

经验交流

高效液相色谱法测定食品中的香豆素

陈 捷 胡国昌

(中华人民共和国进口食品卫生监督检验中心 广州 510405)

提 要 介绍了用反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定食品中香豆素含量的方法。样品用无水乙醚萃取,在40℃水浴上用氮气吹干,残留物用V(甲醇):V(水)=9:1反萃取,用RP-HPLC定量分析。方法最小检出限为0.015 mg/L,在2~10 mg/L范围内有良好的线性关系,测定准确、重现性好,回收率为97.6%~100.8%,方法可行。

关键词 高效液相色谱法,香豆素,食品

分类号 O658

1 前言

香豆素又称为邻羟基桂酸内酯和1,2-苯并吡喃酮,是主要豆香型香料之一,常用于香薇、素心兰、紫罗兰、山楂花、葵花、兰花等香型的日用香精中。由毒理实验发现,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,由致癌性判定,动物为阳性反应。香豆素对人类的肝脏也有危害,因此,香豆素不得用于食品中。二氢香豆素是调配奶油、椰子、樱桃、坚果等香型的食用香精,它是以香豆素为原料,经催化加氢制得。在生产过程中,有可能将香豆素带入食品中,造成污染。因此有必要对有关食品进行香豆素的监测。目前,国内用HPLC测定食品中香豆素的报道甚少。本文对食品中香豆素的萃取和色谱条件的选择进行了探索,建立了食品中香豆素的RP-HPLC测定方法。该方法简单易行,结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器: Waters 810/510/490/U6K 高效液相色谱组合仪。

试剂: 香豆素(佛山市化工实验厂),甲醇(AR),无水乙醚(AR),磷酸二氢钠(AR)。

2.2 标准贮备液和使用液的配制

贮备液: 精确称取香豆素0.1000 g,用V(甲醇):V(水)=9:1溶解移入100 mL容量瓶中,定容至刻度,摇匀。此贮备液质量浓度为1.00 g/L。

使用液: 准确吸取贮备液1.00 mL于100 mL容量瓶中用V(甲醇):V(水)=9:1稀释至刻度,摇匀,此溶液质量浓度为0.0100 g/L。

2.3 色谱条件

色谱柱: Nova-Pak C₁₈反相柱(5 μm,150 mm×3.9mm i. d.),流动相为V(甲醇):V[0.01 mol/L磷酸二氢钠溶液(pH 5.4)]=45:55,流速1.0 mL/min,进样量10 μL,紫外检测波长:275 nm,AUFS:0.02,柱温35℃。

2.4 样品前处理

(1)含油脂的固体样品:将样品粉碎,称取10.00 g于250 mL带塞锥形瓶中,加50.0 mL无水乙醚振荡萃取30 min,静置片刻,快速过滤,吸取滤液20.0 mL于25 mL比色管中,在40℃水浴上用氮气吹干,再准确加入10.0 mL V(甲醇):V(水)=9:1,剧烈振荡萃取,静置过夜,取上层清液,用0.45 μm微孔滤膜过滤,供HPLC测定。

(2)不含油脂的固体样品:将样品粉碎,称取样品4 g于100 mL带塞锥形瓶中,加25 mL沸水,振荡30 min,过滤,用少量水冲洗过滤漏斗,合并滤液,冷却后,转移到125 mL分液漏斗中,用无水乙醚15 mL,15 mL,10 mL分别萃取3次,萃取同时将每次乙醚层移入25 mL比色管中,在40℃水浴上用氮气吹干。再准确加入10.0 mL V(甲醇):V(水)=9:1,振荡均匀,静置,取上层清液,用0.45 μm微孔滤膜过滤,供HPLC测定。

(3)饮料、酒类等液体样品:取样品10 g于125 mL分液漏斗中,加10 mL水稀释摇匀,用无水乙醚

萃取,以下操作同 2.4(2)。

2.5 样品测定

分别进标准溶液及样品测定液 10 μL,收集数据,设置积分参数,通过单点外标法,由 Baseline 810 色谱工作站自动定量计算,标准及样品加标色谱图见图 1,测定结果见表 1。

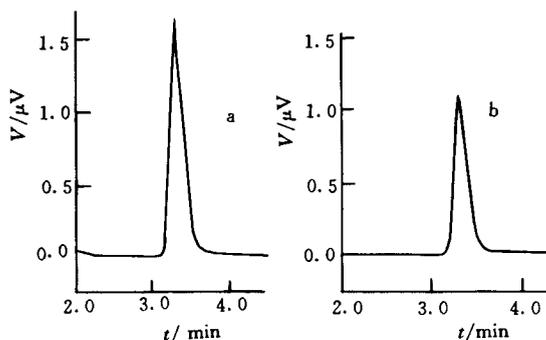


图 1 香豆素标准色谱图(a)和样品加标色谱图(b)

Fig. 1 Chromatograms of standard coumarin (a) and spiked sample (b)

表 1 样品测定结果

Table 1 Analytical results for samples

样品名 Sample	产地 Place of production	进样量 Inj. vol. (μL)	测定值 Found (g/L)
曲奇饼 Butter cookies	丹麦 Denmark	10	未检出 not found
西瓜柳 sour melon	英国 England	10	未检出 not found
瑞士糖 Sugar	印尼 Indonesia	10	未检出 not found
ADVOCAAT 酒	荷兰 Netherlands	10	未检出 not found
BLUECURACAO 酒	荷兰 Netherlands	10	未检出 not found

3 结果和讨论

3.1 萃取溶剂的选择

香豆素溶于许多有机溶剂及油脂中,且具有升华的性质。为尽可能减少水浴、吹干操作所造成的损失,我们选择了沸点低、毒性相对较小、价格便宜的无水乙醚进行第一步萃取。吹干后的残留物往往含有油脂,如果直接用甲醇进行萃取,有一些油脂会溶于甲醇中,并且萃取到甲醇中的杂质也比较多,直接进样后,对色谱柱会造成不良影响。为此我们采用甲醇-水进行萃取,以减少油脂和杂质在萃取液中含量。如水的比例过大,会降低测定香豆素的回收率,通过实验,我们选择 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 9 : 1$ 进行萃取,获得了满意的结果。

3.2 流动相配比的选择

测香豆素采用甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钠作为流动相,通过实验发现甲醇比例越大,香豆素出峰保留值越小,与杂峰分离不开;甲醇比例越小,香豆素出峰保留值越长,虽然与杂峰分开,但灵敏度显著降低。兼顾两者,经过条件优化,我们选择了流动相的配比为 $V(\text{甲醇}) : V(0.01 \text{ mol/L 磷酸二氢钠}) = 45 : 55$ 。

3.3 线性关系及最小检出限的测定

(1)准确吸取贮备液 5 mL,于 50.0 mL 容量瓶中,用 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 9 : 1$ 稀释至刻度,摇匀,此溶液质量浓度为 0.1 g/L。分别吸取上述溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 于 25.0 mL 容量瓶中,用 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 9 : 1$ 定容至刻度,摇匀,系列标准溶液的质量浓度分别为 2, 4, 6, 8, 10 mg/L。分别进样 10 μL,进行测定。回归方程 $Y = 2.2949 \times 10^5 X - 4.1987 \times 10^4$, $r = 0.9999$,标准曲线见图 2。由出峰面积对质量浓度绘制的标准曲线表明,质量浓度在 2 ~ 10 mg/L 范围内呈良好的线性关系。

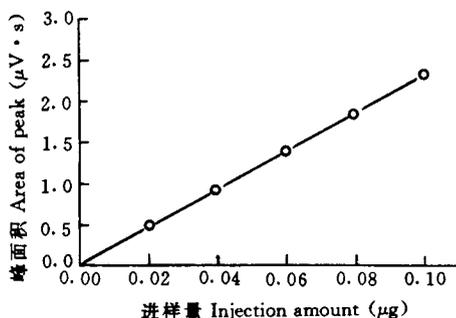


图 2 香豆素标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of coumarin

(2)准确吸取 2 mg/L 的标准溶液 10 μL 进样,可得到相应的香豆素峰面积响应值以及噪声的峰面积响应值。根据 $S = 2N$,计算得出最小检出质量浓度为 0.015 mg/L。

3.4 回收率测定

溶液 A:用乙醚准确配制质量浓度为 1.00 和 0.10 g/L 的香豆素标准溶液,待用。溶液 B:用去离子水准确配制质量浓度为 1.00 和 0.10 g/L 的香豆素标准溶液,待用。取适量曲奇饼,分别加入一定量的溶液 A,按 2.4(1)步骤操作。取适量西瓜柳和 TEARDROP 酒,分别加入一定量的溶液 B,再分别按 2.4(2)和 2.4(3)步骤操作。

添加回收的测定结果见表 2,结果表明,香豆素在测定过程中损失很少,也说明本方法具有较好的准确度。

表 2 方法回收率结果

Table 2 Recovery of the method

样品 Sample	编号 No.	加入量 Added (mg)	检出量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)
曲奇饼 Butter cookies	1	1.00	0.9761	97.6
	2	0.10	0.1008	100.8
西瓜柳 Sour melon	3	1.00	0.9910	99.1
	4	0.10	0.09777	97.8
TEARDROP 酒	5	1.00	0.9853	98.5
	6	0.10	0.09826	98.3
平均 mean				98.7±1.2

注:本底香豆素未检出(Samples did not contain coumarin).

3.5 精密度测定

取回收系列样品中的一个样品,平行测定 6 次,隔 5 天后,再平行测定 6 次,结果见表 3,表 3 表明,

表 3 精密度结果($n=6$)Table 3 Precision of the method ($n=6$)

编号 No.	样品重复测定值 Results for samples (g/L)						平均值 X(g/L)	标准偏差 SD (g/L)	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5	6			
1	0.09817	0.1003	0.1004	0.09952	0.09709	0.09758	0.09884	0.0014	1.4
2*	0.09978	0.09814	0.09718	0.09843	0.1006	0.09795	0.09868	0.0013	1.3

2* 是 1 号样品放置 5 天后的重复测定值(2* is the determined values after 5 days for No. 1 sample).

参 考 文 献

- 石 青. 化学品毒性,法规、环境数据手册. 北京:中国环境科学出版社,1992. 462~463
- 孙宝国,何 坚. 香精概念——香料、调配、应用. 北京:化学工业出版社,1996. 211~212
- Lamiabil D, Vistelle R, Trenque T et al. J Chromatogr, Biomed Appl, 1993,131 (2(J Chromatogr, 620)):273-277
- Bourgaud F, Poutaraud A, Cuckert A. Phytochem Anal, 1994,5 (3):127-132
- Antonious M S, Sabry D Y. Mikrochim Acta, 1995, 118(1-2):69-74
- Kiflard A J, O'Kennedy R, Bogan D P. J Pham Biomed Anal. 1996,14(11): 1585-1590
- Mazur W, Fotsis T, Wahala K et al. Anal Biochem, 1996, 233 (2):169-180
- Ehlers D, Pfister M, Bork W-R et al. Z Lebensm Vnters Forsch, 1995,201(3):278-282

The Determination of Coumarin in Foods by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Chen Jie and Hu Guochang

(The Center of Import Food Hygiene Supervision and Inspection of
P. R. Chian, Guangzhou, 510405)

Abstract An HPLC procedure for determination of coumarin in foods has been developed. The samples were extracted with ether. The extract was evaporated at 40°C under dry N₂. The residue was diluted by adding 10.0 mL MeOH-H₂O(9 : 1) and keep standing. A 10 μL clear liquid was analysed by HPLC on a Nova Pak C₁₈ column (5 μm, 150mm×3.9 mm. i. d.) with MeOH/10 mmol/L-phosphate buffer of pH 5.4(45 : 55) as mobile phase (1.0 mL/min) and UV detection at 275 nm. The calibration curve was linear in the range from 2 to 10 mg/L and the detection limit was 0.015 mg/L. Recoveries of the method were from 97.6% to 100.8%. The CV ($n=6$) was 1.3%. The method is simple, rapid and accurate.

Key words high performance liquid chromatography (HPLC), coumarin, food

样品在短时期内测定,不影响测定结果,也表明本方法具有良好的精密度。

3.6 干扰实验

由于样品的前处理与测定苯甲酸、山梨酸、糖精钠、BHA、BHT 的前处理有相似之处,通过实验表明,苯甲酸、山梨酸、糖精钠、BHA、BHT 对香豆素的测定没有干扰。

4 结论

本方法操作简便,测定准确,重现性好,在 2~10 mg/L 范围内有良好的线性关系,最小检出限为 0.015 mg/L,平均回收率为(98.7±1.2)%,可用于各种食品中香豆素含量分析。