

气相色谱-串联质谱法测定香精香料中的香豆素和黄樟素

李长于^{1,2}, 李祖光¹, 周示玉¹, 叶丹凤¹, 刘文涵¹

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014;

2. 浙江省质量技术监督检测研究院, 浙江 杭州 310013)

摘要:采用乙醇超声提取, 丙酸苯乙酯为内标进行定量, 气相色谱-离子阱串联质谱法测定香精香料中香豆素和黄樟素的含量。选取香豆素的母离子和子离子分别为 m/z 146 和 m/z 118, 黄樟素的母离子和子离子分别为 m/z 162 和 m/z 131, 内标丙酸苯乙酯选择 m/z 104 为定量离子。结果表明, 香豆素和黄樟素在 0.05~5 mg/L 范围内呈良好线性关系 ($r>0.995$), 方法的检测限 ($S/N=3$) 香豆素为 0.004 mg/L、黄樟素为 0.002 mg/L, 加标回收率为 90.0%~131.2%。该方法操作简单、快速、灵敏度高, 适用于香精香料中香豆素和黄樟素的快速检测。

关键词:香豆素; 黄樟素; 香精香料; 气相色谱-串联质谱 (GC-MS/MS)

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2011)05-0265-06

Determination of Coumarin and Safrole in Flavor by Gas Chromatography Coupled to Ion Trap Tandem Mass Spectrometry

LI Chang-yu^{1,2}, LI Zu-guang¹, ZHOU Shi-yu¹, YE Dan-feng¹, LIU Wen-han¹

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science,

Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Zhejiang Test Academy of Quality and Technical Supervision, Hangzhou 310013, China)

Abstract: A method for determination of coumarin and safrole in flavor was developed by gas chromatography coupled to ion trap tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Sample was ultrasonically extracted with ethanol from the flavor. The analysis was performed by GC-MS/MS using propanoic acid, 2-phenylethyl ester as an internal standard. The m/z 146 and m/z 118 were selected as the parent ion and daughter ion for coumarin, the m/z 162 and m/z 131 as the parent ion and daughter ion for safrole, respectively. The m/z 104 was selected as the quantitation ion for propanoic acid, 2-phenylethyl ester as an internal standard. Results show that, when the concentration of coumarin and safrole compounds ranged of 0.05–5 mg/L, the curves show good linear relationship ($r>0.995$). The lowest detection limit of the method ($S/N=3$) are 0.004 mg/L, 0.002 mg/L for coumarin and safrole, re-

收稿日期: 2011-02-15; 修回日期: 2011-05-16

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y407308) 和浙江省科技厅钱江人才项目 (2010R10044) 资助

作者简介: 李长于 (1983~), 男, 江西婺源人, 硕士研究生, 从事分析化学研究工作。E-mail: lcy0610mail@126.com

通信作者: 李祖光 (1971~), 男, 江西上饶人, 博士, 教授, 博士生导师, 从事分析化学等教学和科研工作。E-mail: lzg@zjut.edu.cn

spectively. The recoveries ranged from 90.0% to 131.2%. The method is simple, rapid, high sensitivity, and suitable for the determination of coumarin and safrole in flavor.

Key words: coumarin; safrole; flavor; gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

香豆素(coumarin)又名邻羟基桂酸内酯和1,2-苯并吡喃酮,是广泛存在于自然界中的一种内酯类化合物,在芸香科和伞形科植物中存在最多,其次存在于豆科、兰科、木樨科、茄科和菊科植物,少数来自微生物^[1]。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。欧盟规定,对于洗去型化妆品,香豆素含量不得超过 30 $\mu\text{g/g}$,对于非洗去型化妆品,香豆素含量不得高于 10 $\mu\text{g/g}$ ^[2]。黄樟素(safrole)又称黄樟油素、黄樟脑,它主要存在于沉水樟、坚叶樟等樟属植物的精油中^[3]。黄樟素是合成洋茉莉醛、香兰素、胡椒基丙酮及胡椒基丁醚等香料化学品的一种重要原料,同时黄樟油中含黄樟素,是一种天然香精,曾用于食品添加剂和化妆品中。但近年来有研究表明,黄樟素能在肝组织中形成黄樟素-脱氧核糖核酸(DNA)加合物,对人体有一定的毒副作用,易诱发基因突变和肝损伤,甚至肝癌,是消化系统、血液系统、泌尿系统的强致癌物^[4]。因此,目前世界各国均禁止将黄樟素作为香料和食品添加剂直接使用。在香精香料生产过程中有可能由天然植物精油带入香豆素和黄樟素成分,因此对香精香料进行质量控制是非常必要的。

目前,关于香豆素和黄樟素的测定方法有液相色谱^[5-10]、气相色谱和气相色谱-质谱联用法^[11-17]。串联质谱能够提供足够的化合物结构信息,可用于定性分析及推测化合物结构^[18],准确可靠,特征母离子和子离子的一一对应性使之排除干扰能力强,定量时本底值低,检测灵敏度高,特别适用于分析背景干扰严重、定性困难、被测化合物含量很低的样品,该技术在食品有机污染物检测方面^[19-23]已得到应用。对于香精香料中的香豆素和黄樟素,国内外还未见利用气相色谱-离子阱串联质谱(GC-MS/MS)法进行检测的报道。本研究采用气相色谱-离子阱串联质谱法检测香精香料中的香豆素和黄樟素,并对目前市场上使用的各种香精香料样品进行分析检测。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

CP 3800-Saturn 2000 气相色谱-质谱联用仪;美国 Varian 公司产品,配有液体化学源(CI, 色谱级乙腈为化学电离反应试剂)。

1.2 主要材料与试剂

香豆素、黄樟素和丙酸苯乙酯标准品(纯度大于 99.9%);迪马公司产品;乙醇(分析纯);杭州化学试剂有限公司产品;市售的各种香精香料样品。

1.3 标准溶液配制

香豆素和黄樟素混合标准溶液的配制:准确称取 0.01 g 香豆素和 0.01 g 黄樟素于 100 mL 容量瓶中,用乙醇稀释定容至刻度,配制成 100 mg/L 混合标准溶液,然后用乙醇溶液分别稀释至 10 mg/L,摇匀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存,备用。

丙酸苯乙酯内标溶液的配制:准确称取 0.01 g 丙酸苯乙酯于 100 mL 容量瓶中,用乙醇稀释定容至刻度,配制成 100 mg/L 丙酸苯乙酯内标溶液,然后用乙醇分别稀释至 10 mg/L 和 1 mg/L,摇匀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存,备用。

不同浓度的香豆素和黄樟素混合标准溶液的配制:用乙醇溶液将 10 mg/L 混合标准溶液逐级稀释成以下浓度:5.0、2.0、1.0、0.5、0.1、0.05 mg/L,每级标液中内标丙酸苯乙酯浓度均为 1 mg/L。

1.4 样品前处理方法

准确称取 0.2 g 香精香料样品于 50 mL 锥形瓶中,加入 3 g 无水 Na_2SO_4 除水,然后加入 10 mL 含内标(丙酸苯乙酯内标浓度为 1 mg/L)的乙醇溶液,超声 20 min,静置;然后将锥形瓶中的提取液全部转入 10 mL 容量瓶中,并用乙醇清洗锥形瓶 3 次,清洗液也转入容量瓶中,定容至刻度,超声均匀后静置过夜。取 1 μL 上层清液进行 GC-MS/MS 分析。

1.5 试验条件

1.5.1 色谱条件 毛细管色谱柱:DB-5 low bleed/MS, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm (J&W Scientific, CA, USA);进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;载

气:He,纯度 99.999%,流速 1.0 mL/min;程序升温:柱温 100 ℃,保持 1 min,以 3 ℃/min 升至 160 ℃,然后以 20 ℃/min 升至 280 ℃,保持 5 min;进样量 1.0 μL;不分流进样。

1.5.2 质谱条件 采用电子轰击方式进行离子化,EI 电离能量 70 eV,离子阱温度 150 ℃,歧管温度 40 ℃,传输线温度 250 ℃,溶剂延迟时间 8 min。香豆素母离子为 m/z 146,子离子为 m/z 118,碰撞电压(CID)0.50 V;黄樟素母离子为 m/z 162,子离子为 m/z 131,碰撞电压 0.78 V;CID 模式均采用共振模式;内标物丙酸苯乙酯选择 m/z 104 为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 串联质谱条件的优化

吸取 1 μL 浓度为 5.0 mg/L 香豆素和黄樟素混合标准溶液进样,在电子轰击电离方式下进行全扫描,对二级质谱条件进行优化,得到香豆素和黄樟素的 EI-MS 质谱图,分别示于图 1 和图 2。

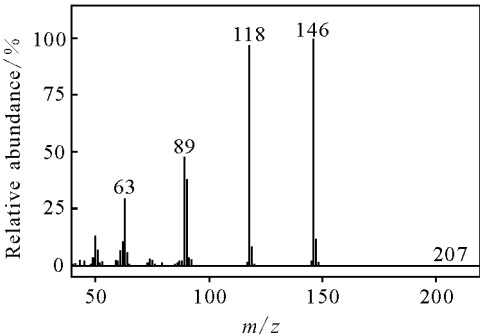


图 1 香豆素的 EI-MS 质谱图
Fig. 1 EI-MS spectra of coumarin

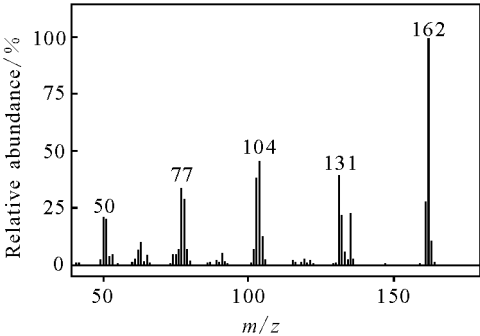


图 2 黄樟素的 EI-MS 质谱图
Fig. 2 EI-MS spectra of safrole

MS/MS 分析中对子离子谱影响最大的是碰撞电压,如果碰撞电压太高,母离子完全碎裂;如果碰撞电压太低,母离子没有碎裂或子离子碎片过少,化合物的结构信息不足。试验对选定的母离子逐渐加大碰撞电压,比较不同碰撞电压的 MS/MS 图谱,选择最佳的碰撞电压和其他分析条件,以便得到尽可能丰富的结构信息。选择合适的母离子和子离子是保证目标化合物获得最佳灵敏度的重要因素,通常从目标化合物的一级质谱中选择响应较大的特征离子作为母离子,可得到更高的灵敏度,所以本研究以香豆素分子离子 m/z 146 和黄樟素分子离子 m/z 162 作为母离子进行 AMD (Automated Methods Development),确定合适的碰撞电压,实验结果列于表 1 和表 2。

表 1 碰撞电压对香豆素 MS/MS 谱图的影响
Table 1 Effect of value of CID on MS/MS spectra of coumarin

碰撞电压/V	母离子/(m/z)和 相对丰度/%	子离子/(m/z)和 相对丰度/%
0.20	146(100)	<u>118</u> (23)
0.30	146(100)	118(27)
0.40	146(25)	118(100)
0.46	146(10)	118(100)
0.50	146(4)	118(100)
0.60	146(0)	118(100)
0.80	146(0)	118(100)
1.00	146(0)	118(100)

注:带下划线为定量子离子

表 2 碰撞电压对黄樟素 MS/MS 谱图的影响
Table 2 Effect of value of CID on MS/MS spectra of safrole

碰撞电压/V	母离子/(m/z)和 相对丰度/%	子离子/(m/z)和 相对丰度/%
0.20	162(100)	<u>131</u> (4),161(27)
0.40	162(100)	131(91),132(97), 161(70),104(36)
0.60	162(34)	131(100),132(62),104(52)
0.72	162(10)	131(100),132(47),104(53)
0.78	162(8)	131(100),132(35),104(54)
0.80	162(0)	131(100),132(32),104(60)
1.00	162(0)	131(100),132(25),104(58)

注:带下划线为定量子离子

由表 1 可知,当碰撞电压小于 0.40 V 时,香豆素母离子有少量碎裂;当碰撞电压逐渐上升,母离子的丰度逐渐下降,子离子的丰度上升;当碰撞电压为 0.46~0.50 V 时,母离子已大部分碎裂;直到碰撞电压为 0.60 V 时,母离子完全碎裂, m/z 146 母离子消失。因此本试验选择香豆素最佳碰撞电压为 0.50 V,香豆素的 EI-MS/MS 分析结果示于图 3。同理,由表 2 可知,当碰撞电压小于 0.60 V 时,黄樟素母离子有少量碎裂;当碰撞电压逐渐上升,母离子的丰度逐渐下降,子离子的丰度上升;当碰撞电压为 0.72~0.78 V 时,母离子已大部分碎裂;直到碰撞电压为 0.80 V 时,母离子完全碎裂, m/z 162 母离子消失。因此本试验选择黄樟素最佳的碰撞电压为 0.78 V,黄樟素的 EI-MS/MS 分析结果示于图 4。

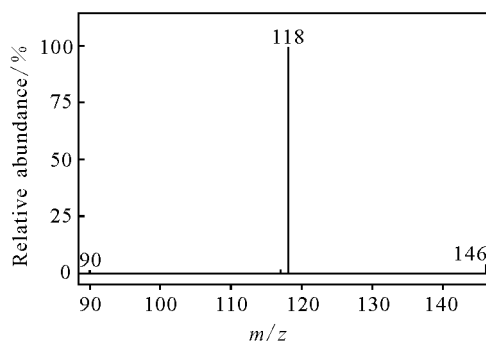


图 3 香豆素的 EI-MS/MS 质谱图
Fig. 3 EI-MS/MS spectra of coumarin

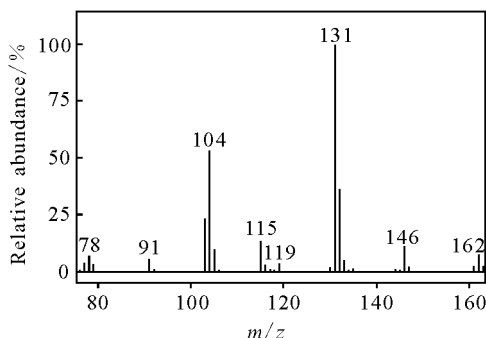


图 4 黄樟素的 EI-MS/MS 质谱图
Fig. 4 EI-MS/MS spectra of safrole

2.2 标准曲线的绘制

根据香豆素和黄樟素的二级质谱图,选取香豆素最高峰强度子离子 m/z 118、黄樟素最高峰

强度子离子 m/z 131 作为定量离子;内标丙酸苯乙酯 m/z 104 为定量离子。根据标准溶液中香豆素、黄樟素分别与丙酸苯乙酯内标峰面积的比值(y)和浓度的比值(x)作图,示于图 5 和图 6。结果显示,香豆素和黄樟素的标准溶液在 0.05~5 mg/L 范围内,所得峰面积比与浓度比的线性关系均较良好,线性回归方程和相关系数分别为: $y=0.4921x+0.0401, r=0.998$ 和 $y=0.3877x+0.0115, r=0.999$ 。

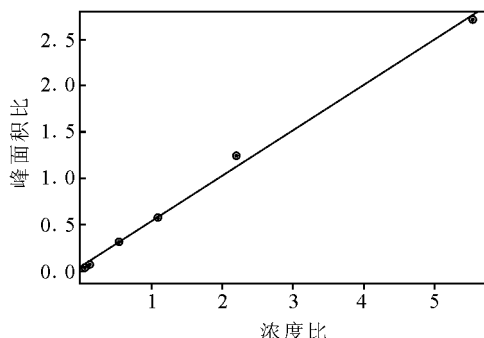


图 5 香豆素的标准曲线
Fig. 5 Standard curve of coumarin

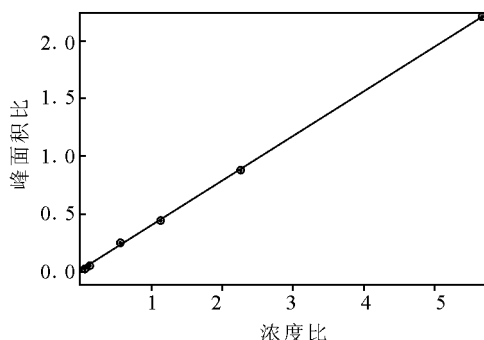


图 6 黄樟素的标准曲线
Fig. 6 Standard curve of safrole

2.3 精密度试验及检测限

将浓度为 0.1 mg/L 香豆素和黄樟素混合标准溶液重复进样 7 次,经测定计算得到香豆素和黄樟素的 RSD 值分别为 3.18% 和 2.84%。检测限(LOD)的计算是根据进样 0.05 mg/L 混合标准溶液,在信噪比(S/N)为 3 的条件下,计算得到香豆素和黄樟素的检测限分别为 0.004、0.002 mg/L。

2.4 回收率试验结果

采用标准加入法进行回收率试验,对方法的

准确度进行考察。在空白香精香料样品中,按高、中、低 3 个水平分别加入 1.0,0.5,0.2 mL 10 mg/L 香豆素和黄樟素的混合标准溶液,每个浓度水平进行 5 次平行试验,结果列于表 3。

表 3 回收率试验结果 (n=5)
Table 3 Recovery rate of coumarin and safrole at different spiked amounts(n=5)

待测物	标准加入量/ μg	测定值/ μg					平均值/ μg	平均回收率/%	RSD /%
香豆素	2.0	1.95	2.04	2.41	2.20	2.34	2.19	109.5	8.88
	5.0	5.84	6.39	6.42	6.65	7.02	6.46	129.2	6.66
	10.0	13.81	13.14	12.31	11.81	14.53	13.12	131.2	8.38
黄樟素	2.0	1.76	1.79	2.01	1.63	1.79	1.80	90.0	7.61
	5.0	4.43	4.39	4.85	4.96	4.34	4.59	91.8	6.28
	10.0	9.79	9.40	9.37	9.47	9.88	9.58	95.8	2.46

计算结果显示,香豆素和黄樟素在不同添加量样品中的平均回收率分别为 109.5%~131.2%和 90.0%~95.8%。

2.5 实际样品检测

按试验方法对市售的 100 多个香精香料样品进行分析,大部分样品中均未检出香豆素和黄樟素,只有极少数样品中检出香豆素或黄樟素,其中 5 种市售香精香料样品的检测结果列于表 4。根据香豆素和黄樟素的色谱保留时间以及其特征质谱图,对检出香豆素或黄樟素的样品进行了定性确认,选择香豆素特征离子 m/z 118、 m/z 146,黄樟素特征离子 m/z 131、 m/z 104 为定性离子,样品的色谱保留时间和质谱碎片离子必须与标准品完全吻合。

表 4 采用本方法测得的香精香料
中香豆素和黄樟素的含量

Table 4 Contents of coumarin
and safrole in flavor analyzed by this method

样品	香豆素含量/($\mu\text{g/g}$)	黄樟素含量/($\mu\text{g/g}$)
样品 1	ND	ND
样品 2	0.05	ND
样品 3	4.20	ND
样品 4	ND	0.16
样品 5	5.33	ND

注:ND 表示未检出

3 结论

本研究建立了香精香料样品中香豆素和黄樟素的气相色谱-离子阱串联质谱分析方法。样品只需乙醇超声处理,就可以直接进样,前处理

步骤简单,结合串联质谱排除干扰能力强,定量时本底值低的特性,该方法具有快速简便、检测灵敏度高,准确可靠,重现好,适合于香精香料或食品添加剂等复杂样品中的香豆素和黄樟素的检测,同时也为其他复杂样品中香豆素和黄樟素含量的测定提供了可借鉴的方法。

参考文献:

[1] 王 华,鲁小梅,姚 虎,等. 香豆素及其衍生物的应用研究进展[J]. 化工时刊,2009,23(8):40-43.
[2] 李 洁,王 超,武 婷,等. 高效液相色谱法测定化妆品中三种香豆素的含量[J]. 日用化学工业,2006,36(4):257-259.
[3] 梅家庆,孙凌峰. 中国的黄樟素植物资源[J]. 香料香精化妆品,2008,(5):35-39.
[4] 章 瑜,陈跃进. 黄樟油的毒性研究[J]. 苏州医学院学报,1995,15(2):241-242.
[5] 陈 捷,胡国昌. 高效液相色谱法测定食品中的香豆素[J]. 色谱,1999,17(2):204-205.
[6] 蒋小华,谢运昌,黄永林. RP-HPLC 测定红丝线中香豆素的含量[J]. 广西植物,2006,26(4):451-452.
[7] MARTINO E, RAMAIOLA E, URBANO M, et al. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1125(2): 147-151.
[8] DE JAGER L S, PERFETTI G A, DIACHENKO G W. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies[J]. Journal of Chro-

- matography A, 2007, 1 145(1/2): 83-88.
- [9] RATHERS M, MATISSEK R. Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(2): 637-642.
- [10] SIANO F, GHIZZONI C, GIONFRIDDO F, et al. Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products[J]. Food Chemistry, 2003, 81(3): 469-475.
- [11] STANFILL S B, ASHLEY D L. Solid phase microextraction of alkenylbenzenes and other flavor-related compounds from tobacco for analysis by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 858(1): 79-89.
- [12] POLZIN G M, STANFILL S B, BROWN C R, et al. Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 1 948-1 953.
- [13] DE JAGER L S, PERFETTI G A, DIACHENKO G W. Comparison of headspace-SPME-GC-MS and LC-MS 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.
- [14] 王 星,蔡天培,王 超,等. 化妆品中黄樟素和 6-甲基香豆素的气相色谱-质谱测定法[J]. 环境与健康杂志,2007,24(5):358-359.
- [15] 吴惠勤,朱志鑫,黄晓兰,等. 气相色谱-质谱联用法测定烟用香精中黄樟素及香豆素[J]. 理化检验-化学分册,2010,46(6):607-609.
- [16] 吴 婷,金其璋. 不同食品中侧柏酮、龙蒿脑、黄樟素和甲基丁香酚的含量测定[J]. 中国食品添加剂,2010,(1):223-228.
- [17] 赵晓亚,林雁飞,胡小钟,等. 气相色谱-质谱法同时测定化妆品中 5 种香豆素类化合物[J]. 分析试验室,2010,29(3):76-79.
- [18] 李祖光,高志祥. 2-氨基-3-硝基吡啶和 2-氨基-5-硝基吡啶的 EI/MS/MS 分析[J]. 分析试验室,2004,23(4):12-15.
- [19] 佟 玲,李重九. 含硫蔬菜中 50 种农药多残留的气相色谱-串联质谱检测技术研究[J]. 分析测试学报,2008,27(9):930-935.
- [20] 薛 平,杜利君,陈 勇,等. 菌类食品中多种有机磷农药的气相色谱-离子阱二级质谱联用法测定[J]. 分析测试学报,2009,28(10):1 121-1 126.
- [21] 邓晓军,郭德华,李 波,等. 葡萄酒中痕量木塞污染物的顶空固相微萃取-气相色谱-串联质谱法检测[J]. 分析测试学报,2008,27(12):1 375-1 378.
- [22] 张朋杰,张宪臣,张 静,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食用油中的叔丁基对苯二酚[J]. 食品科学,2009,30(6):143-145.
- [23] 高文惠,艾连峰. 高效液相色谱-串联质谱法测定进出口食品中十三吗啉残留[J]. 食品科学,2009,30(22):331-334.

=====

(上接第 264 页)

- [11] BEARDSLEY R L, REILLY J P. Optimization of guanidination procedures for MALDI mass mapping [J]. Anal Chem, 2002, 74(8): 1 884-1 890.
- [12] KEOUGH T, LACEY M P, YOUNGQUIST R S. Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsources decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(24): 2 348-2 356.
- [13] COCKRILL S L, FOSTER K L, WILDSMITH J, et al. Efficient micro-recovery and guanidination of peptides directly from MALDI target spots [J]. Biotechniques, 2005, 38(2): 301-304.
- [14] RODRIGUEZ F, ROZAS I, ORTEGA J E, et al. Guanidine and 2-Aminoimidazoline Aromatic Derivatives α 2-adrenoceptor antagonists, 1: toward new antidepressants with heteroatomic linkers [J]. J Med Chem, 2007, 50(18): 4 516-4 527.