

LC-MS/MS 法测定饮料中香豆素类化合物

LCMSMS-768

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了饮料中 8 种香豆素类化合物的分析方法。使用外标法定量，在各自校准曲线浓度范围内，各组分线性相关系数大于 0.9983，检出限在 0.001 ng/mL-0.243 ng/mL 之间。使用低、中、高浓度标准品溶液分别连续进样 6 针，保留时间的 RSD 在 0.01%-0.12% 之间，峰面积的 RSD 在 0.66%-2.93% 之间。前处理简单，加标回收率良好。该方法满足食品补充检验方法要求，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 香豆素 饮料

技术特点：

- ❖ 使用同时注入 (Co-injection) 功能，有效地改善了溶剂效应。
- ❖ 样品前处理操作简单，耗时短，易上手。

香豆素类化合物是一类重要的杂环化合物，母环结构为苯并吡喃酮，广泛存在于自然界的植物中，如芸香科、伞形科、菊科、豆科等。作为一类重要的天然香料，常用作定香剂、脱臭剂，配制香水和香料，也用作饮料、食品、香烟、塑料制品、橡胶制品等的增香剂。

由毒理实验发现，香豆素对小鼠胚胎有毒性，能引起痛觉消失，使中性胆碱酯酶发生变化，对大鼠为可疑致肿瘤物，由致癌性判定，动物为阳性反应。香豆素对人类的肝脏也有危害，2017 年世界卫生组织国际癌症研

究机构公布的致癌物清单中，香豆素为 3 类致癌物，因此，香豆素不允许作为添加剂直接使用，但其衍生物 6-甲基香豆素、八氢香豆素和二氢香豆素允许作为食品用合成香料使用（见 GB 2760-2014 表 B.3）。

2022 年 2 月 7 日，国家市场监督管理总局发布并实施 BJS 202203《饮料中香豆素类化合物的检测》。本实验参考该标准，使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了饮料中香豆素类化合物的检测方法，可为相关从业人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40A	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XR×2	柱温箱：	CTO-40C
自动进样器：	SIL-40C XR	质谱仪：	LCMS-8045
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.99		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： Shim-pack GIST C18-AQ (150 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30807-03)

流动相： A-0.1% 甲酸水溶液； B- 乙腈

进样体积： 10 μL

同时注入： 40 μL 水

流速： 0.3 mL/min

柱温： 40°C

洗脱方式： 梯度洗脱，B 相起始浓度为 30%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.00	泵	B Conc	30
13.00	泵	B Conc	90
14.00	泵	B Conc	90
14.01	泵	B Conc	30
17.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式：	ESI+	雾化气流速：	3.0 L/min
接口温度：	400°C	干燥气流速：	5.0 L/min
D L 温度：	300°C	加热气流速：	15.0 L/min
加热模块温度：	500°C	碰撞气：	氦气
扫描模式：	多反应监测 (MRM)	喷针位置：	+3.5 mm
MRM 参数：	见表 2		

表 2 MRM 参数

序号	化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	香豆素	91-64-5	147.00	103.05*	-10	-17	-17
				91.10	-16	-23	-17
2	7-甲氧基香豆素	531-59-9	177.05	121.05*	-12	-23	-12
				134.10	-19	-25	-26
3	二氢香豆素	119-84-6	149.00	107.05*	-16	-19	-11
				121.10	-16	-16	-12
4	7-甲基香豆素	2445-83-2	161.00	105.10*	-11	-22	-10
				115.10	-29	-21	-25
5	7-乙氧基-4-甲基香豆素	87-05-8	205.05	177.10*	-10	-19	-18
				105.10	-22	-24	-19
6	醋硝香豆素	152-72-7	354.05	249.05*	-10	-39	-12
				163.05	-18	-15	-29
7	环香豆素	518-20-7	323.05	251.05*	-23	-17	-28
				173.05	-16	-31	-30
8	3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)	63226-13-1	461.15	244.05*	-13	-19	-11
				160.15	-17	-54	-16

* 代表定量离子对。

1.3 标准品溶液的配制

取标准品各适量，精密称定，用乙腈溶解分别制成 100 mg/L 的标准储备液。取储备液各适量，使用乙腈稀释制成 1 mg/L 的混合标准中间液。吸取混合标准中间液适量，用乙腈配制成 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的混合标准系列工作液。

1.4 样品前处理

参照 BJS 202203 《饮料中香豆素类化合物的检测》，液体试样前处理流程见图 1。

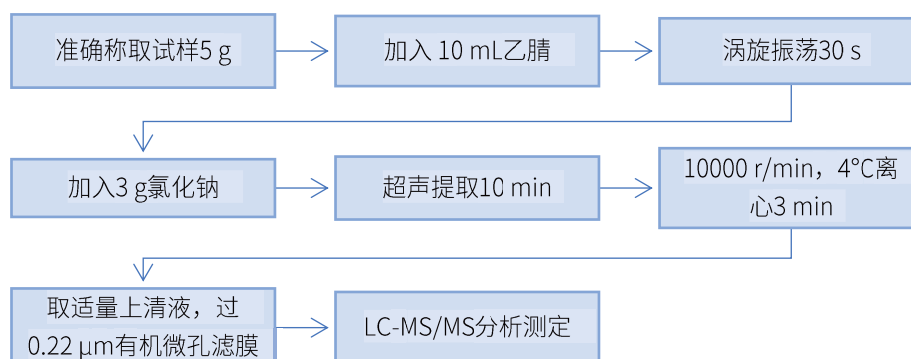


图1 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 标准品溶液的 MRM 色谱图

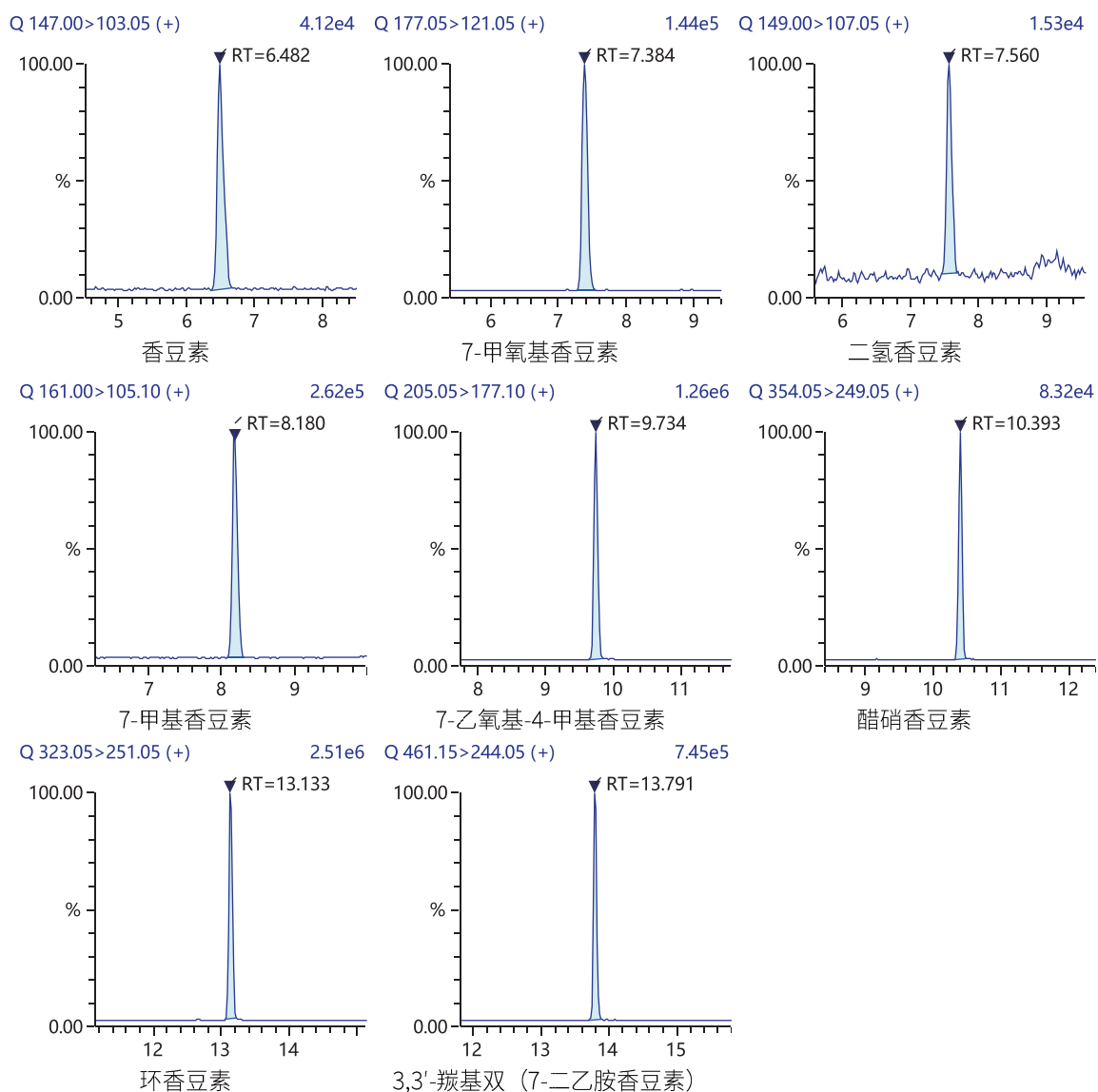


图2 标准品溶液 MRM 色谱图 (5 ng/mL)

2.2 校准曲线和检出限

按照 1.2 项下分析条件，标准系列溶液按照浓度从低到高的顺序依次上机测定，以待测物的质量浓度为横坐标，其对应的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 3 所示。8 种香豆素类化合物在校准曲线浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 大于 0.9983，各校准点准确度在 86.7%-107.7% 之间。根据各化合物最低浓度点标样数据，以 3 倍信噪比计算检出限，各化合物检出限及线性相关系数如表 3 所示。

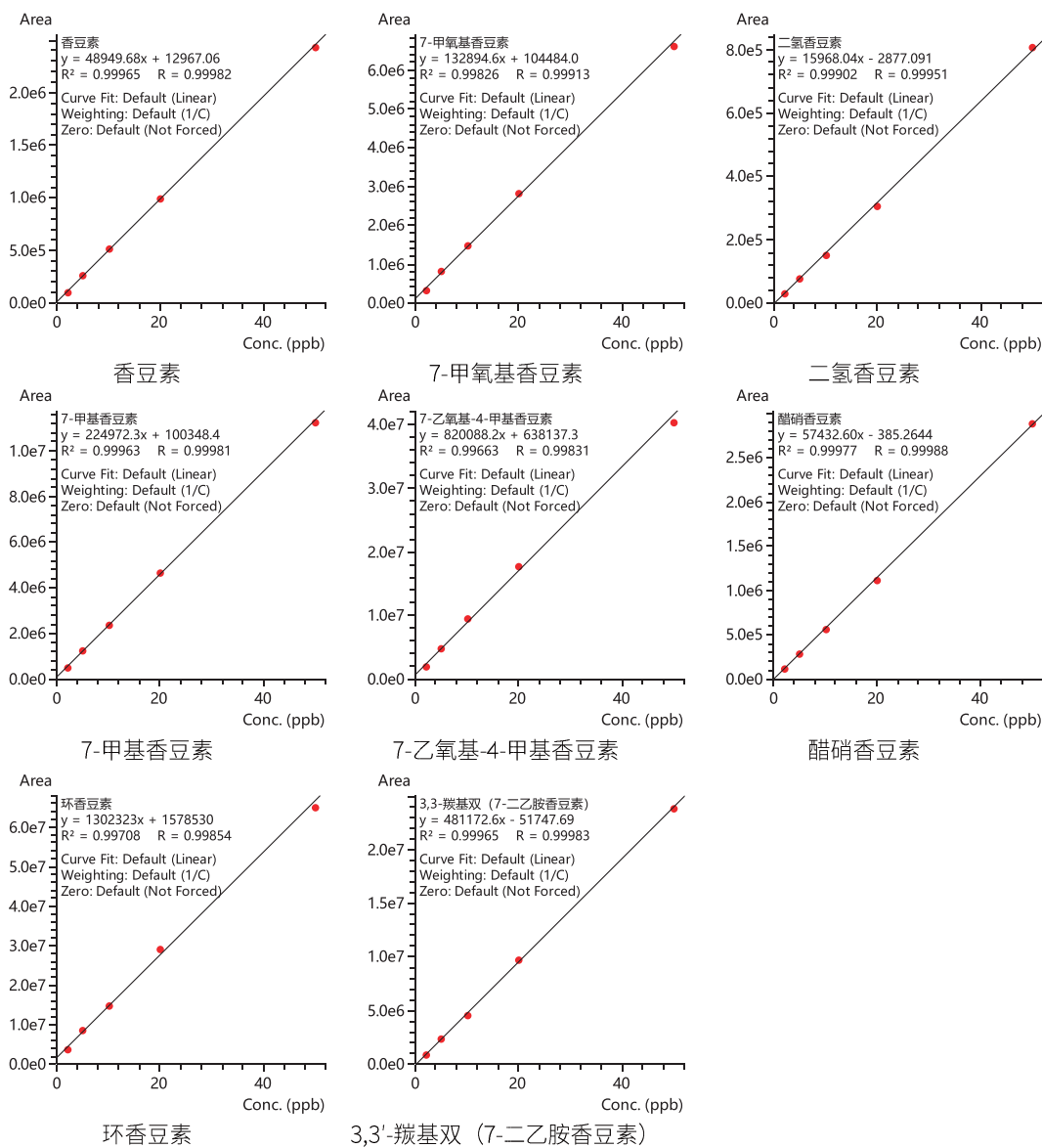


图 3 校准曲线

表 3 各组分相关系数及检出限

序号	化合物名称	相关系数 (r)	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
1	香豆素	0.9998	95.3-103.3	0.041
2	7- 甲氧基香豆素	0.9991	88.7-107.0	0.012
3	二氢香豆素	0.9995	95.9-105.2	0.243
4	7- 甲基香豆素	0.9998	95.2-102.3	0.015
5	7- 乙氧基 -4- 甲基香豆素	0.9983	86.7-107.7	0.001
6	醋硝香豆素	0.9999	97.9-101.7	0.002
7	环香豆素	0.9985	87.1-105.3	0.001
8	3,3' - 羰基双 (7- 二乙胺香豆素)	0.9998	96.9-102.2	0.001

2.3 重复性实验

取标准品溶液低 (4 ng/mL)、中 (25 ng/mL)、高 (40 ng/mL) 3 个浓度水平, 每个浓度水平连续进样 6 次, 考察仪器的重复性。结果如表 4 所示, 8 种香豆素类化合物保留时间的 RSD 在 0.01%-0.12% 之间, 峰面积的 RSD 在 0.66%-2.93% 之间, 仪器精密度良好。

表 4 重复性结果

序号	化合物名称	4 ng/mL		25 ng/mL		40 ng/mL	
		保留时间 SD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	香豆素	0.04	2.42	0.10	1.29	0.10	1.13
2	7- 甲氧基香豆素	0.02	2.23	0.11	2.82	0.12	2.93
3	二氢香豆素	0.08	2.84	0.10	2.02	0.08	1.43
4	7- 甲基香豆素	0.02	1.58	0.06	0.76	0.07	1.24
5	7- 乙氧基 -4- 甲基香豆素	0.02	2.46	0.04	1.94	0.05	0.66
6	醋硝香豆素	0.02	2.52	0.03	2.06	0.04	1.29
7	环香豆素	0.01	1.02	0.03	1.33	0.02	2.33
8	3,3' - 羰基双 (7- 二乙胺香豆素)	0.01	2.01	0.03	2.51	0.02	2.46

2.4 加标回收率

取空白饮料样品进行加标回收测定, 分别添加标准品溶液低 (4 ng/mL)、中 (25 ng/mL)、高 (40 ng/mL) 3 个浓度水平, 按照上述所建立的方法进行样品处理及测定。每个浓度水平重复 3 份平行样品, 计算加标回收率和相对标准偏差 (RSD)。结果如表 5 所示, 8 种香豆素类化合物的加标回收率在 88.6%-111.1% 之间, RSD 在 0.12%-3.96% 之间。

表 5 各组分添加回收率结果

序号	化合物名称	4 ng/mL		25 ng/mL		40 ng/mL	
		回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
1	香豆素	88.6	1.32	94.4	1.97	92.0	0.16
2	7- 甲氧基香豆素	89.3	3.96	96.8	2.45	92.5	3.71
3	二氢香豆素	106.2	0.69	97.4	1.32	94.3	1.95
4	7- 甲基香豆素	88.7	2.64	94.9	1.49	92.5	2.28
5	7- 乙氧基 -4- 甲基香豆素	94.9	0.12	98.8	0.28	91.1	0.73
6	醋硝香豆素	95.6	0.56	95.4	1.12	92.1	1.59
7	环香豆素	107.6	3.02	111.1	1.30	103.4	0.61
8	3,3' - 羰基双 (7- 二乙胺香豆素)	107.6	2.46	109.0	3.14	102.4	0.85

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用, 参考 BJS 202203《饮料中香豆素类化合物的检测》, 建立了饮料中 8 种香豆素类化合物的分析方法, 并进行了详尽的方法学考察。实验结果表明, 该方法前处理简单, 灵敏度高, 专属性强, 满足标准要求, 可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

