

超高效液相色谱检测婴幼儿奶粉中的香兰素

LC-083

摘要：本文建立了婴幼儿配方奶粉中甲基香兰素和乙基香兰素的超高效液相色谱测定法。通过超高效液相色谱快速分离，二极管阵列检测器进行定量分析。方法的线性范围为 0.1~100 mg/L；对于甲基香兰素和乙基香兰素，仪器的定量限和检出限分别为 0.03 mg/L 和 0.01 mg/L；仪器的重复性较好，0.2 mg/L，5 mg/L 和 50 mg/L 的混合标准溶液连续进样 6 次，保留时间 RSD% \leq 0.1%，峰面积 RSD% < 0.5%；空白样品中加入 4 mg/kg 甲基香兰素和乙基香兰素，回收率分别为 84.3% 和 80.8%。

关键词：香兰素 婴幼儿奶粉 超高效液相色谱

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 GB2760-2011》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。本方法采用超高效液相色谱-二极管阵列检测器测定婴幼儿奶粉中的甲基香兰素和乙基香兰素，能够实现婴幼儿奶粉中香兰素的准确、快速分析。

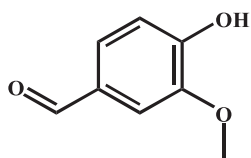


图 1 甲基香兰素结构式

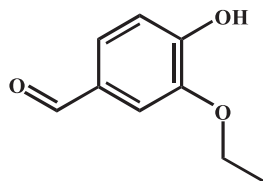


图 2 乙基香兰素结构式

实验部分

1.1 仪器

本实验使用 LC-30A 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-20A₅(在线脱气机)，SPD-M20A(二极管阵列检测器) 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：20 mM 磷酸二氢钠 (冰醋酸调节 pH=4.0)；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 μ m

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱方式：梯度洗脱

表 1 梯度洗脱程序

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

进样量：5 μ L

二极管阵列检测器：采样频率 40 Hz，定量波长 276 nm。

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 10% 乙腈重新溶解，过滤，待测。

结果讨论

2.1 标准品的色谱图

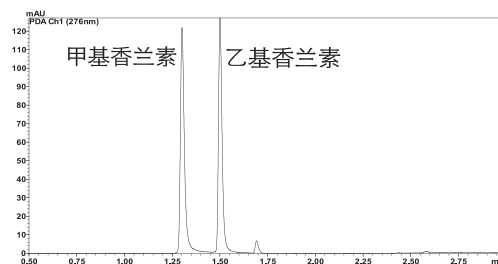


图 3 10 mg/L 标准品色谱图 (276 nm)

2.2 线性关系

将浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 mg/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 2。

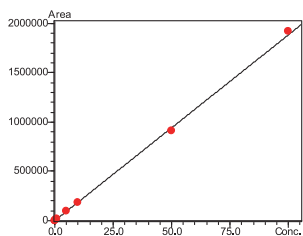


图 4 甲基香兰素标准曲线

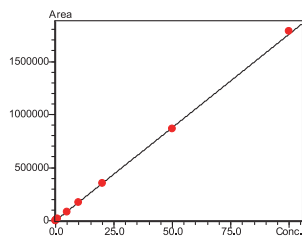


图 5 乙基香兰素标准曲线

表 2 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	$Y = (18851.8)X - (210.054)$	0.9998
2	乙基香兰素	$Y = (17598.0)X - (113.580)$	0.9999

2.3 重复性实验

对 0.2 mg/L, 5 mg/L 和 50 mg/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 3 所示。保留时间 RSD% \leq 0.1%, 峰面积 RSD% $<$ 0.5%。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	名称	0.2 mg/L		5 mg/L		50 mg/L	
		RSD% R.T	RSD% Area	RSD% R.T	RSD% Area	RSD% R.T	RSD% Area
1	甲基香兰素	0.10	0.44	0.10	0.43	0.10	0.22
2	乙基香兰素	0.07	0.47	0.05	0.35	0.07	0.37

2.4 灵敏度

根据标准曲线中的最低点 0.1 mg/L 计算仪器的灵敏度, 通过 LabSolutions 软件计算信噪比、仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算), 结果见表 4。

表 4 0.1 mg/L 信噪比、检测限

编号	名称	S/N	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
1	甲基香兰素	31.77	0.03	0.01
2	乙基香兰素	34.76	0.03	0.01

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, 样品色谱图如图 4 所示。样品中加入 4 mg/kg 标准品, 加标色谱图如图 5 所示。甲基香兰素的回收率为 84.3%, 乙基香兰素的回收率为 80.8%。

讨论

本文建立了超高效液相色谱测定婴幼儿奶粉中甲基香兰素和乙基香兰素的方法。该方法能够实现样品的快速分析, 两种化合物的线性范围 0.1~100 mg/L, 仪器的最低定量限和检出限分别为 0.03 mg/L 和 0.01 mg/L, 仪器的重复性较好, 空白样品中加入 4 mg/kg 甲基香兰素和乙基香兰素, 回收率分别为 84.3% 和 80.8%。本方法适合作为婴幼儿奶粉中香兰素测定的快速分析方法。

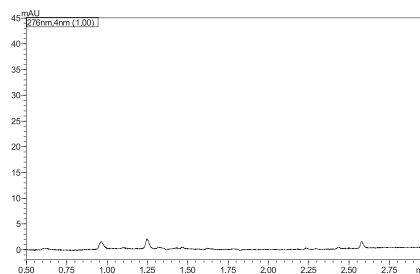


图 6 1 段 (0-6 个月) 婴幼儿奶粉色谱图

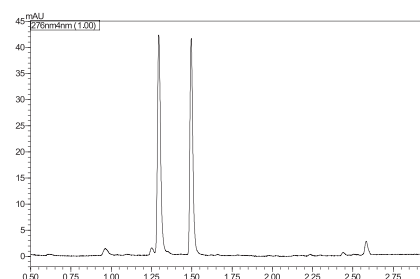


图 7 4 mg/kg 加标样品色谱图