

实验技术与方法

超高效液相色谱法同时测定酱腌菜中的7种防腐剂与2种甜味剂

董桂贤,王朝霞,张桂芳,王颖,张晓瑜,王曰雷,杨翠云
(山东省烟台市疾病预防控制中心,山东烟台 264003)

摘要:目的 建立采用超高效液相色谱(UPLC)-二极管阵列检测器(PDA)同时快速检测酱腌菜中7种防腐剂(山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯)和2种甜味剂(糖精钠、安赛蜜)的方法。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m),流动相为甲醇+0.02 mol/L 乙酸铵溶液,梯度洗脱,在35 $^{\circ}$ C柱温,0.20 ml/min流速下,采用二极管阵列检测器在230、257 nm波长处进行检测,外标法定量。结果 2种甜味剂和7种防腐剂15 min内完全分离,在10~250 mg/L范围内,峰面积和质量浓度的线性关系良好($r \geq 0.9991$),以3组高、中、低浓度作为不同的添加水平,平均加标回收率为85.1%~98.8%,RSD为3.5%~8.5% ($n=6$),检出限($S/N=3$)为0.2~1.0 mg/kg,定量限($S/N=10$)为0.5~4.0 mg/kg。结论 本方法操作方便、分离效果好、线性范围宽,能满足酱腌菜中防腐剂和甜味剂的检测要求。

关键词:超高效液相色谱法;酱腌菜;防腐剂;甜味剂;食品添加剂;食品安全

中图分类号:R155;O657.7;TS202.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0155-04

Simultaneous determination of 7 preservatives and 2 sweeteners in pickled vegetables by ultra performance liquid chromatography

Dong Guixian, Wang Zhaoxia, Zhang Guifang, Wang Ying, Zhang Xiaoyu, Wang Yuelei, Yang Cuiyun
(Yantai Center for Disease Prevention and Control, Shangdong Yantai 264003, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method for simultaneous determination of 7 preservatives (sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, butyl *p*-hydroxybenzoate) and 2 sweeteners (saccharin sodium, acesulfame potassium) in pickled vegetables by ultra performance liquid chromatography. **Methods** Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m) was used as separation column, and methanol and 0.02 mol/L ammonium acetate was used as mobile phase in gradient elution mode at the flowrate of 0.20 ml/min. The column temperature was set to 35 $^{\circ}$ C and detected by diode array detector at 230 and 257 nm, respectively. **Results** The 9 food additives were completely separated within 15 mins. In the range of 10~250 mg/L, the peak area and content was in a good linear relationship ($r \geq 0.9991$). The average recoveries at three spiked levels were 85.1%~98.8%, with RSDs of 3.5%~8.5% ($n=6$). The limits of detection ($S/N=3$) were 0.2~1.0 mg/kg and the limits of quantification ($S/N=10$) were 0.5~4.0 mg/kg. **Conclusion** This method is simple and fast with high sensitivity, and it is suitable for the determination of food additives in pickled vegetables.

Key words: Ultra performance liquid chromatography (UPLC); pickled vegetables; preservative; sweetener; food additive; food safety

酱腌菜是我国传统的消费食品,品种多,消费量可观。其依据 GB 2760—2011《食品添加剂使用卫生标准》^[1]对食品的分类又称为腌渍的蔬菜,苯甲酸、脱氢乙酸及其钠盐和糖精钠等作为防腐剂与甜味剂在其生产加工过程中已被广泛使用,但是过量和超范围的添加会对人体健康造成严重的

威胁。卫生部对腌渍的蔬菜的食品添加剂使用范围和使用量经过几次修订,依据 GB 2760—2011《食品添加剂使用卫生标准》,山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、糖精钠、安赛蜜是可适用于腌渍的蔬菜的食品添加剂,对其使用量作出严格规定,而羟基苯甲酸酯类及其钠盐不允许使用于腌渍的蔬菜。目前防腐剂和甜味剂的检验方法很多^[2-6],超高效液相色谱(UPLC)是近年来新发展的液相色谱技术,代表了液相色谱发展方向。我们通过摸索,着重就样品的前处理及上机测定进行了深入的研

收稿日期:2012-12-26

基金项目:2011年烟台市科学技术发展计划(第二批)(2011252)

作者简介:董桂贤 女 副主任技师 研究方向为食品安全分析

E-mail:dgxian_77@163.com

究,建立了UPLC法同时测定酱腌菜中7种防腐剂与2种甜味剂的方法,该方法流动相流速仅为高效液相色谱法的1/5,具有节省试剂、分析时间短、重现性极佳、操作方便、分离效果好、线性范围宽的优点,并获得较高的精密度和准确度,适合大批量样品的快速测定。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY UPLC-Class超高效液相色谱仪,带二极管阵列检测器和荧光检测器(美国Waters公司);KQ-100B型超声波清洗器。

安赛蜜[GBW(E)100065]、山梨酸(BW3507)、苯甲酸[GBW(E)100262]、糖精钠[GBW(E)100166]、尼泊金甲酯[GBW(E)100074]、尼泊金乙酯[GBW(E)100064]、尼泊金丙酯[GBW(E)100075]、尼泊金丁酯[GBW(E)100077]标准品皆购自中国计量科学研究院,脱氢乙酸(CDCP-O-59-2G)购自农业部环境保护科研监测所。配制标准溶液时各取0.050 g于50 ml容量瓶中,加25 ml甲醇溶解,再用水溶解稀释至刻度,配成浓度均为1.00 mg/ml的混合标准溶液;配制使用溶液时取适量的防腐剂与甜味剂的混合标准溶液,用水稀释,配成浓度分别为10、20、50、100、250 $\mu\text{g/ml}$ 的使用液;甲醇(色谱纯);超纯水用PURELAB Classic-超纯水器制备;乙酸铵溶液(0.02 mol/L):称取1.54 g乙酸铵,加水至1 000 ml溶解,经0.45 μm 滤膜过滤;氨水(1+1):氨水加等体积水混合;亚铁氰化钾溶液:称取106 g亚铁氰化钾加水至1 000 ml;乙酸锌溶液:称取220 g乙酸锌溶于少量水中,加入30 ml冰乙酸,加水稀释至1 000 ml。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

方法一:对于只通过简单的食盐或少量酱油腌渍的(蛋白质含量很少)蔬菜,可称取样品约5 g于25 ml比色管,加10%甲醇浸提,用氨水(1+1)调整pH至近中性,加10%甲醇至刻度,混匀,超声提取15 min,经微孔滤膜(0.22 μm ,水相)过滤,滤液待上机分析。

方法二:对于较为复杂处理腌渍的(蛋白质含量高)蔬菜,例如拌辣酱、面酱或油炒制的蔬菜,可称取样品约5 g于25 ml比色管中,加入10%甲醇10 ml,亚铁氰化钾溶液2 ml,摇匀,再加入乙酸锌溶液2 ml摇匀,以沉淀蛋白质,加10%甲醇定容至刻度,8 000 r/min离心5 min,上清液经微孔滤膜(0.22 μm ,水相)过滤,滤液待上机分析。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样量3 μl ,流动相A为甲醇,B为0.02 mol/L乙酸铵溶液,流速0.20 ml/min。流动相梯度洗脱程序:0~5 min,10% A;5~5.5 min,10%~60% A;16 min,60% A;16~16.5 min,60%~10% A;17 min,10% A。

2 结果与amp;讨论

2.1 样品前处理方法的摸索

市面所售的山梨酸多以山梨酸钾、苯甲酸以苯甲酸钠、脱氢乙酸以脱氢乙酸钠、糖精以糖精钠和安赛蜜以乙酰磺胺酸钾的形式,上述5种皆易溶于水,呈中性或微碱性。市售尼泊金酯类多以复合钠盐的形式,也易溶于水。所以可以用氨水(1+1)调整pH至近中性,加入一定比例的甲醇可促进尼泊金酯类的提取^[7],实验比较了甲醇含量为5%、10%、15%、20%、25%对9种添加剂提取效果的影响,发现随着甲醇含量的增加,尼泊金甲、乙、丙、丁酯的响应值略有提高,其余组分无明显变化。但当甲醇含量超过10%时,前5种峰会有重叠,分离度不好,所以选用10%甲醇来提取较为合适。对于只通过简单的食盐或少量酱油腌渍的(蛋白质含量无或很少)蔬菜可采用1.2.1中的方法一来处理,而对于较为复杂处理腌渍的(蛋白质含量高)蔬菜,例如拌辣酱、面酱或油炒制的蔬菜可采用1.2.1中的方法二来处理。

2.2 色谱条件的选择

检测器及检测波长的选择:由于上述9种物质在紫外区均有吸收,可以选用紫外检测器进行检测,通过二极管阵列检测器获得的光谱图可知,安赛蜜、苯甲酸、糖精钠、山梨酸、脱氢乙酸、尼泊金酯的最大吸收波长分别在224、223、220、254、230、257 nm。综合考虑前面先出峰的5种标准物质在紫外区的检测灵敏度,本实验选择230 nm作为检测波长,后面时间选择257 nm作为尼泊金甲、乙、丙、丁酯的检测波长。

色谱柱的选择:目前食品添加剂的分析主要采用 C_{18} 液相色谱柱^[2-6]。本实验采用Waters公司的超高效液相色谱仪,比普通液相色谱仪耐压性能更强,分析时间更短,色谱柱分离效果更好。比较了Waters BEH C_{18} 2.1 mm \times 50 mm、2.1 mm \times 100 mm、2.1 mm \times 150 mm三根柱子的分离效果,50 mm的柱子分析时间最短,但安赛蜜的出峰时间为0.753 min,较早,检测实际样品时杂质峰干扰较大,150 mm的柱子分析时间稍长一些,综合考虑选择100 mm的柱子,安赛蜜出峰时间为2.103 min,与干

扰峰能完全分离,并在 15 min 内 9 种添加剂完全分离,较为合适。

流动相的选择:依据国标检验方法^[2-6],仍选择甲醇和 0.020 mol/L 乙酸铵溶液作为流动相,但根据 9 个峰的实际分离情况对甲醇和乙酸铵的配比进行了梯度摸索。实验中发现甲醇和乙酸铵在流动相中的比例的少量变化会使前 5 种组分的保留时间发生明显改变,减少甲醇含量时,各组分保留时间变长,分离效果较好,但扩散效应大,峰形差;反之,

当甲醇含量 11% 时,会使出峰时间提前,前面 5 种物质的峰分不开,发生重叠;在甲醇和乙酸铵溶液的比例为 10:90 的条件下,前面 5 种物质分离效果较好。考虑本实验要同时分离测定 9 种添加剂,特别是对 4 种尼泊金酯同系物的分离,通过试验摸索,当甲醇含量 60% 时,后面 4 种尼泊金酯同系物的分离效果良好,本方法通过对梯度变化的摸索,选择了最佳变化梯度,在 15 min 内可使 7 种防腐剂与 2 种甜味剂达到完全分离(见图 1)。

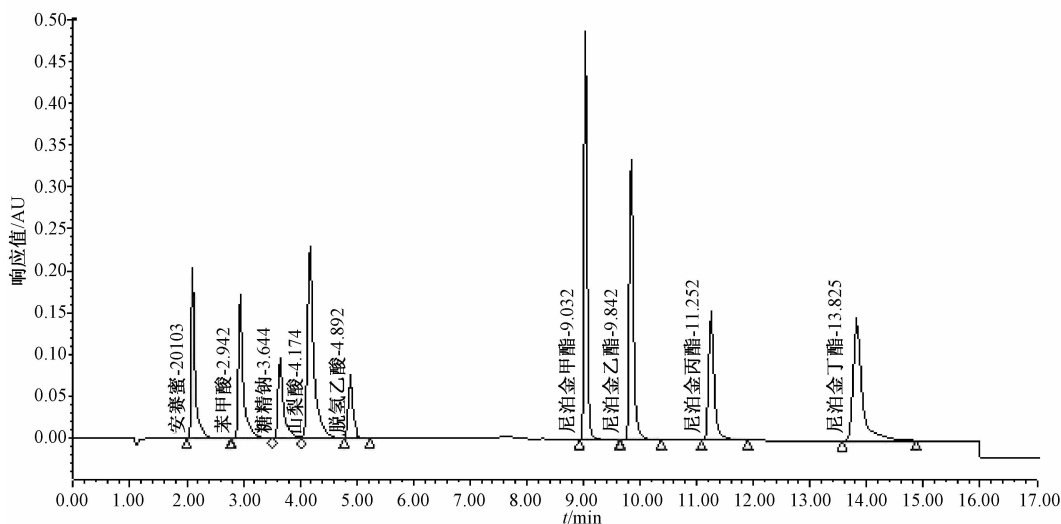


图 1 7 种防腐和 2 种甜味剂标准品混合液的色谱图

Figure 1 Chromatogram of a mixture of 7 preservatives and 2 sweeteners standards

2.3 标准曲线绘制

分别进样 3 μl 标准系列中各浓度混合标准使用液,记录色谱图,根据标准液的浓度和峰面积绘制标准曲线,以保留时间为定性依据。在本实验条件下,9 种目标分析物的浓度 (x , mg/L) 与峰面积 (y) 之间呈良好的一次线性关系,表 1 可见,相关系数 $r \geq 0.999 1$ 。

表 1 甜味剂和防腐剂的 UPLC 测定法的线性范围、回归方程和相关系数 ($n = 5$)

Table 1 The linear equations of preservatives and sweeteners

食品添加剂	线性范围(mg/L)	回归方程	相关系数
安赛蜜	10 ~ 250	$y = 44791x - 57684$	0.999 9
苯甲酸	10 ~ 250	$y = 48368x - 101312$	0.999 8
糖精钠	10 ~ 250	$y = 30488x - 113771$	0.999 8
山梨酸	10 ~ 250	$y = 88190x - 292486$	0.999 2
脱氢乙酸	10 ~ 250	$y = 22838x - 400662$	0.999 1
尼泊金甲酯	10 ~ 250	$y = 78208x - 362497$	0.999 4
尼泊金乙酯	10 ~ 250	$y = 82027x + 118802$	0.999 9
尼泊金丙酯	10 ~ 250	$y = 77848x - 254158$	0.999 8
尼泊金丁酯	10 ~ 250	$y = 65403x + 39268$	0.999 5

2.4 最低检出浓度

本实验中基线的噪声 $< 200 \mu\text{V/s}$,以 $200 \mu\text{V/s}$ 计,当样品中被测组分峰高为基线噪声的 3 倍时的浓度为最低检出浓度,被测组分峰高为基线噪声的

10 倍时的浓度为最低定量浓度。以取样 5 g 最后定容到 25 ml 计,最低检出浓度和定量限见表 2。

表 2 甜味剂和防腐剂的最低检出限 (LDD) ($S/N = 3$) 与定量限 (LOQ) ($S/N = 10$)

Table 2 The limits of detection (LOD) ($S/N = 3$) and quantification (LOQ) ($S/N = 10$) for preservatives and sweeteners

食品添加剂	测定液最低检出浓度 (mg/L)	检出限 (mg/kg)	测定液最低定量浓度 (mg/L)	定量限 (mg/kg)
安赛蜜	0.1	0.5	0.3	1.5
苯甲酸	0.1	0.5	0.4	2.0
糖精钠	0.2	1.0	0.8	4.0
山梨酸	0.04	0.2	0.1	0.5
脱氢乙酸	0.2	1.0	0.8	4.0
尼泊金甲酯	0.04	0.2	0.1	0.5
尼泊金乙酯	0.06	0.3	0.2	1.0
尼泊金丙酯	0.09	0.45	0.3	1.5
尼泊金丁酯	0.1	0.5	0.5	2.5

2.5 添加回收率和精密度

采用同一腌渍的蔬菜样品,取 15 份,应用本法,分别加入一定量的标准溶液,以 3 组高、中、低浓度作为不同的添加水平,每个水平 5 份,按上述操作进行测定,计算平均回收率和相对标准偏差 (RSD),见表 3。

表3 甜味剂与防腐剂的添加回收率和相对标准偏差($n=5$)

Table 3 The recovery and repeatability for preservatives and sweeteners			
化合物	添加水平 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
安赛蜜	20	90.2	7.8
	40	93.3	6.5
	100	97.4	4.3
苯甲酸	20	92.5	6.5
	40	96.8	5.9
	100	98.5	4.2
糖精钠	20	88.6	7.9
	40	92.5	6.8
	100	94.3	5.6
山梨酸	20	93.1	5.6
	40	96.4	4.5
	100	98.8	3.5
脱氢乙酸	20	85.1	8.5
	40	88.6	7.6
	100	89.3	7.5
尼泊金甲酯	20	85.9	6.8
	40	87.6	7.5
	100	89.8	5.9
尼泊金乙酯	20	86.3	7.8
	40	87.8	6.4
	100	90.2	6.9
尼泊金丙酯	20	85.9	8.2
	40	88.6	7.5
	100	90.3	6.9
尼泊金丁酯	20	85.2	7.6
	40	87.6	6.8
	100	88.7	4.5

2.6 干扰性试验

将4种混合色素(柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红)标样在相同色谱条件下进行分离,两者叠加色谱图见图2。可见,4种色素与9种目标分析物基本不发生重叠,第一个色素柠檬黄虽然与安赛蜜分离度未大于1.5,但是超高效液相色谱在峰保留时间偏离仅为5%,基本不干扰测定,还可以通过最大吸收波长来排除柠檬黄的干扰。也提示我们在前处理条件和灵敏度满足的情况下,色素也可以与防腐剂、甜味剂同时检测。

2.7 实际样品的测定

随机选取市售散装酱腌菜30份,通过本实验确立的实验条件,同时进样3 μ l 处理后试样溶液,测得峰面积与标准曲线比较定量。结果发现防腐剂苯甲酸严重超标的现象,最高超标为5倍,图3为某实际样品的色谱图。

3 小结

本方法运用超高效液相色谱法可同时测定食品中的防腐剂和甜味剂,大大节约了试剂和分析时间,本方法操作方便、分离效果好,重现性极佳、线性范围宽,并可获得较高的精密度和准确度,适合

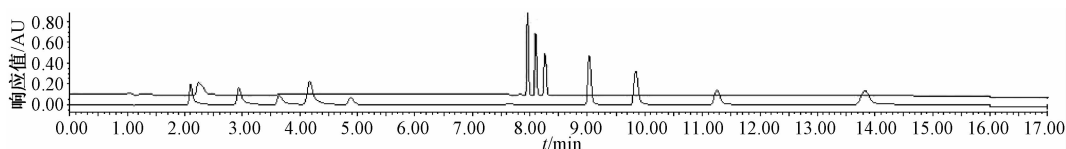


图2 9种目标分析物与4种混合色素叠加色谱图

Figure 2 Overlapping chromatogram of 9 (7 preservatives, 2 sweeteners) and 4 pigments

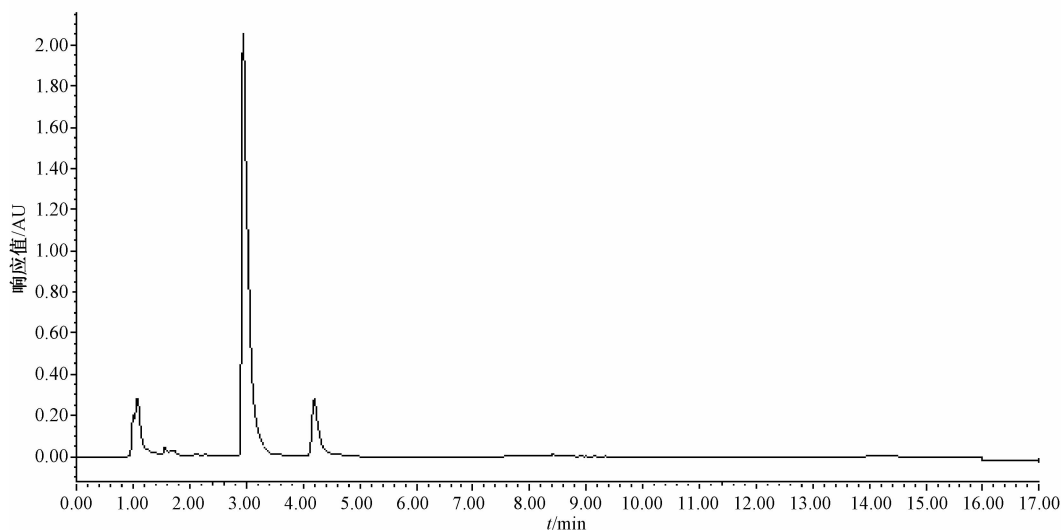


图3 实际样品的色谱图

Figure 3 Chromatogram of a real sample