

气相色谱法测定食品中己二酸

周兴华¹, 董 英^{*1}, 李 平², 肖 香¹, 范晓丽¹, 吕 平²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013;

2. 镇江出入境检验检疫局, 江苏镇江 212013)

摘 要:建立了气相色谱/氢火焰离子化检测器同时测定 6 种食品中己二酸含量的方法。该方法通过加酸助溶, 采用乙酸乙酯提取食品样品中的己二酸, 浓缩后再用硅烷化试剂进行衍生化处理。考察了温度、时间及衍生化试剂用量对己二酸硅烷化衍生效果的影响。以庚二酸内标法定量测定, 定量限为 5 mg/kg, 在 5~600 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系, 相关系数 $r > 0.999$; 在 6 种供试样品的四个添加水平下己二酸的平均回收率在 80%~106% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 小于 7%。结果表明, 该方法可用于进出口食品中己二酸残留的检测。

关键词:己二酸; 硅烷化处理; 气相色谱; 检测; 食品

中图分类号: O657.7⁺¹

文献标识码: A

己二酸, 化学名为 1,4-丁烷二羧酸, 在自然界中也有分布, 甜菜等植物中均有一定的含量^[1]。目前, 己二酸作为酸味剂和 pH 调节剂, 在固体饮料、果冻、果冻粉、口香糖等食品中允许限量使用。我国对食品中己二酸残留限量的规定为: 固体饮料 0.01 g/kg、果冻粉 0.5 g/kg、口香糖 4 g/kg^[2]。国外有将其作为增香剂应用于醇饮料、速溶饮料等^[1,3]。目前欧盟、美国等对焙烤食品、奶制品、料酒、沙拉、火腿肠中的己二酸含量已作了限量规定, 其中焙烤食品最大残留限量 (MRL) 规定为 0.5 g/kg, 火腿肠为 3 g/kg, 料酒不得检出等。

有机羧酸的分析可采用酶法、分光光度法、气相色谱法及高效液相色谱法等方法。其中, 气相色谱法和高效液相色谱法是目前最常用的方法^[4-6], 但由于己二酸在波长 210 nm 以上只有微弱的紫外吸收, 故用高效液相色谱紫外检测有一定困难^[7-8]。而由于己二酸极性大、沸点高, 不易气化, 一般需经衍生后进行气相色谱或气相色谱-质谱联用检测, 已报道的衍生化方法包括酯化、甲基化、硅烷化等^[9-12]。祈辉等^[13]采用酯化方法测定废水中己二酸含量, 但回收率不高; 文献^[10]采用重氮甲烷甲基化方法检测橙汁中己二酸的残留量, 但其前处理方法十分繁琐, 不仅耗时, 且衍生化试剂毒性大, 故该方法的使用受到了限制; 国标 GB/T 20377-2006 中采用硅烷化衍生方法测定变性淀粉中己二酸的含量。目前国内未见其它食品中己二酸气相色谱测定方法的报道。本文采用硅烷化方法对食品样品进行衍生化处理, 旨在建立简单快速、安全的己二酸的气相色谱检测方法, 以满足国内对进出口食品中己二酸残留的检测限量要求。

1 实验部分

1.1 主要仪器、试剂与材料

HP5890 SERIES II 气相色谱仪 (美国, 惠普公司), 配有氢火焰离子化检测器 (FID) 和 N2000 色谱工作站; 色谱柱: DB-1 (美国, 30 m $\times$ 0.25 mm i. d. $\times$ 0.25 μm); 自动浓缩 TurboVap LV 氮吹仪 (水浴温度可保持在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$) (德国, Zymark Corporation); XH-C 涡流混合器 (江苏省金坛市医疗仪器厂)。

收稿日期: 2010-07-01

修回日期: 2010-09-29

基金项目: 国家标准委计划项目 (No. 20073790-T-424)

* 通讯作者: 董 英, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。

己二酸标准品(纯度 99.5%,德国 Sigma-Aldrich 公司);庚二酸(纯度 99%,上海邦成有限公司);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA,盐城晶华化工有限公司);三甲基氯硅烷(TMCS,国药集团化学试剂有限公司)。称取适量己二酸和庚二酸标准品,以乙腈溶解,分别配成浓度为 3 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液,于 4~8℃ 保存;根据待测样液中己二酸含量情况,临用时再以乙腈稀释成适当浓度的标准工作液。

固体饮料、果冻、料酒、果冻粉、火腿肠、胶基糖果均购自当地超市。

1.2 样品前处理

1.2.1 样品的预处理 取固体饮料、果冻、果冻粉、肉制品匀浆后保存在 4℃ 冰箱中备用,料酒充分混匀后直接取样,口香糖在液氮(-70℃)中迅速冷却,研磨粉碎,4℃ 冷藏保存在冰箱中备用。

1.2.2 样品中己二酸的提取 称取试样(固体饮料、果冻、料酒、果冻粉、肉制品、胶基糖果)1 g(精确到 0.01 g)于试管中,加入与所用系列标准溶液相适量的内标溶液;再加入 7 mL 蒸馏水用涡旋混匀器混匀,用 2 mol/L 硫酸溶液调节 pH 至 2;加入 5 mL 乙酸乙酯涡旋萃取 2 min,静置分层后将乙酸乙酯层移入另一玻璃反应试管,若乳化现象严重,不能分层,可移入玻璃离心管,以 3 000 r/min 离心 5 min;下层继续用 5 mL 乙酸乙酯重复萃取两次,收集所有乙酸乙酯层,在 30℃ 下氮气吹干。

1.2.3 己二酸提取物的硅烷化 向吹干提取物的反应管中加入 0.5 mL 乙腈,超声溶解,再加入硅烷化试剂(BSTFA:TMCS=99:1)0.5 mL,盖紧塞子于涡流混合器上混匀,于 30℃ 反应 1.5 h,取反应液供气相色谱测定。

1.3 气相色谱条件

载气:高纯氮气(99.999%),流速为 1 mL/min;辅助气:氢气流速为 30 mL/min;空气流速为 400 mL/min;氮气尾吹:30 mL/min;进样口温度:250℃;柱温:恒温 210℃,检测器温度:250℃;进样体积:1 μL ;分流进样:分流比 50:1。

2 结果与讨论

2.1 样品提取方法的选择

本实验对比了乙醚、石油醚、乙酸乙酯三种有机溶剂提取效果,乙酸乙酯的提取效果最佳,确定乙酸乙酯为最佳提取溶剂。由于己二酸在酸性条件下处于游离状态,更易溶于乙酸乙酯中,通过加酸作为辅助提取手段,便于乙酸乙酯对己二酸浸提,同时除去酸不溶性杂质。试验表明加酸比不加酸提取效果更好。对于样品火腿肠和果冻粉乳化现象严重问题,可在离心管中提取再直接离心,即可实现两相分层,既节省了时间,又减少了溶剂消耗。

2.2 衍生化条件的选择

由于己二酸具有一定的极性,沸点高,无法直接进行气相色谱检测。本文采用 BSTFA-TMCS 对其进行硅烷化衍生处理时, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 取代羟基中的氢原子,增强了目标化合物的挥发性以便于进行气相色谱分析。

2.2.1 衍生化试剂用量的确定 吸取 5 mg/mL 己二酸标准工作溶液 0.1 mL 置于反应瓶中,加入不同量硅烷化试剂并用乙腈定容至 1 mL,混匀,于 30℃ 下反应 2 h,考察衍生物响应值与衍生化试剂用量的关系。结果表明当衍生化试剂用量在 0.15 mL 时基本满足反应需要。考虑到样品杂质干扰问题,为保证完全反应,衍生化试剂用量选为 0.5 mL。

2.2.2 最佳衍生化温度的确定 吸取 1 mg/mL 己二酸标准工作溶液 0.1 mL 置于反应瓶里,加入 0.5 mL 硅烷化试剂并用乙腈定容至 1 mL,混匀,于不同温度下反应 2 h,考察衍生物响应值与反应温度的关系。实验表明己二酸衍生物在 30~60℃ 范围变化衍生化效果基本不变,在 30℃ 已能达到反应要求,故衍生化温度选为 30℃。

2.2.3 最佳衍生化时间的确定 吸取 1 mg/mL 己二酸标准工作溶液 0.1 mL 置于反应瓶里,加入 0.5 mL 硅烷化试剂并用乙腈定容至 1 mL,混匀,于 30℃ 下反应不同时间,考察衍生物响应值与反应时间的关系。实验表明己二酸在 1.5 h 和衍生化试剂已能完全反应,故衍生时间为 1.5 h。

2.3 己二酸及内标庚二酸的气相色谱分析

取己二酸和内标庚二酸混合标样经衍生化处理后进行气相色谱分析,己二酸及内标庚二酸色谱图见图 1。己二酸的色谱峰保留时间为 5.6 min,内标物的色谱峰保留时间为 6.2 min。同时对其进行了气相色谱质谱定性分析,在 m/z 50~450 质量范围内进行全扫描,己二酸衍生物的质谱图见图 2。己二酸沸点为 337.5℃,经过衍生化处理,己二酸分子中活性氢被硅烷基取代,生成的己二酸衍生物减少了氢键束缚,改变了化合物的极性,降低了沸点,有利于气相色谱分析。

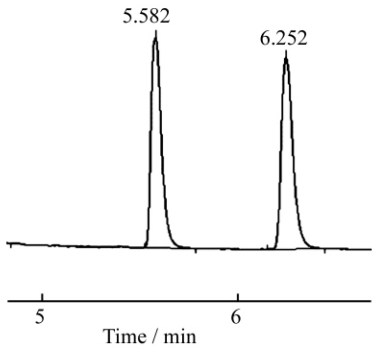


图 1 两种标准品的气相色谱图
Fig. 1 Chromatogram of two standards

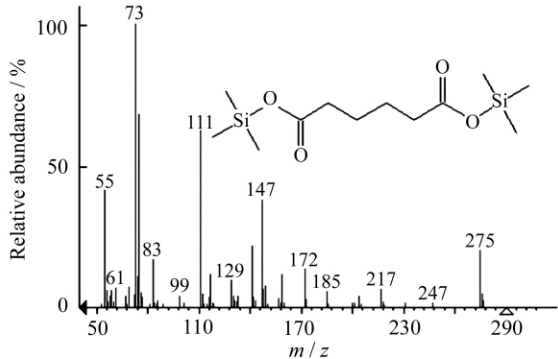


图 2 己二酸衍生物的质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of adipic acid

2.4 线性范围和检出限

由于不同食品中规定的己二酸最大残留限量差别很大,围绕内标物浓度不同做成三种不同线性范围的标准曲线。即将己二酸标准溶液用乙腈梯度稀释,并加入内标物,使内标物浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$,相对应的己二酸浓度范围分别为 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 、50~250 $\mu\text{g/mL}$ 和 50~600 $\mu\text{g/mL}$,在上述仪器条件下进行测定,以己二酸标准溶液浓度对应己二酸峰面积与内标物峰面积的比值作图,线性关系良好,其线性方程分别为: $y=0.0196x+0.0031$, $y=0.0094x+0.0688$ 和 $y=0.0032x+0.0195$,相关系数 R^2 分别为 0.9992、0.9993、0.9996,其中 x 为己二酸标准溶液的浓度, y 为己二酸峰面积与内标物峰面积的比值(A_i/A_s)。根据信噪比(S/N)=10 得到方法的定量限均为 5 mg/kg 。

2.5 方法的回收率和精密度

选择 6 种不含己二酸的代表性食品样品(固体饮料、果冻、果冻粉、胶基糖果、料酒、肉制品)进行回收率和精密度实验,以定量限、最大残留限量及其 0.5 倍和 2 倍值的水平分别对各样品进行添加和测定,每种样品平行测定 10 次。依照公式 $X(\%) = \frac{(A_i/A_s)_{\text{添加}}}{(A_i/A_s)_{\text{标样}}} \times 100$ 计算回收率,其结果见表 1。6 种食品的平均回收率在 80%~106%之间,相对标准偏差(RSD)在 7%以内。

表 1 己二酸在六种食品中的加标回收率
Table 1 Recoveries of adipic acid in six foods

Sample	Spiking levels (mg/g)	Mean recoveries (%)	RSD (%)	Sample	Spiking levels (mg/g)	Mean recoveries (%)	RSD (%)
Jelly powder	0.005	89.4	6.4	Solid beverage	0.005	88.8	5.6
	0.25	105.4	4.1		0.01	82.1	4.9
	0.5	81.9	5.2		0.02	93.7	4.3
	0.1	87.9	4.8		0.005	89.6	5.9
Jelly	0.005	88.8	6.5	Cooking wine	0.01	92.8	5.4
	0.05	80.1	4.9		0.02	82.5	3.9
	0.1	81.3	2.7		0.005	89.6	5.9
	0.2	86.0	2.2		2	84.4	3.4
Ham	0.005	89.8	5.9	Gum	4	85.8	1.9
	1.5	87.7	1.5		8	84.7	1.5
	3	84.4	2.3				
	6	88.9	2.5				

参考文献:

- [1] ZHANG Hong-xiang Translated(张洪祥译). Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists(卫生试验法)[M]. Beijing(北京):Huawen Press(华文出版社),1995:9.
- [2] GB2760-96. Hygienic Standards for Uses of Food Additives(食品添加剂使用卫生标准)[S].
- [3] MA Jia-xiang Translated(马家骥译). Analysis Method of Food Attitives(食品中添加剂的分析方法)[M]. Beijing(北京):China Standard Press(中国标准出版社),1988:2.
- [4] LI You-yuan(李友元),CHEN Chang-hua(陈长华),TAO Ping(陶 萍). Chinese Journal of Chromatography(色谱)[J],2002,**20**(1):46.
- [5] Chen Zuliang,Tang C,Xu Jianming. Chromatography A[J],1999,**859**:173.
- [6] Fischer K. Analytica Chimica Acta[J],2002,**465**:157.
- [7] DA Shi-lu(达世禄),XU Wei(徐 伟),HAN Hong-yan(韩红岩),WANG Zhong-hua(王忠华). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)[J],1996,**24**(7):777.
- [8] Kawamura K. Anal. Chem. [J],1993,**65**:3505.
- [9] DENG Ai-hua(邓爱华),HU Rong-rong(胡蓉蓉),LUO He-an(罗和安),CHEN Xiao-ming(陈小明). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室)[J],2002,**21**(2):18.
- [10] Roger Wood, Lucy Foster, Andrew Damant and Pauline Key. Analytical Methods for Food Additives[M]. Boca Raton Boston New York Washington: CRC Press,2004:188.
- [11] Ito Y, Ogawa S, Iwaida M. Anal. Chem. [J], 1979, **62**(4):937.
- [12] GB/T 20377-2006/ISO 11215. National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准)[S].
- [13] QI Hui(祁 辉),DONG Liang(董 亮). Chinese Society for Environmental Sciences(中国环境科学学会学术年会优秀论文集)[C]. 2007:256.

Determination of Adapic Acid in Food by Gas Chromatography

ZHOU Xing-hua¹, DONG Ying^{*1}, LI Ping², XIAO Xiang¹, FAN Xiao-li¹, LV Ping²

(1. College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

2. Zhenjiang Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhenjiang 212013)

Abstract: A method was established for the determination of adipic acid residue in six kinds of foods using gas chromatography with flame ionization detection (FID). The adipic acid was extracted with ethyl acetate through the acid-assisted extraction. The extract was evaporated to dryness and derivatized with N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA). The influences of temperature, time, derivatization reagent and its amount on the silylation derivatization efficiency were investigated and optimized. Then the contents were examined with pimelic acid as an internal standard. The limit of detection was 5 mg/kg, and the calibration curve was good linear in the concentration of 5~600 $\mu\text{g/mL}$ with the correlation coefficient more than 0.999. The method was applied to the analysis of adipic acid in the six kinds of food samples and the average recoveries were in the range of 80%~106% with the relative standard derivations of less than 7%. This method could be used to determine the adipic acid in import and export foods.

Keywords: Adipic acid; Silylation treatment; Gas chromatography; Food