研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2014.11018

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

杨华梅*, 杭 莉
(泰州市疾病预防控制中心, 江苏 泰州 225300)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚 4 种香精的方法。样品用水提取,固相萃取小柱净化,目标化合物采用 UPLC™ BEH C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离,以甲醇和含 0.002 mol/L 乙酸铵及 0.1%(v/v)甲酸的水溶液为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾离子源电离、正离子多反应监测模式质谱检测。4 种香精在 5~500 μg/L 或 10~1 000 μg/L 质量浓度范围内线性良好,相关系数均在 0.999 5~0.999 8 之间;回收率为 75.8%~116%,相对标准偏差(RSD, n=6)为 1.58%~4.01%。该方法灵敏、准确,检测范围广,分析速度快,适合食品中香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚 4 种香精的检测。

关键词:超高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱法;香兰素;乙基香兰素;麦芽酚;乙基麦芽酚;食品
中图分类号:O658 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-8713(2015)03-0250-06

Determination of four frequently-used essences in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Huamei*, HANG Li
(*Taizhou Center for Disease Control and Prevention, Taizhou 225300, China*)

Abstract: A method has been developed for the simultaneous determination of vanillin, ethyl vanillin, maltol and ethyl maltol in foods by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS). The sample was extracted with ultrapure water, and purified with SPE column. The target compounds were separated on a C18 column with the gradient elution of methanol and water containing 0.002 mol/L ammonium acetate and 0.1% (v/v) formic acid. The four components were determined in the modes of electrospray positive ionization (ESI^+) and multiple reaction monitoring (MRM). The linear ranges were 10-1 000 μg/L for vanillin and maltol and 5-500 μg/L for ethyl vanillin and ethyl maltol, with the correlation coefficients more than 0.999. The recoveries of the four compounds ranged from 75.8% to 116%, with the relative standard deviations (RSDs) of 1.58%-4.01%. The method showed good extraction efficiency, high sensitivity and good reproducibility. It is suitable for the simultaneous detection of vanillin, ethyl vanillin, maltol and ethyl maltol in foods.

Key words: ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS); vanillin; ethyl vanillin; maltol; ethyl vanillin; food

香精作为一种可影响食品口感和风味的特殊高倍浓缩添加剂已经被广泛应用到食品生产的各个领域,它可以弥补食品本身的香味缺陷,赋予部分食品生动的原滋味,加强食品的香味,掩盖食物的不良气息[1,2]。香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚是食品中常用的重要的食品增香剂,它们被广泛用作糖果、饼干、糕点和饮料中。但美国儿童科学年报报道过量摄入食用香精、香料会加重肾的负担,有损脏器的发育[3];欧盟专家委员会报道,大剂量食用香兰素可导致头痛、恶心、呕吐、呼吸困难,甚至损伤肝、肾;而麦芽酚具有弱的致突变活性和诱导细胞死亡的毒性作用[4],并且它可以控制人体内铁和铝的含量水平[5,6]。而我国不少商家为了追求最大利益违法添加香料,以至出现“香精大米”和“香精包子”

* 通讯联系人.Tel:(0523)86393133,E-mail:yanghuamei263@sina.com.
收稿日期:2014-11-13

等事件。目前 GB2760-2011《食品安全国家标准食品添加使用标准》中规定较大婴儿和幼儿配方食品中香兰素和乙基香兰素的最大使用量均为 5 mg/100 mL,婴幼儿谷类辅助食品中香兰素的最大使用量为 7 mg/100 mL, 0 至 6 个月婴幼儿配方食品以及巴氏杀菌乳等 14 类新鲜原味食品中不得添加任何食用香料。考虑到大量食用这些人工合成的香精会对人体造成潜在性危害以及缺少相应的检测标准,建立食品中香精的检测方法具有重要的意义。

目前文献报道单独检测香兰素、乙基香兰素、麦芽酚、乙基麦芽酚的方法很多,有光度法[7]、伏安法[8]、电极法[9]、高效液相色谱法(HPLC)[10-15]、化学发光法[16]、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法[17]、液相色谱-质谱联用法[18,19]以及毛细管电泳法[20]等。同时测定这 4 种物质的方法只搜索到两篇文献报道,一是任呼博等[21]用 HPLC 同时测定了烟用添加剂中的这 4 种物质;二是 Ni 等[22]用分光光度法同时测定了食品中的这 4 种香精。本文采用超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-MS/MS)对食品中的香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚 4 种香精进行了同时测定。

1　实验部分

1.1　仪器与设备

Waters ACQUITY 超高效液相色谱;AB SCIEX API4000$^+$质谱仪;中佳 HC-3018R 高速冷冻离心机。

1.2　试剂与材料

甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);实验用水:屈臣氏瓶装蒸馏水;乙酸铵和甲酸(色谱纯,美国Tedia 公司); STYRE-SCREEN^{R}SSH2P 固相萃取小柱(60 mg/3 mL,美国 UCT 公司);香兰素(纯度 98%)、乙基香兰素(纯度 99%)、麦芽酚(纯度 99%)和乙基麦芽酚(纯度 99%)。试验中牛奶、火腿、瓜子、大米、饮料和糕点等 30 份样品均购自本地超市。

1.3　标准溶液的配制

分别称取香兰素、乙基香兰素、麦芽酚、乙基麦芽酚 0.1 g(精确至 0.1 mg),置于 10 mL 量瓶中,加少量甲醇溶解后,用纯水稀释至刻度,置于冰箱中冷藏。临用前用纯水配制成质量浓度均为 10 mg/L 的 4 种物质的混合标准溶液。

1.4　样品前处理

液体样品:准确称取样品 1.0 g 至 50 mL 离心管中,加入 10 mL 水稀释混匀,备用;半固体样品和固体样品:准确称取样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 水,置于摇床振摇(300 r/min) 30 min 后,冷冻离心(5 ℃, 10 000 r/min) 5 min,取上清液 5 mL 上柱;油脂及果胶类样品:准确称取样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 水,置于摇床振摇(300 r/min) 30 min 后,冷冻离心(5 ℃, 10 000 r/min) 5 min,上层水溶液全部用定性滤纸过滤,取滤液 5 mL 上柱。

将 SSH2P 固相萃取小柱分别用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。将上述离心后的样品加入小柱内,常压过滤,待样液全部上完后用 20 mL 水洗涤小柱并真空抽近干,用 1 mL 甲醇洗脱待测物,最后用含 0.002 mol/L 乙酸铵和 0.1% (v/v)甲酸的水溶液将洗脱液定容至 5 mL,混匀后进行仪器分析。

1.5　LC-MS/MS 条件

1.5.1　LC 条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC^{TM}BEH C18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流速:0.2 mL/min;进样体积:10.0 μL;柱温:30 ℃;样品室温度:25 ℃;流动相:A 为 0.002 mol/L 乙酸铵和 0.1% (v/v)甲酸的水溶液;B 为甲醇;梯度洗脱程序:0~6 min, 2%B~98%B; 6~7 min, 98%B; 7~9 min, 98%B~2%B; 9~10 min,2%B。

1.5.2　MS/MS 条件

扫描方式:电喷雾电离源正离子(ESI$^+$)扫描;采集模式:多反应监测(MRM)模式;碰撞气压力(CAD): 6 Pa;气帘气压力(CUR): 15 Pa;雾化气压力(GS1): 50 Pa;辅助气压力(GS2): 50 Pa;入口电压(EP): 10 V;碰撞室出口电压(CXP): 12 V;喷雾电压:5 500 V;气化温度:300 ℃。定量和定性离子、碰撞能量等参数见表 1。

表 1　4 种物质的保留时间、相对分子质量和串联质谱分析参数
Table 1　Retention times, relative molecular masses and MS/MS parameters for the four compounds

Analyte	Retention time/min	M_r	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/V
Vanillin	3.78	152.15	153.2	93.1*	69	20
				125.4	65	14
Ethyl vanillin	4.25	166.18	167.2	93.1*	62	25
				139.1	58	15
Maltol	2.79	126.11	127.1	109.2*	70	25
				52.9	74	33
Ethyl maltol	3.66	140.14	141.2	126.1*	67	26
				70.9	55	40

* quantification ion. DP: declustering potential. CE: collision energy.

2　结果与讨论

2.1　液相色谱条件的优化

选用 Waters ACQUITY UPLC^{TM}BEH C18 色谱

柱,以甲醇和水为流动相,在水中加入 0.002 mol/L 乙酸铵和 0.1%(v/v)甲酸有助于待测物的母离子 $[M+H]^+$的形成,并能增强检测的灵敏度。在 1.5.1 节条件下,各个待测物的离子流图见图 1。

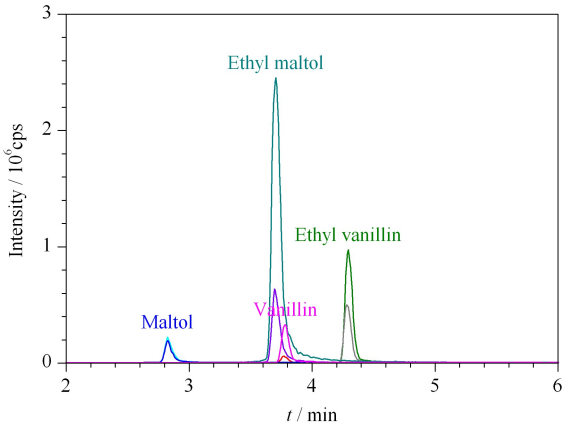


图 1 4 种标准物质的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of the four standards

2.2 质谱条件的优化

2.2.1 定性、定量离子的选择

根据 4 种香精的结构特征,选择正离子模式电离,采用流动注射泵进样,分别对质量浓度为 1.0 mg/L 的 4 种香精标准溶液进行一级质谱扫描,确定其准分子离子峰,并分别优化其去簇电压。分别以其准分子离子为母离子,通过碰撞气碰撞产生碎片离子进行二级质谱扫描,同时优化碰撞电压,选择丰度较高的 2 种碎片离子作为定性与定量特征离子。通过试验优化,4 种香精的定性与定量特征离子及优化的质谱参数见表 1。

2.2.2 分析物的子离子产生途径

从香兰素的化学结构式可以看出其苯环上有羟基、甲氧基和醛基 3 个基团,图 2 中香兰素的碎裂途

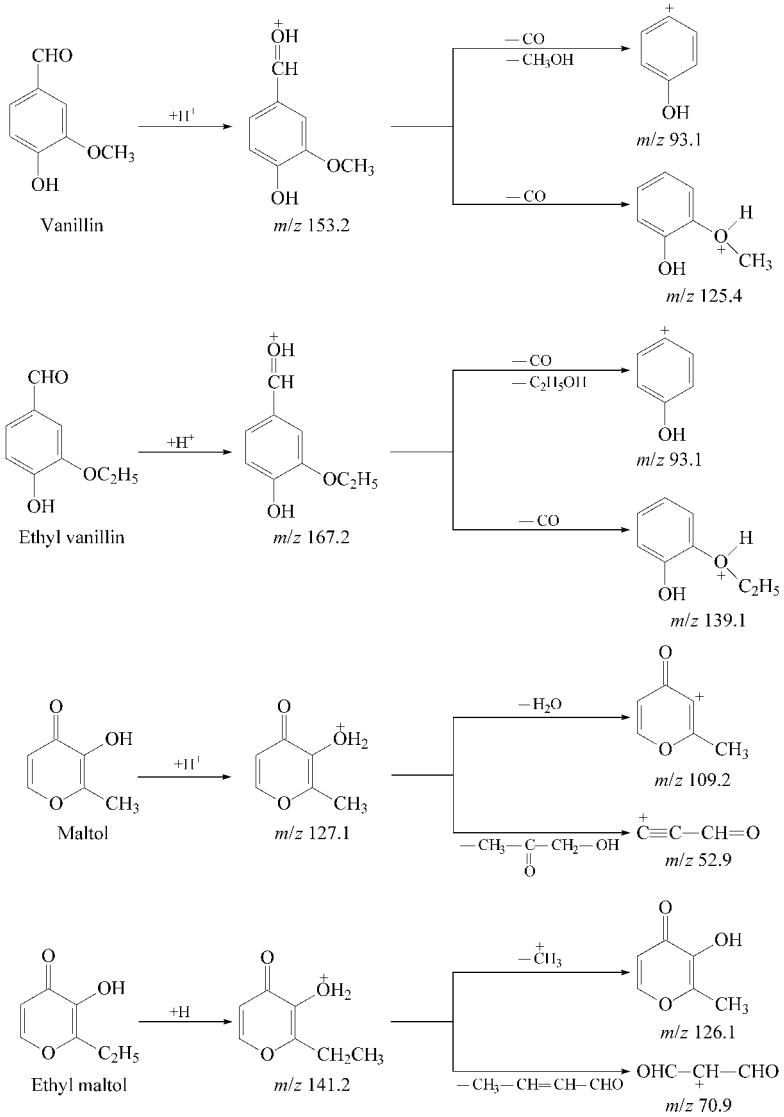


图 2 4 种化合物可能的碎裂途径

Fig. 2 Tentative fragmentation pathways for the four compounds

径表明,流动相中游离氢离子易进攻稳定性最差的醛基形成 m/z 153.2 母离子,当碰撞电压小时母离子脱去一个 CO 分子形成 m/z 125.4 子离子,当碰撞电压大时母离子同时脱去一个 CO 分子和一个 CH_3OH 分子形成 m/z 93.1 子离子;图 2 中乙基香兰素的裂解原理同香兰素。

从麦芽酚的化学结构式可以看出其吡喃酮环上有一个甲基和一个羟基,图 2 中麦芽酚的碎裂途径表明,流动相中游离氢离子易进攻羟基形成 m/z 127.1 母离子,当碰撞电压小时母离子脱去一个水分子形成 m/z 109.2 子离子,当碰撞电压增大时电子在环内传递吡喃酮环发生裂解并结构重组,形成 m/z 52.9 子离子;而图 2 中乙基麦芽酚则是在电压小时母离子脱去一个甲基正离子形成 m/z 126.1 分子,电压增大时母离子也发生环裂解并结构重组形成 m/z 70.9 子离子。

2.3　样品前处理条件的选择

食品中蛋白质的含量较高,用水对样品进行浸泡处理时会带入大量的水溶性蛋白质,因此测定前需对样品进行净化处理。

本文采用固相萃取法对提取液进行净化,试验中选用不含 4 种化合物的牛奶样品,添加 10 mg/L 的混合标准溶液 0.5 mL,对比了 STYRE-SCREEN^{R}SSH2P 小柱(60 mg/3 mL)和 CNW-BOND LC-C18 小柱(500 mg/6 mL)的富集、净化效果,结果见表 2。

表 2　采用 2 种固相萃取小柱净化时 4 种物质的回收率

Table 2　Recoveries of the four compounds purified with two SPE cartridges　%

SPE cartridge	Vanillin	Ethyl vanillin	Maltol	Ethyl maltol
C18	98.9	94.2	0	0
SSH2P	99.4	94.8	94.0	93.1

通过试验比较,发现上样后 C18 小柱对麦芽酚和乙基麦芽酚不保留,而 SSH2P 小柱对 4 种物质富集都很好。原因在于麦芽酚、乙基麦芽酚、香兰素和乙基香兰素均具有弱酸性,尤其是麦芽酚和乙基麦芽酚的极性较大,普通的 C18 柱不适合极性较大的物质,而 SSH2P 小柱填料为苯乙烯-二乙烯基苯聚合物颗粒,对酸性、中性和碱性化合物均能较好地富集。试验证明 SSH2P 小柱既对 4 种物质有着很好的富集回收率,又能去除大量水溶性蛋白质,因此本试验选择 STYRE-SCREEN^{R}SSH2P 小柱进行净化。

2.4　定量限及线性关系

将 10 mg/L 的混合标准溶液用甲醇和 0.002 mol/L 乙酸铵及 0.1%(v/v)甲酸水溶液(体积比 1∶4)配制成系列浓度的标准溶液,仪器检出限为样品处理后的阴性基质中添加标准品的方式获得($S/N\geqslant3$),定量限采用在样品处理后的阴性基质中添加标准品的方式获得($S/N\geqslant10$);以目标组分定量离子的响应值 y 对相应的质量浓度 x(μg/L)绘制标准曲线,4 种香精的质量浓度线性关系良好,相关系数 r 在 0.999 5~0.999 8 之间(见表 3),均满足检测要求。

表 3　线性关系、相关系数(r)、仪器检出限(IDL)和定量限(LOQ)

Table 3　Linear relationships, correlation coefficients (r), limits of instrument detection (IDLs) and quantification (LOQs)

Compound	Linear equation	r	Linear range/(mg/L)	IDL/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
Vanillin	$y=3.83\times10^6x+1.32\times10^4$	0.9998	0.01-1.0	0.025	0.075
Ethyl vanillin	$y=1.11\times10^7x-1.81\times10^4$	0.9995	0.005-0.5	0.015	0.045
Maltol	$y=2.42\times10^6x-1.07\times10^4$	0.9997	0.01-1.0	0.030	0.090
Ethyl maltol	$y=1.94\times10^7x+3.89\times10^5$	0.9996	0.005-0.5	0.010	0.030

y: response value of quantitative ion of analyte; x: mass concentration of analyte, μg/L.

2.5　回收率、精密度和基质效应

在牛奶、火腿、瓜子、大米、果冻及糕点阴性样品中分别添加 0.50 mg/kg 的混合标准溶液,混合后静置,使标准溶液被样品充分吸收,然后按照本方法测定,计算加标回收率和相对标准偏差(RSD)。另外将牛奶、火腿、瓜子、大米、果冻及糕点阴性样品按优化的方法制成基质溶液并用其稀释标准溶液后测定,计算每种样品的基质效应。

由表 4 数据可以看出,4 种香精的回收率为 75.8%~116%,RSD 为 1.58%~4.01%,基质效应为 2.37%~37.8%,表明净化效果和质谱条件较为合理,有利于定量分析的准确性。

2.6　实际样品的检测

利用本文建立的分析方法,对火腿肠、瓜子、牛奶、饮料、大米以及糕点等 6 类 30 份样品中的 4 种香精进行了测定,结果见表 5。可以看出,香兰素的检出含量为 0.082~53 mg/kg,乙基香兰素的检出含量为 0.10~6.8 mg/kg,麦芽酚的检出含量为 0.17~3.7 mg/kg,乙基麦芽酚的检出含量为 0.12~6.6 mg/kg。

表 4 各种基质中 4 种物质的加标回收率、RSD 和基质效应(n=6)

Table 4 Recoveries, RSDs and matrix effects of the four compounds spiked in different matrices (n=6)

Matrix	Compound	Average recovery/%	RSD/%	Matrix effect/%	Matrix	Compound	Average recovery/%	RSD/%	Matrix effect/%
Milk	vanillin	102.1	1.58	2.81	Melon seeds	vanillin	82.3	3.89	31.7
	ethyl vanillin	93.5	1.73	5.36		ethyl vanillin	79.8	4.01	24.1
	maltol	94.1	1.67	7.50		maltol	102	2.32	20.8
	ethyl maltol	92.8	1.59	3.28		ethyl maltol	82.8	3.41	37.8
Ham sausage	vanillin	97.0	2.43	2.60	Jelly	vanillin	91.5	2.76	10.3
	ethyl vanillin	98.7	2.58	9.82		ethyl vanillin	100	3.21	6.25
	maltol	82.0	3.61	19.6		maltol	98.7	2.89	2.76
	ethyl maltol	75.8	3.13	27.5		ethyl maltol	90.6	3.45	2.37
Grain rice	vanillin	107.2	1.98	5.17	Steamed	vanillin	91.9	2.14	14.7
	ethyl vanillin	110.0	2.11	7.10	bread	ethyl vanillin	106	1.76	6.25
	maltol	91.9	2.01	15.9		maltol	116	1.65	9.30
	ethyl maltol	105.7	1.87	5.30		ethyl maltol	112	1.89	11.6

表 5 实际样品中 4 种化合物含量的分析结果

Table 5 Analytical results of the four compounds in practical samples

Sample	Vanillin/(mg/kg)	Ethyl vanillin/(mg/kg)	Maltol/(mg/kg)	Ethyl maltol/(mg/kg)
Melon seeds 1	0.92	–	0.88	0.14
Melon seeds 2	9.5	3.0	–	0.32
Ham sausage 1	–	–	0.21	0.12
Ham sausage 2	–	–	0.24	–
Milk 1	–	–	–	–
Milk 2	–	–	0.17	6.6
Milk powder 1	–	–	–	–
Milk powder 2	–	–	–	–
Milk drink	5.1	–	0.18	–
Carbonhydrate drink 1	–	–	–	–
Carbonhydrate drink 2	–	–	–	–
Carbonhydrate drink 3	0.32	–	–	–
Oatmeal	53	6.8	3.7	5.9
Corn steamed bread 1	–	0.10	–	0.59
Corn steamed bread 2	1.0	–	–	–
Layer cake	0.57	0.22	–	–
Steamed bread 1	–	–	–	–
Steamed bread 2	–	–	–	–
Biscuits	–	–	2.1	–
Bugles	0.14	–	–	0.16
Glutinous rice cake	–	–	1.6	0.13
Puff Pastry	23	6.4	2.6	2.4
Cookies	–	–	3.5	–
Erjiao dates	–	–	–	–
Plum pudding	–	–	–	–
Strawberry jam	0.16	–	–	–
Grain fragrant rice 1	0.082	–	–	–
Grain fragrant rice 2	0.12	–	–	–
Grain rice 1	0.17	–	–	–
Grain rice 2	0.098	–	–	–

–: less than LOQ.

3 结语

本文建立了超高效液相色谱-串联质谱法用于同时测定食品中香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚 4 种香精。此方法灵敏度高、选择性好、前处理方法简单,线性关系、回收率和重现性等方法学指标较好,特别是分析时间短,仅用时 10 min 即完成,为食品中香兰素、乙基香兰素、麦芽酚和乙基麦芽酚 4 种香精的快速检测提供了一种可靠的方法。

参考文献:

[1] Liu S T, Liu Y H, Ruan R S, et al. Science and Technology of Food Industry (刘士涛, 刘玉环, 阮榕生, 等. 食品工业科技), 2012(9): 426

[2] Chen J M. Food Research and Development (陈金明. 食品研究与开发), 2004, 25(1): 34

[3] Pan L. Journal of Hunan City University: Natural Science (潘磊. 湖南城市学院学报: 自然科学版), 2011, 20(2): 48

[4] Hironishi M, Kordek R, Yanagihara R, et al. Neurodegeneration, 1996, 5(4): 325

[5] Liang R F, Niu Q. Journal of Toxicology (梁瑞峰, 牛侨. 毒理学杂志), 2011, 25(6): 467

[6] Liang R F, Li W Q, Niu Q. Journal of Environment and Health (梁瑞峰, 李伟庆, 牛侨. 环境与健康杂志), 2011, 28(4): 302

[7] Zhang G W, Ni Y N. Journal of Analytical Science (张国文, 倪永年. 分析科学学报), 2005, 21(1): 20

[8] Ni Y N, Wang P P. Journal of Nanchang University: Natural Science (倪永年, 王苹苹. 南昌大学学报: 理科版), 2012, 36(1): 43

[9] Zhou J, Di J W, Wu Y, et al. Chinese Journal of Applied Chemistry (周君, 狄俊伟, 吴莹, 等. 应用化学), 2008, 25(1): 81

[10] Peng S H, Ma W H, Di J W. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory (彭少华, 马文华, 狄俊伟. 光谱实验室), 2005, 22(4): 680

[11] Wang H, Liu Y Q, Yang H M, et al. Food Science and

Technology (王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. 食品科技), 2006 (8): 235
[12] Jing L J, Han W, Yan G L. Food Science (景丽洁, 韩伟, 闫光烈. 食品科学), 2006, 27(4): 205
[13] Farthing D, Sica D, Abernathy C, et al. J Chromatogr B, 1999, 726: 303
[14] Waliszewski K N, Pardio V T, Ovando S L. Food Chem, 2006, 101: 1059
[15] Li H F, Yang H Y, Zhang Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (李海芳, 杨红云, 张英, 等. 色谱), 2014, 32 (4): 413
[16] Sanfeliu Alonso M C, Lahuerta Zamora L, Martinez Calatayud J. Anal Chim Acta, 2001, 438: 157
[17] de Jager L S, Perfetti G A, Diachenko G W. Food Chem, 2008, 107: 1701
[18] Li X Y, Wang H. Farm Machinery (李小运, 王浩. 农业机械), 2012(3): 126
[19] de Jager L S, Perfetti G A, Diachenko G W. J Chromatogr A, 2007, 1145: 83
[20] Ohashi M, Omae H, Hashida M. J Chromatogr A, 2007, 1138: 262
[21] Ren H B, Bie Z Y, Wei Y P, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (任呼博, 别振英, 蔚亦沛, 等. 分析试验室), 2014, 33(8): 950
[22] Ni Y N, Zhang G W, Serge K. Food Chem, 2005, 89(3): 465