

高效液相色谱法测定小麦粉中乙二胺四乙酸二钠的方法优化

关炳峰¹, 杜 瑞¹, 陈 红¹, 尹红娜¹, 陈世伟^{2*}

(1. 河南省商业科学研究所有限责任公司, 郑州 450002; 2. 河南省食品药品评价中心, 郑州 450018)

摘 要: **目的** 优化高效液相色谱法测定小麦粉中乙二胺四乙酸二钠的分析方法。**方法** 以 C₁₈ 为色谱柱, 甲醇:四丁基溴化铵-乙酸钠混合溶液(pH 4.0)体积比为 5:95 为流动相, 三氯甲烷净化提取液, 三氯化铁衍生 EDTA-2Na。**结果** 乙二胺四乙酸二钠浓度在 2~100 μg/mL 范围内线性关系良好($r^2=0.99999$), 检出限 2.0 mg/kg, 定量限 7.0 mg/kg, 平均回收率在 89%以上。**结论** 本方法简便快捷、结果准确、重复性良好, 适合测定小麦粉中乙二胺四乙酸二钠的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 乙二胺四乙酸二钠; 小麦粉; 流动相; 色谱柱

Optimization of determination of disodium ethylene diamine tetraacetate in wheat flour by high performance liquid chromatography

GUAN Bing-Feng¹, DU Rui¹, CHEN Hong¹, YIN Hong-Na¹, CHEN Shi-Wei^{2*}

(1. Henan Commerce Science Institute Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China;
2. Henan Food and Drug Evaluation Center, Zhengzhou 450018, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the method for determination of disodium ethylenediamine tetraacetate in wheat flour by high performance liquid chromatography. **Methods** C₁₈ column was used as the chromatographic column, and the volume ratio of methanol: tetrabutylammonium bromide-sodium acetate mixed solution (pH 4.0) was 5:95 as mobile phase. The chloroform was used to purify the extract, and EDTA-2Na was derived from ferric chloride. **Results** The linear relationship was good when the concentration of disodium ethylenediamine tetraacetate was 2–100 μg/mL ($r^2=0.99999$), the detection limit was 2.0 mg/kg, the limit of quantification was 7.0 mg/kg, and the average recovery rate was above 89%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and repeatable, which is suitable for the determination of disodium ethylenediamine tetraacetate in wheat flour.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; disodium ethylene diamine tetraacetic acid; wheat flour; mobile phase; chromatographic column

基金项目: 河南省科技攻关项目(182102310064)

Fund: Supported by Key Scientific and Technological Projects in Henan Province (182102310064)

*通讯作者: 陈世伟, 副主任医师, 主要研究方向食品药品安全监测。E-mail: csw3000@163.com

*Corresponding author: CHEN Shi-Wei, Associate Chief Physician, Food and Drug Safety Monitoring, Henan Food and Drug Evaluation Center, Zhengzhou 450018, China. E-mail: csw3000@163.com

1 引言

小麦是全世界分布范围最广、种植面积最大、总产量最高、贸易额最多的粮食作物,是世界上 1/3 以上人口的主食。我国是全球小麦产量和消费量最大的国家,小麦是仅次于水稻而居第二位的粮食作物,在我国粮食总量平衡中占有重要地位,素有“中原粮仓”和“中国厨房”之称的河南,不仅小麦产量占全国总产量的 26%,而且是全国最大的小麦粉及面制品生产基地。因此,小麦粉的食用安全性对我国以及河南省的经济发展以及人民生活意义重大。

仅面粉允许添加的食品添加剂就有面粉处理剂、抗氧化剂、水分保持剂、膨松剂、酸度调节剂、稳定剂、凝固剂、抗结剂等多种。这些食品添加剂都有严格的使用标准,但在生产过程中时常有超范围或超量使用的情况,尤其是在溴酸钾、过氧化苯甲酰、硫酸铝钾等相继被禁止在面粉中使用后,小麦粉中是否有未被监控的、未知的食品安全危险物质值得注意^[1-4]。我省在对以往的抽检样品中发现疑似乙二胺四乙酸二钠的异常峰。

乙二胺四乙酸二钠目前可以作为稳定剂、凝固剂、抗氧化剂、防腐剂使用,但是不能用在小麦粉中。若不按规定或超限量使用乙二胺四乙酸二钠,就会影响人的身体健康,导致人体中微量元素的流失,对上呼吸道、眼睛、黏膜产生影响,可引起呕吐、腹泻、和急腹痛等症状^[5-7]。因此,研究对小麦粉中乙二胺四乙酸二钠的检测研究就显的尤为重要。目前,食品中乙二胺四乙酸二钠的检测方法主要包括 GB 5009.278-2016^[8]和 SN/T 3855-2014^[9],但这 2 种方法都不适用于小麦粉。

因此,本研究优化了高效液相色谱法测定小麦粉中乙二胺四乙酸二钠含量的方法,以期相关部门的监管提供技术参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪,附二极管阵列检测器(美国安捷伦公司);色谱柱: Hypersil GOLD SAX (4.6 mm×150 mm, 5 μm, 美国 Thermo Scientific 公司); Diamonsil Plus C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 迪马科技公司)。

甲醇(色谱纯, 迪马科技公司); 浓盐酸、浓磷酸、三氯化铁 FeCl₃·6H₂O (分析纯, 阿拉丁试剂有限公司); 乙二胺四乙酸二钠二水合物标准品(99.5%,N11936-1G, 上海安谱科学仪器有限公司)

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

0.02 mol/L 三氯化铁溶液: 称取 0.54 g 三氯化铁,溶于 90 mL 水中,转移至 100 mL 容量瓶中,加入 0.03 mL

浓盐酸,加入超纯水定容至 100 mL,混匀,备用。

1.0 mol/L 磷酸溶液: 量取 68 mL 浓磷酸,超纯水稀释,定容至 1000 mL,混匀,备用。乙二胺四乙酸二钠标准储备溶液: 准确称取 100 mg 乙二胺四乙酸二钠二水合物标准品,用水溶解转移入棕色容量瓶中,加入超纯水定容至 50 mL,得到质量浓度为 2.0 mg/mL 的标准储备溶液,4 °C 条件下储存备用。

2.2.2 样品处理方法

称取面粉 2.5 g,分别加水和三氯甲烷各 10 mL,震荡 20 min 超声 20 min,8000 r/min 离心 10 min,移取上清液于 50 mL 离心管中。加入水 10 mL,重复以上步骤,收集上清液^[7-9]。合并上清液。

衍生化: 上清液中加入 2 mL 三氯化铁混合,然后水定容,超声 10 min,过滤上机。

2.2.3 液相色谱条件^[10-14]

色谱柱 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 甲醇: 四丁基溴化铵-乙酸钠混合溶液(pH4.0)体积比为 5:95; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL。

3 结果与分析

3.1 前处理条件的优化

按照国标 GB 5009.278-2016^[8]方法对面粉样品进行前处理。面粉样品加水震荡 20 min,静置 30 min 后高速(12000 r/min)离心,离心液过固相萃取柱。实验发现,由于面粉中含有大量的淀粉、蛋白等大分子有机物,加水震荡离心后会使大分子化合物析出,从而导致 SPE 小柱堵塞,影响了实验结果准确性。参考相关文献资料^[7-9]采用三氯甲烷净化,通过加标回收实验,提取液经三氯甲烷液液萃取净化后,回收率在 90%以上,同时在三氯甲烷和水相两相交界面处会有大量白色粘稠物析出。结果显示,与固相萃取小柱净化相比,采用三氯甲烷净化,成本更低,结果更准确。

3.2 流动相的选择

研究发现采用 GB 5009.278-2016 使用的流动相(85:15, V:V), EDTA 目标峰附近有一杂质峰,杂质峰与 EDTA 分离度为 1.5,基线基本分离。但长时间运行, EDTA 峰和杂质峰出峰时间发生变化,会造成 EDTA 峰和杂质峰基线不分离。通过优化流动相中有机相和水相比(17:83、15:85、12:88、10:90、8:92、5:95)发现: 水相比比例不断增大,杂质峰和 EDTA 峰的出峰顺序、分离度均发生变化。高有机相时,杂质峰先出, EDTA 峰后出; 高水相时 EDTA 峰先出,杂质峰后出; 其中比例在 12:88(V:V)和 10:90(V:V)时,目标峰和 EDTA 峰均没有分开,有机相水相比在 12:88(V:V)时,杂质峰先出, EDTA 峰后出; 有机相水相比为 10:90(V:V)时, EDTA 峰先出,杂质峰后出。随着有机相比

例减小, EDTA 和杂质峰分离度越来越大。若水相比比例大于 95%, 色谱柱长时间运行会造成色谱柱填料塌陷, 缩短色谱柱寿命。同时实验中也发现液相系统压力随着水相比比例增大而减小, 这主要是流动相中含有表面活性剂和高浓度缓冲盐, 高有机相时, 会降低表明活性剂和缓冲盐溶解度, 造成流动相粘度大, 体系压力大。因此最终选择流动相为: 甲醇:离子对试剂-乙酸铵混合溶液(pH 3)的比例为 5:95。色谱图如图 1 所示。

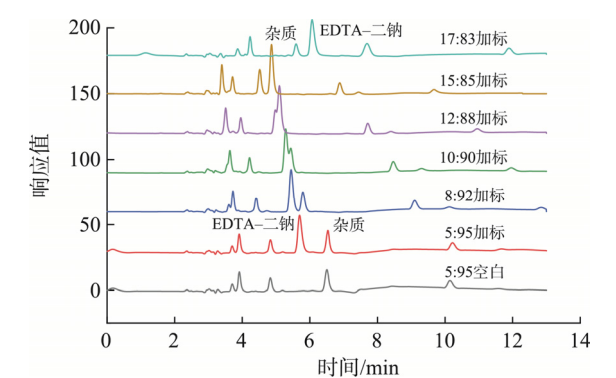


图 1 C₁₈ 色谱柱流动相条件优化
Fig.1 Optimization of mobile phase condition for C₁₈ column

3.3 色谱柱选择

分别考察了 C₁₈、SAX 两款色谱柱, 其中 SAX 色谱柱流动相中不需要加入离子对试剂, 但流动相中需要加入 10 g 左右磷酸二氢钾缓冲盐, 调节流动相 pH(pH=2.3/3.0/4.0)。结果发现: pH 为 2.3 时, EDTA 响应值最大, 但后面有一个大的未知拖尾峰, pH 为 4.0 时响应值最低, 主峰后没有未知拖尾峰, 见图 2。在实验室分析检测过程中, C18 色谱柱适合绝大多数化合物的分析检测, 而适合 SAX 柱分析检测的化合物很少。因此实验室中最常见色谱柱为 C₁₈ 色谱柱; 选用 C₁₈ 色谱柱分析检测 EDTA, 通过对流动相进行优化, 可以满足。若选用 SAX 专用色谱柱分析检测 EDTA, 则会增加实验室成本。同时, 为了提高检测效率, 很多实验室都装备了超高效液相色谱, 目前市售的超高效

色谱柱主要为 C₁₈ 柱, 而 SAX 超高效柱相对比较少见。

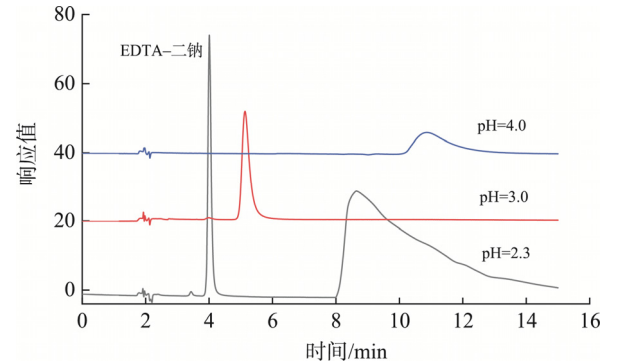


图 2 SAX 色谱柱的 pH 优化
Fig.2 pH optimization of SAX chromatographic columns

3.4 方法验证

以乙二胺四乙酸二钠浓度(X /(mg/kg))为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 计算线性方程及相关系数。以信噪比 3 时对应的乙二胺四乙酸二钠的浓度计算方法检出限, 以信噪比 10 时对应的乙二胺四乙酸二钠的浓度计算方法检出限结果最低定量浓度, 结果为检出限 2.0 mg/kg, 定量限 7.0 mg/kg。选取 4 个不含乙二胺四乙酸二钠的面粉样品, 根据 GB 2760-2014 中乙二胺四乙酸二钠在部分食品中的添加量及相关文献的研究, 确定添加水平分别为 10、20、50、100 mg/kg, 每个添加水平平行 6 次, 平均回收率均在 89%以上, 相对标准偏差((relative standard deviation, RSD)在 1%~4%之间, 结果见表 1。设置标准检测浓度为 2、5、10、20、50、100 μ g/mL, 得线性方程 $Y=26.37X-6.49$, $r^2=0.99999$, 结果表明该前处理方法重复性好, 结果准确可靠, 适合小面粉中乙二胺四乙酸二钠含量的测定。

称取不含乙二胺四乙酸二钠的小麦粉样品, 添加水平为 50 mg/kg, 平行测定 50 次, 考察 EDTA 在流动相为甲醇: 四丁基溴化铵-乙酸钠混合溶液(pH4.0)体积比为 5:95 条件下, EDTA 的稳定性和精密度。在 50 次重复条件下, EDTA、杂质峰保留时间都很稳定, 其中 EDTAD 的 RSD 值为 0.12%, 其结果如图 3。

表 1 空白面粉样品中乙二胺四乙酸二钠加标回收率的测定($n=6$)
Table 1 Determination of the standard recovery rate of EDTA-2Na in blank flour samples ($n=6$)

样品	加标水平/(mg/kg)	含量/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
A	10	9.73	97.3		
A	10	9.77	97.7		
A	10	9.79	97.9		
A	10	9.45	94.5	97	1.3
A	10	9.61	96.1		
A	10	9.68	96.8		
A	10	9.78	97.8		

续表 1					
样品	加标水平/(mg/kg)	含量/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
B	20	18.12	90.6	93	3.1
B	20	18.14	92.4		
B	20	19.10	95.5		
B	20	17.90	89.5		
B	20	19.52	97.6		
B	20	18.49	92.5		
B	20	19.05	95.3	89	3.8
C	50	41.35	82.7		
C	50	44.02	88.0		
C	50	45.61	91.2		
C	50	46.76	93.5		
C	50	44.52	89.0		
C	50	45.49	91.0	90	1.6
C	50	45.50	91.0		
D	100	88.84	88.8		
D	100	89.56	89.6		
D	100	89.83	89.8		
D	100	90.81	90.8		
D	100	88.19	88.2		
D	100	91.73	91.7	92.3	
D	100	92.27	92.3		

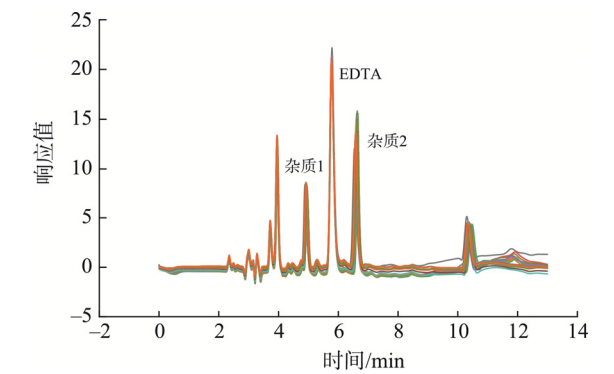


图 3 乙二胺四乙酸二钠 50 针重复试验
Fig.3 The repeated test of EDTA-2Na

4 结 论

本研究建立了采用 C₁₈ 色谱柱, 以甲醇:四丁基溴化铵-乙酸钠混合溶液(pH 4.0)体积比为 5:95 为流动相, 三氯甲烷净化提取液, 三氯化铁衍生 EDTA-2Na, 测定面粉中乙二胺四乙酸二钠含量的高效液相法。设置乙二胺四乙酸二钠检测

浓度为 2、5、10、20、50、100 μg/mL, 得线性方程 $Y=26.37X-6.49$, $r^2=0.99999$, 检出限 2.0 mg/kg, 定量限 7.0 mg/kg, 试验验证平均回收率在 89%以上, 结果表明该前处理方法重复性好, 方法简单, 结果准确可靠, 可为面粉中乙二胺四乙酸二钠含量测定及建立相关检测标准提供参考依据。

参考文献

[1] 毛婷, 路勇, 姜洁, 等. 食品安全未知化学性风险快速筛查确证技术研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 245-253.
Mao T, Lu Y, Jiang J, et al. Recent advances in rapid screening and confirmation methods for the risk of unknown chemical substances in foods [J]. Food Sci, 2016, 37(5): 245-253.
[2] 王海莹. 使用 Triple TOF4600 进行未知物筛查[J]. 食品安全导刊, 2013, (15): 39-40.
Wang HJ. Triple TOF4600 was used for unknown object screening [J]. Food Saf Magaz, 2013, (15): 39-40.
[3] 游新勇, 杨曙明, 赵璐瑶. 农产品中未知物分析的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 263-268
You XY, Yang SM, Zhao LY. Advances in analysis of unknown

- components in agricultural products [J]. Food Sci, 2016, 37(1): 263–268.
- [4] 孙兴权, 曾泽, 赵景红, 等. 组合分析法检测面粉中4种非法添加物[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 305–309.
- Sun XQ, Zeng Z, Zhao JH, *et al.* Determination of 4 illegal additives in wheat flour by combination analysis method [J]. Food Ind Technol, 2013, 34(21): 305–309.
- [5] 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-Food additive use standard [S].
- [6] 许中敏, 鲍小丹, 刘鲁林, 等. 乙二胺四乙酸铁钠的国内外法规情况研究[J]. 中国食品添加剂, 2012, 6(1): 207–211.
- Xu ZM, Bao XD, Liu LL, *et al.* Research of domestic and overseas regulations of sodium iron EDTA [J]. Chin Food Addit, 2012, 6(1): 207–211.
- [7] 李硕, 李莉, 曹金. 高效液相色谱法检测面粉中的乙二胺四乙酸二钠[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 640–645.
- Li S, Li L, Cao J. Determination of ethylene diamine tetraacetic acid isodium in flour by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 640–645.
- [8] GB 5009.249-2016 食品安全国家标准 铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠的测定[S].
- GB 5009.249-2016 National standard for food safety-Determination of iron sodium ethylenediamine tetraacetic acid in iron-fortified soy sauce [S].
- [9] SN/T 3855-2014 出口食品中乙二胺四乙酸二钠的测定[S].
- SN/T 3855-2014 Determination of disodium ethylenediamine tetraacetic acid in export food [S].
- [10] 巫立健, 赖国银, 白松, 等. 高效液相色谱法测定面粉及面粉制品中乙二胺四乙酸二钠的含量[J]. 分析测试学报, 2017, 36(11): 1230–1234.
- Wu LJ, Lai GY, Bai S, *et al.* Determination of disodium ethylene diaminetetraacetic acid in flour and its products by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(11): 1230–1234.
- [11] 魏冬旭, 韩广源, 孙莹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的乙二胺四乙酸二钠[J]. 理化检验: 化学分册, 2014, 50(6): 698–701.
- Wei DX, Han GY, Sun Y, *et al.* HPLC-MS determination of Na₂-EDTA in food [J]. Part B: Chem Anal. 2014, 50(6): 698–701.
- [12] 魏冬旭, 胡坤, 孙莹, 等. 高效液相色谱法测定食品中乙二胺四乙酸二钠[J]. 检验检疫学报, 2013, 23(6): 50–53.
- Wei DX, Hu S, Sun Y, *et al.* Determination of EDTA-2Na in food by high performance liquid chromatography [J]. J Inspect Quarant, 2013, 23(6): 50–53.
- [13] 韩秋珍, 周芳梅, 张思妹. 高效液相色谱法测定蜜饯中乙二胺四乙酸二钠的含量[J]. 西部中医药, 2016, 28(12): 91–96.
- Han QZ, Zhou FM, Zhang SM, *et al.* Determination of ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt content in preserved fruits by high performance liquid chromatography [J]. West J Tradit Chin Med, 2016, 28(12): 91–96.
- [14] 马驰远, 郭平, 陈林, 等. 高效液相色谱法测定腌渍蔬菜罐头中乙二胺四乙酸二钠的含量[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 258–262.
- Ma CY, Guo P, Chen L, *et al.* Determination of ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt content in canned pickled vegetables by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2016, 37(16): 258–262.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



关炳峰, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品加工与食品安全检测。
E-mail: 369394548@qq.com

陈世伟, 副主任医师, 食品药品安全监测。
E-mail: csw3000@163.com