

高效液相色谱法测定凉皮中的脱氢乙酸

王艳*

(厦门华夏学院, 厦门 361024)

摘要: **目的** 建立凉皮中脱氢乙酸含量的高效液相色谱测定方法。**方法** 样品用水提取, 经过 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后进样分析。色谱柱: CNW[®] Athena C₁₈-WP 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(90%), 甲醇(10%); 洗脱方式: 等度; 检测器波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 3.0 μL ; 采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。**结果** 脱氢乙酸平均回收率 98.9%~100%, 相对标准偏差 0.730%~1.810%, 在 1.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 相关系数 0.9994, 定量限 10.0 mg/kg。**结论** 该方法具有样品预处理简单, 分析速度快, 灵敏度高的特点。针对厦门市流通领域中的样品实际检测, 发现流动摊贩所售凉皮制品中脱氢乙酸含量多数超过 1000 mg/kg 的限量规定。

关键词: 高效液相色谱法; 凉皮; 脱氢乙酸

Determination of dehydroacetic acid in Liangpi (cold noodles) by high performance liquid chromatography

WANG Yan*

(Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of dehydroacetic acid in Liangpi (cold noodles). **Methods** Pure water was used to extract sample and 0.45 μm microfiltration membrane was used to filter. Column: CNW C₁₈ column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 10 mmol/L ammonium acetate solute (90%) and methanol (10%) were used as mobile phase; Elution mode: isocratic, the detection wavelength was 230 nm with 1.0 mL/min as flow rate, column temperature was room temperature with 3.0 μL injection volume, the results were used to determine by external standard method. **Results** The analytical results showed that the recoveries of dehydroacetic acid in Liangpi were in ranged of 98.9% to 100%, and the relative standard deviation was 0.730%~1.810%. It showed a good linearity in 1.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ with the correlation coefficients (r^2) of 0.9994, the limit of quantity (LOQ) of the method was 10.0 mg/kg. **Conclusion** The sample preparation of this method is simple, rapid and high sensitive. The testing results of the actual sample indicated that dehydroacetic acid of Liangpi products sold by street peddler exceed the limited provisions of 1000 mg/kg.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; Liangpi; dehydroacetic acid

基金项目: 厦门市科技局(3502Z20130036)

Fund: Supported by Xiamen Science and Technology Bureau Projects (3502Z20130036)

*通讯作者: 王艳, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测方向。E-mail: wy@hxxxy.edu.cn

*Corresponding author: WANG Yan, Engineer, Xiamen Huaxia University, Room 513 of Shensi Building, No. 288 Tianma Road, Jimei District, Xiamen 361024, China. E-mail: wy@hxxxy.edu.cn.

1 引言

自2014年,各地质检部门在简陋食品作坊中查获含有超量“脱氢乙酸钠”的凉皮类制品^[1,2]。国标GB 2760-2014^[3]规定,脱氢乙酸及其钠盐作为食品添加剂使用时,其最大使用量以脱氢乙酸计,其中淀粉制品的最大使用量为1000 mg/kg。另外美国食品药品监督管理局(FDA)规定最高残留限量为65 mg/kg^[4]。由于脱氢乙酸钠需要添加较高的剂量才能起效,例如0.1%能有效抑制霉菌,0.4%可有效抑制细菌,所以,为了防腐效果很多业者倾向于超限量使用。

“脱氢乙酸钠”在食物中的起效成分为脱氢乙酸(dehydroacetic acid, DHA)。脱氢乙酸别名“脱氢醋酸”,常温为晶型粉末并难溶于水,故常以钠盐形态流通和使用。脱氢乙酸及钠盐是一种酸型广谱防腐剂,对食品中的细菌、霉菌和酵母菌有较强抑制作用,特别对霉菌酵母的抑菌力强。脱氢乙酸毒性低,其急性毒性LD₅₀ 570 mg/kg(大鼠,经口)^[5],并且脱氢乙酸无臭,无刺激性,略带酸味,在水中逐渐降解为乙酸,十分适合作为“凉皮”制品的专用防腐剂。

脱氢乙酸的检测方法有气相色谱法,多数使用乙醚^[6]作为提取溶剂,也可以用乙醇^[7]、乙腈^[8]、乙酸乙酯^[9]等提取,挥干后丙酮定容,用火焰离子检测器(FID)检测器检测,2003版国标方法^[10]也采用气相法,不过由于其使用玻璃填充柱分离,在当前已经不合时宜;也有用紫外分光光度法检测,例如赵舒景等^[11]用硫酸锌沉淀火腿肠中蛋白质后于293 nm波长测定上清液的吸光度,陈丹萍等^[12]用水蒸气蒸馏加有机溶剂萃取法,提取物于308 nm波长测定吸光度;高效液相色谱法,前处理中主要的提取溶剂为水^[13],甲醇^[14],乙醇^[15]等;对于油性样品也有用乙腈^[16]提取的;多数方法没有对提取液pH值提出要求,如需要可用氨水^[17]或碳酸盐^[18]调节。针对脱氢乙酸含量测定,业界主要采用液相色谱法,因为液相色谱法具有前处理简单,测定结果重现性好的特点。本文针对“凉皮”制品的特点,优化有关前处理和仪器参数,采用高效液相色谱法分析厦门流通领域中各主体制售“凉皮”制品中脱氢乙酸的 actual 含量。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

供试凉皮类样品,采自厦门市不同行政区的集贸市场、商场/超市,中小学周边等地点(2015年6月)。

脱氢乙酸标准品(1000 μg/mL乙醇,农业部环境保护科研监测所),临用时用超纯水配制成1~50 μg/mL工作液。甲醇(色谱纯,美国Tedia公司),其他试剂为分析纯,实验用水为超纯水。离心管(容量50 mL),针式微孔过滤膜(孔径0.45 μm)。

2.2 仪器设备

高效液相色谱仪(LC1200,美国Agilent公司),配有DAD检测器(美国Agilent公司);CNW[®] Athena C₁₈-WP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, PN8.462572.0001,上海安谱公司);电子天平(精确至0.01 g);IKA均质器(T18 Basic,德国IKA公司);离心机(TGL-16G,上海安亭)。

2.3 方法

2.3.1 样品处理

称取2.00 g样品于50 mL离心管中,加入20.0 mL超纯水,均质后于2500 r/min离心,取上清液过0.45 μm针式微孔过滤膜,进样分析。

2.3.2 液相色谱条件

色谱柱:CNW[®] Athena C₁₈-WP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A为10 mmol/L乙酸铵水溶液,B为甲醇。洗脱方式:等度,A:B=90:10;检测器波长:230 nm;流速:1.00 mL/min;柱温:室温;进样量:3.00 μL;采用色谱峰保留时间定性,峰面积外标法定量。

3 结果与讨论

3.1 前处理

对于高蛋白含量类型的食品,前处理时一般针对性的加入乙酸锌和亚铁氰化钾的方法沉淀,由于凉皮中蛋白质含量低,此步骤可以省略。对于凉皮样品,加水后是否调节pH=7.0,经过对比,发现对于色谱峰型和定量影响不大,所以省略此步骤。对于添加合理脱氢乙酸剂量的凉皮样品,10倍稀释后的样品试液正合适,对于违规超量添加的样品,得到第1次初筛结果后,第2次复验时需要针对性的将稀释倍数

提高到 50~100 倍, 使其检测浓度落在方法线性范围内为宜。

3.2 仪器参数优化

3.2.1 检测波长的选择。

脱氢乙酸的吸收波长扫描图^[19]显示其有 2 个吸收峰, 分别在 230 nm、293 nm 附近, 针对标准品的实际测试表明, 230 nm 波长比 293 nm 波长所得色谱峰面积大 2 倍左右, 230 nm 吸收信号较强且该波长也可用于苯甲酸和山梨酸的检测, 为了获得较好的灵敏度并满足多项目同时测定需要, 本方法选择 230 nm 为检测波长。

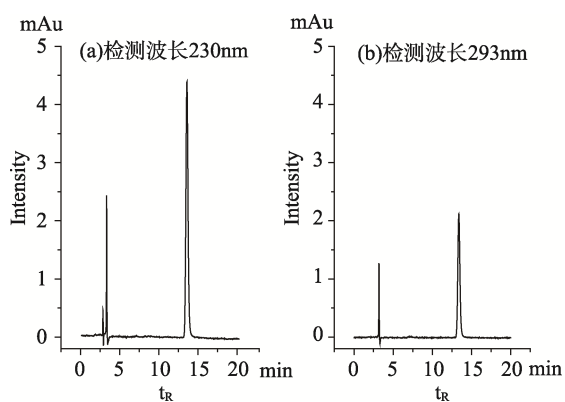


图 1 脱氢乙酸(5 µg/mL)检测波长的实测色谱图对比

(a)230 nm; (b) 293 nm

Fig. 1 Chromatograms of dehydroacetic acid (5 µg/mL) under the wavelength of (a) 230 nm and (b) 293 nm respectively

3.3 线性关系

将脱氢乙酸标准品用水稀释, 配置成浓度为 1.00~50.0 µg/mL 的标准工作液进样分析, 以峰面积为纵坐标, 对应的浓度为横坐标, 作标准曲线并进行回归分析。结果表明, 在 1.00~50.0 µg/mL 范围内脱氢乙酸浓度与色谱峰面积具有良好的线性关系, 且峰形良好, 能够满足 GB 2760-2014 中关于脱氢乙酸添加限量 300~1000 mg/kg 的法规测定需要且有冗余。线性范围内的标准工作曲线具体见图 2。

图 3 为阴性样品添加 10.0 mg/kg 浓度水平, 前处理后所得试液浓度在 1 µg/mL 左右的色谱图, 以及凉皮阴性样品和浓度为 1 µg/mL 的标准工作液实测所得色谱图。

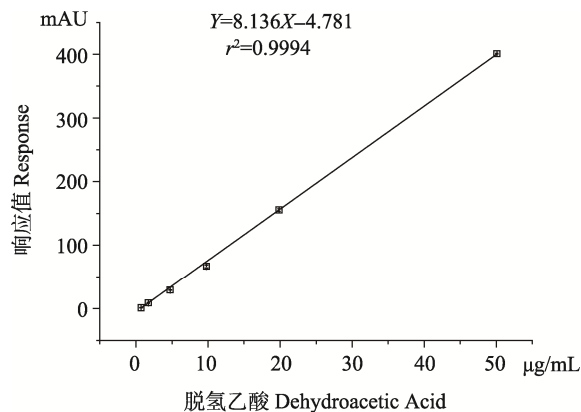


图 2 脱氢乙酸标准工作曲线

Fig. 2 Calibration curve of dehydroacetic acid

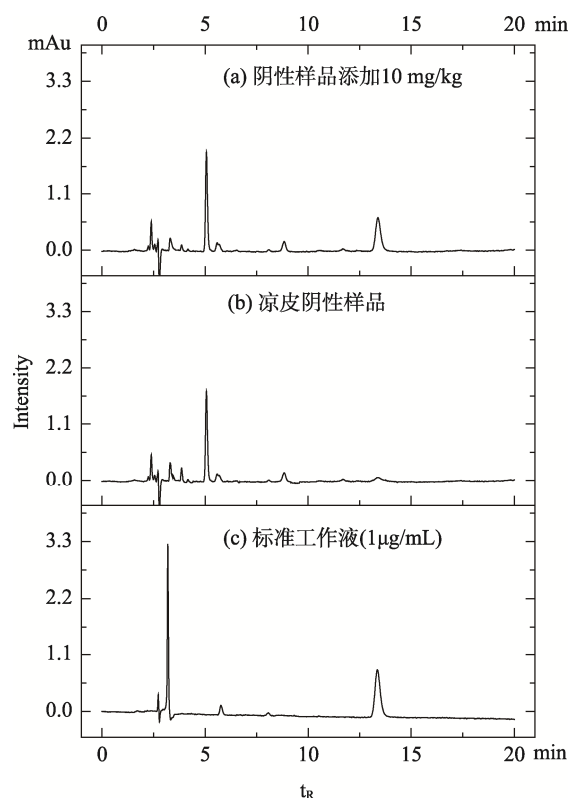


图 3 脱氢乙酸色谱图

Fig. 3 Chromatograms of dehydroacetic acid (a)阴性样品添加 10 mg/kg(前处理后试液浓度在 1 µg/mL 左右)、(b)凉皮阴性样品和(c)标准工作液(1 µg/mL)
(a) spiked Liangpi sample (10 mg/kg, test solution about 1 µg/mL); (b) blank Liang Pi sample; (c) standard working solution (1 µg/mL)

3.4 准确度、精密度和方法定量限

取阴性凉皮样品, 向其中添加脱氢乙酸, 使其

浓度水平达到 10.0、20.0 和 50.0 mg/kg, 每个浓度水平 6 个平行样, 依据本法处理, 所得测试液理论浓度为 1.00、2.00 和 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 。脱氢乙酸的加标回收率和精密度结果见表 1。在实际样品中添加脱氢乙酸浓度最低为 10.0 mg/kg 时, 依据本法测定所得回收率和精密度均满意。因此, 将 10.0 mg/kg 作为本方法的定量限。

3.5 实际样品检测

流通领域中凉皮的制售主体主要包括商场/超市、社区餐馆或流动摊贩, 而货源基本以自制和作坊批发 2 种方式为主。对于大型超市来说, 其凉皮以自产自销为主, 流动摊贩由于销量较小则主要从无名作坊批发进货, 社区餐馆的凉皮来源介于以上 2 种可能性之间。受人力和物力限制, 此次样本数量有限, 所得数据及分析结论仅供管窥。

3.5.1 脱氢乙酸的整體使用情况

样品的采样地点涉及厦门市海沧、湖里和思明 3 个区, 业者形态包括路边流动摊贩、有固定店面的社区餐馆、便民店和大型商场超市, 样品中脱氢乙酸的检测结果见表 2。

根据以上数据初步分析, 流动性摊贩所售凉皮中超标使用脱氢乙酸的情况最为普遍和严重, 最高

添加量达到 2000 mg/kg, 超标 2 倍; 有固定店面的社区餐馆, 其自制凉皮制品也有添加中等量的脱氢乙酸, 具体为限量值的 20%~30%, 固定店面也有从小作坊批发凉皮, 其测定结果超标。对于大型商场/超市内部的熟食店铺, 其凉皮为现场制作销售并且由于管理严格规范, 脱氢乙酸用量很低甚至无添加。

3.5.2 凉皮中脱氢乙酸的添加方式

凉皮是用高筋面粉制作, 面粉揉成面团后在水中揉捏, 揉制时溶于水部分为“面浆”, 揉制后期不溶于水的面团剩余部分为“面筋”。将面浆在刷油平盘上烫熟即为半透明状的凉皮; 面筋蒸熟后为灰色蜂窝孔状, 切小块作为配料与凉皮相拌和。从工艺分析, 如果直接在面粉中添加, 则制成的凉皮和面筋都含脱氢乙酸; 若仅在揉制所得面浆中添加, 则凉皮有而面筋不应含有脱氢乙酸。

由于凉皮中脱氢乙酸含量较高要 100 倍稀释后才可落在线性范围内测试, 面筋 10 倍稀释即可。图 4 为某公交站旁电动三轮车流动摊贩所销售凉皮及配料面筋中脱氢乙酸的检测结果, 该样品凉皮中脱氢乙酸的含量高于面筋约 70 倍, 据此推断无名作坊业者是在面团揉制期间直接拌入脱氢乙酸钠, 在水中揉制时脱氢乙酸富集在面浆中, 所以凉皮和面筋都含有脱氢乙酸, 但以凉皮中含量为高。

表 1 加标回收率与精密度 ($n=6$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviation of samples ($n=6$)

组份	样品添加水平 (mg/kg)	测试液理论水平 ($\mu\text{g/mL}$)	测试液平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
脱氢乙酸	10.0	1.00	0.989	98.9	1.81
	20.0	2.00	2.00	100	1.45
	50.0	5.00	4.97	99.5	0.730

表 2 凉皮中脱氢乙酸检出情况汇总表
Table 2 Detection results of dehydroacetic acid in Liangpi

行政区	业者形态	采样数	脱氢乙酸使用情况		
			超标 (>1000 mg/kg)	适量 ($100\sim1000$ mg/kg)	微量 (<100 mg/kg)
海沧区	流动个体	6	5	/	1
海沧区	固定店面	1	1	/	/
湖里区	固定店面	3	/	2	1
思明区	大型商场超市	4	/	1	3

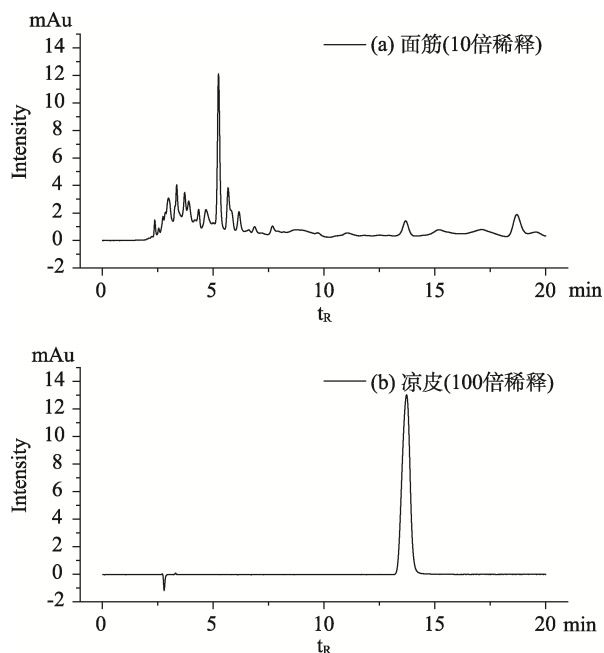


图 4 某流动摊贩所售(a)凉皮及(b)配料面筋中的脱氢乙酸含量差异

Fig. 4 Concentration difference of dehydrogenation acid in (a) Liangpi and (b) ingredient gluten sold by a specific itinerant trader

4 结 论

脱氢乙酸钠作为防腐剂在凉皮制品中被大量使用,其含量测定以 HPLC 法为主,本文所述方法对样品前处理步骤进行简化,对液相色谱法的参数进行优化,方法可以满足标准法规中的有关限量检测需求。在 2015 年夏季高温时节,对本地区各类市场主体销售的凉皮制品进行随机检测,发现大型商超和有固定店面的业者较为自律,其自制凉皮在添加脱氢乙酸钠时较为规范并符合限量;城乡结合部和街边流动摊贩销售的凉皮多数存在脱氢乙酸含量超标的现象。

参考文献

- [1] 每日新报(天津). 质监夜间突击检查捣毁两吨“毒凉皮”[EB/OL]. [2014-08-27]. http://www.tianjinwe.com/tianjin/sh/paeq/201408/t20140827_689377.html.
Meirixinbao (Tianjin). Supervision night raids destroyed two tons "poison Liangpi" [EB/OL]. [2014-08-27]. http://www.tianjinwe.com/tianjin/sh/paeq/201408/t20140827_689377.html.
- [2] 厦门网. 曾厝垵一铁皮屋生产“三无凉皮” 生产环境脏乱差 [EB/OL]. [2015-05-23]. http://news.xmnn.cn/a/xmxw/201505/t20150523_4486295.htm.
- [3] GB 2760-2014 食品添加剂使用卫生标准 [S].
GB 2760-2014 Hygienic standards for uses of food additives [S].
- [4] CFR-Code of Federal Regulations Title 21 [EB/OL]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=172&showfr=1&subpartnode=21:3.0.1.1.3.2>.
- [5] 叶银枝. 脱氢醋酸钠在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2002, (03): 64-66.
Ye YZ. Dehydrogenation sodium acetate in food applications [J]. China Food Addit, 2002, (03): 64-66.
- [6] 殷德荣. 毛细管气相色谱法同时测定食品中山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、尼泊金丙酯[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, (04): 469-471.
Yin DR. Determination of sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, propyl paraben by capillary gas chromatography [J] Chin J Health Lab, 2004, (04): 469-471.
- [7] 宗万里, 曲淑霞, 王妍. 毛细管气相色谱法测定面包中脱氢乙酸含量[J]. 生命科学仪器, 2012, (02): 8-10.
Zong WL, Qu SX, Wang Y. Determination of dehydroacetic acid by capillary gas chromatography in bread [J]. Life Sci Instrum, 2012, (02): 8-10.
- [8] 张敬波, 姜俊, 佟克兴, 等. 毛细管柱-气相色谱法测定食品中脱氢乙酸[J]. 理化检验(化学分册), 2011, (05): 533-535, 538.
Zhang JB, Jiang J, Tong KX, *et al.* Determination of dehydroacetic acid by capillary column-gas chromatography in food [J]. Phy Test (Chem Anal), 2011, (05): 533-535, 538.
- [9] 龚睿睿. 毛细管气相色谱法测定食品中脱氢乙酸[J]. 粮油加工, 2009, (09): 55-58.
Gong RR. Determination of dehydroacetic acid by capillary gas chromatography in food [J]. Grain Oil Proc, 2009, (09): 55-58.
- [10] GB/T 5009.121-2003 食品中脱氢乙酸的测定 [S].
GB/T 5009.121-2003 Determination of dehydroacetic acid in foods [S].
- [11] 赵舒景, 常晓歌, 刘宏坤, 等. 紫外分光光度法测定火腿肠中脱氢乙酸钠[J]. 河南预防医学杂志, 2007, 18(03): 186-189.
Zhao SJ, Chang XG, Liu HK, *et al.* Determination of dehydrogenation sodium acetate by UV spectrophotometry in ham [J]. Henan J Prev Med, 2007, 18 (03): 186-189.
- [12] 陈丹萍, 褚庆华, 杨富春, 等. 紫外分光光度法快速测定调味

- 品中脱氢乙酸含量[J]. 中国食品添加剂, 2015, (04): 195-198.
Chen DP, Chu QH, Yang FC, *et al.* Rapid Determination of dehydrogenation acid by UV spectrophotometry in condiments content [J]. Chin Food Addit, 2015, (04): 195-198.
- [13] 罗晓燕, 刘莉治, 李晓东, 等. HPLC 法测定月饼中的脱氢乙酸钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, (03): 301-302.
Luo XY, Liu LZ, Li XD, *et al.* HPLC method for the determination of sodium acetate dehydrogenation moon cake [J] Chin J Health Lab, 2003, (03): 301-302.
- [14] 刘义, 朱显琴, 邱宏, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中的糖精钠、苯甲酸、山梨酸、富马酸二甲酯和脱氢乙酸钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, (03): 582-583.
Liu Y, Zhu XQ, Qiu H, *et al.* High performance liquid chromatography determination of sodium saccharin, benzoic acid, sorbic acid, dimethyl fumarate and sodium acetate dehydrogenation [J]. Chin J Health Lab, 2009, (03): 582-583.
- [15] 康绍英, 张继红, 沈汇琴, 等. 二极管阵列-高效液相色谱同时检测食品中的安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠和脱氢乙酸[J]. 食品与机械, 2007, (05): 118-121.
Kang SY, Zhang JH, Shen HQ, *et al.* Detection of food acesulfame potassium benzoic acid sorbic acid and saccharin sodium and dehydroacetic acid by DAD-high performance liquid chromatography [J]. Food Mach, 2007, (05): 118-121.
- [16] 杜玉锋, 桂淦, 束婧婷, 等. HPLC 检测鸡组织中脱氢乙酸残留量的研究[J]. 中国家禽, 2012, (24): 25-28.
Du YF, Gui G, Shu JT, *et al.* Residues determination of dehydrogenation acid in chicken [J]. China Poultry, 2012, (24): 25-28.
- [17] 林源, 曾小明, 吴海智, 等. 高效液相色谱法测定食品中的脱氢乙酸[J]. 食品与机械, 2009, (03): 99-100, 105.
Lin Y, Zeng XM, Wu HZ, *et al.* Determination of dehydroacetic acid in food by HPLC [J]. Food Mach, 2009, (03): 99-100, 105.
- [18] 张凤林. 液态食品中脱氢乙酸含量的高效液相色谱测定方法的研究[J]. 数理医药学杂志, 2010, (02): 224-225.
Zhang FL. High performance liquid chromatography method for determination of dehydroacetic acid content of liquid food products [J]. J Math Med, 2010, (02): 224-225.
- [19] 梁可, 黄惠敏. 高效液相色谱法同时检测食品中脱氢乙酸、山梨酸、苯甲酸、糖精钠的含量[J]. 科技传播, 2010, (18): 103-104.
Liang K, Huang HM. HPLC method to detect the content of dehydrogenation acid, sorbic acid, benzoic acid, sodium saccharin in food [J]. Sci Commun, 2010, (18): 103-104.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



王 艳, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测方向。
E-mail: wy@hxxy.edu.cn