

高效液相色谱法同时测定肉制品中的6种食品添加剂

李秀琴*, 张庆合, 杨 总

(中国计量科学研究院, 北京 100013)

摘要:建立了同时测定肉制品中化学性质差异较大的6种常用食品添加剂的高效液相色谱(HPLC)分析方法。根据6种添加剂(苯甲酸(钠)、山梨酸(钾)、糖精钠、安赛蜜、诱惑红和胭脂红)的化学性质,对HPLC分析条件进行了详细的优化。结果表明:以ZORBAX Eclipse Plus C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)为分析柱,以甲醇和20 mmol/L醋酸铵溶液(pH为6.9)为流动相进行梯度洗脱,在235 nm波长下进行检测,可以在18 min内完成6种添加剂的同时测定。在高、低两个加标浓度下,样品的回收率为80.7%~94.4%,相对标准偏差($n=3$)为2.0%~7.1%。结果表明,该方法快速、准确,能够同时分析测定肉制品中上述6种食品添加剂。

关键词:高效液相色谱法;食品添加剂;防腐剂;甜味剂;着色剂;肉制品

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)12-1204-05

Simultaneous determination of six food additives in meat products by high performance liquid chromatography

LI Xiuqin*, ZHANG Qinghe, YANG Zong

(National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

Abstract: A novel method was proposed for the simultaneous separation and determination of six food additives, benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium, acesulfame potassium, ponceau 4R and allura red AC, by high performance liquid chromatography (HPLC). After optimized the separation conditions of HPLC, the separation can be completed within 18 min by using a ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 20 mmol/L ammonium acetate (pH 6.9) and methanol as the mobile phases. The gradient elution was performed by 8% methanol (0–2 min), 8%–50% methanol (2–3 min), 50% methanol (3–9 min), 50%–8% methanol (9–12 min) and 8% methanol (12–18 min). The detection wavelength was set at 235 nm. This method has been successfully applied to the analysis of meat products and the average recoveries ranged from 80.7% to 94.4% at high and low spiked levels. The relative standard deviations (RSDs, $n=3$) were between 2.0% and 7.1%. The method is simple, rapid, accurate and suitable for the simultaneous determination of the six food additives in meat products.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); food additives; preservatives; sweeteners; colorants; meat products

随着食品工业的飞速发展,食品添加剂已经成为食品加工过程中不可或缺的配料,其中以防腐剂、甜味剂和着色剂等食品添加剂的使用最为广泛。在我国2007年新发布的国家标准《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760-2007)^[1]中明确规定了各类肉制品中允许使用的食品添加剂种类和使用限量,其中

苯甲酸、糖精钠、安赛蜜不允许在肉制品中使用,而人工合成色素胭脂红和诱惑红仅允许在可食用动物肠衣中添加使用。目前,虽然有文献报道可以对多种食品添加剂进行同时分析测定,但多为对防腐剂、着色剂和甜味剂中的1到2类添加剂进行检测^[2-10]。本研究分别选择几种较为常用、较易滥用

* 通讯联系人:李秀琴,博士,副研究员,研究方向为食品安全。Tel: (010) 64279562, E-mail: lxqjpx@gmail.com.

基金项目:中国计量科学研究院基本业务费项目(课题编号 21-AKY0921)。

收稿日期:2010-08-19

的添加剂,即苯甲酸(钠)(BA)、山梨酸(钾)(SOR)(防腐剂),诱惑红(YHH)、胭脂红(YZH)(着色剂),糖精钠(SA)和安赛蜜(AK)(甜味剂)作为研究目标,以人们较为关注、基体较为复杂的肉制品为研究基体进行了方法的开发。这 6 种添加剂的化学性质差异较大,受影响的测定因素(比如 pH 值、溶解样品的溶剂种类等)较多,目前尚未见肉制品中同时测定该 6 种添加剂的文献报道。本文结合文献报道^[2-10]和相关国家标准^[11-14],对苯甲酸、山梨酸、诱惑红、胭脂红、糖精钠和安赛蜜这 6 种食品添加剂的 HPLC 分析条件进行了详细的考察和优化,建立了一种快速、可靠的同时测定肉制品中 6 种食品添加剂的 HPLC 分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SHIMADZU LC-20AT 高效液相色谱仪,配 SPD-M20A 二极管阵列检测器,日本岛津公司;Sigma 3k30 离心机,德国 Sigma 公司;Vortex-2 Genie 涡旋振荡器,美国 Scientific Industries 公司;KS 260 圆周式震荡摇床,德国 IKA 公司;OASIS MCX 固相萃取柱(6 mL, 150 mg),美国 Waters 公司。

甲醇、乙醇(色谱纯,德国 Merck 公司);实验用水为 Milli-Q 系统制纯水;标准品安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠(纯度 > 99%)、胭脂红(纯度 99.0%)、诱惑红(纯度 99.0%)由中国计量科学研究院提供。

火腿样品均购自超市。

1.2 标准溶液的制备

分别准确称取 0.05 g 安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠、胭脂红、诱惑红 6 种标准品,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇-水(1:4, v/v)溶液定容到刻度,超声混匀,配制成 6 种添加剂的标准储备溶液。

准确量取安赛蜜、山梨酸、糖精钠标准储备溶液各 5 mL,苯甲酸标准储备溶液 3 mL,胭脂红和诱惑红标准储备溶液 2.5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇-水(1:4, v/v)溶液定容到刻度,配制成 6 种标准品的混合储备液。

1.3 样品的制备

1.3.1 样品提取

样品用液氮冷冻粉碎,密封袋置于 4 °C 下保存。称取 2.5 g 粉碎样品至 50 mL 离心管中,加入温水 15 mL,1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,涡旋 30 s,使样品和提取溶剂充分混匀。振荡提取 20 min,超声提取 20 min,于 5 000 r/min 下离心 10 min,转移上清液至 50 mL 离心管中。剩余残渣重复此操作一

次。合并提取液,并用盐酸调 pH 至中性。提取液中依次加入 220 g/L 硫酸锌、106 g/L 亚铁氰化钾各 2.5 mL,剧烈振摇 2 min,沉淀蛋白^[3,5,10,13,14]。于 5 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,转移上清液至 50 mL 离心管中。

在剩余残渣中加入 15 mL 乙醇-氨水-水(7:2:1, v/v/v)溶液,再加入 10 mL 正己烷,涡旋 30 s,振荡提取 20 min,超声提取 20 min,于 5 000 r/min 下离心 10 min,弃去正己烷层,乙醇氨水溶液转移至 50 mL 离心管中,同样方法提取 2 次,直至提取液接近无色。合并提取液,用盐酸调 pH 至中性。于 45 °C 下旋转蒸发挥去乙醇,浓缩至约 10 mL,提取液中依次加入 220 g/L 硫酸锌、106 g/L 亚铁氰化钾各 1.5 mL,剧烈振摇 2 min,沉淀蛋白^[2,4,11,12]。于 5 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,上清液合并转移至 50 mL 离心管瓶中,用水定容至 50 mL,待净化。

1.3.2 样品净化^[9]

准确量取 5.0 mL 提取液至固相萃取柱 OASIS-WAX(6 mL, 150 mg, 30 μm, 预先依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化)中,分别用 5 mL 2% 甲酸水溶液和 5 mL 水淋洗,最后用 5 mL 氯化甲醇溶液(氨水-甲醇(5:95, v/v))洗脱,抽至近干。整个固相萃取过程流速不超过 1 mL/min。洗脱液于 50 °C 下用氮气吹干,残留物用甲醇-20 mmol/L 醋酸铵溶液(1:4, v/v)溶液分两次转移至 5 mL 容量瓶中并定容,摇匀备用。取 2 mL 样品提取液,于 10 000 r/min 下离心 2 min,取上清液供 HPLC 测定。

1.4 HPLC 条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温为 30 °C;流动相:A 相为甲醇,B 相为 20 mmol/L 醋酸铵水溶液(pH 6.9);流速为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL;检测波长为 235 nm;流动相梯度洗脱程序:8% A 保持 2 min,1 min 内 A 相升至 50% 并保持 6 min,3 min 内 A 相降至 8% 并保持 6 min,整个分析时间为 18 min。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

HPLC 分析中,色谱柱的选择非常关键。由于不同品牌色谱柱的制备原料、工艺、表面处理和键合方式等各不相同,常常会导致分离性能存在一定的差异,对个别化合物可能存在明显的差异。因此,本文选择实验室现有的 4 种色谱柱进行分离效果比较研

究 4 种色谱柱包括(1)Capcell Pak C₁₈ MG II 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);(2)Sun Fire C₁₈ 柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm);(3)ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm);(4)ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。从实验结果可以看出,1 号色谱柱对山梨酸和糖精钠的分离效果较差,并且出现峰拖尾现象;2 号色谱柱上安赛蜜保留时间较短,在死时间附近出峰;3 号色谱柱上安赛蜜、苯甲酸、山梨酸 3 个化合物均在 3 min 内出峰,不适合对实际样品进行分析;4 号色谱柱对 6 种物质分离效果最好,标准溶液的色谱图见图 1。综合考虑保留时间、分离效果和柱效等因素,最后选择 4 号 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱作为实验分离所用色谱柱。

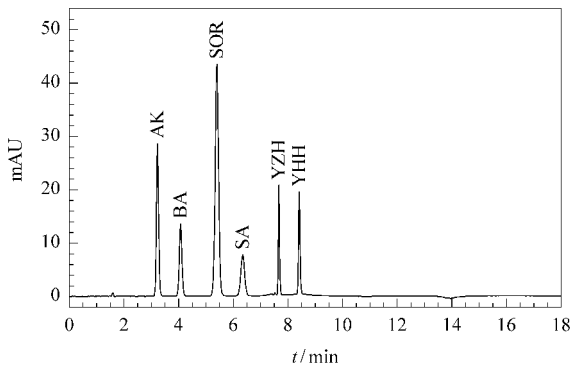


图 1 6 种食品添加剂混合标准溶液的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of a mixed standard solution of six food additives

AK: acesulfame potassium; BA: benzoic acid; SOR: sorbic acid; SA: saccharin sodium; YZH: ponceau 4R; YHH: allura red AC.

2.1.2 流动相 pH 值的选择

实验考察了流动相 pH 值在 4.0 ~ 6.9 范围内(用乙酸调节 pH 值)6 种食品添加剂在色谱柱上的保留行为(见图 2)。由图 2 可知,糖精钠、安赛蜜、胭脂红和诱惑红的保留几乎不受 pH 值变化的影响,而苯甲酸和山梨酸则随着 pH 值的升高而保留变弱。这主要是由于苯甲酸和山梨酸的 pK_a 值分别为 4.19 和 4.76,在中性条件下两者均以阴离子的形式存在,与固定相之间的相互作用较弱。随着 pH 值的降低,两者以中性分子形式存在的比例越来越大,在色谱柱上的保留也越来越强,所以流动相的 pH 值对这两个化合物在色谱柱上的保留影响较大。而糖精钠、安赛蜜、胭脂红和诱惑红均易溶于水,在水溶液中可能均以阴离子的形式存在,因此流动相 pH 值的变化不会影响其存在形式,也不会影响它们在色谱柱上的保留。综上所述,考虑到分析时间和

分离效果的综合因素,最终选择流动相的 pH 为 6.9。

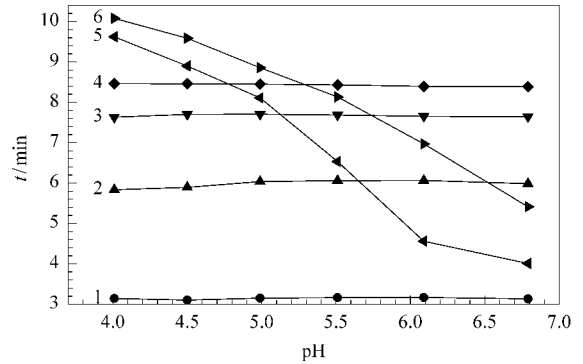


图 2 流动相中缓冲溶液的 pH 值对分析物保留时间的影响
Fig. 2 Effect of pH value of buffer in the mobile phase on the retention time of analytes

1. AK; 2. SA; 3. YZH; 4. YHH; 5. BA; 6. SOR.

由于 6 种食品添加剂在色谱柱上的保留行为相差较大,难以通过等度洗脱实现快速分离,因此选择梯度洗脱。在选定甲醇(A)和 20 mmol/L 醋酸铵(B)溶液为流动相的条件下,考察了 5 种梯度洗脱程序下 6 种食品添加剂的分离情况。5 种梯度洗脱程序分别为(1)8% A 保持 1 min, 2 min 内 A 相升至 50% 并保持 7 min, 2 min 内 A 相降至 8% 并保持 8 min, 整个分析时间为 20 min。(2)8% A 保持 3 min, 2 min 内 A 相升至 50% 并保持 4 min, 1 min 内 A 相降至 8% 并保持 5 min, 整个分析时间为 15 min。(3)8% A 保持 3 min, 12 min 内 A 相升至 50% 后不保持, 1 min 内 A 相降至 8% 并保持 9 min, 整个分析时间为 25 min。(4)8% A 保持 2 min, 1 min 内 A 相升至 50% 并保持 6 min, 3 min 内 A 相降至 8% 并保持 4 min, 整个分析时间为 16 min。(5)8% A 保持 2 min, 1 min 内 A 相升至 50% 并保持 6 min, 3 min 内 A 相降至 8% 并保持 6 min, 整个分析时间为 18 min。实验结果表明:程序(1)基线不稳,原因可能是在前 10 min 的梯度变化过快,到 10 min 时系统才平衡。因此将梯度变化速度减缓,设计了程序(2)。在程序(2)下进行分析,但糖精钠和山梨酸的分离度较差,且在该条件下随着样品浓度的增大,山梨酸与糖精钠的分离度越来越差。为了使山梨酸和糖精钠的分离度增大,进一步变化梯度条件,设计了程序(3)。在程序(3)下进行分析,山梨酸和糖精钠得到了良好的分离,但胭脂红、诱惑红出峰时间较晚,分析时间较长,不利于快速分析。为了缩短分析时间,进一步优化洗脱条件,设计了程序(4)。在程序(4)下进行分析,6 种分析物的分离效果均较好,但是经过多次重复试验发现,

糖精钠的保留时间在 6.0 ~ 6.9 min 之间不稳定,查找原因发现是在前一针分析完毕进行下一针进样时,柱压并没有回到起始时的柱压,说明色谱柱还未完全平衡,需延长分析结束后的平衡时间,故设计了程序(5)。在程序(5)下进行分析,最后分析时间为 18 min,此时糖精钠的保留时间稳定在 6.3 min。本文最终以程序(5)为实验所采用的梯度洗脱程序。

2.1.3 样品溶剂的选择

溶剂对样品的溶解性以及保存时间是样品溶剂选择的关键。本实验分别选择甲醇、水、甲醇-水(1:4, v/v)和甲醇-20 mmol/L 醋酸铵溶液(1:4, v/v) 4 种溶剂系统溶解样品,通过比较 6 种分析物的保留时间和响应值以及峰形优劣来选择合适的溶剂。结果表明,用甲醇作溶剂时,安赛蜜和糖精钠的色谱峰出现分叉,并伴有前延现象,而以水作溶剂时安赛蜜和糖精钠的色谱峰不出现上述现象(见图 3)。甲醇-水(1:4, v/v)和甲醇-20 mmol/L 醋酸铵溶液(1:4, v/v)作溶剂时与水作溶剂时没有显著差异。考虑到 6 种分析物不同的溶解特性,且水中加入一定量的甲醇有利于溶液的长期保存,所以本实验选择甲醇-水(1:4, v/v)作为配制标准溶液的溶剂,而样品的稀释溶液则采用甲醇-20 mmol/L 醋酸铵溶液(1:4, v/v)。

2.1.4 检测波长的选择

本文采用光电二极管阵列检测器,在 195 ~ 700 nm 范围内对所有分析物进行紫外波长扫描。结果发现,在实验条件下,安赛蜜的吸收波长范围是 210 ~ 280 nm,最大吸收波长为 226 nm;糖精钠的吸收波长范围是 245 ~ 318 nm,最大吸收波长为 267 nm;苯甲酸的吸收波长范围是 213 ~ 288 nm,最大吸收波长为 224 nm;山梨酸的吸收波长范围是 215 ~ 315 nm,最大吸收波长为 254 nm;胭脂红的吸收波长范围是 206 ~ 239 nm,最大吸收波长为 218 nm;诱惑红的吸收波长范围是 204 ~ 292 nm,最大吸收波长为 236 nm。胭脂红和诱惑红在可见波长区有特征吸收,但是兼顾其他 4 种化合物,所以不采用它们的可见吸收波长作为检测波长。由于流动相

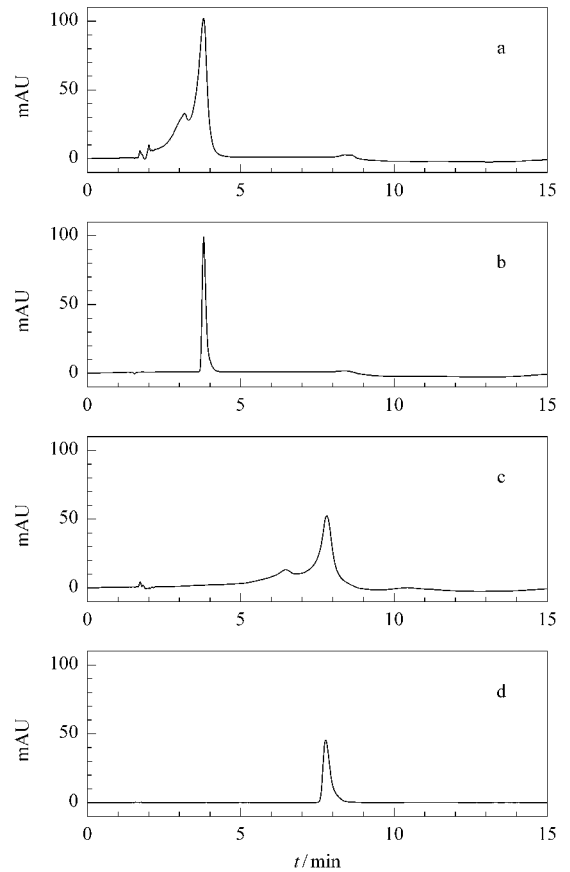


图 3 不同溶剂中安赛蜜和糖精钠的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of acesulfame potassium and saccharin sodium in different solvents

a. AK in methanol; b. AK in water; c. SA in methanol; d. SA in water.

在 200 nm 波长下背景的紫外吸收较高,又要保证每种分析物的测定灵敏度尽可能大,因此最终采用 235 nm 作为检测波长进行分析。

2.2 检出限、定量限和线性关系

取适当的 6 种标准物的储备液(1.0 mg/mL),配制成系列混合标准溶液,质量浓度分别为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、2.0、10.0、20.0、100.0、200.0 mg/L。以 3 倍信噪比($S/N = 3$)计算各化合物的检出限,以 10 倍信噪比($S/N = 10$)计算各化合物的定量限,各添加剂的检出限、定量限、线性范围和相关系数见表 1。

表 1 6 种食品添加剂的线性范围、线性方程、检出限和定量限

Table 1 Linear ranges, linear equations, detection limits and quantitation limits of six food additives

Food additive	Linear range/(mg/L)	Linear equation	r^2	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
Acesulfame potassium	0.010 - 100	$y = 13246x + 235.6$	0.9994	0.005	0.010
Benzoic acid	0.038 - 100	$y = 12376x + 190.3$	0.9991	0.008	0.038
Sorbic acid	0.010 - 100	$y = 37955x + 594.3$	0.9994	0.005	0.010
Saccharin sodium	0.103 - 100	$y = 7988x - 3342.4$	0.9999	0.052	0.103
Ponceau 4R	0.050 - 100	$y = 13149x - 2877.7$	1	0.025	0.051
Allura red AC	0.050 - 100	$y = 15853x - 2214.3$	1	0.025	0.051

y : peak area; x : mass concentration of the analyte, mg/L.

2.3 精密度与回收率实验

准确称取同一份粉碎好的火腿样品 6 份,每份 2.5 g。分别加入高、低两个浓度的混合标准溶液,按照建立的方法进行样品前处理与测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 6 种食品添加剂的加标回收率($n=3$)
Table 2 Recoveries of six food additives spiked in a sample ($n=3$)

Food additive	Spiked/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
Acesulfame potassium	24.5	92.4	4.1
	12.2	90.3	4.9
Benzoic acid	15.0	93.6	3.8
	7.5	94.4	3.2
Sorbic acid	75.0	87.5	2.0
	37.5	80.7	3.7
Saccharin sodium	20.2	91.4	5.2
	10.1	91.1	6.0
Ponceau 4R	50.1	88.4	5.1
	25.0	84.7	7.1
Allura red AC	15.2	90.8	4.7
	7.6	92.4	6.2

2.4 实际样品的测定

按建立的方法对火腿样品中的安赛蜜、糖精钠、山梨酸、苯甲酸、胭脂红和诱惑红 6 种添加剂进行测定。所检样品中未检出安赛蜜、糖精钠、胭脂红和苯甲酸,只检出少量的山梨酸和诱惑红,其含量均符合 GB 2760-2007 的规定。

3 结语

对食品加工过程中常用的 6 种食品添加剂山梨酸、苯甲酸、安赛蜜、糖精钠、胭脂红和诱惑红的高

效液相色谱分析方法进行了较为系统的研究,主要对色谱柱、流动相 pH 值、梯度洗脱程序及检测波长等条件进行了详细的优化,利用甲醇-醋酸铵缓冲盐系统,采用梯度洗脱的方式实现了 6 种食品添加剂的同时测定。该方法快速、准确,适合肉制品中食品添加剂的检测。

参考文献:

- [1] GB 2760-2007
- [2] Chen Q C, Yu W L, Wang J. Chinese Journal of Chromatography (陈青川, 于文莲, 王静. 色谱), 2001, 19(2): 105
- [3] Chen Q C, Mou S F, Liu K N, et al. J Chromatogr A, 1997, 771: 135
- [4] Li Y, Wu X X. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (李颖, 吴雪祥. 中国卫生检验杂志), 2005, 15(9): 1093
- [5] Chen Y, Li X G. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (陈妍, 李兴根. 理化检验: 化学分册), 2008, 44(Suppl): 191
- [6] Wang H M, Guo W, Wang J P, et al. Food Research and Development (王红梅, 郭伟, 王继鹏, 等. 食品研究与开发), 2007, 28(6): 106
- [7] Ni Z N, Wang T J, Wu R J. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (倪竹南, 王天娇, 吴人杰. 中国卫生检验杂志), 2009, 19(2): 292
- [8] Wen H. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (文红. 理化检验: 化学分册), 2006, 42(4): 293
- [9] Yang D J, Chen B. J Agric Food Chem, 2009, 57: 3022
- [10] Chen F H, Wu G B, Lin H L, et al. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (陈发河, 吴光斌, 林华玲, 等. 中国食品学报), 2006, 6(6): 126
- [11] GB/T 9695.6-2008
- [12] GB/T 5009.29-2003
- [13] GB/T 5009.141-2003
- [14] GB/T 5009.28-2003