

气相色谱—质谱法同时定量检测香精中 3 种禁用物质

Simultaneous determination of three prohibited substances in fragrance compound through gas chromatography-mass spectrometry

陆 智

LU Zhi

(无限极〔中国〕有限公司, 广东 广州 510665)
(Infinitus [China] Company Ltd., Guangzhou, Guangdong 510665, China)

摘要:建立了基于气相色谱—质谱(GC-MS)同时检测香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰 3 种禁用物质的方法,并对方法进行验证。结果表明:该方法在浓度为 0.000 5~0.100 0 mg/mL 时呈现良好的线性关系,相关系数均大于 0.990 0;回收率为 90%~116%,相对标准偏差为 4.2%~5.4%,重复性好。检出限为 0.005 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N \geq 3$),满足痕量分析检测要求,可用于香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的定性定量分析。将该方法应用到薄荷香精样品中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮和苄氰的检测,未检测到阳性样品。

关键词:香精;香叶腈;2-戊基-2-环戊烯-1-酮;苄氰;气相色谱—质谱法

Abstract: In this study, a gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method was established for the determination of geranyl nitrile, 2-pentyl-2-cyclopenten-1-one and phenyl cyanide in fragrance compound, and the method was also validated. The method had good linearity ($>0.990\ 0$) with the concentration from 0.000 5 mg/mL to 0.100 0 mg/mL and low limits of detection (LOD) ($<0.005\ \mu\text{g/mL}$) for these three target compounds. And the recovery was from 90% to 116% with relative standard deviation (RSD) from 4.2% to 5.4% at quality control concentration. In a word, the method met the need of trace detection, which can be used to test geranyl nitrile, 2-pentyl-2-cyclopenten-1-one and phenyl cyanide in fragrance compound. When the GC-MS method was applied to detect these three components in different peppermint fragrance samples, none of them was detected out.

Keywords: fragrance compound; geranyl nitrile; 2-pentyl-2-cyclopenten-1-one; phenyl cyanide; gas chromatography-mass spectrometry

香精是由多种香原料、溶剂或载体以及其他辅料调配而成的芳香类混合物,通常直接用于调整食品、日用品、烟草等众多产品的风味。GB/T 22731—2017 中明确将香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮和苄氰列入香精禁用物质名单。香叶腈(柠檬腈)具有新鲜柠檬香气,适于配制花香型、果香型产品。但香叶腈可能导致遗传性缺陷,其大鼠经口的半数致死量(LD_{50})为 4 150 mg/kg,兔子经皮 LD_{50} 为 4 300 mg/kg,可造成皮肤刺激和严重眼刺激^[1]。2-戊基-2-环戊烯-1-酮是一种重要的有机合成中间体,比如合成白兰酮香料^[2],2-戊基-2-环戊烯-1-酮在香精的配制中有提调花香的作用。但 2-戊基-2-环戊烯-1-酮会造成轻微皮肤刺激,可能导致皮肤过敏反应,大鼠经口 LD_{50} 为 2 200 mg/kg^[3]。苄氰可由甲苯经氮氧化或由苯甲酸经干馏而制得,可用作香料的中间体^[4]。大鼠经口 LD_{50} 为 270 mg/kg,经皮 LD_{50} 为 2 mg/kg;小鼠经皮 LD_{50} 为 45 500 $\mu\text{g/kg}$,经腹腔 LD_{50} 为 10 mg/kg。迄今为止,有关香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮和苄氰检测方法尚未见报道。

气相色谱—质谱法(GC-MS)在香精或加香产品中挥发性化合物的检测中运用比较广泛^[3-5]。曾莉等^[6]建立肉制品中 12 种多环芳烃化合物的 GC-MS 同时测定方法,确定了方法的检出限、定量限、标准曲线和线性范围,该方法具有简单、易操作、准确度和重现性好的特点。范文来等^[7]建立了药香型白酒中的痕量萜烯类化合物的定量分析方法,所有化合物的线性相关系数良好, $R^2 \geq 0.992\ 1$,检测限为 0.01~3.62 $\mu\text{g/L}$,定量限为 0.03~12.05 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差小于 15%,加标回收率为 81.01%~118.94%。

鉴于香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮和苄氰已被禁用,且未查阅到相关检测方法的文献报道。本研究拟采用 GC-MS 法定量分析香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮和苄氰,并对所建立的方法进行方法学验证及应用,论证此方法的可行性,为检测方法标准的制定提供技术参考。

作者简介:陆智(1981—),男,无限极(中国)有限公司工程师,硕士。
E-mail: Chris.Lu@infinitus-int.com
收稿日期:2018-03-01

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

气相色谱—质谱仪: Agilent 7890B-5977B 型, 配 EI 源, 美国 Agilent 公司;

漩涡振荡器: VORTEX-5 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

分析天平: FA2014 型, 上海良平仪器仪表有限公司;

香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰: 色谱纯, 美国 Sigma 公司;

甲醇、丙酮: 色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司;

薄荷香精: 10 个样品, 市售。

1.2 标准溶液制备

香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰标准储备液: 称取香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰标准品 1.000 g 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制浓度为 10 mg/mL 的标准储备液, 于 4 ℃ 避光保存。

1.3 样品处理方法

将香精用甲醇稀释 100 倍后供 GC-MS 分析。

1.4 GC-MS 条件

1.4.1 气相色谱分析 条件 HP-Innowax 极性色谱柱, 60.00 m×0.25 mm×0.25 μm。采用高纯度氮气作为载气, 纯度≥99.999%; 流速 0.8 mL/min; 进样口温度 250 ℃; 进样体积 0.2 μL; 基于前期香精分析确定的升温程序为: 40 ℃ 保持 6 min, 以 3 ℃/min 升温至 100 ℃ 保持 5 min, 以 5 ℃/min 升温至 230 ℃ 保持 10 min。3 种物质色谱图见图 1。

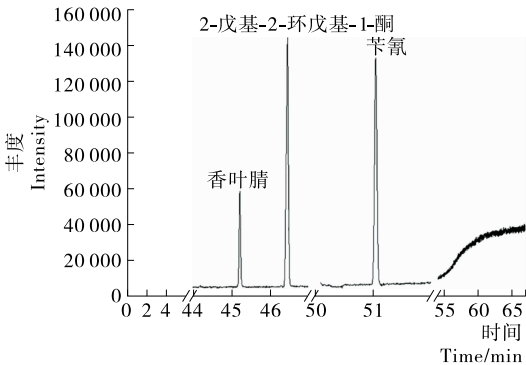


图 1 香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰气相色谱图
Figure 1 GC-MS chromatogram of geranyl nitrile, 2-pentyl-2-cyclopenten-1-one and benzyl cyanide

1.4.2 质谱条件 电子轰击离子源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 ℃; 质量扫描范围 50~550 amu; 检测方式全扫描和 SIM 碎片扫描。香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的保留时间、质谱离子碎片等信息见表 1。

1.4.3 定性和定量分析 以标准样品的保留时间和监测离子定性, 待测样品中监测离子的丰度比与标准品的相同离子丰度比相差不大于 20%。

采用外标法对香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰进行定量分析。待测液中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的

表 1 香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰质谱分析参数
Table 1 Parameters of GC-MS analysis method for geranyl nitrile, 2-pentyl-2-cyclopenten-1-one and benzyl cyanide

化合物	保留时间/min	特征碎片离子及丰度比 (<i>m/z</i>)
香叶腈	45.233	69(100)、134(30)、148(12)
2-戊基-2-环戊烯-1-酮	46.471	96(100)、123(43)、152(38)
苄氰	51.056	117(100)、90(42)、77(12)

响应值应在标准曲线的线性范围内, 超过线性范围则应稀释后再进样分析。

1.5 建立香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的 GC-MS 分析方法

1.5.1 绘制标准曲线 配制了 0.000 5, 0.001 0, 0.005 0, 0.010 0, 0.050 0, 0.100 0 mg/mL 梯度溶液, 供 GC-MS 分析。以标准品浓度为横坐标 *x*, 以相应的定量离子碎片提取峰面积为纵坐标 *y*, 拟合标准曲线得线性回归方程和相关系数。

1.5.2 确定检出限和定量限 取稀释 100 倍后的香精样品, 加入不同体积的混合标准溶液配制成含目标化合物浓度分别为 0.000 1, 0.000 5, 0.001 0 μg/mL 的样品, 振荡, 混匀, 供 GC-MS 分析, 以信噪比 (*S/N*) ≥ 3 时的浓度作为方法检出限, 以检出限的 3 倍作为方法的定量限。

1.5.3 确定回收率和精密度 以稀释 100 倍的香精为样品基质, 加入混合标准溶液配制成含标准品浓度为 1, 2 μg/mL 的加标样品, 同时用甲醇配制浓度分别为 1, 2 μg/mL 的样品作为空白参考; 经 GC-MS 分析, 以加标样品中各化合物定量离子碎片提取峰面积与空白参考样品中各化合物定量离子碎片提取峰面积之比计算方法回收率。

精密度的测定, 将不同加标浓度的样品各配制 6 个, 供 GC-MS 分析, 以计算方法精密度。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线及线性范围、检出限、定量限

本研究采用外标法对香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰 3 种禁用物质进行定性定量分析。

由表 2 可知, 3 种物质加入稀释 100 倍后的香精中经过检测分析, 在浓度为 0.000 5~0.100 0 mg/mL 时线性拟合良好, 相关系数均大于 0.990 0。建立的外标法方法可用于香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的定性定量分析。该方法的检出限为 0.005 μg/mL, 定量限为 0.015 μg/mL, 满足痕量物质的定量分析要求。

2.2 回收率、精密度

由表 3 可知, 添加量为 1 μg/mL 时, 回收率为 90%~116%, 相对标准偏差为 4.2%~5.4%; 添加量为 2 μg/mL 时, 回收率为 96%~107%, 相对标准偏差为 4.7%~4.9%。2 个加标浓度水平, 3 种物质的方法回收率和精密度较好, 说明方法重现性好, 比较稳定, 可用于香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苄氰的定性定量分析。

表 2 3 种禁用物质气相色谱—质谱检测方法的线性方程、相关系数、线性范围、检出限以及定量限
Table 2 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges, detection limits and quantitation limits
for the GC-MS analysis method

化合物	线性方程	相关系数 R^2	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
香叶腈	$y = 3.75\text{E}+07x - 3.29\text{E}+05$	0.997 5	0.000 5~0.100 0	0.005	0.015
2-戊基-2-环戊烯-1-酮	$y = 3.14\text{E}+07x - 9.32\text{E}+03$	0.999 2	0.000 5~0.100 0	0.005	0.015
苯氰	$y = 7.33\text{E}+07x + 1.18\text{E}+04$	0.999 2	0.000 5~0.100 0	0.005	0.015

表 3 气相色谱—质谱检测方法的回收率与精密度
Table 3 Recovery and precision for the GC-MS analysis
method ($n=6$) %

化合物	1 $\mu\text{g/mL}$		2 $\mu\text{g/mL}$	
	回收率	精密度	回收率	精密度
香叶腈	103~112	5.4	102~107	4.8
2-戊基-2-环戊烯-1-酮	104~116	4.7	105~110	4.7
苯氰	90~99	4.2	96~101	4.9

2.3 检测方法的应用

将建立的 GC-MS 方法应用到薄荷香精样品中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苯氰 3 种禁用物质的分析检测,结果显示:不同来源、不同批次的 10 个薄荷香精样品中均未检测到这 3 种禁用物质。

3 结论

本研究建立了同时检测香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苯氰的气相色谱—质谱方法,具有简便快速、灵敏度高等特点,并且检测低限、回收率和精密度均满足国内外对香精中禁用物质检测的相关要求,适用于香精中禁用物质的监测。

参考文献

[1] BRAIN K R, GREEN D M, LALKO J, et al. In-vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile[J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(1): 133-138.

[2] 邵仕香, 刘珂, 孙宝红, 等. 微波催化合成 2-戊基环戊-2-烯酮的研究[J]. 天津理工学院学报, 2001, 17(3): 101-103.

[3] ZENG Yuan, LUO Jian-yong, FAN Ya-ming, et al. Detection of flavor components in ethanol extract from kelp using GC-MS method[J]. Food Science & Technology, 2015, 40(10): 279-283.

[4] LISKO J G, STANFILL S B, WATSON C H. Quantitation of ten flavor compounds in unburned tobacco products [J]. Analytical Methods Advancing Methods & Applications, 2014, 6(13): 4 698-4 704.

[5] WU Ping-qu, ZHANG Li-qun, SHEN Xiang-hong, et al. Determination of ethyl Carbamate in Chinese yellow rice wine by diatomaceous earth extraction and GC/MS method[J]. Journal of Aoac International, 2015, 98(3): 834-838.

[6] 曾莉, 张熠, 刘丹, 等. 气相色谱-质谱法同时测定肉制品中的 12 种多环芳烃[J]. 中国卫生检验杂志, 2017(17): 2 486-2 488.

[7] 范文来, 胡光源, 徐岩. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定药香型白酒中萜烯类化合物[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 110-116.

(上接第 54 页)

[8] SCHRADER K, FERNANDEZ C, CHEYNG W, et al. Evaluation of commercial antisera for *Salmonella* serotyping [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(2): 685-658.

[9] ANEJO J, ISA S, AUDU O, et al. Isolation and polymerase chain reaction detection of virulence *invA* gene in *Salmonella* spp. from poultry farms in Jos, Nigeria[J]. Journal of Medicine in the Tropics, 2016, 18(2): 98.

[10] SAEKI E, ALVES J, BONFANTE R, et al. Multiplex PCR (mPCR) for the Detection of *Salmonella* spp. and the Differentiation of the Typhimurium and Enteritidis Serovars in Chicken Meat[J]. Journal of Food Safety, 2013, 33(1): 25-29.

[11] FITZGERALD C, COLLINS M, DUYNE S, et al. Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10): 3 323-3 334.

[12] LIU Bin, ZHOU Xiu-juan, ZHANG Li-da, et al. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella* enterica Typhimurium and Enteritidis[J]. Food Control, 2012, 27(1): 87-93.

[13] YIN N, NG L, LIN R, et al. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Paratyphi A[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(4): 243-248.

[14] RAHN K, DEGRANDIS S, CLARKE R, et al. Amplicification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(4): 271-279.

[15] PARK S, RICKE S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 152-160.

[16] KIM T, HWANG H, KIM J. Development of a novel, rapid multiplex polymerase chain reaction assay for the detection and differentiation of *Salmonella* enterica serovars enteritidis and typhimurium using ultra-fast convection polymerase chain reaction[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(10): 580-586.