

食品中马来酸的高压液相色谱法检测研究

陈健¹, 林真², 张玉燕¹, 钱疆¹, 蔡少立¹, 杨方^{1*}

(1. 福建出入境检验检疫局 检验检疫技术研究重点实验室, 福州 350001;

2. 福建生物工程职业技术学院 保健营养学系, 福州 350002)

摘要: **目的** 探讨应用高压液相色谱法来检测各种食品中的马来酸。**方法** 以 Agilent SB C₁₈ 色谱柱为分析柱, 确立了对淀粉、改性淀粉、蛋酥饼干、芋泥汤圆、刀削面、粉丝等食品中马来酸的高压液相色谱检测法。通过试验, 考察了富马酸对这些食品中的马来酸检测的影响。**结果** 在试验条件下, 富马酸不会对马来酸的检测造成影响。通过对方法的回收率和精密度进行分析探讨, 结果在所确定的实验条件下, 即流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢铵溶液(pH 调至 2.5), 流速: 0.6 mL/min, 检测波长: 240 nm, 柱温: 30℃, 峰面积和标准溶液在 0.5~20.0 mg/L 范围内呈良好线性关系, 线性系数大于 0.999, 平均回收率处于 93.8%~101.1%, RSD 均小于 5.0 %。**结论** 本实验方法安全可靠, 可以满足实际检测的需要。**关键词:** 高压液相色谱法; 马来酸; 富马酸; 食品; 淀粉

Research on determination of maleic acid in food by high pressure liquid chromatography

CHEN Jian¹, LIN Zhen², ZHANG Yu-Yan¹, QIAN Jiang¹, CAI Shao-Li¹, YANG Fang^{1*}

(1. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;

2. Health Department of Fujian Technology Biological Engineering Institute, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high pressure liquid chromatography (HPLC) method for determination of maleic acid in starch, modified starch, egg biscuit and some foods. **Methods** With Agilent Zorbax Stabond C₁₈ column, the effect of the fumaric acid was studied. **Results** The peak area and the standard solution in the 0.5~20 mg/L kept a good linear relationship, with a correlation coefficient of more than 0.999. The extraction recoveries were between 93.8%~101.1% and the RSD was less than 5.0%. **Conclusion** This laboratory method can meet the requirement for determination in practice.

KEY WORDS: high pressure liquid chromatography; maleic acid; fumaric acid; food; starch

2013年5月15日, 据中国台湾“今日新闻网”报道, 嘉义县调查站3月接获检举食物含毒淀粉顺丁烯二酸酐, 卫生部门随即展开稽查, 截至6月中旬, 根据台湾地区“卫生署食药局”在其官网公布的

“检出顺丁烯二酸产品及其原料封存回收统计表”, 目前已累计查获回收违规产品和原料 692.05 吨, 此事件成为台湾地区“塑化剂事件”后的又一重大食品安全事故。

基金项目: 十二五科技计划项目(2011BAK10B04)、福建省科技项目(2012Y6001)

Fund: Supported by the 12th five-year plan (2011BAK10B04); Fujian province science and technology project (2012Y6001)

*通讯作者: 杨方, 研究员, 主要研究方向为食品理化分析检测。E-mail: yffjciq@gmail.com

*Corresponding author: YANG Fang, Professor, Technical Center of Fujian Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.312, Hudong Road, Fuzhou 350001, China. Email: yffjciq@gmail.com

顺丁烯二酸酐在水中即为顺丁烯二酸形式存在,顺丁烯二酸又称“马来酸”,是一种化合物,为最简单的不饱和二元羧酸,一般用于树脂、涂料等化学粘合剂,或者作为原料生产农药^[1,2]。此化合物没有任何的营养价值,被不法商人加入淀粉中后增加食品的弹性和黏性,增加食品外观光亮度。作为二元酸,它可以延长淀粉的保存期。这种化合物有很好的水溶性,与人体直接接触会破坏器官的黏膜组织,并会损害肾脏。根据目前中国的食品添加剂使用标准 GB 2760-2011^[3]的规定,禁止将顺丁烯二酸酐或顺丁烯二酸在淀粉及淀粉食品中使用。

目前国内外关于淀粉及淀粉食品中顺丁烯二酸的检测文献很少,已报道^[4-7]的一些方法主要是顺丁烯二酸在化工产品、或化工产物、废水中的检测。在一些淀粉产品的检测文献^[8]中也只有一些简单的淀粉基质,并未对糕点等复杂基质有进一步的研究,并且对马来酸的反式结构体富马酸并未提及。富马酸又称反丁烯二酸,作为食品的酸味调节剂,应用于面包、饮料、糖果等食品。本研究参考了文献资料和一些相关的标准,通过选择合适的色谱柱和色谱条件利用出峰的时间不同来排除富马酸对马来酸检测的干扰,利用 C₁₈ 小柱对一些复杂淀粉制品的基质干扰进行优化^[9-11]。该方法准确可靠、方便操作,适用于实验室的检测以及工厂的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200SL 快速液相色谱仪,含 DAD 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); Milli-Q System 超纯水制备器(美国 Milipor 公司)。

无水乙醇(分析纯),磷酸(分析纯),石油醚(分析纯),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。 α -淀粉酶(美国 Sigma 公司, 35.4 U/mg); 马来酸标准品(美国 Fluka, 纯度>99.0%); 富马酸标准品(美国 Sigma 公司, 纯度>99.0%)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 分析柱; 流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢铵溶液(用磷酸将 pH 调至 2.5); 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L。

1.3 标准贮备液与工作液配制

准确称取适量马来酸标准品,用水溶解,储备液浓度为 1000 mg/L,并据需要将储备液用流动相稀释成 1.0~100.0 mg/L 的标准工作液。

1.4 样品制备前处理

称取样品 5 g 至 100 mL 比色管,加 0.1 g 的 α -淀粉酶,加 40~45 °C 水,摇晃振荡 30 min,或加 1 mL 的乙酸锌和 1 mL 亚铁氰化钾除蛋白,振荡、定容,取上清液过 0.45 μ m 滤膜,高效液相色谱测定。

糕点等富含油脂的样品:称取样品 5 g,加 0.1 g 的 α -淀粉酶,加 40~45 °C 水,摇晃振荡 30 min 定容后倒入分液漏斗中,加入石油醚 100 mL,振荡 5 min,静置分层,移取下层溶液,取其中 3 mL 用 C₁₈ 固相萃取小柱过滤,吸取 1 mL 滤液经 0.45 μ m 的滤膜待测。

2 结果与讨论

2.1 实验条件分析

2.1.1 色谱柱分析

在一些文献中液相色谱分析常常使用普通 C₁₈ 或 C₈ 柱作为分析柱,但通过研究发现,马来酸、富马酸在此类柱上的保留时间短,较高流速时各峰无法区分开来。本文采用 Agilent SB- C₁₈ 分析柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),该色谱柱适用于 pH 较低的流动相,流速设为 0.6 mL/min。在此条件下通过不同时间的出峰能够很好地分离马来酸和富马酸,并且保持峰型较好,见图 1。

2.1.2 其他色谱条件分析

本研究对流动条件的影响进行了考察,比较了 0.1 mol/L 磷酸二氢铵溶液、0.1 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇溶液(90:10, v/v)、0.1 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇溶液(97:3, v/v)三种流动条件,发现甲醇对最后的马来酸、富马酸的分离影响较大,最终选择 0.1 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇溶液(97:3, v/v)作为流动相。柱温选择 25、30、35 °C 时出峰情况未见有明显区别,本研究选择 30 °C。因为马来酸的紫外-可见光谱如图 2,没有很典型的出峰高位,所以选择 240 nm,以避免在低值处的多数仪器噪音、溶剂噪音。

在以 0.1 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇溶液(97:3, v/v)为流动相,流速为 0.6 mL/min 时,检测谱图见图 3。

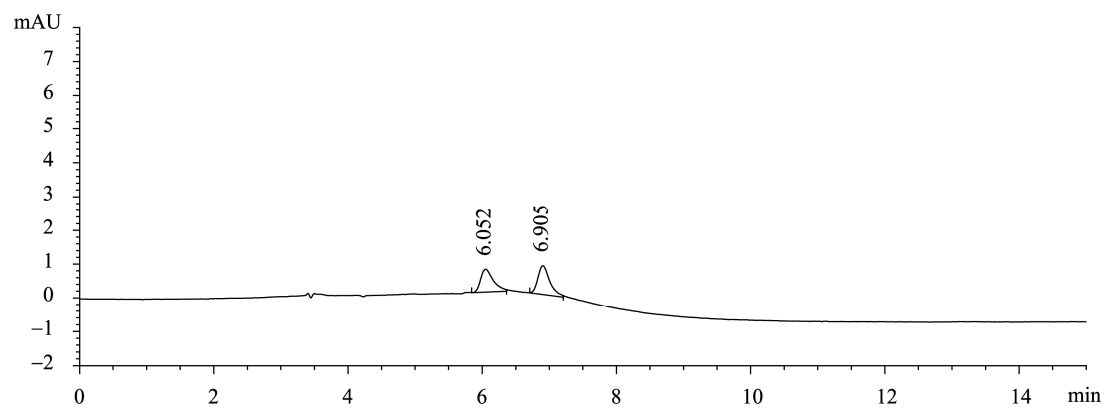


图 1 马来酸(6.052 min)与富马酸(6.905 min)色谱图
Fig. 1 The chromatogram of maleic acid and fumaric acid

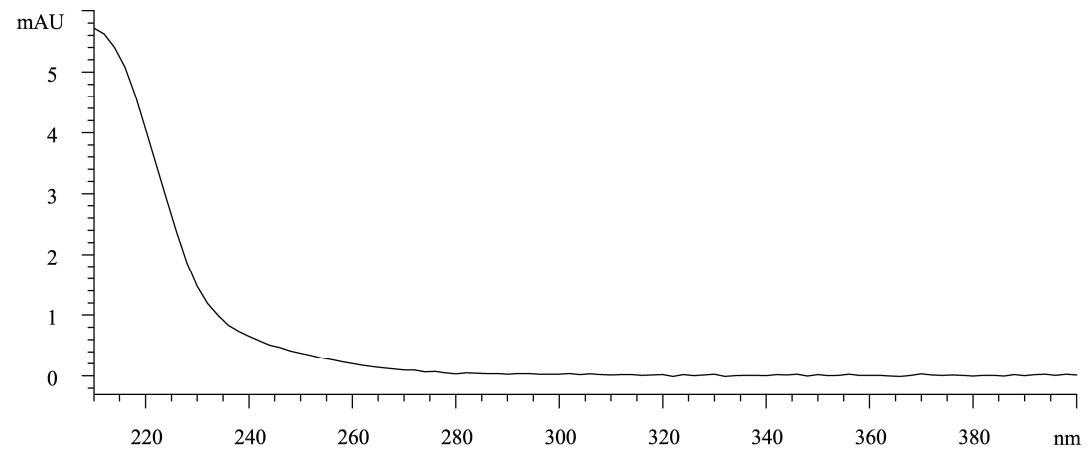


图 2 马来酸紫外光谱图
Fig. 2 The ultraviolet spectrogram of maleic acid

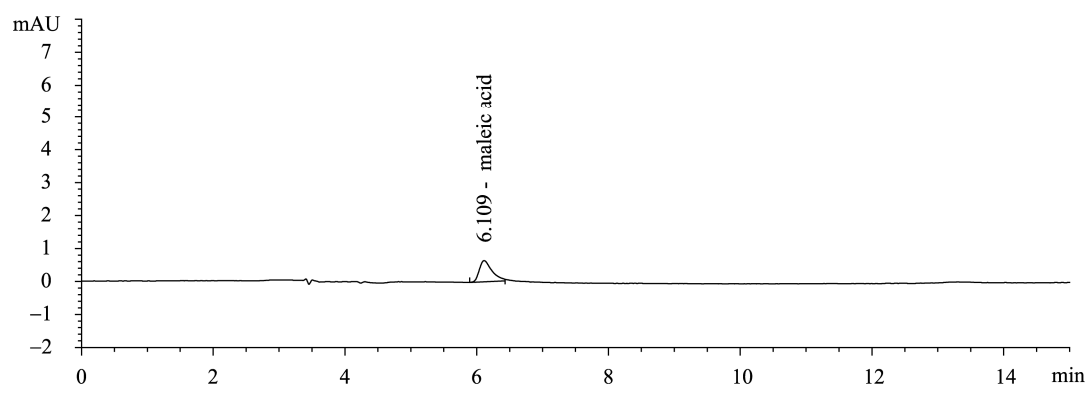


图 3 马来酸色谱图
Fig. 3 The chromatogram of maleic acid

2.2 实验结果讨论

2.2.1 标准曲线回归方程与相关系数

在本研究的实验条件下, 以峰面积和标准溶液浓度作图, 液相色谱在 0.5~20 mg/L 范围内呈良好线性关系, 线性方程与相关系数见表 1。

2.2.2 方法的回收率和精密度试验

本实验选取一般淀粉、变性改良淀粉、市购桂花小圆子、市购芋泥汤圆、市购蛋酥饼干、刀削面、粉

丝作为基质, 在这些基质中进行 10、20、100 mg/kg 3 个浓度水平的添加回收实验, 每个样品基体、每个添加水平重复测定 6 次, 回收率和精密度见表 2, 其中淀粉阴性样品谱图和添加回收谱图见图 4。

表 1 液相色谱法的线性方程与相关系数
Table 1 The linear equation and correlation coefficient of the liquid chromatography

检测方法	线性方程	相关系数
液相色谱法	$Y = 9.4903X - 0.6406$	0.9999

表 2 回收率与精密度试验($n=6$)
Table 2 The recovery rate and the precision test ($n=6$)

基质	添加浓度/(mg·kg ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%	变异系数/%
普通淀粉	10	95.2~102.0	98.7	2.4
	20	91.6~98.0	95.0	2.4
	100	93.8~99.6	96.5	1.9
变性改良淀粉	10	97.4~105.6	101.1	2.9
	20	98.8~103.5	101.0	1.8
	100	93.1~97.9	95.7	2.0
桂花小圆子	10	87.8~102.2	96.0	4.9
	20	90.1~100.3	96.1	3.7
	100	94.8~102.4	96.9	2.8
芋泥汤圆	10	92.5~103.9	97.7	4.4
	20	89.3~100.1	95.2	3.7
	100	94.7~104.6	98.6	3.5
蛋酥饼干	10	91.2~100.3	96.1	3.2
	20	90.1~100.3	93.8	4.4
	100	91.7~101.0	97.0	3.6
刀削面	10	96.9~104.5	99.8	3.0
	20	93.3~99.9	96.1	2.4
	100	94.2~100.4	97.1	2.7
粉丝	10	95.5~105.6	100.1	3.5
	20	94.3~100.3	97.6	2.7
	100	95.2~100.8	98.3	2.3

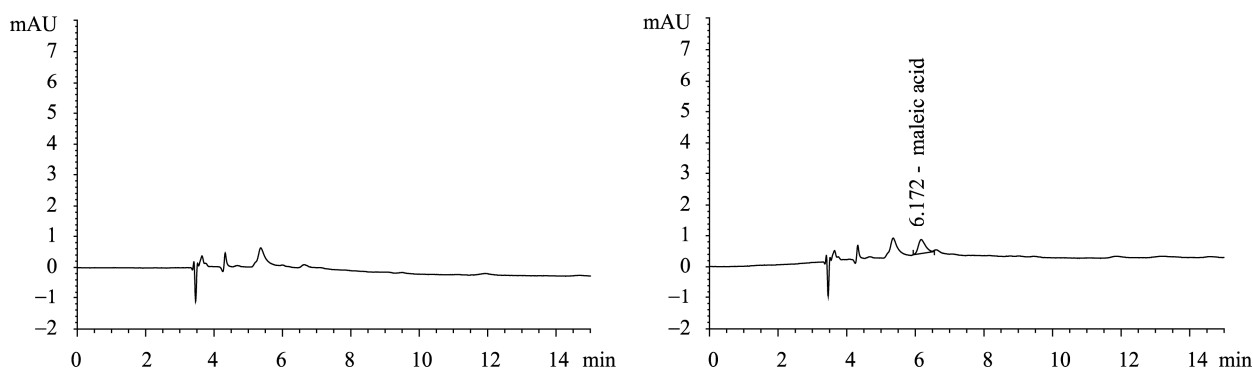


图4 普通淀粉空白(左图)和检测限添加(右图)色谱图

Fig. 4 The chromatogram of starch sample negative sample (left), positive sample (right)

试验表明,本方法的定量检测限为10 mg/kg,平均回收率在93.8%~101.1%,变异系数均<5%,说明该方法准确度较高,满足实际检测需求。

2.2.3 富马酸对检测结果的影响研究

富马酸又称延胡索酸或反丁烯二酸,是马来酸的异构体,但不同于马来酸的是富马酸作为一种常见的食品添加剂而广泛应用于面包、饮料、糖果等食品。在本实验条件下,富马酸被证明不会影响马来酸的检测,谱图见图1。马来酸保留时间6.1 min,富马酸保留时间6.9 min。在图1中,按先后出峰顺序分别为马来酸和富马酸。色谱图表明,在所确定的实验条件下,富马酸不会对马来酸检测造成干扰。

3 结论

本研究所建立的快速液相色谱法能够快速、准确、灵敏地测定多种淀粉及其淀粉食品中的马来酸的含量。由于本研究建立的色谱分析方法简便、处理简单、分析结果可靠,可广泛应用于实验室的检测和企业的质量检验和质量控制。

参考文献

- [1] 罗菊香, 黄建春, 王仁章, 等. 马来酸单淀粉酯的制备及其性能研究[J]. 粮食与饲料工业, 2010(5): 22-24.
Luo JX, Huang JC, Wang RZ, *et al.* Preparation of starch maleic acid ester and study on its properties [J]. Cereal Feed Ind, 2010, (5): 22-24.
- [2] 李红艳, 陈万勤, 王谨, 等. 高效液相色谱法测定淀粉及淀粉制品中的顺丁烯二酸与顺丁烯二酸酐总量[J]. 分析测试学报, 2012, 31(8): 1013-1016.
Li HY, Chen WQ, Wang J, *et al.* Determination of maleic anhydride in starch products by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(8): 1013-1016.
- [3] GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用卫生标准[S].
GB 2760-2011 National food safety standard Hygienic standards for uses of food additives[S].
- [4] 张国安, 王玉萍, 彭盘英. 反相液相色谱法测定废水中的马来酸和富马酸[J]. 化学世界, 2010(7): 404-407.
Zhang GA, Wang YP, Peng PY, *et al.* Determination of fumaric acid and maleic acid in wastewater by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chem World, 2010(7): 404-407.
- [5] 曹宗泽, 向秋芬, 冯琳, 等. 色谱法分离测试马来酸及马来酸母液中的富马酸[J]. 广东化工, 2012, 39(7): 173-174.
Cao ZZ, Xiang QF, Feng L, *et al.* Separation and determination of fumaric acid in maleic acid and maleic mother liquid by high performance liquid chromatography [J]. Guangdong Chem Ind, 2012, 39(7): 173-174.
- [6] 施介华, 徐秀珠. 反相高效液相色谱法分离和测定富马酸[J]. 分析化学, 2000, 28(4): 470-472.
Shi JH, Xu XZ. Separation and determination of fumaric acid by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2000, 28(4): 470-472.
- [7] Suarez-Luque S, Mato I, Huidobro JF, *et al.* Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2002, 955: 207-214.
- [8] 蒙泳, 黎德勇, 甘露, 等. 高效液相色谱法测定淀粉中的顺丁烯二酸[J]. 洛阳理工学院学报: 自然科学版, 2012, 22(2): 1-4.
Meng Y, Li DY, Gan L, *et al.* Determination of maleic acid and maleic anhydride in starch [J]. J Luoyang Inst Sci Technol (Nat Sci Ed), 2012, 22(2): 1-4.
- [9] GB/T 23296.21-2009 食品接触材料 高分子材料 食品模拟物中顺丁烯二酸及顺丁烯二酸酐的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 23296.21-2009 Food contact materials-Polymer-Determination

of maleic acid and maleic anhydride in food simulants-High performance liquid chromatography [S].

- [10] 张旭红. 正相色谱法测定顺丁烯二酸二甲酯反应液中微量顺丁烯二酸[J]. 化学分析计量, 2010(2): 86-87.

Zhang XH. Determination of the tittle maleic acid in dimethyl maleate reaction solution by normal phase chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2010(2): 86-87.

- [11] 高翠英, 李彦斌, 贾皓旭, 等. 色谱法同时测定富马酸和马来酸的含量[J]. 广东化工, 2008, 35(8): 140-143.

Gao CY, Li YW, Jia HX. Determination of the purity of maleic acid and fumaric acid by liquid chromatography [J]. Guangdong Chem Ind, 2008, 35(8): 140-143.

(责任编辑: 周盼虹)

作者简介

陈健, 工程师, 主要研究方向为食品理化分析检测。

E-mail: cjpine@163.com

杨方, 研究员, 主要研究方向为食品理化分析检测。

E-mail: yffjciq@gmail.com

“转基因食品安全”专题征稿

在过去的 30 年里,科学家已经成功培育出多种转基因动植物。近年来,转基因食品的研发迅猛发展,产品品种及产量也成倍增长,有关转基因食品的问题日渐凸显,其致敏性、安全性、抗药性等问题引起了科学家和公众的广泛关注。我国于 2001 年颁布《农业转基因生物安全管理条例》,对转基因食品进行科学监管,之后又发布了一系列管理办法。

鉴于此,本刊特别策划了“**转基因食品安全**”专题,由上海交通大学**张大兵**教授担任专题主编,张大兵教授现为上海交大学生命科学技术学院副院长,国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者奖励计划特聘教授,担任国家农业转基因生物安全委员会委员,长期从事转基因生物分子特征等方面研究,发表 SCI 论文近百篇,获授权专利 14 项;制定国家 ISO 技术标准 4 项,制定国家标准 20 余项。本专题主要围绕**转基因食品成分检测、监测与溯源、安全性分析评价,转基因食品管理法律法规、监管现状及问题等**或您认为本领域有意义的问题进行论述,计划在**2014 年 1 月**出版。

本刊编辑部特邀请您为本专题撰写稿件,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可,请在**2013 年 11 月 20 日前**通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部