

液液萃取—接受相固化—反萃取—气相色谱/质谱法 测定奶粉中的香兰素

Determination of vanillin in powdered milk by liquid-liquid extraction-solidification
of acceptor phase-reextraction-gas chromatography/mass spectrometry

章建辉 李莎 黄辉 夏立新

ZHANG Jian-hui LI Sha HUANG Hui XIA Li-xin

(长沙市食品质量监督检测中心, 湖南 长沙 410013)

(Changsha Center of Supervision & Inspection on Food Quality Safety, Changsha, Hunan 410013, China)

摘要:建立液液萃取—接受相固化—反萃取技术联用气相色谱/质谱法检测奶粉中香兰素的新方法。该方法选用乙醚为提取剂, 0.01 mol/L 100 μ L 氢氧化钠溶液为接受相, 二氯甲烷为反萃取剂, 采用 GC—MS 测定, 选择离子监测(SIM)模式, 外标法定量。结果表明, 在优化试验条件下, 方法的线性范围为 0.20~10.0 μ g/mL, 相关系数为 0.999 5, 检出限为 ($S/N=3$)0.004 mg/kg。应用该方法分析实际样品, 加标回收率为 82.0%~98.0%, 相对标准偏差(RSD) 2.83%~6.83%。该法简便、快速、准确和灵敏度好, 适用于奶粉中香兰素含量的检测。

关键词:液液萃取—接受相固化—反萃取; 气相色谱/质谱; 奶粉; 香兰素

Abstract: A novel method for the determination of vanillin in powdered milk by liquid-liquid extraction - solidification of acceptor phase droplet-reextraction combined with gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS) was developed. The sample was extracted with ether and the supernatant was cleaned up using 0.01 mol/L 100 μ L sodium hydroxide and the residue was reextracted with dichloromethane. The detection of vanillin was carried out by GC—MS in selected ion monitoring(SIM) mode and external standard method was used for quantitative determination. Under the optimum conditions, the linear range of the method was from 0.20 to 10.0 μ g/mL and the linear correlation coefficient (R) was higher than 0.999 5. The limit of detection ($S/N=3$) was 0.004 mg/kg. The relative standard deviation of the method was less than 6.83% with the recovery values ranging from 82.0% to 98.0%. The proposed method which is very simple, rapid and highly sensitive can meet the needs of determination of vanillin in powdered milk.

基金项目:湖南省科技计划项目(编号:2013WK2003)

作者简介:章建辉(1982—), 男, 长沙市食品质量监督检测中心工程师, 硕士。E-mail: zhangjianhui2012@163.com

通讯作者:夏立新

收稿日期:2014-11-28

Keywords: Liquid-Liquid extraction - solidification of acceptor phase-reextraction; gas chromatography/mass spectrometry; powdered milk; vanillin

香兰素(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛, 又称芳草醛)有浓烈的奶香气息, 是重要的香料之一, 广泛应用于医药、食品、农药、有机合成及药用辅料等领域。食用大剂量的香兰素可导致头痛、恶心、呼吸困难、损肝伤肾等, 危害人体健康。GB 2760—2011 食品添加剂使用标准中规定, 0 至 6 个月婴幼儿配方食品中不得添加香兰素, 较大婴儿和幼儿配方食品中可以使用香兰素, 最大使用量为 5 mg/100 mL, 但标准中并未提供相应的检测方法。目前常用的香兰素检测方法有电化学法^[1]、分光光度法^[2]、高效液相色谱法^[3,4]、高效液相色谱/质谱法^[5,6]、气相色谱法^[7]和气相色谱/质谱联用法^[8,9]。电化学法和分光光度法分析成本低, 但操作繁琐, 灵敏度差; 高效液相色谱法和气相色谱法因简单、快速等优点而得到广泛应用, 但易出现假阳性; 高效液相色谱/质谱法因需要使用固相萃取柱对样品进行净化, 样品处理成本高; 气相色谱/质谱联用法有机溶剂消耗量大, 易污染环境。

液液微萃取—悬浮溶剂固化法(solidification of floating organic drop liquid phase microextraction, LPME—SFO)是 Zanjani 等^[10]于 2007 年提出来的一种新型萃取技术。该法选用凝固点较低且密度小于水的溶剂为萃取剂, 萃取后低温冷却, 萃取剂凝结成固体悬浮于水相表面, 取出固化的萃取剂与水相分离, 待萃取剂溶化后进样分析。该方法选择的萃取剂毒性小, 萃取剂固化后易取出, 在简单基质中对目标物进行分离富集方面具有很好的优势, 并得到应用^[11-14]。LPME—SFO 需要的微量有机溶剂在冷冻或低温条件下能够凝固, 有机溶剂选择性小, 限制了该法的应用。石慧等^[15]

对 LPME—SFO 进行改进,选择酸性水溶液为固化剂来分离减肥茶中的西布曲明,并取得很好的试验效果。目前涉及香兰素检测的方法中接受相固化—反萃取技术尚未见报道,本研究拟在前人研究基础上提出一种液液萃取—接受相固化—反萃取新方法,该方法利用萃取剂对目标物萃取后,选择碱性水溶液为接受相,低温下将水相固化后去除有机相,室温溶解后用有机相再进行反萃取。本研究旨在为奶粉中香兰素的测定提供新方法,为食品安全的监测、预警及控制提供必要的技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷、乙醚:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;
氢氧化钠、盐酸、无水硫酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
无水硫酸钠:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;
香兰素标准品:质量分数为 99.7%,瑞士 Fluka 公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱质谱联用仪:Agilent 7890A/5975C 型,美国 Agilent 公司;
氮吹仪:OA-SYS 型,美国 Organomation 公司;
漩涡混合器:SK-1 型,金坛市医疗仪器厂;
高速离心机:CT 14D 型,上海天美科学仪器有限公司;
电子天平:AL204 型,梅特勒—托利多仪器上海有限公司。

1.3 方法

1.3.1 香兰素标准储备液 称取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)的香兰素标准品于 100 mL 容量瓶中,用二氯甲烷溶解并定容至刻度线,配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,于 4 ℃ 保存备用
1.3.2 香兰素标准工作液 准确吸取 1.0 mg/mL 的香兰素标准储备液,用二氯甲烷逐级稀释配成 0.20,0.50,1.0,2.0,5.0,10.0 μg/mL 的标准工作液。
1.3.3 样品处理 取 0.5 g(精确至 0.000 1 g)样品于离心管中,加 1.0 mL 蒸馏水(盐酸调节蒸馏水 pH 为 4.0~6.0)溶解奶粉后,加乙醚涡旋提取 2 min,加适量无水硫酸钠后,9 000 r/min 离心 5 min。乙醚 7 mL(3,2,2 mL)提取 3 次,合并提取上清液至 10 mL 尖底离心管中。取 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 100 μL 加入到提取液中,涡旋 2 min,5 000 r/min 离心 3 min。—20 ℃ 下冰冻 10 min。待水相固化后,低温下迅速移除上层有机相,室温下将水相溶解。水相中加入 0.5 mol/L 盐酸 20 μL,混匀后加入二氯甲烷 1.00 mL,涡旋提取 2 min 后,5 000 r/min 离心 3 min,取下层溶液进样分析。

1.3.4 香兰素提取与净化单因素条件

(1) 萃取方法和萃取剂的选择:选取相同浓度加标样

品,使用 4 种不同萃取剂(乙醚、乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷)对奶粉中香兰素进行提取。试验选用样品加萃取剂直接涡旋提取(干提取)和溶解后再加萃取剂涡旋提取(湿提取)两种方式,计算萃取率。
(2) 接受相 pH 值对萃取率的影响:取 5 份相同浓度加标奶粉样品,分别使用 pH 为 8.0,9.0,10.0,10.7,11.0,11.7,12.0 的氢氧化钠溶液 200 μL 对加标样品进行萃取,计算萃取率。

(3) 接受相体积对萃取率的影响:取 5 份相同浓度加标奶粉样品,乙醚提取后,考察了 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液不同体积下的萃取效果,体积分别选择为 50,80,100,120,150 μL,计算萃取率。

(4) 反萃取剂的选择:试验选取相同浓度的标准品,考察了不同反萃取溶剂(乙醚、乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷)对香兰素响应的影响。

1.3.5 色谱和质谱条件

(1) 气相色谱条件:VF-wax MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气:He(>99.999%);柱温流量:1 mL/min;进样口温度:250 ℃;分流比 1:10;进样量 1 μL;柱升温程序:初始温度 80 ℃,保持 1 min,以 20 ℃/min 速率升温至 180 ℃,保持 4 min,再以 10 ℃/min 升温至 260 ℃,保持 1 min。
(2) 质谱条件:EI 离子源温度 230 ℃;四级杆温度 150 ℃;碰撞能量 70 eV;传输线温度 280 ℃;质谱接口温度 230 ℃;溶剂延迟 5 min;选择离子检测(SIM)模式的主要离子的 m/z 151,152,81,109。

2 结果与分析

2.1 萃取方法和萃取剂的选择

由图 1 可知:样品直接提取时,4 种萃取剂回收率偏低;样品溶解后再提取时,4 种萃取剂回收率高。因此选用样品溶解后再提取的方法对样品进行提取。

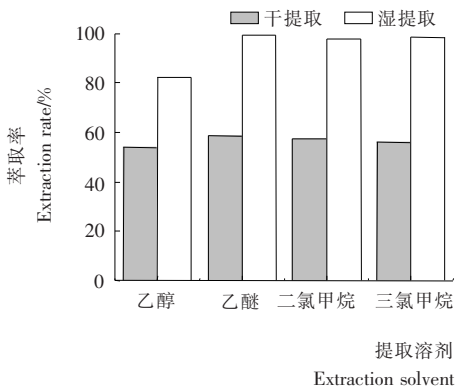


图 1 萃取剂及方法对奶粉中香兰素提取率的影响
Figure 1 Effect on the extraction rate of vanillin from powdered milk by different extraction solvents and methods

采用样品溶解方法提取香兰素时,乙醇与水互溶,萃取后难以除水,氮吹浓缩时需加入碱防止目标物挥发,操作繁琐;二氯甲烷和三氯甲烷密度比水大,离心后样品上浮,也不易操作。乙醚提取效果好,且操作方便。因此选择乙醚为萃取剂。

2.2 净化条件的选择

2.2.1 接受相 pH 值对萃取率的影响 香兰素结构中含有酚羟基,在碱性条件下以离子形式存在,酸性条件下以分子形式存在。在碱性条件下,易将香兰素从有机相中提取出来。试验以氢氧化钠溶液为接受相,比较不同 pH 值对萃取率的影响。由图 2 可知:随着 pH 值的增大,萃取率升高;当 pH 值大于 11.0 后,萃取率大于 96%。为满足对高浓度目标物萃取,最终选择 pH=12.0 的氢氧化钠溶液为接受相。

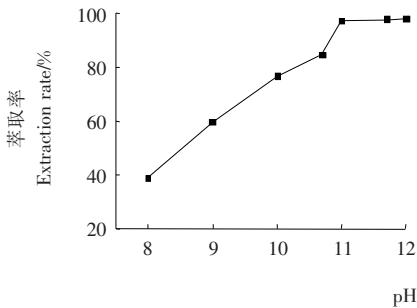


图 2 接受相 pH 值对提取率的影响

Figure 2 Effect on the extraction rate of vanillin in different pH value

2.2.2 接受相体积对萃取率的影响 由图 3 可知:反萃取率先随反萃取剂体积增加而增加;当氢氧化钠溶液用量为 100 μL 时,萃取率为 98.1%;当氢氧化钠溶液体积大于 100 μL 时,反萃取率变化不大。氢氧化钠溶液用量增大,固化时间将延长。因此选定氢氧化钠的用量为 100 μL 。

2.2.3 反萃取剂的选择 氢氧化钠溶液为接受相进行反萃取时,香兰素以盐的形式被提取出来,大部分干扰物存在于有机相中,样品得以净化。接受相体积很小,液态下难以将

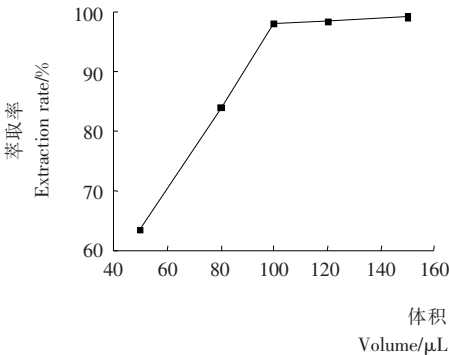


图 3 接受相体积对萃取率的影响

Figure 3 Effect on the extraction rate of vanillin in different volume

两相完全分离。本试验采用接受相固化的方式去除有机相。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冰冻 10 min,水相成为固化态,然后低温下迅速去除有机相。室温溶解后,用 20 μL 0.5 mol/L 盐酸将溶液酸化,香兰素以分子形式存在接受相中。

试验分析了乙醚、乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷等溶剂对香兰素响应的影响。乙醚对香兰素响应不稳定,并且会造成香兰素无响应,原因可能是在气相进样口高温条件下,乙醚与香兰素反应产生了聚合物。乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷对香兰素响应值大并且稳定,但乙醇与水互溶,萃取后难以分离,三氯甲烷毒性比二氯甲烷大。本试验最终选择二氯甲烷为反萃取溶剂。

2.3 分析条件的确定

2.3.1 色谱条件确定 在 1.3.5 气相色谱分离条件下,首先通过 GC—MS 的全扫描方式(m/z 50~200)得到总离子流色谱图(TIC)(见图 4),然后根据 TIC 谱图来选择相对丰度较高和质荷比(m/z)较大离子进行分析。

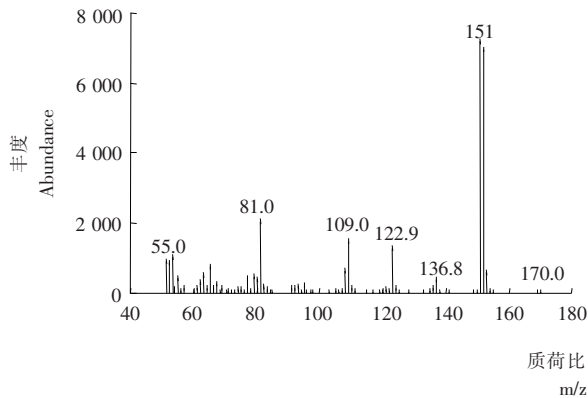


图 4 香兰素的质谱图

Figure 4 Mass spectrum of vanillin by GC/MS

2.3.2 仪器定性定量方式 利用质谱对目标物进行准确性,需要了解 EI—MS 谱图中碎片离子的归属,故对其特征碎片离子的可能碎裂机理进行初步解析(见图 5)。选择 m/z 151 为定性离子, m/z 152,81,109 为定量离子。

2.4 工作曲线,检出限,方法回收率、精密度

将香兰素标准溶液稀释成 0.20,0.50,1.0,2.0,5.0,10.0 $\mu\text{g/mL}$,在本试验确定的试验条件下进行测定,并绘制标准曲线。以浓度($C,\mu\text{g/mL}$)为横坐标,色谱峰面积为纵坐

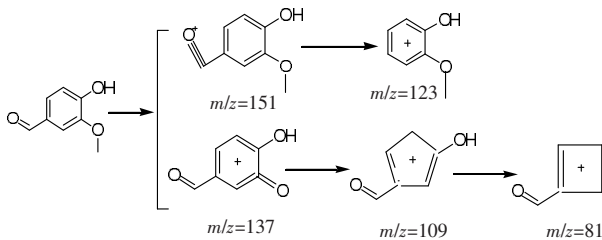


图 5 香兰素的 EI—MS 碎片离子结构

Figure 5 The structure of vanillin EI—MS fragments

标(A),得到线性方程 $A = 32\,509.0C - 7\,716.4$, 相关系数 0.999 5。结果表明在 0.20~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,方法检出限($S/N=3$)为 0.004 mg/kg 。

选取阴性样品, 香兰素的加标水平为: 0.50, 1.0,

4.0 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度水平的加标回收试验, 相关色谱图见图 6; 每个样品连续测定 6 次, 测定精密度和加标回收率(见表 1)。结果表明: 回收率为 82.0%~98.0%, 相对标准偏差小于 6.83%。

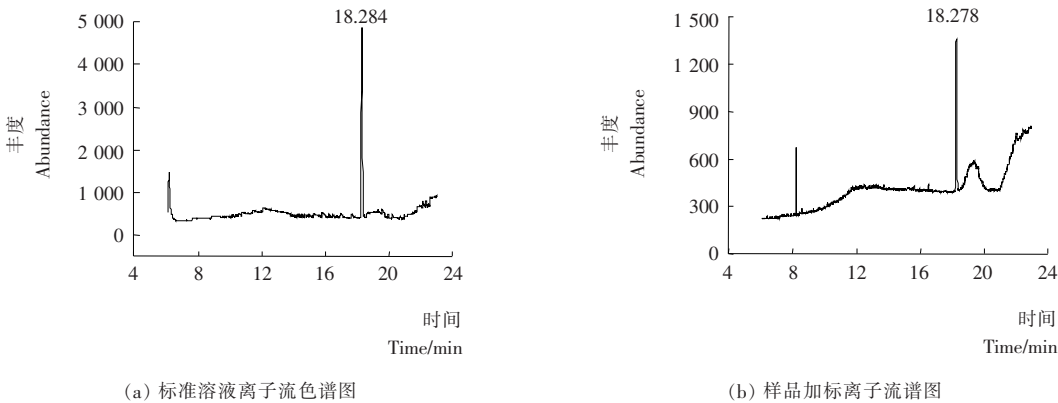


图 6 香兰素标准溶液离子流色谱图和样品加标离子流谱图

Figure 6 The ion chromatograms of standard of vanillin and spiked sample

表 1 精密度和回收率的测定

Table 1 Determination of RSD and recovery rate ($n=6$)

添加量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			平均值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		平均回	精密
								收率/%	RSD/%
0.50	0.46	0.42	0.49	0.41	0.44	0.47	0.448	89.7	6.83
1.0	0.85	0.90	0.89	0.91	0.94	0.92	0.902	90.2	3.39
4.0	3.74	3.66	3.92	3.74	3.62	3.68	3.726	93.2	2.83

2.5 与其它方法的比较

运用本试验建立的方法与文献方法比较可知(见表 2): 本试验有机萃取溶剂消耗少, 检出限低, 说明本方法具有很强的适用性。

表 2 不同测定方法结果比较

Table 2 Comparison results of different methods

分析方法	有机试剂 消耗/mL	检出限/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	参考文献
液相色谱法	>20	0.05	[4]
高效液相色谱/质谱法	>15	0.01	[5]
气相色谱法	>50	1.5	[7]
气相色谱/质谱联用法	>50	0.006	[8]
气相色谱/质谱联用法	<10	0.004	本试验

3 结论

目前关于香兰素检测的方法较多, 但对其分离净化的研究报道相对较少。本试验建立液液萃取—接受相固化—反萃取的新方法与传统的检测方法相比, 简化了分离净化过程、操作简单、无需浓缩、试剂消耗少、灵敏度高、检出限低,

还减少了检测的假阳性现象, 有望在将来为制定奶粉样品中香兰素的国标检测方法提供依据。

参考文献

1 邱萍, 倪永年. 微分脉冲伏安法测定食品中的香兰素[J]. 南昌大学学报(理科版), 2002, 26(2): 124~127.

2 张国文, 倪永年. 多元校正—光度法同时测定食品中的香兰素和乙基麦芽酚[J]. 分析科学学报, 2005, 21(1): 20~23.

3 景丽杰, 韩伟. 用反相高效液相色谱法测定香兰素含量[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 205~207.

4 赵志红, 张逢秋. 反相高效液相色谱法同时测定食品中香兰素、乙基麦芽酚的含量[J]. 食品科技, 2006(12): 136~138.

5 韩超, 刘滨. 液相色谱—串联质谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中 4 种香料[J]. 分析测试学报, 2014, 33(2): 208~211.

6 Lowry S, Jager D, Gracia A. Comparison of head-space SPME—GCMS and LCMS for the detection and quantification of coumarin, vanillin and ethyl vanillin in vanilla extract products[J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1 701~1 709.

7 欧菊芳, 顾秀英. 气相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中香兰素和乙基香兰素[J]. 江西科学, 2011, 29(1): 23~25.

(下转第 105 页)

表 5 腐乳桔霉素含量测定结果

Table 5 Determination results of citrinin content in sufu			
样品	检测结果/(mg·kg ⁻¹)	样品	检测结果/(mg·kg ⁻¹)
腐乳 1	0.08	腐乳 5	8.69
腐乳 2	0.78	腐乳 6	0.69
腐乳 3	5.26	腐乳 7	1.92
腐乳 4	3.63	腐乳 8	6.86

3 结论

本试验采用甲醇－乙酸乙酯－甲酸(7：3：1,V/V)作为提取剂,超声处理 10 min,提取温度 50 ℃,能有效提取腐乳中桔霉素,减少杂质干扰。建立了高效液相色谱荧光检测器法检测腐乳中桔霉素含量,其目标物分离效果好、回收率高、重现性好,试验方法可用于腐乳产品桔霉素含量检测。另外提取液未经净化处理,操作简便,分析时间短。对市售 8 个腐乳产品进行桔霉素含量检测,检测结果表明所检的 8 个腐乳样品普遍受桔霉素污染,但受污染程度相差较大,可能是因为腐乳产品桔霉素含量水平受产品生产工艺和菌种的影响较大。建议建立腐乳产品桔霉素污染数据库,改进生产工艺,选用低风险菌种,降低甚至清除腐乳产品桔霉素污染。

参考文献

1 张国艳,石彦国. 腐乳生产回顾[J]. 食品与发酵工业,1993(6): 72~74.

2 Wong H C, Koehler P E. production and isolation of an antibiotic from monascus purpureus and its relationship to pigment production [J]. Journal of Food Science,1981, 46(2):589~592.

3 Blanc P J, Laussac J P, Bars J, et al. Characterization of monascidin A from Monascus as citrinin[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995(27): 201~213.

4 Chiba H, Yoshikawa M. Opioid antagonist peptides derived from k-casein[J]. Journal of Dairy Research, 1989, 3(56): 363~366.

5 Sabater-Vilar M, Maas R F M, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination[J]. Mutation Research, 1999(444): 7~

16.

6 许赣荣,卢晨,穆晓青,等. 部分红曲霉菌株产桔霉素的研究[J]. 无锡轻工大学学报,2000,19(1):58.

7 李凤琴,许赣荣,李玉伟,等. 食品工业用红曲菌株产桔霉素能力的研究[J]. 卫生研究,2003(6):16~20.

8 李凤琴,许赣荣,李玉伟,等. 国产红曲制品中桔霉素污染水平的研究[J]. 卫生研究,2005(4):451~454.

9 Li Xue-Mei, Shen Xing-Hai, Xue Lan, et al. A validated RP—HPLC method for the determination of citrinin in Xuezhikang capsule and other monascus-fermented products[J]. E-Journal of Chemistey, 2012, 9(1):260~266.

10 李燕,仇峰,杨美华,等. 高效液相色谱—串联质谱法测定中药中桔青霉素[J]. 药物分析杂志,2011, 31(9):1 726~1 730.

11 文镜,徐东. 红曲中桔霉素的 HPLC 苯基柱分离分析[J]. 中国酿造,2010(6):148~151.

12 郭雪梅,许杨,刘仁荣. 免疫亲和柱—高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J]. 食品与发酵工业,2007, 33(10): 148~151.

13 柴秋儿,田亚琼,钟其顶,等. 食品添加剂红曲红中桔霉素检测方法的研究[J]. 食品与发酵工业,2008, 34(11): 144~148.

14 孙伟伟,王静,吴彩梅. 腐乳中存在的安全隐患[J]. 食品研究与开发,2009, 30(4): 156~160.

15 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 2916—2011 出口食品中桔霉素的测定方法 免疫亲和柱净化—高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

16 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 2426—2010 进出口粮谷中桔霉素含量检测方法 液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

17 文镜,贾继春. 高效液相色谱法测定红曲醋中桔霉素含量[J]. 中国酿造,2008(9): 76~79.

18 黄志兵,李燕萍,王延华,等. HPLC 法测定橙色红曲菌 As3. 4384 及其诱变体发酵产物中的桔霉素[J]. 食品科学,2006, 27(12): 614~617.

19 陈蕴,许赣荣,虞慧玲. 红曲桔霉素高效液相色谱测定条件的优化[J]. 食品与发酵工业,2004, 30(1): 118~123.

20 王彩霞,肖杰,孙爱东,等. 高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J]. 中国粮油学报,2010, 25(7): 125~128.

21 靳赛,尤晓颜,王玉芬,等. 红曲米中桔霉素的高效液相色谱法检测[J]. 河南科学,2005, 23(2): 204~206.

(上接第 101 页)

8 韩双,杨金宝. 气相色谱—质谱/选择离子法测定牛奶中的香兰素[J]. 中国乳品工业,2008,36(8):53~55.

9 乙小娟,朱加叶. 气相色谱—质谱法测定巧克力中香兰素、特丁基对苯二酚、咖啡因[J]. 理化检验(化学分册),2009(12):1 404~1 406.

10 Zanjani M R K, Yamini Y, Shariati S. A new liquid-phase micro-extraction method based on solidification of floating organic drop[J]. Analytica. Chimica. Acta, 2007, 585(2): 286~293.

11 翦英红,胡艳. 分散液液微萃取—上浮溶剂固化/高效液相色谱法测定沉积物中的十溴联苯醚[J]. 分析化学,2010,38(1):62~66.

12 王宇,邹晓莉. 混合萃取剂—悬浮固化分散液相微萃取测定尿中

的苯巯基尿酸[J]. 分析化学,2013,41(5):749~753.

13 Zhang Jing-Wen, Ke Xiao-jing. Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for determination of trace cobalt in water samples[J]. Journal of the chinese Chemical Society,2011,58(7):911~918.

14 Zhang Jing-Wen, Wang Yu-kun. Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for determination of trace lead in water samples[J]. CLEAN-Soil, Air, Water,2011,39(12):1 095~1 098.

15 石慧,夏丹. 分散液液微萃取—反萃取—接受相固化—高效液相色谱法测定减肥茶中的西布曲明[J]. 分析化学,2013,41(9): 1 444~1 448.