

气相色谱法测定食品添加剂柠檬酸脂肪酸甘油酯中柠檬酸的改进

郑悦珊, 洪泽淳, 李 南, 简德威, 熊含鸿, 陈思敏, 刘莹莹, 孙明蔚, 梁旭霞*
(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 改进气相色谱法测定食品添加剂柠檬酸脂肪酸甘油酯中柠檬酸的分析方法。**方法** 对测定食品添加剂柠檬酸 GB 29951-2013《食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸脂肪酸甘油酯》的气相色谱法中衍生剂、色谱柱以及升温程序进行优化, 并对优化后的方法进行验证。**结果** 选择 N,O-双(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺(BSTFA)作为衍生剂, HP-5 毛细管柱作为分离柱, 温度程序为 80 °C(1 min) -20 °C/min-165 °C(5 min) -30 °C/min-250 °C(1 min), 可在 15 min 内完成对目标物的分离, 线性方程为 $Y=0.67193X+0.05490$, $r=0.9935$, 方法回收率为 93.0%~98.7%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.4%, 检出限为 0.1%。**结论** 该方法目标物分离效果好, 回收率及灵敏度高, 适用于食品添加剂柠檬酸的定量检测。

关键词: 气相色谱法; 总柠檬酸; 添加剂

Improvement of the method for determination of citric acid in citric acid fatty acid glyceride by gas chromatography

ZHENG Yue-Shan, HONG Ze-Chun, LI Nan, JIAN De-Wei, XIONG Han-Hong,
CHEN Si-Min, LIU Ying-Ying, SUN Ming-Wei, LIANG Xu-Xia*

(Guangdong Institute for Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To improve gas chromatography method for the determination of citric acid in glyceryl citrate fatty acid ester of food additive. **Methods** According to GB 29951-2013 *National food safety standard-Food safety national standard food additive extraction method of citric acid fatty acid glyceride*, the derivative, column and temperature program for gas chromatography were optimized, and the optimized method was verified. **Results** BSTFA was selected as a derivative agent, HP-5 capillary column was selected as a separation column, the temperature procedures was 80 °C (1 min) -20 °C/min - 165 °C (5 min) -30 °C / min - 250 °C (1 min). The separation of the target object could be completed within 15 min. The linear equation was $Y=0.67193X+0.05490$, $r=0.9935$. The recovery rate of the method was between 93.0% and 98.7%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.4%, detection limit was 0.1%. **Conclusion** The method has good separation effect, high recovery and sensitivity, and is suitable for quantitative determination of citric acid in food additives

KEY WORDS: gas chromatography; citric acid; additive

*通讯作者: 梁旭霞, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检测与食品安全。E-mail: liangxuxia@126.com

*Corresponding author: LIANG Xu-Xia, Ph.D, Chief Technician, Guangdong Institute of Food Inspection, No.1103 Zengcha Road, Baiyun District, Guangzhou 510410, China. E-mail: liangxuxia@126.com

1 引言

柠檬酸(citric acid)又称枸橼酸, 化学名称 2-羟基丙烷-1,2,3-三羧酸。柠檬酸主要用作酸味剂、增溶剂、缓冲剂、抗氧化剂、除腥脱臭剂等。此外, 柠檬酸具有抑菌、护色、改进风味、促进蔗糖转化等作用, 同时还具有螯合作用, 能够清除某些有害金属。柠檬酸能够防止因酶催化和金属催化引起的氧化作用, 从而阻止速冻水果变色变味^[1]

柠檬酸是食品中的一种添加剂, GB 29951-2013《食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸脂肪酸甘油酯》^[2]中柠檬酸的理化指标为 13%~50%, 目前为止只在葡萄酒中的含量有严格的规定^[3-6], 其他的食品中没有明显的规定, 但是柠檬酸过量有可能引起疾病这种说法在一些报道中已经多次提到^[7], 因此其作为食品酸度调节剂可在各类食品中按生产需要适量使用^[8]。

张素娟^[9]对不同样品中的柠檬酸的检测方法进行了评述, 目前柠檬酸的测定常用方法有高效液相色谱法^[5,6,10]、离子色谱法^[11,12]、气相色谱法^[13-16]等。高效液相色谱法灵敏度高但是预处理繁琐, 测定周期长, 实验成本较高, 离子色谱法对样品中蛋白含量有严格限定, 不适合做复杂样品分析, 气相色谱法与不同检测器搭配可提高其灵敏度, 与质谱联用是目前有机酸检测中最常见最精密的方法, 但目前为止对柠檬酸气相色谱法的研究还比较少, 用气相色谱法对柠檬酸的检测的样品大都是土壤, 食品中柠檬酸的检测大都采用液相色谱法, GB 29951-2013《食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸脂肪酸甘油酯》中采用 N-甲基-N-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺(N-methyl-n-trimethylsilane trifluoroacetamide, MSTFA)衍生剂价格较高, 而且所用的色谱柱是玻璃柱, 不具备广泛应用性, 且国标中是采用恒温的分析方式, 不利于目标物与杂质的分离。

因此, 本研究采用 N,O-双(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺(N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA)作为衍生剂, 价格比 MSTFA 低许多, BSTFA 与 MSTFA 是同种类型衍生剂, 而且 BSTFA 也可作为氨基酸、三聚氰胺的衍生剂, 选择 BSTFA 作为衍生剂可降低实验成本, 色谱柱选用 HP-5 毛细管柱具有广泛应用性, 采用升温程序可使目标物很好的分离检测, 改进国标方法后使之具有良好的回收率、准确性以及重复性, 从而有利于准确测定食品添加剂柠檬酸的检测, 为食品安全性监管提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

内标酒石酸(纯度 99.78%, 美国 Stanford Analytical

Chemicals 公司); 无水柠檬酸(纯度 98%, 加拿大全资公司); 正庚烷(AR, 广州化学试剂厂); 盐酸(GR, 广州化学试剂厂); 吡啶(色谱纯, 上海安谱公司); 氢氧化钾(AR, 广州化学试剂厂); 乙醇(GR, 广州化学试剂厂); 三甲基氯硅烷(trimethyl chlorosilane, TMCS, 色谱纯, 上海麦克林公司); 六甲基二硅烷(hexamethyl disilylamine, HMDS, 色谱纯, 上海阿拉丁公司); N,O-双(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺(BSTFA, AR, 临沂艾科试剂公司)。

2.2 仪器设备

Agilent 7890B 型气相色谱仪(配有 FID 检测器, 美国安捷伦公司); RV10 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司)。

2.3 溶液配制

酒石酸内标溶液的配制: 准确称取 0.05 g 酒石酸标准物质, 用超纯水定容至 50.0 mL, 得到 1 mg/mL 的酒石酸内标标准储备液。

柠檬酸对照液的配制: 准确称取 0.03 g 无水柠檬酸, 用超纯水定容至 10.0 mL, 得到 3 mg/mL 的柠檬酸标准储备液。

氢氧化钾-乙醇溶液(0.5 mol/L): 称取 4 g 氢氧化钾, 用乙醇溶液溶解定容至 200 mL;

标准使用液衍生化: 依次准确移取 3 mg/mL 柠檬酸标准储备液 40、80、100、200、400、1000 μ L, 加入 1 mL 1 mg/mL 酒石酸内标标准储备液, 加入到带盖的圆底烧瓶中, 蒸发至干, 加入 1 mL 吡啶、0.2 mL TMCS、0.4 mL HMDS、0.1 mL BSTFA, 将烧瓶的盖子盖紧小心旋转至溶质全部溶解, 将烧瓶放置入烘箱, 在 60 $^{\circ}$ C 下加热 1 h, 得到三甲硅烷(tetramethylsilane, TMS)衍生化标准溶液, 线性范围为 0.03~3 mg/mL, 可供气相色谱分析。

2.4 样品前处理

皂化反应: 称取试样 1 g(精确至 0.001 g)置于圆底烧瓶中, 加入 25 mL 氢氧化钾-乙醇溶液(0.5 mol/L), 将装有混合液的烧瓶与回流冷凝器相连, 回流 30 min, 用盐酸酸化后用旋转蒸发仪进行浓缩;

萃取: 用不超 50 mL 水将浓缩物定量转移到分液漏斗中, 分别用 50 mL 庚烷萃取 3 次, 弃去萃取物, 将水相层转移至 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀备用;

衍生反应: 吸取 1 mL 经萃取得到的溶液以及 1 mL 酒石酸内标标准储备溶液至圆底烧瓶中, 蒸发至近干, 加入 1 mL 吡啶、0.2 mL TMCS、0.4 mL HMDS、0.1 mL BSTFA, 盖紧盖子后混匀, 将烧瓶置于 60 $^{\circ}$ C 下加热 1 h, 得到三甲硅烷衍生化的试样溶液, 供气相色谱仪分析。

2.5 仪器条件

色谱柱: HP-5(30 m \times 250 μ m, 0.25 μ m); 检测器温度:

240 °C; 尾吹气: N₂; 尾吹流量: 25 mL/min; 进样模式: 分流; 分流比: 5:1; 进样口温度: 240 °C; 载气: N₂; 吹扫流量: 3 mL/min; 线速度: 27.395 cm/sec; 总流量: 9 mL/min; 色谱柱流量: 1 mL/min; 柱温箱温度: 80 °C; 温度程序: 80 °C(1 min)–20 °C/min–165 °C(5 min)–30 °C/min–250 °C(1 min)。

2.6 衍生试剂的选择

查文献可得, 黄建立^[15]、任清^[16]采用 N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺(N,O-Bisacetamide, BSA)作为衍生剂衍生柠檬酸, GB 29951-2013^[2]标准采用 MSTFA, 均与本文中采用的衍生试剂 BSTFA 属于同种类型衍生试剂, 且 BSTFA 还可用于氨基酸、三聚氰胺、林可霉素的衍生实验, 适用性比较广泛, BSTFA 价格比较低, 实验成本比较低, 样品经过 BSTFA 皂化衍生后经气相色谱仪检测后得到的含量可达到标准要求的指标范围, 故选用 BSTFA 作为此次研究的衍生剂。

2.7 色谱柱的选择

国标中采用的玻璃柱没有广泛应用性, 查文献^[15]得气相色谱法测定柠檬酸可用毛细管柱, 选用与国标使用的极性相近的 HP-5 柱, HP-5 柱具有广泛使用性, 方便获取, 且可以达到良好的分离效果。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

采用国标中恒温分析时, 目标物分离效果不好, 与杂质峰无法完全分离。采用程序升温分析时, 在对柱温进行优化选择后, 得到了适宜的温度变化程序: 初始温度为 80 °C 保持 1 min, 以 20 °C/min 的速率升到 165 °C, 保持 5 min, 再以 30 °C/min 的速率升至 250 °C 保持 1 min, 其他的色谱条件为: 进样口温度为 240 °C, 检测器温度为 240 °C。分离结果见图 1、2。

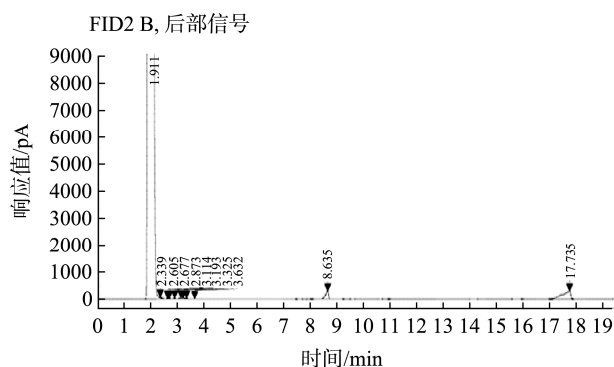


图1 恒温分离结果

Fig.1 Results of constant temperature separation

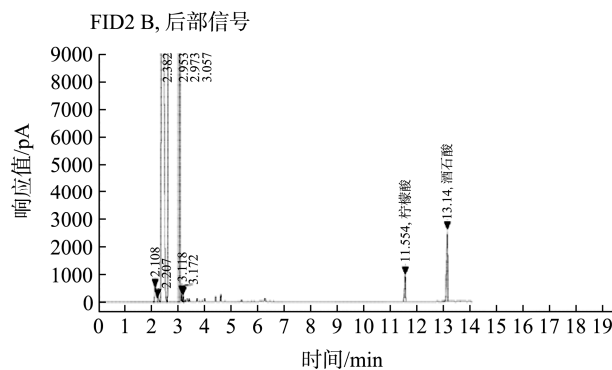


图2 升温分离结果

Fig.2 Results of temperature separation

3.2 线性关系及检出限

按照 2.5 进行气相色谱分析, 以含量比为横坐标, 峰面积比为纵坐标建立校正曲线, 相关系数为 0.9935, 线性良好, 详见图 3。目标物及内标物出峰顺序如图 4 所示, 峰型良好, 以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限, 为 0.1%, 满足实验的测定要求。

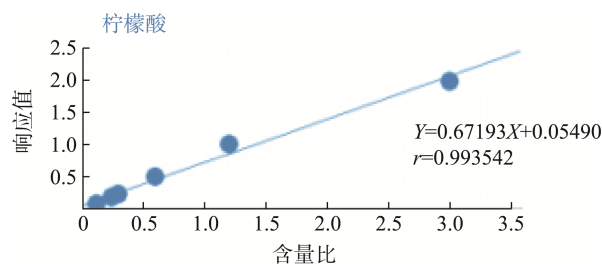


图3 柠檬酸工作曲线图

Fig.3 Working curve of citric acid

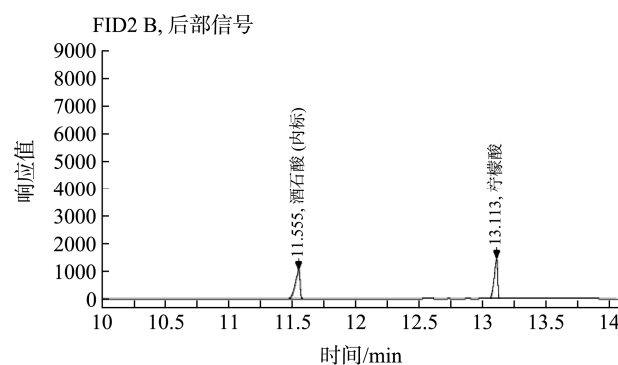


图4 柠檬酸及酒石酸标准品色谱图

Fig.4 Standard chromatogram of citric acid and tartaric acid

3.3 加标样品的加标回收和精密度

在样品中添加 9%、15%、30% 3 个水平的加标浓度, 计算加标回收率见表 1, 低、中、高 3 个浓度的水平的加标回收率分别为 93.0%~98.7%, 按实验方法平行测定 8 次,

计算精密度, 结果见表 2, 计算得相对标准偏差($n=8$)为 0.4%, 表明在确定的色谱条件下精密度良好。

3.4 样品测定

购买 3 个不同厂家的柠檬酸脂肪酸甘油酯样品, 按照 2.4 进行前处理, 按照 2.5 上机分析, 检测结果如表 3, 均符合 GB 29951-2013 中柠檬酸的理化指标(13%~50%)。

4 结论与展望

本研究采用 BSTFA 作为衍生剂, 价格比 MSTFA 低, BSTFA 与 MSTFA 是同种类型衍生剂, 而且 BSTFA 也可作为氨基酸、三聚氰胺、林可霉素的衍生剂, 应用性比较广泛, 选择 BSTFA 作为衍生剂可降低实验成本; 色谱柱选用 HP-5 毛细管柱具有广泛应用性, 采用升温程序分离目标物可使目标物很好的分离检测, 改进国标方法后使之具有良

好的回收率、准确性以及重复性, 因此该方法适用于添加剂柠檬酸的检测监控。但是该方法采用的前处理方法过于繁琐复杂, 衍生时间长, 实验耗时长, 因此, 本研究将继续优化方法的前处理方法、衍生温度以及时间, 进一步提高食品添加剂柠檬酸的检测技术, 为食品安全性监管提供技术支撑。

表 1 柠檬酸 3 个加标浓度及加标回收率($n=8$)
Table 1 Three citric acid concentration recovery($n=8$)

加标水平/%	回收率/%			相对相差/%
	1	2	平均回收率	
9	98.7	96.7	97.7	2.0
15	94.7	94.7	94.7	0
30	93.7	93.0	93.4	0.7

表 2 柠檬酸精密度实验
Table 2 Precision test of citric acid

	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	RSD/%
峰面积	2631.57	2649.08	2647.39	2625.75	2634.93	2629.15	2688.76	2654.51	2645.15	-
含量/%	51.10	51.04	51.86	51.12	51.08	51.12	51.90	51.30	51.32	0.4
回收率/%	97.0	96.8	99.5	97.1	96.9	97.1	99.7	97.7	97.7	1.2

表 3 样品实验结果
Table 3 Result of samples

序号	A	B	C
测定值 1/%	22.2	36.6	20.1
测定值 2/%	22.0	36.1	21.9
平均值/%	22.1	36.4	21.0

参考文献

- 汪东风. 食品化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
Wang DF. Food chemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- GB 29951-2013 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸脂肪酸甘油酯[S].
GB 29951-2013 National food safety standards-Food additive-Citric acid fatty acid glyceride [S].
- GB 15037-2006 葡萄酒[S].
GB 15037-2006 Wine [S].
- 徐淑飞, 贺丽娜, 王兰花, 等. 全自动葡萄酒成分分析仪测定葡萄酒中柠檬酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(19): 5129-5132.
Xu SF, He LN, Wang LH, et al. Determination of citric acid in wine by automatic wine composition analyzer [J]. J Food Saf Qual, 2008, 9(19): 5129-5132.
- 何军风. 高效液相色谱法检测葡萄酒中柠檬酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2512-2515.
He JF. Determination of citric acid in wine by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2008, 9(10): 2512-2515.
- 鲁娜. 液相色谱法检测葡萄酒中柠檬酸的含量[J]. 食品安全导刊, 2018, (9): 99.
Lu N. Determination of citric acid in wine by liquid chromatography [J]. Chin Food Saf Magaz, 2018, (9): 99.
- 樊惠民, 余实, 谭远方. 食品中柠檬酸的检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(4): 205-208.
Fan HM, Yu S, Tan YF. Detection of citric acid in food [J]. J Food Saf Qual, 2011, 2(4): 205-208.
- GB 2760-2007 食品添加剂使用卫生标准[S].
GB 2760-2007 Hygienic standard for the use of food additives [S].
- 张素娟. 食品中柠檬酸的检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 352-354.
Zhang SJ. Research progress on detection methods of citric acid in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(1): 352-354.
- 张颖婷. 高效液相色谱法同时测定山楂丸中苹果酸、柠檬酸的含量[C]. 中国药学会第四届药物检测质量管理学术研讨会资料汇编, 2017.
Zhang YT. Simultaneous determination of malic acid and citric acid in hawthorn pill by HPLC [C]. Compilation of materials of the fourth

- symposium on drug testing quality management of CPA, 2017.
- [11] 陈松辉, 叶平, 汶海花, 等. 离子色谱法测定混合饲料添加剂中的甲酸、乳酸和柠檬酸[J]. 化工管理, 2018, (13): 28–30.
Chen SH, Ye P, Wen HH, *et al.* Determination of formic acid, lactic acid and citric acid in mixed feed additives by ion chromatography [J]. Chem Enterp Manage, 2018, (13): 28–30.
- [12] 冯顺卿, 陈钰欣, 姚骏骅. 离子色谱法同时测定研磨液中氨三乙酸、柠檬酸和磷酸盐[J]. 分析实验室, 2016, 35(11): 1334–1337.
Feng SQ, Chen YX, Yao JH. Simultaneous determination of ammonia-triacetic acid, citric acid and phosphate in grinding solution by ion chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2016, 35(11): 1334–1337.
- [13] 陈立新, 陈麒宇, 江帆. 毛细管气相色谱法分析土壤中苹果酸、柠檬酸和丙二酸[J]. 分析仪器, 2010, (5): 43–46.
Chen LX, Chen QY, Jiang F. Analysis of malic acid, citric acid and malonic acid in soil by capillary gas chromatography [J]. Anal Instrum, 2010, (5): 43–46.
- [14] 李建红, 王志畅. 气相色谱法测定土壤中丙酸、苹果酸、柠檬酸[J]. 东华理工学院学报, 2006, (4): 376–378.
Li JH, Wang ZC. Determination of propionic acid, malic acid and citric acid in soil by gas chromatography [J]. J East China Univ Technol, 2006, (4): 376–378.
- [15] 黄建立. 饲料添加剂中乳酸和柠檬酸的毛细管气相色谱法测定[J]. 福建分析测试, 2005, (4): 2277–2279.

- Huang JL. Determination of lactic acid and citric acid in feed additives by capillary gas chromatography [J]. Fujian Anal Test, 2005, (4): 2277–2279.
- [16] 任清. 衍生化-毛细管气相色谱法同时测定饲料添加剂中富马酸、乳酸和柠檬酸[J]. 分析化学, 2002, (3): 304–306.
Ren Q. Simultaneous determination of fumaric acid, lactic acid and citric acid in feed additives by derivatization-capillary gas chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2002, (3): 304–306.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



郑悦珊, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检测与分析。
E-mail: 837177508@qq.com



梁旭霞, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检测与食品安全。
E-mail: liangxuxia@126.com