高效液相色谱-蒸发光散射法测定肉制品中山梨糖醇

甘凝岚
（江苏省产品质量监督检验研究院，江苏 南京 210007）

摘　要：建立肉制品中山梨糖醇的高效液相色谱-蒸发光散射检测器（high performance liquid chromatography-evaporation light scattering detector，HPLC-ELSD）测定法。采用乙腈-水溶液（7∶3，*V*/*V*）作为流动相直接超声提取样品，经Agilent ZORBAX NH_2（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱分离，蒸发光散射检测器检测；优化ELSD检测器参数为飘移管温度90 ℃，氮气流速2.0 L/min。结果表明：山梨糖醇含量在0.2～5.0 mg/mL范围内有良好的线性，方法相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）在1.28%～2.02%之间，回收率在88.3%～99.0%之间。本方法具有样品前处理简便、方法检出限低、方法重现性好的特点，适用于肉制品中山梨糖醇含量的测定。
关键词：山梨糖醇；肉制品；高效液相色谱-蒸发光散射法

Determination of Sorbitol in Meat Products by High Performance Liquid Chromatography-Evaporation Light Scattering Detector

GAN Ninglan
(Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection (HPLC-ELSD) method was developed for the determination of sorbitol in meat products .The samples were ultrasonically extracted using acetonitrile water (7:3, *V*/*V*) as mobile phase and separated on ZORBAX NH_2 Agilent column, then detected by evaporative light scattering detector (ELSD). Optimized ELSD detector parameters such as drift tube temperature and nitrogen flow rate were set at 90 ℃ and 2.0 L/min, respectively. The results showed that sorbitol displayed good linearity relationship over the concentration range of 0.2 to 10 mg/mL. The method precision (relative standard deviation, RSD) ranged from 1.28% to 2.02%, and the recovery was between 88.3% and 99.0%. This method has the advantages of simple sample pretreatment, low detection limit and good reproducibility. So it is useful for the determination of sorbitol in meat products.
Key words: sorbitol; meat products; high performance liquid chromatography-evaporation light scattering detector (HPLC-ELSD)
中图分类号：O657.7　　文献标志码：A　　文章编号：1001-8123（2015）08-0017-05
doi: 10.7506/rlyj1001-8123-201508005

山梨糖醇又名山梨醇、蔷薇醇、清凉茶醇、六羟基醇[1]，主要是由葡萄糖催化加氢法和淀粉糖化直接加氢法生产，也可用蔗糖为原料进行生产[2]。山梨糖醇在食品工业中功能性很多，主要包括高黏性（促使食品增浓与定型）、吸湿性（使食品有润滑性和柔软性）、甜味或凉爽的味觉、多价螯合剂、结晶改性剂（延迟结晶）和膨黏性能等[3]。因此，山梨糖醇的添加可使食品在整个保质期内各种品质都保持不变。山梨糖醇是一种半天然、营养型甜味剂，其甜度只有蔗糖（食糖）的60%，其发热量也比食糖降低了1/3，是一种非生龋性物质，现已广泛用于糖尿病人专用的无糖型食品[4]。研究发现，在肉制品的加工过程中，山梨糖醇的添加能够增强肉制品体系对外加水分和自身水分的保持，提高体系的持水力，可以作为一种优异的持水剂使用。例如，在相同的加工时间内山梨糖醇的添加能够降低肉制品的水分活度，有利于产品的贮藏；添加山梨糖醇还可以显著缩短产品的生产周期，提高产品的得率及水分含量；同时，山梨糖醇的添加也能改善产品的品质，使其硬度降低，更易咀嚼[5]。近年来，部分肉制品生产商开始在肉制品的加工过程中加入山梨糖醇，作为持水剂使用。

据报道，美国要求在相应食品包装上说明，山梨糖醇最大日摄入量为50 g。欧洲要求当糖醇使用比例超过10%时，则须在相应食品包装上说明可能引起轻度腹泻。我国现有的食品安全国家标准GB 2760—2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定肉制品中不得添加山梨糖醇，而调味品中的山梨糖醇可以“按生产需要适量使用”，但没有明确限制其添加量。肉制品中常使用调味料来改善口感，若肉制品中测得山梨糖醇则必须符合带入原则，且不得对食用者造成损害。由于内服过量的山梨糖醇，会导致食用者腹泻和消化紊乱，因

收稿日期：2015-04-11
作者简介：甘凝岚（1986—），女，助理工程师，学士，研究方向为食品分析。E-mail：184950171@qq.com

此需要建立检测肉制品中山梨糖醇的分析方法，为肉制品行业的规范发展提供标准依据。

目前，检测山梨糖醇常用的方法有高效液相色谱法[6-11]、液质联用法[12-14]、气相色谱法[15-18]、气质联用法[19]、离子色谱-质谱联用法[20]、离子交换色谱-脉冲安培法[21]等。示差折光检测器对外部环境要求较高，实验室的温度、湿度以及流动相的流速都会对其有较大影响，因此，实验过程要求相对严格。用气相色谱法检测山梨糖醇前必须对山梨糖醇经行衍生化处理，但是这种处理很容易改变山梨糖醇的性质。离子色谱法用于山梨糖醇含量的检测研究较多，其灵敏度较好，但是山梨糖醇在电极表面会发生氧化还原反应，从而影响方法的准确性。运用质谱检测器检测山梨糖醇，虽然灵敏度高，但样品前处理操作复杂。本实验选用蒸发光散射检测器法，具有样品处理简单、基线稳定、检出限低、针对性强等优点。本方法的建立旨在为肉制品中山梨糖醇含量的测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香肠制品、火腿肠、猪肉脯、牛肉干、酱卤肉等共10 批次市售样品均购于南京各大超市。

乙腈（色谱纯） 美国Tedia公司；去离子水 美国Millipore公司；山梨糖醇（99%） 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

AL204型电子天平 梅特勒-托利多（上海）有限公司；A25实验室高剪切分散乳化机 上海乔荣电子科技有限公司；XW-80A漩涡混合器 上海青浦沪西仪器厂；KQ-300E型超声波清洗机 昆山市超声波仪器有限公司；Heraeus Multifuge XIR型离心机 美国Thermo Fisher公司；1260型高效液相色谱仪、380型蒸发光散射检测器 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

取5.00 g粉碎后的肉制品于50 mL具塞离心管中，准确加入20.0 mL流动相，涡旋混合均匀，超声提取30 min，以8 000 r/min离心3 min，取适量上清液，经0.22 μm微孔滤膜过滤，滤液待上机分析。

1.3.2 色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX NH_2柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（7∶3，*V/V*）；流速：1.0 mL/min；柱温箱温度：40 ℃；进样体积：10 μL；漂移管温度：90 ℃；氮气流速：2.0 L/min。

1.3.3 标准溶液配制

1.3.3.1 标准储备液的配制

精确称取山梨糖醇标准品100.00 mg于10 mL容量瓶中，配制成质量浓度为10 mg/mL的标准储备液。

1.3.3.2 标准工作液的配制

分别准确吸取不同体积山梨糖醇的标准储备液，将其用水稀释成质量浓度为0.2、0.5、1、2、4、5 mg/mL的标准工作液。进行高效液相色谱-蒸发光散射检测器（high performance liquid chromatography-evaporation light scattering detector，HPLC-ELSD）检测，根据样品的保留时间进行定性分析。

2 结果与分析

2.1 测定条件的优化

2.1.1 样品前处理方法的优化

由于肉制品中的基质较为复杂，其中蛋白质和油脂含量较高，在前处理过程中要尽量去除这些杂质，同时也要保证样品中山梨糖醇的提取率。实验比较了3 种前处理方法：方法1为参照GB/T 22222—2008《食品中木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇的测定 高效液相色谱法》，样品要经石油醚去脂，蒸发净石油醚，加入去离子水超声提取，再加入沉淀剂沉淀蛋白，滤纸过滤，滤液再经0.45 μm微孔滤膜过滤，待上机检测；方法2参照SN/T 3142—2012《进口食品中*D*-甘露糖醇、麦芽糖、木糖醇、*D*-山梨糖醇的检测方法 液相色谱-质谱法》，样品用去离子水超声提取后，将提取液用容量瓶定容，再取出部分提取液经Oasis HLB固相萃取柱净化洗脱，最后经0.22 μm滤膜过滤，待上机检测；方法3为样品经流动相乙腈-水（7∶3，*V/V*）超声提取，离心后直接经0.22 μm滤膜过滤，待上机检测。

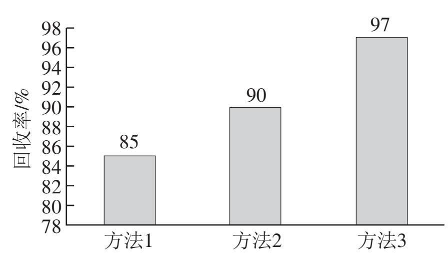


图 1 不同方法的实验结果

Fig.1 Effect of pretreatments on sorbitol recovery

由图1可知，方法1由于沉淀剂易干扰目标物山梨糖醇的提取，使得其回收率较低；虽然方法2的回收率较方法1高，但步骤繁琐，耗时较长；而方法3的回收率较高，且操作简单，因此，选用方法3作为本实验的前处理方法。

2.1.2 检测器的选择

参照GB/T 22222—2008《食品中木糖醇、山梨醇、

麦芽糖醇的测定 高效液相色谱法》运用示差折光检测器检测山梨糖醇，该方法仪器系统平衡时间较长、检测过程中基线易飘移、方法检出限较高，实验对检测环境和流速要求较高且方法重现性较差。采用蒸发光散射检测器检测山梨糖醇，检测系统稳定性较好、仪器检出限较低、方法重现性较好。因此本方法选用蒸发光散射检测器检测肉制品中的山梨糖醇。

2.1.3　ELSD参数的优化

ELSD检测主要受到2 个重要参数的影响：漂移管温度和载气（N_2）流速。比较漂移管温度分别为80、85、90、95、100 ℃时，载气（N_2）流速分别为1.0、1.5、2.0、2.5、3 L/min时对山梨糖醇响应强度的影响。

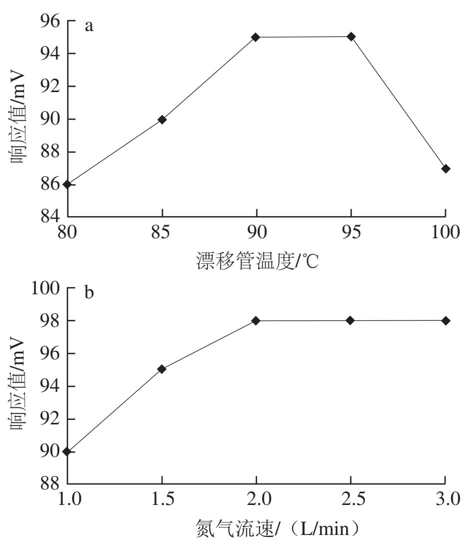


图 2　不同漂移管温度（a）和不同氮气流速（b）条件下山梨糖醇的响应强度

Fig.2　Response intensity of sorbitol at different drift tube temperatures (a) and different nitrogen flow rates (b)

由图2可知，在一定范围内，漂移管温度越高，山梨糖醇的响应强度越好，信噪比越大，当漂移管温度达到95 ℃以上时，山梨糖醇的响应强度反而下降，信噪比减小；随着氮气流速的提高，山梨糖醇的响应强度越好，信噪比也不断增大，在流速达到2.0 L/min以后，山梨糖醇的响应强度变化趋于平衡。因此，最终选择最适用于山梨糖醇检测的ELSD参数设置条件：漂移管温度为90 ℃，载气流速为2.0 L/min。

2.2　方法验证

2.2.1　最低检出限和定量限

空白肉制品经1.3.1节处理后，仪器进样10 μL时，山梨糖醇标准溶液最低检出限为8.0 μg/mL，最低定量限为25 μg/mL。

2.2.2　工作曲线和线性范围

取配制好的山梨糖醇标准工作液，上机检测，以山梨糖醇标准溶液的峰面积计算其对数为纵坐标，以其质量浓度对数为横坐标，绘制标准曲线得到线性回归方程：y=1.25x－7.31，相关系数为0.999 2，线性范围为0.2～5.0 mg/mL。

2.2.3　精密度

表 1　精密度实验结果

Table 1　Precision of the method

山梨糖醇质量浓度/（mg/mL）	峰面积 1	2	3	4	5	6	均值	RSD/%
0.2	976 496	994 561	1 001 563	983 694	1 010 615	1 002 256	994 864	1.28
1	6 336 158	6 448 953	6 508 152	6 388 463	6 605 910	6 518 865	6 467 750	1.50
5	32 579 065	33 563 464	33 936 855	32 886 873	34 258 747	34 065 076	33 548 347	2.02

吸取山梨糖醇标准工作液0.2、1、5 mg/mL，各质量浓度均进样6 次，以峰面积计算精密度。由表1可知，相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）介于1.28%～2.02%之间，精密度良好。

2.2.4　回收率

1 mg/mL山梨糖醇标准溶液、空白牛肉干样品、牛肉干样品1 mg/mL山梨糖醇加标色谱图如图3所示。取不含有山梨糖醇的空白牛肉干9 份，按0.2、1、5 mg/g 3 种加标水平加标，经1.3.1节方法处理样品后，按1.3.2节条件用仪器检测，由表2可知，回收率在88.3%～99.0%之间，RSD均小于5.0%，符合分析要求。

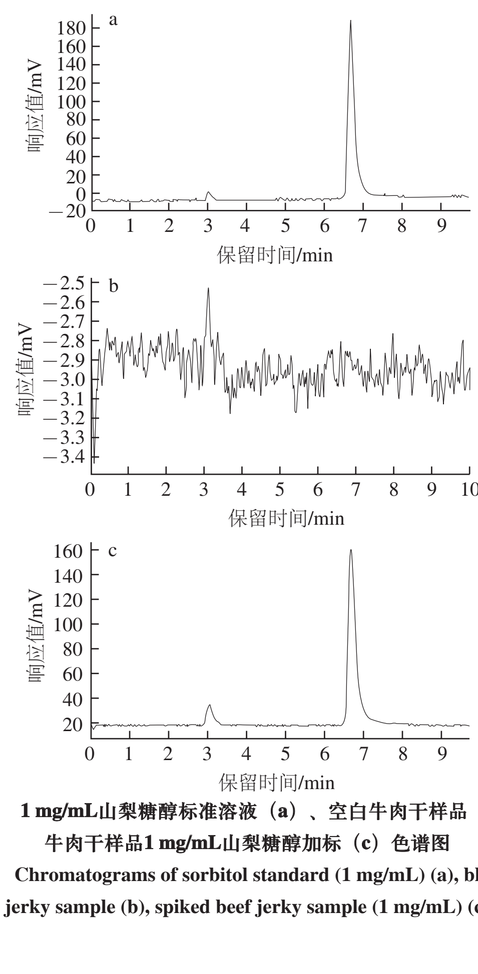


图 3　1 mg/mL山梨糖醇标准溶液（a）、空白牛肉干样品（b）、牛肉干样品1 mg/mL山梨糖醇加标（c）色谱图

Fig.3　Chromatograms of sorbitol standard (1 mg/mL) (a), blank beef jerky sample (b), spiked beef jerky sample (1 mg/mL) (c)

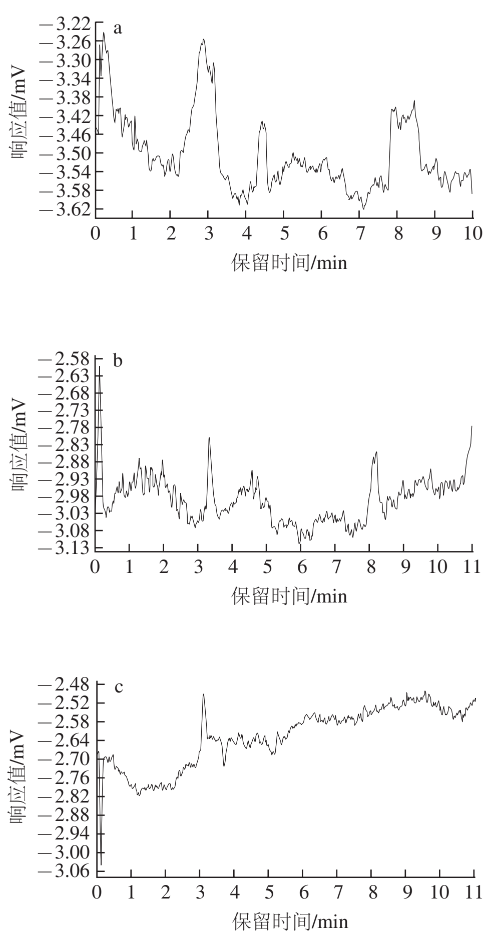
表 2 样品加标回收率

Table 2 Spike recovery of the method

加标量/（mg/g）	实测量/（mg/g）	加标回收率/%	加标回收率平均值/%	RSD/%
	0.18	90.0		
0.2	0.18	90.0	88.3	3.40
	0.17	85.0		
	0.94	94.0		
1	0.95	95.0	94.0	2.25
	0.98	98.0		
	5.02	100.4		
5	4.89	97.8	99.0	1.32
	4.94	98.8		

2.2.5 杂质对目标物质的干扰

经实验发现，肉制品中常用添加剂如防腐剂、着色剂、抗氧化剂等，这些杂质在运用本方法的处理、分析条件时，都没有对山梨糖醇的检测产生干扰，结果见图4。



a.山梨酸；b.诱惑红；c.VC。

图 4 肉制品中加入不同添加剂色谱图

Fig.4 Chromatograms of meat added with different foods additives

2.3 未知肉制品中山梨糖醇含量的测定

利用本方法对南京各大超市销售的10 批次肉制品（包括香肠制品、火腿肠、猪肉脯、牛肉干、酱卤肉等）进行检测，检测结果见表3。经检测，所检样品中有4 批次产品检出山梨糖醇。

表 3 未知肉制品中山梨糖醇的含量（n=3）

Table 3 Sorbitol content in unknown meat products determined by the method (n = 3)

样品	山梨糖醇含量/（g/100 g）
香肠-1	0.32
香肠-2	0.17
火腿肠-1	ND
火腿肠-2	ND
猪肉脯-1	0.85
猪肉脯-2	1.44
牛肉干-1	ND
牛肉干-2	ND
酱鸭-1	ND
酱鸭-2	ND

注：ND.低于本方法检出限。

3 结 论

采用高效液相色谱法氨基柱分离、蒸发光散射检测器检测肉制品中的山梨糖醇。结果表明，本方法可以基本排除肉制品中常见添加剂的干扰，若检出阳性样品，可根据检出量的多少来判断：含量不高则因添加调味料而带入的可能性较大；含量过高则生产时人为添加的可能性较大。该方法利用70%乙腈-水提取样品，不仅能沉淀蛋白质而且脂肪提取物和溶出杂质较少，有效缩短了前处理时间，提高了回收率，同时针对山梨糖醇优化了ELSD参数，使得此方法具有前处理简便、检出限低、重现性好、针对性强的特点，可以准确、高效地测定肉制品中的山梨糖醇的含量。

参考文献：

[1] 袁长富, 李仲良, 卢春山, 等. 山梨醇制备及转化催化剂研究进展[J]. 化工生产与技术, 2007, 14(1): 34-37.

[2] 秦树春, 岳大永. 催化剂在山梨醇生产中的应用[J]. 淀粉与淀粉糖, 2007(1): 29-32.

[3] 杨仲春. 山梨醇的国内外产需状况及其应用[J]. 甲醇与甲醛, 2003(6): 18-25.

[4] 王淑霞, 王英秋. 山梨醇的应用及国内市场浅析[J]. 化工设计, 1994(6): 9-12.

[5] 闫晓蕾. 山梨糖醇在香肠制品中的持水作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

[6] 李黎, 刘玉峰. 高效液相色谱法测定食品中的糖醇[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 278-280.

[7] 甘宾宾, 马彦, 叶志云. 反相高效液相色谱法测定山梨醇和甘露醇[J]. 化学世界, 1999(2): 99-102.

[8] 于珍, 闫正, 蔡立鹏, 等. 高效液相色谱法-蒸发光散射法测定无糖糕点饼中糖醇含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 362-364.

[9] 马立田, 王式箴. 高效液相色谱法测定低热量食品中的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和山梨糖醇的研究[J]. 食品与发酵工业, 1990, 24(4): 12-17.

[10] 徐绣珠, 徐根良. 糖和糖醇高效液相色谱分析[J]. 分析化学, 1999, 27(5): 547-550.

[11] 辛梅华, 徐金瑞, 方柏山, 等. 蔗糖水解液及发酵液中糖及糖醇的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 1997, 16(6): 44-46.

[12] 李传慧, 李淑娟, 安娟, 等. HPLC/MS/MS法同时测定食品中5 种天然甜味剂[J]. 中国医药指南, 2008(19): 161-163.

[13] 马书民, 王明泰, 韩大川, 等. 液相色谱串联质谱法测定食品中甘露糖醇、麦芽糖、木糖醇、山梨糖醇[J]. 中国食品添加剂, 2012(5): 206-210.

[14] LOOS R, GAWLIKB M, BOETTCHER K, et al. Sucralose screening in European surface waters using a solid phase extraction liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(7): 1126-1130.

[15] 高国琰, 董责章. 气相色谱法尿半乳糖醇及其他糖醇的测定[J]. 中国医科大学学报, 1995, 24(3): 247-249.

[16] 陈晨, 朱建良, 欧阳平凯. 稀水溶液中糖和糖醇的气相色谱分析[J]. 南京化工大学学报, 1997, 19(2): 79-83.

[17] 刘敬兰, 陈连文. 衍生化毛细管GC法分离山梨醇及甘露醇[J]. 分析化学简报, 2001, 29(10): 1185-1187.

[18] 王静, 王晴, 向文胜, 等. 色谱法在糖类化合物分析中的应用[J]. 分析化学, 2001, 29(2): 222-227.

[19] 周洪斌, 熊治渝, 余杨, 等. 醋酸酐衍生-气相色谱-质谱联用测定葡萄酒中的糖醇[J]. 色谱, 2013, 31(11): 1093-1101.

[20] 周洪斌, 熊治渝, 李平, 等. 离子色谱-质谱联用法检测食品中的糖醇[J]. 色谱, 2013, 31(8): 786-790.

[21] 唐坤甜, 林立, 梁丽娜, 等. 无糖和低糖食品中的糖和糖醇同时分析的阴离子交换色谱-脉冲安培检测法研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 327-331.