

反相高效液相色谱法同时快速测定食品中常见的 8 种食品添加剂

张秀尧

(浙江平阳县卫生防疫站, 浙江 平阳 325400)

摘要 :采用反相高效液相色谱法测定食品中常见的 8 种食品添加剂:糖精、甜味素、苯甲酸、山梨酸、香兰素、咖啡因、胭脂红和日落黄。实验采用 Shim-pack CLC-ODS 分析柱,以甲醇-乙酸铵(pH 7.0)(体积比为 44:56)为流动相,在 UV 220 nm 处检测。样品经 Carrez 试剂处理去除杂质后直接进样,一次进样分析仅需 8 min。平均回收率为 91.9%~108.5%,相对标准偏差小于 4%($n=5$)。

关键词 :高效液相色谱法;食品;食品添加剂

中图分类号:O658.1;TS20

文献标识码:A

文章编号:1000-871X(2000)06-0539-04

1 前言

糖精、甜味素、苯甲酸、山梨酸、香兰素、咖啡因、胭脂红和日落黄为常用食品添加剂,其中糖精、苯甲酸和山梨酸的 HPLC 法测定已有多篇文献报道^[1-3]。杨元等^[4]应用 HPLC 法测定了糖精、苯甲酸、山梨酸、柠檬黄和日落黄,但日落黄与山梨酸分离不完全,冲渝民等^[5]介绍了非梯度 HPLC 法在 12 min 内测定柠檬黄、苋菜红、胭脂红和日落黄,并同时测定了糖精、苯甲酸,但糖精与柠檬黄分离不完全。有关甜味素(aspartame)的 HPLC 测定方法^[6,7]报道较少,而香兰素的报道仅见 TLC 法^[8]、GC 法^[9]。本文采用非梯度洗脱反相 HPLC 法同时测定上述 8 种食品添加剂,方法简便、快速,一次进样分析仅需 8 min。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

岛津 LC-10A 液相色谱仪,SPD-10A 紫外-可见光检测器,Upper 色谱工作站(浙江大学)。

甜味素(日本 AJINOMOTO Co. INC);苯甲酸、山梨酸和香兰素为分析纯,咖啡因为生化试剂,胭脂红、日落黄(市售),纯度为 60%;糖精(上海第六制药厂)。

标准液按常法配制成为 1.0 g/L 的储备液,使用时混合配成合适浓度的使用液。

Carrez 试剂^[6] I :15 g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 用水溶解并稀释至 100 mL。Carrez 试剂 II :30 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 用水稀释至 100 mL。

2.0 mol/L NH_4Ac (AR 级)按常法配制,并调 pH 至 7.0。使用时取 5.0 mL 稀释至 500 mL,用 0.45 μm 滤膜过滤。甲醇(色谱纯)水为去离子水并经石英亚沸蒸馏器蒸馏。

2.2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack CLC-ODS 6.0 mm i. d. \times 150 mm,预处理柱:Shim-pack CLC G-ODS(4);流动相:甲醇-20 mmol/L 乙酸铵(pH 7.0)(体积比为 44:56);流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}C$ ~28 $^{\circ}C$;检测波长:220 nm;进样体积:10 μL ;以保留时间定性,峰高外标法定量。

2.3 样品预处理

2.3.1 汽水、可乐等碳酸型饮料 称取适量样品置于 100 mL 容量瓶中,加 50 mL 水,超声脱气 10 min,加 1.0 mL 2.0 mol/L NH_4Ac ,加水至刻度,混匀,用 0.45 μm 滤膜过滤。

2.3.2 果汁型饮料、含乳饮料、酱油、配制酒和黄酒 称取适量样品置于 100 mL 容量瓶中,加 50 mL 水,加 Carrez 试剂 I,II 各 1.0 mL,加水至刻度,混匀,静置 10 min,滤纸过滤,弃初滤液,取续滤液 10 mL 用 0.45 μm 滤膜过滤。

2.3.3 食醋及其他酸性食品(饮料) 称取适量样品置于 100 mL 容量瓶中,加 50 mL 水,用 $NH_3 \cdot H_2O$ (体积比为 1:1)将其中和至中性,加入 1.0 mL 2.0 mol/L 的乙酸铵,加 Carrez 试剂 I,II 各 1.0 mL,加水至刻度,其余操作同“2.3.2”。

2.3.4 果冻、罐头及其他半固体、固体食品 取一定量的样品加一定量的水用食品搅拌机均质。称取适量置于 100 mL 容量瓶中,其余操作同“2.3.2”。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

选用甲醇-20 mmol/L 乙酸铵 (pH 7.0) 体积比为 44:56 作流动相, 分离效果较好(见图 1 和图 2)。

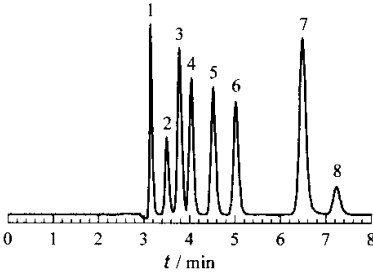


图 1 混合标准样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of mixed standard sample

1. 胭脂红 (carmine); 2. 糖精 (saccharin); 3. 日落黄 (sunset yellow); 4. 苯甲酸 (benzoic acid); 5. 山梨酸 (sorbic acid); 6. 咖啡因 (caffeine); 7. 香兰素 (vanillin); 8. 甜味素 (aspartame)

敏波长为 254 nm。苯甲酸、糖精为 230 nm。在本条件下测得甜味素的灵敏波长为 220 nm, 香兰素为 254 nm。考虑到甜味素的灵敏度较低, 故选用 220 nm 作为检测波长。

3.3 样品前处理

许多文献介绍了采用样品稀释液经 0.45 μm 滤膜过滤后直接进样法, 但这仅适合于基质含量较少像汽水之类的样品, 对于基质含量较高的样品, 若直接进样对色谱柱很不利。Moors 等^[7]提出用连续固相萃取法作为 RP-HPLC 测定苯甲酸、山梨酸、糖精和甜味素的前处理方法, 样品稀释液先通过季胺碱类阴离子交换剂, 苯甲酸、山梨酸和糖精被保留, 甜味素不被吸附, 流出液和清洗液再通过 C₁₈ 填料吸附甜味素, 然后分别洗脱上述两支色谱柱上的吸附物质, 方法较麻烦。栗元文^[11]报道用乙腈提取硅藻土柱净化方法, 对蛋白质、脂肪脱除效果好, 但其操作步骤多, 且乙腈耗量大(一个样品多于 100 mL)。采用章日春^[6]介绍的 Carrez 试剂去杂质法效果好, 操作简单、价廉, 回收率均在 90% 以上, 但加入量要适当, 以每 100 mL 样品中加入 Carrez 试剂 I, II 各 1.0 mL 为宜, 实验发现, 若各加 2.0 mL, 则胭脂红、香兰素和甜味素的回收率偏低, 分别只有 83.6% ~ 93.0%, 67.6% ~ 73.3% 和 76.4% ~ 84.6%。

3.4 标准曲线及最小检出量

分别测定一定质量浓度范围内的标准品溶液, 以峰高 (X, mA) 对标准品质量浓度 (Y, mg/L) 作线性回归, 结果见表 1。

3.5 样品回收率

在 100 mL 容量瓶中加入适量的样品, 再加入一定量的标准品进行加标回收试验, 结果见表 2。

3.6 样品的测定

结果见表 3。

3.2 检测波长的确定

据文献^[10]介绍, 山梨酸、胭脂红和日落黄的灵

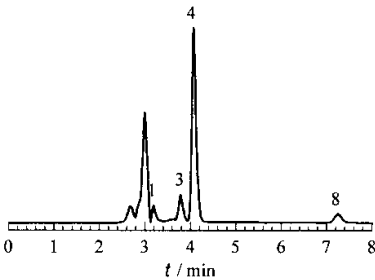


图 2 健力宝饮料色谱图

Fig.2 Chromatogram of "Jianlibao" drink

峰序同图 1 (Peak No. the same as in Fig.1)

表 1 8 种食品添加剂的标准曲线及最小检出量

Table 1 The standard curves and detection limits of the eight food additives

食品添加剂 Food additive	保留时间 Retention time (min)	线性范围 Linear range (mg/L)	回归方程* Regression equation*	r	最小检出量 Detection limit (ng)
胭脂红 Carmine	3.14	0~30	$Y = -0.0312 + 0.0350X$	0.9995	1
糖精 Saccharin	3.48	0~70	$Y = -0.2782 + 0.0743X$	1.0000	1
日落黄 Sunset yellow	3.76	0~60	$Y = -0.0379 + 0.0784X$	1.0000	1
苯甲酸 Benzoic acid	4.03	0~70	$Y = -0.2179 + 0.0800X$	1.0000	1
山梨酸 Sorbic acid	4.51	0~70	$Y = -0.2435 + 0.0864X$	1.0000	1
咖啡因 Caffeine	5.01	0~100	$Y = -0.4799 + 0.1516X$	0.9999	2
香兰素 Vanillin	6.47	0~200	$Y = 0.9407 + 0.1982X$	0.9998	5
甜味素 Aspartame	7.23	0~150	$Y = -0.2782 + 1.0148X$	0.9993	10

* X: 峰高 (peak height) mA; Y: 质量浓度 (mass concentration) mg/L。

表 2 样品加标回收试验 (n = 3)

Table 2 The recovery tests (n = 3)

食品添加剂 Food additive	佳酿酱油 Jianiang soy sauce					健力宝 Jianlibao drink								
	本底值 back-ground (mg/L)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)	本底值 back-ground (mg/L)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)
胭脂红 Carmine	nd	-	-	-	-	0.70	5.0	5.51	96.2	2.9	2.5	3.08	95.2	3.1
糖精 Saccharin	nd	5.0	4.69	93.8	2.8	nd	7.5	7.14	95.2	2.4	4.0	3.77	94.3	2.7
日落黄 Sunset yellow	nd	-	-	-	-	1.76	5.0	6.62	97.2	2.6	2.5	4.17	96.4	2.9
苯甲酸 Benzoic acid	9.04	20.0	30.38	106.7	1.8	8.13	20.0	28.87	103.7	2.0	10.0	17.79	96.6	2.2
山梨酸 Sorbic acid	nd	20.0	20.22	101.1	1.5	nd	20.0	20.74	103.7	1.9	10.0	10.22	102.2	2.4
咖啡因 Caffeine	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
香兰素 Vanillin	nd	20.0	19.06	95.3	2.4	nd	50.0	51.25	102.5	2.2	20.0	18.42	92.1	2.9
甜味素 Aspartame	nd	50.0	47.90	95.8	3.6	7.88	50.0	62.13	108.5	3.7	20.0	28.40	102.6	3.8

食品添加剂 Food additive	喜之郎果冻 Strong pudding					可口可乐 Coca-cola												
	本底值 back-ground (mg/L)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)	本底值 back-ground (mg/L)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)	加标量 added (mg/L)	测得值 found (mg/L)	回收率 recovery (%)	RSD (%)
胭脂红 Carmine	nd	5.0	4.79	95.8	2.5	2.5	2.40	96.0	3.4	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
糖精 Saccharin	nd	7.5	7.10	94.7	2.3	4.0	3.78	94.5	2.9	nd	7.5	6.95	92.7	2.1	4.0	3.79	94.8	1.9
日落黄 Sunset yellow	nd	5.0	4.89	97.8	2.8	2.5	2.42	96.8	3.1	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
苯甲酸 Benzoic acid	nd	20.0	20.56	102.8	1.7	10.0	10.40	104.0	2.2	nd	20.0	18.70	93.5	1.6	10.0	9.43	94.3	1.8
山梨酸 Sorbic acid	23.27	20.0	43.97	103.5	1.5	10.0	33.38	101.1	2.4	nd	20.0	19.36	96.8	1.9	10.0	10.25	102.5	2.0
咖啡因 Caffeine	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	49.09	30.0	79.36	100.9	2.1	10.0	58.68	95.9	2.4
香兰素 Vanillin	33.11	50.0	84.56	102.9	2.5	20.0	51.85	93.7	3.1	nd	50.0	48.61	97.2	2.7	20.0	19.56	97.8	3.3
甜味素 Aspartame	nd	50.0	50.62	101.2	3.2	20.0	20.76	103.8	3.5	nd	50.0	46.55	93.1	3.0	20.0	18.38	91.9	3.7

nd 未检出(not detectable); - 未进行加标试验(without recovery test)

表 3 样品测定结果 (n = 3)

Table 3 Results of sample determinations (n = 3)

mg/kg

样品 Sample	胭脂红 Carmine	糖精 Saccharin	日落黄 Sunset yellow	苯甲酸 Benzoic acid	山梨酸 Sorbic acid	咖啡因 Caffeine	香兰素 Vanillin	甜味素 Aspartame
健力宝 Jianlibao drink	7.02	nd	17.58	80.70	nd	nd	nd	78.78
可口可乐 Coca-cola	nd	nd	nd	nd	nd	98.39	nd	nd
喜之郎果冻 Strong pudding	nd	nd	nd	nd	232.38	nd	35.64	nd
佳酿酱油 Jianiang soy sauce	nd	nd	nd	434.35	nd	nd	nd	nd

nd 未检出(not detectable)

从表 1 2 可知, 本体系灵敏度高, 样品稀释倍数大, 基质干扰小, 且回收率高, 精密度好, 样品重复测定 5 次, RSD 均小于 4%。食品中常见的色素都不干扰测定, 柠檬黄、苋菜红在溶剂前沿出峰, 亮蓝出峰较后, 且灵敏度较低, 不干扰测定, 赤藓红和对羟基苯甲酸乙酯、丙酯不被洗脱。故本法特别适合于日常食品样品的快速检测。

参考文献:

[1] ZHANG Ri-chun(章日春). China Public Health(中国

公共卫生), 1994, 10(4):176-178

[2] HUANG Shu-yun, BAI Yi-ping, HU Jia-ying, et al(黄淑云, 白怡平, 胡家英, 等). Journal of Environment and Health, Physical and Chemical Analysis of Food Hygienic(Special Issue, Vol. 7) 环境与健康杂志·食品卫生理化检验(第 7 集), 1995:49-51

[3] QIN Hua-juan(秦华娟). Journal of Environment and Health, Physical and Chemical Analysis of Food Hygienic(Special Issue, Vol. 7) 环境与健康杂志·食品卫

- 生理化检验(第7集)), 1995 67-69
- [4] YANG Yuan ,NANBA Yasuhiro ,FURUYA Yoshisuke (杨元,南波康朗,谷屋良典). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1993, 2(5):271-272
- [5] ZHONG Yu-min ,DONG Yu ,LI Wen-hui(仲渝民,董昱,李文惠). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1992, 2(5):275-277
- [6] ZHANG Ri-chun(章日春). Standard operating procedure of Zhejiang Province Sanitation and Antiepidemic Station, part of analysis method(浙江省卫生防疫站标准操作规程·检验方法分册). Hangzhou [s. n.] (杭州[出版者不详]), 1995. 283
- [7] Moors M, Teixeira C R R R, Jimidar M, et al. Anal Chim Acta, 1991, 255(1):177-186
- [8] XIAO Xue-cheng(肖学成). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1992, 2(6):381
- [9] WANG Jian-hua, WANG Ya-li(王建华,王亚丽). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 2000, 10(2):178-179
- [10] SHEN Xiao-wan(沈小婉). Chromatography applied in food analysis(色谱法在食品分析中的应用). Beijing: Peking University Press(北京:北京大学出版社), 1992. 152-158
- [11] LI Wen-yuan(栗文元). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1997, 7(6):340-342

Simultaneous Rapid Determination of Eight Food Additives in Foods by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Xiu-yao

(Pingyang County Sanitation and Antiepidemic Station, Pingyang 325400, China)

Abstract A simple and rapid method for the determination of eight food additives by RP-HPLC is described. They were saccharin, aspartame, benzoic acid, sorbic acid, vanillin, caffeine, carmine and sunset yellow. The experiments were carried on Shim-pack CLC-ODS (150 mm × 6.0 mm i. d.) with methanol-20 mmol/L NH₄Ac (44:56, V/V; pH 7.0) as the eluent at a flow rate of 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was fixed at 220 nm. The food samples, after precipitation of the impurities with Carrez reagent, were injected directly into the HPLC system. The average recoveries of all the eight additives were between 91.9%-108.5%, and the RSDs were lower than 4% (n = 5). The analysis of a single sample required only 8 min. This method has been successfully applied to the routine analysis of these additives in foods.

Key words high performance liquid chromatography; food; food additive