

高压液相色谱法测定蜜饯食品中色素、防腐剂和甜味剂

张 莹 杨大进 方从容 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

吴述琇 孙 淳 王心宇 北京市卫生防疫站 (100013)

在蜜饯生产中常需要添加色素、甜味剂和防腐剂,国家标准理化检验方法中测定这三类添加剂的首选方法是薄层色谱法^[1],但薄层色谱法仅是半定量方法,加之蜜饯食品往往因高糖、高果胶、高淀粉,检测添加剂时提取困难,使测定结果不准确。我们参考有关资料,提出分别适用于蜜饯食品色素、甜味剂和防腐剂的样品前处理方法和高压液相色谱(HPLC)测定法。该法与导数分光光度法比较结果一致。具有较好的准确度和精密度。

1 色素的测定

1.1 材料

1.1.1 试剂和材料

聚酰胺粉 200 目。

甲醇—甲酸 6+4。

200g/l 柠檬酸溶液 20g 柠檬酸用水定容至 100ml。

乙醇—氨溶液 取 1ml 氨水,加 70% 乙醇至 100ml。

pH6 的水 用 20% 柠檬酸调节蒸馏水 pH 至 6。

10g/l α -淀粉酶溶液 称 1g α -淀粉酶用水定容至 100ml。此溶液临用时配制。

色素标准溶液 精确称取胭脂红、苋菜红、柠檬黄、亮蓝色素各 0.100g,用 pH6 的水溶解,移入 100ml 容量瓶中并稀释至刻度。此溶液每 ml 相当于 1mg 商品色素。

色素标准使用液 临用时吸取上述 4 种色素标准溶液各 5.0ml,分别置于 50ml 容量瓶中,加 pH6 的水稀释至刻度。此溶液每 ml 相当于 0.1mg 商品色素。

0.02mol/l 乙酸铵溶液 称取 1.54g 乙酸铵,加水至 1000ml。

1.1.2 仪器、设备

高压液相色谱仪 Tracor 900 型。

微量注射器。

1.1.3 分析步骤

样品处理 称取 2.5g(视样品中色素含量多少而定)均碎的样品,置于 100ml 三角烧瓶中,加入 30ml 水,用 200g/l 的柠檬酸调节 pH 至 5 左右后盖上瓶塞,置于水浴锅中加热至 88—90℃,加入 5ml 10g/l α -淀粉酶溶液,保温 10min,再用 200g/l 柠檬酸调 pH 至 3—4,此时会出现絮状沉淀。加热煮沸使酶失活。

吸附分离 称 0.5—1g 聚酰胺粉(根据样品中的色素量而定),置于 10ml 小烧杯中,用少量水调浆后加入上述溶液中,充分搅拌,使样品中的色素完全被吸附。将吸附色素的聚酰胺全部转入 G₃垂融漏斗中,先用 150ml 70℃ pH 为 6 的酸水洗,再用丙酮和 95% 乙醇各洗三次,然后用甲醇—甲酸洗至滤出液无色为止,再用 10ml 甲醇充分洗涤之。用 300ml 70℃ 水洗至滤出液 pH 与原蒸馏水相同为止。用乙醇—氨溶液分次解吸全部色素并收集之。将色素解吸液置于小瓷蒸发皿中,置于水浴上驱氨,浓缩至一定体积,然后用 200g/l 柠檬酸调至 pH6 左右,移入 5ml 容量瓶稀释至刻度。

色谱条件

色谱柱 Shim-Pack CLC-ODS

流动相 甲醇 0.02mol/l 乙酸铵

流速 1.0ml/min

检测器 紫外检测器

记录器量程 1mv

纸速 5mm/min

样品分析 经滤膜 (HA 0.45 μ m) 过滤, 取 20 μ l 进高压液相色谱仪, 与标准的保留时间和峰高比较, 进行定性和定量。



图1 人工合成色素色谱图

1. 柠檬黄 2. 苋菜红 3. 胭脂红

样品的前处理实验

在提取蜜饯食品中色素时用 10g/l α -淀粉酶溶液水解淀粉, 用丙酮和乙醇溶解明胶和果胶, 因为若不去除这三种物质, 则会在抽滤的漏斗底部形成一层致密的薄膜, 影响抽滤。如按国标方法, 一般一个样品提取完成需 2 天半的时间, 而且有的色素也会因长时间的紫外线照射而褪色, 采用改进后的方法仅用一小时左右, 大大缩短所用的时间, 使用这些试剂不影响结果。

高压液相色谱分析条件的选择

蜜饯食品中常用的色素有四种, 它们分别是胭脂红、苋菜红、柠檬黄和亮蓝。在本实验仪器不具备梯度洗脱的情况下, 选用合适的色谱分析条件如表 1。

根据选择的分析条件对标准系列进行检测, 在 0.02 — 0.40g/Kg 浓度范围内线性方程相关系数均大于 0.9998, 线性好, 可以用保留时间和峰高进行定性、定量分析。

1.2 结果与讨论

表1 四种色素的色谱分析条件

色 素	流动相条件	检测波长 (nm)	保留时间	灵敏度
胭脂红	甲醇 / 0.02mol/l 乙酸铵 21/79	510	10'10"	0.04
苋菜红	同上	510	4'47"	0.04
柠檬黄	同上	510	4'33"	0.08
亮 蓝	甲醇 / 0.02mol/l 乙酸铵 45/55	630	8'27"	0.04

不同分析方法结果比较

表2 两种食品色素测定方法的比较

样品名称	色 素	高效液相法 (g/Kg)	导数分光光度法 (g/Kg)
山楂蛋白脯	胭脂红	0.1480	0.147
山 楂 片	胭脂红	0.0300	0.029
京 糕 条	苋菜红	0.0875	0.087
青 梅	柠檬黄	0.0217	0.023
	亮 蓝	0.0463	0.047
绿地瓜脯	柠檬黄	0.0255	0.024
	亮 蓝	0.0319	0.031

注: 导数分光光度法由北京大学化学系同时测定。

方法的最小检出浓度

采用本方法, 苋菜红、胭脂红、柠檬黄、亮蓝的最小检出浓度依次为 3.50、

4.82、5.82、8.24mg/Kg。此最小检出浓度较允许残留量低很多, 完全可以满足色素残留量测定要求。

方法的准确度和精密度

为检验前处理方法的准确度,对四种色素分别进行三个加标水平的6次回收率测定,测定结果见表3。在对精密度进行测定时采用京糕条,对样品本身测定6次的变异系数为4.92%。准确度和精密度均符合化学分析的要求。

表3 四种色素的准确度结果

样品名称	色素	加入水平 (mg)	平均回收率 (%)	CV (%)
山楂蛋白脯	胭脂红	0.1	98.7 ± 4.20	4.26
		0.4	94.4 ± 3.84	4.07
		0.8	90.1 ± 3.55	3.94
京糕条	苋菜红	0.1	92.7 ± 2.67	2.88
		0.3	96.3 ± 4.61	4.79
		0.6	94.9 ± 2.10	2.21
绿地瓜脯	柠檬黄	0.05	91.9 ± 6.84	7.44
		0.1	95.4 ± 4.15	4.35
		0.5	95.6 ± 2.17	2.27
亮蓝	亮蓝	0.05	93.6 ± 5.42	5.79
		0.1	91.7 ± 3.96	4.32
		0.5	96.5 ± 3.44	3.56

2 防腐剂和甜味剂的测定

2.1 材料和方法

2.1.1 试剂

0.02mol/l 乙酸铵溶液 称取 1.54g 乙酸铵,加水至 1000ml。

苯甲酸标准溶液 称取 0.1000g 苯甲酸,用少量乙醇溶解后移入 100ml 容量瓶中,并稀释至刻度,此溶液浓度相当于 1mg/ml。

山梨酸标准溶液 称取 0.1000g 山梨酸,用少量乙醇溶解后移入 100ml 容量瓶中,并稀释至刻度,此溶液浓度相当于 1mg/ml。

糖精钠标准溶液 称取 0.0851g 经 120℃ 烘干 4 小时后的无水糖精钠,用少量水溶解后移入 100ml 容量瓶中,并稀释至刻度,此溶液浓度相当于 1mg/ml。

苯甲酸、山梨酸、糖精钠标准混合溶液 取苯甲酸、山梨酸、糖精钠标准溶液各

10.0ml,放入 100ml 容量瓶中,加水至刻度,此溶液含苯甲酸、山梨酸、糖精钠各 0.1mg/ml。

2.1.2 仪器、设备

高压液相色谱仪 Tracor 900 型。

微量注射器。

分析步骤

样品处理 称取 2.5g 样品(视样品本身含量而定),放入研钵中。量取 20ml 水,先用少量水进行研磨,再用余下的水将研钵内所有样品转移至 50ml 比色管中。

提取 向比色管中先加 3ml 磷酸,再准确加 20ml 乙醚,连同比色管一同称重。然后猛烈振摇 2min,再次称重,如量减少,则加乙醚至原量,混匀,放置分层。吸取 10ml 乙醚入 10ml 比色管中,在约 40℃ 水浴上挥干。用高压液相的流动相(甲醇:0.02mol/l 乙酸铵 = 10:90)定容至 5ml。

色谱条件

色谱柱 shim-pack CLC-ODS

流动相 甲醇 0.02mol/l 乙酸铵 = 10:9

流速 1.4ml/min

检测器 紫外检测器, 215nm 波长,灵敏度为 0.02AUFs。

记录器量程 20mV

纸速 5mm/min

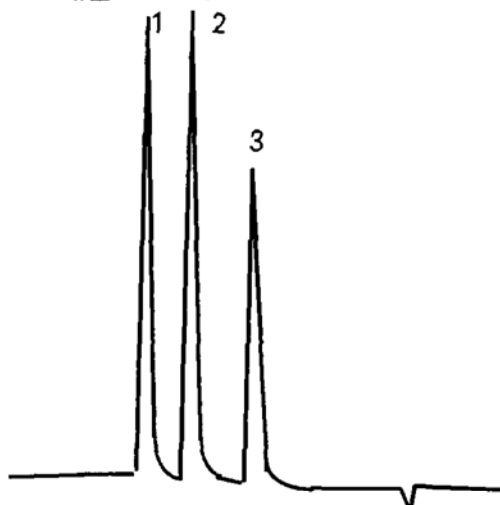


图2 苯甲酸、山梨酸、糖精钠色谱图

1. 苯甲酸 2. 山梨酸 3. 糖精钠

2.1.3 样品分析

经滤膜 (HA 0.45 μ m) 过滤, 取 20 μ l 注入高压液相色谱仪, 与标准的保留时间和峰高比较, 进行定性和定量。

2.2 结果与讨论

样品的前处理实验

为了检验所改进的前处理方法, 进行了加碱法 (先以 4.4ml 4% 氢氧化钠溶液进行研磨, 再用 15.6ml 水转移) 及国标方法中的前处理方法, 三种前处理方法的比较表明其结果是一致的。而我们所确定的方法具有所用试剂少, 步骤简单等优点。三种方法的比较见表 4。

表 4 几种前处理方法的比较

样 品 名 称	所用添加剂	含量 (g/Kg)		
		磷酸—乙醚法	国标法	加碱法
杏化梅	糖精钠	4.3795	4.3740	4.3768
卫 生 槐	糖精钠	0.1266	0.1269	0.1264

目的仪器条件的情况, 经过选择的最佳色谱分析条件, 能够很好地分离检测这三种物质。苯甲酸的保留时间为 4'33", 山梨酸为 5'47", 糖精钠为 6'35"。根据选择的分析条件对标准系列进行检测, 在 0.02—0.80g/Kg 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均在 0.999 以上。

时间和峰高进行定性和定量分析。

方法的最小检出浓度

采用本法, 苯甲酸、山梨酸、糖精钠的最小检出浓度依次为 13.99、2.19、11.14mg/Kg, 此最小检出浓度较允许残留至少低一个数量级, 完全满足防腐剂、甜味剂残留量测定的要求。

表 5 三种添加剂的准确度结果

样 品 名 称	添加剂	加入水平 (mg)	平均回收率 (%)	CV (%)
川贝柠檬李	糖精钠	0.4	94.6 $\pm$ 6.72	7.10
		0.8	98.2 $\pm$ 5.05	5.14
		1.2	90.9 $\pm$ 4.21	4.63
	山梨酸	0.1	95.9 $\pm$ 2.24	2.34
		0.2	92.3 $\pm$ 3.62	3.92
		0.3	94.3 $\pm$ 3.11	3.30
卫 生 槐	苯甲酸	0.1	96.6 $\pm$ 3.72	3.85
		0.3	97.5 $\pm$ 4.67	4.79

收率测定, 以确定本方法的准确度, 结果见表 5。在测定方法的精密度时, 对川贝柠檬李样品自身测定 6 次的变异系数分别为 1.56%、2.58%, 对回收率 6 次测定的变异系数见表 5。本方法的准确度和精密度均符合化