

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2011.06.006

在线渗析-离子色谱法测定水产品中多聚磷酸盐的研究

王 扬, 何 辉, 叶磊海, 何 丰, 郑重莺
(浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012)

摘要: 文章采用离子色谱法, 结合在线渗析技术对水产品中多聚磷酸盐的质量分数进行了测定。该方法测定多聚磷酸盐离子在质量浓度 0 ~10.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 相关系数达到 0.999。检出限为 3.0 ~10 µg·L⁻¹, 回收率为 95.8% ~104%, 连续进样检测值相对标准偏差小于 10%。试验结果显示该法分离度好, 灵敏度高, 检测结果准确, 操作方便快捷, 适合水产品中多聚磷酸盐的测定。

关键词: 离子色谱; 水产品; 多聚磷酸盐; 在线渗析技术

中图分类号: TS 254.7 文献标志码: A 文章编号: 2095-0780-(2011)06-0035-05

Determination of polyphosphates in aquatic products using ion chromatography-inline dialysis

WANG Yang, HE Hui, YE Leihai, HE Feng, ZHENG Chongying
(Aquatic Product Quality Testing Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The polyphosphates in aquatic products was determined by ion chromatography with inline dialysis. Within the concentration range of 0 ~10.0 mg·L⁻¹, the linear correlation coefficient is 0.999; the limit of determination is 3.0 ~10 µg·L⁻¹; the recovery is 95.8% ~104%; the RSD is less than 10%. The method, which is sensitive, accurate, simple, rapid and has a good efficiency of separation, is suitable for determining polyphosphates in aquatic products.

Key words: ion chromatography; aquatic products; polyphosphates; inline dialysis technology

多聚磷酸盐是一类重要的功能性食品添加剂, 作为保水剂和品质改良剂在杭州市鱼类等水产品加工过程中被广泛应用, 起到部分抑菌、保持水分和改善口感的作用^[1-3]。多聚磷酸盐是一类化合物, 包括正磷酸盐 (PO₄⁻)、焦磷酸盐 (P₂O₇⁴⁻)、多聚磷酸盐 (P₃O₁₀⁵⁻) 和三偏磷酸盐 [(PO₃)₃³⁻] 等种类^[4-5]。然而, 人体过多摄入多聚磷酸盐会促进血液凝结, 增加心脑血管疾病的发病率^[6]。多聚磷酸盐在某些水产品中已禁止使用, 如扇贝加工过程中严禁使用, 欧盟和捷克对其进口的鳕鱼片和人工蟹肉严格限制使用多聚磷酸盐, 波兰则不允许使

用。近年来, 一些不法商贩利用多聚磷酸盐保水性好的特点, 在水产品中人为注水, 造成欺诈消费者的行为。尤其在冻虾仁生产中为改善外观、提高保水性, 采用按原料质量一定比例的多聚磷酸盐溶液进行浸泡虾仁。在加工过程中允许使用的情况下, 一般冷冻水产品中多聚磷酸盐的允许限量为 5 g·kg⁻¹^[7]。故对此建立行之有效的检测方法很有必要。

水产品中多聚磷酸盐检测, 传统采用分光光度法, 先用氧化剂将样品中的多聚磷酸盐转化成 PO₄⁻, 然后用磷钼酸 喹法、重量法或比色法测

定, 结果只能测定总量, 无法区别多聚磷酸盐的形态, 而且检测限高。其他分析方法还有纸上层析法、离子交换法、薄层色谱法和 pH 滴定法等, 但各自存在分析时间长、干扰因素多和重复性差等缺点^[8-10]。还有对海产品中多聚磷酸盐进行提取后, 用核磁共振法直接测定, 由于设备价格昂贵, 很难普及^[11]。文章利用离子色谱具有同时分离测定多种阴离子的特点, 建立离子色谱法同时测定水产品中 4 种多聚磷酸盐的质量分数, 结合英蓝渗析技术净化样品, 减少了手工操作的繁琐和误差, 达到满意的效果。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

861 离子色谱仪、863Compact Autosampler 自动进样器及 IC Net 2.3 色谱工作站 (瑞士万通公司出品); Metrosep A Supp 5-150 分离柱及 Metrosep A Supp 4/5 保护柱 (瑞士万通公司出品); 英蓝超滤单元 (瑞士万通公司出品); SK8210HP 型超声波清洗仪 (上海科导仪器有限公司出品); Milli-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司出品)。

PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 标准品均购自 Sigma 公司。氢氧化锂 (LiOH)、硫酸 (H_2SO_4) 和乙腈 (CH_3CN) 均为分析纯。40 mmol·L⁻¹ LiOH 溶液配制为称取 LiOH 1.7667 g, 用超纯水溶解, 定容至 1 L。所有溶液均由超纯水配制, 超纯水电阻为 18.2 M Ω 。冷冻鲳鱼、冷冻小黄鱼及冻虾仁样品购于超市, 冷冻鱿鱼由某水产品客户提供。

1.2 标准工作曲线绘制

磷酸盐混合标准储备液: 精确称取 PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 标准品各 0.100 g, 用超纯水溶解于 100 mL 容量瓶内定容, 使各组分质量浓度为 1.00 g·L⁻¹。磷酸盐混合标准工作液采用倍比稀释方法, 用 40 mmol·L⁻¹ LiOH 溶液将其配制成 0、1.0 mg·L⁻¹、5.0 mg·L⁻¹、8.0 mg·L⁻¹ 和 10.0 mg·L⁻¹ 系列工作液。

取系列质量浓度工作液进样分析, 每一质量浓度重复 5 次, 测出各质量浓度所对应的平均峰面积, 用各组分的平均峰面积对质量浓度来绘制标准曲线, 得回归方程和相关系数。

1.3 色谱条件

采用 861 型离子色谱仪, Metrosep A Supp5-150

分离柱; 淋洗液为 40 mmol·L⁻¹ LiOH 溶液 + 2% CH_3CN ; 流速 0.7 mL·min⁻¹; 检测器采用电导检测方式; 进样体积 20 μL 。

1.4 样品测定

称取 5.00 g 捣碎样品于 50 mL 具塞离心管中, 匀质 5 min, 加入 30 mL 煮沸的热超纯水, 混匀, 超声波水浴中提取 10 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液用 40 mmol·L⁻¹ LiOH 溶液定容至 50 mL。移取适量上清液稀释一定倍数后置于自动进样器上待测, 仪器带有英蓝超滤装置, 自动在线净化样品。按 1.3 色谱条件进行测定, 计算样品中多聚磷酸盐的质量分数。

2 结果与讨论

2.1 重现性、检测限和线性关系

三聚磷酸盐溶液因具有水解不稳定性而易水解形成 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 和 PO_4^{3-} , 其水解速率随着溶液 pH 的减小或溶液温度的升高而增加^[4]。因此, 此试验的系列标准工作溶液均以 40 mmol·L⁻¹ LiOH 溶液配制并置于冰箱中保存待用。

在所选的色谱条件下, 对混合标准溶液连续进样 5 次考察 PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 的重复性。上述待测组分保留时间的相对标准偏差分别为 0.216%、0.325%、0.603% 和 0.516%。色谱峰面积的相对标准偏差分别为 1.55%、1.62%、1.32% 和 1.48%。

测定 0 ~ 10.0 mg·L⁻¹ 质量浓度范围的 PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 系列混合工作液, 计算得出的线性方程及相关系数; 按照 S/N = 10 计算各组分的检测定量限。标准色谱图见图 1, PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 的线性关系和检出限见表 1。

2.2 样品预处理

2.2.1 提取方法 因为水产品中存在各种酶等活性物质, 多聚磷酸盐在水产品中存在形式不稳定, 导致同一样品多次检测结果重现性差。韦小焯等^[12]和许迪明等^[13]采用将样品在 0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温下浸提一定时间, 缓解多聚磷酸盐降解, 抑制酶的活性。KAUFMANN 和 MADEN^[14]采用微波加热抑制水产品和奶酪中降解多聚磷酸盐的酶活性。陈笑梅等^[15]研究证明采用加热方式使活性物质失活, 阻断多聚磷酸盐的分解。此试验采用样品中直接加入

表 1 PO_4^- 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 的线性方程、线性关系和检出限

Tab. 1 Linear equation, linear correlation and detection limit of PO_4^- , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $(\text{PO}_3)_3^{3-}$

组分 analyte	线性方程 linear equation	相关系数 (R) correlation coefficient	检出限 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ detection limit
磷酸盐 PO_4^-	$A=0.014\ 7+0.005\ 80X$	1.000 0	3.0
焦磷酸盐 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	$A=0.041\ 6+0.007\ 14X$	1.000 0	3.0
多聚磷酸盐 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$	$A=0.077\ 0+0.005\ 72X$	0.999 9	10.0
三偏磷酸盐 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$	$A=0.079\ 3+0.007\ 70X$	1.000 0	8.0

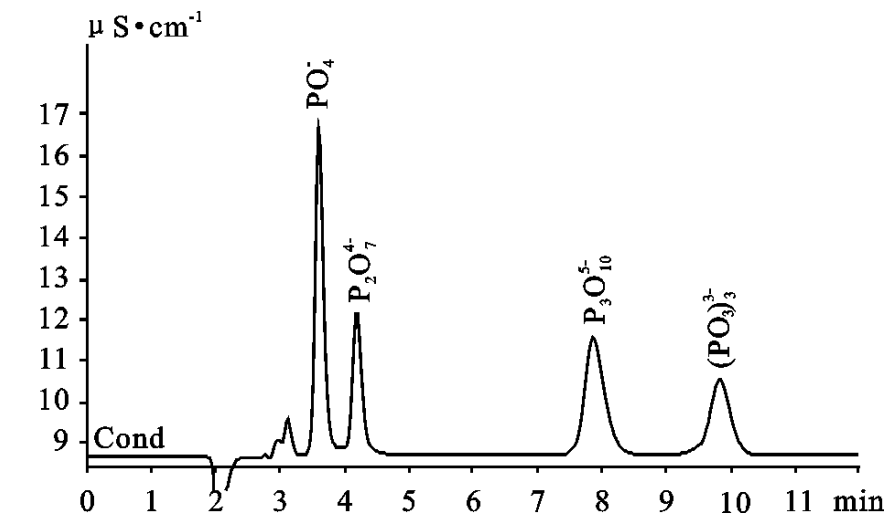


图 1 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合多聚磷酸盐标准溶液色谱图
Fig 1 Chromatography of standard solution of polyphosphates (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

沸水，再用超声波提取，获得满意的提取效率和试验重现性。超声波提取的特点是提取时间短、提取效率高和方便快捷。

2.2.2 净化方法 离子色谱所分析的样品要求非常严格，要求样品中不得含有颗粒物，因为这些颗粒将堵塞并最终损坏分离柱。水产品中存在着大量的蛋白质和脂肪，用水提取多聚磷酸盐的同时部分蛋白质和脂肪也会被带入提取液中。这些物质的存在会严重干扰测定和减短色谱柱寿命。目前国内也有采用氯仿、三氟乙酸及三氯乙酸等蛋白质沉淀剂，这需要繁杂的前处理步骤，且使用的有机试剂有一定毒性^[12-18]。采用英蓝渗析技术可在进入色谱柱前去除样品中的蛋白质和脂肪，将干扰减至零。渗析采用了半透膜的原理，将生物大分子和长链有机物等物质阻挡在半透膜外，而小分子及无机阴阳离子等则可穿过半透膜被接收液所富集。在渗析过程结束之后整个渗析单元可被自动清洗和润洗，完全排除了人为的手动操作所带来的污染或干扰。整个渗析时间只需要 6~10 min，离心过的样品体积只需 10

mL，渗析率超过 96%，而且无须预浓缩或过滤，将手工劳动节省了 90% 以上。由于英蓝渗析技术可以做到边检测边渗析，即当上一个样品正在检测期间，机器已经在开始渗析下一个样品准备进样，很大程度提高了试验的效率。

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 淋洗条件的选择 淋洗液主要成分为 NaOH 和 KOH 溶液，多采用梯度洗脱^[12-18]。此试验采用淋洗液为 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiOH 溶液和 CH_3CN ，按 $V(\text{LiOH}) : V(\text{CH}_3\text{CN}) = 98 : 2$ 混合。LiOH 溶液相比 NaOH 和 KOH 溶液其碱性弱，有利于延长色谱柱的寿命； CH_3CN 作为有机改性剂，可以缩短出峰时间。此试验采用等度淋洗，相对于梯度洗脱，该洗脱系统更为稳定。此试验多聚磷酸盐混合标准品色谱图 4 个组分可在 10 min 之内完全出峰（图 1）。

2.3.2 分离度结果 按照 2.3 色谱条件， PO_4^- 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$ 4 种标准品得到分离，按照公式计算分离度^[19]。结果显示， PO_4^- - $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ - $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 和 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ -(PO_3)₃³⁻ 各组分之间的分离度分别为 2.034、7.510 和 2.874，分离度均大于 1.5，可以很好地完全分离，满足分析测试的要求。

2.4 加标回收率试验

在空白去活的虾仁、鳕鱼和鱿鱼样品中添加混合多聚磷酸盐标准溶液，使样品中的多聚磷酸盐质量分数在 0.50 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平。样品重复测试 6 次，回收率和精密度结果见表 2。4 种形态多聚磷酸盐的回收率结果在 95.8%~104% 之间，相对标准偏差均小于 10%，符合测定要求。

2.5 不同样品测定结果

选购市售冷冻小鲳鱼、冷冻小黄鱼、冷冻鱿鱼和冻虾仁样品按 1.4 样品前处理方法进行处理，测定结果见表 3。

表 2 水产品样品的回收率和精密度试验结果 (n = 6)

组分 analyte	平均回收率 average recovery			相对标准偏差 RSD
	虾仁 prawn meat	鳕鱼 cod fish	鱿鱼 squid	
磷酸盐 PO_4^-	98. 2	101. 0	102. 0	4. 01
焦磷酸盐 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	96. 9	99. 3	95. 8	4. 68
多聚磷酸盐 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$	98. 7	97. 1	98. 6	6. 73
三偏磷酸盐 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$	97. 5	98. 0	95. 7	2. 14

表 3 几种水产品中多聚磷酸盐测定结果

待测项目 analyte	mg · kg ⁻¹			
	冷冻鲳鱼 frozened pomfret	冷冻小黄鱼 frozened little yellow croaker	冷冻鱿鱼 frozened squid	冻虾仁 frozened prawn meat
磷酸盐 PO_4^-	176	170	118	51
焦磷酸盐 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	6	未检出	未检出	4
多聚磷酸盐 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$	未检出	11	未检出	45
三偏磷酸盐 $(\text{PO}_3)_3^{3-}$	未检出	未检出	未检出	1

3 结论

该研究采用离子色谱法结合英蓝渗析技术，同时测定水产品中的 4 种多聚磷酸盐形态。试验结果显示，采用该方法可以检测出样品中磷酸盐的种类和质量分数，灵敏度高，结果准确、稳定，可以用于生产过程中水产品的质量控制和市场商品监管检验，判断水产加工品中是否使用了磷酸盐，添加量是否符合食品添加剂标准规定的允许限量，是否存在超标等问题。从市场上随机抽取的几种水产冷冻加工品的检测结果显示，在水产品加工过程中使用多聚磷酸盐很普遍，如何规范控制使用量，确保消费者的身体健康问题需要引起有关部门的重视。从近年来欧盟风险预警情况来看，中国出口水产品中多聚磷酸盐超标问题，不仅扩大了检验范围而且加大了查验力度，因此，中国水产品出口企业必须高度注意多聚磷酸盐的使用限量问题。

参考文献:

[1] 沈飏, 胡兴娟, 徐君辉, 等. 水产品中添加剂多聚磷酸盐抑菌效果的研究 [J]. 食品科学, 2010, 31 (21): 54 - 57.
SHEN Biao, HU Xingjuan, XU Junhui, et al. Antimicrobial effect of polyphosphate additives in fishery product [J]. Food Sci,

2010, 31 (21): 54 - 57. (in Chinese)
[2] 李苗云, 张秋会, 柳艳霞, 等. 不同磷酸盐对肉品保水性的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2008, 42 (4): 439 - 443.
LI Miaoyun, ZHANG Qiuhui, LIU Yanxia, et al. Phosphate retention in different effects on meat [J]. Acad J Henan Agric Univ, 2008, 42 (4): 439 - 443. (in Chinese)
[3] 张坤生. 磷酸盐在肉制品中的作用 [J]. 肉类工业, 1991 (3): 25 - 26.
ZHANG Kunsheng The role of phosphate in meat products [J]. Meat Ind, 1991 (3): 25 - 26. (in Chinese)
[4] 袁丽, 高瑞昌, 韩国良, 等. 肌肉中多聚磷酸盐水解的研究进展 [J]. 农业工程技术: 农产品加工业, 2008 (3): 26 - 27.
YUAN Li, GAO Ruichang, HAN Guoliang, et al. Current status of research for the hydrolysis of polyphosphates in muscle [J]. Agric Eng: Agric Prod Process Ind, 2008 (3): 26 - 27. (in Chinese)
[5] 余来普. 食品加工中的磷酸盐 [J]. 精细与专用化学品, 1986 (10): 21 - 22.
YU Laipu Phosphate in food processing [J]. Fine Specialty Chem, 1986 (10): 21 - 22. (in Chinese)
[6] 邓光辉, 胡炜, 黄科林, 等. 离子色谱法检测三聚磷酸盐中不同形态磷酸盐的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30 (10): 153 - 155.
DENG Guanghui, HU Wei, HUANG Kelin, et al. Ion chromatography for content determination of various phosphate forms in tri-polyphosphate [J]. Food Sci, 2009, 30 (10): 153 - 155. (in Chinese)
[7] 张国华, 袁桂铮, 刘燕波, 等. 2009 年度舟山出口水产品风险监控结果分析 [J]. 现代商贸工业, 2010 (16): 117 - 118.

ZHANG Guohua, YUAN Guizheng, LIU Yanbo, et al. Zhoushan seafood exports in 2009 of risk monitoring results [J]. Mod Trade Ind, 2010 (16): 117 - 118. (in Chinese)

[8] 王翠英 . 三聚磷酸盐的电位测定法 [J]. 应用化工, 1987 (4): 151 - 152.

WANG Cuiying Tripolyphosphate potential method [J]. Appl Chem Ind, 1987 (4): 151 - 152. (in Chinese)

[9] 秦安荣 . 聚磷酸分析法简介 [J]. 云南化工, 1986 (3): 131 - 132.

QIN Anrong. Polyphosphoric acid analysis introduction [J]. Yun-nan Chem Ind, 1986 (3): 131 - 132. (in Chinese)

[10] 秦安荣 . 正磷酸盐和聚磷酸盐共存时的分析法 [J]. 云南化工, 1987 (2): 44 - 46.

QIN Anrong Orthophosphate and polyphosphate coexistence analy-sis [J]. Yunnan Chem Ind, 1987 (2): 44 - 46. (in Chinese)

[11] 彭增起, 周光宏 . 用 31P 核磁共振研究鸡肉中 4 种多聚磷酸钠的水解 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28 (4): 130 - 134.

PENG Zengqi, ZHOU Guanghong 31P NMR studies with 4 kinds of chicken hydrolysis of polyphosphates [J]. Acad J Nanjing Ag-ric Univ, 2005, 28 (4): 130 - 134. (in Chinese)

[12] 韦小烨, 林文业, 邓卫利 . 离子色谱法测定水产品中多聚磷酸盐的含量 [J]. 广西科学院学报, 2010, 26 (3): 270 - 272.

WEI Xiaoye, LIN Wenye, DENG Weili. Detemination of polypho-sphate in aquatic product by ion chromatography [J]. J Guangxi Acad Sci, 2010, 26 (3): 270 - 272. (in Chinese)

[13] 许迪明, 杨娟芬, 任飞 . 免试剂离子色谱法测定肉制品中的多聚磷酸盐 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 118 (12): 2553 - 2555.

XU Diming, YANG Juanfeng, REN Fei. Reagent-free ion chroma-tography of polyphosphates in meat products [J]. J Chin Sanit In-spec, 2008, 118 (12): 2553 - 2555. (in Chinese)

[14] KAUFMANN A, MADEN K. Polyphosphate determination in sea-food and processed cheese using high-performance anion exchange chromatography after phosphatase inhibition using microwave heat shock [J]. Food Additives Contam, 2005, 22 (11): 1073 - 1082.

[15] 陈笑梅, 池浩超, 黄超群, 等 . 沸水阻断多聚磷酸盐分解离子色谱法检测水产品中的多聚磷酸盐 [J]. 分析化学, 2008, 36 (10): 1403 - 1406.

CHEN Xiaomei, CHI Haochao, HUANG Chaoqun, et al. Determi-nation of polyphosphates in aquatic products by ion chromatography after inhibition by boiling water [J]. Anal Chem, 2008, 36 (10): 1403 - 1406. (in Chinese)

[16] 崔晗, 陈溪, 黄大亮, 等 . 离子色谱法同时测定水产品中的柠檬酸盐和多聚磷酸盐 [J]. 现代科学仪器, 2009, 28 (5): 67 - 69.

CUI Han, CHEN Xi, HUANG Daliang, et al. Determination of polyphosphates in aquatic product by ion chromatography [J]. Mod Sci Instrum, 2009, 28 (5): 67 - 69. (in Chinese)

[17] 吴玉萍, 李天飞, 王东丹, 等 . 离子色谱法测定食品添加剂三聚磷酸盐中的杂质含量 [J]. 色谱, 2003, 21 (3): 291 - 293.

WU Yuping, LI Tianfei, WANG Dongdan, et al. Ion chromato-graphic method for determination of impurities in tripolyphosphate [J]. Chromatography, 2003, 21 (3): 291 - 293. (in Chi-nese)

[18] 王大凯, 邹运香, 许多, 等 . 低酸度淋洗液离子色谱法测定多聚磷酸盐 [J]. 分析测试学报, 1995, 14 (3): 97 - 99.

WANG Dakai, ZOU Yunxiang, XU Duo, et al. Ion chromato-graphic detemination of polyphosphates with low-acidity eluants [J]. J Instrum Anal, 1995, 14 (3): 97 - 99. (in Chinese)

[19] 牟世芬, 刘克纳, 丁晓静 . 离子色谱方法及应用 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 28.

MOU Shifen, LIU Kena, DING Xiaojing. Application of ion chro-matography () [M]. 2nd edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 28. (in Chinese)