

利用改进的胶束电动毛细管色谱法和液相色谱法 测定 6 类重点食品中的脱氢乙酸

丁晓静¹, 林明淑², 张 晶¹, 苏 萍², 杨 屹²

(1. 北京市疾病预防控制中心, 食物中毒溯源技术北京市重点实验室, 北京市预防医学研究中心, 北京 100013;

2. 北京化工大学 理学院, 北京 100029)

摘要: 改进了实验室建立的测定脱氢乙酸的胶束电动毛细管色谱 (MEKC) 和国标的液相色谱 (LC) 的分离及样品前处理方法. 改进后的两种方法均能准确测定 6 类重点食品中的脱氢乙酸, 为重新评估脱氢乙酸的风险、修订或制定其在不同食品中的限量标准提供依据. 改进后的 MEKC 和 LC 方法的检出限及定量限分别为 0.2、0.5 mg/L 和 0.05、0.2 mg/L. 6 类重点食品空白基质的加标回收率均在 81.9%~116.0% 之间, 相对标准偏差在 0.4%~7.3% 之间. 测定了 284 件食品样品, 结果均无超标. 使用改进的两种方法同时测定了 45 件样品, 对其中 20 件阳性样品的结果进行了比较, 结果吻合. 改进后的 MEKC 及 LC 方法样品前处理简单, 非常适合大量样品检测.

关键词: 脱氢乙酸; 辣条; 黄油; 预制肉制品; 淀粉制品; 咸菜; 胶束电动毛细管色谱; 液相色谱

中图分类号: O657.7

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2021)01-0008-10

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2021.01.002

Application of Improved Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic and Liquid Chromatographic Method for Determination of Dehydroacetic Acid in Six Species Key Foods

DING Xiao-jing¹, LIN Ming-shu², ZHANG Jing¹, SU Ping², YANG Yi²

(1. *Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China;*

2. *College of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China*)

Abstract: The electrophoretic, chromatographic and sample pretreatment conditions for the previously established micellar electrokinetic capillary chromatographic method (MEKC) in our laboratory and the liquid chromatographic (LC) method of the national standard were improved for the analysis of dehydroacetic acid (DHA). DHA in six species key foods could be accurately assayed by both of the two improved MEKC and LC methods. The analytical results could provide a basis for reassessing the risk of DHA and revising or resetting the permitted levels of DHA in six species key foods. The limits of detection and quantitation for the improved MEKC and LC method were 0.2, 0.5 mg/L and 0.05, 0.2 mg/L, respectively. The recoveries of the spiked blank samples of the six species key foods were in the ranges of 81.9%~116.0% with relative standard deviations ranging from 0.4% to 7.3%. 284 food samples were analyzed by the improved MEKC method. None of them exceeds the permitted levels. Forty-five samples were determined simultaneously by the two improved methods. The

收稿日期: 2021-01-13; 修订日期: 2021-02-06.

基金项目: 国家食品安全风险评估中心工作专项 [Special Project of China National Center for Food Safety Risk Assessment]

作者简介: 丁晓静 (1968-), 女, 主任技师/教授, 主要从事色谱技术在医药卫生领域的应用研究, E-mail: dxj666@aliyun.com.

results of 20 positive samples were compared which were in agreement with each other. Both improved LC and MEKC methods have the advantages of simple sample pretreatment, which is suitable for routine analysis.

Key words: DHA; spicy strips; butter; meat products; starch-based products; pickles; MEKC; LC

脱氢乙酸(DHA)为弱酸,其 pK_a 为 5.4^[1],难溶于水,易溶于乙腈、甲醇及碱溶液。DHA 或其钠盐(DHA-S)^[2]对食品中的酵母菌、细菌和霉菌均有抑制作用,我国允许其用于 12 类食品的防腐^[3]。但过量食用会危害健康。许多国家对其使用均有严格规定。美国被允许用于草莓和切或去皮的南瓜,其限量为 65 mg/kg。日本对黄油、奶酪、人造黄油等奶产品的限量为 0.5 g/kg,欧盟则禁止使用^[1]。

2017 年 7 月,我国宁夏一奶农往牛奶中超范围添加 DHA-S,导致多名幼儿发生食物中毒^[4-5]。2019 年 3 月 15 日,“打假晚会”曝光的、深受学生喜爱的“问题辣条”,严重危害了学生的身体健康^[6-7]。基于此,我国卫生和健康委员会决定重新评估 6 类重点食品中 DHA 的安全限量,以保证消费者健康^[2]。而 DHA 含量的准确测定,对其风险评估具有非常重要的作用。

目前文献报道的 DHA 的测定方法有气相色谱(GC)法^[8-10]、液相色谱(LC)法^[8, 11-14]、超高效液相色谱(UPLC)法^[15]和毛细管电泳(CE)法^[16]。GC 法和 LC 法是我国食品安全国家标准中的测定方法^[8],其前处理繁琐费时,LC 法^[8]中还存在 DHA 标准溶液配制及流动相不合理的问题,而且均未涉及辣条的测定。CE 法^[16]同样未涉及辣条和菌类及藻类制品的测定。

本文改进了文献[16]中胶束电动毛细管色谱(MEKC)法和国标中 DHA 测定的 LC 法的分离及样品前处理条件,使两种改进后的方法均能准确测定 6 类重点食品中的 DHA。该法高效、快速、准确且操作简单,非常适合常规实验室大量样品分析。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪具二极管阵列检测器(美国贝克曼库尔特有限公司); $\Phi 50\ \mu\text{m}$ 未涂层熔融石英毛细管(河北永年锐沣色谱配件有限公司);Milli-Elix/RiOs 超纯水仪(美国 Millipore 公司);Vortex-Genie 2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries);KQ-100E 医用超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Waters 2695 高效液相色谱仪具 2998 二极管阵列检测器(美国 Waters

公司);Universal 32 离心机(德国 Hettich);Techmate C₁₈(100 Å,250×4.6 mm,4.6 μm)(北京泰克美科技有限公司)。

硼砂(中国医药公司北京采购供应站);硼酸(优级纯,铁岭市开原化工厂);氢氧化钠(优级纯,北京化工厂);十二烷基硫酸钠(SDS,纯度 $\geq 99\%$,Sigma-Aldrich);乙腈和甲醇(色谱纯,Fisher Scientific,USA);脱氢乙酸(纯度 $\geq 98\%$,Sigma-Aldrich);脱氢乙酸钠一水合物(98%,百灵威科技有限公司);磷酸二氢钠、磷酸(国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(优级纯,北京化工厂);乙腈(色谱纯,Fisher Scientific,USA);山梨酸($\geq 99\%$,Sigma-Aldrich);苯甲酸($\geq 99.5\%$,Sigma-Aldrich);乙酸铵(分析纯,北京化学试剂公司)。

样品:284 件,分别从超市、商场、便利店、食品店、菜市场、淘宝网购得,其中咸菜 53 件,黄油 20 件,预制肉制品 78 件,粉丝、粉条及挂面 51 件,辣条 31 件,薯片、虾条 29 件,食用菌及藻类制品 22 件。

1.2 MEKC 法的 10 g/L 标准储备液

称取 100 mg DHA 和 113 mg DHA-S,分别置于 10 mL 容量瓶中,分别加入乙腈、纯水溶解、稀释、定容,涡旋混匀,置于 4 °C 冰箱保存。

1.3 LC 法的 10 g/L 山梨酸、苯甲酸和脱氢乙酸标准储备液

分别准确称取山梨酸和苯甲酸各 100 mg,分别使用乙腈溶解、稀释、定容至 10 mL,涡旋混匀,置于 4 °C 冰箱保存。10 g/L DHA 和 DHA-S 标准储备液按 1.2 节方法制备。

1.4 样品处理

按文献[17]中调味品的样品前处理方法,即将 0.3 g 样品置于 1.5 mL 离心管中,加入 0.3 mL 饱和 NaCl 溶液,涡旋混匀后加入 0.7 mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 10 min,9 000 r/min 离心 5 min,分层后取上层乙腈 10 μL ,加入 190 μL 样品稀释液,混匀后进样。其中,MEKC 法的样品稀释液:1.5 mmol/L 硼砂+ 6 mmol/L 硼酸,LC 法的样品稀释液:水。

1.5 改进的 MEKC 条件

毛细管:未涂层石英毛细管, $\Phi 50\ \mu\text{m} \times 70\ \text{cm}$ (有效长度:60 cm);操作温度 25 °C;分离缓冲溶液

15 mmol/L 硼砂+ 60 mmol/L 硼酸+140 mmol/L SDS;
分离电压 26 kV;进样压力及时间 3.45×10^{-3} MPa,
28 s;检测波长 228 nm;工作电流 46.6 μ A 左右.

新装毛细管按文献[17-20]方法进行处理.

1.6 LC 条件

改进的色谱条件:色谱柱 Techmate C_{18} (100 $\text{\AA}$,
250 $\times$ 4.6 mm,4.6 μ m);流动相为乙腈:15 mmol/L
磷酸+20 mmol/L 磷酸二氢钠(体积比为 30:70),
等度洗脱;流速:1 mL/min;检测波长:307 nm;柱温:
40 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μ L.

国标 LC 条件:色谱柱 C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm,
5 μ m);流动相为甲醇:20 mmol/L 乙酸铵(体积比
为 10:90),等度洗脱;流速:1 mL/min;检测波长:
293 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μ L.

2 结果与讨论

2.1 MEKC 法的改进

本实验室前期研究所建立的食品中 10 种防腐
剂的分析方法^[16]曾用于能力验证样品测定,获得满
意结果,证明了其准确性,故本研究仍用文献[16]
所用毛细管规格及分离缓冲体系.由于本研究测定
的食品样品种类及防腐剂种类与文献有所不同,需
要在进一步增加分离度及检测灵敏度基础上,着重
优化前处理条件.

2.1.1 分离缓冲溶液中 SDS 浓度的优化

文献[16]所用分离缓冲溶液中 SDS 浓度为
100 mmol/L,用于本研究的实际样品分析时,发现存
在基质干扰.保持分离缓冲溶液中 60 mmol/L 硼酸
及 15 mmol/L 硼砂不变,试验了 100、120 和
140 mmol/L SDS 对实际样品中 DHA 分离的影响,
结果如图 1 所示.综合考虑分离度及灵敏度,SDS 最
佳浓度为 140 mmol/L.在此浓度下,本研究所分析
的 284 件实际样品均未发现干扰.

2.1.2 进样时间的优化

进样时间对待测物的分离效果和灵敏度有显著
影响.考察了进样压力保持 3.45×10^{-3} MPa 不变的
情况下,进样时间分别为 10、20、28 和 35 s 时的分离
效果,结果如图 2 所示.由图 2 可见,随着进样时间
的增加,各峰校正峰面积明显升高.样品塞一般占用毛
细管有效长度的 1%~2%^[21],使用 CE expert 软件计
算,进样时间 35 s 时,样品区带为窗口长度的 2.8%,
容易导致峰形展宽,分离度减小.而进样 28 s 时,样
品区带为窗口长度的 2.01%.故最佳进样时间为 28 s.

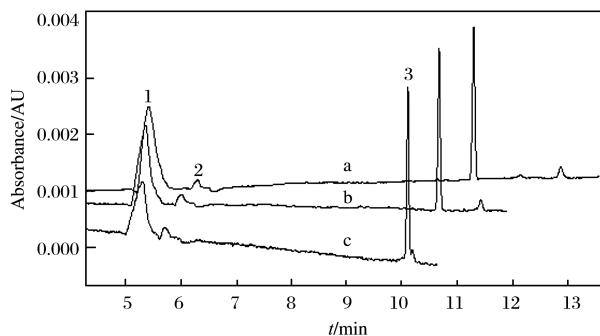


图 1 SDS 浓度对实际样品中 DHA 分离的影响

Fig. 1 Effect of SDS concentration on separation of DHA in real samples

(a) 140 mmol/L, (b) 120 mmol/L, (c) 100 mmol/L
Separation buffer: 15 mmol/L sodium borate+60 mmol/L
boric acid+ x mmol/L SDS

Peak: (1), (2) unknown, (3) DHA

Capillary: $\Phi 50 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$ (effective length: 60 cm),
Separation voltage: 26 kV, injection pressure and
time: 3.45×10^{-3} MPa for 28 s, detection: 228 nm,
temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$

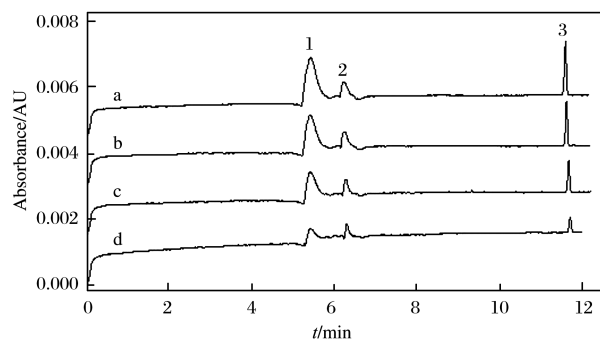


图 2 进样时间对 DHA 分离的影响

Fig. 2 Effect of injection time on separation of DHA

(a) 35 s, (b) 28 s, (c) 20 s, (d) 10 s

Separation buffer: 15 mmol/L sodium borate+
60 mmol/L boric acid+ 140 mmol/L SDS

Other MEKC conditions and specified peaks were
the same as in Fig. 1.

2.1.3 样品前处理条件的优化

文献[16]处理咸菜、黄油和调味品等 10 类食
品样品时,分别使用了不同的前处理方法.故本研
究借鉴该文献处理调味品样品的前处理方法,即基
于饱和 NaCl 可使水相与乙腈有机相分层的原理^[22],
构建相分离体系,拟将 6 类重点食品样品的前
处理方法统一为一种方法.首先对 111#和 113#辣

条阳性样品进行前处理.

为考察乙腈能否将 DHA 从样品中一次提取完全,样品均进行第二次提取. 111#样品提取前,样品与离心管总质量 1.192 g. 提取完,取出上清液后,样品与离心管总质量为 0.799 g,则取出的上清液(乙腈)的质量为:1.192 g-0.799 g=0.393 g. 而加入的 0.70 mL乙腈提取液质量为 0.544 g,则残留在管内的乙腈质量为 0.544 g-0.393 g=0.151 g,残留量为 0.151 g/0.544 g=28%. 将第二次提取与第一次提取的校正峰面积相比,比率为 52/176=30%. 两个比例相差 2%,说明第一次提取时仅有 2% 未能被提取出,可以忽略,因此认为一次提取便可完全提取样品中的 DHA.

同理,113#样品提取前,样品与离心管总质量 1.195 g.提取完,取出上清液后,样品与离心管总质量为 0.840 g,则取出的上清液(乙腈)的质量为:1.195 g-0.840 g=0.355 g. 而加入的 0.70 mL 乙腈提取液质量为 0.544 g,则残留在管内的乙腈质量为 0.544 g-0.355 g=0.189 g,残留量为 0.189 g/0.544 g=35%. 将第二次提取与第 1 次提取的校正峰面积相比,比率为 53/150=35%. 两个比例相同,说明第一次提取即可将 DHA 提取完全.

市场上可购买到的食品样品中防腐剂均为 DHA-S,而非 DHA. DHA-S 易溶于水而不溶于有机溶剂,为了验证乙腈可以将 DHA-S 以 DHA 的形式从食品样品中提取出来,将质量浓度均为 10 g/L 的 DHA 标准贮备液和 DHA-S 标准贮备液稀释 100 倍后,分别取 140 μ L 加入到称量好的空白样品中,按 1. 4 节方法处理后进样检测,结果如图 3 所示. 由图 3 可见,DHA 和 DHA-S 的定量结果一致,说明这种前处理方法能够将 DHA 或 DHA-S 很好的提取出来. 此方法之所以能达到满意的回收率,是因为样品前处理时加入过量饱和 NaCl 溶液,受盐析效应的影响,DHA-S 最终以弱酸形式被提取到乙腈层,从而能够被准确测定^[17].

2. 1. 4 标准曲线、线性范围及检出限、定量限

在改进的 MEKC 条件下,使用乙腈将 DHA 的储备液(10 mg/mL)逐级稀释,配制混合标准溶液,其质量浓度分别为 10、20、40、80、120、200、400、800、1 000 mg/L,然后取每个浓度的混合标准溶液 10 μ L,再加入 190 μ L 样品稀释液,涡旋混匀,配制 成 0.5、1、2、4、6、10、20、40、50 mg/L 标准系列,保证每个标准溶液中均含 5%乙腈. 采用校正峰面积外

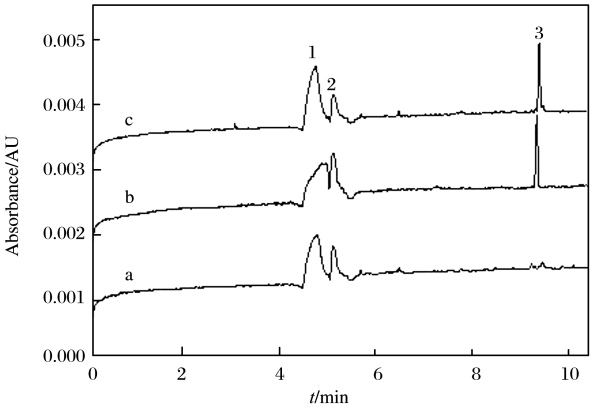


图 3 DHA 和 DHA-S 的提取结果
Fig. 3 Extraction results of (a) blank sample, (b) sodium dehydroacetate and (c) dehydroacetic acid. Other MEKC conditions and specified peaks were the same as in Fig. 1.

标法定量,校正峰面积(A)与质量浓度(ρ , mg/L)具有良好线性关系,线性回归方程 $A = 122.219\rho + 6.272$,线性范围为 0.5~50 mg/L,相关系数(r^2)为 0.999 9,检出限为 0.2 mg/L,定量限为 0.5 mg/L.

2. 1. 5 方法精密度

分别平行称取 7 份咸菜、黄油、预制肉制品、辣条、淀粉制品、藻类及菌类制品样品,分别置于 1.5 mL离心管中,按 1. 4 方法进行处理,在改进的 MEKC 条件下直接进样测定,计算其含量及迁移时间的相对标准偏差(RSD),方法精密度如表 1 所列.

表 1 改进的 MEKC 法测定 6 类重点食品中 DHA 方法精密度 ($n=7$)

Table 1 Method precisions of DHA in 6 species key food samples by improved MEKC method ($n=7$)

样品	质量分数 /(g/kg)	含量 RSD /%	迁移时间 RSD/%
咸菜	0.46	5.6	0.2
黄油	0.04	3.6	0.2
预制肉制品	0.42	6.2	0.1
辣条	0.20	3.1	0.2
淀粉类	0.04	1.4	0.4
藻类及菌类制品	0.47	2.5	0.4

2. 1. 6 加标回收率

分别选取咸菜、黄油、预制肉制品、辣条、淀粉类

制品和藻类及菌类制品的空白样品,分别在 1、5、10 mg/L 三个水平下进行加标回收率试验,每个加标水平的样品平行处理 5 份,结果如表 2 所列. 由表

2 可见,不同基质样品的低、中、高三个水平的加标回收率在 83.7%~116.0%之间,RSD 在 1.1%~7.3% 之间.

表 2 改进的 MEKC 法测定 6 类重点食品中 DHA 加标回收率 (n=5)

Table 2 Results of spiked recoveries of 6 species key food samples by improved MEKC method (n=5) %

样品	1 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
咸菜	110.1	5.9	104.8	4.4	114.4	2.8
黄油	94.4	3.1	91.9	4.8	101.9	7.3
预制肉制品	83.7	2.4	85.5	2.8	92.5	3.6
辣条	90.8	3.0	86.6	1.4	89.9	2.7
淀粉类	95.9	1.1	84.0	3.8	100.9	2.8
藻类及菌类制品	99.2	1.8	108.6	1.7	116.0	2.3

2. 1. 7 实际样品测定

使用改进的 MEKC 法测定购得的 284 件样品,每件样品均进行两次平行测定. 其中阴性样品 207 件,小于定量限的有 20 件. 咸菜中 DHA 质量分数在 0.03~0.40 g/kg 之间,辣条在 0.05~0.16 g/kg 之间,预制肉制品在 0.03~0.40 g/kg 之间,藻类及菌类制品在 0.02~0.34 g/kg 之间,淀粉类仅有一件检出,质量分数为 0.48 g/kg. 阳性样品均未超标.

2. 2 LC 法的改进

2. 2. 1 储备液介质的选择

DHA 的 lg K_{ow} 经 EPI Suite 4.1 软件计算为 0.78, 25 ℃ 时水中溶解度为 690 mg/L^[23],微溶于水. 故国标法中的 LC 法配制 DHA 标准储备液时,使用氢氧化钠溶解,根据配制方法可知:DHA 标准系列质量浓度最低点 1 mg/L 中氢氧化钠浓度为 0.05 mmol/L,理论计算标准溶液 pH≈9.7,最高质量浓度点中氢氧化钠浓度为 10 mmol/L,理论计算此标准溶液 pH≈12,如此高 pH 易导致硅胶填料的色谱柱柱效下降. 故本研究采用乙腈溶解 DHA 并制备储备液.

2. 2. 2 流动相的优化

食品中常用防腐剂除 DHA 外,还同时添加山梨酸或苯甲酸,因 LC 的分离柱效较 MEKC 低 2~3 个数量级^[24],为避免这两种防腐剂的干扰,将 3 种防腐剂配制成混合溶液,优化流动相条件. DHA pK_a 为 5.4^[1]、山梨酸和苯甲酸的 pK_a 均为 4.2^[16]. 理论上,流动相的 pH 应不高于 pK_a -2,即酸性流动相体系才能保证三者以分子形式存在而且能够在反相 C_{18} 色谱柱上保留,从而实现与杂质分离,得到较为准确的定量

结果. 当采用国标中偏弱碱性的流动相甲醇:20 mmol/L 乙酸铵(体积比 10:90)时,峰形拖尾严重,如图 4 所示,且分析实际样品时 DHA 与干扰峰的分离不达基线,影响其准确定量. 当采用文献[25]所用流动相 0.02 mol/L 乙酸铵(氨水调 pH 为 9.0):甲醇(体积比 97:3)时,DHA 峰形略有前伸,如图 5 所示. 当采用 0.015 mol/L 磷酸+0.02 mol/L 磷酸二氢钠:乙腈(体积比 70:30)时,DHA 峰形较好,且时间较短,如图 6 所示. 故选择 0.015 mol/L 磷酸+0.02 mol/L 磷酸二氢钠:乙腈(体积比 70:30)为最佳流动相.

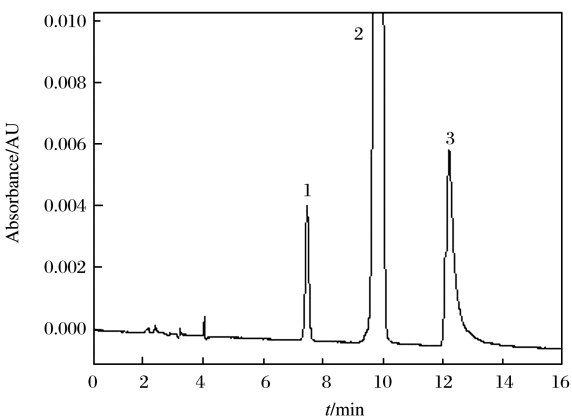


图 4 三混标在国标法的流动相条件的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of three mixed standards in mobile phase of national standard

Peak: (1) benzoic acid, (2) sorbic acid, (3) DHA

Column: techmate C_{18} (100 Å, 250×4.6 mm, 4.6 μm),

mobile phase: $V(\text{methanol}) : V(20 \text{ mmol/L ammonium acetate}) = 10 : 90$, flow rate: 1 mL/min,

detection: 293 nm

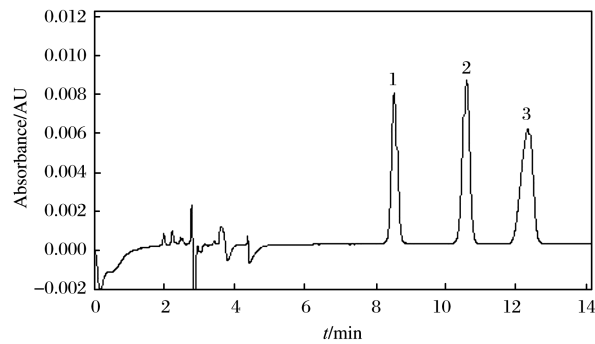


图 5 三混标在文献[25]所用流动相的色谱图
Fig. 5 Chromatogram of three mixed standards in mobile phase of reference^[25]

Mobile phase: 0.02 mol/L ammonium acetate, pH 9.0 adjusted with ammonium hydroxide
Other LC conditions and specified peaks were the same as in Fig. 4.

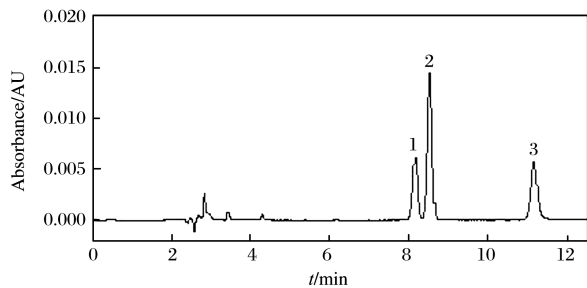


图 6 三混标在含磷酸盐缓冲体系流动相的色谱图
Fig. 6 Chromatogram of three mixed standards in mobile phase of phosphate buffer solution

Mobile phase: V(acetonitrile) : V(15 mmol/L phosphate acid+20 mmol/L sodium dihydrogen phosphate, pH 2.34)= 30 : 70, detection: 307 nm
Other LC conditions and specified peaks were the same as in Fig. 4.

DHA 的最大紫外吸收波长与流动相的 pH 有很大关系。当流动相为弱碱性的乙酸铵体系时,分别在 230、291 nm 有最大吸收,如图 7 所示。在流动相 pH 为 2.34 的 15 mmol/L 磷酸+20 mmol/L 磷酸二氢钠体系中,分别在 223、307 nm 有最大吸收,但 307 nm 的紫外吸收峰高于 223 nm,如图 8 所示,故本研究选择 307 nm 为检测波长。

2. 2. 3 样品稀释液的优化

与 MEKC 法的样品前处理一样,乙腈提取后,需要使用样品稀释液对乙腈提取液进行稀释。分别考察水、3%乙腈-水、5%乙腈-水、10%乙腈-水溶液

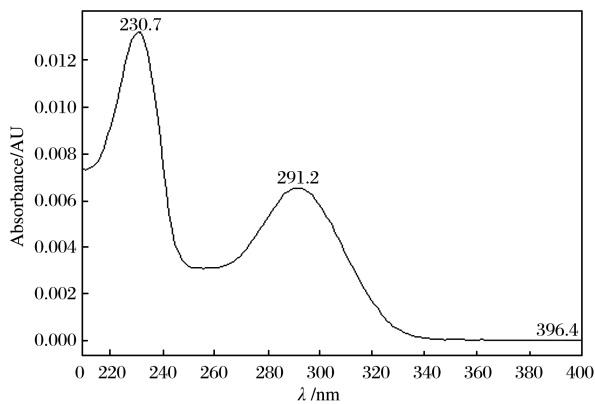


图 7 DHA 在乙酸铵流动相中紫外吸收光谱图
Fig. 7 Ultraviolet absorption spectrum of DHA in mobile phase of ammonium acetate

Other LC conditions and specified peaks were the same as in Fig. 4.

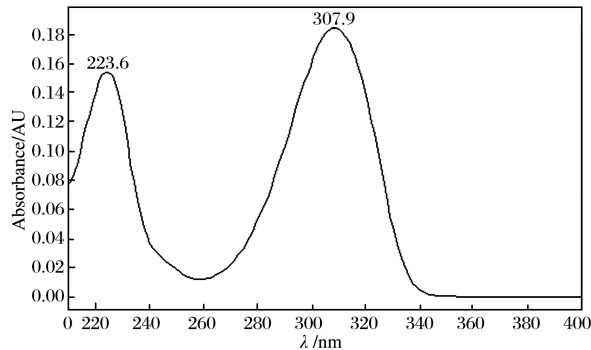


图 8 磷酸盐流动相中 DHA 紫外吸收光谱图
Fig. 8 Ultraviolet absorption spectrum of DHA in mobile phase of phosphate as shown in Fig. 6

Other LC conditions and specified peaks were the same as in Fig. 4.

以及 5%乙腈-15 mmol/L 磷酸+20 mmol/L 磷酸二氢钠这 5 种稀释液对 DHA 分离及峰高的影响,结果表明:这 5 种样品稀释液对 DHA 的分离及峰高无明显影响,故以水为样品稀释液。

2. 2. 4 前处理方法的改进

国标法^[8]中 DHA 的 LC 法的样品前处理通过调节样品溶液 pH,将 DHA-S 提取出来,易损失和沾污样品。此外,不同类别的样品需采用不同的前处理方法,大部分样品需固相萃取柱净化,操作复杂繁琐费时,根据误差传递理论,前处理方法步骤越多,则结果的误差也越大。此外消耗的试剂(特别是有有机溶剂)、耗材(容量瓶、离心管等)较多,而且中间还有调节 pH 的环节,容易造成样液的损失而导致

结果不准确. 与 MEKC 法一样,充分利用 DHA 易溶于乙腈的性质,构建了利于乙腈提取的条件,将加入的 DHA-S 盐,通过盐析作用,最终以 DHA 的形式被乙腈提取出来. 为进一步确认盐析作用,取两份 0.5 mL 2 mg/L DHA-S(水介质),分别加入 0.5 mL 乙腈. 其中一份溶液中加入过量 NaCl 固体至不溶,则溶液分层,如图 9(a)所示. 另一份溶液中不加 NaCl 固体,则溶液不分层,如图 9(b)所示. 加入饱和 NaCl 固体的溶液中 DHA 的峰面积大约是不加 NaCl 固体的两倍,说明盐析作用效果明显.

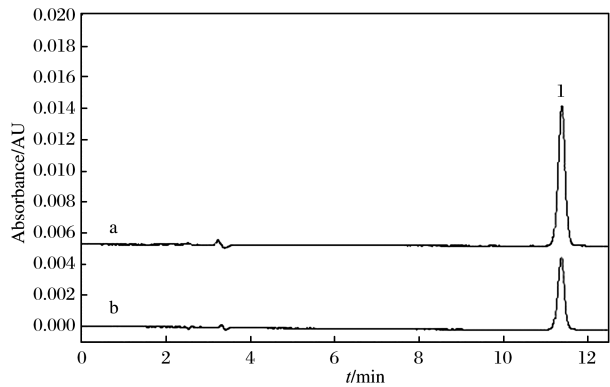


图 9 NaCl 对 DHA 提取的影响

Fig. 9 Effect of NaCl on extraction of DHA
(a) 0.5 mL acetonitrile was first added to 0.5 mL 2 mg/L DHA-S, and then NaCl was added until saturated NaCl solution was formed, (b) 0.5 mL acetonitrile was added to 0.5 mL 2 mg/L sodium dehydroacetate without NaCl addition
Peak: (1) DHA
Other LC conditions were the same as in Fig. 6.

2. 2. 5 标准曲线、线性范围及检出限、定量限
在改进的 LC 条件下,使用乙腈将 DHA 的储备

液(10 g/L)逐级稀释,其质量浓度分别为 4、10、20、40、80、120、200、400、800、1 000 mg/L,然后每个浓度取 10 μL,再加入 190 μL 水,配制成 0.2、0.5、1、2、4、6、10、20、40、50 mg/L 标准系列. 采用峰面积外标法定量,峰面积(A)与质量浓度(ρ, mg/L)具有良好线性关系. 线性回归方程 $A = 2.61 \times 10^4 \rho + 38.1$,线性范围为 0.2~50 mg/L,相关系数(r^2)为 0.999 9,检出限为 0.05 mg/L,定量限为 0.2 mg/L.

2. 2. 6 方法精密度

分别平行称量 7 份咸菜、黄油、预制肉制品、辣条、淀粉制品、藻类及菌类制品样品,分别置于 1.5 mL 塑料离心管中,按 1. 4 节方法处理,使用改进的 LC 法测定,方法精密度结果如表 3 所列.

表 3 改进的 LC 法测定 6 类重点食品中 DHA 方法精密度($n=7$)
Table 3 Precisions of DHA in 6 species key foods by improved LC method ($n=7$)

样品	质量分数/(g/kg)	含量 RSD/%
咸菜	0.22	3.8
黄油	0.44	0.9
预制肉制品	0.20	1.9
辣条	0.44	3.1
淀粉类	0.45	3.0
藻类及菌类制品	0.25	4.6

2. 2. 7 加标回收率

选取咸菜、黄油、预制肉制品、辣条、淀粉类、藻类及菌类制品样品的空白基质,分别在低、中、高 3 个质量浓度水平(1、5、10 mg/L)进行加标回收率试验,每个水平的样品平行处理 5 份,结果如表 4 所列.

表 4 改进的 LC 法测定 6 类重点食品中 DHA 加标回收率($n=5$)
Table 4 Results of spiked recoveries of 6 species key food samples by improved LC method ($n=5$) %

样品	1 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
咸菜	91.5	2.3	92.8	2.6	100.3	2.4
黄油	82.9	1.0	92.1	1.5	94.2	0.4
预制肉制品	81.9	2.0	85.0	1.1	83.5	1.4
辣条	89.0	4.0	92.9	1.4	95.6	2.1
淀粉类	96.3	0.7	95.1	5.2	98.0	1.0
藻类及菌类制品	99.3	4.2	108.6	1.7	115.4	4.3

2. 2. 8 实际样品测定

为进一步验证改进后的 LC 法的可靠性,分别使用国标液相色谱法和改进的液相色谱法,分别测定国标前处理方法和改进的前处理方法处理的样品. 鉴于国标前处理法中调节 pH 时,需将电极直接插入样品溶液,易污染电极,最终缩短电极使用寿命,造成较高的检测成本,在此只将一件咸菜样品用于方法比对. 按国标色谱条件,分别按国标及改进的前处理方法得到的色谱图如图 10 所示. 由图 10

可见,使用国标液相色谱条件测定时,无论是国标前处理还是改进的前处理方法,都有杂质未被完全分离,并且定量结果的相对标准偏差为 7.2%. 当用改进的液相色谱条件时,无论是国标前处理还是改进的前处理方法,分离均好,如图 11 所示,且定量结果的相对标准偏差减小,为 2.9%,二者结果基本吻合,再次证明国标方法在分析样品基质相对简单的咸菜样品时,无论是色谱分离还是样品前处理,均存在不合理之处,需改进.

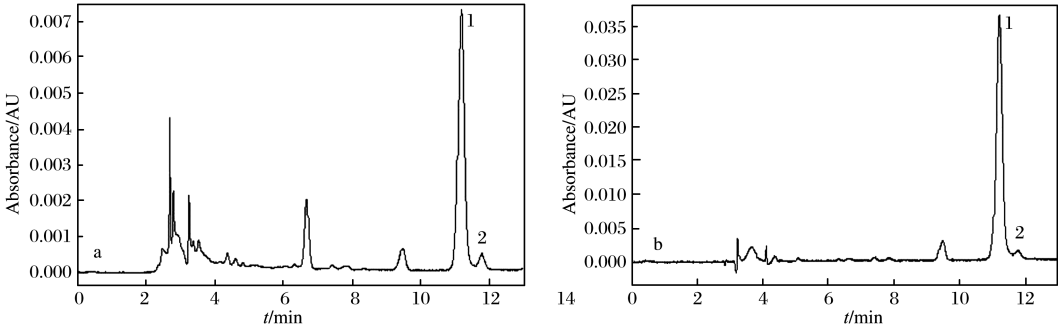


图 10 国标液相色谱条件下,分别按国标和改进的前处理方法处理咸菜样品的色谱图
Fig. 10 Chromatograms of pickle samples treated according to national standard and improved pretreatment method, respectively under chromatographic conditions of national standard
(a) sample pretreatment method according to national standard method, (b) improved sample pretreatment method
Peak: (1) DHA, (2) unknown
Other LC conditions were the same as in Fig. 4.

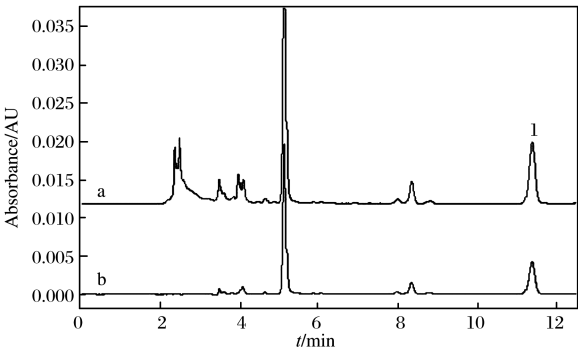


图 11 改进的国标液相色谱条件下,分别按国标和改进的前处理方法处理咸菜样品的色谱图
Fig. 11 Chromatograms of pickle samples treated according to national standard and improved pretreatment method, respectively under chromatographic conditions of improved national standard
(a) sample pretreatment method according to national standard method, (b) improved sample pretreatment method in this research
Peak: (1) DHA
Other LC conditions were the same as in Fig. 6.

使用改进的国标方法对 45 件样品进行了检测,并与改进的 MEKC 结果比对,其中 25 件样品两种方法结果均为阴性,另外 20 件阳性样品结果如表 5 所列. 可见,两种改进方法的测定结果吻合好,适用于 6 类重点食品样品的测定.

表 5 改进的 MEKC 和改进的 LC 法对阳性样品的测定结果
Table 5 Results of positive samples by improved MEKC and LC methods / (g/kg)

样品编号	MEKC	HPLC	样品编号	MEKC	HPLC
1	0.19	0.20	242	0.03	0.03
2	0.19	0.20	250	0.25	0.23
3	0.08	0.08	257	0.05	0.04
4	0.05	0.05	258	0.03	0.03
5	0.08	0.09	259	0.05	0.04
6	0.15	0.15	260	0.02	0.03
8	0.29	0.31	263	0.12	0.12
9	0.04	0.04	264	0.10	0.10
13	0.11	0.11	266	0.05	0.05
14	0.40	0.43	268	0.11	0.11

3 结论

分离是定量的基础,分离好,定量结果才能准。但如果实际样品的前处理不当,干扰物质不能被去除,则在分离时将产生干扰,导致定量不准确。改进后的两种方法,无论是从分离还是样品前处理,均比原来的方法更科学合理,这已在 SDS 和流动相优化的条件试验中得以体现。因为改进后的前处理方法通过盐析效应,仅将溶于乙腈的组分从样品基质中有效提取,284 件实际样品的测定结果表明,干扰被有效消除,故能够得到准确的分析结果。

将 6 类重点食品的前处理方法统一为一种方法。将改进的 MEKC 法与改进的国标 LC 法测定咸菜样品的结果进行了比较,二者吻合性好,进一步验证了两种改进方法的准确性。将改进的 MEKC 法用于 6 类重点食品的检测,加标回收率均在 83.7%~116.0%之间,相对标准偏差在 1.1%~7.3%之间。无论是改进的 MEKC 还是 LC 法,前处理均简单、易行。MEKC 法的检测成本低,更适合大量样品的分析。

参考文献:

- [1] Scordino M, Lazzaro F, Borzì M A, Sabatino L, Traulo P, Gagliano G. Dehydroacetic acid in cheese and cheese coating, results of official control in Italy[J]. Food Additives & Contaminants: Part B, 2018, 11(1):75-81.
- [2] 肖潇,李国君,宋雁,于洲,姜健,杜宏举.基于系统文献检索食品添加剂脱氢乙酸及其钠盐危害识别[J].中国食品卫生杂志,2020,32(5):582-588. [XIAO Xiao, LI Guo-jun, SONG Yan, YU Zhou, JIANG Jian, DU Hong-ju. Hazard identification of dehydroacetic acid and its sodium salt used as food additives based on systematic literature searches[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(5):582-588.]
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国国家标准:食品安全国家标准 食品添加剂使用标准 GB 2760—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [4] 刘峰,徐飞,袁秀娟,马江涛,郝琼,关光玉.一起牛奶中脱氢乙酸钠中毒事件调查分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(5):490-493. [LIU Feng, XU Fei, YUAN Xiu-juan, MA Jiang-tao, HAO Qiong, GUAN Guang-yu. An analysis of sodium dehydroacetate in milk poisoning event[J]. Chinese Journal of Food

Hygiene, 2019, 31(5):490-493.]

- [5] 丁晓静,赵新颖,陈亮.毛细管电泳技术在乳制品营养与安全分析中的应用[J].食品安全质量检测学报,2020,11(17):5820-5831. [DING Xiao-jing, ZHAO Xin-ying, CHEN Liang. Application of capillary electrophoresis in nutrition and safety analysis of dairy products[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(17):5820-5831.]
- [6] 毕鸿昌.多源流框架下公共政策制定过程研究——以多省市“校园 200 米范围内禁售辣条”政策为例[J].领导科学,2020(2):93-97. [BI Hong-chang. Research on the process of public policy making under the framework of multi-source flow[J]. Leadership Science, 2020(2):93-97]
- [7] 邓玉秀,朱秀菊,黄海霞,冯婷,张倩勉.辣条中防腐剂使用现状分析[J].食品安全质量检测学报,2020,11(6):1969-1972. [DENG Yu-xiu, ZHU Xiu-ju, HUANG Hai-xia, FENG Ting, ZHANG Qian-mian. Analysis of the current use of preservatives in spicy strips[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(6):1969-1972.]
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国国家标准:食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定 GB 5009.121—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [9] 张娜,任春香,吴英良,陶雨风.毛细管气相色谱法同时测定果汁中山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸[J].食品安全质量检测学报,2020,11(9):2744-2747. [ZHANG Na, REN Chun-xiang, WU Ying-liang, TAO Yu-feng. Determination of sorbic acid, benzoic acid and dehydroacetic acid in juice by capillary gas chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(9):2744-2747.]
- [10] 朱自德,方林明,陈辉德,王婷.气相色谱法测定面包、糕点和肉制品中脱氢乙酸[J].安徽农业科学,2020,48(1):213-215,233. [ZHU Zi-de, FANG Lin-ming, CHEN Hui-de, WANG Ting. Determination of dehydroacetic acid in bread, pastry and meat products by gas chromatography[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(1):213-215,233.]
- [11] Iwakoshi K, Shiozawa Y, Yamajima Y, Baba I, Monma K, Kobayashi C, Sasamoto T. Determination of nine preservatives in processed foods using a modified QuEChERS extraction and quantified by HPLC-PDA[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2019, 36(7):1020-1031.
- [12] Zhang Y M, Liu H L, Yu Z R, Wang K, Wang Y J,

- Yin J. Sodiumdehydroacetate levels in chicken tissues [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2016, 47:31-37.
- [13] 黄珊, 范云燕, 孙琦, 苏颖. QuEChERS 净化法快速检测食品中的脱氢乙酸[J]. 食品工业, 2020, 41(7):309-312. [HUANG Shan, FAN Yun-yan, SUN Qi, SU Ying. QuEChERS purification method for rapid detection of dehydroacetic acid in food[J]. The Food Industry, 2020, 41(7):309-312.]
- [14] 暴会蕊, 郭会芝. 食品中脱氢乙酸的测定[J]. 现代食品, 2020(2):178-182. [BAO Hui-rui, GUO Hui-zhi. Determination of dehydroacetic acid in food[J]. Modern Food, 2020(2):178-182.]
- [15] Park J, Choi S, Oh D, Mah J H. Simultaneous and rapid analysis of chemical preservatives in processed animal products by ultra-performance liquid chromatography[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(1):291-298.
- [16] Ding X J, Xie N, Zhao S, Wu Y C, Li J, Wang Z. Simultaneous determination of ten preservatives in ten kinds of foods by micellar electrokinetic chromatography [J]. Food Chemistry, 2015, 181:207-214.
- [17] 解娜. 食品中防腐剂、化妆品中巯基乙酸的高效毛细管电泳分析方法研究及应用[D]. 保定: 河北农业大学, 2014. [XIE Na. Study and applications of the methods for determination of preservatives in food and thioglycolic acid in cosmetics by high performance capillary electrophoresis[D]. Baoding, China: Hebei Agricultural University, 2014.]
- [18] 解娜, 丁晓静, 宋宝花, 李佳, 王志. 胶束电动毛细管色谱法同时测定复方化学消毒剂及日化产品中邻苯二甲醛、对氯间二甲基苯酚及三氯生[J]. 色谱, 2013, 31(1):64-70. [XIE Na, DING Xiao-jing, SONG Bao-hua, LI Jia, WANG Zhi. Simultaneous determination of o-phthalaldehyde, p-chloro-m-xenol and triclosan in compound chemical disinfectants and daily chemicals by micellar electrokinetic chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(1):64-70.]
- [19] 丁晓静, 刘文叶, 王萍. 胶束电动毛细管色谱-激光诱导荧光检测法测定番茄酱、番茄沙司和辣椒粉中罗丹明 B[J]. 食品科学, 2020, 41(4):287-292. [DING Xiao-jing, LIU Wen-ye, WANG Ping. Determination of rhodamine B in ketchup, tomato sauce and chili powder by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection[J]. Food Science, 2020, 41(4):287-292.]
- [20] 李疆, 赵珊, 张晶, 丁晓静. 胶束电动毛细管色谱法测定牛奶中脱氢乙酸[J]. 首都公共卫生, 2017, 11(6):272-274. [LI Jiang, ZHAO Shan, ZHANG Jing, DING Xiao-jing. Determination of dehydroacetic acid in milk by micellar electrokinetic chromatography [J]. Capital Journal of Public Health, 2017, 11(6):272-274.]
- [21] Weston A, Brown P R. HPLC and CE principles and practice[Z]. San Diego: Academic Press, 1997:142-197:187.
- [22] 张红医, 韩利梅, 石志红, 杜雪红. 乙腈与水在任何条件下都互溶吗[J]. 化学教育(中英文), 2017, 38(20):76-80. [ZHANG Hong-yi, HAN Li-mei, SHI Zhi-hong, DU Xue-hong. Is acetonitrile miscible with water in any cases[J]. Chinese Journal of Chemical Education, 2017, 38(20):76-80.]
- [23] Dehydroacetic acid[EB/OL]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122903>.
- [24] 丁晓静, 郭磊. 毛细管电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [25] 赵欣, 李强. 高效液相色谱法测定面包、饼干等烘焙类食品中的脱氢乙酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13):3464-3468. [ZHAO Xin, LI Qiang. Quantitative determination of dehydroacetic acid in bread, cookies and other baked food by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(13):3464-3468.]