

第十二章 食品添加剂的测定

第一节 概述

一、食品添加剂的种类

食品添加剂是指为改善食品品质和色、香、味以及防腐和加工工艺的需要加入食品中的化学合成或者天然物质。食品添加剂的种类很多,按来源分为天然食品添加剂和人工合成食品添加剂两大类。按食品添加剂的功能、用途划分,各国分类不尽相同,我国《食品添加剂使用卫生标准》将其划分为 22 类:(1) 酸度调节剂;(2) 抗结剂;(3) 消泡剂;(4) 抗氧化剂;(5) 漂白剂;(6) 膨松剂;(7) 胶姆糖基础剂;(8) 着色剂;(9) 护色剂;(10) 乳化剂;(11) 酶制剂;(12) 增味剂;(13) 面粉处理剂;(14) 被膜剂;(15) 水分保持剂;(16) 营养强化剂;(17) 防腐剂;(18) 稳定剂和凝固剂;(19) 甜味剂;(20) 增稠剂;(21) 食品香料;(22) 其他。

二、食品添加剂的安全使用和管理

食品添加剂在用于食品之前,尽管已在实验室中进行了多次安全性测试,但毕竟不是食品的基本成分,因此,食品添加剂存在安全性问题。但食品添加剂在安全性监督管理下,在允许范围内按照要求使用一般来说是安全的。WHO / FAO 规定了《使用食品添加剂的一般原则》,就食品添加剂的安全性和维护消费者利益方面制订了一系列严格的管理办法,并对食品添加剂安全性进行审查,订出它们的 ADI 值。食品添加剂法典委员会(CCFA),每年定期召开会议,对食品添加剂制定统一的规格和标准,确定统一的试验方法和评价方法等,对 JECFA(食品添加剂联合专家委员会)所通过的各种食品添加剂的标准、安全性评价方法等进行审议和认可,在提交食品法典委员会(CAC)复审后公布。1995 年我国颁布了《食品卫生法》,1997 年卫生部又颁发了《中华人民共和国国家标准食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-1996),其中对食品添加剂的安全管理做了许多严格的规定,以确保食品添加剂食用安全。

三、食品添加剂检测方法

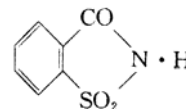
食品添加剂有无机物质和有机物质,其测定方法和其它分析一样,首先应设法将被分析物质从复杂的混合物中分离出来,达到分离与富集待测物质的目的,以利于下一步的测定。常用的分离手段有蒸馏法、溶剂萃取法、沉淀分离法、色层分离法、掩蔽法等。样品分离后再针对待测物质的物理、化学性质选择适当的分析方法。常用的分析方法有容量法、分光光度法、薄层层析法和高效液相色谱法等。

第二节 几种甜味剂的检测

甜味剂是指赋予食品甜味的食品添加剂,按其来源可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂;以其营养价值可分为营养型和非营养型甜味剂。我国经全国食品添加剂标准化技术委员会审定,经卫生部批准实施的 GB 2760-1996 国家卫生使用标准规定的甜味剂有糖精、甜蜜素、甜味素(阿斯巴甜)、甜菊苷、甘草、安赛蜜(AK 糖)、阿力甜、异麦芽酮糖、麦芽糖醇、山梨醇、木糖醇、乳糖醇及三氯蔗糖等共 15 种。下面介绍几种甜味剂的测定方法。

一、糖精钠的检测

糖精是应用较为广泛的人工合成甜味剂。其学名为邻-磺酰苯甲酰亚胺,分子式为 $C_7H_5O_3NS$,其结构式如右图。糖精为无色到白色结晶或白色晶状粉末,在水中溶解度很低,易溶于乙醇、乙醚、氯仿、碳酸钠水溶液及稀氨水中。对热不稳定,长时间加热失去甜味。因糖精难溶于水,故食品生产中常用其钠盐,即糖精钠。糖精钠为无色结晶,无臭或微有香气,浓度低时呈甜味,浓度高时有苦味。易溶于水,不溶于乙醚,氯仿等有机溶剂。其热稳定性与糖精类似但较糖精要好,其甜度为蔗糖的 200~700 倍。



糖精钠被摄入人体后,不能被吸收利用,不分解,不供给热能,大部分从尿中排出而且不损害肾功能。其致癌作用一直有争议,尚未有确切结论,考虑到人体的安全性,1997 年 FAO / WHO 公布,将其 ADI 值定为 0~5mg/kg 体重。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定,糖精钠可用于饮料、酱菜类、复合调味料、蜜饯、配制酒、雪糕、冰淇淋、冰棍、糕点、饼干、面包等,以糖精计,最大使用量为 0.15g/kg。汽水只允许用 0.08g / kg; 浓缩果汁可按浓缩倍数的 80% 加入。瓜子, 1.2g/kg。话梅、陈皮,

5. 0g/kg。

糖精钠测定方法有多种，有高效液相色谱法、酚磺酞比色法、薄层色谱法、紫外分光光度法，此外还有纳氏比色法、离子选择性电极法等。

(一) 高效液相色谱法

1. 原理

样品加温除去二氧化碳和乙醇，调节 pH 至近中性，过滤后进高效液相色谱仪。经反相色谱分离后，以其标准溶液峰的保留时间为依据进行定性，以其峰面积求出样液中被测物质的含量。计算公式如下：

$$\text{糖精钠含量 (g/kg或g/L)} = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000}$$

式中： m_1 ——进样体积中糖精钠的质量，mg；

m_2 ——样品质量，g；

V_1 ——样品稀释总体积，mL；

V_2 ——进样体积，mL。

2. 色谱条件

检测器：紫外检测器，波长 230nm，灵敏度 0.2AUFS；
色谱柱：YWG-C₁₈ 4.6mm×250mm，10μm 不锈钢柱，或其他型号 C₁₈ 柱；

流动相：甲醇+0.02mol/L 乙酸铵溶液 (5+95)；

流速：1.0mL/min；

进样量：10μL。

4. 说明与讨论

(1) 本方法为国家标准分析方法 (GB/T5009.28-1996)，适用于各类食品中糖精钠含量的测定。取样量为 10mL，进样量为 10μL 时，最低检出限量为 1.5ng。另外，本方法可同时测定食品中糖精钠、苯甲酸、山梨酸的含量，其高效液相色谱图如图 12-1。

(2) 汽水和配制酒类要微热搅拌除去二氧化碳和乙醇，再用氨水 (1:1) 调 pH 值约为 7，加水定容，经 0.45μm 滤膜过滤；饮料、果汁类用氨水 (1:1) 调 pH 值约为 7，加水定容，离心沉淀，上清液经 0.45μm 滤膜过滤。

(二) 酚磺酞比色法

1. 原理

样品经除去蛋白质、果胶、二氧化碳、酒精等，在酸性条件下用乙醚提取，分离糖精钠，然后与酚和硫酸在 175℃ 作用生成酚磺酞，再与氢氧化钠反应产生红色化合物。其反应式为：

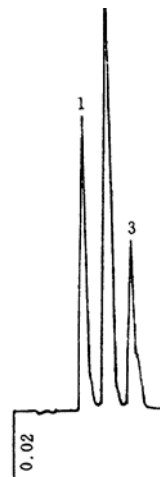
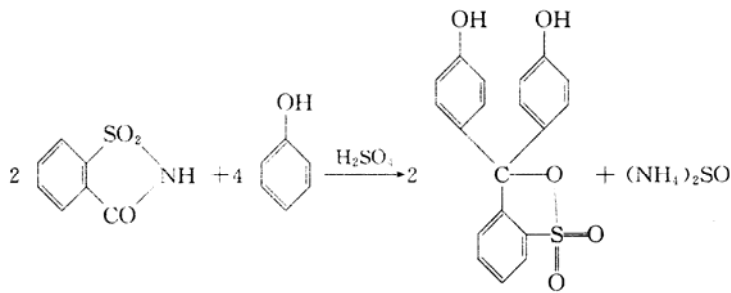
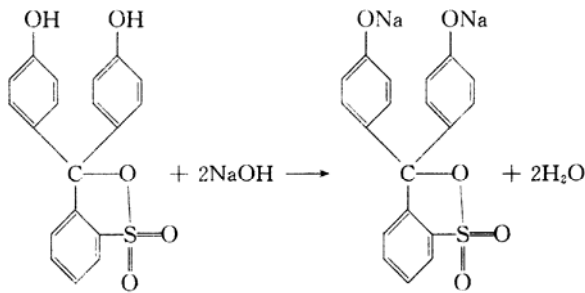


图 12-1 苯甲酸、山梨酸、糖精钠高效液相色谱图
1-苯甲酸 2-山梨酸 3-糖精钠



酚磺酞



酚磺酞二钠 (红色)

测定吸光度值，与标准系列比较定量，按下面公式计算样品中糖精钠含量。

$$\text{糖精钠 (g/kg 或 g/L)} = \frac{c_1 - c_0}{m \times V_2 / V_1}$$

式中： c_1 ——测定用试样液中糖精钠量，mg；

c_0 ——空白液中糖精钠量，mg；

m ——样品质量，g 或 ml；

V_1 ——样品乙醚提取液总体积，ml；

V_2 ——比色用样品乙醚提取液体积，ml。

2.说明与讨论

(1) 糖精易溶于乙醚，而糖精钠难溶于乙醚，为了便于乙醚提取，使糖精钠转化成糖精，样品溶液需进行酸化处理。

(2) 为防止用乙醚萃取时发生乳化，可在样品溶液中加入 CuSO_4 和 NaOH ，沉淀蛋白质；对于富含脂肪的样品，可先在碱性条件用乙醚萃取脂肪，然后酸化，再用乙醚提取糖精。

(3) 因酒精既可溶于乙醚，又可溶于水，当用乙醚萃取时易乳化，分层不清，故含酒精的饮料应先加热挥去酒精；对含 CO_2 的饮料，应先除去 CO_2 ，否则将影响样液体积。

(4) 本法受温度影响较大，要使糖精充分与酚在硫酸作用下生成酚磺酞，应严格控制在 $175 \pm 2^\circ\text{C}$ 温度下反应 2h。

(三)薄层色谱法

1.原理

在酸性条件下，食品中的糖精钠用乙醚提取，挥去乙醚后，用乙醇溶解残留物。点样于硅胶 GF254 薄层板或聚酰胺薄层板上，展开后喷显色剂显色，再与标准比较。进行定性和半定量测定。在实验条件下糖精的 R_f 值为 0.3。计算公式如下：

$$x = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中 x ——样品中糖精钠的含量，g/kg 或 g/L；

m_1 ——测定用样液中糖精钠的质量，mg；

m_2 ——样品质量 (体积)，g (mL)；

V_1 —样品提取液残留物加入乙醇的体积, mL;

V_2 —点样液体积, mL。

2. 说明与讨论

(1) 本方法为国家标准分析方法, 适用于各类食品中糖精钠含量的测定。取样量为 10mL, 进样量为 10 μ L 时, 最低检出限量为 1.5ng; 另外可同时测定食品中糖精钠、苯甲酸、山梨酸、环己基氨基磺酸的含量, 用聚酰胺薄层板, 用展开剂异丙醇-浓氨水-无水乙醇 (20:1:1) 展开时, 糖精钠的比移值 0.31, 环己基氨基磺酸为 0.47, 苯甲酸为 0.61, 山梨酸为 0.73。

(2) 聚酰胺薄层板的制备: 称取 1.6 g 聚酰胺粉, 加 0.4g 可溶性淀粉, 加约 14mL 水研磨均匀合适为止, 立即倒入涂布器内制成面积为 5cm \times 20cm, 厚度为 0.3mm 的薄层板。室温干燥后, 于 80 $^{\circ}$ C 干燥 1h, 取出, 置于干燥器中保存、备用。聚酰胺薄层板的烘干温度不能高于 80 $^{\circ}$ C, 否则聚酰胺变色。

(3) 硅胶 GF254 薄层板的制备: 称取 1.4 g 硅胶 GF254, 加 4.5mL 0.5% CMC-Na 溶液与小研钵中研匀, 立即倒入涂布器内制成面积为 5cm \times 20cm, 厚度为 0.3mm 的薄层板, 稍干后, 于 110 $^{\circ}$ C 活化 1h, 取出, 置于干燥器中保存、备用。

(4) 在薄层板下端 2cm 的基线上用微量注射器点样, 点样量应估计其中糖精的含量为 0.1~0.5mg。硅胶 GF254 薄层板用展开剂苯-乙酸乙酯-乙酸 (12:7:3) 进行展开; 聚酰胺薄层板用展开剂异丙醇-浓氨水-无水乙醇 (20:1:1) 展开。展开完毕, 取出在空气中挥干, 喷显色剂, 显色剂为 0.04% 溴甲酚紫的 50% 乙醇溶液 (pH=8), 其斑点呈黄色, 背景呈蓝色。

(5) 其它说明与讨论见酚磺酞比色法。

(四) 其他方法

1. 离子选择性电极法

糖精选择电极是以季铵盐所制 PVC 薄膜为感应膜的电极, 它和作为参比电极的饱和甘汞电极配合使用, 可以测定食品中糖精钠含量。当测定温度、溶液总离子强度和溶液接界电位等条件一致时, 测得电位遵守能斯特方程式, 电位差随溶液中糖精离子的活度改变而变化, 被测溶液中糖精钠含量在 0.02~1mg/mL 范围内时, 电位值与糖精离子浓度的负对数成直接关系。

该法为卫生部推荐的参考方法。对苯甲酸的浓度为 200~1000mg/kg 时无干扰; 苯甲酸的浓度为 50~500mg/kg, 糖精钠的含量在 100~150mg/kg 范围内, 约有 3%~10% 的正误差, 水杨酸和羟基苯甲酸酯堆苯法的测定有严重影响。

2. 紫外分光光度法

样品经处理后, 在酸性条件下用乙醚提取食品中的糖精钠, 然后挥去乙醚, 用乙醇溶解残留物。点样于硅胶 GF254 薄层板或聚酰胺薄层板上, 展开完毕后, 硅胶 GF254 板可直接在波长 254nm 紫外灯下观察糖精钠的荧光条状斑。如用聚酰胺板, 挥干后喷显色剂, 斑点成黄色, 背景为蓝色。把斑点连同硅胶 GF254 或聚酰胺刮入小烧杯中。同时刮一块与样品条状大小相同的空白薄层板, 置于另一烧杯中做对照, 经薄层分离后, 溶于碳酸氢钠溶液中, 经离心分离后, 取上清液于波长 270nm 下测定吸光度, 与标准比较定量。此法操作简单, 精度高, 可测定微量的糖精。

3. 纳氏比色法

利用糖精的溶解特性, 先在碱性条件下用水溶解、浸取, 再在酸性条件下用乙醚萃取, 然后挥干乙醚, 残渣在强酸性条件下加热水解, 使糖精成为铵盐, 与纳氏试剂作用生成一种黄色化合物, 该化合物颜色深浅与糖精的含量成正比, 可比色定量。此法操作简单, 精度高, 但干扰物质多。

4. 荧光法

从样品中提取出糖精, 在硫酸酸性条件下用高锰酸钾将干扰成分除去, 于激发波长 277nm, 发射波长 410 nm 测定荧光强度, 与标准比较定量。本法检测下限低, 可测定微量的糖精, 但干扰因素多, 有待进一步完善。

5 气相色谱法

糖精难挥发, 必须首先和甲基化试剂(碘化甲烷、重氮甲烷等)进行反应生成甲基糖精, 然后用气相色谱法测定。此法检测下限为 10 mg/kg, 回收率和重现性都很好。

二、其他几种重要甜味剂的检测

(一) 环己氨基磺酸钠的检测

环己氨基磺酸钠商品名为甜蜜素，是人工合成的非营养型甜味素，为白色针状、片状结晶或结晶性粉末，无臭，味甜，稀释溶液的甜度约为蔗糖的 30 倍，对酸、碱、光、热稳定。摄食环己氨基磺酸钠后约 40% 从尿中排出，60% 从粪便中排出。对其致癌作用引起了世界各国的争议，至今都没有达成一致看法。1994 年 FAO/WHO 对 ADI 值规定为 0~11mg/kg 体重。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定环己氨基磺酸钠可用于酱菜、调味酱油、配制酒、糕点、饼干、面包、雪糕、冰淇淋、冰棍、饮料等，最大使用量为 0.65g/kg；蜜饯，1.0g/kg；陈皮、话梅、话李、杨梅干，8.0g/kg。

1. 原理

在酸性介质中环己氨基磺酸钠与亚硝酸反应，生成环己醇亚硝酸酯，利用气相色谱法进行定性定量。按下式计算：

$$\text{环己氨基磺酸钠含量 (g/kg)} = \frac{A \times 10 \times 1000}{m \times V \times 1000} = \frac{10A}{mV}$$

式中： m ——样品质量，g；
 V ——进样体积， μL ；
 A ——测定用试样中环己氨基磺酸钠的含量， μg ；
 10 ——正己烷加入量，mL。

2. 色谱条件

色谱柱：不锈钢柱，长 2m，内径 3mm；
固定相：Chromsorb WAW DMCS 80-100 目，涂以 10% SE-30；
温度：柱温 80℃；气化室 150℃；检测器 150℃；
流速：氮气 40 mL/min；氢气 30 mL/min；空气 300 mL/min。

3. 说明与讨论

(1) 含二氧化碳的样品需经加热除去，含酒精的样品加氢氧化钠溶液调至碱性，于沸水浴中加热以除去酒精。

(2) 环己氨基磺酸钠与亚硝酸钠的反应必须在冰浴中进行。

(二) 乙酰磺胺酸钾的检测

乙酰磺胺酸钾又名安赛蜜，对光、热（225℃）均稳定，甜感持续时间长，味感优于糖精钠。经动物毒性试验证明，本品是安全的。FAO / WHO 于 1997 年规定其 ADI 值为 0~15mg/kg 体重。乙酰磺胺酸钾主要用于：果脯、奶类饮品、水果类甜点、果酱、口香糖、浓缩果蔬饮料、酒类、蛋类甜食、减肥营养配方、啤酒和麦乳精饮料等。

1. 原理

样品中乙酰磺胺酸钾经高效液相反相柱 C_{18} 分离后，以保留时间定性、峰高或峰面积定量。按下式计算：

$$\text{乙酰磺胺酸钾含量 (g/kg或g/L)} = \frac{c \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中： c ——由标准曲线上查得进样液中乙酰磺胺酸钾的含量，mg/mL；
 m ——样品质量，g；
 V_1 ——样品稀释液总体积，mL；
 V_2 ——HPLC 测定时进样的体积，mL。

2. 色谱条件

检测器：紫外检测器，波长为 214nm；
分析柱：大连化物所生产的 4.6mm×150mm，粒度 5 μm ，Spherisorb C_{18} 柱；
流动相：0.02mol/L 硫酸铵（740~800mL）+甲醇（170~150mL）+乙腈（90~50mL）+10% H_2SO_4 （1mL）；
流速：0.7mL/min。

3.说明与讨论

(1)本方法可同时测定乙酰磺胺酸钾、糖精钠、咖啡因、天门冬酰苯丙氨酸甲酯,检出限为 0.004 mg/mL。

(2) 样品须温热, 搅拌除去二氧化碳或超声脱气。通过微孔滤膜过滤。

(三) 山梨糖醇的检测

山梨糖醇的甜度与蔗糖相近。易溶于水, 稳定性高, 不易与氨基酸、蛋白质等发生褐变反应。我国和 FAO/WHO 对 ADI 值均未作特殊规定。我国允许在冷饮类、糕点、浓果汁、饼干、面包、酱菜类和糖果中按正常生产需要使用。

1. 原理

用水或乙醇溶液从样品中提取山梨糖醇, 用减压浓缩方法将水分全部除去后, 制备乙酰化山梨糖醇, 用乙醚萃取乙酰化山梨糖醇, 浓缩至干, 用丙酮定容后进行气相色谱分析。以保留时间定性、峰高或峰面积定量。

2. 乙酰化山梨糖醇衍生物的制备

准确吸取样品溶液和山梨糖醇标准溶液各 10mL, 放入 50mL 浓缩器中, 准确加入 5mL 4mg/mL 木糖醇作为内标液, 在 60℃水浴上减压浓缩, 除去水分, 然后加入 14mL 无水吡啶和 7mL 无水乙醇, 在 60~70℃水浴上激烈振摇, 使残渣溶解, 放置过夜。加水 20mL 后, 用 10mL 水定量转移到分液漏斗中, 用 50mL、30mL、30mL 乙醚分 3 次萃取, 合并全部乙醚层, 用 20mL 0.1mol/LH₂SO₄ 洗 2 次, 再用 20mL 水洗 1 次, 乙醚层加入无水硫酸钠, 放置 1h。将此液过滤, 残渣用 50mL 乙醚分数次洗涤, 将滤液和洗液合并于圆底烧瓶中, 减压浓缩除去乙醚, 向残渣中加丙酮使其溶解, 准确加至 10mL。

3. 色谱条件

检测器: 氢焰电离检测器;

色谱柱: 玻璃柱, 内径为 3mm, 长度为 2m; 内装涂以 XE-60 (3%) 的 60~80 目硅烷化处理过的硅藻土担体;

温度: 柱温从 150℃到 220℃以 6℃/min 速度升温; 检测器为 250℃;

载气: 氮气, 40mL/min。

第三节 几种常用的防腐剂的检测

防腐剂是能防止食品腐败、变质, 抑制食品中微生物繁殖, 延长食品保存期的一类物质总称。防腐剂使用简单。可使食品在常温下及简易保藏条件下短期贮藏, 在现阶段尚有一定作用, 随着食品保藏新工艺、新设备的不断完善, 防腐剂将逐步减少使用, 甚至不用。目前, 我国许可使用的品种有: 苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸、山梨酸钾、丙酸钠、丙酸钙、对羟基苯甲酸乙酯和丙酯、脱氢醋酸等。

一、苯甲酸钠和山梨酸钾的检测

苯甲酸又名安息香酸。为白色有丝光的鳞片或针状结晶, 熔点 122℃, 沸点 249.2℃。100℃开始升华。在酸性条件下可随水蒸汽蒸馏。微溶于水。易溶于氯仿、丙酮、乙醇、乙醚等有机溶剂。化学性质较稳定。苯甲酸钠为白色颗粒或结晶性粉末, 无臭或微有安息香气味, 在空气中稳定, 易溶于水和乙醇, 难溶于有机溶剂, 其水溶液呈弱碱性 (pH 值约为 8), 在酸性条件下 (pH 2.5~4) 能转化为苯甲酸。

在酸性条件下苯甲酸及苯甲酸钠防腐效果较好, 适宜用于偏酸性的食品 (pH 4.5~5)。苯甲酸进入人体后, 大部分与甘氨酸结合形成无害的马尿酸。其余部分与葡萄糖醛酸结合生成苯甲酸葡萄糖醛酸甙从尿中排出, 不在人体内积累。苯甲酸的毒性较小, 1996 年 FAO/WHO 限定苯甲酸及盐的 ADI 值以苯甲酸计为 0~5mg/kg 体重。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定碳酸饮料的最大使用量为 0.2g/kg; 低盐酱菜、酱类、蜜饯、食醋、果酱 (不包括罐头)、果汁饮料、塑料桶装浓缩果蔬汁最大限量以苯甲酸计为 2g/kg。

山梨酸又名花楸酸, 为无色、无臭的针状结晶, 熔点 134℃, 沸点 228℃。山梨酸难溶于水, 易溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂, 在酸性条件下可随水蒸汽蒸馏, 化学性质稳定。山梨酸钾易溶于水, 难溶于有机溶剂, 与酸作用生成山梨酸。山梨酸及其钾盐也是用于酸性食品的防腐剂, 适合于在 pH 5~6 以下使用。它是通过与霉菌、酵母菌酶系统中的巯基结合而达到抑菌作用。但对厌氧芽孢杆菌、乳酸菌无效。山梨酸是一种直链不饱和脂肪酸, 可参与体内正常代谢, 并被同化而产生 CO₂ 和水, 几乎对人体没有毒性,

是一种比苯甲酸更安全的防腐剂。FAO/WHO 联合食品添加剂专家委员会 1996 年提出的山梨酸和山梨酸钾的 ADI 值以山梨酸计为 0~25mg/kg 体重。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定，山梨酸和山梨酸钾可用于肉、鱼、禽类制品，最大限量为 0.075g/kg。水果、蔬菜保鲜及碳酸饮料为 0.2g/kg；胶原蛋白肠衣、低盐果酱、酱类、蜜饯、果汁饮料、果冻为 0.5g/kg；果酒为 0.6g/kg；塑料桶装浓缩果蔬汁、软糖、鱼干制品、即食豆制品、糕点、面包、即食海蛰、乳酸菌饮料等为 1.0g/kg。

(一) 气相色谱法

1. 原理

样品酸化后，用乙醚提取苯甲酸、山梨酸，用带氢火焰离子化检测器的气相色谱仪进行分离测定，与标准系列比较定量。测出苯甲酸、山梨酸量后，再分别乘以适当的相对分子质量比，求出苯甲酸钠，山梨酸钾量。按下式计算：

$$\text{苯甲酸含量 (g/kg或g/L)} = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{5}{25} \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中：x——样品中苯甲酸或山梨酸的含量，g/kg；
 m_1 ——测定用样品液中苯甲酸或山梨酸的质量， μg ；
 m_2 ——样品的质量，g；
 V_1 ——加入丙酮的体积，mL；
 V_2 ——测定时进样的体积，mL。

2. 色谱条件

检测器：氢火焰离子化检测器；

色谱柱：内径 3mm，长 2m 玻璃柱，内装涂以 5% (m/m) DEGS +1% (m/m) H_3PO_4 固定液的 60~80 目 Chromosorb WAW。

流速：载气为氮气，50mL/min

温度：进样口 230℃，检测器 230℃，柱温 170℃。

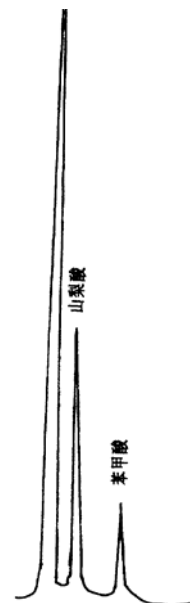


图 12-2 苯甲酸、山梨酸
气相色谱图

3 说明与讨论

(1) 本法为国家标准方法，可同时测定食品中苯甲酸和山梨酸的含量，山梨酸保留时间为 173 秒，苯甲酸保留时间为 368 秒。如图 12-2 所示。适用于酱油、果汁、果酱。最低检出限为 1 μg ，用于色谱分析的样品为 1g 时，最低检出浓度为 1mg/kg。

(2) 样品溶液的制备：称取一定量事先混合均匀的样品，置于 25mL 带塞量筒中，加 0.5mL 盐酸 (1:1) 酸化，用 15mL、10mL 乙醚提取 2 次，每次振摇 1min，将上层乙醚提取液吸入另一个 25mL 带塞量筒中。合并乙醚提取液。用 3mL 氯化钠酸性溶液 (40g/L) 洗涤 2 次，静止 15min，用滴管将乙醚层通过无水硫酸钠滤入 25mL 容量瓶中。加乙醚至刻度，混匀。准确吸取 5mL 乙醚提取液于 10mL 带塞刻度试管中，置 40℃ 水浴上挥干，加入 2mL 丙酮溶解残渣，备用。

(3) 通过无水硫酸钠层过滤后的乙醚提取液应达到去除水分的目的，否则乙醚提取液在 40℃ 挥去乙醚后如仍残留水分会影响测定结果。这时必须将残留水分挥干，但会吸出极少量白色氯化钠，当出现此情况时，应搅动残留的无机盐后加入石油醚-乙醚 (3:1) 振摇，取上清液进样，否则氯化钠覆盖苯甲酸和山梨酸，时

(二) 高效液相色谱法

1. 原理

样品加温除去二氧化碳和乙醇，调节 pH 至近中性，过滤后进高效液相色谱仪，经反相色谱分离后，根据保留时间和峰面积进行定性和定量。按下式计算：

$$\text{苯甲酸含量 (g/kg或g/L)} = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中:

m_1 ——进样体积中苯甲酸的质量, mg; m_2 ——样品质量, g;

V_1 ——样品稀释总体积, mL; V_2 ——进样体积, mL。

2. 色谱条件

检测器: 紫外检测器, 波长为 230nm, 灵敏度为 0. 2AUFS;

色谱柱: YWG-C₁₈ 4. 6×150mm5μm, 或其他型号 C₁₈ 柱;

流动相: 甲醇+乙醇铵溶液 (0. 02mol/L) (5+95);

流速: 1. 0mL/min; 进样量: 10μL。

4. 说明与讨论

(1) 本法为国家标准分析方法, 可同时测定食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的含量, 适用于酱油、果汁、果酱。山梨酸灵敏波长为 254nm, 在此波长测苯甲酸和糖精钠的灵敏度较低, 苯甲酸和糖精钠的灵敏波长为 254nm, 为照顾三种被测组分灵敏度, 方法采用 230nm。(2) 含二氧化碳的样品需经加热除去, 含酒精的样品加氢氧化钠溶液调至碱性, 于沸水浴中加热以除去酒精。

(3) 被测溶液 pH 对测定和色谱柱使用寿命均有影响, pH>8 或 pH <2 时, 影响被测组分的保留时间, 对仪器有腐蚀作用。苯甲酸和山梨酸的测定以中性为宜。

(4) 测定食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的含量, 也可以用 Micro PAK CN-10 4×300mm 柱, 流动相可用甲醇-水。

(5) 对共存物进行干扰试验表明: 蔗糖在 230nm 处无吸收, 柠檬酸吸收很少, 在此色谱条件下, 咖啡因和人工色素不被洗脱, 因此这些共存物质不影响苯甲酸、山梨酸和糖精钠的定性、定量分析。

(三) 薄层色谱法

1 原理

样品酸化后, 用乙醚提取苯甲酸、山梨酸。将样品提取液浓缩, 点于聚酰胺薄层板上, 展开。显色后, 根据薄层板上苯甲酸, 山梨酸的比移值, 与标准比较定性, 并可进行概略定量。计算公式如下:

$$x = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{10}{25} \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000}$$

式中 x —样品中苯甲酸或山梨酸的含量,g/kg;

m_1 —测定用样品液中苯甲酸或山梨酸的质量, mg; m_2 —样品质量, g;

V_1 —加入乙醇的体积, mL;

V_2 —测定时点样的体积, mL;

10—测定时吸取液乙醚提取液的体积, mL;

25—样品乙醚提取总体积,mL。

2. 说明与讨论

(1) 本法为国家标准分析方法, 可同时测定食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的含量, 适用于酱油、果汁、果酱。本方法灵敏度高, 但操作繁琐, 重现性差。

(2) 样品中如含有 CO₂、酒精时应先加热除去, 富含脂肪和蛋白质的样品应除去脂肪和蛋白质, 以防用乙醚提取时发生乳化, 除去的方法同食品中糖精钠的测定。

(3) 样品处理时, 酸化的目的是使苯甲酸钠、山梨酸钠转变为苯甲酸或山梨酸, 便于乙醚提取。

(4) 其它说明与讨论见薄层色谱法测定食品中糖精钠的含量。

(四) 紫外分光光度法测定苯甲酸

1. 原理

样品中苯甲酸在酸性溶液中可以随水蒸气蒸馏出来, 与样品中非挥发性成分分离, 然后用重铬酸钾溶液和硫酸溶液进行激烈氧化, 使除苯甲酸以外的其它有机物氧化分解, 将此氧化后的溶液再次蒸馏, 用碱液吸收苯甲酸, 第二次所得的蒸馏液中基本不含除苯甲酸以外的其它杂质。根据苯甲酸钠在 225nm 有最大吸收, 故测定吸光度可计算出苯甲酸含量。计算公式如下:

$$\text{苯甲酸 (g/kg)} = \frac{(c-c_0) \times 1000}{m \times \frac{25}{50} \times \frac{V}{50} \times 1000}$$

式中： c ——测定用样品溶液中苯甲酸含量，mg；
 c_0 ——测定用空白溶液中苯甲酸含量，mg；
 V ——测定用第二次蒸馏液体积，ml；
 m ——样品质量，g。

2.说明与讨论

(1) 样品处理方法为：称取均匀的样品 10.0g，置于 250mL 蒸馏瓶中，加磷酸 1mL，无水硫酸钠 20g，水 70mL，玻璃珠 3 粒进行蒸馏。用预先加有 5mL 0.1mol/L 氢氧化钠的 50mL 容量瓶接收馏出液，当蒸馏液收集到 45mL 时，停止蒸馏，用少量水洗涤冷凝器，最后用水稀释到刻度。吸取蒸馏液 25mL，置于另一个 250mL 蒸馏瓶中，加入 1/30mol/L 重铬酸钾溶液 25mL，2mol/L 硫酸溶液 6.5mL，连接冷凝装置，水浴上加热 10 分钟，冷却，取下蒸馏瓶，加入磷酸 1mL，无水硫酸钠 20g，水 40mL，玻璃珠 3 粒，按上述方法进行第二次蒸馏，收集馏出液，最后用水稀释到刻度。

(2) 根据样品中苯甲酸含量，取第二次蒸馏液 5~20mL，用 0.01mol/L 氢氧化钠定容，以 0.01mol/L 氢氧化钠作为对照液，于 225nm 处测定吸收度。

(3) 用 5mL 1mol/L 氢氧化钠代替 1mL 磷酸进行第一次蒸馏，按上述样品处理方法作空白试验，测定空白溶液的吸光度。

二、其他防腐剂的检测

(一) 食品中对羟基苯甲酸乙酯、丙酯的检测

对羟基苯甲酸乙酯又名尼泊金乙酯及尼泊金丙酯。对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯均为苯甲酸的衍生物，分别由对羟基苯甲酸与乙醇和丙醇以硫酸为触媒酯化而成。都是结晶性粉末，无臭或有轻微的特殊香气，味微苦，灼麻。在水中难溶，但易溶于丙酮、乙醇。因其是酯类，不易受 pH 的影响。在 pH4~8 内防腐效果很好。

摄食后在胃肠中能迅速完全吸收，并水解成对羟基苯甲酸而从尿中排出，不在体内蓄积。其毒性低于苯甲酸，而高于山梨酸。FAO / WHO 联合食品添加剂专家委员会于 1994 年规定对羟基苯甲酸乙酯与丙酯的 ADI 值均为 0~10mg/kg 体重。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定对羟基苯甲酸乙酯与丙酯可使用于果蔬保鲜，最大使用量（以对羟基苯甲酸计）为 0.012g/kg；食醋 0.10g/kg；碳酸饮料、蛋黄馅 0.20g/kg；果汁饮料、果酱（不包括罐头）、酱油等为 0.25g/kg；糕点馅为 0.5g/kg。

1. 原理

样品中的对羟基苯甲酸酯类，用乙腈提取后，经过滤后进液相色谱仪进行测定，与标准比较定性、定量。对羟基苯甲酸甲酯、丙酯保留时间为 4.2min、7.6min。计算公式如下：

$$\text{对羟基苯甲酸酯含量 (g/kg)} = \frac{c \times 25}{m \times 1000} \times \frac{1000}{1000}$$

式中： c ——样品溶液的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；
 m ——样品质量，g；
 25——样品溶液的体积，mL。

2 样品溶液的制备

称取约 20g 的样品，打碎，准确称取 2g 样品于 15mL 具塞离心管中，加入 5mL 乙腈，塞上塞子，振荡 30s 后，于 500r/min 离心 5min，将上清液转至 25mL 容量瓶中，重复操作 3 次，用乙腈稀释至刻度。用 1.0 μm 滤膜过滤，供色谱测定。

3. 色谱条件

检测器：紫外检测器，波长为 254nm；灵敏度为 0.16AUFS；

色谱柱：U-Bondapak C₁₈ 30cm×4.6mm（内径）；

流动相：乙腈+水（45+55）；

流速：1. 5m/min。

（二）食品中脱氢醋酸的检测

脱氢醋酸及其钠盐属于广谱防腐剂，特别对霉菌和酵母的抑制能力强，为苯甲酸钠的 2~10 倍。该类防腐剂能迅速而完全地被人体组织所吸收，进入人体后即分散于血浆和许多器官中，可抑制体内多种氧化酶的活性。日本 1973 年曾报道，该类防腐剂有导致肾结石等问题，因此其安全性受到怀疑。目前日本已经限制使用该类防腐剂。欧共体也禁止使用。我国年生产能力约 200 吨，主要用于饲料。但有时也用于袋装酱菜防腐，且防腐作用很强，用 0. 02% 浓度约 60 天无霉变。脱氢乙酸的 ADI 值未作规定。

1. 原理

样品中脱氢乙酸加热溶解后，离心分离，经过滤后直接进液相色谱仪中分离测定，与标准品比较定量。

2. 样品溶液的制备

称取人造奶油 1g，放入带塞刻度离心管中，加水 40mL，加温使试样溶解，强烈振摇，加水 50mL，混匀，在离心机上约 3000r/min，离心 5min，取一部分水层用滤纸过滤，取滤液 40mL，用滤膜（0. 45 μ m）过滤，供色谱测定用。

3. 色谱条件

检测器：紫外检测器，波长为 225nm，0. 02AUFS；

色谱柱：4. 8mm \times 50mm，粒径 5 μ m，Unisil Q C₁₈ 柱；

流动相：0. 03mol/L 乙酸钠乙酸缓冲液+甲醇溶液（7+3）；

流速：0. 8mL/min。

本方法脱氢乙酸的检出限为 1.0mg/kg，平均回收率为 97.4%，相对标准差为 1.66%。

第四节 发色剂的检测

发色剂又名护色剂或呈色剂。是一些能够使肉与肉制品呈现良好色泽的物质。最常用的是硝酸盐和亚硝酸盐。亚硝酸盐和硝酸盐添加在制品中后转化为亚硝酸，亚硝酸易分解出亚硝基(NO)，生成的亚硝基会很快与肌红蛋白反应生成鲜艳的、亮红色的亚硝基肌红蛋白(MbNO)，亚硝基肌红蛋白遇热后，放出巯基(-SH)，变成了具有鲜红色的亚硝基血色原，从而赋予食品鲜艳的红色。同时，亚硝酸盐对抑制微生物的增殖有一定作用。与食盐并用可增加抑菌，对肉毒梭状芽孢杆菌有特殊抑制作用。亚硝酸盐和硝酸盐作为食品添加剂，过多地使用对人体产生毒害作用。亚硝酸盐与仲胺反应生成具有致癌作用的亚硝胺。过多地摄入亚硝酸盐会引起正常血红蛋白(二价铁)转变成正铁血红蛋白(三价铁)而失去携氧功能，导致组织缺氧。以亚硝酸钠计 ADI0~0. 2mg / kg，以硝酸钠计 ADI0~5mg/kg。我国卫生标准规定：亚硝酸钠、硝酸钠的使用限于肉类制品及肉类罐头中，最大使用量：硝酸钠为 0. 5g / kg，亚硝酸钠为 0. 15g / kg，残留量以亚硝酸钠计，肉类罐头不超过 0. 05g / kg，肉制品不超过 0. 03g / kg。

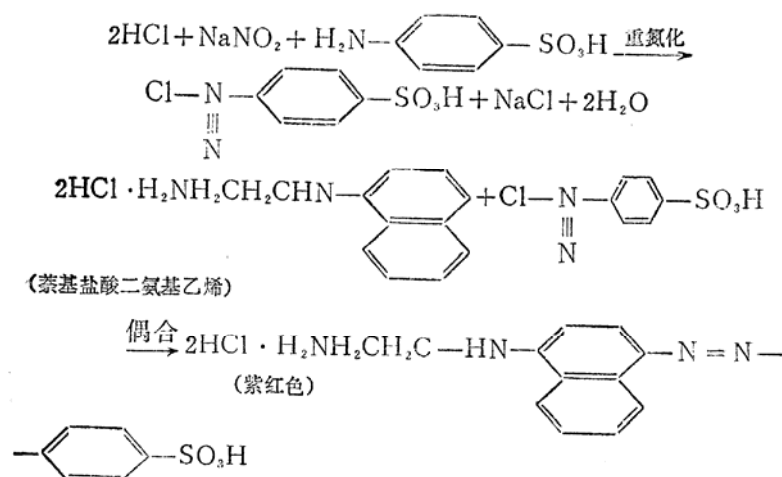
硝酸盐和亚硝酸盐的测定方法很多，公认的测定法为格里斯试剂比色法测亚硝酸盐含量，镉柱法测硝酸盐含量。其它还有气相色谱法、荧光法和离子选择性电极法等。

一、亚硝酸盐的检测

（一）格里斯试剂比色法

1. 原理

样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，再与 N-1-萘基乙二胺偶合形成紫红色染料，其最大吸收波长为 550nm。反应式如下：



测定吸光度与标准比较定量。计算公式如下：

$$\text{亚硝酸盐含量 (mg/kg)} = \frac{m_2 \times 1000}{m_1 \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000}$$

式中：
 m_1 ——样品质量，g；
 m_2 ——测定用样液中亚硝酸盐的含量， μg ；
 V_1 ——样品处理液总体积，mL；
 V_2 ——测定用样液体积，mL。

2. 说明于讨论

- (1) 本方法为国家标准方法 (GB/T5009.33-1996)，适用于食品中亚硝酸盐的测定，最低检出限为 1mg/kg。
- (2) 本实验用水应为重蒸馏水，以减少误差。
- (3) 样品处理方法为：称取约 10.00g (粮食取 5g) 经绞碎混匀样品，置于绞肉机中，加 70mL 水和 12mL 氢氧化钠溶液 (20g/L)，混匀，用氢氧化钠溶液 (20g/L) 将样品的 pH 值调至 8，定量转移至 200mL 容量瓶中加入 10mL 硫酸锌溶液，混匀，如不产生白色沉淀，再补加 2~5mL 氢氧化钠，混匀，置 60℃ 水浴中加热 10min，取出后冷至室温，加水至刻度，混匀，放置 0.5h，用滤纸过滤，弃去初滤液 20mL，收集滤液备用。同时作试剂空白试验。
- (4) 此法用于油脂多的样品时，可通过冷却使脂肪凝固后再把它滤去，或用撇去法分开萃取液上层脂肪；对有色的样品，如红烧的肉类，因其色素影响比色测定，应在硫酸锌沉淀蛋白质后，取其滤液 60 mL 于 100mL 容量瓶中，加氢氧化铝乳液定容，然后过滤取其无色透明滤液进行比色测定。若一次加氢氧化铝乳脱色效果不好，可进行二次，甚至三次加氢氧化铝乳脱色，直至萃取液为无色透明滤液再进行比色测定。
- (5) N-1-萘基乙二胺有致癌作用，使用时应注意安全。

(二) 示波极谱法

1. 原理

样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸性的条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，在弱碱性条件下再与 8-羟基喹啉偶合形成橙色染料，该偶氮染料在汞电极上还原产生电流，电流与亚硝酸盐的浓度呈线性关系，可与标准曲线比较定量。计算公式如下：

$$x = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{V_4}{V_3} \times 1000}$$

式中 x——样品中亚硝酸盐的含量，g / kg
 m_1 ——测定用样液中亚硝酸盐的质量， μg ；
 V_3 ——样品溶液的总容积，mL；

V_4 ——测定用样液的体积, mL;

m_2 ——样品质量, g

2. 说明与讨论

(1) 8-羟基喹啉溶液配制方法为: 称取 0.250 g 8-羟基喹啉, 加 4mL 0.1mol/L HCl 和少量水溶解, 移至 250mL 容量瓶稀释至刻度。

(2) 样品处理方法为: 称取 5.00 g 经绞碎混匀的样品(午餐肉, 火腿肠可称 10.00~

20.00g), 置于 50mL 烧杯中, 加 12.5mL 硼砂饱和液, 搅拌均匀, 以 70℃ 的水 300mL 将样品洗入 500mL 容量瓶中, 于沸水浴中加热 15min, 取出后冷却至室温, 然后一面转动, 一面加入 5mL 亚铁氰化钾溶液, 摇匀, 再加入 5mL 乙酸锌溶液, 以沉淀蛋白质。加水定溶, 摇匀, 放置 30min, 除去上层脂肪, 清液用滤纸过滤, 弃去初滤液 50mL, 滤液备用。

(3) 显色过程应严格控制条件。方法为: 吸取一定体积的亚硝酸钠标准溶液、样品处理液和试剂空白液, 分别置于 10mL 容量瓶(或比色管)中。于各容量瓶(或比色管)中分别加入 0.20mL 0.10mol/L EDTA 溶液, 1.50mL 8g/L 对氨基苯磺酸溶液, 混匀, 静止 3~4min 后各加入 1.00mL 1g/L 8-羟基喹啉溶液和 0.5mL 5% 氨水, 用水稀释至刻度, 混匀, 静止 10~15min。

(4) 在示波极谱仪上采用三电极体系进行测定, 以滴汞电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂电极为辅助电极。测定参考条件为: 原点电位调节在 -0.2V; 倍率为 0.1; 电极开关拨至三电极、导数档; 测量开关拨至阴极。然后将三电极插入电解池中, 每隔 7s 仪器自行扫描一次, 在荧光屏上记录 -0.5V 左右的极谱波高。本法为 GB/T5009.33 中的第二法, 相对偏差 ≤ 10%。

(三) 荧光法

亚硝酸盐与过量的对氨基苯磺酸起重氮化反应, 剩余的对氨基苯磺酸与荧光胺作用, 生成稳定的荧光团和无荧光的水解产物。在激发波长为 436nm, 荧光波长为 495nm 下, 其荧光强度与对氨基苯磺酸的量成正比。对氨基苯磺酸的原始量减去重氮化后过剩的对氨基苯磺酸的量, 即为与亚硝酸盐发生重氮化反应的对氨基苯磺酸的量, 进而可计算出亚硝酸盐的含量。

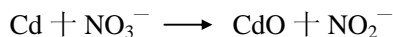
本法不受检液本身的颜色或混浊干扰, 也不受样品稀释度的影响。但操作较为复杂。

二、硝酸盐的检测

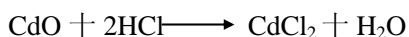
(一) 镉柱法

1. 原理: 样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后, 溶液通过镉柱, 或加入镉粉, 使硝酸根离子还原成亚硝酸根离子。反应如下:

在镉柱中, 镉定量地将 NO_3^- 还原成 NO_2^- :



镉柱经使用后用稀盐酸除去表面的氧化镉可重新使用:



在弱酸性条件下, 亚硝酸根与对氨基苯磺酸重氮化后, 再与 N-1 萘基乙二胺偶合形成红色染料, 测得亚硝酸盐总量, 由总量减去亚硝酸盐含量即得硝酸盐含量。计算公式如下:

$$\text{硝酸盐含量 (mg/kg)} = \frac{(m_1 - m_2) \times 1.232 \times 1000}{m \times (V_2/V_1) \times 1000}$$

式中: m ——样品的质量, g;

m_1 ——经镉粉还原后测得亚硝酸钠的质量, μg ;

m_2 ——直接测得亚硝酸盐的质量, μg ;

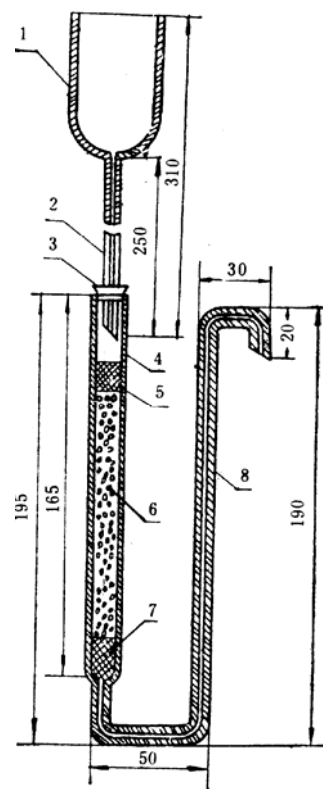


图 12-3 镉柱装置图

1. 分液漏斗 2. 橡皮塞 3. 玻璃棉

4. 海面状镉 5. 镉柱玻璃管 6. 出液毛细管

v_1 ——样品处理液总体积, mL;

v_2 ——测定用样液体积, mL。

1. 232——亚硝酸钠换算成硝酸钠的系数

2. 镉柱

(1) 海绵状镉粉的制备: 将 500mL 硫酸镉溶液中, 投入足够的锌棒经 3~4h, 当其中的镉全部被锌置换后, 用玻璃棒轻轻刮下, 取出残余锌棒, 使镉沉底, 倾去上层清液, 以水用倾斜法多次洗涤, 然后移入粉碎机中, 加 500mL 水, 捣碎约 2s, 用水将金属细粒洗至标准筛上, 取 20~40 目之间的部分, 置试剂瓶中, 用水封盖保存, 备用。

(2) 镉柱的制备: 如图 12-3。取 25mL 酸式滴定管数支, 向柱底压入 1cm 高玻璃棉作垫, 上置一小漏斗, 将新配制的镉粉带水加入柱内, 边装边轻轻敲击柱, 排除柱内空气, 加镉粉至 8~10cm 高, 上面用 1cm 高的玻璃棉覆盖, 上置一贮液漏斗。当镉柱填装好后, 先用 25mL/L HCl 洗涤, 再以水洗两次, 每次 25mL, 调节柱流速至 3~5mL/min。镉柱不用时用水封盖, 随时都要保持水平面在镉层之上, 不得使镉层夹有气泡。

(3) 镉柱还原效率的测定: 先加 25mL 氯化铵缓冲液于柱中, 至液面接近海绵镉时, 吸取 2.0mL 硝酸钠标准溶液 (10 μ g/mL), 经镉柱还原, 控制流速 3~5mL/min, 用 50mL 容量瓶接收。加入 5mL 氯化铵缓冲液, 液面接近海绵镉时, 加入 15mL 水洗柱, 还原液与洗液一并流入 50mL 容量瓶中。加 5mL 60% 乙酸, 10mL 显色剂, 加水稀释至刻度, 混匀暗处放置 25min。用 1cm 比色杯, 以标准零管调节零点, 于波长 550nm 处测吸光度, 根据亚硝酸盐标准曲线计算还原效率 (如镉柱还原率小于 95%, 应经盐酸浸泡活化处理)。

$$\text{还原效率 (\%)} = \frac{m \times 1.232}{20} \times 100$$

式中: m ——20 μ g 硝酸盐还原后测得亚硝酸盐的质量, μ g;

20——硝酸盐的质量, μ g;

1. 232——亚硝酸盐换算成硝酸盐的系数。

3. 说明与讨论

(1) 本方法为国家标准方法 (GB/T5009.33-1996), 适用于食品中硝酸盐的测定, 最低检出限为 1.4mg/kg。

(2) 在制取海绵状镉和装填镉柱时最好在水中, 勿使镉粒暴露于空气中以免氧化。镉柱每次使用完毕后, 应先以 25mL 0.1mol/L HCl 洗涤, 再以水洗 2 次, 每次 25mL, 最后用水覆盖镉柱。

(3) 为保证硝酸盐测定结果准确, 镉柱还原效率应当经常检查。镉柱维护得当, 使用一年效能尚无显著变化。

(4) 在沉淀蛋白质时, 硫酸锌溶液的用量不宜过多。否则, 在经镉柱还原时, 由于加 5mL pH9.6~9.7 氯化铵缓冲液而生成 Zn(OH)₂ 白色沉淀, 堵塞镉柱, 影响测定。

(5) 镉是有害的元素之一, 再制作海绵状镉或处理镉柱时, 其废弃液中含有大量的镉, 不要将这些有害的镉放入下水道污染源和农田, 要经过处理之后再放入下水道。另外, 不要用手直接接触镉, 同时不要弄到皮肤上, 一旦接触, 立即用水冲洗。

(6) 其它说明同亚硝酸盐的检测。

(二) 离子选择性电极法

在 0.1mol/L 硫酸钾介质中, 用硫酸银除去氯离子干扰, 硝酸根离子浓度在 $10^{-2} \sim 8 \times 10^{-5}$ mol/L 之间, 电位值和硝酸根浓度负对数呈直线关系, 由此求出样品溶液中硝酸盐含量。测定时取切碎混匀样品 10.0~20.0g, 用 0.1mol/L 硫酸钾溶液磨匀后, 移入 100mL 容量瓶中, 用 0.1mol/L 硫酸钾溶液定容, 过滤。取滤液 40mL 置另一小烧杯中, 插入电极, 在搅拌下读取稳定电位, 由标准曲线求出硝酸根含量。

此法亚硝酸盐含量占硝酸盐含量的 30%~40% 时, 不影响硝酸盐的测定, 如超过这个比例, 可加入一定量硝酸盐标准溶液, 以提高硝酸盐水平。溶液有颜色或混浊不影响测定。

(三) 气相色谱法

1. 原理

用硫酸在低于 95 $^{\circ}$ C 时, 硝酸根可与苯作用生成硝基苯。然后用气相色谱法分析该生成物, 以 2-氯萘为

内标物，给出一定的峰值和保留时间，据此可推算出样液中亚硝酸盐和硝酸盐的浓度。

2.说明与讨论

(1) 该方法优点是避免了使用致癌物质萘胺类的化合物，有色物质也不影响测定，可测 10mg/kg 以下的硝基苯，回收率达 95~99%。

(2) 严格控制硝酸根与苯的反应。可采用下面的方法：按上面镉柱法处理样品，取 30mL 样品处理液和 20mL 苯于分液漏斗中，充分振摇后，静置，分层，分出水层，收集于 100mL 三角瓶中，加 10mL 苯。滴加 50mL 80% 的硫酸，滴加速度以苯刚刚沸腾或将要沸腾为宜，令反应 5min。然后将全部混合物移入分液漏斗中，用碳酸钠和水洗苯层，收集苯层。

(3) 本方法还可用高锰酸钾将亚硝酸盐氧化成硝酸盐，测定亚硝酸盐含量。

第五节 漂白剂——二氧化硫及亚硫酸盐的检测

漂白剂是指可使食品中有色物质经化学作用分解转变为无色物质，或使其褪色的食品添加剂。有还原型漂白剂和氧化型漂白剂两类。还原型漂白剂有：二氧化硫、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、低亚硫酸钠、焦亚硫酸钠等，氧化型漂白剂有：过氧化氢、次氯酸等。使用时，有单一使用，也有混合使用。我国使用的大都是以亚硫酸类化合物为主的还原型漂白剂。它们通过所产生的二氧化硫的还原作用，来抑制、破坏食品的变色因子，使食品褪色或免于发生褐变。一般在食品的加工过程中要求漂白剂除对食品的色泽有一定作用外，对食品的品质、营养价值及保存期均不应有不良的改变。

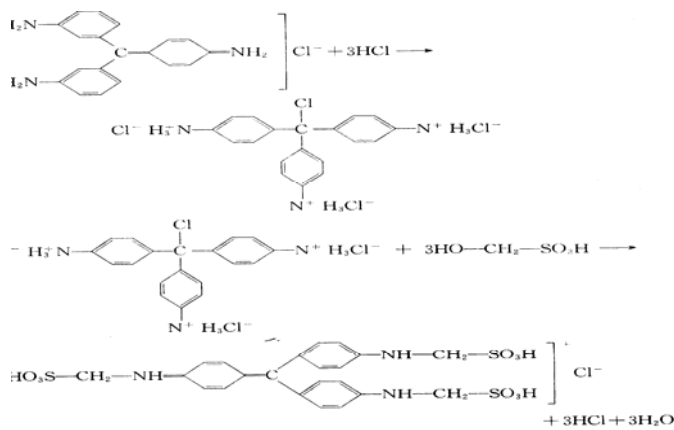
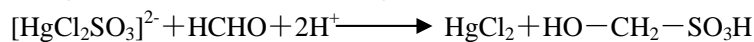
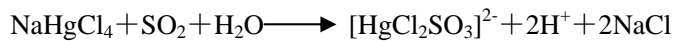
目前，在我国食品行业中，使用较多的是二氧化硫和亚硫酸盐。两者本身并没有什么营养价值，也非食品中不可缺少成分，而且还有一定的腐蚀性，对人体健康也有一定影响，因此在食品中添加加以限制。1994 年 FAO / WHO 规定了亚硫酸盐的 ADI 值为 0~0.7mg/kg 体重。并要求在控制使用量的同时还应严格控制 SO₂ 的残留量。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760~1996 规定，亚硫酸盐可用于葡萄酒、果酒，用量为 0.25g/kg，残留量（以二氧化硫计）不得超过 0.5g/kg。最大使用量：蜜饯、葡萄糖、食糖、冰糖、糖果、液体葡萄糖、竹笋、蘑菇及蘑菇罐头为 0.40~0.60g/kg，薯类淀粉为 0.20g/kg；残留量（以二氧化硫计）：竹笋、蘑菇及蘑菇罐头不得超过 0.04g/kg，液体葡萄糖不得超过 0.2g/kg，蜜饯、葡萄、黑加仑浓缩汁不得超过 0.05g/kg，薯类淀粉不得超过 0.03g/kg。

测定二氧化硫和亚硫酸盐的方法有：盐酸副玫瑰苯胺比色法、滴定法、碘量法、高效液相色谱法和极谱法等，其中常用的是前两种方法。

一、盐酸副玫瑰苯胺法

(一) 原理

亚硫酸盐与四氯汞钠反应生成稳定的络合物，再与甲醛及盐酸副玫瑰苯胺作用生成紫红色络合物。反应如下：



聚玫瑰红甲基磺酸（紫红色）

于波长 550nm 处有最大吸收峰，且在一定范围内其色泽深浅与亚硫酸盐含量成正比，故可比较定量。计算公式如下：

$$\text{二氧化硫含量 (g/kg)} = \frac{m_1 \times 1000}{m \times V / 100 \times 1000 \times 1000}$$

式中： V——测定用样液的体积， mL；
m₁——测定用样液中二氧化硫的含量， μg；
m——样品质量， g。

(二) 说明与讨论

1. 本方法为国家标准分析法 GB/T5009.34-1996 中的第一法，适用于食品中亚硫酸盐残留量的测定，最低检出浓度为 1mg/kg。

2. 颜色较深样品，需用活性炭脱色。

3. 样品中加入四氯化汞吸收液以后，溶液中的二氧化硫含量在 24 小时之内稳定，测定需在 24 小时内进行。

4. 亚硫酸易与食品中的醛(乙醛)、酮(酮戊乙酸、丙酮酸)及糖(葡萄糖、单糖)等结合，形成结合态亚硫酸，样品处理时加入氢氧化钠可使结合态亚硫酸释放出来。

5. 亚硝酸对反应有干扰，加入氨基磺酸铵是为了分解亚硝酸，反应式为：



6. 盐酸副玫瑰苯胺加入盐酸调节成黄色，必须放置过夜后使用，以空白管不显色为宜，否则需重新用盐酸调节。

7. 盐酸副玫瑰苯胺中盐酸用量对显色有影响，加入量多，显色浅，加入量少，显色深，对测定结果有较明显的影响，因此需严格控制。

8. 显色反应的最适温度为 20~25℃，温度低，灵敏度低，因此样品管和标准管应在相同温度条件下进行。

9. 对于饼干、粉丝等固体样品处理方法是：称取 5.0~10.0g 研磨均匀的样品，以少量水湿润并移入 100mL 容量瓶中，然后加入 20mL 四氯化汞吸收液，浸泡 4h 以上，若上层溶液不澄清，可加入亚铁氰化钾溶液及乙酸锌溶液各 2.5mL，最后用水稀释至 100mL 刻度，过滤后收集滤液。

10. 二氧化硫标准溶液的浓度随放置时间的延长逐渐降低，因此临用必须标定其浓度。

二、蒸馏法

(一) 原理

在密闭容器中对样品进行酸化并加热蒸馏，以释放出其中的二氧化硫，释放物用乙酸铅溶液吸收。吸收后用浓盐酸酸化，再以碘标准溶液滴定，根据所消耗的碘标准溶液量计算出样品中二氧化硫含量。计算公式如下：

$$x = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.01 \times 0.032 \times 1000}{m}$$

式中 x——样品中二氧化硫总含量， g / kg；
V₁——滴定样品所用碘标准滴定溶液的体积， mL；
V₂——滴定试剂空白所用碘标准滴定溶液的体积， mL；
m——样品质量， g；
0.032——每毫摩 SO₂ 的质量， g / mmol。
0.01——滴定时所用碘标准溶液的浓度， mol/L。

(二) 测定方法

固体样品用刀切或剪刀剪成碎末后混匀，称取约 5.00g 均匀样品(样品量可视含量高低而定)。液体样品可直接吸取 5.0~10.0mL 样品，置于 500mL 圆底蒸馏烧瓶中。将称好的样品置入圆底蒸馏烧瓶中，加入 250mL 水，装上冷凝装置，冷凝管下端应插入碘量瓶中的 25mL 乙酸铅(208 / 1)吸收液中，然后在蒸馏瓶中加入 10mL 盐酸(1 + 1)，立即盖塞，加热蒸馏。当蒸馏液约 200mL 时，使冷凝管下端离开液面，

再蒸馏 1min。用少量蒸馏水冲洗插入乙酸铅溶液的装置部分。

向取下的碘量瓶中依次加入 10mL 浓盐酸、1mL 淀粉指示液(10g / L)。摇匀之后用碘标准滴定溶液(0. 01mol / L)滴定至变蓝，且在 30s 内不褪色为止。在检测样品的同时要做空白试验。

本法为 GB/T5009.34-1996 中的第二法，适用于色酒、葡萄糖糖浆及果脯。

三、离子色谱法

(一) 原理

试样中的亚硫酸盐在磷酸酸性条件下，于 90℃水浴中通氮曝气分离，收集在三乙醇胺溶液中，取一定体积的样品溶液和空白溶液，分别注入离子色谱内测定亚硫酸的峰高，根据预先用标准溶液(0. 1—0. 4ug / mL 二氧化硫)作成标准曲线，计算样品中亚硫酸含量。计算公式如下：

$$x = \frac{m_1 \times 1000}{m \times \frac{0.1}{10} \times 1000 \times 1000}$$

式中 x——样品中二氧化硫含量，g / kg；

m_1 ——进样体积中二氧化硫质量，ug；

m——样品质量，g；

10——试样溶液体积，mL；

0. 1——进样体积，mL。

(二) 说明与讨论

1. 本方法适用于食品中残留亚硫酸盐和天然亚硫酸盐的测定。亚硫酸在 0. 01~4. 0ug / 100uL 范围内呈线性关系，最小检出量为 0. 2ug / g。在红葡萄酒、糖豆、蜜饯樱桃、豆酱、冷冻虾、玉米粉等样品中，添加二氧化硫至 10ug / g、100ug / g，依次测定回收率为 89%~109. 0%。对 1ug / mL 二氧化硫标准溶液测定 10 次，相对标准偏差为 0. 44%。

2. 1000mgCl⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻、甲酸、乙酸、乙醇，10mg 甲醛、糖醛、二甲基硫醚、二甲基二硫醚、甲硫醇钠、丙烯基异硫氰酸盐及 0. 1mgS²⁻对测定无干扰。NO₂⁻、乙醛、苯甲醛有严重负干扰，二氧化氮干扰可用氨基磺酸铵消除，醛类干扰用 2, 4-DNP 消除。

3. 试验溶液制备：取 10. 00mL 吸收液，加入 A 吸收管内，取 5mL2, 4-DNP 溶液加到联结二氧化硫捕集装置的 B 吸收管内。称取 1. 0~5. 0g 样品(固体样品切成长 2mm 以下)，放入已通氮脱气 10min 的 40mL 磷酸(1 + 4)和 1mL 氨基磺酸铵溶液的曝气瓶内。立即接好捕集装置。曝气瓶于 90℃水浴中以 800mL / min 流速通氮气 40min，所得吸收液即为试验溶液。用蒸馏水代替样品同上操作，得到的吸收液为空白试验溶液。测定前如 A 吸收管内的吸收液不足 10mL 时，应加吸收液补足至 10mL。

第六节 食用合成色素的检测

食用色素是以食品着色、改善食品的色泽为目的的食品添加剂。可分为食用天然色素和食用合成色素两大类。天然色素是从一些动、植物组织中提取的，其安全性高，但稳定性差，着色能力差。难以调出任意的色泽，且资源较短缺，目前还不能满足食品工业的需要；合成色素是用有机物合成的，主要来源于煤焦油及其副产品，资源十分丰富。合成色素具有稳定性好、色泽鲜艳、附着力强、能调出任意色泽等优点，因而得到广泛应用，但由于许多合成色素本身或其代谢产物具有一定的毒性，致泻性与致癌性，因此必须对合成色素的使用范围及用量须加以限制，确保其使用的安全性。

食用合成色素种类多，国际上允许使用的有 30 多种，我国允许使用的主要有苋菜红、胭脂红、赤藓红、新红、诱惑红、玫瑰红、柠檬黄、日落黄、亮蓝、靛蓝、牢固绿等。目前，在食品行业中使用单元色素已较少，需使用复合色素方可达到较满意的色泽，因而给其分析测定带来了一定困难。

合成色素的测定方法主要有薄层层析法和高效液相色谱法。

一、薄层层析法

(一) 原理

在酸性条件下，用聚酰胺吸附水溶性合成色素，而与天然色素，蛋白质、脂肪、淀粉等物质分离。然

后在碱性条件下，用适当的溶液将其解吸，再用薄层层析法进行分离鉴别，与标准比较定性、定量。计算公式如下：

$$\text{色素含量 (g/L或g/kg)} = \frac{c \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中： c ——测定用样液中色素含量，mg；
 m ——样品质量（或体积），g 或 mL；
 V_1 ——样品解吸后样液总体积，mL；
 V_2 ——样液点板体积，mL。

（二）说明与讨论

1. 本法为国家标准分析方法 GB/T5009.35-1996 中的第二法，最低检出量为 50ug，点样量为 1 g，样品最低检出浓度约为 50mg/kg。

2. 样品处理时，对含 CO₂ 的饮料需加热排除 CO₂；果酒、配制酒要加热排出乙醇；淀粉、软糖、硬糖、蜜饯等用水加热溶解，用 20% 柠檬酸溶液调 pH 至 4 左右；奶糖用乙醇-氨溶液溶解，水浴上加热浓缩，立即用 1：10 硫酸调至微酸性，再加 10% 钨酸钠溶液使蛋白质沉淀，过滤，收集滤液；蛋糕首先脱水、脱脂，再用乙醇-氨溶液直至提取完全，然后按处理奶糖的方法提取色素、沉淀蛋白质和收集滤液。

3. 处理过的样液加热至 70℃ 之后，加入 0.5~1.0g 聚酰胺粉，并充分混匀，然后用 20% 柠檬酸溶液调 pH 至 4 左右，使色素吸附完全，因为聚酰胺粉在偏酸性(pH4~6)条件下对色素吸附力较强。如溶液中仍有颜色，可再加入少量的聚酰胺粉。如样品色素浓度太高，要用水适当稀释，因为在浓溶液中，色素钠盐的钠离子不容易解离，不利于聚酰胺粉吸附。

4. 样液中的色素被聚酰胺粉吸附后，全部转入 G₃ 垂融漏斗或玻璃漏斗中过滤，当用热水洗涤聚酰胺粉以便除去可溶性杂质时，要求用经 20% 柠檬酸调节 pH4 的 70℃ 水反复洗涤，防止吸附的色素被洗脱下来，使定量结果偏低。若含天然色素，可再用甲醇-甲酸洗涤至无色，再用 70℃ 水洗涤至中性，洗涤过程中必须充分搅拌。

5. 用乙醇-氨溶液分次解吸全部色素，收集全部解吸液，水浴驱氨。若是单元色，用水定容至 50mL，用分光光度计比色；若为混合色，将解吸液水浴浓缩至 2mL 左右，转入 5mL 容量瓶中，用 50% 乙醇洗涤、定容。在进行蒸发浓缩时，要控制水浴温度在 70~80℃，使其缓慢蒸发，勿溅出皿外，另外，要经常摇动蒸发皿，防止色素干结在蒸发皿的壁上。

6. 采用聚酰胺粉薄层板进行定性、定量分析，用点样管吸取浓缩定容后的样液 0.5mL，在离底边 2cm 处从左至右点成与底边平行的条状，在板的右边点 2μL 色素标准溶液。在点样时最好用吹风机边点边吹干，在原线上点，直至点完一定量。另外，点样线缝宽不得超过 2mm。

7. 苋菜红与胭脂红用甲醇-乙二胺-氨水（10+3+2）展开剂；靛蓝、亮蓝用甲醇-氨水-乙醇（5+1+10）展开剂；柠檬黄与其它色素用柠檬酸钠溶液（25g/L）-氨水-乙醇（8+1+2）展开剂。取适量展开剂倒入展开槽中，将薄层板放入展开，待色素明显分开后，取出晾干，与标准色斑比较其比移值，确定色素种类。在展开之前，展开剂在缸中应预先平衡 1 小时，使缸内蒸汽压饱和，不至于出现边缘效应。

8 层析用的溶剂系统，不可以使用或存放太久，否则浓度和极性都起变化，影响分离效果，最好两天换一次，以保证分离效果。

9. 分别吸取一定体积的色素标准溶液，置于 10mL 带塞比色管中，加水至刻度。在特定波长处（胭脂红 510nm，苋菜红 520nm，柠檬黄 430nm，日落黄 482nm，亮蓝 627nm，靛蓝 620nm）测定吸光度。绘制标准曲线。

10 将薄层层析板上的条状色斑剪下，用刀刮下移入漏斗中，用乙醇-氨溶液解吸色素，少量多次至解吸液为无色，收集解吸液于蒸发皿中水浴驱氨后转入 10mL 比色管中，用水定容。于上述波长处测定吸光度，在标准曲线上查得色素含量。

二、高效液相色谱法

（一）原理

合成色素在酸性条件下用聚酰胺粉吸附或用液-液分配提取，然后制成样液（水溶液），注入高效液相

色谱仪，经反相色谱分离，以保留时间和峰面积进行定性和定量。计算公式如下：

$$\text{色素含量(g/kg)} = \frac{c \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中

c——进样体积中色素的含量，mg；

V₁——样品稀释总体积，mL；

V₂——进样体积，mL；

m——样品质量，g。

(二) 色谱条件

1. 检测器：UV254nm，0.2AUFS；

2. 色谱柱：YWG-C₁₈ 4.6×250mm10 μ m 不锈钢柱；

3. 流动相：甲醇-0.02mol/L 乙酸铵溶液 (pH=4)；

4. 梯度洗脱：甲醇：20~35%，5min；

35~98%，5min；98%继续6min；

5. 流速：1mL/min。

(三) 说明与讨论

1. 本法为 GB/T5009.35-1996 中的第一法，样品处理同薄层色谱法。

2. 色素提取有聚酰胺粉吸附法和液-液分配法。样品不含赤藓红时，用聚酰胺粉吸附法。含赤藓红时，用液-液分配法。

3. 聚酰胺粉吸附法同薄层色谱法中，只是定容之后需经 0.45 μ 滤膜过滤。液-液分配法是将制备好的样液移入分液漏斗中，加入 2mL 盐酸，5%三正辛胺正丁醇溶液 10~20mL，充分振摇提取，静置，分取有机相，重复 2~3 次，合并有机相，然后用饱和硫酸钠液洗 2~3 次，每次 8~10mL，将有机相转入蒸发皿中，水浴加热浓缩至 10mL 左右，再转入分液漏斗中，加 60mL 正己烷，混匀，加 2%氨水提取 2~3 次，每次 5mL 左右，合并氨水层 (含水溶性酸性合成色素)，再用正己烷洗 2~3 次，分取氨水层。用乙醇调至中性，然后水浴加热蒸发至近干，用水转入 5mL 容量瓶中，定容，经 0.45 μ 滤膜过滤。取色素标准溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪中，经分析得出色谱图，再取色素提取液 10 μ L 注入高效液相色谱仪测定，根据 R_t 值定性，外标法定量。8 种色素的色谱图如图 12-4。

4. 用高效液相色谱仪测定时，测定一个样品后，将流动相中甲醇浓度恢复至 20%，使之稳定 20min 后，再开始测定第二个样品。

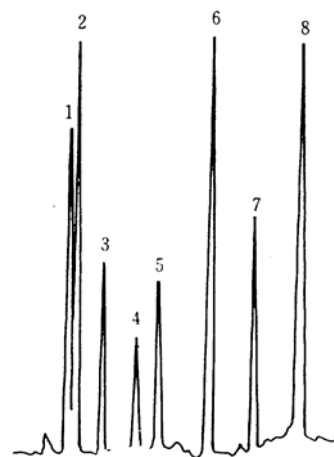


图 12-4 八种色素高效液相色谱图

1-新红 2-柠檬黄 3-苋菜红 4-靛蓝
5-胭脂红 6-日落黄 7-亮蓝 8-赤藓红

思考题

1. 说明薄层色谱法测定食品中糖精钠的原理及操作要点。
2. 气相色谱法测定食品中苯甲酸和山梨酸时，制备样品溶液时为什么要进行酸化处理。
3. 说明紫外光谱法测定食品中苯甲酸的原理及提取过程。
4. 简要说明格里斯试剂比色法测定亚硝酸盐的原理及方法。
5. 制备镉柱时应注意什么，镉柱还原效率如何测定。
6. 如何标定二氧化硫溶液浓度，标定时应注意什么。
7. 盐酸副玫瑰苯胺法测定食品中亚硫酸盐时，加入四氯汞钠溶液的作用是什么。
8. 测定食品中合成色素时，样品溶液为什么要用 20% 柠檬酸调 pH 至 4。
9. 如何洗脱被聚酰胺粉吸附的色素，洗脱时应注意什么。

(许牡丹)