

综述

铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠含量测定方法研究进展

郭 忠 李 彦 张文德

(河北省唐山市疾病预防控制中心,河北 唐山 063000)

摘 要:综述了几年来国内铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠的检测方法。科学评价了分光光度法、原子吸收法、极谱法、毛细管区带电泳法、高效液相色谱法、样品背景颜色的校正以及测定结果的卫生学意义。

关键词:铁强化酱油;乙二胺四乙酸铁钠;检测方法;综述

Progress in Assay Methods for Detecting NaFeEDTA in Iron Fortified Soy Sauce

GUO Zhong, LI Yan, ZHANG Wen-de

(Tangshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: To review the assay methods for detecting NaFeEDTA in iron fortified soy sauce. Spectrophotometry, atomic absorption spectrometry, oscillopolarography, capillary zone electrophoresis, high performance liquid chromatography, correcting background color of samples and the hygienic significance of detected results were evaluated.

Key words: Iron Fortified Soy Sauce;NaFeEDTA;Determination Method;Review

乙二胺四乙酸铁钠(NaFeEDTA)作为强化酱油中铁的补充剂,已被纳入 GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准。在推广铁强化酱油的实施计划过程中,为了保障铁强化酱油产品质量符合国家标准,相继研究出测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量的分光光度法^[1-7]、原子吸收法(AAS)^[10]、高效液相色谱法(HPLC)^[13]、毛细管区带电泳法^[14,15](CZE)和单扫示波极谱法^[11]等。本文就近几年国内铁强化酱油中 NaFeEDTA 检验方法进展作一评述。

1 检测方法

1.1 分光光度法

分光光度法具有操作简便、成本较低、便于基层推广的特点,最先成为测定铁强化酱油 NaFeEDTA 的方法。苗虹等^[1]较早报道了直接紫外分光光度法,其原理利用 NaFeEDTA 在波长 256 nm 处的强紫外吸收与其浓度的线性关系,测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量,线性范围为 0.4~4.0 μg/ml,样品加标回收率为 95%~107%,相对标准偏差(RSD)为

标准,考虑到大部分散装干笋(80%)SO₂残留量在 0.5 g/kg 以下,参照干制蔬菜(0.2 g/kg)等食品的国家标准,散装干笋的 SO₂ 国家标准定为 0.5 g/kg 较为合理。

散装水发竹笋的 SO₂ 可以直接测定,建议国家标准定到 0.15 g/kg 更为科学。

试验证明袋装浸泡竹笋的 SO₂ 也可以直接测定,建议国家标准定为 0.15 g/kg 为宜。

参考文献

- [1] 卫生部卫生监督中心卫生标准处. 食品卫生标准及相关法规汇编(上)[M]. 北京:中国标准出版社,2005:7.
- [2] 卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [3] 卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.34—2003 食品中亚硫酸盐的测定[S].
- [4] 王竹天,杨大进,吴永宁. 食品卫生检验方法(理化部分)注解(下)[M]. 北京:中国标准出版社,2008:42-50.

[收稿日期:2009-04-29]

中图分类号:R194;O622.7;S644.2

文献标识码:C

文章编号:1004-8456(2009)06-0548-03

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(05276101D-6)

作者简介:郭 忠 男 副主任技师

通讯作者:张文德 男 主任技师

4.0 % ($n = 5$)。该法尽管操作简便,样品直接稀释,不用处理,但由于酱油在紫外波长处存在的干扰物质较多,实际工作中很难找到作校正空白的相同酱油,因此,直接紫外光度法准确测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量还存在局限性。后来黄建等^[2]开发了测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量的定量方法,原理是在 $\text{pH} > 0.5$ 的酸性条件下,酱油中 NaFeEDTA 完全离解出游离的 Fe^{3+} , Fe^{3+} 与显色剂硫氰酸铵反应生成红色配合物,在最大吸收波长 480 nm 处测量总铁含量,然后减去在中性条件下测得强化酱油本底中游离 Fe^{3+} 和颜色背景吸光度之差来计算试样中 NaFeEDTA 含量。该法优点是,样品采用甲醇沉淀处理,简便实用;酱油中共存物质的影响通过不经酸化的样品作空白校正予以扣除;此法克服了直接紫外光度法的不足。强化酱油中 NaFeEDTA 的线性范围为 4 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,样品加标回收率为 95 % ~ 110 %, RSD 为 0.8 % ($n = 6$)。2007 年该法被列为推荐性国家标准检验方法(第二法 比色法)^[3]。之前也有人^[4]尝试对硫氰酸铵法进行改进,用已知未强化 NaFeEDTA 的同等级酱油作样品消除底色的干扰,老抽酱油样品加标回收率可以达到 100.4 % ~ 106.4 %, RSD 为 2.0 %。但在实际检测工作中是无法找到未强化 NaFeEDTA 的同等级酱油样品的。

硫氰酸盐比色法测定铁是一种经典的传统方法,但方法的最大缺点是所生成的红色配合物在水相中不够稳定,通常使用有机溶剂作支持溶液^[5]。但使用大量的有机溶剂不仅会增加测定成本,而且对环境带来一定污染。因此,为了改善这种测定条件,张文德等^[6,7]对硫氰酸铵法做了两个方面的改进,一种方法是显色剂以硫氰酸钾替代硫氰酸铵,以 TritonX-100 作增溶剂替代有机溶剂,以氯胺 T 作氧化剂,在最大吸收波长 490 nm 条件下测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量。结果,NaFeEDTA 浓度在 20 ~ 200 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ 范围与吸光度之间呈线性关系,相关系数为 0.999 9,检出限为 2 μg 。样品的加标回收率为 93.9 % ~ 106.5 %, RSD 为 0.5 % ~ 3.7 %。由于引入了 TritonX-100,方法有增敏增稳作用,灵敏度提高 1 倍。其次,硫氰酸钾的熔点、水溶性、分解温度比硫氰酸铵高^[8],用硫氰酸钾作显色剂不仅稳定性好,容易保存,而且试剂空白值也很小。另一种方法是在原有方法的基础上又作了改进,样品不用处理,在胶束增溶体系下,直接取微量样品测定,结果,与标准方法的测定值是一致的。改进后反应时间大大缩短,检测速度加快,耗材更少,全部操作过程仅需 2 ~ 5 min 即可完成。样品加标回收率为 98.5 % ~ 107.9 %, RSD 为 1.4 % ~ 5.1 %。此法成为当前测

定铁强化酱油中 NaFeEDTA 最为简便的光度方法。解立斌等^[9]在硫氰酸盐方法基础上,探讨了在降低样品取样量、减少试剂用量方面的可行性,同时优化了显色体系的条件,对硫氰酸铵比色法有了新的改进,改进后的方法操作简便,进一步缩短了检测时间。

1.2 原子吸收法

蒋瑾华等^[10]较早报道了用微波消化-火焰原子吸收法测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量,检出限为 0.048 $\mu\text{g}/\text{ml}$,回收率为 98 % ~ 104 %, RSD 为 3.3 %。该法虽然不存在酱油本身有色物质的干扰问题,但本底铁无法扣除,结果只能以测定的总铁来计算,这样当对测定结果或产品进行卫生学评价时不能作出准确的判断。

1.3 示波极谱法

李彦等^[11]报道了用单扫示波极谱法快速测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量的分析方法,原理是在 0.01 mol/L 酒石酸钾钠-乙二胺底液中,NaFeEDTA 在峰电位 $E_p - 1.67\text{ V (vs SCE)}$ 处产生灵敏的二阶导数极谱还原波,波高 $H(ip/\mu\text{A})$ 与 NaFeEDTA 的浓度呈正比,检出限为 0.1 mg/L,NaFeEDTA 的线性范围为 0.1 ~ 5.0 mg/L,样品加标回收率为 88.8 % ~ 112.0 %, RSD 为 1.5 % ~ 4.0 %,与标准方法(比色法)比较结果是一致的^[12]。该法特点:1、由于酱油本身的颜色及共存物质对波峰无影响,因而样品可以不处理;2、取样量少,样品不用稀释,减少了样品稀释造成的误差;3、测定速度快,每样测定仅需 3 ~ 5 min。4、通过观察酱油中 NaFeEDTA 的极谱还原波的动态扫描过程,还可以区别强化的是不是 NaFeEDTA。

1.4 高效液相色谱法

魏峰等^[13]建立了用反相离子对高效液相色谱法(reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography, HPLC)分离和测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 的方法。样品经甲醇沉淀后,以 Zorbax C₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm)进行分离,以含 12.5 % 甲醇、0.13 % 四丁基氢氧化铵和 0.052 % 甲酸的水溶液($\text{pH} 3.5$)作流动相,在检测波长 254 nm 进行测量,样品加标回收率为 94.1 % ~ 101.5 %,重复测量峰面积的 RSD ($n = 6$) 为 0.89 %,NaFeEDTA 的最低检出限为 0.03 mg/L。该法是以 FeEDTA^- 形式进行计量的,因此可以作铁强化酱油中 NaFeEDTA 的形态分析。所以该法对铁强化酱油的质量控制和监测及卫生学评价都具有重要的意义。2007 年该法被列为国标法(第一法 高效液相色谱法)^[3]。

1.5 毛细管区带电泳法

魏峰等^[14]还建立了用毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)分离技术测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 的方法。该法在 25kV 电压下阳极端检测,采用含有 30 mmol/L 柠檬酸、20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、0.15 mmol/L 十二烷基溴化铵和 0.05 mmol/L 十二烷基硫酸钠的缓冲溶液作为分离介质、254 nm 紫外检测器检测,样品稀释后直接测定,精密度和准确度较高,重复测定($n=6$)的 RSD 为 2.15%,样品平均加标回收率为 94.3%~101.2%。NaFeEDTA 的最低检出限为 4 $\mu\text{g/ml}$ 。该法与硫氰酸铵比色法比较,结果是一致的。但该法更适宜作为强化酱油中 NaFeEDTA 的形态分析。唐美华等^[15]选择的分离和测定条件为:采用 pH=9.0,20 mmol/L 硼酸盐缓冲体系,加入聚乙二醇 2.0 mmol/L,检测波长 254 nm,分离电压 20 kV,分离温度 25℃,压力进样时间 5 s。该法线性范围为 0.02~1.4 mg/ml,回收率 95.6%~104.8%。无需对样品进行预处理,简便、快速、准确。用该方法测定了市售加铁酱油中 NaFeEDTA 的含量,结果令人满意。

2 标准方法存在的问题和改进建议

目前,硫氰酸铵比色法已列为标准的第二法(GB/T 21234—2007 铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠的测定),但还存在一些不足,主要是重现性不好、准确度不高,每次测定结果偏差较大,需要多次重复操作,操作条件苛刻,尤其是夏天受温度的影响大。为了探讨这个问题,李彦等^[16]作了较为详细的研究,分析了标准方法重现性差所产生的原因,并提出了解决方案,指出标准方法产生的误差主要与体系中使用了大量的无水乙醇、丙酮等溶剂有关。由于有机溶剂渗透性和挥发性较强,尤其是夏天操作时,在添加试剂、混匀过程中需要开口排气,此时有机溶剂可能发生外溢、迅速挥发后,导致容器瓶口壁处残

留高浓度的显色产物,当随之移入比色池内时,造成吸光度值很大的变化。室内温度越高,放置的时间越长,有机溶剂挥发的越多,测定结果的误差就越大。其次硫氰酸铵显色剂长期放置或温度过高($>32^\circ\text{C}$)时会逐渐分解出硫化物,使溶液变黄,导致显色时 SCN^- 的有效浓度降低,致使吸光度变化,造成分析误差。

对标准方法存在的问题,解决方案最好注意以下几点:1、夏天操作时需采取降温措施,减少溶剂挥发。2、选择磨口严密好的反应容器,减少溶剂外溢。3、硫氰酸铵显色剂宜储存棕色瓶,短期可存放于冰箱,操作时避免光线直射。尽管这些措施可以使标准方法的准确度和精密度得到一定改善,但有机溶剂的影响还是主要的,有时不可避免的需要多次重复测量才能得到满意的结果。相比之下胶束体系测定方法^[6,7]显得优越。

3 共存物质对测定的影响及卫生学评价的意义

酱油成分是比较复杂的,含有大量的可溶性固形物,这些固形物除酿造中产生的蛋白质、氨基酸、有机酸、糖类、维生素、矿物质及微量元素等固有物质外,还添加了高浓度的食盐、焦糖色,增稠剂、增味剂、甜味剂及防腐剂等食品添加剂^[17],背景颜色较深,直接影响光度法的测量。因此,如何消除共存物质的干扰是方法成败之关键。以光度法为例,在中性条件下,强化酱油本底中究竟有多少游离铁被扣除、酸性条件下又有多少络合型铁没有被扣除一直不太清楚。以往众多学者也都将这种减差法测得结果视为添加的 NaFeEDTA,以这种结果评价产品质量似乎也不够科学。对于这一问题,李彦等^[16]通过测定非强化酱油中游离型铁和结合型铁的含量,验证了标准方法在扣除本底铁方面所暴露出来的一些问题,结果见表 1。

表 1 非强化酱油中铁的含量

非强化酱油	吸光度值			相当于 NaFeEDTA 含量(mg/100 ml)	折算成络合 Fe^{3+} 含量(mg/100 ml)
	A 管/水参比	B 管/水参比	A - B		
1	0.328	0.269	0.059	32.0	4.2
2	0.074	0.053	0.021	12.7	1.6
3	0.122	0.091	0.031	17.8	2.3
4	0.163	0.134	0.029	16.8	2.2
5	0.199	0.155	0.044	24.4	3.2
6	0.276	0.227	0.049	26.9	3.5
7	0.167	0.142	0.025	14.8	1.9

由此可见,通过减差法形式扣除本底中干扰物质,而实际扣除的主要物质是酱油的颜色背景,其中游离铁所占的比例很小。尽管在测定过程中少许加入氧化剂过硫酸铵或氯胺 T,但在 pH 中性条件下,

这些氧化剂大部分被样品空白(B 管)中还原物质所消耗掉了,不足以使其中的络合铁分解呈游离态离子铁。样品中绝大部分铁以氨基酸及有机酸等络合形式存在,性质比较稳定,结合比较牢固,这些络合

铁约占样品中总铁比例的 90 %以上。再者,络合铁在中性条件下不能游离,不与显色剂发生显色反应,因而无法扣除。但在强酸条件下可以发生水解和氧化,生成游离的 Fe^{3+} ,游离的 Fe^{3+} 与显色剂反应生成红色配合物。此时将 A 管减去 B 管的吸光度之差(ΔA)换算成络合 Fe 含量,其浓度在 1.6 ~ 4.2 mg/100 ml 范围,该值与食物成分表中酱油所标出的铁的含量^[18]进行对照,两者基本是一致的;如果将 ΔA 值换算成 NaFeEDTA 含量,即产生相当于 12.7 ~ 32.0 mg/100 ml 范围的误差。

4 结论

酱油本底中大部分铁以氨基酸及有机酸等络合形式存在,目前建立起来的分光光度法、原子吸收法、极谱法均存在络合型铁不能分离问题,因而评价这些方法给出的结果和产品质量时,其测定值实际为添加的 NaFeEDTA 含量与样品本底铁值的总和。HPLC 和 CZE 有助于对铁强化酱油中 NaFeEDTA 的形态分析,而由于成本较高,在实际推广应用方面尚有一定距离。因此,建立经济、快速及准确的检测方法有待解决。

参考文献

[1] 苗虹,于波,霍军生,等. 食品添加剂 NaFeEDTA 测定方法研究[J]. 食品科学,2000,21(8):48-50.
[2] 黄建,霍军生. 铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量测定[J]. 卫生研究,2003,32(增刊):60-63.
[3] 中国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21234—2007 铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠的测定[S].

[4] 陈湛,肖雪花,陆云婷,等. 有色酱油 NaFeEDTA 含量测定与底色干扰的排除[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(3):322-323.
[5] 潘教麦,陈亚森,严恒太. 显色剂及其在光度分析中的应用[M]. 上海:科学技术出版社,1981:51-56.
[6] 张文德,王竹天,刘玉欣. 铁强化酱油中 NaFeEDTA 的快速测定[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(6):535-537.
[7] 张文德,王竹天,刘玉欣. 铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量的分光光度检验方法研究[J]. 卫生研究,2007,36(2):166-168.
[8] 志田正二. 化学辞典[M]. 东京:森北出版株式会社,1981:754.
[9] 解立斌,黄建,孙静,等. 硫氰酸铵比色法测定铁强化酱油中 NaFeEDTA 含量的改进[J]. 卫生研究,2008,37(4):420-423.
[10] 蒋瑾华,刘江晖,陈斌,等. 强化酱油中铁含量的快速测定[J]. 食品科学,2003,24(4):124-125.
[11] 李彦,张文德. 单扫示波极谱法测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(4):308-310.
[12] 李彦,张文德. 单扫极谱法测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量与标准方法的比较[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(6):1067-1068.
[13] 魏峰,李文仙,黄建,等. 反相离子对高效液相色谱法测定铁强化酱油中的乙二胺四乙酸铁钠[J]. 色谱,2006,24(1):58-61.
[14] 魏峰,霍军生,黄建,等. 毛细管区带电泳法分离测定铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠[J]. 卫生研究,2006,35(1):103-106.
[15] 唐美华,陈国柱,于文涛. 毛细管区带电泳法测定强化铁酱油中 NaFeEDTA 的含量[J]. 食品科学,2005,26(11):194-196.
[16] 李彦,张文德. 光度法测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量两种方法的比较[J]. 中国调味品杂志,2008,33(8):77-80.
[17] 寺野重造,桥爪洋,小熊悟. 食品の検査と分析[J]. ぶんせき,2000,307(7):300-394.
[18] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:126.

[收稿日期:2009-04-23]

中图分类号:R15;TS264.21;TQ421.36 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2009)06-0550-04

卫生部监督局关于食品用酶制剂允许在焙烤食品专用面粉中存留的复函
卫监督食便函〔2009〕183号

中国食品添加剂和配料协会:

你协会《关于食品加工用酶制剂是否允许在面粉改良剂和专用面粉中存留的咨询函》(中食协〔2009〕14号)收悉。经研究,现函复如下:

《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760)食品用酶制剂及其来源名单(表 C.2)规定了食品加工中允许使用的酶。焙烤食品的专用面粉不属于直接供消费者食用的终产品,属于焙烤食品原料。食品用酶制剂可以添加并存留在焙烤食品专用面粉中,以便在焙烤食品的生产过程中发挥作用。

使用食品用酶制剂和其他食品添加剂生产面粉用复合食品添加剂应按照《食品添加剂卫生管理办法》相关规定执行。

专此函复。

二〇〇九年六月十五日