

固相萃取-高效液相色谱法测定淀粉及淀粉制品中顺丁烯二酸的含量

林晓佳, 陈树东*, 何敏恒, 李秀英
(广州市质量监督检测研究院, 广州 511447)

摘要: **目的** 建立固相萃取分离-高效液相色谱检测淀粉及淀粉制品中顺丁烯二酸含量的分析方法。 **方法** 用 SAX 固相萃取小柱提取样品中的待测化合物后, 以 Synergi 4 μ Hydro-Rp -80a C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 4 μ m), 0.1% CF₃COOH 溶液(V:V)为流动相, 有效分离样品中的顺丁烯二酸。 **结果** 顺丁烯二酸色谱峰面积的自然对数与浓度的自然对数呈良好的线性关系, 相关系数(r^2)为 0.9998, 回收率在 88.9%~94.2%之间, 相对标准偏差 1.7%~2.9%, 检出限(LOD)为 1.5 mg/kg($S/N=3$)。 **结论** 该法操作快速简单, 准确度高, 重现性好, 能够满足实际检测需要。

关键词: 顺丁烯二酸; 顺丁烯二酸酐; 固相萃取-高效液相色谱法; 淀粉

Determination of maleic acid in starch and starch products by solid phase extraction-high performance liquid chromatography

LIN Xiao-Jia, CHEN Shu-Dong*, HE Min-Heng, LI Xiu-Ying
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of maleic acid in starch and starch products by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Methods** A SAX solid phase extraction column was used to extract the analytes from the samples. The maleic acid in the sample was effectively separated on a Synergi 4 μ Hydro-Rp-80a C₁₈ column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 4 μ m), using 0.1% CF₃COOH (V:V) as the mobile phase. **Results** The natural logarithm of chromatographic peak area and concentration had a good linear relationship ($r^2>0.9998$). The results indicated that the limit of quantification (LOD) of maleic acid was 1.5 mg/kg ($S/N=3$). The recoveries of maleic acid from spiked samples were ranged from 88.9% to 94.2% with RSDs of 1.7%~2.9% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, precise and had high recoveries for the determination of maleic acid in actual samples.

KEY WORDS: maleic acid; maleic anhydride; solid phase extraction-high performance liquid chromatography; starch products

1 引言

顺丁烯二酸, 又称马来酸, 作为一种人工合成的有机

酸, 顺丁烯二酸是重要的有机化工原料, 其用途非常广泛, 主要用于制造不饱和聚酯树脂、醇酸树脂漆、农药、润滑油添加剂等, 经深加工可生产 1,4-丁二醇、C-丁内脂、四氢

*通讯作者: 陈树东, 工程师, 主要研究方向为食品和农产品质量安全检测技术。E-mail: uu3g@163.com

*Corresponding author: CHEN Shu-Dong, Engineer, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, No.1-2 Zhujiang Road, Chaotian Industrial District, Panyu District, Guangzhou 511447, China. E-mail: uu3g@163.com

呋喃、酒石酸、富马酸等系列精细化学品, 也可作为淀粉处理剂^[1]。经处理后的淀粉可用于改善食品的弹性和黏性, 以及改善食品外观光泽度, 同时这种物质还可以提高淀粉的保质期。有研究发现顺丁烯二酸能损害眼部及肾脏^[2]。顺丁烯二酸并不在食品添加剂卫生标准(GB 2760-2014)^[3]允许添加的食品添加剂目录中, 不是合法食品添加剂。而市场上, 一些不良商家为了提高淀粉的弹性、粘度和稳定性, 在食用淀粉中加入大量顺丁烯二酸淀粉酯, 而使食用淀粉存在着巨大的食品安全隐患^[16-18]。因此, 建立一种检测食用淀粉中的顺丁烯二酸及顺丁烯二酸酐的方法是非常必要的。

顺丁烯二酸的检测方法有滴定法^[4], 紫外分光光度法^[5,6], 气相色谱法^[7], 离子色谱法^[8,9], 气相色谱质谱法^[10]、高效液相色谱法^[11-14]、高效液相色谱-串联质谱法^[11]等。目前, 检测顺丁烯二酸比较准确有效的方法是高效液相色谱法。然而, 由于淀粉及淀粉产品种类较多, 成分复杂, 而顺丁烯二酸的检测波长较低, 在检测过程中存在很多的干扰, 对结果的判断和准确定量有较大的影响。本实验利用 LC-SAX 强阴离子交换固相萃取柱对样品进行净化, 以去除复杂样品中的基质干扰, 提高样品纯度和检测灵敏度^[10,11]。该方法操作简单、可靠, 适用于对淀粉及淀粉制品中顺丁烯二酸进行准确的定性及定量。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

顺丁烯二酸标准品(99%, 美国 Sigma 公司); 甲醇(色谱级, 德国 Merck 公司); 三氟乙酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 无水乙醇(分析纯, 广州化学试剂厂); 氨水(分析纯, 广州化学试剂厂); 硫酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂)。

强阴离子交换固相萃取柱 SAX-SPE(500 mg, 6 mL, Waters); Synergi Hydro-RP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm)

实验样品: 小麦粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉、地瓜粉、变性淀粉、珍珠粉圆、复合淀粉均购于当地市场。

2.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪-配二极管阵列 DAD 检测器(美国 Agilent 公司); KQ5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 3-3000 型高速离心机(德国 Sigma 公司); Mili-Q 纯水系统(美国 Milipore 公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 标准溶液的制备

标准储备溶液(1.0 mg/mL)的配制: 称取顺丁烯二酸 0.1000 g 于 100 mL 容量瓶中, 用去离子水溶解后定容, 充分摇匀备用。此溶液于 4 °C 冰箱中可储存 3 个月。将标准

储备溶液用去离子水配制成 0.5、5.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL 系列标准溶液, 使用前配制。

2.3.2 试样处理

准确称取 2.5 g 样品于 50 mL 塑料离心管中, 加乙醇-水(1:1, V:V)定容至刻度, 充分摇匀, 超声波提取 10 min, 以 3000 r/min 离心 3 min; 取 5.0 mL 上清液加入一滴酚酞指示剂, 取用 5%氨水(V:V)调至溶液变为浅红色, 将清液转移至已经过活化平衡的 SAX 固相萃取柱中以自然流速过柱, 待样品全部吸附后用 3 mL 水淋洗, 流速约 3 mL/min, 抽至近干后, 用 2 mL 0.1%硫酸以不超过 1 mL/min 流速洗脱。洗脱液过滤后, 供 HPLC 分析。

2.3.3 液相色谱操作条件

色谱柱: 菲罗门 Synergi 4μ Hydro-Rp-80a C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm); 流动相: 0.1 mol/L CF₃COOH(V:V); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 215 nm; 进样体积 20 μL; 柱温: 25 °C。

2.3.4 测定步骤

将标准工作溶液按照质量浓度由低到高的顺序进样测定, 在 215 nm 波长处, 以色谱图中的峰面积对其质量浓度绘制标准曲线。试样溶液进样后, 以色谱图中的保留时间及相应的光谱图定性, 峰面积定量。

3 结果与分析

3.1 色谱柱和流动相的选择

Synergi Hydro-RP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 极性端基封尾 C₁₈ 色谱柱, 对非极性及强极性烷基化合物有超强保留。在 100%无机相流动相条件下对高极性化合物有强保留, 故本论文采用 0.1%(V:V)三氟乙酸水溶液作为流动相, 目标物质有较好的峰型, 峰宽合理。

3.2 固相萃取柱的选择

本文比较了 C₁₈、SCX 和 SAX 3 种 SPE 柱对淀粉制品中顺丁烯二酸萃取效果以及去除干扰物的效果。分别将调节 pH 后的样品溶液直接过 SPE 柱, 收集了以 C₁₈ 柱洗脱的净化液, 以及 SAX 和 SCX 柱的洗脱液进行分析。结果显示, 尽管 C₁₈ 对色素有较好的吸附作用, 但对部分样品蛋白质的吸附作用较差, 干扰了顺丁烯二酸的分析。SAX 柱是以季胺基为填料, 通过阴离子交换方式吸附有机酸, 而蛋白质和部分色素则不被吸附, 从而达到去除干扰物的目的。而 SCX 柱是以苯磺酸基为填料, 通过阳离子交换方式吸附有机酸。从分析结果看, 顺丁烯二酸在 SCX 柱保留不如 SAX 柱, 导致顺丁烯二酸的回收率偏低。这是因为顺丁烯二酸属于弱酸, 其 pK_a>2, 在弱阴离子交换柱中保留较好, 需要使用强阴离子交换柱才能有较好的保留, 因此选择 SAX 柱进行净化。净化前后的色谱图见图 1。

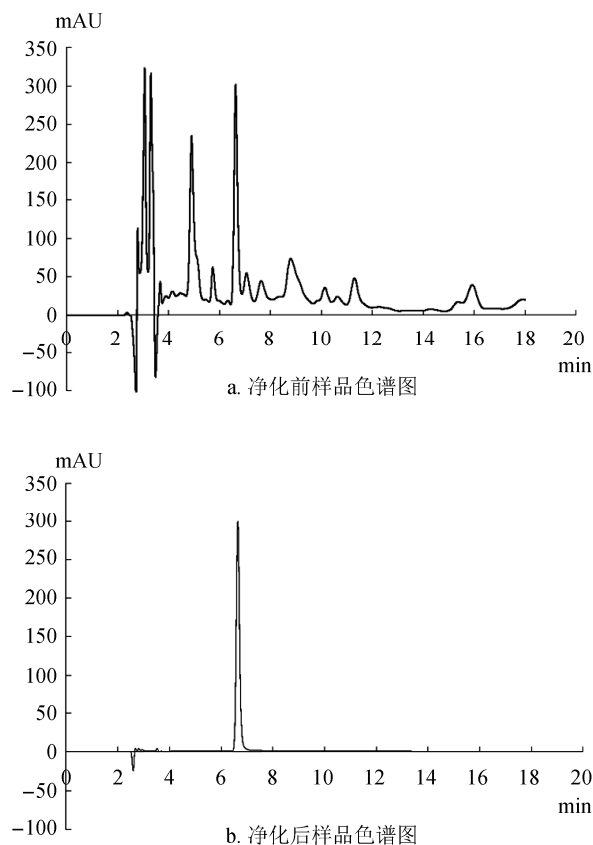


图 1 SCX 柱净化前后的色谱图

Fig. 1 The chromatograms of maleic acid before and after elution

3.3 对调节样品溶液 pH 的氨水溶液浓度的选择

SAX 柱是以强阴离子交换形式, 将目标物质吸附在填料中。为了保证顺丁烯二酸被 SPE 柱有效吸附, 需要通过调节样品 pH 使之以阴离子形式被吸附。由于顺丁烯二酸是弱酸, 其盐呈弱碱性, 一定比例的氨水溶液将样品溶液调至弱碱性, 以确保待测物以离子形式存在于样品溶液中。实验以 1%、5%、10%氨水溶液(V:V)进行比较, 由图 2 可见, 5%氨水溶液(V:V)加标回收率最高。

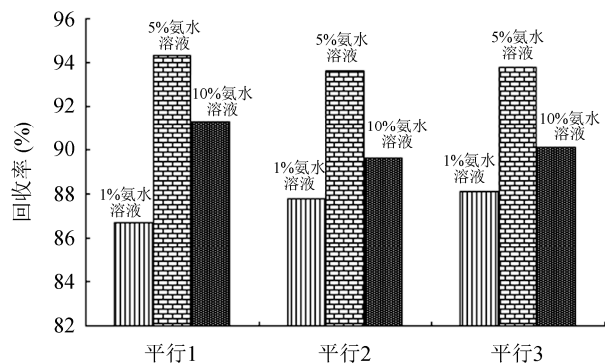


图 2 氨水浓度对样品回收率的影响

Fig. 2 Effects of different ammonia concentrations on recoveries

3.4 淋洗液和洗脱剂的选择

当弱碱性的样品溶液进入 SAX 小柱, 目标物被吸附在填料中, 色素及糖类不被吸附流出 SAX 小柱, 为了让目标物更好的与其它物质分离, 需要用淋洗液淋洗 SAX 小柱, 本文以阴性样品对比了超纯水、乙醇及乙醇-水(1:1, V:V)3 种溶液, 由表 1 可见, 超纯水同样能很好地净化 SAX 小柱, 达到目标物与其它物质分离的目的, 而且环保便捷, 故选用超纯水作为样品淋洗液。

表 1 不同淋洗液对回收率的影响
Table 1 Effects of different eluents on recoveries

淋洗液类型	回收率/%		
	平行 1	平行 2	平均值/%
超纯水	93.2	93.3	93.2
乙醇	94.5	94.1	94.3
乙醇-水(1:1, V:V)	93.6	93.8	93.7

为了使目标物从 SAX 柱上被洗脱出来, 洗脱剂应选择强酸溶液, 有机酸在酸性条件下以分子形式存在, 致使 SAX 柱对其保留性大大降低, 从而达到洗脱的目的。而洗脱剂的用量同样需要严格控制, 洗脱剂用量不足时目标分析物不能完全从 SPE 柱上洗脱, 洗脱剂用量过多时会导致稀释倍数过大, 本文分别比较了 1、1.5、2、2.5、3 mL 5 种不同体积的洗脱剂, 在相同上样量的基础上对比 0.1%硫酸-水溶液(V:V)和 0.1%盐酸-水溶液(V:V)对顺丁烯二酸洗脱效果的影响, 结果表明两种相同浓度的酸溶液对顺丁烯二酸的洗脱效果相近。由图 3 可见, 洗脱剂超过 2 mL 之后, 回收率基本相同, 因此选择洗脱剂用量为 2 mL 0.1%硫酸-水溶液(V:V)。

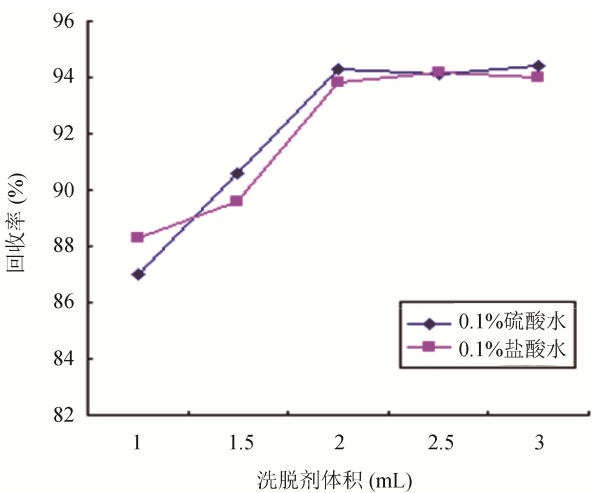


图 3 不同洗脱剂体积对样品回收率的影响

Fig. 3 Effects of different volumes of eluent on recoveries

3.5 线性关系和检出限

配制质量浓度为 0.5、2.5、10.0、50.0、150.0 mg/L 的顺丁烯二酸标准溶液, 经 HPLC 分析后, 以顺丁烯二酸的响应峰面积(Y)对其质量浓度(X, mg/L)作标准曲线, 其线性范围为 0.5~150.0 mg/L, 线性方程为 $Y=2468.2X-1019$, 相关系数 $r^2=0.9998$, 以 3 倍信噪比($S/N=3$)计算得方法的检出限(LOD)为 1.5 mg/kg。

3.6 回收率和精密度

分别取玉米淀粉、变性淀粉和珍珠粉圆 3 种具有代表性的样品, 进行 3 个水平添加回收率试验, 每个加标水平测定 6 次, 方法回收率和相对标准偏差(RSD)见表 2。回收率在 88.9%~94.2%之间, 相对标准偏差在 1.7%~2.9%之间, 说明方法的准确度和精密度达到分析要求。

表 2 样品添加回收率和精密度结果(n=6)
Table 2 Recovery and precision results of samples (n=6)

添加水平/mg/L	测定项目	玉米淀粉	变性淀粉	珍珠粉圆
0	含量/mg/L	0	0	0
	回收率/%	93.2	95.4	88.9
5	RSD /%	2.6	2.6	2.3
	回收率/%	91.6	93.5	90.7
25	RSD/%	1.7	2.7	1.9
	回收率/%	94.2	91.2	92.0
100	RSD /%	2.1	2.9	1.8

4 结 论

建立了固相萃取-高效液相色谱方法对淀粉及淀粉制品中顺丁烯二酸的检测方法, 该方法具有分离效果好、定量准确、干扰小、灵敏度高等优点, 可用于复杂样品中顺丁烯二酸的检测。实验探讨了色谱柱和流动相固相萃取柱对调节样品 pH 值的氨水浓度以及淋洗液和洗脱液的选择, 确定了前处理方法采用 SAX 强阴离子交换固相萃取柱对淀粉及淀粉制品进行净化的方法能更好的消除杂质干扰, 定量更准确, 并采用 Synergi Hydro RP C₁₈ 色谱柱对顺丁烯二酸进行检测能较好的保留, 在纯水相环境下可对顺丁烯二酸准确定性和定量, 方法绿色环保。

参考文献

[1] 徐敦明, 陈燕, 周爽, 等. 液相色谱-串联质谱法测定淀粉及其制品中的顺丁烯二酸与顺丁烯二酸酐总含量[J]. 色谱, 2013, 31(12): 1224-1227.
Xu DM, Chen Y, Zhou S, *et al.* Determination of the total amount of maleic acid and maleic anhydride in starch and its products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J

Chromatogr, 2013, 31(12): 1224-1227.
[2] 何芸, 刘树滔, 林钦. 顺丁烯二酸的应用及检测方法的研究进展[J]. 福建分析测试, 2015, (1): 16-19.
He Y, Lin ST, Lin Q. Advance of the application and measurement of maleic acid [J]. Fujian Anal Test, 2015, (1): 16-19.
[3] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard Standard for uses of food additives [S].
[4] 肖玲. 顺丁烯二酸酐含量测定研究[J]. 化工技术与开发, 2005, 34(6): 45-46.
Xiao L. Selection of indicator for determination of maleic anhydride [J]. Technol Dev Chem Ind, 2005, 34(6): 45-46
[5] 李彦威, 方慧文, 梁素霞, 等. 偏最小二乘紫外分光光度法同时测定丁烯二酸的顺反异构体[J]. 分析化学, 2008, 36(1): 95-98.
Li YW, Fang HW, Liang SX, *et al.* Simultaneous determination of cis and trans-butenedioic acid by partial least squares ultraviolet spectrophotometry [J]. Chin J Anal Chem, 2008, 36(1): 95-98.
[6] 高翠英, 孟俊亮, 李彦威. 紫外分光光度法测定马来酸含量[J]. 太原理工大学学报, 2008, 39(3): 230-231.
Gao CY, Meng JL, Li YW. Determination of the purity maleic acid by UV spectrophotometry [J]. J Taiyuan Univ Technol, 2008, 39(3): 230-231.
[7] 李金华. 气相色谱和气-质联用快速分析催化合成顺丁烯二酸二甲酯产物[J]. 化学工程与装备, 2008, (12): 134-137.
Li JH. Gas chromatography and gas-ms quick analysis of catalytic synthesis of dimethyl maleate [J]. Chem Eng Eq, 2008, (12): 134-137.
[8] 林高明, 陈梅兰, 胡忠阳, 等. 离子色谱法测定淀粉中的顺丁烯二酸(酐)[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (5): 668-669.
Lin GM, Chen ML, Hu ZY, *et al.* Determination of maleic acid (anhydride) in starch by ion chromatography [J]. China J Health Lab Tech, 2014, (5): 668-669
[9] 王存进, 杜晓磊. 离子色谱法测定乙醛酸中的顺丁烯二酸和乙二酸[J]. 化学分析计量, 2013, 22(2): 94-96.
Wang CJ, Du XL. Determination of maleic acid in glyoxylic acid ion chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2013, 22(2): 94-96.
[10] 王立媛, 吴平谷, 张晶, 等. GC/MS 测定淀粉制品中顺丁烯二酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (5): 639-640.
Wang LY, Wu PG, Zhang J, *et al.* Determination of maleic acid in starch products by GC/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, (5): 639-640.
[11] 岳虹, 赵贞, 刘春霞, 等. HPLC 法测定发酵乳中顺丁烯二酸含量[J]. 饮料工业, 2015, (2): 23-25.
Yue H, Zhao Z, Liu CX, *et al.* Determination of cis-2-butenedioic acid in fermented milk by HPLC [J]. Beverage Ind, 2015, (2): 23-25.
[12] 王丹, 方从容, 鲁杰, 等. 淀粉类食品中顺丁烯二酸的高效液相色谱测定方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (14): 1977-1979.
Wang D, Fang CR, Lu J, *et al.* Multi-target analysis of maleic acid in starch products by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, (14): 1977-1979.
[13] 薛霞, 张艳侠, 王艳丽, 等. 高效液相色谱法测定淀粉及相关食品中马来酸(酐)与富马酸的含量[J]. 分析测试学报, 2014, 33(3): 324-328.
Xue X, Zhang YX, Wang YL, *et al.* Determination of maleic acid (maleic anhydride) and fumaric acid in starch and related foods by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(3): 324-328.

- [14] 李杰, 于瑞祥. 高效液相色谱法测定淀粉与饮料中马来酸和富马酸[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(3): 55–57.
Li J, Yu RX. HPLC determination of maleic acid and fumaric acid in starch and drink [J]. Res Explor Lab, 2014, 33(3): 324–328.
- [15] 马欣欣, 杨水莲. 急性重度顺式丁烯二酸酐中毒1例报告[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21(2): 87–88.
Ma XX, Yang SL. A case report on acute severe maleic anhydride poisoning [J]. Chin J Ind Med, 2008, 21(2): 87–88.
- [16] Li ZY, Qin W. Equilibrium of extraction of succinic, malic, maleic and fumaric acids with trioctylamine [J]. Chin J Chem Eng, 2002, 10(3): 281–285.
- [17] Li HF, Li H, Zhong X, *et al.* Study on the chemical modification of cellulose in ionic liquid with maleic anhydride [J]. Adv Mater Res, 2012, 581–582: 287–291.
- [18] 台湾“毒淀粉”风波席卷小吃业[EB/OL]. http://news.xinhuanet.com/fortune/2013-05/28/c_115943141.html. 2013-05-28.
Poison starch storm swept across Taiwan snack industry [EB/OL].

http://news.xinhuanet.com/fortune/2013-05/28/c_115943141.html.
2013-05-28.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



林晓佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 442592788@qq.com



陈树东, 工程师, 主要研究方向为食品和农产品质量安全检测技术。
E-mail: uu3g@163.com