

实验技术与方法

高效液相色谱法同时测定面制品中顺丁烯二酸和富马酸的含量

雍宗锋,曹慧,周新亚

(宿迁市疾病预防控制中心,江苏 宿迁 223800)

摘要:目的 建立用高效液相色谱法同时测定面制品中的顺丁烯二酸和富马酸含量。方法 样品经50 ml 10%甲醇-水萃取,离心后,水层过0.45 μm滤膜,经Waters Atlantis T3色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离,以0.1%磷酸-甲醇(95:5, V/V)作流动相,紫外检测器检测,波长210 nm。结果 在优化的试验条件下,顺丁烯二酸和富马酸的浓度在0.1~25 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程分别为 $y_{\text{顺丁烯二酸}} = 147008x - 1316.8$ ($r = 0.9995, n = 6$)和 $y_{\text{富马酸}} = 176689x - 670.1$ ($r = 0.9996, n = 6$),方法检出限均为2.0 mg/kg,回收率为86.88%~93.02%,相对标准偏差为0.67%~1.08%。结论 该方法简便、准确,可适用于面制品中顺丁烯二酸和富马酸的同时测定。

关键词:高效液相色谱法;面制品;顺丁烯二酸;富马酸;食品污染物;食品安全

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0769-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.017

Simultaneous determination of maleic acid and fumaric acid in flour products by high performance liquid chromatography method

YONG Zong-feng, CAO Hui, ZHOU Xin-ya

(Disease Control and Prevention Center of Suqian City, Jiangsu Suqian 223800, China)

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography method for the determination of maleic acid and fumaric acid in flour products. **Methods** The flour product samples were extracted with 50 ml of 10% methanol and water, then centrifuged and filtered with 0.45 μm membrane. Waters Atlantis T3 chromatographic column was used to separate the sample with 0.1% phosphoric acid and methyl alcohol (95:5, V/V) as the mobile phase. The samples were detected by UV-detector, the column temperature was 30 °C and the wavelength was 210 nm. **Results** Under the optimized experimental conditions, the calibration curve showed good linearity in the range of 0.1-25 μg/ml. The regression equation is $y = 147008x - 1316.8$ ($r = 0.9995, n = 6$) for maleic acid, $y = 176689x - 670.1$ ($r = 0.9996, n = 6$) for fumaric acid. The detection limit was 2.0 mg/kg with the recovery rate in the range of 86.88%-93.02%, and the relative standard deviation of method was 0.67%-1.08%. **Conclusion** The method was simple, accurate, and could be applied to the determination of maleic acid and fumaric acid in flour products.

Key words: High performance liquid chromatography; flour products; maleic acid; fumaric acid; food contaminant; food safety

丁烯二酸存在顺反异构体,反丁烯二酸又名富马酸(fumaric acid),是一种允许使用的食品添加剂,主要用作酸度调节剂和防腐剂,生湿面制品中最大允许使用量为0.6 g/kg。顺丁烯二酸(maleic acid)又名马来酸,是重要的工业原料,不是食品添加剂。中国台湾“毒淀粉”事件,即制造改性淀粉时使用顺丁烯二酸酐,顺丁烯二酸酐遇水水解生成顺丁烯二酸引起的残留。顺丁烯二酸酐加入淀粉后,可增加食物的弹性、黏性和外觀光亮度,增加食品

口感,但对人体肾脏造成损伤。目前,我国标准GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[1]没有将顺丁烯二酸列为食品添加剂。关于富马酸和马来酸的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2-8]、离子色谱法^[9-11]、毛细管电泳法^[12]、液相色谱-串联质谱法^[13-14],高效液相色谱法是有机酸分析中较成熟、常用的方法。面制品中顺丁烯二酸和富马酸的同时测定鲜见报道,因此,研究面制品中顺丁烯二酸和富马酸的测定具有重要意义。

收稿日期:2016-07-02

基金项目:江苏省预防医学研究课题(Y2015048)

作者简介:雍宗锋 男 副主任技师 研究方向为卫生理化检验

E-mail:sqcdc@qq.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Waters e-2695 高效液相色谱仪(配2998PDA紫

外检测器,美国 Waters)、电子天平、旋涡混合器、振荡培养箱、超声波洗涤器、台式离心机、艾科浦 U 系列纯化水机。

顺丁烯二酸标准品(46671,纯度 99.8%,北京迪马科技)、富马酸标准品(CDCT-C13955500,纯度 99.3%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH)、甲醇(HPLC 色谱纯)、85% 磷酸(优级纯)、超纯水(18.28 M Ω ·cm)、面制品(流动摊贩上购买)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

顺丁烯二酸标准储备溶液:精密称取 0.050 0 g 顺丁烯二酸,加超纯水溶解于 10 ml 容量瓶定容,得浓度为 5.0 mg/ml。

富马酸标准储备溶液:精密称取 0.050 0 g 富马酸,加 0.5 ml 甲醇溶解,再加入超纯水于 10 ml 容量瓶定容,得浓度为 5.0 mg/ml。

顺丁烯二酸和富马酸混合标准使用溶液:分别吸取 1.0 ml 顺丁烯二酸和富马酸标准储备溶液,加入超纯水于 100 ml 容量瓶定容,得浓度为 50 μ g/ml 的混合标准使用溶液。

1.2.2 样品处理

称取样品 2.5 g,于 50 ml 具塞聚四氟乙烯离心管中,加入 10% 甲醇溶液 50 ml,盖塞,涡旋 2 min,摇床振荡 20 min,超声 10 min,静置、冷却,10 000 r/min 离心 10 min。取水相 2 ml,用针筒式过滤器经 0.45 μ m 滤膜过滤,弃去初滤液 0.5 ml,取滤液 1.0 ml,待分析。

1.2.3 标准曲线的制备

移取顺丁烯二酸和富马酸混合标准使用液,用水稀释配制成 0.1、0.25、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、25.0 μ g/ml 的顺丁烯二酸和富马酸标准系列。在色谱条件下,分别取 20 μ l 进样分析,测定保留时间和峰面积,采用多点线性校正,以测得的峰面积及浓度绘制标准曲线。

1.2.4 仪器条件

色谱柱:Waters Atlantis T3 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相为 0.1% 磷酸-甲醇(95:5, V/V),流速 0.7 ml/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,紫外检测波长 210 nm,进样量 20 μ l。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的比较

试验中比较了 Waters Atlantis T3 纯水柱和 Waters sunfireTM C₁₈ 柱两种色谱柱,C₁₈ 柱适合分析非极性和中性样品,对极性很大的化合物保留不好;T3 纯水柱是改进后的超纯硅胶基质 C₁₈ 柱,适

合分析极性化合物,可以很好地分开顺丁烯二酸和富马酸等有机酸,所以选择 Waters Atlantis T3 纯水柱。

2.2 检测波长的选择

对 5.0 μ g/ml 顺丁烯二酸和富马酸标准溶液在二极管阵列紫外检测器上进行 190~400 nm 波长紫外扫描,发现在 (208.4 \pm 1) nm 波长处均具有最大紫外吸收峰,见图 1。考虑到 208 nm 基本接近末端吸收,因此,选择 210 nm 为检测波长。

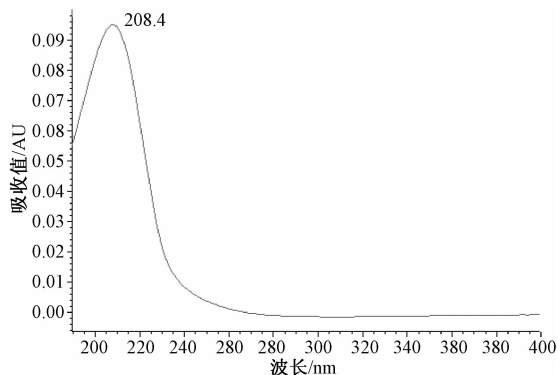
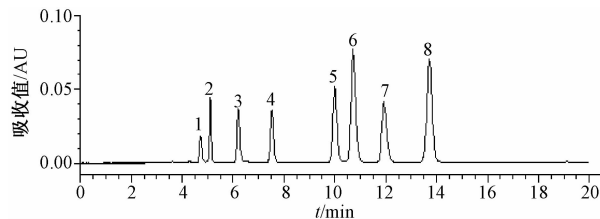


图 1 顺丁烯二酸和富马酸标准的紫外光谱图
Figure 1 Ultraviolet spectrogram of maleic acid and fumaric acid standard

2.3 流动相的选择

由于磷酸及其盐在紫外区基本无吸收,常被用作有机酸分析的流动相。比较了 0.1% HPO₃^[15]、KH₂PO₄-K₂HPO₄^[16]、(NH₄)₂HPO₄^[17] 作流动相时,顺丁烯二酸和富马酸与常见有机酸的分离情况,发现磷酸作流动相比较好。配制 0.01%、0.05%、0.1%、0.15% 的磷酸作流动相进行试验,发现随着磷酸浓度增大,8 种有机酸分离效果越好,色谱图见图 2。考虑到酸度过高会影响色谱柱的寿命,选择 0.1% HPO₃ 作为流动相。



注:1. 草酸;2. 酒石酸;3. 苹果酸;4. 乳酸;5. 顺丁烯二酸;
6. 柠檬酸;7. 丁二酸;8. 富马酸

图 2 5 μ g/ml 顺丁烯二酸和富马酸标准溶液与常见其他有机酸 HPLC 色谱图

Figure 2 HPLC chromatogram of standard solution of maleic acid and fumaric acid and other common organic acid

2.4 甲醇添加量的影响

比较添加 0%、1%、3%、5%、7%、10%、15%、20% 甲醇对峰形和保留时间的影响,结果发现随着

甲醇含量的增加,有机酸与固定相的相互作用减弱,保留时间缩短,分离度变差。不加甲醇时,峰有点拖尾,峰形不好,且分析时间较长。在流动相中加入甲醇可以有效改善峰形且能保护色谱柱,选择在 0.1% HPO₃ 中加入 5% 甲醇。

2.5 柱温的影响

以 0.1% 磷酸-甲醇(95:5, V/V) 为流动相,以 0.7 ml/min 的流速进样,在 25、30、37 °C 柱温下,结果发现:柱温升高,出峰提前,顺丁烯二酸的保留时间变化为 7.512、7.087、6.480 min,富马酸的保留时间变化为 10.564、9.687、8.665 min,柱压由 1.24 × 10⁷、1.36 × 10⁷、1.09 × 10⁷ Pa 逐步降低,综合考虑,采用室温下 30 °C 分析。

2.6 流速的影响

以 0.1% 磷酸-甲醇(95:5, V/V) 为流动相,柱温 30 °C,分别以 0.3、0.5、0.7、1.0、1.2 ml/min 的流速进样,结果发现流速升高,柱压逐步升高(3.93 × 10⁶、6.53 × 10⁶、8.98 × 10⁶、1.24 × 10⁷、1.55 × 10⁷ Pa),不利于色谱柱的保护和使用,流速过低分析时间较长(35、20、15、10、7 min),且峰型展宽,柱效变差,因此选择流速 0.7 ml/min。

2.7 线性范围和检出限

在本方法确定的试验条件下,以浓度(μg/ml) 为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线,以 3 倍信噪比(S/N=3) 计算检出限,顺丁烯二酸和富马酸的最低检出浓度均为 0.1 μg/ml,以样品取样量 2.5 g、萃取液体积 50 ml 计算,方法检出限均为 2.0 mg/kg,见表 1。

表 1 线性范围和检出限

Table 1 Linear range and detection limit

组分名	线性范围 (μg/ml)	回归方程	相关系数	检出限 (mg/kg)
顺丁烯二酸	0.1~25	y = 147008x - 1316.8	0.999 5	2.0
富马酸	0.1~25	y = 176689x - 670.1	0.999 6	2.0

2.8 回收率和精密度试验

取已知含量的面粉制品 3 份,然后分别加入 50 μg/ml 顺丁烯二酸和富马酸标准使用溶液 0.5、1.0、5.0 ml,按 1.2.2 样品处理操作,依法测定,每个添加水平重复测定 6 次,计算平均回收率,结果见表 2。RSD 分别为 0.67% ~ 1.08% 和 0.72% ~ 0.82% (n=6)。

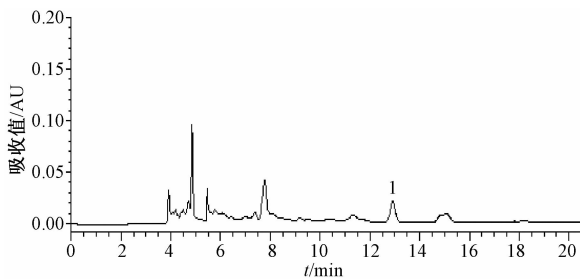
2.9 样品测定

采集宿迁市流动摊贩售卖面粉制品 30 份,分别按 1.2.2 方法处理样品,在 1.2.4 色谱条件下测定,外标法计算含量。结果发现:样品中均未检出顺丁烯二酸,富马酸的含量在 2 ~ 77 mg/kg 之间,见图 3、4。

表 2 样品加标回收率试验结果(n=6)

Table 2 Spiked recoveries and RSDs of the sample

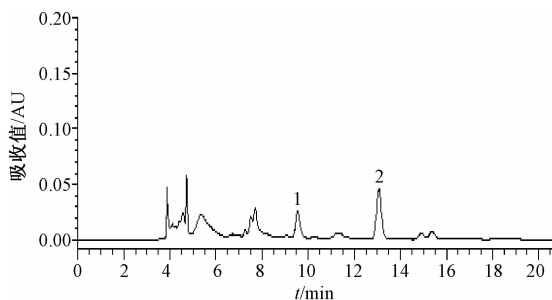
组分名称	本底值 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	平均回收率/%	RSD/%
顺丁烯二酸	0	25	21.78	87.12	1.08
	0	50	44.26	88.52	0.84
	0	250	232.55	93.02	0.67
富马酸	29.7	25	51.42	86.88	0.82
	29.7	50	74.33	89.26	0.77
	29.7	250	262.15	92.98	0.72



注:1. 富马酸;顺丁烯二酸未检出

图 3 面粉样品色谱图

Figure 3 Chromatogram of flour product sample



注:1. 顺丁烯二酸;2. 富马酸

图 4 面粉样品加标色谱图(20 mg/kg)

Figure 4 Chromatogram of flour product sample spiked (20 mg/kg)

3 小结

本方法使用 T3 纯水柱,以 0.1% 磷酸-甲醇(95:5, V/V) 为流动相,同时测定面粉及制品中顺丁烯二酸和富马酸,分离效果好,方法简便,抗干扰能力强,食品中常见的酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸等有机酸不干扰其测定。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

[2] 薛亮,黄亮. 高效液相色谱法检测淀粉及其制品中顺丁烯二酸[J]. 食品工业,2014,35(3):247-250.

[3] 王丹,吕冰,周爽,等. 高效液相色谱法检测淀粉及含淀粉食品中 6 种有机酸[J]. 中国食品添加剂,2014(2):108-113.

[4] 王丹,方从容,鲁杰,等. 淀粉类食品中顺丁烯二酸的高效液相色谱测定方法[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(14):

- 1977-1979,1983.
- [5] 王宏华,孙浩思,刘菲. 高效液相色谱法测定淀粉中的顺丁烯二酸[J]. 啤酒科技,2014(5):35-38.
- [6] 岳虹,赵贞,刘春霞,等. HPLC法测定发酵乳中顺丁烯二酸含量[J]. 饮料工业,2015,18(2):23-25.
- [7] 蒙泳,黎德勇,甘露,等. 高效液相色谱法测定淀粉中的顺丁烯二酸[J]. 洛阳理工学院学报(自然科学版),2012,22(2):1-4.
- [8] 李红艳,陈万勤,王瑾,等. 高效液相色谱法测定淀粉及淀粉制品中的顺丁烯二酸与顺丁烯二酸酐总含量[J]. 分析测试学报,2012,31(8):1013-1016.
- [9] 林高明,陈梅兰,胡忠阳,等. 离子色谱法测定淀粉中的顺丁烯二酸(酐)[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(5):668-669.
- [10] 王存进,杜晓磊. 离子色谱法测定乙醛酸中的顺丁烯二酸和乙二酸[J]. 化学分析计量,2013,22(2):94-96.
- [11] 朱晓玲,刘杰,严恒,等. 离子色谱法测定淀粉及淀粉制品中顺丁烯二酸[J]. 分析试验室,2013,32(12):109-111.
- [12] 杨若明,张经华,蓝叶芬. 毛细管电泳法对铝胁迫下小麦根部有机酸的直接测定[J]. 分析试验室,2005,24(3):16-18.
- [13] 徐敦明,陈燕,周爽,等. 液相色谱-串联质谱法测定淀粉及其制品中的顺丁烯二酸与顺丁烯二酸酐总含量[J]. 色谱,2013,31(12):1224-1227.
- [14] 孙兴权,曾明家,肖珊珊,等. 液相色谱-串联质谱法测定淀粉中顺丁烯二酸和顺丁烯二酸酐总量[C]//中国化学会第七届全国仪器分析及样品预处理学术研讨会论文集,烟台,2013. 北京:中国化学会出版,2013:190-194.
- [15] 中华人民共和国卫生部. GB 25544—2010 食品添加剂 DL-苹果酸[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23296. 21—2009 食品接触材料 高分子材料 食品模拟物中顺丁烯二酸及顺丁烯二酸酐的测定 高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [17] 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. 157—2003 食品中有机酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

实验技术与方法

液相色谱-串联质谱法检测塑料瓶装乳酸饮料中的双酚 A 含量

宁文吉¹, 马云杰², 陈秀雯¹, 李琰¹

(1. 上海市闵行区疾病预防控制中心, 上海 201101; 2. 洋山出入境检验检疫局, 上海 201306)

摘要:目的 探讨用液相色谱-串联质谱法检测瓶装乳酸饮料中双酚 A 的样品前处理及测定方法。方法 样品在碱性条件下沉淀蛋白质后,用固相萃取小柱提取,甲醇洗脱。样品经色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 5 μm)分离,以纯水-甲醇(40:60, V/V)为流动相分离。采用电喷雾电离负离子模式(ESI⁻),多反应监测(MRM),外标法定量分析。结果 该方法在 2.0 ~ 100.0 μg/L 范围内呈良好线性;仪器检出限 0.01 ng;当取样量为 10 g,方法检出限为 0.001 μg/kg;双酚 A 高、中、低加标浓度(80、50、10 μg/L)的平均回收率为 100.9% ~ 107.5%,变异系数为 6.2% ~ 7.6%。结论 该方法适用于塑料瓶装乳酸饮料中双酚 A 含量的测定,具有灵敏度高、前处理方法简单、可批量检测、检测速度快的特点,可推广检测食品样品中痕量双酚 A 含量。

关键词:液相色谱-串联质谱;瓶装乳酸饮料;双酚 A;前处理;检出限;回收率

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0772-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.018

Determination of BPA in plastic bottled lactic acid drinks using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

NING Wen-ji, MA Yun-jie, CHEN Xiu-wen, LI Yan

(Minhang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China)

Abstract: Objective Pretreatment for bisphenol A (BPA) in plastic bottled lactic acid drinks was discussed and a method for the determination of BPA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was established.

Methods Samples were protein precipitated under alkaline condition before solid phase extraction. The elution was separated by column with water and methanol as the mobile phase (volume ratio 40:60). LC-MS/MS ion electrospray

收稿日期:2016-08-31

基金项目:闵行区自然科学研究课题项目(2014MHZ034)

作者简介:宁文吉 女 副主任技师 研究方向为食品及环境卫生理化检验 E-mail:ningwenji@sohu.com