Nanchang Univ (Nat Sci), 2002, 26(2): 124-127.
- [11] 肖锋, 张毅, 陈沛金, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3431-3436.
Xiao F, Zhang Y, Chen PJ, et al. Simultaneous determination of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in infant formulas by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 3431-3436.
- [12] 陈柯星, 柯华, 林捷. 食品中乙基麦芽酚的气相色谱分析方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(11): 2629-2628.
Chen KX, Ke H, Lin J. Gas chromatographic determination of ethyl maltol in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(11): 2629-2630.
- [13] 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 Arts Sci (Nat Sci Ed), 2011, 23(2): 51-54.
- [14] 姚超英. 离子液体萃取-离子色谱法分析食品中的香兰素[J]. 杭州化工, 2010, 40(2): 29-31.
Yao CY. Ionic liquid extraction-ion chromatography determination of vanillin in food [J]. Hangzhou Chem Ind, 2010, 40(2): 29-31.
- [15] 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. 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/SIM [J]. China Dairy Ind, 2008, 36(8): 53-55.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



迟秋池, 理化检验技师, 主要研究方向为药物分析和食品安全质量控制。
E-mail: chiqiuchi@126.com



刘 畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品安全质量控制。
E-mail: ccchangchang@hotmail.com

“食品贮藏与保鲜研究与应用进展”专题征稿函

随着人们生活水平的提升, 消费者对食品的质量与安全性的要求也越来越高, 今天的消费者不仅要求食品新鲜, 而且要求食品保持原有的天然风味和营养结构, 因此如何再延长食品贮藏期的同时, 保持食品原有风味营养, 已成为人们研究的重点。

鉴于此, 本刊特别策划了“**食品贮藏与保鲜研究与应用进展**”专题, 由 **《食品安全质量检测学报》副主编、渤海大学食品科学研究院果蔬贮藏与加工研究所所长 冯叙桥 教授** 担任专题主编, 主要围绕**食品贮藏保鲜工艺研究、食品贮藏保鲜新技术进展(如栅栏技术、生物酶技术、可食性包装膜、超高压等)、食品贮藏保鲜机制分析等**或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2016 年 9 月份出版。

本刊编辑部和 **冯叙桥 教授** 欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 **2016 年 8 月 15 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部