

# 超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱联用技术检测婴幼儿奶粉中的香兰素

LCMSMS-057

**摘要：**本文建立了使用液相色谱仪 – 三重四极杆质谱仪测定婴幼儿配方奶粉中甲基香兰素和乙基香兰素的方法。通过高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定量分析两种香兰素，甲基香兰素和乙基香兰素在 1~500  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性良好，标准曲线相关系数均在 0.999 以上；重复性实验表明 2.5  $\mu\text{g/L}$ 、25  $\mu\text{g/L}$  和 250  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.5% 和 2% 以下；甲基香兰素和乙基香兰素的最低定量限分别为 1.00  $\mu\text{g/L}$  和 0.80  $\mu\text{g/L}$ ；空白样品中加入 50  $\mu\text{g/kg}$  甲基香兰素和乙基香兰素，回收率分别为 87.2% 和 79.8%。

**关键词：**香兰素 婴幼儿奶粉 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

香兰素是重要的食品添加剂，其被广泛用作糖果、饼干、糕点、饮料等食品的增香剂。我国《食品添加剂使用标准 GB 2760-2011》明确规定 0 到 6 个月婴幼儿配方食品中不得添加任何食用香料，引发业内广泛关注。目前，国内外测定香兰素的方法主要有光度法、高效液相色谱法、电化学法等，尚无国标方法。但是这些方法都无法高灵敏度、高选择性地检测婴幼儿奶粉中添加的香兰素。本方法采用高效液相色谱 – 三重四极杆质谱联用技术测定婴幼儿奶粉中的甲基香兰素和乙基香兰素，具有灵敏度高、选择性等优点。

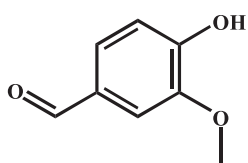


图 1 甲基香兰素结构式

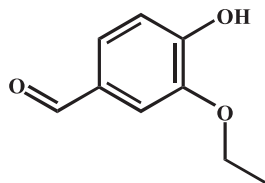


图 2 乙基香兰素结构式

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统，包括 LC-30AD $\times$ 2(输液泵)，SIL-30AC(自动进样器)，CTO-30AC(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，DGU-20A<sub>5</sub>(在线脱气机)，LCMS-8040(三重四极杆液质)和 LabSolutions Ver 5.50(工作站)。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

流动相：A 相：水；B 相：乙腈

流速：0.4 mL/min

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmID  $\times$  50 mm, 1.6  $\mu\text{m}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	有机相浓度(%)
0.0-2.0	10-90
2.0-2.5	90
2.5-3.5	10

进样量：5  $\mu\text{L}$

#### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI(-)

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气及干燥气：氮气 3.0 L/min、20 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压：1.96 kV

扫描模式：多反应监测(MRM)

驻留时间及延迟时间：25 ms、3 ms

表 2 2 种化合物的 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
			Bias (V)	(V)	Bias (V)
甲基香兰素	151.00	136.00*	10	18	25
		92.10	10	20	17
乙基香兰素	165.05	136.00*	20	11	24
		92.10	20	22	14

\*表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：称取 10 mg 的甲基香兰素、乙基香兰素标准品，用乙腈溶于 10 mL 的容量瓶中，配成 1 mg/mL 的母液，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

前处理步骤：准确称取奶粉试样 1 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中，加入 pH=4.5 的水溶液 5 mL，混匀超声提取 5 分钟，加 2% 乙酸铅溶液 2 mL，混匀后静置 2 min，8000 rpm/min 离心 10 分钟；取上清液用 5% 氨水溶液调节 pH 至中性；将上清液全部加样至活化好的 InertSep MA-1( GL Sciences )小柱，然后分别用 3 mL 5% 氨水溶液和 3 mL 甲醇淋洗小柱，弃去淋洗液；用 3 mL 5% 酸化甲醇洗脱，收集洗脱液氮气吹干，用 1 mL 流动相重新溶解，过滤，待测。

## 结果与讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

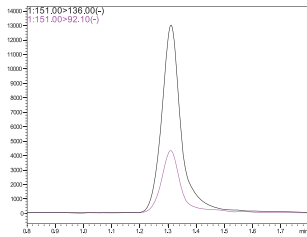


图3 50 µg/L 甲基香兰素标准品色谱图

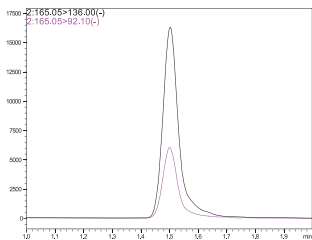


图4 50 µg/L 乙基香兰素标准品色谱图

### 2.2 线性关系

将浓度为 1, 2.5, 10, 25, 250, 500 µg/L 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如下图所示，线性方程及相关系数见表 3。

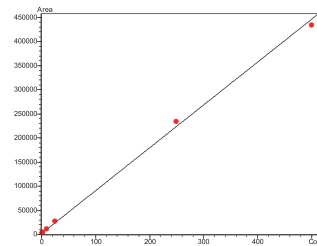


图5 甲基香兰素标准曲线

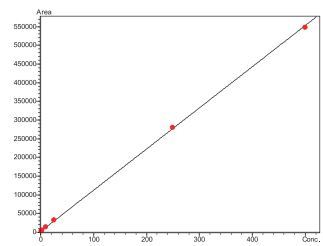


图6 乙基香兰素标准曲线

表3 2 种化合物的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 r
1	甲基香兰素	$Y = (890.177)X + (1638.61)$	0.9991
2	乙基香兰素	$Y = (1101.87)X + (2111.54)$	0.9997

### 2.3 重复性实验

对 2.5 µg/L, 25 µg/L 和 250 µg/L 混合标准工作液连续测定 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。保留时间 RSD% < 0.5%，峰面积 RSD% < 2%。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	名称	2.5 µg/L		25 µg/L		250 µg/L	
		RSD% R.T	RSD% Area	RSD% R.T	RSD% Area	RSD% R.T	RSD% Area
1	甲基香兰素	0.43	1.67	0.14	1.75	0.11	1.06
2	乙基香兰素	0.37	1.69	0.21	1.43	0.08	1.50

## 2.4 灵敏度

重复分析 2.5 µg/L (n=7) 标准溶液, 计算 7 次平行测定的标准偏差, 置信度为 99% 时的 t 值取 3.143, 按照  $LOD=t \times SD$  计算仪器检出限, 4 倍检出限为定量限。仪器检出限和定量限的计算结果见表 5。

表 5 仪器定量限和检出限

编号	名称	RSD%	LOQ	LOD
		Area	(µg/L)	(µg/L)
1	甲基香兰素	3.20	1.00	0.25
2	乙基香兰素	2.58	0.80	0.20

## 2.5 回收率实验

按照 1.3 所述方法处理 1 段 (0-6 个月) 婴幼儿奶粉, 未检出甲基香兰素及乙基香兰素, 样品色谱图见图 7。1 g 样品中加入 0.05 µg 标准品, 加标色谱图见图 8。甲基香兰素的回收率为 87.2%, 乙基香兰素的回收率为 79.8%。

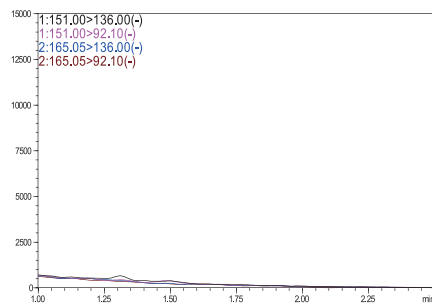


图7 1段 (0-6 个月) 婴幼儿奶粉色谱图

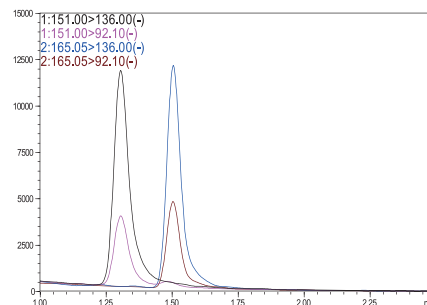


图8 50 µg/kg 加标样品色谱图

## 结论

本文建立了超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术同时测定婴幼儿奶粉中甲基香兰素和乙基香兰素的方法。仪器的重复性良好, 不同浓度混合标准溶液连续进样 6 次, 保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.5% 和 2% 以下, 两种化合物的线性范围 1~500 µg/L, 定量限分别为 1.00 µg/L 和 0.80 µg/L, 空白样品中加入 50 µg/kg 甲基香兰素和乙基香兰素, 回收率分别为 87.2% 和 79.8%。本方法适合婴幼儿奶粉中香兰素测定。