

毛细管电泳在食品分析中的应用进展

孟祥平 刘建学

(河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳, 471003)

摘 要 阐述了毛细管电泳在食品分析中的应用。主要包括糖类、氨基酸、脂肪酸、有机酸、矿物质、维生素、食品添加剂、农药残留量、生物毒素、抗生素残留量等食品成分的分析,并简要介绍了毛细管电泳的一般原理,对今后的发展前景进行了展望。

关键词 毛细管电泳, 食品成分, 食品分析

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是一种以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道的液相分离技术,具有高效、快速、微量和便于自动化的特点。CE迅速发展于1980年代中后期,是继高效液相色谱(HPLC)之后又一重大进展,它使分析科学进入纳升水平,为小体积样品分析提供可能,适合于从无机离子到生物大分子的分离分析,从荷电离子到中性分子的分离分析。作为一种重要的分离分析技术,CE已广泛应用于生命科学的各个领域。食品成分复杂,种类繁多,所以在分析上要求很高,由于CE具有多种不同的分离模式,分析对象也广泛,可以从饮用水到复杂的肉制品,分析成分可以从简单的金属离子到蛋白质等大分子,同时CE的灵敏度高,适合于痕量分析,特别是对样品提取、浓缩、纯化和衍生等前处理过程无严格要求,因此CE在食品分析中将发挥重要作用。

1 毛细管电泳的基本原理及分离模式

1.1 基本原理

毛细管电泳仪是在高电场强度下,将毛细管中的待测物,按其分子质量,或电荷、淌度等因素的差异而得到有效分离。

在毛细管电泳过程中,电渗流(electroosmosis flow, EOF)对物质的有效分离起重要作用,是毛细管电泳分离的主要驱动力,电渗是一种流体迁移现象,是毛细管中的溶剂因轴向直流电场作用而发生的定向流动。毛细管是由石英硅制成的,在 $\text{pH} > 3$ 的溶液中,其内壁表面硅羟基($-\text{Si}-\text{OH}-$)会电离成 SiO^- ,它将吸引溶液中的正电荷,使其聚集在自己的周围,在毛细管内壁和溶液之间的固液界面上形成双电层,在外加电场的驱动下,带电离子会同带正电荷

的溶剂层一道向负极移动形成电渗流。在毛细管电泳中还会存在电泳流和电渗流,在不考虑相互作用的前提下,粒子在毛细管内电场中的运动速度等于电泳速度和电渗速度矢量和。正粒子的运动方向和电渗流的一致,最先流出;中性粒子的电泳速度为“零”,故和EOF速度相等;负粒子因其运动方向与EOF方向相反,将在中性粒子之后流出;各种粒子因迁移速度不同而实现分离。

1.2 分离模式

据试样性组分在背景溶液中所起作用的不同,毛细管电泳可分为6种分离模式。

(1)毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)

CZE是毛细管电泳中最基本、应用最普遍的一种分离模式,分离是基于样品中各个组分间荷质比的差异,依据样品中不同离子成分在外加电场作用下电泳淌度的不同而实现分离。常用于对带电离粒子的分离分析。

(2)胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic chromatography, MEKC)

MEKC谱是毛细管电泳中唯一既能分离中性化合物又能分离带电组分的分离模式。在背景电解质种加入表面活性剂(如十二烷基硫酸钠, SDS),当其浓度超过临界胶束浓度后就形成有一种疏水内核,外部带负电的胶束。溶质在水相和胶束相之间产生分配,中性离子按疏水性不同得以分离。

(3)毛细管等速电泳(capillary isotachopheresis, CITP)

CITP也是依据样品组分淌度的不同进行分离,是一种较早的分离模式,常用于分离离子型化合物。

(4)毛细管凝胶电泳(capillary gel electrophoresis, CGE)

CGE是各种分离模式中柱效最高的一种CE模

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2005-07-11,改回日期:2005-10-12

式,由于毛细管内填充有凝胶,样品组分在分离中不仅受电场力的作用,还受凝胶尺寸排阻效应的作用,而用水溶性的线性高的分子聚合物加在缓冲液中,用压力充入毛细管中,就是无胶筛分。多用于蛋白质、核苷酸片段的分离。

(5)毛细管等电聚焦(capillary iso electric focus, CIEF)

CIEF 是依据样品组分的等电点不同而实现分离的电泳技术,是将普通等电聚焦电泳移到毛细管内进行的。一般用于兼性离子的样品,等电点仅差 0.001 可分离的物质。

(6)毛细管电色谱(capillary electric chromatography, CEC)

是将 HPLC 中众多的固定相微粒填充到毛细管中,以样品与固定相之间的相互作用为分离机制,以电渗为流动相驱动力的色谱过程,此外还有毛细管矩形电泳(CAE),芯片式毛细管电泳(CCE)及非水毛细管电泳(CNACE)等。

下表 1 有助于根据样品的物化性质选择合适的电泳模式。

表 1 毛细管电泳模式的选择

离子	分子	肽	蛋白质	多聚核酸	DNA
CIE	MECC	CIE	CIE	CGE	CGE
ITP	CIE	MECC	CGE	MECC	
	ITP	CIE	MECC	IEF	
		CGE	IEP		
		CIE			

2 毛细管电泳在食品分析中的应用

2.1 食品本身组分的分析

2.1.1 糖类

糖类是人体必需的营养素之一,对生命活动过程十分重要,过去常用 HPLC 和 GC 等分离方法测定。近年来随着毛细管电泳技术的发展,CE 也开始广泛用于食品中糖类的分离分析。由于糖类物质多为电中性,且亲水性强,又不具备强的紫外和荧光生色基团,故大多数情况下,糖类需经衍生化后再用 CZE 模式分离,在 CZE 中,由于中性分子的电泳迁移速度等于 EOF 速度而无法得到分离。如果在电泳介质中加入形成胶束(micellae)的阴离子表面活性剂(如十二烷基硫酸钠,SDS),中性分子将依据其极性大小在水相与胶束相(拟固定相)之间产生多次色谱类型的分配行为,从而达到分离的效果。目前在糖检测方面紫外分析应用较多,但它的灵敏度相对不高,检出限

一般只有 10^{-6} mol 数量级^[1]。而用激光诱导荧光检测,对糖类进行柱前高效荧光标记,可使检出限达到 10^{-9} mol 水平^[2,3]。在食品中糖的分离测定多用 MEKC 和 CZE 模式,目前报道 MEKC 已用于分离和测定各类软饮料、高粱水解液及豌豆提取物中的葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、水苏糖、棉子糖及其他低聚糖类^[4]。Klochow 等人^[5]用 CZE 分离,间接紫外法测定了苹果汁、桔汁和葡萄汁中的果糖、葡萄糖和蔗糖含量。任一平等^[6]应用高效毛细管区带电泳柱前衍生法测定食品中的功能性低聚糖(低聚异麦芽糖和低聚麦芽糖),检出限可达 0.027 ~ 0.059 ng。

2.1.2 氨基酸

人体对蛋白质的需要实际上是对氨基酸的要求,自然间一般的蛋白质含 22 种氨基酸,其中有 8 种为人体必需的,它们在人体内不能合成。过去氨基酸 CE 分离后可用间接紫外、间接荧光或电化学检测器检测,而更多情况是对食品中要测定的氨基酸先进行水解,然后再用衍生试剂进行柱前或柱后衍生,最后利用紫外或荧光检测器测定。如氨基酸样品采用茚三酮(Dns-Cl)衍生剂进行衍生,254 nm 紫外波长下其精氨酸衍生物的最低检测限达 8.5×10^{-11} g^[7]。采用异硫氰酸荧光素(FITC)衍生,激光诱导荧光检测器(LIF)检测,CZE 对氨基酸进行分离^[4]。目前 CE 技术用于氨基酸分析检测资料报道较多,但有关食品基质中氨基酸组成和含量的研究却不多,今后有待于在这方面做进一步研究。

2.1.3 脂肪酸

脂肪酸是重要的营养素之一,食品中脂肪酸的测定对于分析食品的化学特性和进行食品质量的控制有很重要作用。过去脂肪酸的测定常用气相色谱(GC)和 HPLC。GC 虽具有耐高温的色谱柱,能用氢火焰离子检测器(flame ionization detector, FID)检测食品中的脂肪酸,但对甲基和三甲基硅烷基衍生物的不稳定性有一定的要求。在 HPLC 中流出物采用在线检测技术,且某些检测器如折射指数检测器(refraction index detection, RID)不便于直接对样品进行检测;衍生化反应经常使被测物转化不完全,也会生成干扰性的副产物;此外,对于有表面活性部位的溶质如长链脂肪酸,可能发生吸附现象,最终导致色谱峰拖尾,分析结果受影响。近年来 CE 已广泛应用于食品中脂肪酸的分离分析,常用的分离模式为 CZE 和 MECK,如 Marcon 等人^[8]采用 CZE 模式,间接紫

外分析皂化油脂中的脂肪酸组成。在电解液中加入 5 mol/L 的磷酸盐, 4 mol/L 的十二烷基苯磺酸钠, 4 mol/L 二甲基- β -环戊二烷, 45% 的氰甲烷, 不到 10 min 就可检出 9 种 $C_{10} \sim C_{20}$ 脂肪酸。

随着脂肪酸链长的增加, 其水溶性相应降低, 并在缓冲液中形成胶束, 分离选择性也随之降低, 同时运用表面活性剂, MEKC 方法也可用于分析食品中的脂肪酸, 但在分析 $C_{11} \sim C_{15}$ 的中链脂肪酸受到一定限制^[8]。

2.1.4 有机酸

有机酸的 CE 测定是 1990 年代初首先被报道的, 近年来有了较大发展。目前多用 CZE 模式测定啤酒、果汁、酸乳、蔬菜汁及面包中的多种有机酸(有机阴离子)。由于大多数有机酸无紫外吸收, 故需用间接紫外测定。Devries 等人^[9]用 CZE 分离间接紫外同时测定了啤酒中的苹果酸、柠檬酸、醋酸、乳酸、琥珀酸和丙酮酸。利用计算机控制 CE 的温度或电压程序, 使毛细管中的电解缓冲液形成动态, pH 梯度或 EOF 梯度可大大增加有机酸的分离度。

2.1.5 矿物元素

食品中矿物元素虽含量少, 但在生物体内具有重要功能, 目前在食品基质用 CE 分析矿物元素应用最广泛和成熟。如矿泉水、苹果浆、果汁、花生酱、牛乳、奶酪及乳粉中的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子; 饮用水中的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 及 NH_4^+ 等离子。

食品基质中的阳离子可用间接紫外法检测, 也可转化为具有紫外吸收的化合物, 用直接紫外法测定。Kajiwara 等人用直接紫外法检测小麦面筋中的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 离子, 检出下限约 10^{-9} mol/L。对于无机阴离子采用 CIE 分析较成功, CIE 可以测定饮用水、矿泉水、牛奶、可乐、果汁、蔬菜汁、葡萄酒、酱油、面包、咖啡及其它食品中的 Br^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 F^- 、 CO_3^{2-} 等无机阴离子^[4]。

2.1.6 维生素

维生素是食品中微量存在的小分子营养物质, 是维持人体正常生理功能所必需的一类有机化合物。食品中某种维生素长期缺乏或不足将引起代谢紊乱和出现病理状态, 因此对食品中维生素的分析很重要。CZE 和 MEKC 均可测食品基质中总抗坏血酸, 如 Canclon 等人^[12]用 CZE 分离电化学检测柠檬汁中的 V_c 。MEKC 测定啤酒、果汁和蔬菜汁中 L -抗坏血酸。此外, CZE 也可一次同时检出食品基质中的盐酸吡哆胺、吡哆醇和吡哆醛等多种 B 族维生素^[10]。

2.1.7 功能成分的分析

目前, CE 也可用于对食品基质中的功能成分如生物碱和黄酮及其苷类方面物质的分析, 酚酸的分析也有报道, 如采用 CZE 模分离生物碱, 采用了 MEKC 及 CZE 两种方法对黄酮化合物分离。

3 食品添加剂的分析

食品添加剂是用于改善食品的品质、延长食品保存期、便于食品加工和增强食品营养成分的一类化学合成或天然物质。它在食品的制造加工、包装处理及感官评定等方面起了很大的作用。但是, 食品添加剂的广泛使用, 使公众产生了恐惧。因而, 食品添加剂的定量、定性分析, 是一个至关重要的方面。近来, 用 CE 法测定食品添加剂的报道日益增多, 可用 CZE 或 MECC 测定防腐剂、抗氧化剂、甜味剂、色素、发色剂、咖啡因和苯甲酸等混合添加剂。如用 CZE 测软饮料、酒、水果和浓缩果汁、人造黄油、果酱中的山梨酸检测极限为 0.06 g/L^[11]; MECC 测果汁、酒类、果酱、干酪片中的山梨酸和苯甲酸检测极限均为 0.1 g/L^[12]; MECC 测芝麻油、葡萄酒中的 BHQ、BHA、BHT、PG、没石子酸月桂酯、没石子酸、葵酯、 V_c 、植酸^[13]; CZE 测甜叶菊提取物中甜叶菊糖检测极限为 25~150 mg/L^[14]; CZE 测果汁饮料、冰淇淋靛蓝、坚固绿、柠檬黄、赤鲜红、亮蓝、靛蓝、朱红 4R 等, 检测极限 5 μ g/mL^[15]; CZE 测各类蔬菜、干酪、白菜、菜汤中硝酸盐和亚硝酸盐, 检测极限分别为 0.32、0.31 μ g/mL^[16]。

4 在食品加工贮运保存过程中由周围环境引起的污染物的分析

4.1 农药残毒

农药主要有两大类即杀虫剂和除草剂。人类食用被农药污染的粮食、水果、蔬菜、饮用水等食品后, 残留在其中的农药会贮存在人体内, 而且排泄缓慢, 最终可能造成急性或慢性中毒。现在, 许多国家已规定了食品中各种农药的残留限量。过去农药残留多用 GC、HLCP 和质谱(MZ)等方法检测, 随着 CE 技术的发展, CE 已广泛应用于农药残留的分析, 分离模式主要有 CZE 和 MEKC。目前 CZE 和 MEKC 已用于饮用水、牛乳、啤酒、谷物、马铃薯和猪肉等食品中的农药残留的测定。

Nemoto 等人用加压液相萃取 CZE 分离, 在紫外波长为 240 nm 处测定了大豆中的 6 种极性除草剂,

检出范围在 5.2~8.9 ng/g。最近,Sliva 等人^[17]研究了一种在线预富集技术,并与 MECC 联用,分析了水果和蔬菜中 9 种混和杀虫剂,检出限为 2~46 $\mu\text{g/L}$ 。MEKC 用于对饮用水和马铃薯中 2 种农药百草枯(Paraquat)和杀敌草快(Dquat)的残留,检出下限分别为 0.2 ng/mL、0.01 $\mu\text{g/g}$ 。费新平等^[18]采用高效毛细管电泳-安培检测法对农药甲基对硫磷、对硫磷、西维因和速灭威水解产物酚类进行了测定研究,测定检出限(mg/L):间-甲酚 0.04, α -萘酚 0.02,对硝基苯酚 0.03;对硫磷、速灭威和西维因回收率分别为 91.1%、94 % 和 101.1%,相对标准偏差分别为 3.3%、2.5% 和 2.2%。

4.2 毒素

生物毒素是细菌的代谢产物,有很强的的毒性,如控制不良很易对人体健康造成不良影响。Locke 和 Thibault^[4]利用毛细管涂层柱结合 MS 检测器,测定了扇贝中的 3 种麻痹性贝毒素,检测下限可达 10 ng/g。曾红燕等人^[19]用 MEKC 测定了玉米中赤霉烯酮及其代谢物,样品经液-液超声波提取, C_{18} 小柱净化后,测得玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZON)、 α -Zearalenol(α -ZOL)、 β -Zearalenol(β -ZOL)、黄曲霉 B1(AflatoxinB1, AFTB1)、赭曲霉 A(OchratoxinA, OchA)的检出限分别为:0.008 4、0.081、0.14、0.001 6、0.031 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 抗生素

由于抗生素被广泛用于饲料添加剂和各种动物药物中,因而在畜产品、水产品和蜂蜜制品中会有残留。据报道,一些四环素类抗生素如金霉素和土霉素用作食品保鲜剂,可延长富含蛋白质的食品、冷冻食品等的保质期^[20]。食品中的抗生素过多会损害人体健康。因此需对食品中抗生素残留量进行限制和监测。最近有报道用 CE 测定食品中抗生素的残留,如张兰等人^[21]用毛细管电泳/紫外检测法同时测定水产品中的四环素(TC)、金霉素(CTC)、土霉素(OTC)、多西环素(DC)及氯霉素(CAP)的含量,检测下限为 0.5~1.5 $\mu\text{g/mL}$ 。刘波静^[22]用毛细管电泳法检测了牛乳中 4 种抗生素,即氯霉素、四环素、土霉素和金霉素的残留,检测限分别为 10、15、15、20 $\mu\text{g/L}$ 。陈天豹等人^[23]用毛细管电泳法对蜂蜜中的 5 种残留抗生素——四环素(TC)、土霉素(OTC)、多西环素(DOC)、金霉素(CTC)和氯霉素(CP)进行了分离测定。检测极限分别为 20、20、20、40、10 $\mu\text{g/L}$ 。

5 小结

CE 作为一种高效分离技术已广泛应于食品分析的各个方面,由于其具有如下三方面的优势:(1)具有极高的灵敏度,特别适合进行痕量分析;(2)对样品的提取、浓缩、纯化和衍生等前处理过程没有严格的要求;(3)具有多种同的分离体系,分析方法极具灵活性,可以满足不同样品基质和待测成分的分析要求,所以 CE 在食品分析这一领域具有极大的发展潜力。

6 前景展望

随着 CE 技术不断发展,CE 已逐渐开始和分子技术相结合,两者的结合使得分析具有更高的灵敏性、专一性和高效性,可应用于许多领域,在食品工业中,可用于检测食品物质成分,致病菌和转基因生物。如 CGE 和分子技术结合能更好的运用于种类检定和微生物分析等方面。近年来有关 CGE 和聚合链(PCR)结合检测食品中的致病菌报道不多,但极高的灵敏性和能区分同种类中非常相似链的特点,使得其在微生物研究方面特别是转基因生物检测方面将扮演重要角色。

参考文献

- Paulus A, Klockow A. Detetion of carbohydrates in capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1996, 7(20):353~376
- Starr C. Fluorophore assisted carbohydrates in the separation analysis and sequencary of carbonhydrates[J]. J Chromatogr A, 1996, 7(20):292~321
- Jinharda R, Pervin A. Separation of negatively charged carbohydrates by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 1996, 7(20):323~335
- 杨晓泉,王学兵,张水平,等. 毛细管电泳在食品分析中的应用[J]. 食品与发酵工业,1998,25(5):58~63
- Klockow A, Figuericredo V. J Chro-matogr, 1993, 680:187
- 任一平,铁晓威,黄白芬,等. 毛细管电泳法测定食品中的低聚糖异麦芽糖含量[J]. 食品工业科技,2000,21(6):4
- 陈义,竺安. 毛细管区带电泳[J]. 色谱,1990,8(3):154
- Marcone A L de Oliveira, Gustavo A M, et al. Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 924:533~539
- Kajiwarra H, Sato A, Kaneko S. Biosci Biotech Biochem, 1993,547:1010

- 12 Panti T. The determination of sorbic acid and benzoic acid in variety of beverages and food by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Food Chem, 1995, 53:219~226
- 13 Boycemec S. Separation of food grade antioxidants(synthctic and natura) using mixed micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 1 970~1 975
- 14 Liuj L. Separation and determination of stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography[J]. J Lid Chroma, 1995, 18: 1 703~1 719
- 15 Laih, Zhut, Zhangy, et al. Determination of synthetic colourant foodaddtives by capillary zone electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 1995, 378:63~71
- 16 Jimidarm, Hartmannnc, Cousementn, et al. Determination of nitrate and nitrite invegetables by capillary electrophoresis with indirect detection[J]. J Chromatogr A, 1995, 706: 479~492
- 17 Silva C L, lima E C, Tavares M E. Investigation of preconcentration strategies for the trace analysis of multi-residue pesticides in real by capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 2003, 1 014(1~2):109~116
- 18 费新平,王立世,张水锋,等.毛细管电泳-安培检测法对甲基对硫磷、对硫磷、西维因和速灭威农药残留的测定研究[J].分析测试学报,2004,23(5):70~73
- 19 曾红燕,黎源倩,晋军.毛细管电泳法测定玉米赤霉烯酮及其代谢物[J].四川大学学报,2003,34(2):333~336
- 20 Fennema O R. Food Chemistry[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1985. 652~655
- 21 张兰,林子庵,谢增鸿.毛细管电泳用于水产品中五种抗生素的同时测定[J].分析测试技术与仪器,2004,10(1):18~23
- 22 刘波静.毛细管电泳法测定牛奶中残留的抗生素[J].中华预防医学杂志,2003,37(4):270~271
- 23 陈天豹,邓文汉,卢莞华,等.毛细管电泳法检测蜂蜜中残留的抗生素[J].色谱,2001,19(1):91~93

The Development and Application of Capillary Electrophoresis in Food Analysis

Meng Xiangping Liu Jianxue

(College of Food and Bioengineering, Henan Science and Technology University, Luoyang, 471003, China)

ABSTRACT The recent applications of capillary electrophoresis(CE) in food analysis were reviewed, mainly including the CE analysis methods of carbohydrates, amino acids, organic acids, minerals, vitamins, additives, pesticide residuals, toxins and antibiotics residuals in various foods. The common conclusion of CE and its development prospects were briefly outlined.

Key words capillary electrophoresis, food ingredient, food analysis

信
息
窗

美国研制出新甜味剂“降苦灵”

最近,一种可以减少苦味分子影响、以酵母为原料制造的低聚核苷酸和以DNA为基础的甜味剂化合物“降苦灵”,由美国新乔治州的生物技术香料公司林瓜杰公司开发成功,并已获得生产技术专利。

这种新甜味剂可用于改善食品、药品的味道,目前正在各大食品生产公司和制药公司试用。“降苦灵”可以直接添加进食品、饮料和保健食品、医药品中,达到减轻苦味,增加甜味的目的。新甜味剂能给予大脑神经以刺激,从而在口中释放出一种能阻碍苦味知觉的蛋白质多肽。事实上,“降苦灵”防御舌的细胞感受到苦味分子,与苦味柚子、咖啡因和镇痛剂“伊布浦洛菲”制品中的柚皮苷之类引发的苦味感受类同。“降苦灵”对其他味觉无阻碍作用。该产品是天然物质,所以是安全的,预计有关部门将在今后制定用于食品和饮料的法规,该公司希望该甜味剂在试用18个月后被批准正式使用。现在已有2~3家食品材料生产公司正式研究引用该专利技术,生产制造该甜味剂新产品。在加工食品中添加使用“降苦灵”,还可减少加工食品砂糖和钠盐的用量,并成为更适于保健的加工制品。

目前该公司正在开发更多以DNA为基础的合成甜味剂和食盐替代品,并计划在今后几年内,将这些新产品投入商品化生产,供应添加剂市场。