

高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的 香兰素和乙基香兰素

孙雪梅, 许 强, 孙晓萌, 王轶鹏, 张志涛, 孟凡达*

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东第一医科大学, 济南 250062)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的检测方法。**方法** 样品经含 5% 乙酸的乙腈溶液提取液提取, 超声处理后, 使用乙腈定容, 高速离心后上清液过 0.22 μm 微孔滤膜。使用高效液相色谱检测, 检测波长 308 nm, 外标法定量。**结果** 本方法前处理简便易操作, 香兰素和乙基香兰素在 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 以 3 S/N 作为最低检出限, 方法的检出限均为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加标回收率分别为 97.0%~101.1%、96.0%~100.5%, 相对标准偏差小于 5%。**结论** 该方法操作简便, 准确度高, 重现性好, 适合奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的快速测定。

关键词: 高效液相色谱; 食品添加剂; 香兰素; 乙基香兰素; 快速检测

Simultaneous determination of vanillin and ethyl-vanillin in milk-taste-drink by high performance liquid chromatography

SUN Xue-Mei, XU Qiang, SUN Xiao-Meng, WANG Yi-Peng, ZHANG Zhi-Tao, MENG Fan-Da*

(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong First Medical University, Jinan 250062, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simultaneous determination of vanillin and ethyl-vanillin in milk-taste-drink by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile with 5% acetic acid solution, after ultrasonic treatment, acetonitrile was used to fix the volume., Then determined by high performance liquid chromatography at 308 nm after high speed centrifugation and supernatant treatment. The external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The pretreatment method was simple and easy to operate. The linear relationship between vanillin and ethyl vanillin was good in the concentration range of 0.1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The detection limit of the method was 0.02 g/mL with 3 S/N as the lowest detection limit. The standard recovery was 97.0%–101.1% and 96.0%–100.5%, respectively, with the relative standard deviation less than 5%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible. It can be applied to the simultaneous determination of vanillin and ethyl-vanillin in milk-taste-drink.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; food additive; vanillin; ethyl-vanillin; rapid analysis

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS075, 2015WS0196)

Fund: Supported by the Medical and Health Science and Technology Project of Shandong Province (2017WS075, 2015WS0196)

*通讯作者: 孟凡达, 助理研究员, 主要研究方向为体外诊断 POCT 快速检测方法研究。E-mail: mengfind@163.com

*Corresponding author: MENG Fan-Da, Assistant Professor, Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China. E-mail: mengfind@163.com

1 引言

香兰素和乙基香兰素作为食品用香料类的食品添加剂,由于能够极大的增强饮料的奶香气息,在奶味饮料中的应用非常广泛。但香兰素和乙基香兰素的大量摄入会导致头晕、恶心、呕吐、呼吸困难等反应,甚至对人体的肝、肾等代谢器官带来极大损伤^[1-5]。

目前常见的香兰素和乙基香兰素的检测方法有紫外分光光度法、气相色谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等^[6-15]。分光光度法进行联合检测时无法将两者区分,存在相互的干扰,在食品检测中应用较少;气相色谱法前处理周期长,容易造成被测物在空气中的氧化,因而容易带来精密度差的问题;液相色谱法操作简单,精密度高,重复性好,但目前多应用于婴幼儿乳粉和乳制品中,在奶味饮料中应用不多,而且存在着前处理繁琐的问题;液相色谱-质谱联用法对设备要求较高,操作繁琐,在基层检验机构中推广困难。

奶味饮料,尤其是奶茶近些年在年轻人群中日渐风靡,其中也不乏有一些不良商家过度添加香兰素和乙基香兰素作为奶味增加剂,增加饮料的口感,极大的危害了人民的健康。建立一种简便的香兰素和乙基香兰素的快速联合检测方法,能够及时的获得奶味饮料中的奶味添加剂含量,对于奶茶行业的监督、指导和规范具有重要意义。

本研究建立了一种利用高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的方法,以期对奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的检测和监管提供了一种简便有效的方式。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(配 DAD 检测器)、Ultrasonic Cleaner 超声波发生器、TB-215D 分析天平[丹佛仪器(北京)有限公司];TG16WS 高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

香兰素(纯度 $\geq 99.0\%$)、乙基香兰素(纯度 $\geq 98.0\%$)(上海麦克林生化科技有限公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯)、乙酸、甲酸、正己烷、乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);0.22 μm 有机滤膜(天津津滕有限公司);实验室用水超纯水。

无添加纯牛奶、养乐多、奶昔、多种口味奶茶均为市售。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

混合标准储备溶液配制:分别准确称取 500 mg 的香兰素和乙基香兰素于 100 mL 的容量瓶中使用含有 5% 乙酸

的乙腈溶液溶解,定容,配制成分别含有香兰素和乙基香兰素均为 5 mg/mL 标准储备液,避光,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合标准中间液配制:精确量取 2 mL 香兰素和乙基香兰素标准储备溶液于 100 mL 的容量瓶中使用含有 5% 乙酸的乙腈溶液定容,配制成分别含有香兰素和乙基香兰素均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准中间溶液,避光,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合标准工作液的配制:分别量取适量的混合标准中间液,使用含有 5% 乙酸的乙腈溶液配制含有 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香兰素和乙基香兰素的系列标准工作液。

2.2.2 样品前处理

准确量取 2 mL 的奶味饮料,置于 10 mL 的离心管中,加入 2 mL 5% 乙酸的乙腈溶液,充分振摇,超声处理 5 min,使用乙腈定容后,将溶液充分振荡均匀后,10000 r/min 离心 10 min。取上清,过 0.22 μm 有机滤膜后,供高效液相色谱测定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱:SB-C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流量:1.0 mL/min;流动相:乙腈+水+甲醇+乙酸+甲酸+乙酸铵=100 mL+600 mL+ 300 mL+12.5 mL+0.4 mL+0.6 g;检测波长:308 nm;进样量:10 μL ;以色谱峰的保留时间定性,采用外标法峰面积定量。

3 结果与分析

3.1 检测波长的选择

如图 1 香兰素和乙基香兰素的吸收光谱所示,两者最大吸收峰均为 233、279、308 nm,但由于在 233 nm 处,很多有机化合物均会存在吸收,因此会出现大量吸收峰的干扰,因此,233 nm 不作为两者定量检测优选波长。

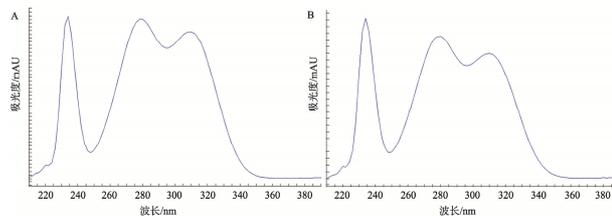


图 1 香兰素(A)和乙基香兰素(B)的吸收光谱
Fig.1 Absorption spectrum of vanillin (A) and ethyl-vanillin (B)

分别使用 279 nm 和 308 nm 作为检测波长进行了 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香兰素和乙基香兰素的混合标准工作液测定,如图 2 所示,采用 308 nm 作为检测波长时,相对于 279 nm 作为检测波长,目标峰峰形对称性好,信噪比高。

使用无添加纯牛奶作为空白样本,添加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合样本,分别使用 279 nm 和 308 nm 作为检测波长进行检测。检测液相色谱图如图 3 所示,采用 308 nm 作为检测波长时

具有更好的峰形和更高的信噪比。

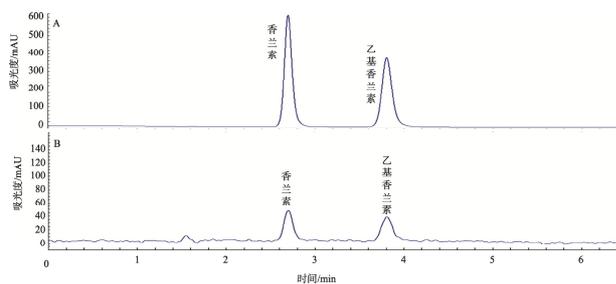


图 2 样品在不同检测波长下谱图比较: 308 nm(A)和 279 nm(B)
Fig.2 Chromatogram comparison in different detection wavelength: 308 nm(A)and 279 nm(B)

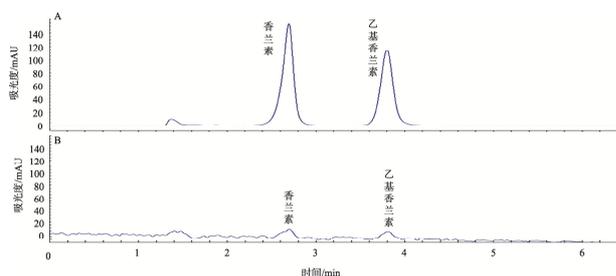


图 3 空白样品添加 2 $\mu\text{g/mL}$ 混合样本在不同检测波长下谱图比较: 308 nm(A)和 279 nm(B)
Fig.3 Chromatogram comparison of spiked of 2 $\mu\text{g/mL}$ in different detection wavelength: 308 nm(A)and 279 nm(B)

综合香兰素和乙基香兰素的化学性质, 以及对标准混合工作液和试剂样本的检测的表现, 采用 308 nm 作为检测波长时, 方法的检测信号更强、干扰更低、信噪比更高, 检测性能更优。因此后期检测选择 308 nm 作为检测波长。

3.2 前处理条件优化

实验证明在酸性条件下, 香兰素和乙基香兰素以游离酸的形式存在, 使用含有 5% 的乙酸的乙腈溶液作为前处理溶液, 能够极大程度的保证香兰素和乙基香兰素释放于溶液中, 而且酸性条件下能充分的将样本中脂肪及蛋白固化, 通过离心的方式即可将脂肪与蛋白除去, 将上清液过滤后进样, 发现几乎无杂质影响检测。

将离心后上清液使用正己烷进一步脱脂后进样与简化前处理操作后直接进样比较, 发现正己烷处理前后, 待测物峰面积一致, 说明简化的前处理方式能够完全去除样本中脂肪的干扰, 故实验采取简化前处理方式。

3.3 方法的线性范围及检出限

将系列混合标准工作液进样后, 将峰面积 $Y(A)$ 为纵坐标, 以标准品浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标, 进行线性回

归如图 4 所示。在 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 香兰素的线性回归方程为 $Y=38.51X+1.15$, $r^2=0.9999$; 香兰素的线性回归方程为 $Y=31.94X+0.75$, $r^2=0.9999$ 。表明 2 者的线性关系良好。

以 3 S/N 作为最低检出限, 测得香兰素和乙基香兰素的检出限均为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。

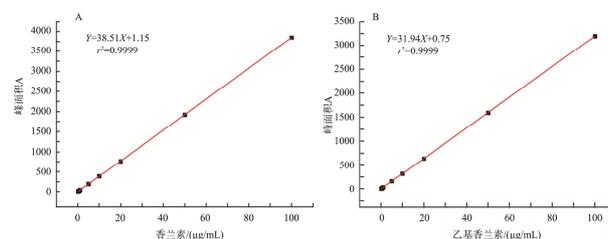


图 4 香兰素(A)和乙基香兰素(B)标准曲线
Fig. 4 Standard curve of vanillin (A) and ethyl-vanillin (B)

3.4 回收率及精密度实验

取空白样本 18 份, 每份 2 mL, 每 6 份为一组, 在 1、5、20 $\mu\text{g/mL}$ 3 个水平下进行香兰素和乙基香兰素混合加标回收实验, 测定结果见表 1。如表 1 所示, 香兰素和乙基香兰素的加标回收率分别为 97.0%~101.1%和 96.0%~100.5%, 相对标准偏差均小于 5%。说明建立的高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的方法回收率和精密度良好, 具有可靠的检测性能。

3.5 实际样品测定

应用优化好的方法进行了奶味饮料中香兰素和乙基香兰素的含量测定, 色谱图 5 所示。香兰素及乙基香兰素均呈现出良好的吸收峰, 且无干扰及拖尾峰存在, 说明建立的联合检测的方法性能良好。

表 1 准确度和回收率实验结果($n=6$)
Table 1 Results of tests for precision and recovery($n=6$)

化合物	添加值 /($\mu\text{g/mL}$)	测定值 /($\mu\text{g/mL}$)	回收率 /%	RSD /%
香兰素	1	0.97	97.0	4.3
	5	4.87	97.4	3.8
	20	20.21	101.1	1.9
乙基香兰素	1	0.96	96.0	3.9
	5	4.94	98.8	2.8
	20	20.10	100.5	2.4

对市售的 10 种奶味饮料成品以及 10 种外卖购买奶茶

样品进行了香兰素和乙基香兰素含量的测定, 检出情况如表 2 所示。检测结果表明市面上奶味饮料中很多产品含有一定含量的奶味增加剂香兰素和乙基香兰素, 对市场奶味饮料的质量监管具有一定的指导意义。

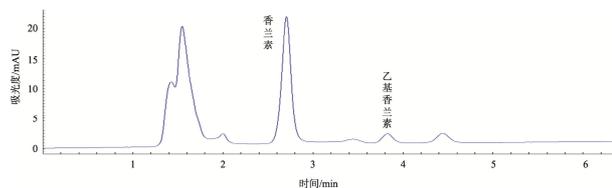


图 5 实际样本检测色谱图
Fig.5 Chromatogram of sample

表 2 奶味饮料中香兰素和乙基香兰素的检测结果($\mu\text{g/mL}$)
Table 2 Results of determination of vanillin and ethyl-vanillin in milk-taste-drink($\mu\text{g/mL}$)

编号	样本名称	香兰素	乙基香兰素	编号	样本名称	香兰素	乙基香兰素
1	养乐多 1	13.49	1.80	11	奶茶 1	58.24	-
2	养乐多 2	16.78	2.59	12	奶茶 2	48.23	-
3	养乐多 3	17.44	1.98	13	奶茶 3	-	-
4	奶昔(芒果味)	50.10	-	14	奶茶 4	58.46	-
5	奶昔(香蕉味)	51.15	-	15	奶茶 5	-	-
6	奶昔(苹果味)	52.88	-	16	奶茶 6	-	-
7	优酸乳 1	58.40	18.44	17	奶茶 7	68.66	-
8	优酸乳 2	-	-	18	奶茶 8	45.42	12.38
9	优酸乳 3	-	-	19	奶茶 9	59.26	2.35
10	优酸乳 4	-	-	20	奶茶 10	-	-

4 结 论

本研究建立了一种利用高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的检测方法, 结合香兰素和乙基香兰素的吸收光谱、空白样本添加法检测和实际样本检测结果, 最优的选择 308 nm 作为检测波长; 优化了样本的前处理方式, 简化了实验条件, 通过含有 5% 乙酸的乙腈溶液进行样本中香兰素和乙基香兰素的提取, 有效的提取了目标分析物, 提高了检测效率; 香兰素和乙基香兰素在 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 以 3S/N 作为最低检出限, 方法的检出限均为 0.02 $\mu\text{g/mL}$; 方法的加标回收率分别为 97.0%~101.1% 和 96.0%~100.5%, 相对标准偏差均小于 5%, 说明建立的高效液相色谱法同时测定奶味饮料中的香兰素和乙基香兰素的方法回收率和精密度良好, 具有可靠的检测性能。

实验表明, 新建立的方法检测效率极大提升、回收率及精密度高、可推广性强, 对市场奶味饮料中的奶味增加剂的监管和检测具有重要的意义。

参考文献

- [1] 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]. 分析实验室, 2011, 30(8): 84-87.

- Luo GZ, Liu X, Meng YC. Simultaneous 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.
- [2] 赵建国, 姜金斗. 气相色谱质谱联用测定婴幼儿奶粉中香兰素和乙基香兰素[J]. 生命科学仪器, 2013, 11(5): 40-44.
- Zhao JG, Jiang JD. Determination of vanillin and ethylvanillin in infant milk powder by GC/MS [J]. Life Sci Instrum, 2013, 11(5): 40-44.
- [3] 李天宝, 刘炜, 王春利, 等. 奶粉中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(12): 41-43.
- Li TB, Liu W, Wang CL, et al. Determination of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in milk powder [J]. China Dairy Ind, 2014, 42(12): 41-43.
- [4] 曲宝成, 戴学东, 张敬波, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定植物油中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 935-941.
- Qu BC, Dai XD, Zhang JB, et al. Determination of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in vegetable oil by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 935-941.
- [5] 陈波, 徐明敏, 金米聪. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定化妆品中香兰素和乙基香兰素[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(10): 1389-1392, 1395.
- Chen B, Xu MM, Jin MC. Determination of vanillin and ethyl vanillin in cosmetics by high-performance liquid chromatography with solid phase extraction [J]. China J Health Lab Technol, 2017, 27(10): 1389-1392, 1395.

- [6] 吴秉宇, 费婷, 罗辰, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法测定卷烟主流烟气中的香兰素和乙基香兰素[J]. 分析实验室, 2020, 39(1): 77-81.
Wu BY, Fei T, Luo Z, *et al.* Determination of vanillin and ethyl vanillin in mainstream cigarette smoke by solid phase extraction-gas chromatography / mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(1): 77-81.
- [7] 郑小严. 凝胶渗透色谱-气相色谱-三重四极杆质谱法测定配方奶粉中香兰素和乙基香兰素[J]. 福建分析测试, 2018, 27(4): 12-17.
Zheng XY, Determination of vanillin and ethyl vanillin in formula Samples by GPC- GC-MS/MS method [J]. Fujian Anal Test, 2018, 27(4): 12-17.
- [8] 贺江, 盛岳衡. 奶粉中香兰素 UPLC 检测方法的建立[J]. 食品工业, 2018, 39(5): 327-330.
He J, Sheng YH. Development of UPLC method for the determination of vanillin in milk powder [J]. Food Ind, 2018, 39(5): 327-330.
- [9] 黄键, 张文国, 郭桂萍, 等. 高效液相色谱法同时测定化妆品中香兰素和乙基香兰素的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(11): 1318-1321.
Huang J, Zhang WG, Guo GP, *et al.* HPLC determination of vanillin and ethyl vanillin in cosmetics [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2017, 53(11): 1318-1321.
- [10] 陈达, 邹建, 谭棕, 等. 基于傅里叶变换红外光谱技术检测奶粉中香兰素的新方法[J]. 纳米技术与精密工程, 2017, 15(6): 438-443.
Chen D, Zou J, Tan Z, *et al.* Development of a novel method for detecting vanillin in milk powder based on FT-IR [J]. Spectrosc Nanotechnol Preci Eng, 2017, 15(6): 438-443.
- [11] 郑璇, 黄瑾, 林洁, 等. 气相色谱-质谱法测定奶粉中香兰素含量的方法建立[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 35-38.
Zheng X, Huang J, Lin J, *et al.* Determination of vanillin and ethyl vanillin in milk powder by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Mach, 2016, 32(11): 35-38.
- [12] 肖珊珊, 孙兴权, 李一尘, 等. 高效液相色谱法测定软饮料中香兰素和乙基香兰素[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 152-158.
Xiao SS, Sun XQ, Li YC, *et al.* Determination of vanillin and ethyl vanillin in soft drink by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(1): 152-158.
- [13] 于航, 黄光莉, 陶里, 等. 气相色谱-质谱法测定烟用香精香料中香兰素和乙基香兰素[J]. 理化检验(化学分册), 2015, 51(5): 668-671.
Yu H, Huang GL, Tao L, *et al.* GC-MS determination of vanillin and ethyl vanillin in tobacco flavor [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2015, 51(5): 668-671.
- [14] 籍芳, 孙玉慧, 李天宝, 等. 奶粉中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 79-81.
Ji F, Sun YH, Li TB, *et al.* Determination of vanillin, methyl vanillin and ethyl vanillin in milk powder [J]. Food Res Dev, 2015, 36(13): 79-81.
- [15] 王石, 程劼, 苏晓鸥. 应用表面增强拉曼光谱技术快速检测较大婴幼儿配方奶粉中的香兰素[J]. 中国农业科学, 2014, 47(11): 2224-2232.
Wang S, Cheng J, Su XO, *et al.* Rapid determination of vanillin in infant formulas by surface enhanced raman spectroscopy [J]. Sci Agric Sin, 2014, 47(11): 2224-2232.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



孙雪梅, 主要研究方向为食品检测方法研究。

E-mail: 771715791@qq.com



孟凡达, 助理研究员, 主要研究方向为体外诊断 POCT 快速检测方法研究。

E-mail: mengfind@163.com