

高效液相色谱法同时测定酱油中的十种常见添加剂

周运柯¹, 梅玉琴², 张 微¹

(1. 自贡市产品商品质量监督检验所, 四川 自贡 643000; 2. 自贡市疾病预防控制中心, 四川 自贡 643000)

摘 要:建立了同时测定酱油中的十种常见添加剂的高效液相色谱法,提高了检测效率。方法采用 20% 甲醇提取并沉淀,用 C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),甲醇和 0.02 mol/L 醋酸铵为流动相进行梯度洗脱,22 min 即可分离十种添加剂。添加剂回收率为 94.8% ~ 101.0%, 相对标准偏差(RSD)为 1.98% ~ 4.14% (n=6)。该方法简便,快速,灵敏度高,适用于酱油中常见添加剂的快速测定。

关键词:高效液相色谱;酱油;添加剂

中图分类号:0657.7+2

文献标志码:A

食品中的添加剂检测一直是食品检测的主要内容。近年来,随着人们食品安全意识的加强,食品中的甜味剂与防腐剂的使用情况日益受到广大消费者的重视。目前,对酱油中的安赛蜜,苯甲酸,山梨酸,糖精钠,脱氢乙酸,富马酸二甲酯和对羟基苯甲酸酯类化合物在 GB2760 - 2011 食品添加剂使用标准中^[1]均有明确的使用要求。并且,国家标准中对这些添加剂都有着相应的检测方法^[2-6],主要为高效液相色谱法^[2,5-6]和气相色谱法^[3-4]等。但是绝大多数方法中都只能检测几种添加剂,而且由于检测中使用的仪器和前处理方法不同,导致各组分检测要多次进行,不仅增大了工作量和成本,而且不能适应多组物质同时检测的趋势。已有文献对酱油中的多种物质同时进行了检测^[7-10],但是样品需要 SPE 小柱^[7-9]或凝胶色谱^[10]净化,操作繁琐且实验成本高。本研究参考相关文献[7-9,11-14],优化检测方法,在现有标准的基础上,采用 20% 甲醇提取,梯度洗脱,双波长同时检测,一次性检测酱油中的十种添加剂。该方法简便,灵敏,准确,快速,可用于对酱油中的添加剂含量进行检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜(1 mg/mL, 国家标准物质中心),脱氢乙酸、富马酸二甲酯(99%, 美国 Chemservice),对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯(99%, 天津博迪化工有限公司),醋酸铵、亚铁氰化钾、1+1 盐酸溶液、乙酸锌(分析纯,重庆川东化工厂),甲醇(HPLC 级,天津四友精细化学品有限公司)。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1200series 型液相色谱仪,带二极管阵列检测器和自动进样器(美国安捷伦公司),H1650R 离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 色谱条件

Welch Xtimate C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μm),柱温 40 °C,流速 1.5 mL/min,流动相为甲醇(A):0.02 mol/L 的醋酸铵溶液(B)。梯度洗脱程序为 0~3 min,5% A + 95% B;3~5 min,A 由 5% 升至 20%,保持 5 min;10~13 min,A 由 20% 升至 60%,保持 9 min,22.1 min,A 由 60% 恢复至 5%,保持 5 min。

收稿日期:2013-04-03

作者简介:周运柯(1983-),男,四川西昌人,助理工程师,主要从事食品安全检测方面的研究,(E-mail)xchxyk@126.com

1.4 标准溶液配置

准确称取脱氢乙酸、富马酸二甲酯、对羟基苯甲酸酯甲酯、乙酯、丙酯和丁酯各 0.1000 g,用甲醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,各标准储备溶液浓度为 1.000 mg/mL。然后取各种添加剂标准储备溶液 0.25 mL,0.50 mL,0.75 mL,1.00 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 10 mL 甲醇,用水定容至刻度,混匀。其浓度依次为 0.01 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.03 mg/mL, 0.04 mg/mL 的标准混合溶液,经过 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤后测定,以峰面积对浓度进行线性回归。

1.5 样品前处理

称取样品 3 g(精确至 0.0001 g)于 25 mL 容量瓶中,加入 5 mL 水和 10 mL 甲醇混匀后,依次加入 0.5 mL 300 g/L 的乙酸锌溶液和 0.5 mL 150 g/L 的亚铁氰化钾溶液,用水稀释至刻度,混匀,于离心机上(10 000 r/min)离心 5 min,经过 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤后测定。

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

国家标准及文献中糖精钠、苯甲酸、山梨酸的检测波长为 230 nm^[1],安赛蜜的检测波长为 214 nm^[4],脱氢乙酸为 254 nm^[8],富马酸二甲酯为 220 nm^[5],对羟基苯甲酸酯为 254 nm^[7],而利用 DAD 检测器的光谱扫描功能对各种待测物的标准物质最大吸收波长在 200 ~ 800 nm 进行扫描后发现,糖精钠、苯甲酸山梨酸、安赛蜜、脱氢乙酸、富马酸二甲酯和对羟基苯甲酸酯的最大吸收波长依次为:206 nm,224 nm,255 nm,227 nm,230 nm,200 nm 及 254 nm,可以看出,除对羟基苯甲酸酯外,其余组分均在 230 nm 处有着较大的紫外吸收,为尽可能兼顾目标化合物的灵敏度,采用了双波长检测的方案,即糖精钠、苯甲酸、山梨酸、安赛蜜、脱氢乙酸、富马酸二甲酯采用 230 nm 的波长进行检测,而对羟基苯甲酸酯则采用 254 nm 的波长进行检测。

2.2 流动相 pH 的选择

流动相 B 配置好并按照设置条件运行后,脱氢乙酸与山梨酸混合在一起无法分离,而其它组分分离良好(图 1a),此时测得乙酸铵溶液的 pH 为 7.05,而用 1+1 的盐酸溶液对流动相 B 调节 pH 至 5.8 后,各组分都能够得到良好的分离(图 1b)。推测是由于在低 pH 条件下,脱氢乙酸与山梨酸的存在状态与固定相和流动相的

相互作用各不相同而导致二者分离。

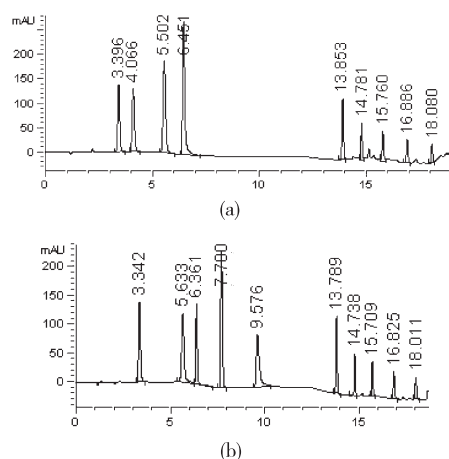


图 1 不同 pH 流动相条件下 230 nm 波长色谱图

2.3 提取溶剂的选择

取一定量的样品,分别加入不同量的安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠、脱氢乙酸、富马酸二甲酯及四种对羟基苯甲酸酯类物质,依次采用水,10% 甲醇,20% 甲醇,40% 的甲醇溶液对酱油中的待测物进行提取,按照上述方法处理后,平行测定 3 次,计算其回收率,其结果见表 1。从表 1 可以看出,用 20% 的甲醇与 40% 的甲醇作为提取溶剂均对各类待测物有着良好的回收,但是用 40% 的甲醇作为提取溶剂时,安赛蜜的峰型严重变矮拖尾,影响实际测定,因此综合考虑后使用 20% 的甲醇作为提取溶剂,10 种待测物的回收率均在 94.8% ~ 101.0% 范围内,表明该方法具有良好的回收率。

2.4 线性范围及检出限

在选定实验条件下,以峰面积 Y 为纵坐标,质量浓度 C(mg/L)为横坐标绘制标准曲线,得出线性方程和线性范围。按照信噪比(S/N)等于 3 计算最低检测浓度。按实验方法对实际样品加入 200 mg/kg 的 10 种待测物的混合标液,平行测定 6 次,计算其相对标准偏差(%),结果见表 2。从表 2 可以看出,该方法对各种待测物具有较宽的线性范围和较高的精密度及相关系数。

2.5 样品测定结果

采用此方法,对自贡市辖区范围内的企业生产的 5 种酱油进行了检测,结果见表 3。结果表明,5 种酱油中有 4 种酱油检出了苯甲酸,1 种酱油检出了山梨酸,还有一种酱油检出了安赛蜜。其含量范围在 0.02 ~ 0.81 g/kg 之间,均符合相关标准^[1]的要求。图 2 为其中一份酱油样品的色谱图及其加标色谱图。

表 1 酱油中 10 种添加剂在不同提取溶剂中的回收率

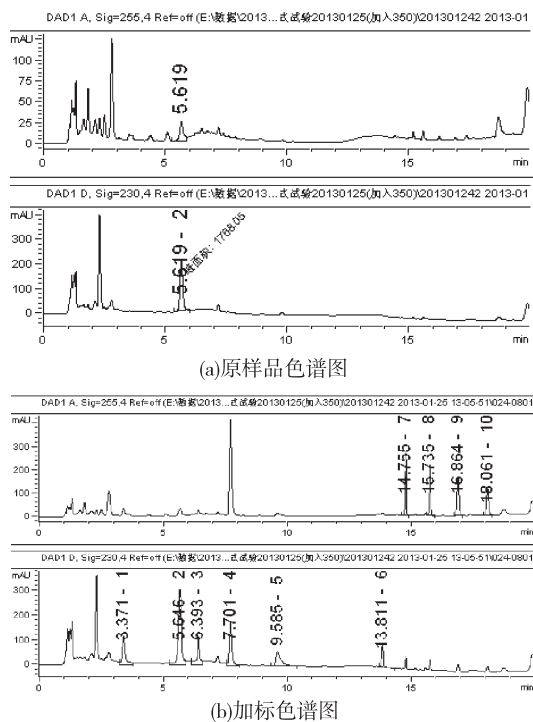
化合物	本底值 mg/kg	加入量 mg/kg	各种提取溶剂的测得值(mg/kg)及回收率(%)							
			水		10% 甲醇		20% 甲醇		40% 甲醇	
			测得值	回收率	测得值	回收率	测得值	回收率	测得值	回收率
安赛蜜	0	100.0	96.9	96.9	94.9	94.9	97.2	97.2	95.7	96.0
	0	200.0	198.6	99.3	196.8	98.4	195.6	97.8	192.4	96.0
	0	600.0	594.0	99.0	592.8	98.8	591.1	98.5	582.8	97.1
苯甲酸	431.2	100.0	525.9	94.7	524.3	93.1	529.3	98.1	524.5	93.3
	431.2	200.0	618.8	99.4	628.0	98.4	624.3	96.6	612.4	95.1
	431.2	600.0	1007.8	96.1	1030.1	99.8	1022.4	98.5	1016.9	97.6
山梨酸	0	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	101.0	101.0	95.7	95.7
	0	200.0	199.4	99.7	195.0	97.5	196.6	98.3	202.0	101.0
	0	600.0	598.9	99.8	596.8	99.5	592.6	98.8	600.2	100.0
糖精钠	0	100.0	93.8	93.8	96.1	96.1	98.2	98.2	100.0	100.0
	0	200.0	191.8	95.9	193.2	96.9	196.3	98.2	199.8	99.9
	0	600.0	573.0	95.5	583.6	97.3	594.1	99.0	601.1	100.2
脱氢乙酸	0	100.0	94.0	94.0	97.0	97.0	99.3	99.3	100.4	100.4
	0	200.0	192.1	96.0	199.2	99.65	200.4	100.2	196.1	98.0
	0	600.0	586.9	97.8	91.6	98.6	594.7	99.1	595.0	99.2
富马酸二甲酯	0	100.0	73.8	73.8	79.8	79.8	94.8	94.8	95.6	95.6
	0	200.0	154.6	77.3	160.1	80.1	191.4	95.7	195.6	97.8
	0	600.0	464.5	77.4	489.7	81.6	576.5	96.1	589.8	98.3
对羟基苯甲酸甲酯	0	100.0	84.2	84.2	86.2	86.2	96.2	96.2	96.6	96.6
	0	200.0	168.6	84.3	175.4	87.7	192.6	96.3	200.6	100.3
	0	600.0	501.9	83.6	520.8	86.8	586.8	97.8	594.1	99.0
对羟基苯甲酸乙酯	0	100.0	82.8	82.8	83.2	83.2	94.4	94.4	98.3	98.3
	0	200.0	161.8	80.9	173.2	86.6	191.2	95.6	197.8	98.9
	0	600.0	493.6	82.3	510.7	85.1	580.2	96.7	600.4	100.1
对羟基苯甲酸丙酯	0	100.0	77.3	77.3	86.5	86.5	94.9	94.9	98.2	98.2
	0	200.0	156.2	78.1	170.6	85.3	194.6	97.3	200.0	100.0
	0	600.0	476.5	79.4	518.6	86.4	587.2	97.9	597.6	99.6
对羟基苯甲酸丁酯	0	100.0	80.8	80.8	86.0	86.0	95.0	95.0	97.4	97.4
	0	200.0	161.0	80.5	173.0	86.5	195.6	97.8	197.4	98.7
	0	600.0	476.2	79.4	517.7	86.3	584.3	97.4	595.0	99.2

表 2 10 种添加剂的标准工作曲线、检出限及标准偏差

化合物	保留时间 (min)	回归方程	线性范围 (mg/L)	相关系数	检出限 (mg/L)	相对标准 偏差(%)
安赛蜜	3.342	$Y = 21.811C - 0.681$	2.0 - 150.0	0.9998	0.22	2.81
苯甲酸	5.533	$Y = 24.473C + 15.773$	2.0 - 150.0	0.9997	0.20	3.67
糖精钠	6.361	$Y = 16.648C - 4.015$	5.0 - 170.0	0.9993	0.28	2.91
山梨酸	7.700	$Y = 37.342C - 19.092$	2.0 - 150.0	0.9998	0.17	1.98
脱氢乙酸	9.576	$Y = 27.132C - 58.568$	5.0 - 170.0	0.9990	0.24	3.91
富马酸二甲酯	13.789	$Y = 15.957C - 0.864$	5.0 - 180.0	0.9997	0.24	4.14
对羟基苯甲酸甲酯	14.738	$Y = 38.248C + 22.636$	2.0 - 150.0	0.9992	0.18	2.04
对羟基苯甲酸乙酯	15.709	$Y = 36.645C + 12.454$	2.0 - 150.0	0.9991	0.19	2.15
对羟基苯甲酸丙酯	16.825	$Y = 33.974C + 23.784$	2.0 - 150.0	0.9992	0.19	2.98
对羟基苯甲酸丁酯	18.011	$Y = 32.246C + 9.184$	2.0 - 150.0	0.9990	0.20	2.71

表 3 样品测定结果

化合物	浓度(g/kg)				
	酱油 1	酱油 2	酱油 3	酱油 4	酱油 5
安赛蜜	未检出	未检出	未检出	未检出	0.08
苯甲酸	0.45	0.72	0.61	未检出	0.58
糖精钠	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
山梨酸	未检出	未检出	未检出	0.81	未检出
脱氢乙酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
富马酸二甲酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
对羟基苯甲酸甲酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
对羟基苯甲酸乙酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
对羟基苯甲酸丙酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
对羟基苯甲酸丁酯	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出



峰1:安赛蜜,峰2:苯甲酸,峰3:糖精钠,峰4:山梨酸,
峰5:脱氢乙酸,峰6:富马酸二甲酯,峰7:对羟基苯甲酸甲酯,
峰8:对羟基苯甲酸乙酯,峰9:对羟基苯甲酸丙酯,
峰10:对羟基苯甲酸丁酯

图2 酱油样品色谱图

3 结束语

应用此方法对酱油中的10种添加剂进行检测,各个待检组分在具有良好分离度的同时还拥有较高的精密密度、准确度和灵敏度,相对于文献的方法^[2-13],操作简便、快速且成本较低,符合相应的检测要求,可以作为一次性检测酱油中多种添加剂的高通量检测方法,对适应食品中多组分同时检测的需求和趋势具有积极的作用。

参考文献:

- [1] GB 2760-2011,食品安全国家标准[S].
- [2] GB/T 23495-2003,食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定[S].
- [3] GB/T 5009.31-2003,食品中对羟基苯甲酸酯类的测定[S].
- [4] GB/T 5009.121-2003,食品中脱氢乙酸的测定[S].
- [5] GB/T 5009.140-2003,食品中乙酰胺磺酸钾的测定[S].
- [6] NY/T 1723-2009,食品中富马酸二甲酯的测定[S].
- [7] 黄百芬,张文娟,沈向红.高效液相色谱法同时测定酱油或饮料中的8种防腐剂和3种甜味剂[J].中国卫生检验杂志,2005,15(10):1208-1211.
- [8] 杨红梅,刘艳琴,王浩,等.固相萃取-高效液相色谱法测定酱油中10种防腐剂[J].中国调味品,2011,36(5):94-100.
- [9] 夏静,张敬轩,李挥,等.高效液相色谱法同时检测酱油中7种防腐剂[J].食品科学,2011,32(14):219-222.
- [10] 杨晓凤,张义蓉,侯雪,等.凝胶色谱净化-气相色谱法测定酱油中7种防腐剂[J].分析测试技术与仪器,2011,17(2):110-113.
- [11] 汪辉,曹小彦,李林,等.反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中14种常见食品添加剂的快速测定[J].分析测试学报,2009,28(10):1194-1197.
- [12] 王丽.高效液相色谱法同时测定食品中五种防腐剂的研究[J].陕西科技大学学报:自然科学版,2012,30(4):52-56.
- [13] 曹淑瑞,刘治勇,张雷,等.高效液相色谱法同时测定食品中6种对羟基苯甲酸酯[J].分析化学,2012,40(4):529-522.
- [14] 郑林,施泽明,李佳宣,等.微波萃取气相色谱法测定鱼肉中有机氯残留[J].四川理工学院学报:自然科学版,2010,23(1):62-64.

Determination of Ten Common Additives in Soy Sauce at the Same Time by HPLC Method

ZHOU Yun-ke¹, MEI Yu-qin², ZHANG Wei¹

(1. Zigong Products Quality Supervision and Inspection Institute, Zigong 643000, China; 2. Zigong Center for Disease Control and Prevention, Zigong 643000, China)

Abstract: A HPLC method is established that can determine ten common additives in soy sauce at the time, and the method has improved the detection efficiency. The 20% methanol is extracted and precipitated in the method, the C₁₈ chromatographic column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), carbinol and 0.02 mol/L ammonium acetate are used in gradient elution of mobile phase, then ten kinds of additives can be separated in 22 minutes. The recovery of the additives is 94.8% ~ 101.0%, whose error range relative to standard deviation(RSD) is 1.98% ~ 4.14% (n=6). This method is simple, convenient and fast, and has high sensitivity, so it is suitable for the rapid determination of common additives in soy sauce.

Key words: high performance liquid chromatograph (HPLC); soy sauce; additives