

实验技术与方法

液相色谱荧光法测定食品中乙氧基喹残留量

郑国灿¹,朱美文¹,王晶¹,尹楠戈²,彭光宇¹,陈江¹,李贤良¹

(1. 重庆出入境检验检疫局,重庆 400020; 2. 重庆医科大学,重庆 400016)

摘要:目的 建立检测多类食品中乙氧基喹残留量的液相色谱荧光法。方法 样品在碱性条件下用正己烷提取,经调节酸碱度液液萃取净化后进行检测。采用 Agilent Eclipse XDB-C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱分离,甲醇-水为流动相进行线性梯度洗脱,流速为 1.0 ml/min,柱温 30 ℃,进样量 20 μl;荧光检测器激发波长 365 nm,发射波长 425 nm。结果 乙氧基喹在 0.05~10 mg/L 范围内线性关系良好($r=0.9992$),方法的检出限($S/N=3$)为 7.5 μg/kg,定量限($S/N=10$)为 25 μg/kg;8 类食品基质分别添加 3 个不同浓度水平,平均回收率为 80.5%~95.9%, RSD 为 3.1%~11.5% ($n=8$)。结论 本方法实用性强,可操作性好,适用于多类食品中乙氧基喹残留量的检测。

关键词:乙氧基喹;液相色谱;荧光检测器;食品添加剂;抗氧化剂;食品安全

中图分类号:R155.5;O657.7⁺2;TS202.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0424-04

Determination of ethoxyquin residue in food by liquid chromatography with fluorescence detector

ZHENG Guo-can, ZHU Mei-wen, WANG Jing, YIN Nan-ge,
PENG Guang-yu, CHEN Jiang, LI Xian-liang

(Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective A method for the determination of ethoxyquin residue in food by liquid chromatography with fluorescence detector was developed. **Methods** The homogenized sample was extracted with n-hexane under alkaline conditions, then cleaned by liquid-liquid extraction (LLE) with n-hexane after adjusting the pH value. The targeted compound was determined by liquid chromatography-fluorescence detector. The chromatographic separation were achieved in Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution using methanol-water as mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μl. The ethoxyquin was detected under FD at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=365\text{ nm}/425\text{ nm}$. **Results** The linear range of ethoxyquin was 0.05–10 mg/L, and the correlation coefficient was 0.999 2. The limit of detection was 7.5 μg/kg ($S/N=3$) and the limit of quantification was 25 μg/kg ($S/N=10$). In different food matrixes, the average recoveries of ethoxyquin under three spiked levels were 80.5%–95.9%, with $RSDs$ ($n=8$) of 3.1%–11.5%. **Conclusion** This method was practical, maneuverable and suitable for the determination of ethoxyquin residue in various food.

Key words: Ethoxyquin; liquid chromatography; fluorescence detector; food additive; antioxidant; food safety

乙氧基喹(又名乙氧基喹林、乙氧基喹宁、乙氧喹)是国内外广泛使用的抗氧化剂,常用于水果、蔬菜、饲料等的防腐和保鲜,因此许多国家对其残留限量都作出了规定^[1]:我国规定在水果中的最高残留限量为 1 mg/kg;美国规定在禽蛋中的限量为 0.5 mg/kg;日本规定在苹果、梨中的残留限量为 3 mg/kg,在其它植物源性食品中的限量为 0.05 mg/kg;欧盟规定在苹果、梨中的残留限量为 0.05 mg/kg。

目前关于食品中乙氧基喹残留量的测定,研究的基质主要有禽肉^[2]、畜肉^[3]、水果^[4-6]、蔬菜^[7]、水产品^[8]等,不同类型的食品采用不同的测定方法,主要有荧光分光光度法^[2]、气相色谱-氮磷检测器法^[5]、气相色谱-质谱法^[7]、液相色谱-紫外检测器法^[7,9]、液相色谱-荧光检测器法^[3,9]、液相色谱-电化学检测器法^[10]以及液相色谱-串联质谱法^[4,6,8]。其中,荧光分光光度法由于未对样品进行分离,干扰较大;气相色谱法灵敏度低,无法满足限量要求;液相色谱-质谱联用仪价格昂贵且检测运行成本高,难以普及^[4]。相比而言,液相色谱仪是较好的选择,同时,与紫外检测器相比,荧

收稿日期:2013-05-21

基金项目:国家质检总局科研制标项目(2009B523)

作者简介:郑国灿 男 工程师 研究方向为食品安全监测技术

E-mail:ciqzgc2007@126.com

光检测器具有选择性强、可以降低基质背景干扰、灵敏度高等优点。因此,本文采用液相色谱-荧光检测器法,根据乙氧基喹的化学性质及各类食品基质的特点,对样品提取、净化方法及仪器条件进行优化,建立了适用于水果、蔬菜、调味料(辣椒粉)、畜肉、水产品、禽蛋等多类食品中乙氧基喹残留量的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 液相色谱仪配荧光检测器(美国戴安)、高速均质仪、旋涡混匀器、离心机、氮吹仪、旋转蒸发仪。

乙氧基喹标准品(纯度 $\geq 97.8\%$,美国 Sigma)、正己烷(色谱纯)、无水硫酸钠(650 °C 灼烧 4 h,干燥器内冷却至室温)、碳酸钠、盐酸、氢氧化钠(均为分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 样品提取与净化

提取:将样品用组织捣碎机充分捣碎,准确称取 4 g 均匀的试样(精确到 0.01 g)于 50 ml 具塞离心管中,加入 2 g 碳酸钠和 2 g 无水硫酸钠,加入 15 ml 正己烷,均质提取 3 min,5 000 r/min 离心 3 min,将上层正己烷层转移至 100 ml 鸡心瓶中,残渣再用 15 ml 正己烷提取 1 次,合并正己烷提取液于鸡心瓶中,旋转蒸发浓缩至近干,待净化。

净化:用 5 ml 正己烷分次洗涤含有提取物的鸡心瓶,转移至 15 ml 离心管中,加入 5 ml 0.5 mol/L HCl,涡旋振荡 1 min,静置分层,弃去正己烷层,酸溶液中加入 1 ml 5 mol/L NaOH,使溶液呈碱性,加入 2 ml 正己烷,涡旋振荡 1 min,静置分层,转移正己烷层,水层溶液再用正己烷重复萃取两次,合并正己烷层,氮吹浓缩至干,加入 2 ml 甲醇溶解残渣,0.22 μm 微孔滤膜过滤,供液相色谱仪测定。

1.2.2 标准溶液的配制

准确称取 10 mg(精确到 0.1 mg)乙氧基喹标准品于 100 ml 容量瓶中,用正己烷溶解并定容至刻度,配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备液,-18 °C 下避光保存,临用时用甲醇稀释得到系列标准溶液。

1.2.3 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C18 柱(150 mm \times 4.6 mm,5 μm),以甲醇-水为流动相进行线性梯度洗脱(见表 1),流速 1.0 ml/min,进样量 20 μl ;荧光检测器激发波长 365 nm,发射波长 425 nm。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution of liquid chromatography

时间/min	水/%	甲醇/%
0	80	20
5	50	50
10	30	70
20	17	83
20.1	80	20
30	80	20

2 结果与分析

2.1 样品提取与净化条件的选择

2.1.1 提取方法的选择

乙氧基喹属于弱极性化合物,不溶于水,易溶于有机溶剂,其化学结构中含有喹啉环,喹啉环上的仲胺具有一定的接受质子能力,属于一种弱的有机碱,容易以离子态存在,在使用有机溶剂进行提取时加入碱性溶液抑制乙氧基喹结构中仲胺的离子化可大大提高提取效率^[4]。因此,结合相关文献^[3-4],并考虑到水的存在会影响后续浓缩,本研究选择加入碳酸钠固体,同时加入无水硫酸钠以除去食品基质中的水分。另外,由于采用正己烷的提取效率最高^[4],因此本研究选择正己烷作为提取溶剂。

2.1.2 净化方法的优化

根据文献[4]报道,乙氧基喹具有如下性质:在碱性条件下,乙氧基喹的离子化得到抑制,易溶于正己烷等非极性溶剂;在酸性条件下,乙氧基喹被离子化而溶于水溶液。因此,本研究先向正己烷提取液中加入 HCl,使乙氧基喹离子化进入酸性水层,弃去正己烷层,此时溶于正己烷的杂质被去除,再向酸性水溶液中加入 NaOH 调节 pH = 13 ~ 14,抑制乙氧基喹的离子化,再加入正己烷萃取碱性水溶液中的乙氧基喹,通过不断转化乙氧基喹的存在形态达到净化目的。本研究对 HCl 和 NaOH 的浓度及用量、正己烷提取次数进行了优化,从表 2 可以看出,乙氧基喹在水相中的分配比随着盐酸浓度的增大而增大,当 HCl 浓度大于 0.5 mol/L 时,乙氧基喹在水相中的浓度变化不再有太大的变化,因此确定 HCl 浓度为 0.5 mol/L。根据 HCl 浓度及用量,加入 1 ml 5 mol/L NaOH 中和 HCl 使溶液呈碱性,再用 2 ml 正己烷萃取其中的乙氧基喹,萃取 1 次,2 次,3 次的回收率分别为 70%、90% 和 100%。因此确定正己烷萃取次数为 3 次,每次 2 ml。

2.2 色谱分离条件的建立

2.2.1 流动相体系的优化

本研究采用常见的甲醇-水作为流动相,对梯度洗脱程序进行了优化(见表 1)。此外,试验发现目

表2 HCl浓度对乙氧基喹在水相和正己烷相中分配的影响
Table 2 The influence of concentration of hydrochloric acid for distribution of ethoxyquin in water and n-hexane

HCl浓度/(mol/L)	正己烷相中分配比例/%	水相中分配比例/%
0.05	29.4	70.6
0.1	17.1	82.9
0.2	8.9	91.1
0.3	5.3	94.7
0.5	0.5	99.5
1	1	99.0
2	0.4	99.6
3	0.1	99.9
4	0.5	99.5

标物在16 min左右出峰,在其附近基本没有干扰物质,杂质主要集中在20~30 min出峰,因此为了在连续进样时不影响下一个样品的分析,只采集0~20 min谱图,20 min以后切换流动相为初始比例,继续洗脱10 min,使杂质完全流出。

2.2.2 检测波长的选择

已有研究选择365 nm为乙氧基喹的激发波长^[3,8],而检测波长不尽一致。因此,本研究采用365 nm作为激发波长,并对检测波长进行了优化。根据乙氧基喹在不同检测波长下的荧光强度值,确定出最佳检测波长为425 nm。

2.3 线性范围、检出限及定量限的考察

取不同浓度的标准溶液分别进样,以峰面积对浓度作线性回归。结果表明,乙氧基喹浓度在

0.05~10 mg/L间,标准曲线线性关系良好, $r = 0.999 2 (n = 5)$ 。根据0.05 mg/L标准溶液的谱图信号,以3倍信噪比对应的浓度作为检出限,10倍信噪比对应的浓度作为定量限,得到检出限为7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与丁涛等人^[4]的报道结果一致。

2.4 方法的准确度和精密度

通过在不含分析物本底的基质中添加乙氧基喹标准品,测定回收率和RSD考察方法的准确度和精密度。根据不同基质中乙氧基喹的限量要求,对猪肉、猪肝、虾肉、鸡蛋、梨、西红柿、大白菜、辣椒粉8种基质分别添加3个浓度水平测定回收率,每一样品重复测定8次,添加水平及平均回收率、RSD值的测定结果见表3,典型空白基质和空白基质添加最低浓度(0.05 mg/kg)乙氧基喹的色谱图见图1、2。测定结果表明,本方法的平均回收率为80.5%~95.9%,RSD为3.1%~11.5%。从图1、2可以看出,在本研究测定条件下,基质中基本没有杂质在乙氧基喹的保留时间附近出峰干扰测定,测定结果准确可靠。

3 小结

本研究建立了适用于水果、蔬菜、调味料(辣椒粉)、畜肉、水产品、禽蛋等多种基质中乙氧基喹残

表3 不同食品基质中乙氧基喹的回收率和RSD值测定结果($n = 8$)

Table 3 Results of recovery and RSD for ethoxyquin in varied food matrixes

基质	添加水平/ (mg/kg)	测定值/(mg/kg)								平均回收率/ %	RSD/ %
		1	2	3	4	5	6	7	8		
猪肉	0.05	0.0425	0.0428	0.0405	0.0501	0.0437	0.0387	0.0389	0.0515	87.2	11.0
	0.5	0.4325	0.4730	0.5280	0.4325	0.5260	0.4345	0.4500	0.4010	91.9	10.0
	1	1.0310	0.9500	0.8250	0.9300	0.8690	0.8810	0.9000	0.9500	91.7	6.9
虾肉	0.05	0.0438	0.0426	0.0410	0.0382	0.0438	0.0383	0.0424	0.0444	83.6	5.8
	0.1	0.0880	0.0866	0.0967	0.0810	0.0962	0.0846	0.0890	0.0895	89.0	6.0
	0.2	0.2032	0.1632	0.1770	0.1742	0.1988	0.1692	0.1784	0.1644	89.3	8.4
猪肝	0.05	0.0435	0.0393	0.0402	0.0515	0.0412	0.0427	0.0398	0.0516	87.4	11.5
	0.1	0.0918	0.0823	0.0934	0.0821	0.0846	0.0820	0.0909	0.0873	86.8	5.4
	0.2	0.1850	0.1726	0.1762	0.1870	0.1958	0.1776	0.1926	0.1626	90.6	6.1
鸡蛋	0.05	0.0433	0.0398	0.0394	0.0468	0.0442	0.0404	0.0460	0.0382	84.5	7.6
	0.5	0.4640	0.4040	0.4125	0.4570	0.4370	0.4540	0.4360	0.4175	87.1	5.1
	1	0.9520	0.8640	0.8670	0.8600	0.8520	0.8600	0.8620	0.8740	87.4	3.7
梨	0.05	0.0444	0.0363	0.0435	0.0456	0.0418	0.0392	0.0525	0.0426	86.4	11.1
	1	0.8610	1.0210	1.0020	0.8640	0.8180	0.8350	0.8220	0.8790	88.8	8.9
	3	2.7180	3.0300	2.9640	2.5890	2.7600	2.8290	2.7000	2.7570	93.1	5.2
西红柿	0.05	0.0393	0.0406	0.0412	0.0429	0.0487	0.0397	0.0515	0.0382	85.5	11.2
	0.1	0.0888	0.0944	0.0908	0.0930	0.0963	0.0844	0.0875	0.0904	90.7	4.2
	0.2	0.1708	0.1682	0.1662	0.1730	0.1628	0.1750	0.1602	0.1890	85.3	5.2
大白菜	0.05	0.0391	0.0432	0.0378	0.0401	0.0402	0.0399	0.0434	0.0385	80.5	5.1
	0.1	0.0861	0.0842	0.0897	0.0860	0.0807	0.0833	0.0817	0.0883	85.0	3.7
	0.2	0.1772	0.1970	0.2062	0.1664	0.1916	0.1830	0.1702	0.1816	92.1	7.3
辣椒粉	0.05	0.0402	0.0400	0.0475	0.0437	0.0414	0.0401	0.0358	0.0419	82.6	8.2
	100	94.9000	91.3000	91.8000	88.8000	86.0000	90.5000	92.7000	88.5000	90.6	3.1
	200	198.8000	205.0000	178.6000	196.2000	187.0000	195.8000	179.8000	192.6000	95.9	4.8

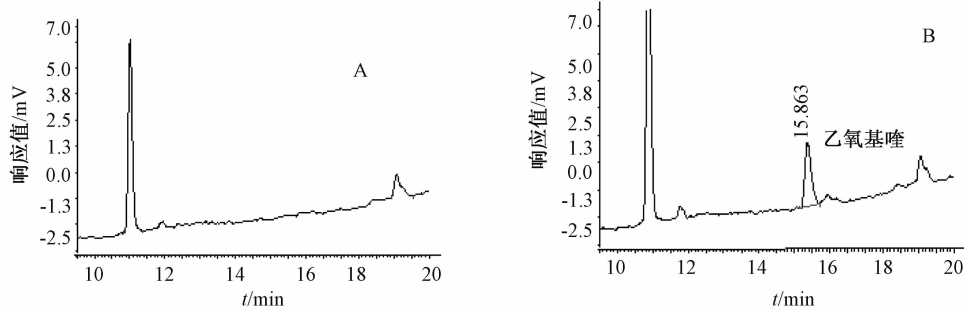


图1 空白猪肝(A)和空白猪肝添加0.05 mg/kg 乙氧基喹(B)的色谱图

Figure 1 Chromatogram of ethoxyquin for pig liver sample(A) and pig liver sample spiked with 0.05 mg/kg(B)

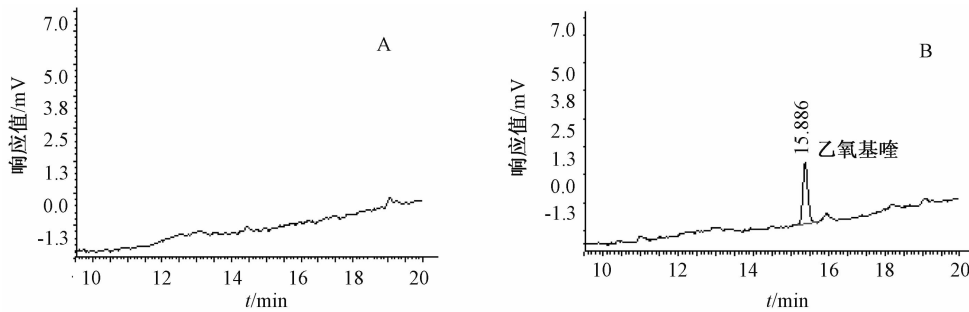


图2 空白大白菜(A)和空白大白菜添加0.05 mg/kg 乙氧基喹(B)的色谱图

Figure 2 Chromatogram of ethoxyquin for cabbage sample(A) and cabbage sample spiked with 0.05 mg/kg(B)

留量的液相色谱-荧光检测器检测方法,本方法实用性强、可操作性好、仪器设备简单,可用于实际工作中对多种食品的乙氧基喹残留量的测定。

参考文献

- [1] 国家质量监督检验检疫总局标准法规研究中心. 食品安全网:食品添加剂限量查询[EB/OL]. 北京:国家质量监督检验检疫总局标准法规研究中心[2013-07-16]. <http://www.tbtsps.gov.cn/foodsafe/xlbz/Pages/foodadditive.aspx>.
- [2] 刘素云,马东霞,郭文林,等. 乙氧基喹在鸡体中的残留测定[J]. 中国饲料,1998(4):11.
- [3] 颜鸿飞,欧阳振中,蔡婧怡,等. 肉类食品中乙氧喹残留的液相色谱检测及质谱确证[J]. 食品与机械,2012,85(5):83-86.
- [4] 丁涛,沈崇钰,蒋原,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水果中乙氧基喹残留[J]. 质谱学报,2009,30(5):307-310.
- [5] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.129—2003 水果中乙氧基喹残留量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [6] Yolanda P, Marinel la F, Carla S, et al. Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry: imazalil as a case study of quantification[J]. J. Chromatogr. A, 2007, 1176(1-2):123-134.
- [7] 杨涛,张煌涛,李明,等. 高效液相色谱法同时测定果蔬中6种防腐杀菌剂[J]. 分析实验室,2008,27(增刊):247-249.
- [8] Villar-Pulido M, Gilbert-López B, García-Reyes J F, et al. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. Talanta, 2011, 85(3):1419-1427.
- [9] Viñas P, Hernández Córdoba M, Sánchez-Pedreño C. Determination of ethoxyquin in paprika by high-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 1991, 42(3):241-251.
- [10] Olek M, Declercq B, Caboche M, et al. Application of electrochemical detection to the determination of ethoxyquin residues by high-performance liquid chromatography[J]. J. Chromatogr. A, 1983, 281:309-313.

· 公告 ·

婴幼儿配方乳粉反式脂肪酸含量符合国家标准

近几年来,国家食品安全监管部门一直把婴幼儿配方乳粉作为食品安全风险监测和风险排查的重点产品,共监测15 007个婴幼儿配方乳粉样品,其中对10 187个样品开展了总脂肪酸和反式脂肪酸的监测。监测结果表明,国产婴幼儿配方乳粉中反式脂肪酸的检测值为0.019 g~0.574 g/100 g,反式脂肪酸最高含量均不超过总脂肪酸的3%,符合《食品安全国家标准 婴幼儿配方食品》(GB 10765—2010)、《食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》(GB 10767—2010)和国际食品法典委员会《婴幼儿配方食品》(CODEX STAN 72—1981)标准的规定。同时,对197个进口婴幼儿配方乳粉样品开展了检测,经检测所有样品均含有反式脂肪酸,检测值为0.024 g~0.367 g/100 g。

国家食品药品监督管理总局
二〇一三年七月九日