

使用超高效液相色谱法 (UHPLC) 快速测定奶粉中香兰素、甲基香兰素、 乙基香兰素和香豆素的含量

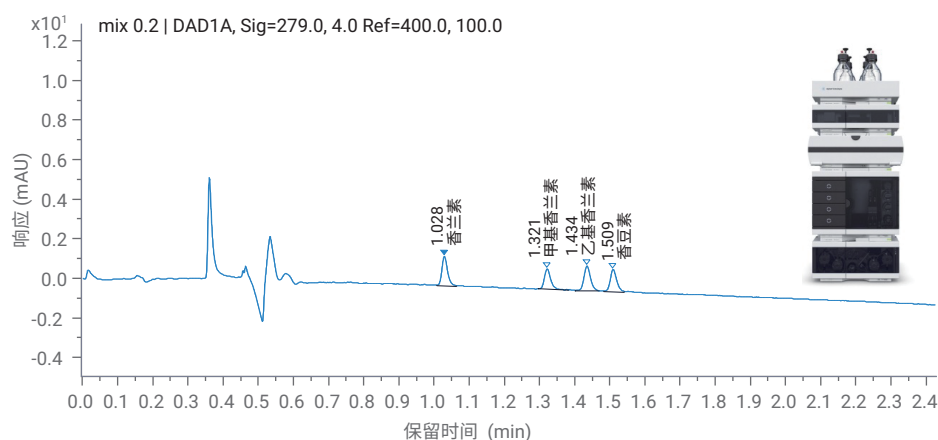
作者

沈梦洁, 殷承华, 鲁锐, 杨新磊
安捷伦科技(中国)有限公司

谢敏, 张志超
欧陆分析技术服务(苏州)有限公司

摘要

本应用简报介绍了一种利用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱 (UHPLC) 系统和 Poroshell 120 CS-C18 (4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$) 色谱柱对奶粉中的添加剂香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素进行定量的快速分析方法。该方法采用乙腈和 0.5% 甲酸水溶液作为流动相, 以梯度方法在 5 分钟内即可完成对香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的检测。与我国《食品安全国家标准 食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定》(GB 5009.284-2021) 中的第一法“液相色谱法”相比, 分析时间更短, 灵敏度更高, 且方法重现性好, 适用于快速检测奶粉中的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素四种添加剂。



香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素混标的色谱图

前言

香兰素和乙基香兰素具有浓烈的奶香味，是食品加工中经常使用的香味添加剂，广泛应用于食品和饮料中^[1]。食用香兰素类香精含量过多的食品可能导致不适，甚至损害身体健康^[2]。我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB2760-2014) 中严格规定了较大婴儿和幼儿配方食品中香兰素的使用限量，并明确指出 0-6 个月婴幼儿配方食品中不得添加^[3]。因此，必须对婴幼儿配方食品中的香兰素类添加剂进行准确检测和严格控制。现行《食品安全国家标准 食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定》(GB 5009.284-2021) 中规定的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素测定方法主要包括高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法和气相色谱-质谱法^[4]。质谱方法虽然灵敏度高，但对操作人员的专业知识有一定的要求，且仪器更昂贵。超高效液相色谱操作简便，结果可靠，是被大家广泛认可和使用的检测技术。本文采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱 (UHPLC) 系统和 Poroshell 120 CS-C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm) 色谱柱，建立了对奶粉中的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素进行快速分析的方法。该方法较国标中的高效液相方法分离度更高、分析速度更快、灵敏度更高。

实验部分

试剂和样品

香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准品（天津阿尔塔科技有限公司），纯度 > 99%；实际奶粉样品由客户提供；甲酸购自 DikmaPure 公司，甲醇和乙腈购自 Merck 公司，盐酸购自上海安谱，所有化学品和溶剂均为 HPLC 级；实验用水为 Milli-Q 纯水机系统（美国）制备的高纯水。

仪器和软件

采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱 (UHPLC) 系统，该系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵（部件号 G7120A）
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler 自动进样器（部件号 G7167B）
- Agilent 1290 Infinity II MCT 柱温箱（部件号 G7116B）
- Agilent 1290 Infinity II DAD 检测器（部件号 G7117B）

采用 Agilent OpenLab CDS 2.6 软件进行仪器控制和数据分析。

四种标准储备液及混合工作溶液的配制

标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准品各 10.0 mg，分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，混匀后备用。

混合工作溶液：分别吸取香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准储备液 (1000 mg/L) 各 100 μL，用甲醇-水 (v/v = 8:2) 定容至 1 mL，得到 100 mg/L 的混合标准溶液；再用甲醇-水 (v/v = 8:2) 稀释得到一系列混标溶液，浓度分别为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL，待测。

样品前处理

实际样品参考 GB 5009.284-2021 中 5.1.2.1 的步骤进行处理，样品前处理流程图如下：

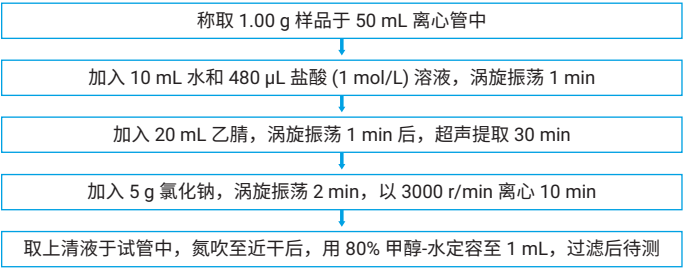


图 1. 样品前处理流程图

色谱条件

色谱柱：	Agilent Poroshell 120 CS-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm（部件号 695975-942）	
柱温：	30 °C	
进样量：	5 μL	
流速：	2 mL/min	
DAD 检测器：	检测波长 279 nm，参比波长 400 nm	
流动相 A：	0.5% 甲酸水溶液	
流动相 B：	乙腈	
梯度洗脱程序：	时间 (min)	B (%)
	0	25
	2	45
	2.5	90
	3.5	90
	3.6	25
	5	25

结果与讨论

色谱柱的选择

GB 5009.284-2021 第一法中采用 250 mm × 4.6 mm, 5 μm 的 C18 色谱柱。为提高分析效率并缩短分析时间, 本文采用粒径更小的 2.7 μm Poroshell 120 系列色谱柱, 并比较了采用不同填料的 Poroshell 120 EC-C18、SB-C18、PFP、Bonus RP、HPH-C18 及 CS-C18 等色谱柱对香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的分离能力。结果发现, 通过优化流动相中有机溶剂的种类和梯度比例, 四种物质在 Poroshell 120 CS-C18 色谱柱上获得了较好的保留和出色的分离效果, 最小分离度可达 2.0 以上, 优于国标方法中甲基香兰素和乙基香兰素的分离效果 (见图 2)。此外, 本文选用比 GB 5009.284-2021 第一法长度更短、柱效更高的 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱, 可以在 5 分钟内完成分析, 与国标方法 (需要 14 分钟) 相比, 分析速度更快、效率更高。

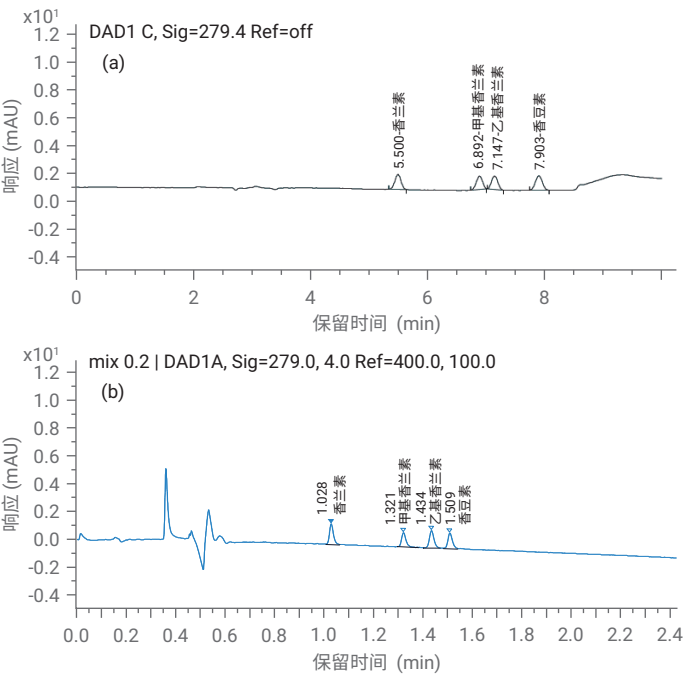


图 2. (a) GB 5009.284-2021 第一法所得到的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准溶液 (0.2 mg/L, 进样量 10 μL) 的液相色谱图; (b) 采用本方法所得到的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准溶液 (0.2 mg/L, 进样量 5 μL) 的液相色谱图

保留时间和峰面积的精密度

使用 0.2 mg/L 的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素混标溶液重复进样 5 次, 得到的平均保留时间和峰面积的 RSD 值如表 1 所示。从表中可以看出, 保留时间和峰面积的 RSD 分别小于 0.05% 和 2.0%, 表明该方法具有较好的重现性和精密度。

表 1. 保留时间和峰面积的精密度 (n = 5)

	香兰素		甲基香兰素		乙基香兰素		香豆素	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	1.028	1.690	1.319	1.306	1.432	1.603	1.507	1.419
2	1.027	1.637	1.319	1.281	1.432	1.589	1.506	1.399
3	1.028	1.650	1.320	1.324	1.432	1.627	1.507	1.436
4	1.028	1.632	1.320	1.299	1.433	1.614	1.508	1.459
5	1.028	1.672	1.320	1.277	1.433	1.590	1.507	1.393
平均值	1.028	1.655	1.320	1.293	1.432	1.601	1.507	1.424
RSD (%)	0.037	1.469	0.046	1.469	0.036	1.025	0.043	1.899

标准曲线

分别使用香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的浓度为横坐标, 对应的峰面积为纵坐标, 绘制浓度范围为 0.1 μg/mL – 100 μg/mL 的标准曲线, 并进行线性回归分析。结果表明, 这四种分析物在该浓度范围内呈较好的线性关系, 线性方程及相关系数 (R²) 见表 2。

表 2. 线性方程及相关系数

化合物	线性方程	相关系数 (R ²)
香兰素	y = 8.4605 x – 0.1387	1.00000
甲基香兰素	y = 6.5892 x – 0.1330	1.00000
乙基香兰素	y = 8.3061 x – 0.2133	1.00000
香豆素	y = 7.6041 x – 0.3573	1.00000

检测限和定量限

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低浓度定义为 LOD, 将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。浓度为 0.01 μg/mL 香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素混标溶液中各色谱峰的 S/N > 3, 浓度为 0.05 μg/mL 的混标溶液中各色谱峰的信噪比均高于 S/N > 10 的要求, 如图 3 所示。香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别达到 0.01 μg/mL 和 0.05 μg/mL, 根据实际样品前处理过程, 可分别换算为 0.01 mg/kg 和 0.05 mg/kg, 明显优于 GB 5009.284-2021 中液相色谱法的检测限 (0.07 mg/kg) 和定量限 (0.2 mg/kg)。

结论

本研究采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱系统和 Poroshell 120 CS-C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 开发出一种能够快速分析奶粉中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的含量的方法。通过对比不同填料的 Poroshell 120 系列色谱柱, 发现 Poroshell 120 CS-C18 对香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的分离效果最好, 且最小分离度大于2。浓度范围为 0.1–100 μg/mL 的标准曲线表现出优异的线性 ($R^2 > 0.9999$), 且方法重复性好, 保留时间和峰面积的 RSD 分别小于 0.05% 和 2.0%。使用该方法四种目标化合物的 LOD 和 LOQ 分别为 0.01 mg/kg 和 0.05 mg/kg, 优于国标 GB 5009.284-2021 中液相色谱方法的检测限和定量限。本方法 5 分钟内即可完成四个化合物的分析, 较国标方法 (14 分钟) 更快、更高效。

参考文献

1. 陈静, 段国霞, 刘丽君, 李翠枝, 吕志勇, 武伦玮, 刘春霞, 岳虹. 高效液相色谱法快速测定乳与乳制品中 4 种香兰素类化合物. 乳业科学与技术, 2020, 43(1): 19-24
2. 黄键, 张文国, 郭桂萍, 倪鹏, 施锦辉, 王金娟. 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. 理化检验-化学分册, 2017, 53(11): 1318-1321
3. GB2760-2016 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
4. GB 5009.284-2021 食品安全国家标准 食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定

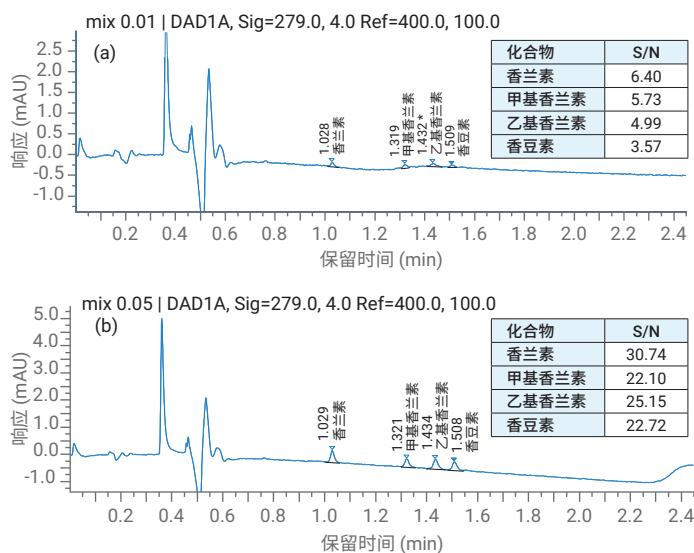


图 3. (a) 香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素浓度分别为 0.01 μg/mL (进样量 5 μL) 的混标溶液的色谱图; (b) 香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素浓度分别为 0.05 μg/mL (进样量 5 μL) 的混标溶液的色谱图

实际样品分析

采用本文所述的方法对实际奶粉样品进行分析, 两次独立测定的结果如图 4 和表 3 所示。结果满足绝对差值小于平均值 15% 的要求, 表明该方法稳定、可靠。

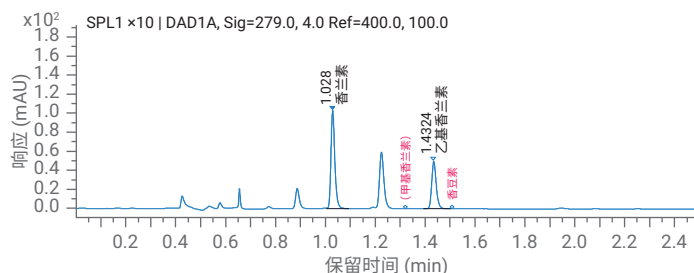


图 4. 实际奶粉样品的色谱图

表 3. 实际奶粉样品平行分析结果

化合物	第一次结果 (μg/mL)	第二次结果 (μg/mL)
香兰素	118.86	132.07
甲基香兰素	未检出	未检出
乙基香兰素	72.56	76.01
香豆素	未检出	未检出

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

DE.87397172

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022

2022 年 8 月 15 日，中国出版

5994-5190ZHCN