



流动相梯度洗脱对 HPLC 法测定五种食品 添加剂出峰顺序的影响

闫仲丽, 杨志岩, 张晓清, 降升平, 赵娟
(天津科技大学现代分析技术研究中心, 天津 300457)

摘要: 在以甲醇和乙酸铵溶液为流动相、柱温 25 °C 等色谱条件不变的前提下, 重点考察了苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄这 5 种食品添加剂保留时间随流动相中甲醇初始体积分数的改变而变化的趋势. 结果表明, 流动相中甲醇体积分数的提高会同时缩短 5 种添加剂的保留时间, 并且对前 4 种添加剂苯甲酸钠、山梨酸、糖精钠、柠檬黄的保留时间的缩短程度依次增大, 致使其出峰顺序发生变化. 本研究所得规律对多组分同时测定时最佳分离条件的优化及定性具有一定的参考和借鉴价值.

关键词: 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 出峰顺序; 苯甲酸; 山梨酸; 糖精钠; 柠檬黄; 日落黄

中图分类号: TS207.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2012)05-0018-04

Impact of Gradient Elution Conditions on Eluotropic Sequence of Five Kinds of Food Additives Treated with HPLC

YAN Zhongli, YANG Zhiyan, ZHANG Xiaoqing, JIANG Shengping, ZHAO Juan

(Research Centre of Modern Analysis Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: When the HPLC parameters of mobile phase with methanol and ammonium acetate were fixed, and the column temperature was 25 °C, the changes of retention time in the benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium, tartrazine and sunset yellow with starting concentration of methanol in the mobile phase were studied. The results showed that the retaining time of all the five kinds of additives could be shortened by increasing the starting concentration of methanol in the mobile phase, and the changes of retaining time in the first four additives benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium and tartrazine increased in turn.

Key words: high performance liquid chromatography; gradient elution; eluotropic sequence; benzoic acid; sorbic acid; saccharin sodium; tartrazine; sunset yellow

近年来,随着食品工业的快速发展,食品安全问题越来越突出. 究其原因,主要有两方面:一是非法添加物,二是滥用添加剂,两者存在本质区别. 苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄,这 5 种物质是 GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》^[1]中均允许添加,但又有限量标准的食品添加剂,而且在果酱、蜜饯凉果里均可以同时添加以上 5 种添加剂,因此,建立一种准确测定食品中上述 5 种添加剂的方法十分必要.

由于高效液相色谱同时具备分离效率高、灵敏度

高和重现性好等优点,是目前进行上述物质分析的首选方法^[2]. 但是高效液相色谱的分离条件优化一直是色谱领域的研究热点之一,而梯度分离条件的优化又是其中的难点. 对于复杂样品的分离,欲取得较佳的分离效果,可以在不同的流动相洗脱模式下进行操作^[3-4]. 流动相等度洗脱及线性洗脱条件下溶质保留时间预测的方法国内已经有报道^[5-6],但是实际实验过程中,等度洗脱及线性洗脱有时也满足不了分离条件优化的需要,而且因为色谱实验过程中,在色谱条件相似的情况下,色谱工作者往往会参照文献或者其

收稿日期: 2012-03-05; 修回日期: 2012-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(311101357, 30900339, 30800255); 中国博士后科学基金(20110490786, 2011M500528)

作者简介: 闫仲丽(1979—), 女, 山东文登人, 工程师, yanzhli@tust.edu.cn.

他人的实验结果对组分进行定性, 或者在色谱实验改变流动相中有机相比例时分离度稍微不好的情况下, 就返回原来的流动相比例进行优化, 导致很多相关的方法优化都停留在某一阶段的有机相比例上^[2]. 因此, 本实验旨在考查台阶式梯度洗脱过程中, 流动相比例的细微变化对 5 种食品添加剂保留时间及出峰顺序的影响.

1 实验

1.1 试剂与仪器

苯甲酸钠、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇(色谱纯), 德国默克公司; 乙酸铵(分析纯)、乙酸钠(分析纯)、冰乙酸(分析纯), 天津化学试剂一厂; 溴化四丁铵、三乙胺, 天津市科密欧化学试剂有限公司.

LC10A 型高效液相色谱仪(配紫外检测器), 岛津仪器有限公司; AR2140 型电子分析天平, 奥豪斯(上海)公司; AS3120 型超声波, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司.

1.2 分析条件

色谱柱为 VP-ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵按不同比例进行梯度洗脱; 流量 1 mL/min; 检测波长 230 nm; 柱温 25 °C; 进样体积 10 μL.

1.3 标准溶液配制

分别准确称取 0.01 上述 5 种添加剂标准品于 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 配成 100 mg/L 的标准储备液. 分别吸取各标准储备液 2 mL 于 100 mL 容量瓶中, 定容, 制成 2 mg/L 的混合标准溶液待测.

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

选用甲醇与乙酸铵-乙酸钠、甲醇与乙酸钠-冰乙酸-溴化四丁铵、甲醇与乙酸钠-三乙胺、甲醇与乙酸钠-乙酸钠-乙腈分别作流动相, 实验结果均不能取得很好的分离效果. 用甲醇与 0.02 mol/L 乙酸铵作流动相, 按体积比 20 : 80 的比例进行实验, 结果分离效果比较理想, 可以使 5 种被测组分有效分离, 而且流动相组分种类最少, 配制最简单.

2.2 柱温的选择

选用常温(20 °C 以下)、25 °C、30 °C 进行实验, 结

果发现柱温越低分离效果越好, 但灵敏度同时下降; 柱温越高, 分离效果越差, 但灵敏度高. 综合考虑以上因素, 选择柱温 25 °C 能取得较好的分离效果, 并达到较高的灵敏度.

2.3 不同流动相梯度条件的影响

在 1.2 的色谱条件下, 将 1.3 中配制的 2 mg/L 标准混合溶液, 进样 10 μL 于液相色谱仪中, 分别按照表 1 中的 3 种梯度程序依次进行洗脱, 并分别用 5 种添加剂的单标进行定性. 结果表明, 3 种梯度程序下, 5 种添加剂的出峰顺序及分离效果分别如图 1、2、3 所示. 当梯度程序由 1 变到 2 及由 2 变到 3, 5 种添加剂的保留时间的变化值见表 2.

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间/min	甲醇/%			0.02 mol/L 乙酸铵/%		
	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 1	梯度 2	梯度 3
0.01	10	15	20	90	85	80
6	10	15	20	90	85	80
8	30	30	30	70	70	70
15	30	30	30	70	70	70
16	10	15	20	90	85	80
18	10	15	20	90	85	80

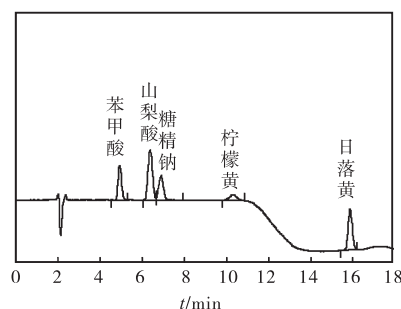


图 1 5 种添加剂采用梯度洗脱程序 1 分析的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of five kinds of additives analyzed with gradient elution program 1

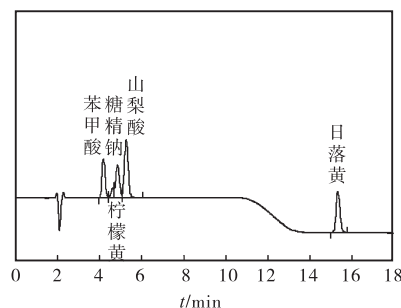


图 2 5 种添加剂采用梯度洗脱程序 2 分析的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of five kinds of additives analyzed with gradient elution program 2

根据表 2 中的数据推断, 流动相中甲醇初始体积

分数的增加对苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄 5 种添加剂的保留时间都会有缩短作用,而且对前 4 种添加剂保留时间缩短的变化值依次增大,这是导致其出峰顺序发生变化的根本原因.日落黄可能是因为由梯度 1 变到梯度 2 时,其出峰时间正好处在流动相中甲醇的体积分数从 30% 回落之后,而由梯度 2 变到梯度 3 时,其出峰时间却又处在流动相中甲醇的体积分数从 30% 回落之前,所以其保留时间 Δt_{23} 的变化值相对来说要比正常值大.

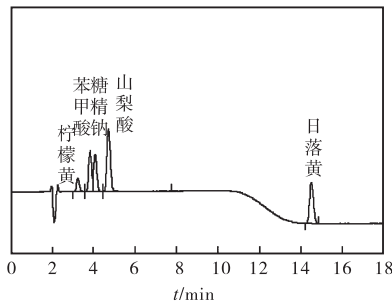


图 3 5 种添加剂采用梯度洗脱程序 3 分析的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of five kinds of additives analyzed with gradient elution program 3

表 2 不同梯度程序下 5 种添加剂保留时间的变化

Tab. 2 Changes of the retaining time of five kinds of additives

组分名称	t_1/min	t_2/min	t_3/min	$\Delta t_{12}/\text{min}$	$\Delta t_{23}/\text{min}$
苯甲酸	4.936	4.183	3.846	0.753	0.337
山梨酸	6.378	5.265	4.735	1.113	0.530
糖精钠	6.895	4.856	4.094	2.039	0.762
柠檬黄	10.328	4.636	3.259	5.692	1.377
日落黄	15.882	15.322	14.496	0.560	0.826

注: Δt_{12} 为添加剂在采用梯度程序 1 与 2 运行的保留时间的变化值; Δt_{23} 为添加剂在采用梯度程序 2 与 3 运行的保留时间的变化值.

2.4 验证实验

5 种添加剂在 2.3 中所述的 3 种梯度条件下进行分离以后,只有梯度程序 1 的分离效果较好,而梯度程序 2 中柠檬黄和糖精钠的分离效果不好,柠檬黄还没有洗脱完毕,糖精钠便被洗脱下来,这就导致柠檬黄成为糖精钠的前肩峰,梯度程序 3 中,苯甲酸和糖精钠分离也不好,这两个峰没有彻底分开.

为了使梯度洗脱程序 2、3 中 5 种组分都得到较好的分离,按照 2.3 中总结的规律调整流动相的梯度.梯度程序 2 中,柠檬黄在糖精钠的前肩上,而增加甲醇初始体积分数时,柠檬黄保留时间提前的变化值比糖精钠大,这就会使柠檬黄与糖精钠分离的更好一些,因此本实验分别采用甲醇初始体积分数 15.5%、

15.8%、16.0% 这 3 种改进的梯度对 5 种组分进行分离,结果甲醇初始体积分数为 15.5% 时,柠檬黄还是在糖精钠的前肩上,16.0% 时柠檬黄虽然与糖精钠彻底分开,但又提前到了苯甲酸的后肩上,只有 15.8% 时分离效果相对较好,如图 4 所示.梯度程序 3 中,苯甲酸和糖精钠没有彻底分开,如果增加流动相中甲醇的初始体积分数,苯甲酸保留时间提前的变化值比糖精钠小,这样分离会更不彻底,所以只有降低梯度程序 3 中甲醇的初始体积分数,才会使其分离更彻底,因此本实验分别采用甲醇初始体积分数 19.5%、19.0%、18.6% 这 3 种改进的梯度对 5 种组分进行分离,结果甲醇初始体积分数为 19.5% 和 19.0% 时,苯甲酸和糖精钠的分离还是不彻底,当甲醇初始体积分数为 18.6% 时,苯甲酸和糖精钠才彻底分开,其分离效果如图 5 所示.以上验证数据初步表明 2.3 中的推断比较合理.

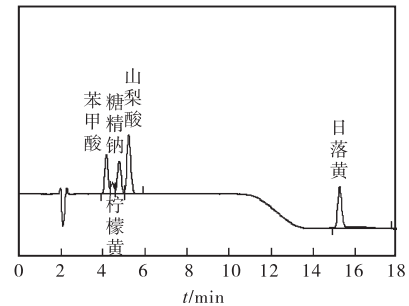


图 4 梯度程序 2 中甲醇初始体积分数提高到 15.8% 进样的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the sample with starting concentration of methanol increased to 15.8%

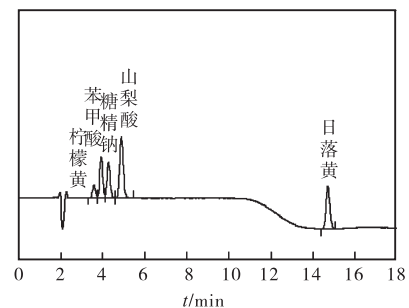


图 5 梯度程序 3 中甲醇初始体积分数降低到 18.6% 进样的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of the sample with starting concentration of methanol decreased to 18.6%

3 结论

在不同浓度梯度条件下, HPLC 法测定 5 种食品添加剂苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄时,

其出峰顺序会发生变化,而且其变化遵循一定的规律.不同浓度梯度的流动相对前4种添加剂保留时间的影响规律为流动相中甲醇体积分数的提高会同时缩短前4种添加剂的保留时间,并且对苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄的保留时间的缩短程度依次增大,致使其出峰顺序发生改变.该规律对色谱分析中多组分同时测定时最佳分离条件的优化具有一定的参考价值,并对其组分定性具有借鉴意义,避免色谱工作者在做同系列组分的分析时盲目参考文献的出峰顺序或者借鉴前人的成果对组分进行定性,同时也警示色谱工作者在分析过程中,改变流动相比比例时分离情况反而不好的情况下,不一定非要返回原始比例方向摸索条件,继续跨过一个台阶梯度,也许分离情况反而会更好.

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品添加剂

使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

- [2] 吴光斌,吕禹泽,陈发河. 反相高效液相色谱法同时测定九种食品添加剂[J]. 食品科学,2006,27(11):457-461.
- [3] Lu Peizhang (Lu Peichang), Zhang Yukui, Liang Xinmiao. High performance liquid chromatography and its expert system[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1994: 5.
- [4] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L. Practical HPLC method development[M]. New York: John Wiley & Sons Inc., 1997: 35-289.
- [5] 单亦初,赵瑞环,张维冰,等. 反相高效液相色谱中流动相线性梯度洗脱条件下溶质保留时间预测的新方法[J]. 色谱,2001,19(3):256-259.
- [6] 王利娟,杨更亮,刘二东,等. 蛋白质在反相高效液相色谱梯度洗脱条件下保留时间的预测[J]. 离子交换与吸附,2006,22(2):120-125.

责任编辑:郎婧

(上接第17页)

- [3] Moraes C M, Abrami P, de Araujo D R. Characterization of lidocaine: hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex [J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2007, 57(3): 313-316.
- [4] Hesselink P G M, Vliet S V, Vries H O, et al. Optimization of steroid side chain cleavage by cyclodextrins[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1989, 17(11): 398-404.
- [5] Singer Y, Shity H, Bar R. Microbial transformation in a cyclodextrin medium. Part 2. Reduction of Andros

tenedione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 35(6): 731-737.

- [6] 毛勇,邓媛,李皎,等. 高效液相法同时测定混合环糊精中的 α 、 β 、 γ -环糊精的含量[J]. 食品与发酵工业,2009(10):138-140.
- [7] 于嘉鑫,刘子列,任勇,等. 高效液相色谱法测定磺丁基- β -环糊精中的 β -环糊精残留含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(4):749-751.

责任编辑:郎婧