

# 高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中的香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素

LC-379

**摘要：**本文建立了一种岛津液相色谱仪测定食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的方法。参照《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》，对样本进行前处理并上机测定。结果表明：香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素在 0.2~100 mg/L 浓度范围内线性关系良好，相关系数在 0.999 以上；0.2 mg/L 的标准溶液连续 6 针进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.015~0.024 % 和 0.18~0.54 % 之间；不同加标浓度下，婴幼儿配方奶粉中四种化合物的加标回收率结果在 73.7~106.4 % 之间。

**关键词：**高效液相色谱仪 香兰素 甲基香兰素 乙基香兰素 香豆素

## 技术特点：

- ❖ 仪器灵敏度高，香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素在 LC-16 上仪器定量限可低至 0.03 mg/L。
- ❖ 使用岛津 Shim-pack GIST C18-AQ 色谱柱，甲基香兰素和乙基香兰素可以获得良好的分离度。

香兰素，又名香草醛，为一种可食用香料，包含香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素，可在香荚兰的种子中找到，也可以合成，具有香荚兰豆香气及浓郁奶香，广泛运用在各种需要添加奶香气息的调香食品中，如蛋糕、冷饮、巧克力、糖果、饼干、方便面、面包等。

如今，香兰素是全球使用最广的食用香料之一，其安全性备受关注。根据毒理学实验积累的大量数据、相关研究结果及暴露量评估，按照标准要求使用香兰素不会对人体造成健康危害，但大量摄入香兰素会导致头晕、恶心等症状，严重时会造成肝、肾损伤。《GB

2760-2014 食品添加剂使用标准》中关于添加量的规定：较大婴儿和幼儿配方食品中可以使用香兰素、乙基香兰素和香荚兰豆浸膏（提取物），最大使用量分别为 5 mg/100 mL 和 5 mg/100 mL，其中 100 mL 以即食食品计，生产企业应按照冲调比例折算成配方食品中的使用量。

本文参照《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》，以婴幼儿配方奶粉为基质，对香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素进行测定。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

LC-16 分析系统，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20Alite	脱气机：	DGU-20A5R
输液泵：	LC-16 x 2	柱温箱：	CTO-16
自动进样器：	SIL-16	检测器：	SPD-16
色谱工作站：	Labsolutions Essentia Ver. 5.98		

### 1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30737-01)

流动相：A 相 -0.5% 甲酸溶液，B 相 - 乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始比例为 45%，，梯度洗脱程序见表 1

柱温：30°C

流速：1.0 mL/min

进样量：10 μL

波长：279 nm

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
5.0	泵	B.Conc	60
5.1	泵	B.Conc	90
8.0	泵	B.Conc	90
9.1	泵	B.Conc	45
14.0	控制器	Stop	

### 1.3 混合标准溶液的制备

#### 试药与试剂

香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素、香豆素混标 (1000 mg/L, 纯度 ≥ 98%) ; 甲酸 (HPLC 级) ; 乙腈 (HPLC 级) ; 甲醇 (HPLC 级) ; 氯化钠 (优级纯) ; 浓盐酸 (12 mol/L) ; Milli-Q 纯水。

#### 试剂配制

0.1% 甲酸 - 甲醇溶液: 吸取 1 mL 甲酸溶于甲醇, 定容至 1000 mL, 临用现配。

1 mol/L 盐酸溶液: 吸取 8.33 mL 浓盐酸溶于水, 定容至 100 mL, 临用现配。

80% 甲醇 - 水溶液: 将甲醇和水按 4:1 (体积比) 混合均匀。

0.5% 甲酸溶液: 吸取 5 mL 甲酸溶于水, 定容至 1000 mL, 临用现配。

#### 混合标准溶液的配制

混合标准中间溶液 (10 mg/L) : 准确吸取香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素、香豆素混合标准储备液 (1000 mg/L) 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加 0.1% 甲酸 - 甲醇定容至刻度, 混匀。将溶液转移至棕色玻璃容器中, -18°C 下避光保存, 可保存 3 个月。

混合标准系列工作溶液: 分别吸取混合标准中间溶液 (10 mg/L) 0.2 mL、1.0 mL、5.0 mL, 混合标准储备液 (1000 mg/L) 0.2 mL、0.5 mL 和 1.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加 80% 甲醇 - 水溶液定容至刻度, 混匀。混合标准系列工作溶液的浓度分别为 0.2 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L、100.0 mg/L, 临用现配。

## ■ 样品前处理

称取 1.00 g 试样, 加入 10 mL 水和 480 μL 的 1 mol/L 盐酸溶液, 涡旋振荡 1 min, 加入 20 mL 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 超声提取 30 min 后, 加入 5 g 氯化钠, 涡旋振荡 2 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液至玻璃试管, 40°C 氮吹至近干, 准确加入 1.0 mL 的 80% 甲醇 - 水溶液溶解残渣, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 待测。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 色谱图

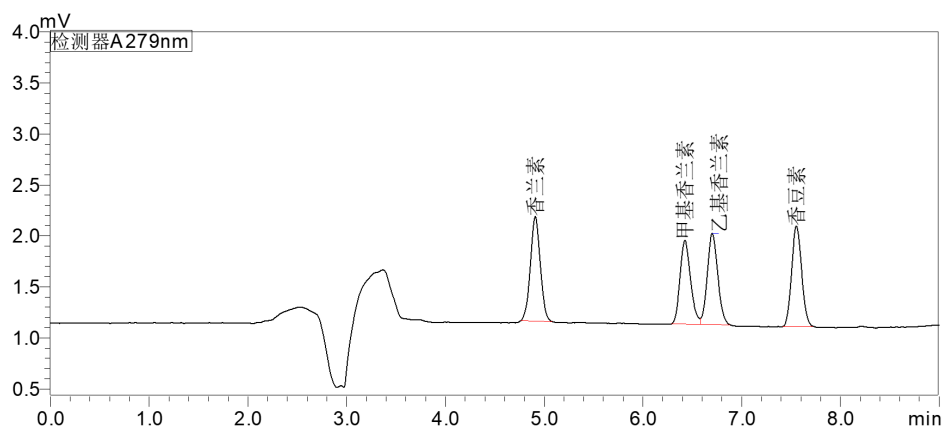


图 1 0.2 mg/L 香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素标准溶液色谱图

表 2 化合物保留时间、峰面积及分离度结果

	香兰素	甲基香兰素	乙基香兰素	香豆素
保留时间	4.918	6.437	6.713	7.567
峰面积	7163	6180	6649	6989
分离度	-	7.554	1.340	4.235

### 3.2 校准曲线、检出限和定量限

将混合标准系列工作溶液，按“1.2 分析条件”进行测定，使用外标法定量。以峰面积为纵坐标，对应的混合标准工作溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线，如图 2 所示。校准曲线线性关系良好，相关系数均大于 0.999，准确度在 94.7%~109.4% 之间。LabSolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。相关系数、检出限及定量限结果见表 3。

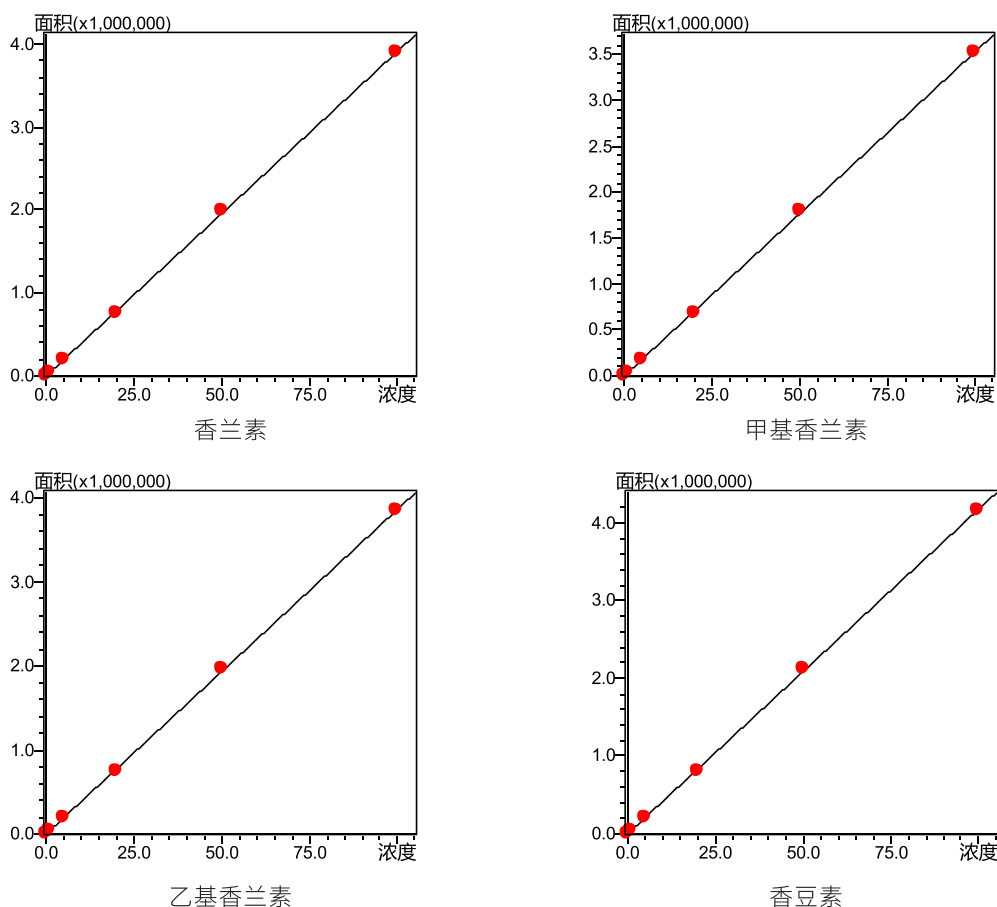


图 2 校准曲线

表 3 校准曲线、检出限和定量限结果

No.	化合物	校准曲线	相关系数 r	线性范围 (mg/L)	准确度 %	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	香兰素	$Y = 39065.0X - 1354.65$	0.9998	0.2-100	94.7-109.0	0.01	0.02
2	甲基香兰素	$Y = 35316.2X - 1520.75$	0.9998	0.2-100	94.7-109.0	0.01	0.03
3	乙基香兰素	$Y = 38664.5X - 1749.35$	0.9998	0.2-100	95.0-108.6	0.01	0.03
4	香豆素	$Y = 41811.3X - 2098.93$	0.9998	0.2-100	95.2-108.7	0.01	0.03

### 3.3 重复性试验

取浓度为 0.2 mg/L 的混合标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.015~0.024 % 和 0.20~0.41 % 之间，表明仪器精密度良好。

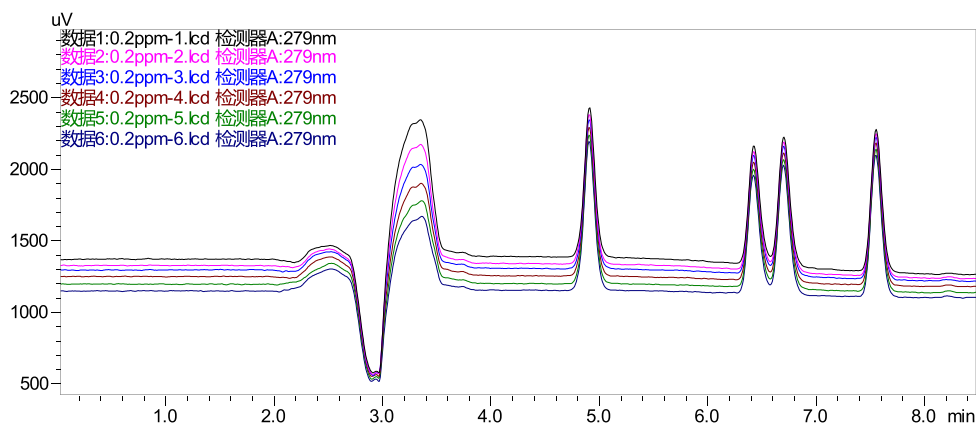


图 3 0.2 mg/L 香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素重复性色谱图

表 4 峰面积和保留时间重复性结果 (n=6)

#	香兰素		甲基香兰素		乙基香兰素		香豆素	
	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
1	7158	4.914	6101	6.429	6607	6.706	6916	7.558
2	7122	4.911	6107	6.428	6628	6.705	6944	7.558
3	7117	4.912	6120	6.428	6570	6.705	6973	7.557
4	7134	4.911	6101	6.428	6597	6.704	6955	7.556
5	7137	4.911	6068	6.426	6552	6.703	6945	7.556
6	7132	4.910	6125	6.426	6581	6.702	6931	7.555
RSD (%)	0.20	0.024	0.33	0.021	0.41	0.020	0.28	0.015

### 3.4 加标回收率

在空白婴幼儿配方奶粉样品中添加 3 个不同浓度混合标准溶液，加标浓度分别为 0.2 mg/kg, 5 mg/kg, 50 mg/kg, 每个浓度平行三份，按照“2. 样品前处理”方法处理后，上机分析，考察加标回收率。香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素、香豆素在婴幼儿配方奶粉中的加标回收率结果在 73.7~106.4 % 之间，结果见表 5。

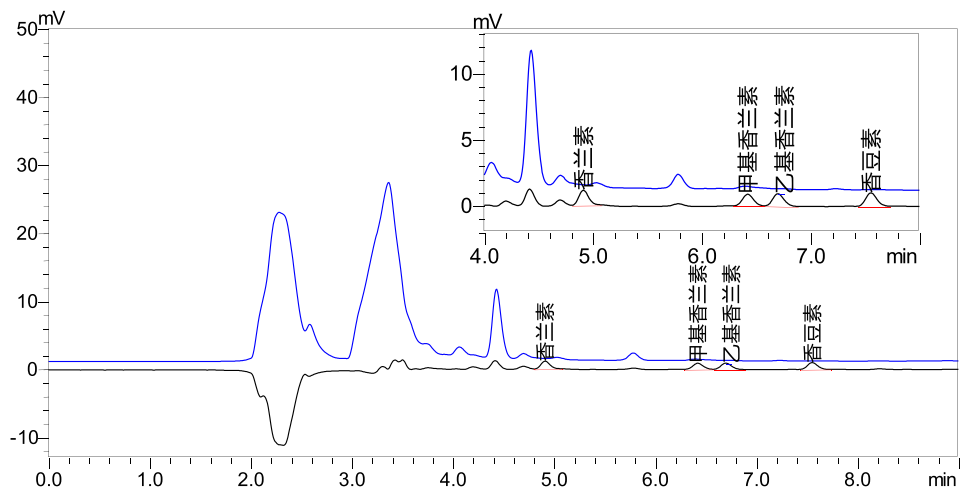


图 4 婴幼儿配方奶粉空白样品（蓝色曲线）及加标 0.2 mg/kg 样品（黑色曲线）色谱图

表 5 婴幼儿配方奶粉样品加标回收率结果 (n=3)

加标量 (mg/kg)	香兰素		甲基香兰素		乙基香兰素		香豆素	
	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
0.2	106.4	2.07	105.2	4.09	100.4	7.87	106.4	2.07
5	80.2	5.18	81.5	5.57	80.6	5.43	79.1	4.57
50	74.2	1.11	74.8	1.15	74.6	1.17	73.7	0.81

## ■ 结论

本文采用岛津 LC-16 高效液相色谱仪，参考《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》，对婴幼儿配方奶粉中 4 种香兰素进行测定。本方法检测灵敏度高、重复性好，系统精密度良好，可为食品安全检测行业检测工作提供参考。

岛津应用云

