

实验技术与方法

毛细管气相色谱法测定食品中甜蜜素

齐惠萍,吕建明,王向纯,刘晓霞

(太原市疾病预防控制中心,山西 太原 030001)

摘要:目的 探讨气相色谱法测定食品中甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)的方法。方法 环己基氨基磺酸钠在硫酸介质中与亚硝酸钠反应后生成环己醇亚硝酸酯,正己烷提取,采用大口径毛细管柱 DM-FFAP(30 m×0.53 mm×0.5 μm)和氢火焰离子化检测器(FID)进行测定,外标法定量。结果 0.010~2.0 mg/ml 范围内线性关系良好,相对标准偏差为 3.2%~6.1%,加标回收率为 90.0%~105.2%。结论 该方法简便、快速、准确、稳定性好,适合食品中甜蜜素含量的测定。

关键词:气相色谱法;食品;甜蜜素

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0435-04

Detection of sodium cyclamate in food by capillary column gas chromatography

Qi Huiping, Lü Jianming, Wang Xiangchun, Liu Xiaoxia

(Taiyuan Center for Disease Control and Prevention, Shanxi Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To detect sodium cyclamate in food by gas chromatography method. **Methods** Sodium cyclamate was reacted with nitrite in sulfuric acid medium, the generated cyclohexanol nitrate was separated by large-diameter capillary column DM-FFAP (30m×0.53 mm×0.5 μm), and detected by GC-FID. **Results** The linear range was 0.010-2.0 mg/ml ($r = 0.9999$), the relative standard deviation was 3.2%-6.1%, and the recovery was 90.0%-105.2%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and more reliable for the determination of sodium cyclamate in food.

Key words: Gas chromatography; food; sodium cyclamate

环己基氨基磺酸钠又名甜蜜素,是一种水溶性新型甜味剂,由于其甜度为蔗糖的 30~50 倍,而价格仅为蔗糖的 3 倍,因而甜蜜素常与糖精按照 9:1 或者 10:1 的比例混合使用,这样可以使味道质量提高^[1],但其并无营养价值。20 世纪 70 年代初,有研究发现其有致癌性^[2],因此许多国家开始禁止使用甜蜜素,国家标准规定其使用限量为 0.65~8.0 g/kg^[3]。而一些企业在实际生产中并没有明确的规定,超量使用甜蜜素的情况经常出现,如何准确快速地测定食品中的甜蜜素就显得非常重要。

国标法 GB/T 5009.97—2003^[4] 采用填充柱作为分离柱,其检出限、分离效果、重现性都不是很理想^[5]。本文采用毛细管柱代替填充柱,相比国标法,结果准确、可靠,效果比较理想。本文同时对国标中的样品制备和前处理方法作了改进。

1 材料与方 法

收稿日期:2011-03-14

作者简介:齐惠萍 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:sxtyqhp@163.com

1.1 材料

太原市 2010 年市场抽检样品 40 份,其中酒类、蜜饯类、干果类、渍菜类各 10 份。

1.2 试剂

氯化钠、100 g/L 的硫酸溶液、50 g/L 的亚硝酸钠溶液,均为分析纯;正己烷(色谱纯);蒸馏水。环己基氨基磺酸钠标准品(纯度为 99.3%,购自中国计量科学研究院)。

1.3 仪器

岛津 GC-14C 气相色谱仪,氢火焰离子检测器, Labsolutions chromatography solution light 工作站,旋涡混合器,离心机。

1.4 方法

1.4.1 标准溶液制备

精确称取 0.1000 g 环己基氨基磺酸钠,加水溶解并定容至 10 ml,浓度为 10 mg/ml。

1.4.2 标准曲线制备

准确吸取 0.010、0.025、0.050、0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 ml 环己基磺酸钠标准溶液于 100 ml 具塞比色管中,加水至 20 ml,置冰浴中各加入 5 ml 50 g/L 亚硝酸钠溶液,5 ml 100 g/L 硫酸溶液,摇

匀,冰浴放置 30 min,并经常摇动,然后准确加入 10 ml 正己烷,5 g 氯化钠,摇匀后置漩涡混合器上振荡 1 min,待静止分层后吸出正己烷层于 10 ml 具塞比色管中低温保存,即得 0.010、0.025、0.050、0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 mg/ml 的甜蜜素标准曲线系列。

1.4.3 样品制备

液体样品(白酒、葡萄酒)摇匀后直接称取 5.0 g 于 100 ml 三角瓶中,用 40 g/L 的 NaOH 溶液调至碱性,在沸水浴中加热 15 min,转移至 100 ml 具塞比色管中,补水到 20 ml 左右。

固体样品用粉碎机打碎(蜜饯凉果类先去核剪碎),称取 5.0 ~ 10.0 g 样品于研钵中,加少许层海砂,研磨至干粉状,经漏斗转移到 100 ml 的容量瓶中不时振摇,1 h 后过滤,准确吸取 20 ml 滤液于 100 ml 具塞比色管中,放在冰浴中,加入 5.0 ml 100 g/L 的亚硝酸钠溶液,5.0 ml 100 g/L 的硫酸溶液,摇匀后放置于冰水混合物中 30 min,并经常摇动,然后加入 5 g 氯化钠和 10 ml 正己烷,漩涡混合器上振荡 1 min,葡萄酒、蜜饯等有乳化现象的样品,则手工振荡 80 次。待静止分层后吸出正己烷层,若样品乳化严重,则将正己烷层转入 10 ml 的具塞离心管 3 000 r/min 离心分离 10 min,取 1.0 μ l 上清液注入气相色谱仪进行测定。以保留时间定性,根据峰面积定量。

1.4.4 色谱条件

色谱柱 DM-FFAP 毛细管柱(30 m \times 0.53 mm \times 0.5 μ m),柱温 80 $^{\circ}$ C,进样温度 150 $^{\circ}$ C,检测器温度 150 $^{\circ}$ C,柱流量 1 ml/min,进样量 1 μ l,分流比 30:1,尾吹 40 ml/min,氢气 45 ml/min,空气 450 ml/min。

1.4.5 定性测定

在上述条件下,保留时间在 1.338 min 所出峰为环己基氨基磺酸钠。见图 1。

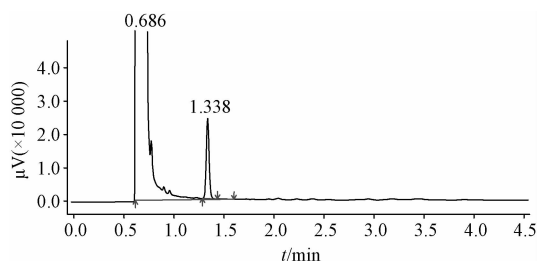


图 1 甜蜜素分离色谱图

Figure 1 Gas chromatogram of sodium cyclamate

1.4.6 定量测定

样品中甜蜜素的含量计算公式:

$$X = m_1 \times 10 \times 1000 / m \times V \times 1000 = 10m_1 / m \times V$$

式中: X——试样中环己基磺酸钠的含量, g/kg;

m——样品质量, g; V——进样体积, μ l; 10——正

己烷加入量, ml; m_1 ——测定用试样中环己基氨基磺酸钠的含量, μ g。

2 结果与分析

2.1 分析条件的优化

2.1.1 色谱柱

由填充柱改为毛细管柱。相对于填充柱而言,毛细管柱具有理论塔板数高、分析速度快的特点。用 FFAP 柱得到的环己基氨基磺酸钠峰形尖锐,其检测限更低,分析速度更快。

2.1.2 标准曲线制备的改进

国标采用单个标准管酯化衍生,进样 1 ~ 5 μ l 绘制标准曲线,当标准浓度变化或操作失误会导致整条曲线变化而不被发现。正己烷极易蒸发,不同的进样量会使样品在进样口的体积发生改变而导致分流的失真^[6],并且若该标准管在实验过程中出现某些误差将会直接影响到整批实验结果。本方法配 8 个不同浓度的甜蜜素标准系列同时进行衍生,可以通过回归计算抵消其中某管的误差,试样进样量与标准进样量相同,操作更科学规范,结果更为准确。

2.1.3 取样量前处理的改进

国标液体试样取 20.0 g,固体试样取 2.0 g,浸泡定容至 100.0 ml 后取 20.0 ml。实际取样量仅为 0.4 g,两者相差为 50 倍。这对标准曲线的选择带来了难度。并且国标标准曲线范围与取样量相比偏高,限量管多数不在标准曲线范围(1 ~ 5 mg/ml)内。

本方法调整了取样量和标准曲线范围,限量小于 0.65 g/L 的液体样品(葡萄酒)称取 5.0 g 后补水至 20 ml;限量小于 0.65 g/L 的固体样品(渍菜类)称取 10.0 g 粉碎混匀的样品于 100 ml 容量瓶中,浸泡 1 h 后取 20 ml;限量大于 1 g/L 的固体样品(蜜饯、活化及干果类)称取 5.0 g 粉碎混匀的样品于 100 ml 容量瓶中,浸泡 1 h 后取 20 ml。这样可保证限量管在标准曲线范围内(0.010 ~ 2.0 mg/ml),使得结果更加准确可靠。

2.1.4 冰浴的控制

正己烷提取液于室温放置 1 h 后甜蜜素峰值显著降低,可衰减 40% 左右。因其衍生物环己醇亚硝酸酯属于非极性、易挥发的低沸点化合物,所以从衍生化前即将反应试管置于冰浴中,冷却后再加试剂衍生。整个过程均在冰浴或冰箱中操作,保证低温的酯化完全,并应尽快分析,以减少不同时间测定样品分解率不同的误差。

2.1.5 标准稳定性测试

将高、中、低 3 个标准溶液配制后每日提取测

定,第1天提取的正己烷层放置并每日测定。结果显示,2.0和0.50 mg/ml两个浓度的标准溶液可稳定3 d。0.030 mg/ml的标准溶液使用时应现用现配,正己烷提取液最好在2 d内测完。否则随天数的增加,出现的杂峰也会逐渐增加。

2.1.6 对含酒精试样的处理

国标对含酒精的试样加40 g/L氢氧化钠溶液调至碱性,于沸水浴中加热除去,制成试样,然后再对试样称量取样。但是由于酒精含量和个人操作习惯的不同以及无法判定酒精是否除尽,使得经水浴加热后剩余样品的质量偏差很大,即造成检测结果偏高且平行性差。本方法改为先称取后除酒精,取样后调至碱性,沸水浴加热15 min,使得检测结果可真实反映样品的含量。

2.1.7 对易乳化试样及pH测试的处理

山楂类、红葡萄酒类样品在提取过程中极易乳化(红葡萄酒类样品的取样量在1~20 g均乳化),无法分层。即便个别样品静置后能析出极少量正己烷,其回收率也较低,为80%左右。如将乳化的正己烷层3 000 r/min离心10 min,即可解决不分层的问题。

在对红葡萄酒类样品除醇时,需要调pH至8左右。实验发现,只需用1 mol/L氢氧化钠将样品调至绿色,即可达到理想的pH值,简化了pH值的测试过程。

2.1.8 萃取方式

国标法任选旋涡混合和手工振摇之一萃取,实验发现萃取方式与回收率好坏密切相关。由于正己烷比重较小,所以在采用旋涡混合的过程中,不时将试管手工颠倒几次,利于有机相和水相的充分混匀,保证萃取效率,标准曲线的线性也较好。

2.1.9 试剂的纯度对测定的影响

在本实验中,亚硝酸钠和正己烷的纯度对试验结果影响较大。应采用分析纯以上的亚硝酸钠,正己烷也应使用色谱纯试剂。使用纯度不高的试剂,会造成提取液进毛细管色谱柱测定时出现许多杂峰,导致无法分辨出所需的待测物峰^[7]。

2.2 线性范围及检出限

以峰面积A对正己烷提取液的浓度C(mg/ml)作回归方程,得方程 $y = 111292.3x - 813.6$,相关系数 $r = 0.9999$,线性范围0~2.0 mg/ml。最小检出限以基线噪声的3倍对应的标准物质浓度为检出限,本方法检出限为0.010 mg/ml。

2.3 精密度测定

分别选用高中低3个浓度样品进行测定,每个浓度做9次平行测定,结果见表1。相对标准偏差为3.2%~6.1%,能满足实验要求。

表1 精密度实验结果

样品	浓度水平	浓度 (mg/ml)	平均值 (mg/ml)	标准差	RSD (%)
1	低浓度	0.030	0.033	0.002	6.1
2	中浓度	0.50	0.51	0.026	5.1
3	高浓度	1.0	0.98	0.031	3.2

2.4 加标回收试验

选取1个已知含量样品,分别加入标准曲线范围内高、中、低3个浓度的甜蜜素标准液,结果见表2。该方法的回收率为90.0%~105.2%,能满足分析要求。

表2 回收率实验结果

样品	本底值 (mg/ml)	加标量 (mg/ml)	测定值 (mg/ml)	回收率 (%)
1	0.428	0.030	0.455	90.0
		0.50	0.954	105.2
		1.0	1.39	96.2

2.5 样品测定

根据国家标准GB 2760—2007《食品添加剂使用卫生标准》对添加环己基氨基磺酸钠最高使用量的规定:配制酒、渍菜类为0.65 g/kg、蜜饯为1.0 g/kg、果丹及话化类为8.0 g/kg,烘焙或炒制的坚果与瓜子为2.0 g/kg。本次调查配制酒类10份样品中4份检出,2份超标;渍菜类10份样品中2份检出,1份超标;蜜饯、果丹及话化类10份中6份检出,均未超标;干果类10份样品中5份检出,1份超标。本次调查40份样品中共检出17份,超标4份,检出率为42.5%,超标率为10.0%。

3 结论

通过优化实验条件,使得采用大口径毛细管柱气相色谱法检测食品中甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)的方法更为科学。该法与国家标准GB/T 5009.97—2003《食品中氨基磺酸钠的测定》中填充柱气相色谱法相比具有检出限低、准确度和精密度较高、分析时间短、定量准确等优点,适合食品中甜蜜素的测定。

参考文献

- [1] 林娟. 食品中环己基氨基磺酸钠的气相色谱分析[J]. 科技创新导报, 2009(25):120.
- [2] 朱世明, 张建威, 祝美云, 等. 气相色谱法测定乳饮料中的甜蜜素含量[J]. 农产品加工. 学刊, 2009(3):167-169.
- [3] 卫生部. GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [4] 卫生部. GB/T 5009.97—2003 食品中氨基磺酸钠的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [5] 杨清群, 周成洪. 毛细管柱气相色谱法测定食品中甜蜜素

- [J]. 当代化工, 2007, 36(1): 89-91.
- [6] 鲁秋宏, 曹叶中. 食品中甜蜜素检测方法的改进[J]. 内蒙古农业科技, 2010(1): 62-63.
- [7] 郝文, 孙维, 唐岩. 食品中甜蜜素的毛细管气相色谱法[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1341.

实验技术与方法

时间分辨荧光免疫分析法测定莱克多巴胺

王超¹, 李志雄¹, 林冠峰², 吴英松^{1,2}

- (1. 中山大学达安基因股份有限公司, 广东 广州 510663;
2. 南方医科大学生物技术学院, 广东 广州 510515)

摘要:目的 用时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)方法测定莱克多巴胺(ractopamine, RAC)。方法 采用 RAC 与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物(RAC-BSA)包被 96 孔板为固相抗原, 与样品中游离的 RAC 共同竞争 Eu^{3+} 标记的抗 RAC 抗体, 用直接竞争法检测尿样中的 RAC, 并对此方法进行方法学评价。结果 分析灵敏度为 0.01 ng/ml; 剂量反应曲线线性相关系数绝对值 $|r| = 0.9985$; 回收率为 91.6% ~ 110.0%; 与多巴酚丁胺、异舒普林、沙美特罗、非诺特罗、克伦特罗、特布他林和沙丁胺醇 7 种药物的交叉反应率分别小于 0.8%、0.1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.01% 和 0.01%; 分析内相对标准偏差为 2.38% ~ 3.90%; 分析间相对标准偏差为 3.68% ~ 5.43%; 与进口 ELISA 试剂比较, 检测结果相关系数 $r = 0.928$ 。结论 莱克多巴胺时间分辨荧光免疫分析法灵敏度比 ELISA 分析法更高、稳定性更好, 具有良好的应用前景。

关键词: 莱克多巴胺; 时间分辨荧光免疫分析法; 免疫检验; 尿液; 食品安全

中图分类号: S852.43 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)05-0438-04

Test ractopamine with the method of time-resolved fluoroimmunoassay

Wang Chao, Li Zhixiong, Lin Guanfeng, Wu Yingsong

(Da An Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510663, China)

Abstract: **Objective** To test ractopamine with the method of time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) for the determination of. **Methods** RAC-BSA was coated by physical adsorption onto a 96 well microtitre plate, which was then competed with RAC in the sample for limited quantity of anti-RAC antibody labeled by Eu^{3+} . Ractopamine in urine could be determined by direct competition method. **Results** The assay sensitivity of the method was 0.01ng/ml. The correlation coefficient of dose-response curve was 0.9985. The recovery rate was 91.6%-110.0%. The cross reaction with dobutamine, isoxsuprine, salmeterol, fenoterol, clenbuterol, terbutaline and salbutamol was less than 0.8%, 0.1%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.01% and 0.01%, respectively. The variation coefficient of intra-assay was 2.38%-3.90%. The variation coefficient of inter-assay was 3.68%-5.43%. Compared with the imported RAC-ELISA kit, the correlation coefficient of the determined results was 0.928. **Conclusion** Compared with ELISA, the time-resolved fluoroimmunoassay for ractopamine offered higher sensitivity and good stability, and had a good prospect for application.

Key words: Ractopamine; time-resolved fluoroimmunoassay; immunoassay; urine; food safety

莱克多巴胺属于 β -类肾上腺素受体兴奋剂。该类药物添加于禽畜饲料中, 可加快畜禽的生长速度, 降低胴体脂肪含量, 使制造脂肪的养分转化为

肌肉蛋白, 从而提高瘦肉率和饲料报酬。当人类食用了含莱克多巴胺残留的动物内脏和肉品后, 常造成急性或慢性食物中毒, 中毒者表现为心慌、心跳加快、手颤、头晕等症状^[1-2]。近年来, 莱克多巴胺的非法使用现象日趋严重, 有必要对其检测方法进行研究。

目前莱克多巴胺的检测方法有很多种, 主要为色谱法和免疫分析法。色谱法如高效液相色谱法

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 广州抗体工程技术中心第一期建设计划(2005Z1-E4031)

作者简介: 王超 男 项目主管

通信作者: 吴英松 男 教授 硕士生导师 研究方向为分子诊断和抗体工程 E-mail: yingsongwu@hotmail.com