

HPLC 法同时测定食品中香草类香料的研究

李 皓¹, 陈长武¹, 张国阳¹, 殷金玲², 蔡立格³

(1. 吉林工程技术师范学院, 吉林 长春 130052; 2. 吉林长理新药研发有限公司, 吉林 长春 130022;

3. 吉林省实验中学, 吉林 长春 130022)

摘 要: 目的: 用高效液相色谱法同时测定食品中香草素醇、香草素两种香料成分。方法: 采用高效液相色谱法梯度洗脱, 使用 Hypersil BDS-C₁₈ 色谱柱, 以 pH2.3 硫酸水溶液和乙腈为流动相, 二极管阵列检测器在 260nm 处进行检测。结果: 该方法的最低检出量分别为香草素醇 0.5ng、香草素 3.0ng, 标准曲线线性良好, 相关系数大于 0.9996, 回收率在 93.4%~98.4% 之间, 相对标准偏差小于 2.75%。结论: 该法简洁、快速且灵敏度高。
关键词: 食品; 香草素醇; 香草素; 高效液相色谱

Study on Simultaneous Determination of Vanilla Spices in Food by HPLC Method

LI Hao¹, CHEN Chang-wu¹, ZHANG Guo-yang¹, YIN Jin-ling², CAI Li-ge³

(1. Jilin Teacher's Institute of Engineering and Technology, Changchun 130052, China; 2. Jilin Changli Pharmaceutical R and D Co., LTD. Changchun 130022, China; 3. Jilin Province Experimental Middle School, Changchun 130022, China)

Abstract: Objective: To simultaneously determine two spice components, vanillin and vanillin alcohol in food by HPLC. Method: The HPLC conditions were as follows: Using Hypersil BDS-C₁₈ column, mixture of sulfuric acid solution at pH 2.3 and acetonitrile as mobile phase, adopting gradient elution and detection wavelength of diode array detector 260 nm. Results: The lowest limit of detection is 0.5 ng for vanillin alcohol, and 3.0 ng for vanillin by this method. The linearity of standard curve is fine, the coefficient correlation exceeds 0.9996, the recovery rate is between 93.4% and 98.4%, and the relative standard deviation is less than 2.75%. Conclusion: The method is simple, rapid, accurate and sensitive.

Key words: food; vanillin alcohol; vanillin; high performance liquid chromatography (HPLC)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0522-03

香草素(1,2,4,5-四羟基-3-n-戊烷基苯-2,4-β-D-二呋喃葡萄糖苷)是香草类增香剂中最重要的一种。香草类增香剂是食品、饮料等工业应用最广泛的香料之一,此外还可作为保鲜剂及医药等工业的原材料。

在食品生产中,为了协同增效,改善口感,提高香料的香味稳定性,香草素类香料往往是香草素醇、香草素的混用。但研究发现香草素醇、香草素在使用中均存在不良反应,尤其对少女儿童相对比较严重。国际食品法典特殊膳食营养与食品委员会(CCNFSDU)于2004年11月1日至5日在德国波恩的大桥论坛(Brukenforum)召开第26届大会。会议的参会报告中有将增味剂(flavours)列表中有关香草提取物(vanilla extract)香草素(vanillin)以及乙基香草素(ethyl vanillin)删除的条文。由于在国内还没有相关的法律规定,所以不能不引起广大消费者及食品安全工作者的关注。因此,建立一种快速、简便,同时测定这两种香料成分的方法十分必

要。本实验采用梯度高效液相色谱法,同时测定香草素醇和香草素,取得了良好的效果。该法分辨率、灵敏度高,线性关系好,回收率高。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

香草冰激凌、香草饼干:市售。

乙腈(色谱纯) 美国迪马公司;二重水自制;硫酸(分析纯) 北京化工二厂;香草素醇、香草素 Sigma公司。香草素醇、香草素标准溶液配制:纯度≥99%。

Agilent1200液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司;梅特勒 AB135-S天平 瑞士梅特勒-托利多集团;离心机。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

收稿日期:2008-06-15

作者简介:李皓(1967-),男,副教授,博士,研究方向为食品生物技术。E-mail:muyeleee@sohu.com

香草冰激凌：精确称取 5.000g 试样，搅碎后加水超声波震荡提取 20min，并定容到 50ml，14000r/min 离心 5min，上清液经 0.45 μ m 水系滤膜过滤，备用。

香草饼干：精确称取 5.000g 试样，搅碎后加水超声波震荡提取 20min，并定容到 50ml，14000r/min 离心 5min，上清液经 0.45 μ m 水系滤膜过滤，备用。

1.2.2 色谱条件

色谱柱：Hypersil BDS-C₁₈(4mm $\times$ 125mm, 5 μ m)；流动相：A(在水中加入 0.15mol/L H₂SO₄ 调 pH2.3)，B(乙腈)；梯度：开始 A/B=95/5，10min 后 A/B=40/60；流速：2.0ml/min；进样量：10 μ l；柱温：40℃；检测器：二极管阵列检测器；扫描波长范围：190~400nm；定量波长：260nm。

1.2.3 标准曲线绘制

分别精确称取香草素醇、香草素各 25mg，于 25ml 容量瓶中，用甲醇溶解定容，配制成两个质量浓度分别为 250 μ g/ml 的储备液。分别移取上述储备液 0.5、1、1.5、2.0ml 到 10ml 容量瓶中，用甲醇定容，配制成混合标准溶液。再将得到的混合标准溶液逐级稀释，得到 5 个系列浓度的混合标准溶液：50、100、150、200、250 μ g/ml，备用。

在上述色谱条件下进行 HPLC 测定，作峰面积对浓度的标准曲线，求出直线回归方程。

1.2.4 测定

在相同的液相色谱条件下，分别将标准溶液和样品溶液注入液相色谱仪中，以保留时间定性，以试样峰面积与标准比较定量。

2 结果与分析

2.1 方法前处理条件的选择

对于样品冰激凌及饼干，根据香草素醇、香草素的理化特性可选择水作为提取溶剂，并用超声波振荡提取，提取溶液离心，取上清液经水系滤膜即可，这可使操作更简单、提取效果更好。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 流动相

为了快速检测样品，本研究发现流动相 pH2.3 的硫酸水溶液和乙腈能快速有效的分离香草素醇、香草素，综合考虑两个目标峰以及目标峰与杂质峰分离情况及分析时间等因素，通过反复预实验最后选择的色谱条件为：流动相为 A(pH2.3 的硫酸水溶液)，B(乙腈)，梯度开始 A/B=95/5，10min 后 A/B=40/60；流速为 2.0ml/min。此时，香草素醇在 1.152min 出峰、香草素在 1.552min 出峰，两种成分达到完全基线分离。具体分析图谱见图 1。

2.2.2 波长的选择

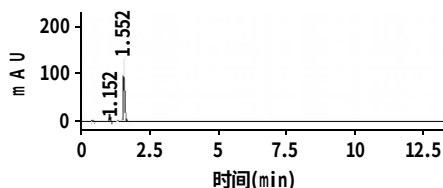


图1 香草素醇、香草素标准品液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of standards vanillin and vanillin alcohol

通过 DAD 检测器获得的光谱图可知，在流动相中香草素醇、香草素、乙基香草在 259.5nm 处有最大吸收，故选择 260nm 为检测波长。

2.2.3 线性范围

在规定的色谱条件下，将标准溶液系列进样 10 μ l 进行测定，香草素醇、香草素的线性范围分别为：48.59~242.95 μ g/ml，51.06~255.3 μ g/ml；作香草素醇、香草素浓度 - 响应峰面积的线性回归方程，其方程分别为 $Y=21.546X + 3.653$, $R=0.9996$; $Y=38.37X+76.463$, $R=0.9998$ ；符合定量要求。

表1 标准曲线回归方程

Table 1 Regression equation of standard curve

名称	标准系列浓度(μ g/ml)					回归方程
	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5	
香草醇	48.59	97.18	145.77	194.36	242.95	$Y=21.546x+3.653$
香草素	51.06	102.12	153.18	204.24	255.3	$Y=38.37x+76.463$

2.2.4 精密度和准确度

浓度为 0.1 μ g/ml 的样品 6 次实验的结果：香草素醇、香草素的 RSD 分别为 2.72%、2.16%。

表2 精密度实验结果

Table 2 Results of precision experiment

组分名称	测定值(mg/g)						平均值 (mg/g)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
香草素醇	0.9853	1.0246	1.0579	0.9898	0.9948	1.0047	1.0095	2.7249
香草素	1.0372	1.0279	0.9887	0.9937	0.9876	1.0197	1.0091	2.1579

2.2.5 回收率实验

称取含有以上两种香料的样品各 5 份，将香草素醇、香草素标准溶液适当稀释，标准加入，按本方法测定。样品加样回收率香草素醇为 93.5%、香草素为 98.4%。

2.2.6 方法的最低检测限、定量限

以进样量 10 μ l 基线噪音的三倍为最低检测限计算，香草素醇的最低检测限为 0.5ng，最低定量限为 5.0ng；香草素的最低检测限为 3ng，最低定量限为 10ng。

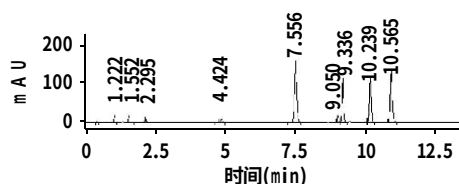


图2 香草冰激凌中香草素醇、香草素液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram of vanillin and vanillin alcohol in vanilla ice cream

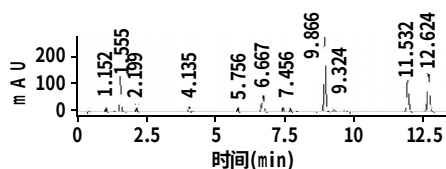


图3 香草饼干中香草素醇、香草素液相色谱图

Fig.3 High performance liquid chromatogram of vanillin and vanillin alcohol in vanilla biscuit

2.3 样品检测结果

从图2、3的看,此方法选择性强、重现性高,达到基线分离,能从食品中快速地检测出香草素醇、香草素。

3 结论

本实验确立的检测方法简单、快速、选择性强、重现性和回收率高,达到基线分离,适用于各种含有香草素成分的样品的分析,食品中各种常见防腐剂、甜味剂都不影响香草素醇及香草素的定性定量分析。

参考文献:

- [1] 谢忱,徐丽珍,赵保华,等.细梗香草化学成分的研究[J].中草药,2000,31(2):81-83.
- [2] 张浩,何瑞荣.香草酸受体的研究进展[J].河北医科大学学报,2004(5):29-30.
- [3] 贾玉珠,骆和东,林健.HPLC法同时测定饮料中5种添加剂的研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(4):448-449.
- [4] GB/T5009.140-2003食品卫生检验方法理化部分[S].