高效液相色谱-串联质谱法同时测定饮料中 8 种香豆素类化合物

许博舟,许秀丽,国 伟,聂雪梅,宋娅瑄,王秀娟*

(中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100176)

摘 要:目的 建立高效液相色谱-串联质谱法同时测定饮料中 8 种香豆素类化合物的分析方法。方法 考察不同实验条件对液体饮料和固体饮料中 8 种香豆素类化合物的提取效果。以乙腈作为提取溶剂,经超声提取、冷冻离心分层,采用 C₁₈ 色谱柱分离,0.2%甲酸水和乙腈作为流动相梯度洗脱,在正离子扫描模式下采用 电喷雾电离多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行测定,基质曲线外标法定量。结果 8 种 目标物在 1~200 µg/L 质量浓度范围线性良好,相关系数(r²)为 0.9976~0.9999。对于液体饮料,方法检出限 (limits of detection, LODs)为 0.2~4.0 µg/kg,定量限(limits of quantitative, LOQs)为 0.6~10.0 µg/kg;对于固体饮料,方法检出限为 1.0~20.0 µg/kg,定量限为 3.0~50.0 µg/kg。采用该方法对 39 例市售饮料样品进行分析,3 例 碳酸饮料样品中检出香豆素,含量为 27.9~35.8 µg/kg,测定值均低于现行方法标准中香豆素类化合物 50.0 µg/kg 的测定低限。结论 该方法灵敏度高、定量限低,且操作简便、快捷,可满足同时测定饮料中 8 种香豆素类化合物含量的检测要求。

关键词: 香豆素; 高效液相色谱-串联质谱法; 同时测定; 饮料

Simultaneous determination of 8 kinds of coumarins in beverage by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Bo-Zhou, XU Xiu-Li, GUO Wei, NIE Xue-Mei, SONG Ya-Xuan, WANG Xiu-Juan*

(Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analysis method for simultaneous determination of 8 kinds of coumarins in beverage by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The extraction effects of 8 kinds of coumarins from liquid beverage and solid beverage were investigated under different experimental conditions. Acetonitrile was used as extraction solvent, after the ultrasonic extraction and frozen centrifugation, and then the analytes were separated with C₁₈ chromatographic column using 0.2% formic acid water and acetonitrile as mobile phase for gradient elution. Finally, the eluents were determined by multiple reaction monitoring (MRM) of electrospray ionization in positive mode, quantified by the matrix-matched external standard method. **Results** Good linearities in the range of 1–200 μ g/L were observed for 8 kinds of target compounds, and the linear correlation coefficient (r^2) were 0.9976–0.9999. The limits of detection (LODs) and limits of quantitative

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602702)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602702)

^{*}通信作者: 王秀娟, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为分析化学。E-mail: xjwangcaiq@163.com

^{*}Corresponding author: WANG Xiu-Juan, Master, Associate Professor, Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Ronghua South Road, Daxing District, Beijing 100176, China. E-mail: xjwangcaiq@163.com

(LOQs) were 0.2–4.0 μ g/kg and 0.6–10.0 μ g/kg for liquid beverage, 1.0–20.0 μ g/kg and 3.0–50.0 μ g/kg for solid beverage, respectively. In this study, 39 commercial beverage samples were analysed using this method, and coumarin was detected in 3 carbonated beverage samples, the content range from 27.9 to 35.8 μ g/kg. All measured values were lower than the LOQs of 50.0 μ g/kg coumarin in the current method standard. **Conclusion** This method not only has high sensitivity and low LOQs, but also is simple, rapid, can meet the requirements of simultaneous determination of 8 kinds of coumarins in beverage.

KEY WORDS: coumarins; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; simultaneous determination; beverage

0 引 言

香豆素作为主要豆香型香料之一,常用于日用香精中。但毒理实验发现,香豆素对小鼠胚胎有毒性,能引起痛觉消失,使中性胆碱醋酶发生变化,对大鼠为可疑致肿瘤物^[1]。由于合成香豆素的毒性大,GB 2760—2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》中没有列出香豆素,欧盟、美国等则禁止香豆素作为食品添加剂使用。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)建议的容许日摄入量(tolerable daily intake, TDI)为 0~0.1 mg/kg·bw^[2]。自60年代开始,饮料工业进入集中生产和高速发展的阶段,且饮料品种繁多,包括矿泉水、碳酸饮料、果蔬汁、乳饮料、酒精饮料等。随着饮料行业的发展,消费者对饮料的风味与口感也有了更多的追求,饮料企业为提供独特香型的饮料产品,会使用香豆素类香精等添加剂来增强风味,但是在提升口感的同时,也带来了潜在的食品安全风险。

中国现行的出入境检验检疫行业标准 SN/T 4318—2015《出口食品中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香 豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素、7-乙氧基-4-甲基香 豆素含量的测定》中对饮料中香豆素类化合物含量的测 定低限较高,为50.0 μg/kg。而且部分香豆素类化合物的 衍生物,如7-甲基香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙 胺香豆素)等也可作为香豆素替代物添加在食品中而逃避 监管,但此类化合物在文献中尚未见报导,且缺少相应 检测方法。因此,为保障饮料食品安全,保证消费者的饮 食安全,建立饮料中多种香豆素类化合物的同时测定方 法非常必要。

目前,针对食品中香豆素类化合物的测定方法主要有 液相色谱法(liquid chromatography, LC)^[3-6]、气相色谱-质谱 法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[7-10]、液相 色谱 - 质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[11-13] 和毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE)^[14]。液相色谱法的前处理方法复杂,操作时间较长,在 复杂基质多组分分析时,存在灵敏度低的问题,导致方法检 出限较高^[15-17]。气相色谱-串联质谱法采用选择离子监测 (select ion monitoring, SIM)模式对化合物进行分析,受基质 干扰明显,易出现假阳性结果^[18-19]。YANG 等^[19]采用液相 色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱联用法[liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry, LC-QqQ(LIT)-MS/MS],可同时对多种目标化 合物进行检测,该方法灵敏度较高,但一般检测实验室难以 配备此类较高端的仪器设备。本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC -MS/MS)同时测定饮料中 8 种香豆 素类化合物的分析方法,可为饮料中 8 种香豆素类化合物的 同时测定提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究在北京市各大中型超市采集饮料样品 39 例,包 括天然矿泉水、果蔬汁类饮料、含乳饮料、发酵乳饮料、碳 酸饮料、茶饮料、运动饮料、速溶咖啡、黑芝麻糊、奶茶冲 剂、可可粉等。将果蔬汁类饮料、碳酸饮料、含乳饮料等液 体样品充分摇匀分装密封,将速溶咖啡、黑芝麻糊、奶茶冲 剂等固体饮料样品捣碎充分混匀分装密封,并记录其品牌、 货架期、包装、建议保存条件等信息,4 ℃避光保存,备用。

乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠、无 水硫酸钠(分析纯, 中国百灵威公司); 香豆素、7-甲氧基香 豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆 素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆 素)(纯度均大于 99.6%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH公司)。

1.2 仪器与设备

Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); KQ-500DE 超 声波清洗仪(昆山市超声仪器公司); Allegra X-22R 高速冷 冻离心机(美国 Beckman Coulter 有限公司); PL203 电子天 平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Vortex Genie 2 涡旋 振荡器(美国 Vortex 公司); Symbiosis Pro 液相色谱(荷兰 Spark Holland 公司); QTRAP 6500 三重四极杆质谱系统(美 国 AB SCIEX 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 前处理方法 准确称取液体饮料试样 5 g(精确至 0.1 g), 置于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 10.0 mL 乙腈,涡旋振 荡 30 s,加入 5.0 g 氯化钠后,超声提取 10 min,离心 5 min (8000 r/min, -4 °C),取 1.0 mL 上清液,过 0.22 μm 有 机滤膜,待测。

准确称取固体饮料试样 1 g(精确至 0.1 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 10.0 mL 乙腈,涡旋振荡 30 s, 加入 3.0 g 无水硫酸钠后,超声提取 10 min,离心 5 min (8000 r/min, -4 ℃),取 1.0 mL 上清液,过 0.22 µm 有机滤膜, 待测。

1.3.2 标准储备液配制

分别准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg)标准品,置于 5 mL 小烧杯中,定量转移至 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈 溶解并定容至刻度,混匀,配制成质量浓度为 100 mg/L 标 准储备液。4 ℃避光保存,备用。

1.3.3 基质匹配标准曲线

分别称取空白饮料样品 1 g(精确至 0.1 g), 按 1.3.1 的 方法分别完成样品前处理,得到不同饮料样品的基质提取 液,用基质提取液作为稀释溶液制备基质标准溶液。

1.3.4 仪器条件

参考文献^[11-13]的方法,本研究对仪器相关参数进行 了优化。

液相色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈反相 液相色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 0.2%甲 酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 流速 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL; 流动相梯度洗脱程序 0.00~2.00 min, A 相 70%, 2.00~12.50 min, A 相 70%~10%, 12.50~13.00 min, A 相 10%~70%, 13.00~15.00 min, A 相 70%。

质谱条件:电离方式为电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI),扫描方式为正离子模式,测定模式为多反 应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式,干燥 气、雾化气、鞘气、碰撞气等均为高纯氮气,电压为 4500 V, 干燥气温度为 600 ℃,干燥气流速为 40.0 L/min,雾化气压 力为 275.8 kPa (40.0 psi),定性离子对、定量离子对和碰撞 能量等其他质谱参数见表 1。

表 1	8 种香豆素类化合物的保留时间和质谱参数

Table 1 Retention time and mass spectrum parameters of 8 kinds of coumarin compounds					
化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能/eV	去簇电压/V
香豆素	4.38	147.3	102.9*/91.0	20; 30	55
7-甲氧基香豆素	5.16	177.1	121.0*/134.1	30; 40	60
二氢香豆素	5.37	149.1	107.0*/121.0	20; 20	50
7-甲基香豆素	5.84	161.1	105.0*/115.1	30; 30	55
7-乙氧基-4-甲基香豆素	7.25	205.1	177.2*/105.0	25; 30	55
醋硝香豆素	7.96	354.1	249.1*/163.0	45; 20	50
环香豆素	10.56	323.1	251.0*/173.1	25; 40	46
3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)	11.31	461.0	244.0*/446.3	25; 35	50

注:*定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的考察

三重四极杆质谱条件的优化一般包括母离子、子离子的 选取,喷雾电压、去簇电压、碰撞能量等的优化。本研究以 针泵注射的方式将 0.1 mg/L 的香豆素等 8 种目标物标准溶液 分次注入质谱仪中,在正离子扫描模式下进行一级质谱扫描, 选取相对丰度较高的特征碎片离子,得到稳定的分子离子峰 [M+H]⁺,对去簇电压进行优化后,再进一步对碰撞能进行优 化,经过二级质谱扫描,得到单一化合物的二级质谱信息, 在全扫描模式下得到母离子、经碰撞打碎后的碎片离子。本 研究选取响应强度高、干扰小的两对离子作为监测离子对用 于定性和定量,8 种香豆素类化合物的总离子流图见图 1。最 后在 MRM 正离子扫描模式下优化离子对的电喷雾电压、雾 化温度、去簇电压、碰撞能量、碰撞室入口和出口电压等质 谱参数,优化后的质谱参数和保留时间见表1。



注: 1. 香豆素; 2.7-甲氧基香豆素; 3. 二氢香豆素; 4.7-甲基香豆 素; 5.7-乙氧基-4-甲基香豆素; 6. 醋硝香豆素; 7. 环香豆素; 8.3.3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)。

图 1 8 种香豆素类化合物标准溶液总离子流图



2.2 色谱条件的考察

为实现多种目标化合物的最佳分离效果,在确定以 Agilent Eclipse plus C₁₈色谱柱为分析柱后,本研究考察了 乙腈-甲酸水、甲醇-甲酸水、甲醇-水、乙腈-水^[3-7]4 种流 动相体系对目标化合物洗脱分离的影响。结果表明在乙腈 体系中,8种香豆素类化合物均有较好的色谱保留,且出峰 时间均在12 min之内;当选择乙腈-甲酸水体系时,二氢香 豆素的峰响应强度远大于选用乙腈-水体系时,其他7种化 合物峰响应强度影响不明显,且乙腈-甲酸水体系下色谱 柱的耐受压力较小。因此,综合考虑保留时间、质谱响应 和色谱峰型,选择乙腈-甲酸水体系为液相色谱的流动相。

2.3 前处理方法的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

化合物的提取效率主要由提取溶剂、提取方式、提取 时间等因素决定,由于香豆素类化合物易溶于极性溶剂^[20], 本研究进行 3 个浓度(10、20、50 μg/kg)的加标回收实验,每 个浓度 2 组平行,并比较其回收率,分别采用乙腈、甲醇、 乙醇从果汁饮料中提取 8 种香豆素类化合物。实验结果如 图 2 所示,甲醇为提取溶剂时,香豆素 7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素和 3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)的提取回收 率均低于 20%,二氢香豆素的回收率高于乙醇为提取溶剂 时的回收率;乙醇为提取溶液时,二氢香豆素和 3,3'-羰基 双(7-二乙胺香豆素)的提取回收率仅在 4.9%~23.5%之间。 提取溶剂对 7-乙氧基-4-甲基香豆素、环香豆素和醋硝香豆 素的回收率影响不明显;当采用乙腈为提取溶剂时,8 种香 豆素类化合物回收率均在 75.4%~110.8%之间。因此,为实 现 8 种香豆素类化合物的同时测定,本方法选择乙腈作为 提取溶剂。

2.3.2 提取时间的优化

样品提取时间是一个重要的参数,提取时间过短将 不能将目标物质完全提取出来, 而提取时间过长则可能会 造成香豆素类化合物结构上的改变[20-21]。以回收率为指标, 本研究考察不同超声提取时间(1、5、10、15 和 20 min)对 各目标物提取效率的影响,每个提取时间2组平行。研究 结果表示,随着提取时间增长,目标化合物的提取效率逐 步提升后下降,见图 3。当提取时间为 1 min 时,目标化合 物的回收率均低于 40.0%, 当提取时间为 5 min 时, 7-甲氧 基香豆素、醋硝香豆素的回收率均已超过 75.0%, 且随超 声时间的延长, 回收率无明显变化; 当提取时间为 10 min 时,香豆素、7-甲基香豆素、二氢香豆素、7-乙氧基-4-甲 基香豆素和 3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)回收率在 80.8%~85.4%; 当提取时间超过 15 min 时, 7 种目标化合物 的回收率均随时间的延长而下降;当提取时间为20min时, 环香豆素的回收率达到 94.2%, 但二氢香豆素的回收率仅 为 47.7%。综上结果,考虑到提取效率,为实现 8 种香豆素 类化合物的同时提取,本研究采用超声提取 10 min,可实 现 8 种化合物回收率在 76.4%~104.7%之间。

2.3.3 提取次数的确定

考虑到超声提取次数对提取效率的影响,本研究考察低、中、高3个添加水平(10、20、50 µg/kg)下8种香豆 素类化合物分次提取的回收率,以10 mL乙腈为提取溶剂, 对样品中的目标化合物进行3次提取。实验结果表明,提 取1次,3个添加水平的样品中8种香豆素类化合物的回收 率均在75.0%以上,第2次提取的回收率在1.0%~2.0%之 间,第3次提取为未检出。综合考虑回收率、检测效率和 实验成本,本方法超声提取1次可满足测定要求,因此本 研究采用超声提取1次。



图 2 3 种提取溶剂下 8 种香豆素类化合物的回收率 Fig.2 Recoveries of 8 kinds of coumarin compounds in 3 kinds of extraction solvents



图 3 不同提取时间下 8 种香豆素类化合物的回收率 Fig.3 Recoveries of 8 kinds of coumarin compounds in different extraction time

2.4 净化条件的优化

由于食品基质较为复杂,参考相关文献^[13,16,21],考察 不同净化方式下目标化合物提取回收率和净化效果的区 别。本研究分别比较了经亲水亲油(hydrophile-lipophile balance, HLB)固相萃取柱、乙二胺-N-丙基甲硅烷 (primary-secondary amine, PSA)粉末和C₁₈粉末净化后含乳 饮料样品中 8 种香豆素类化合物的回收率和净化效果。结 果表明,经 HLB 固相萃取柱净化后,虽杂质干扰稍有降低, 但 7-乙氧基-4-甲基香豆素和 7-甲氧基香豆素回收率稍有 降低;经 PSA 粉末和 C₁₈粉末净化后,香豆素、二氢香豆 素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)回收率明显减低。

与其他研究结果一致,对于较复杂的食品基质,采用 HLB 固相萃取柱可对样品基质进行有效净化^[22]。但是,鉴 于饮料样品基质干扰相对较小,未经净化的提取液中 8 种 香豆素类化合物定量离子的提取离子流图干扰不明显。因 此,综合考虑检测效率、实验成本、净化效率等,饮料样 品经乙腈提取和高速冷冻离心,上清液过 0.22 μm 有机滤 膜后上机检测。

除此之外,对于含脂肪的样品,如发酵乳、植物蛋白 饮料等,经乙腈进行蛋白沉淀的同时,乙腈也易将样品中 的少量脂肪提取出来,为降低脂肪对检测结果的影响,对 于脂肪含量较高的样品,采用加入 5 mL 乙腈饱和正己烷, 涡旋振荡后弃去正己烷层进行样品净化。

2.5 滤膜效应考察

本研究在实验室间对比实验中发现,其中 1 家实验室 提供的反馈结果中 4 种目标化合物的回收率低于 60.0%,因 此研究人员对方法进行了排查,发现滤膜对香豆素类化合 物的回收率有影响。本研究对尼龙、聚四氟乙烯、聚醚砜、 聚丙烯 4 种直径为 13 mm 的 0.22 μm 孔径滤膜的性能进行 了考察。对比结果发现,聚丙烯滤膜对 8 种香豆素类化合物 均有吸附作用,其中对 7-乙氧基-4-甲基香豆素、7-甲氧基香 豆素、醋硝香豆素和 3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)吸附作用 明显,经滤膜过滤后,回收率仅为 57.0%~67.8%。因此,所 选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象后方可使用。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性范围、检出限和定量限

本研究配制了 1、2、5、10、20、50、100、200 µg/L 的 8 种香豆素类化合物的混合标准溶液,以基质溶液定容, 在优化后的条件下,将上述标准系列工作液按照浓度由低 到高进样,以待测物的质量浓度为横坐标,相应化合物的响 应值峰面积为纵坐标绘制标准曲线。以 3 倍信噪比(*S/N*=3)、 10 倍信噪比(*S/N*=10)分别计算方法的检出限和定量限。结果 显示,8 种香豆素类化合物在 1~200 µg/L 质量浓度范围线性 良好, *r*² 均大于 0.9976,对于液体饮料,方法检出限为 0.2~4.0 µg/kg,定量限为 0.6~10.0 µg/kg;对于固体饮料,方 法检出限为 1.0~20.0 µg/kg,定量限为 3.0~50.0 µg/kg,相关 系数和回归方程等见表 2。本研究的方法检出限和定量限明 显低于文献报道^[5-6]。

2.6.2 回收率和精密度

取空白茶饮料样品 5 g, 分别添加 3 个水平(1、2、5 倍 LOQ)的标准储备液, 完成加标回收实验, 每个加标水 平 6 组平行, 并计算 8 种香豆素类化合物的回收率和精密 度。结果显示, 8 种香豆素类化合物的平均回收率为 87.8%~105.3%, 日内精密度为 0.7%~6.6%, 日间精密度为 1.7%~3.9%, 结果见表 3。

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (r), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of 8 kinds of coumarin compounds						
日后化合物	建树同归于田	相关系数(r ²)	检出限/(µg/kg)		定量限/(µg/kg)	
日怀化合物	线性回归力性		液体饮料	固体饮料	液体饮料	固体饮料
香豆素	<i>Y</i> =2.45×10 ⁵ <i>X</i> +24200	0.9996	0.5	2.5	2.0	10.0
7-甲氧基香豆素	<i>Y</i> =8.67×10 ⁵ <i>X</i> +69100	0.9991	0.5	2.5	2.0	10.0
二氢香豆素	<i>Y</i> =4.17×10 ⁴ <i>X</i> +36500	0.9999	4.0	20.0	10.0	50.0
7-甲基香豆素	$Y = 5.51 \times 10^5 X + 35500$	0.9998	0.4	2.0	1.6	5.0
7-乙氧基-4-甲基香豆素	<i>Y</i> =1.43×10 ⁶ <i>X</i> +20200	0.9995	0.2	1.0	0.8	4.0
醋硝香豆素	$Y = 1.47 \times 10^{6} X + 45200$	0.9998	0.2	1.0	0.6	3.0
环香豆素	<i>Y</i> =2.54×10 ⁵ <i>X</i> +40900	0.9976	0.4	2.0	1.8	9.0
3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)	<i>Y</i> =7.09×10 ⁵ <i>X</i> +13300	0.9994	0.5	2.5	2.0	10.0

表 2 8 种香豆素类化合物的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (r²), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of 8 kinds of coumarin compounds

表 3 茶饮料中 8 种香豆素类化合物的平均回收率、日内精密度和日间精密度(n=6)

Table 5 Average recoveries, intra-uay prec	isions and inter-day precisions	s of 8 kinus of countarin comp	ounus in tea urink (<i>n</i> =0)
目标化合物	平均回收率/%	日内精密度/%	日间精密度/%
香豆素	104.6	2.2	2.1
7-甲氧基香豆素	95.1	1.3	1.7
二氢香豆素	105.3	1.7	2.9
7-甲基香豆素	92.5	0.7	1.7
7-乙氧基-4-甲基香豆素	94.4	1.5	3.9
醋硝香豆素	87.8	1.2	1.8
环香豆素	91.9	1.4	3.1
3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)	95.7	6.6	2.9

2.6.3 实际样品测定

Table 2

采用本研究已建立的检测方法对市售的 39 例饮料样 品进行 8 种香豆素类化合物的含量测定,包括天然矿泉 水、果蔬汁类饮料、含乳饮料、发酵乳饮料、碳酸饮料、 茶饮料、运动饮料、速溶咖啡、黑芝麻糊、奶茶冲剂、可 可粉等,并对数据结果进行分析。结果显示,3 例碳酸饮料 样品中检出香豆素,含量分别为 35.8、27.9 和 30.0 μg/kg。 检出值均低于现行出入境检验检疫行业标准 SN/T 4318—2015 中香豆素类化合物 50.0 μg/kg 的测定低限,其 余 7 种化合物在实际样品中测定值均低于方法检出限。

3 结 论

本研究采用直接乙腈提取, 经冷冻高速离心分层后, 采用高效液相色谱-串联质谱法测定, 通过提取溶剂的选 择、提取时间的优化等, 建立了同时测定饮料中 8 种香豆 素类化合物的定量分析方法。本方法较其他文献方法和标 准方法中 50.0 µg/kg 的测定低限, 具有更低的检出限和定 量限, 灵敏度更高, 且前处理操作更加简单, 方法学评价 和实际样品测定结果良好,可满足同时测定饮料中 8 种香 豆素类化合物的检测要求。目前,该方法可用于测定饮料 中香豆素含量的总和,未来将进一步研究天然香豆素类化 合物和合成香豆素类香精的鉴别。

参考文献

- HSIEH CYJ, SUN M, OSBORNE G, et al. Cancer hazard identification integrating human variability: The case of coumarin [J]. Int J Toxicol, 2019, 38(6): 50–552.
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to coumarin [J]. EFSA J, 2004, 2(12): 1–36.
- [3] SPROLL C, RUGE W, ANDLAUER C, et al. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods [J]. Food Chem, 2008, 109(2): 462–469.
- [4] LAVINE BK, CORONA DT, PERERA UDNT. Analysis of vanilla extract by reversed phase liquid chromatography using water rich mobile phases [J]. Microchem J, 2012, 103: 49–61.
- [5] SCHAFFRATH M, WEIDMANN V, MAISON W. Enantioselective high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromate graphy separation of spirocyclic terpenoid flavor compounds [J]. J Chrom

nds in too duinly (n=6)

atogr A, 2014, (1363): 270-277.

- [6] 王玉娇,邓伟,刘通,等. 食品中香料香精分析方法研究进展[J]. 食品 安全质量检测学报, 2019, 10(2): 400–406.
 WANG YJ, DENG W, LIU T, *et al.* Research progress of detection techniques for food flavors and fragrances [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(2): 400–406.
- [7] 王玉娇,刘通,邓亚美,等. QuEChERS-气相色谱-串联质谱法快速检 测茶叶中6种禁用香精成分[J]. 色谱,2019,37(7):766-772.
 WANG YJ, LIU T, DENG YM, *et al.* Rapid determination of six banned fragrance components in tea by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(7): 766-772.
- [8] 刘通,王玉娇 王秀娟,等. 气相色谱-三重四极杆质谱法同时测定巴 氏杀菌乳中9种香精成分[J]. 色谱, 2019, 37(11): 1215–1220.
 LIU T, WANG YJ, WANG XJ, *et al.* Simultaneous determination of nine flavor compounds in pasteurized milk by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(11): 1215–1220.
- [9] LOPEZ P, VAN SISSEREN M, DE MARCO S, et al. A straightforward method to determine flavouring substances in food by GC-MS [J]. Food Chem, 2015, 174: 407–416.
- [10] FALASCA A, CAPRARI C, FELICE VD, et al. GC-MS analysis of the essential oils of *Juniperus communis* L. berries growing wild in the Molise region: Seasonal variability and *in vitro*, antifungal activity [J]. Biochem Syst Ecol, 2016, (69): 166–175.
- [11] REN ZQ, NIE B, LIU T, et al. Simultaneous determination of coumarin and its derivatives in tobacco products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2016, 21(11): 1511–1525.
- [12] SHEN Y, HAN C, LIU B, et al. Determination of vanillin, ethyl vanillin, and coumarin in infant formula by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. J Dairy Sci, 2014, 97(2): 679–686.
- [13] DE JAGER LS, PERFETTI GA, DIACHENKO GW. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: Liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies [J]. J Chromatogr A, 2007, 1145(1-2): 83–88.
- [14] DRESLER S, BOGUCKA-KOCKA A, KOVÁČIK J, et al. Separation and determination of coumarins including furanocoumarins using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Talanta, 2018, 187: 120–124.
- [15] PICO J, ANTOLÍN B, ROMÁN L, et al. Analysis of volatile compounds in gluten-free bread crusts with an optimised and validated SPME -GC/QTOF methodology [J]. Food Res Int, 2018, (106): 686–695.
- [16] 孟宪双,马强,袁汉成,等. 化妆品中致敏原香豆素及其衍生物的高效 液相色谱法测定及质谱确证[J]. 分析测试学报, 2016, 35(7): 799-804.
 MENG XS, MA Q, YUAN HC, *et al.* Determination of coumarin allergen and its derivatives in cosmetics by HPLC and their verification by

HPLC-MS /MS [J]. J Instrum Anal, 2016, 35(7): 799-804.

- [17] 朱玲玲,赵阳,孙欣光,等.超临界流体色谱在天然产物分离分析中的应用进展[J].药物分析杂志,2016,(8):1317-1323.
 ZHU LL, ZHAO Y, SUN XG, et al. Application of supercritical fluid chromatography in the separation and analysis of natural products [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, (8): 1317-1323.
- [18] WELKE JE, ZANUS M, LAZZAROTTO M, et al. Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools [J]. Food Chem, 2014, 164(20): 427–437.
- [19] YANG W, YE M, LIU M, et al. A practical strategy for the characteriz ation of coumarins in *Radix glehniae* by liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(27): 4587–4600.
- [20] 孔令义. 香豆素化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2008. KONG LY. Coumarin Chemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- [21] 韩熠,张承明,喻坤,等. 食品及化妆品中香豆素和黄樟素类化合物分析方法研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2013, (1): 45–49.
 HANG Y, ZHANG CM, YU K, *et al.* Recent advances in analytical methods for coumarins and safroles in food and cosmetics [J]. Flavour Frag Cosmet, 2013, (1): 45–49.
- [22] 董玉瑛,胡梦乔,邹学军,等.固相微萃取及相关联用技术应用进展[J].大连民族大学学报,2018,20(1):1–7.

DONG YY, HU MQ, ZOU XJ, *et al.* Application progress of solid phase microextraction and related combined application technology [J]. J Dalian Nation Univ, 2018, 20(1): 1–7.

(责任编辑:张晓寒 于梦娇)

作者简介



许博舟,硕士,助理研究员,主要研究 方向为食品安全。 E-mail: bozhoux@126.com



王秀娟,硕士,副研究员,主要研究方 向为分析化学。 E-mail: xjwangcaiq@163.com