

变波长高效液相法同时测定糕点中的丙酸钙和纳他霉素

刘莹¹, 王晓蕾¹, 李伟¹, 张义丞¹, 马雪婷²

(1. 天津市产品质量监督检测技术研究院 国家加工食品质量监督检验中心, 天津 300384;

2. 北京联合智业检验检测有限公司, 北京 100012)

摘要: 建立一种同时测定糕点中丙酸钙和纳他霉素的变波长梯度洗脱高效液相色谱检测方法。样品采用超声处理, 以甲醇和 0.01 mol/mL 酸性磷酸氢二铵为流动相进行梯度洗脱, 经色谱柱为 C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m) 分离, 程序化变波长检测, 外标法定量。该方法可以将丙酸钙和纳他霉素两种防腐剂很好的分离, 保留时间分别为 (3.5 $\pm$ 0.2) min 和 (9.4 $\pm$ 0.2) min, 丙酸钙和纳他霉素的线性回归方程相关系数均大于 0.9999, 方法回收率为 89%~98%。采用高效液相色谱同步测定糕点中丙酸钙和纳他霉素的方法具有快速、准确、灵敏度和精密度高的优点, 能满足糕点中丙酸钙和纳他霉素含量同步测定的要求。

关键词: 高效液相色谱法, 糕点, 丙酸钙, 纳他霉素

Simultaneous determination of calcium propionate and natamycin in cake by high performance liquid chromatography with programmed wavelength UV detection

LIU Ying¹, WANG Xiao-lei¹, LI Wei¹, ZHANG Yi-cheng¹, MA Xue-ting²

(1. Tianjin Products Quality Supervision and Inspection Institute, Tianjin 300384, China;

2. United Intelligence Ltd, Beijing 100012, China)

Abstract: A method of simultaneous determination of calcium propionate and natamycin in cake by high performance liquid chromatography with programmed wavelength UV detection was developed. The samples were extracted with ultrasound pretreatment, separated with Agilent Zorbax SB- C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm) using methanol-di-ammonium hydrogen phosphate (0.01 mol/mL) as mobile phase with a gradient elution program, determined with variable wavelength detector, and quantified with external standard curve. This method could achieve the separation of calcium propionate and natamycin in cake, and the retention time of calcium propionate and natamycin was (3.5 $\pm$ 0.2) min and (9.4 $\pm$ 0.2) min, respectively. The correlation coefficients of calibration curves were all above 0.9999, and average recoveries were 89%~98%. It could conclude that the method that using HPLC to simultaneously determine calcium propionate and natamycin in cake had characters of quickness, accuracy and high-sensitivity, which could meet the requirements of simultaneously determining calcium propionate and natamycin in cake.

Key words: HPLC; cake; calcium propionate; natamycin

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)01-0316-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.01.058

丙酸钙在酸性条件下产生游离丙酸, 具有抗菌作用, 对各类霉菌、革兰氏阴性杆菌或好氧芽孢杆菌有较强的抑制作用, 还可以抑制黄曲霉素的产生。丙酸是人体代谢过程中的一种产物和反应物, 丙酸钙分解后的 Ca^{2+} 可被吸收^[1], 所以丙酸钙是一种安全可靠的食物防腐剂和纳他霉素(Natamycin)是纳他尔链霉菌经过发酵得到的一种次级代谢产物, 是一种多烯大环内脂类抗真菌剂。由于它能够有效专一

的抑制酵母菌和霉菌^[2-4], 而且具有较好的稳定性, 因此是广泛使用的天然生物性食品防腐剂和抗菌添加剂。按照 GB2760-2011《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》^[5] 中规定, 对糕点中添加丙酸钙限量值为 2.5 g/kg, 纳他霉素限量值为 0.3 g/kg。

由于糕点是高水分含量食品, 为了延长糕点的保质期, 生产商往往添加复合防腐剂以增强其防腐保鲜效果, 导致防腐剂存在多残留和超范围使用现象。因此, 建立一种能够同时测定丙酸钙和纳他霉素食品添加剂的方法十分必要。目前, 大多数分析方法只能单一测定上述物质, 所用的方法有高效液相色谱法^[6]、气相色谱法^[7-8]、离子色谱法^[9-10]。由于两种物质的检测条件不同, 能够同时检测的方法研

收稿日期: 2014-03-28

作者简介: 刘莹(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品检验研究。

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ510391); 国家自然科学基金项目(31201426)。

究较少。本实验旨在研究用变波长高效液相色谱法同时测定糕点中丙酸钙和纳他霉素的方法可能性,从而提高检测效率,缩短检测时间。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

夹心蛋糕、月饼 均购于超市;丙酸钙(货号:C16493100)、纳他霉素(货号:C162084000),以上标准品纯度均大于或等于 89.5% 均购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH;甲醇(色谱纯) 美国 TEDIA 公司;磷酸、磷酸氢二铵 均为国产分析纯;实验用水 为超纯水。

Aglient 1260 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器) 美国 Aglient 公司;KQ800DB 型数控超声清洗器 800W 昆山市超声仪器有限公司;EASYPURE II 型超纯水器 北京普析通用仪器有限责任公司;BSA2245-CW 电子分析天平 北京赛多利斯公司;H-2050R 型低速冷冻离心机 北京雷勃尔离心机有限公司;IKA T25 型组织捣碎机 上海标本模型厂;pH 纸 天津市塘沽区化学试剂厂;0.45μm 微孔滤膜 天津市东康科技有限公司。

1.2 高效液相色谱分析条件

色谱柱: Agilent ZORBAXSB-C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5μm, 安捷伦公司);柱温 25℃;流速 1.0mL/min;流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.01mol/mL 磷酸氢二铵用磷酸,调整 pH4.5~5.5;检测波长程序: 0~3.5min, 214nm; 3.5~12min, 305nm; 12~14min, 214nm;进样量: 10μL。按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Elution program of mobile phase

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.0	20	80
3.5	20	80
5.0	70	30
12.0	70	30
14.0	20	80

1.3 标准曲线

标准品储备液:准确称取丙酸钙 140mg 和纳他霉素两种标准品 20.0mg,分别用水溶解并定容至 100mL。吸取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 分别置 10mL 容量瓶中,加稀释溶剂稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品系列溶液,以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘出校准曲线图。

1.4 样品溶液的制备

准确称取 5g 试样至 100mL 烧杯中,加水 20mL,加入 0.01mol/L 磷酸溶液 0.5mL 混匀,经超声浸提 15min 后,用 0.01mol/L 磷酸溶液调 pH4.5~5.5 左右,转移试样至 50mL 容量瓶中,用水稀释至刻度摇匀。将试样全部转移至 50mL 具塞塑料离心管中,以不低于 4000r/min 离心 10min,取上清液,经 0.45μm 微孔滤膜过滤后,待液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

实验选取以 A 液甲醇和 B 液 0.01mol/L 磷酸氢

二铵溶液,用磷酸调节 pH4.5~5.5 作为流动相,减少流动相中甲醇的比例或甲醇比例上升较慢时各组分保留时间变长,分离效果较好,但扩散效应大,峰形差。反之,会使出峰时间提前,两种物质的峰分不开,发生重叠^[11]。通过改变流动相比比例,对丙酸钙和纳他霉素标准溶液进行梯度洗脱,最终确定的最佳流动相梯度如表 1 所示。用此梯度能使两物质得到完全分离,保证丙酸钙出峰时间 3.5min,且缩短纳他霉素出峰时间时间为 9.4min,同时峰形较好,减轻或消除峰拖尾现象(见图 1),而且保留时间与变波长检测程序的设计相吻合。

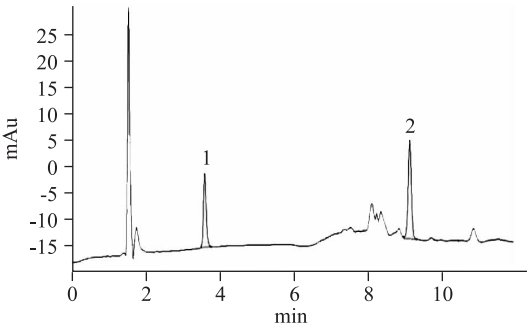


图 1 丙酸钙、纳他霉素混合标准色谱图

Fig.1 HPLC standards chromatograms of calcium propionate and natamycin

注:1:丙酸钙;2:纳他霉素;丙酸钙纳他霉素混合标准溶液为 0.568、0.1mg/mL。

2.2 变波长检测条件的确定

由于不同物质分子结构各异,特征吸收峰的波长各不相同,因此将两种物质标准溶液分别采用 DAD 进行全波段扫描,以确定其最佳吸收波长。从三维色谱图(见图 2)中可见,丙酸钙最大吸收波长在 214nm 处,纳他霉素最大吸收波长在 305nm 处。以此作为变波长检测方法的确定依据。丙酸钙的出峰时间为 3.5min 左右,因此在 0~3.5min 采用 214nm 作为其检测波长;纳他霉素的出峰时间为 9.4min 左右,因此在 3.5~12min 采用 305nm 作为其检测波长。

2.3 样品前处理方法的选择

丙酸钙易溶于水,微溶于甲醇、乙醇等有机溶剂;纳他霉素微溶于水和甲醇,难溶于大部分有机溶剂^[12]。所以选择纯水作为两种物质提取溶剂,加入适量磷酸溶液,超声浸提。糕点经直接浸提后,杂峰较少,且与丙酸钙和纳他霉素的保留时间不一致,能够有较好的分离,同时有效提取两种物质。

2.4 方法的线性范围和检出限

丙酸钙在 35.0~710μg/mL 浓度范围内呈良好的线性关系,纳他霉素在 0.1~100μg/mL 浓度范围内呈良好的线性关系。两组分的线性方程、相关系数见表 2。根据信噪比 S/N=3 计算检出限,结果见表 2。

2.5 回收率和精密度的测定

称取夹心蛋糕分别添加丙酸钙、纳他霉素标准混合溶液三个水平浓度后进行样品处理,测定回收率和精密度。夹心蛋糕中的丙酸钙不同添加量的回收率在 89.2%~96.7% 之间,纳他霉素不同添加量的

表2 糕点中丙酸钙和纳他霉素标准样品的标准曲线方程

Table 2 Standard curve equations of calcium propionate and natamycin

化合物	线性范围(μg/mL)	标准曲线方程	相关系数(r)	检测限(μg/mL)
丙酸钙	35.0~710	Y = 0.212x - 0.559	0.99996	3.00
纳他霉素	0.1~100	Y = 76.65x - 13.68	0.99998	0.05

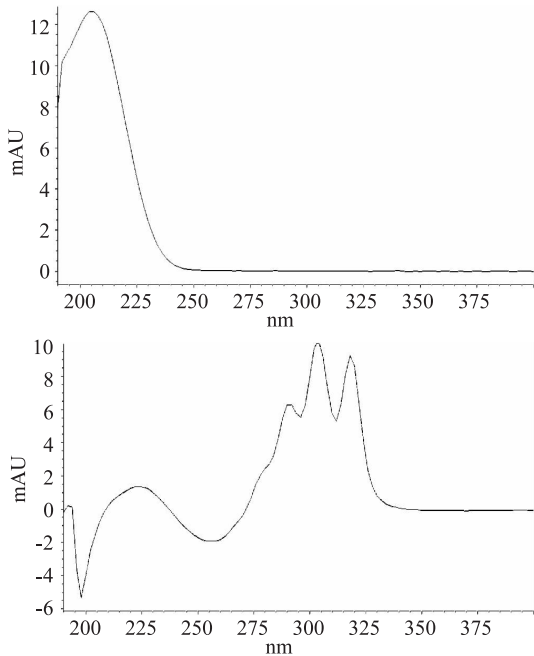


图2 丙酸钙、纳他霉素全波长扫描图

Fig.2 UV-absorption spectra of calcium propionate and natamycin

注:A:丙酸钙;B:纳他霉素。

回收率在 92.5% ~ 98.9% 之间。相对标准偏差在 3.88% ~ 6.23% 之间。回收率与精密度测定结果分别见表 3。由方法回收率与精密度实验结果表明,对于含有微量成分样品的定量测定而言,回收率在 80% 以上完全能满足定量测定的要求;同时精密度实验的结果表明本研究建立的方法系统误差较小,测定结果比较准确,分析方法可行性高。

表3 丙酸钙和纳他霉素回收率和精密度实验结果

Table 3 The recovery and precision of calcium propionate and natamycin

样品	本底值(g/kg)	添加水平(g/kg)	平均测定值(g/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
丙酸钙	0.564	0.01	0.512	89.2	3.88
	0.564	0.1	0.608	91.6	4.25
	0.564	0.5	1.029	96.7	4.75
纳他霉素	0.00362	0.0005	0.00381	92.5	4.36
	0.00362	0.001	0.00436	94.3	5.25
	0.00362	0.005	0.00655	98.9	6.23

2.6 实际样品的测定

随机购买市售的月饼、夹心蛋糕为样本,按照 1.4 样品前处理的方法,再按照 1.2 色谱条件进行测定。每种样品平行三次,测定其中的丙酸钙和纳他

霉素含量色谱图见图 3,结果见表 4。该方法对这些样品均具有良好的适用性,色谱无干扰,在所检样品中均未超过国标对食品添加剂的要求。

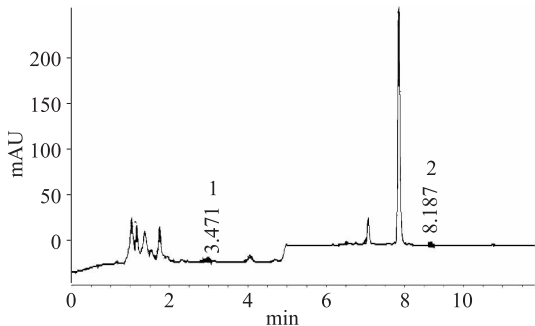


图3 夹心蛋糕丙酸钙及纳他霉素色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of cake

注:1:丙酸钙;2:纳他霉素。

表4 糕点测定结果(mg/kg, n = 3)

Table 4 The determination results of cake(mg/kg, n = 3)

样品	丙酸钙	纳他霉素
月饼	214.126	0.416
	216.411	0.420
	209.465	0.419
夹心蛋糕	158.715	0.358
	169.354	0.361
	149.689	0.368

3 结论

3.1 在流动相的选择上,采用甲醇溶液(A)和 0.01mol/mL 磷酸氢二铵溶液(B)进行梯度洗脱,程序 0.0~3.5min, 20% A; 3.5~5.0min, 20%~70% A, 5.0~12.0min, 70% A, 12.0~14.0min, 70%~20% A。确定了变波长同时检测糕点中丙酸钙和纳他霉素检测条件,其检测波长分别为:214nm(0~3.5min), 305nm(3.5~12 min), 214nm(12~14min)。

3.2 在供试品溶液的制备中,采用超声波在酸性条件下萃取样品,结果干扰物质较少,同时将两种物质有效提取出来。

3.3 本实验建立的方法操作合理简便,方法精密度高,重复性及线性关系良好,回收率令人满意,对于了解食品中丙酸钙的含量水平以及对纳他霉素的加入量的控制有一定的指导意义。

参考文献

[1] 严成.丙酸钙对牛肉保鲜效果的研究[J].食品科学,2009,30(14):300-303.
[2] Harrg Brik. In Analytical profiles of Drug substances [C].
(下转第 323 页)

(14.24%)、 β -甜没药烯(6.99%)、 γ -姜黄烯(5.75%)、 β -水芹烯(4.32%)。

2.2 挥发性风味物质成分分析

2.2.1 烯烴类化合物 从表1得知,铜陵白姜中检测出的烯烴类物质高达83.79%,对风味的贡献最明显,其中姜烯27.64%、 β -倍半水芹烯12.66%,仅两者就占到了总挥发性成分总量的40.30%,为白姜风味物质的主要成分,是姜所特有辛辣风味,同时,好多烯烴类物质也具有独特的香气,如D-柠檬烯具有甜香、柑橘香、柠檬香气。新工艺白姜蜜饯的主要风味物质是原料带入的烯烴类物质,含量达78.09%,并且,姜烯、 β -倍半水芹烯的含量变化也很小。但是,传统工艺白姜蜜饯中烯烴类化合物的含量下降到45.98%,其中,姜烯、 β -倍半水芹烯损失非常明显,相对原料而言分别减少了44.28%、55.53%。

2.2.2 醇类化合物 白姜中醇类含量也相对较高,但经糖制加工后,含量均显著减少。可能是由于醇和酸类物质发生了化学反应。

2.2.3 醛类化合物 柠檬醛(又称香叶醛)有柠檬香气,新工艺白姜蜜饯和原料白姜中相对含量分别为1.30%、1.09%,传统工艺白姜蜜饯中仅为0.15%。白姜原料中的香茅醛经糖制加工后则损失殆尽。

2.2.4 酯类化合物 芳香性的酯类物质发生了极大变化,白姜中的酯类化合物较低,但传统工艺白姜蜜饯和新工艺白姜蜜饯中的相对含量均较高,其中,传统工艺白姜蜜饯中乳酸乙酯含量最高,达24.97%,新工艺白姜蜜饯中则以乙酸香叶酯为主,达14.96%。

2.2.5 酮类及酸类化合物 酮类和酸类的含量及种类不是很多,对风味的贡献不明显。

3 结论

3.1 用SPME-GC-MS分析,结果从铜陵白姜、传统工艺白姜蜜饯和新工艺白姜蜜饯中总共确定了85种挥发性风味物质,其中铜陵白姜47种、传统工艺白姜蜜饯49种、新工艺白姜蜜饯42种。从物质的组成和含量而言,新工艺白姜蜜饯基本保留了原料白姜特有的辛辣风味,而且具有香气的风味物质含量相应增加。可能是由于多次高温煮制的原因,导致传统白姜蜜饯中辛辣风味物质大量损失,虽然具有香气的风味物质含量较高,但已基本没有了姜固有的风味。

(上接第318页)

New York: Academic Press, 1994: 514-557.

[3] Davisnd, Dieneruc. Food and Beverage Mycology [C]. New York: Nostrand-Reinhold, 1987: 517-526.

[4] Davipsonpm, Doanch. Natamycin [J]. Antimicrobiol in Foods, 1993: 395-407.

[5] 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[S]. GB2760-2010. 北京: 中国标准出版社, 2011: 7.

[6] 中华人民共和国国家标准. 食品中丙酸钠, 丙酸钙的测定 高效液相色谱[S]. GB/T 23382-2009. 北京: 中国标准出版社, 2009: 1-6.

[7] 中华人民共和国国家标准. 食品中丙酸钠, 丙酸钙的测定[S]. GB/T 5009.120-2003. 北京: 中国标准出版社, 2004:

3.2 铜陵白姜原料主要风味物质为姜烯、 β -倍半水芹烯、 γ -姜黄烯、 β -甜没药烯、 α -姜黄烯、桉叶醇。传统工艺白姜蜜饯中主体风味物质有乳酸乙酯、 α -姜黄烯、乙酸香叶酯、 β -倍半水芹烯、 β -甜没药烯。新工艺白姜蜜饯中主要风味物质有姜烯、乙酸香叶酯、 β -倍半水芹烯、 β -甜没药烯、 γ -姜黄烯、 β -水芹烯。

参考文献

[1] 席雪梅. 铜陵白姜营养成分分析与应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011: 20-21.

[2] 黄雪松, 陈雅雪. GC-MS法比较鲜姜与干姜的风味物质[J]. 中国食品学报, 2007, 7(5): 133-138.

[3] 樊亚鸣, 任三香, 陈永亨, 等. GC/MS法分析广东阳春沙姜精油的化学成分[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 196-198

[4] John P, Amanda L. Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger [J]. Zingiber officinale Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 209-221.

[5] Park S N, Lim Y K, Freire M O, et al. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria [J]. Anaerobe, 2012, 18: 369-372.

[6] Bicas J L, Neri-Numa I A, Ruiz A L T G. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 1610-1615.

[7] Wang W, Wu N, Zu Y G. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components [J]. Food Chemistry, 2008, 108(3): 1019-1022.

[8] Ojeda-Sana A M, Baren C M, Elechosa M A, et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components [J]. Food Control, 2013, 31(1): 189-195.

[9] Tiwari M, Kakkar P. Plant derived antioxidants-Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress [J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23(2): 295-301.

[10] Kelly C, Marcia O M. Extraction of ginger (Zingiber officinale Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvent: a study of the antioxidant action of the extracts [J]. Supercritical Fluids, 2002, 24: 57-76.

99-100.

[8] 王玉飞, 李继革, 施家威. 气相色谱法测定食品添加剂丙酸钠和丙酸钙的方法改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 31(6): 312-315.

[9] 袁勇军, 戚向阳, 黄丽金, 等. 毛细管气相色谱法测定食品中的丙酸盐[J]. 食品科技, 2009, 24(8): 237-240.

[10] 李艳芳. 超高效液相色谱法测定乳制品中纳他霉素含量[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 220-222.

[11] 程春梅, 彭进, 董刘敏. 高效液相色谱法同时检测果汁饮料中的六种合成着色剂[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 301-304.

[12] 马晓晨. 天然食品防腐剂纳他霉素的特性及其在食品工业中的应用[J]. 现代园艺, 2009(9): 55-56.