

25. 边野喜正夫, 他·食品卫生学·朝仓书店出版, 1979·
57.
26. 周桂莲, 等·副溶血性弧菌致病性的研究 I·中华微

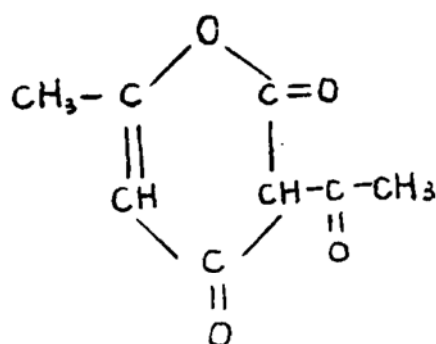
生物学和免疫学杂志 1982;2(5):299.

27. 大桥诚·食品よ媒介とする细菌性疾患の对策·食
品卫生研究. 1980;30(7):9.

食品中脱氢乙酸的测定方法

卫生部食品卫生监督检验所 王竹天综述 高鹤娟审检

脱氢乙酸(Dehydroacetic acid)的化学全名是3-乙酰基-6-甲基-1,2吡喃-2,4(3H)二酮 C3-acetyl-6-methyl-1,2nyran-2,4(3H)dione。英文缩写为 DHA, CA 编号为520-45-6, 化学结构式为:



脱氢乙酸为白色晶体, 具有酸味, 微溶于水, 在乙醇中溶解度最大, 为1g/35ml 是一种酸性防腐剂, 主要用于食品和化装品的防腐。

自40年代以来, Coleman 和 Wolf^[1]发现脱氢乙酸及其钠盐具有防腐作用以来, 脱氢乙酸防腐研究的报道便越来越多。1951年 Wolf^[2]观察了脱氢乙酸对十三种细菌, 六种真菌和一种酵母的防腐试验, 发现浓度在0.4~0.005%之间均有防腐作用, 并认为 PH 值对防腐作用的影响不太大。HaYashi^[3]使用防腐剂2,4,5-三氯苯酚(I)对羟基苯甲酸丁酯(II), 2-甲基2-萘酚(III)脱氢乙酸钠(IV), 山梨酸(V)五种防腐剂对真菌的抑制生长, 见表1。

表1 5种防腐剂抑制真菌生长效果比较

真菌	防腐剂最低抑制生长浓度(mg/L)				
	I	II	III	IV	V
互生毛霉	5	50	>10	10	50
黑色根霉	5	50	>10	10	50
日本根霉	5	50	5	10	50
米曲霉	<1	50	5	50	50
灰绿曲霉	<1	10	<1	50	50
黑色曲霉	<1	50	5	50	>100
灰绿青霉	<1	10	<1	50	50
淡黄青霉	<1	10	5	50	50
轮状青霉	<1	50	5	50	50
点青霉	<1	10	5	50	50
啤酒酵母	6	50	50	>1000	500

从表I看, 脱氢乙酸的防霉效果优于山梨酸, 与对羟基苯甲酸丁酯各有所长。其 I, II

二种物质是目前禁用防腐剂。Tsubouchi^[4]认为脱氢乙酸能阻止黄曲霉的生长和阻止产生

黄曲霉毒素 B₁ 但效果不如丙酸钙和山梨酸好。Cupta^[5] 却认为脱氢乙酸对抑制黄曲霉和寄生曲霉产毒的效果比抑制霉菌生长效果好。Julius^[6] 在这一方面作了更进一步的研究, 他认为脱氢乙酸能抑制霉菌的呼吸链, 阻止核酸前体的形成, 1mg/ml 的脱氢乙酸便能抑制霉菌的生长

随着脱氢乙酸在食品中的应用, 其毒性报道也逐渐增加, 一般报道脱氢乙酸经大鼠口服 LD₅₀ 在 1.25~1.5g/kg 左右。有关脱氢乙酸能否作为食品添加剂, 1963年 Barman^[7] 以 C₁₄ 标记的脱氢乙酸喂养大鼠, 家兔。发现脱氢乙酸在体内的主要代谢产物, 为羟基脱氢乙酸、三乙酸丙酯、和未转化的脱氢乙酸。脱氢乙酸在体内能迅速完全被动物组织吸收, 分散于血浆中, 能通过肾脏从尿中排出, 但较为缓慢。由于脱氢乙酸分子中乙酰基二旁酮基团的反应作用, 使脱氢乙酸可能与蛋白上的 NH₂—结合, 损害组织, Barman 认为脱氢乙酸不适合作为食品添加剂。1985年 Poipatina^[8] 作了大鼠的急性毒性实验, 口服 LD₅₀ 为 1250mg/kg, 他认为脱氢乙酸作为食品添加剂有毒性。日本学者在这方面做了大量研究, 认为控制使用脱氢乙酸及其钠盐对人体不会造成损害, 1985年国际毒理学协会^[9] 对脱氢乙酸及其钠盐作出最后评价, 认为是无毒级的。我国上海医大^[10] 也对脱氢乙酸作了毒性评价, 认为脱氢乙酸对人体是安全的, 本人认为控制使用脱氢乙酸对人体不会造成损害。1986年我国批准脱氢乙酸在食品中使用^[11]

食品中脱氢乙酸的测定, 包括以下几个步骤。

1 提取净化:

如何从食品中分离脱氢乙酸是分析测定的关键。一般常用的提取方法有水蒸汽蒸馏法(a)和有机溶液提取法(b)。(a)脱氢乙酸与它的钠盐经酸化后能从食品中分离随水蒸汽

蒸馏出来。常用的酸化剂有硫酸, 磷酸, 柠檬酸, 酒石酸等。一般对食品成份比较复杂, 含脂肪, 蛋白较多的样本, 如奶酪, 黄油, 人造黄油等可采用该法。Saito^[12] 认为蒸馏法操作简单, 不使用有机溶剂, 干扰物少, 优点突出。以高效液相色谱测定时一般可采用该法提取脱氢乙酸, (b)有机溶剂提取法, 由于脱氢乙酸在酸碱溶液中对有机溶剂有不同的分配系数, 利用这一特点, 从食品中分离脱氢乙酸。常用的有机溶剂有乙醚, 氯仿, 二氯甲烷, 石油醚—乙醚等, 有机溶剂提取比较快速, 对共存于食品中的多种防腐剂均能够测定。但对于富含脂肪, 蛋白较多的样本, 常有乳化现象产生。Danies^[13] 用二氯甲烷提取红酒时便产生严重的乳化现象, 无法进行测定。Masatake^[14] 认为使用较多的乙醚, 或增加盐离子含量能够防止乳化现象的产生。现在常用乙醚作为有机提取溶剂。另外 Tsuda^[15] 提取软饮料, 果汁中的脱氢乙酸, 山梨酸, 苯甲酸时便用了 QAE—Sephadex 离子交换柱作为分离柱, 以 PH9 的氢氧化铵—氯化铵缓冲液作为流动相, 收集第 40~90ml 溶液后再用乙醚—石油醚(1+1)提取, 脱氢乙酸的回收率为 90.3—94.3%。Fujiwara^[16] 用 Dowex 2×8cl 离子交换柱分离脱氢乙酸, 山梨酸, 对羟基苯甲酸酯及香兰素, 以甲醇为洗脱液, 也能较好地分离脱氢乙酸。Nagasawa^[17] 使用 1.7×50cm 装有 polyamide (woelm) 作为分离柱, 以水—乙酸—甲醇(5.5:0.4:4)为洗脱液, 成功地分离了脱氢乙酸, 山梨酸, 苯甲酸, 对羟基苯甲酸, 水杨酸。脱氢乙酸回收率达 95.5%。另外, Daniels^[13] 测定脱皮南瓜中的脱氢乙酸时, 先用三氯甲烷在振荡器上振荡 5min, 然后用离心机在 1500rpm 离心 10min 分出三氯甲烷, 再分离测定。值得一提的是 Sasaki^[18] 在测定果汁型的脱氢乙酸时发现在 25℃ 和 37℃ 时储存 7 个月的脱氢乙酸回收率仅有 30% 和 25%, 作者认为影响脱氢乙酸回

收率的物质有卫矛醇,甜味素,糖精钠,蔗糖,葡萄糖和柠檬酸,其中影响最大的是柠檬酸。黄伟坤^[19]在测定桔汁和腐乳中脱氢乙酸时储存8个月后,脱氢乙酸的含量仅有30%和4.6%

2 测定方法

早在1953年 Ramsey^[20]在测定奶酪中的脱氢乙酸时,以脱氢乙酸在碱性环境中与水杨醛反应呈红色(橙色)来定性。1973年 Piwowar^[21]先采用 TLC 分离技术分离脱氢乙酸,然后在板上割下脱氢乙酸斑点,用有机溶剂提取后,再利用上述反应来定性脱氢乙酸。1965年 Nakamura^[22]采用比色法测定脱氢乙酸,脱氢乙酸与2%硫酸铝反应在440nm处测定其吸光度,但山梨酸,水杨酸干扰测定。1968年 shitazaki^[23]把脱氢乙酸与乙酸-乙醚(1+1)溶液中加入6%硼酸乙酸酐溶液中,生成具有荧光的物质,最大吸收波长为330nm,校正发射波长为362nm,但丙烯酰胺,水杨酸和三氯化铁对本方法有干扰,随后 shitazaki^[24]改进本方法,使脱氢乙酸在77-88%硫酸溶液中与硼酸直接作用,生成具有荧光化合物。最大激发波长在370nm,校正波长在325nm。但仍然有上述物质的干扰。由于脱氢乙酸在307nm,225nm有最大吸收,因而在紫外测定时常常在这一范围选择吸收波长。Ramsey^[20]测定奶酪时在307nm处测定, Piwawa^[21]在测定水果,蔬菜的脱氢乙酸时也选择在307nm。

以上方法一般只能测定单一脱氢乙酸,对于多种防腐剂或其它干扰物共存时便无法测定。随着时代的发展,脱氢乙酸的检测技术经历了 TLC-GLC-HPLC 发展过程。

1 薄层色谱法(TLC法)

TLC测定

方法的主要问题是使脱氢乙酸在薄层板上与其它防腐剂分离,再利用其对紫外有吸收和显色剂来定性定量。Nagasawa^[17]在1969

年测定八种防腐剂时,使用双向展开技术并比较7种展开溶剂,其分离结果最好的是丙酮:水(5+5),正己烷-乙酸(8+2)或丙酮-水(5+5),乙酸-水(3+7)。这二种展开剂均能够把八种防腐剂完全分离。作者同时比较了聚酰胺板和硅胶板,认为前者分离效果比后者好,而且检测灵敏度高,聚酰胺板最低能检出2μg,比硅胶板高十倍。特异,灵敏的显色剂也是分离定性的重要手段,Tjan^[25]在硅胶G板上使用三种含氮的展开溶剂分离12种防腐剂,其中对氯苯甲酸和脱氢乙酸的Rf值非常接近,作者以溴甲酚红紫作为显色剂在紫外灯下观察,对氯苯甲酸显出荧光斑点,脱氢乙酸出现黑色斑点。常用显色剂有二氯荧光黄,三氯化铁,甲酚红紫,甲基红,氮联苯胺^[17,25,26]

2 气相色谱法(GLC法)

GLC法是目前最常用测定食品中脱氢乙酸的方法。由于脱氢乙酸对氢火焰离子化检测器具有很好的响应,一般都采用FID作为检测器,不需衍化直接测定。GLC测定的关键是如何选择分离度高的固定相。1965年 Nishimoto^[27]采用5%DEGS+1%磷酸分离山梨酸,脱氢乙酸,对羟基苯甲酸,对羟基苯甲酸丁酯,以乙酰苯胺为内标,分离效果很好,脱氢乙酸的回收率为73.4~99.9%。Amano^[28]在同时测定山梨酸,苯甲酸水杨酸,脱氢乙酸和对羟基苯甲酸酯类时比较了硅油DC-550,“阿匹松”润滑脂M,聚乙二醇,聚二乙二醇,聚1,4-丁二醇丁二酸酯和吐温20六种固定液的分离效果,认为聚1,4-丁二醇丁二酸酯的分离效果最好。并认为磷酸能够阻止酸性化合物的拖尾现象。随后在分离脱氢乙酸、山梨酸,苯甲酸时常常在色谱柱中加入磷酸以增加固定相的极性。Tcyoda^[29]在测定奶酪、黄油、酒、腌制品;Tsuda^[15]在测定软饮料和果汁中的脱氢乙酸时均采用5%DEGS+1%磷酸为分离柱。该方法也被日本

厚生省推荐为日本分析方法^[30]。1984年 Nakamura^[30]测定人造黄油中脱氢乙酸时,以5%Thermon-1000+5%磷酸为分离柱,最低能检出5ug/10ml 脱氢乙酸。Daniels^[13]测定脱皮南瓜,酒中脱氢乙酸以5%Cartowax-20-tererhtha-licacid 为固定相,以二乙基酚(DPP)为内标,脱氢乙酸的回收率达99-104%。1984年 Yu^[32]测定植物油中脱氢乙酸,BHT,BHA,TBHQ 时用毛细管分离技术,用25m 长石英玻璃毛细管柱涂以5%Phenymethylsilicone,其分离效果非常好,重视性很高,脱氢乙酸的最低检出量0.5PPm 现将 GLC 测定食品中脱氢乙酸的方法列表2。

3 高效液相色谱法(HPLC 法)

HPLC 法越来越多地应用于测定食品中的脱氢乙酸,它分析速度快,准确度高,尤其对于共存于食品中的多种防腐剂都能够很好地分离测定。对于成份较为简单的样本如清凉饮料,酒等可不经提取净化,直接进样测定。^[33]一般以 HPLC 方法测定脱氢乙酸时常采用蒸馏法。测定时,常用紫外检测器。由于脱氢乙酸在225,235,307nm 处有最大吸收峰,最适检测波长一般都在此范围内选择,由于脱氢乙酸在 HPLC 分析过程中会出现拖尾现象,故常加入一些物质以促使脱氢乙酸的分离。Saito^[12]在流动相中加入四丁基胺使脱氢乙酸和山梨酸完全分离。Ikai^[34]使用丙

酮酸来阻止脱氢乙酸的拖尾现象。并认为其效果优于磷酸,乙酸等其它9种有机酸。PH 值对脱氢乙酸的分离影响也是很重要的,不同的流动相对 PH 值的要求不同,kato^[35]以甲醇水为流动相,比较了不同 PH 值的磷酸缓冲液,得其结果是 PH7 的分离效果最好。Saito^[13]使用甲醇:磷酸缓冲液(3+7)作流动相,PH7.2 时分离效果最佳。Welling^[33]以乙腈作流动相,PH 值在4-5 时分离效果最好。1988年 Ikai^[34]在同时分离九种食品防腐剂时,用反相离子色谱柱,以甲醇:乙腈:丙酮酸(1.5+1+3.1)为流动相,加入氯化十六烷三甲基胺作为离子对试剂,着重从丙酮酸的作用,离子对试剂的作用,甲醇,乙腈比例,有机溶液水溶液比例四个方面作了深入的研究。并发现氯化十六烷三甲基胺(CTA)具有增加山梨酸,脱氢乙酸,苯甲酸,糖精在分离柱的保留时间,促使它们完全分离。同时找出甲醇:乙腈在1.5:1.0 时分离效果最好,该方法能在18min 内有效地分离山梨酸,脱氢乙酸,苯甲酸,糖精钠和五种对羟基苯甲酸脂类。表3列出食品中脱氢乙酸的高效液相色谱分析方法。

3 结论

脱氢乙酸的测定方法已有很多,以气相色谱法和高效液相色谱法应用最多,其它方法不能适应现代分析。而高效液相色谱法是今后的发展方向。

表2 GLC 测定食品中 DHA 的方法

样 品	提 取 净 化	分 离 柱 类 型	回 收 率 (%)	检 测 器	参 考 文 献
果 酱	石油醚—乙醚	5%DEGS+1%H ₃ PO ₄ Chromosorbw	73.4~99.9	FID	27
奶 酪	水蒸汽蒸馏后	5%DEGS+1%H ₃ PO ₄ Chromosorbw	86~92.8	FID	39
人造黄油	用乙醚提取	5%DEGS+1%H ₃ PO ₄ Chromosorbw	86~99	FID	14
奶 酪	乙 醚	5%DEGS+1%H ₃ PO ₄ Chromosorbw			
黄 油 等	QAE-Sephadex	5%DEGS+1%H ₃ PO ₄ Chromosorbw	90.3~94.3	FID	15
软饮料	NHOH-NH ₄ CL				
果 汁	洗脱后(1+1) 石油醚—乙醚	Chromosorbw			
酒,脱		5%Iarbowax20M			
皮南瓜	三氯甲烷	+terephthalicacia Chromosorbw-HP	93~104		13
植 物 油	直接进样	石英玻璃毛细管柱 5%phengmethgl silicone	—	FID	32
人造奶油	蒸馏法	5%Thermon1000			
黄 油		+3%H ₃ PO ₄ Chromosorbwaw—DMCS	95~105	FID	3

表3 HDLC 测定食品中 DHA 方法

样 品	提 取 净 化	分 离 柱 类 型	流 动 相	检 测 器	参 考 文 献
奶 酪	蒸馏	LichRosobRP18	甲醇:水	UV235	12
酒	直接进样	Lichrosorb10NH ₂	乙腈:乙酸钠	UV307	33
酱油,果汁	乙醚	Nucleosil3c18	甲醇:乙腈:丙酮 酸	UV233	34
人造奶油	蒸馏	UnisilQ18	乙酸—乙酸钠 —甲醇	UV225	38
腌制品	蒸馏	Ncigelck/ga	0.1%磷酸	UV235	36
酒,软饮					
料,腌制	蒸馏	Finepaksilic18	甲醇:水	UV330	37
蔬菜				270	

参 考 文 献

- [1] Coleman G. Handwolf. a. us patent 2. 474, 228
- [2] Wolf P. ACA 1951, 45, 3908
- [3] Hayashi T. CA 1958, 52, 16652
- [4] Tsulouchi H. CA 1981, 95, 60042
- [5] Gupta S. R Bull. Nutr. Conf. Am. Toxicol. 1976, 15 (4), 447—453.
- [6] Julius S. CA 1976, 85, 105181
- [7] Barman T. E. Toxicol. Arp. in Pharmacol. 1968, 5, 545—568
- [8] nrinatinal L. SCA 1987, 106, 100978
- [9] Registry of Toxic Effects of Chemicals at Stance. 1985~1986, 69, 367
- [10] 上海医大·脱氢乙酸毒性报告(内部资料)
- [11] GB2760-86 北京:中国标准出版社.
- [12] Saito, et al. J. AoAc. 1987, 70(3), 507—509
- [13] Daniels D. H. J. AoAc. 66(4), 893-895
- [14] Masatake T. CA 1978, 88, 35948
- [15] Tsuda T. et al. J. AoAc 1985, 68, (5) 902-905
- [16] Fujiwara M. CA. 34039 75
- [17] Nagasawa K. J. Chromatogr. 1969 43, 473--479
- [18] Sasaki K. CA 75, 150420
- [19] 黄伟坤·工业微生物 1986, 16(3), 37—39
- [20] Ramsey L. L. J. Asso. of official Agric Chem 1953. 5 744-748
- [21] piwpoar T. S. J. AoAc 1973, 56, 1270-1272
- [22] Nakamura Y. CA 1963, 63, 17152
- [23] Shitazaki T. CA 1968, 69, 64463