

超声萃取-高效液相色谱法同时测定进出口食品中常见6种防腐剂

林 源, 赵 涛, 张兆辉

(番禺出入境检验检疫局, 广东 广州 511400)

摘 要: 使用超声萃取-反相高效液相色谱(HPLC)技术, 建立同时分离和检测食物中苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯6种防腐剂的方法。水-甲醇(5:95, V/V)作为提取溶剂进行超声萃取, 采用 Supelco Discovery C₁₈ 反相色谱柱, 流动相为乙腈-乙酸铵缓冲溶液(pH4.4)进行梯度洗脱, 在1ml/min的流速和254nm的检测波长下14min内6种防腐剂得到良好分离。6种防腐剂线性范围从5 μg/ml到100 μg/ml, 相关系数(r)为0.9997~1.0000。方法的平均回收率为90.1%~106.3%, 精密度和稳定性的RSD分别为0.58%~1.79%、0.15%~1.65%, 检出限的范围为0.012~0.43 μg/ml。本方法的预处理过程简便、快速, 应用于30种进出口食品中防腐剂的检测, 检测结果灵敏、可靠。

关键词: RP-HPLC; 超声萃取; 同时测定; 防腐剂; 食品

Ultrasonic Extraction - High Performance Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of 6 Common Preservatives in Imported and Exported Foods

LIN Yuan, ZHAO Tao, ZHANG Zhao-hui

(Panyu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 511400, China)

Abstract: An ultrasonic extraction-reversed phased HPLC method was developed for the simultaneous separation and determination of 6 common preservatives such as benzoic acid, sorbic acid, methylparaben, ethyl P-hydroxybenzoate, nipasol and butyl P-hydroxybenzoate. Samples were extracted with the mixture of water and methanol (5:95, V/V) in ultrasonic field. The gradient elution was carried out on a Supelco Discovery C₁₈ column, with an initial mobile phase of acetonitrile-acetate buffer (pH 4.4) and at the flow rate of 1.0 ml/min. The detector wavelength was set at 254 nm. Under these conditions, the separation of the 6 components was achieved within 14 min. The linear ranges for the determination 6 preservatives by this method were from 5 to 100 μg/ml with a correlation coefficient (r) of 0.9997-1.000, and the limits of detection were 0.012-0.43 μg/ml. The average recoveries for the 6 preservatives in sample spiked at three levels (10, 50 and 100 μg/g) were 90.1%-106.3% (n = 3). The RSDs of precision and stability were 0.58% - 1.79% (n = 5) and 0.15% - 1.65%, respectively. Finally, this method was applied to analysis of these preservatives in 30 different imported and exported food samples. Altogether, the pre-treatment procedure of the developed method is simple and rapid, and the result is sensitive and accurate.

Key words: RP-HPLC; ultrasonic extraction; simultaneous determination; preservative; foods

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0198-04

随着食品工业的发展, 食品添加剂已成为不可或缺的物质, 防腐剂是一类以保持食品原有性质和营养价值为目的的食品添加剂。苯甲酸和山梨酸都是常用的防腐剂, 广泛使用在饮料、方便食品、调味品等各种食品中。对羟基苯甲酸烷基酯即尼泊金酯, 是新一代消毒杀菌防腐剂, 它具有低毒、高效、用量少等优点。随着对-羟基苯甲酸酯类烷基链长的增加, 其在水中的溶

解度降低, 而毒性却相反。但几种不同的脂复配使用可提高溶解度, 并有增效作用^[1]。

定量检测这些防腐剂不仅是为了保证产品的质量, 更重要的是保护了消费者的利益。目前有关苯甲酸、山梨酸或对-羟基苯甲酸酯类防腐剂的测定多采用高效液相色谱法(HPLC)^[2-11], 其他的分析方法如气相色谱法(GC)^[12]和薄层色谱法(TLC)^[13]也有报道, 但很多报道都是单独

收稿日期: 2008-09-01

作者简介: 林源(1979-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品分析。E-mail: linyuans@126.com

检验苯甲酸、山梨酸或对-羟基苯甲酸酯类。已有的报道中用 HPLC 法同时检验苯甲酸、山梨酸和对-羟基苯甲酸酯类比较少,特别是在食品中;且已报道的方法中,预处理过程都相当的麻烦,如采用固相萃取柱进行分离和富集或只测其中的少数几种防腐剂,且分析时间较长^[14-15]。现在很多食品中添加了一种、两种甚至多种防腐剂,且加入的防腐剂具有随意性和不确定性,因此,建立一种能同时测定这些食品添加剂的方法十分重要。本实验建立只需一步超声提取的反相高效液相色谱法,简化了样品预处理过程,缩短样品的分析时间,以期能同时分离和测定苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯 6 种食品添加剂。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

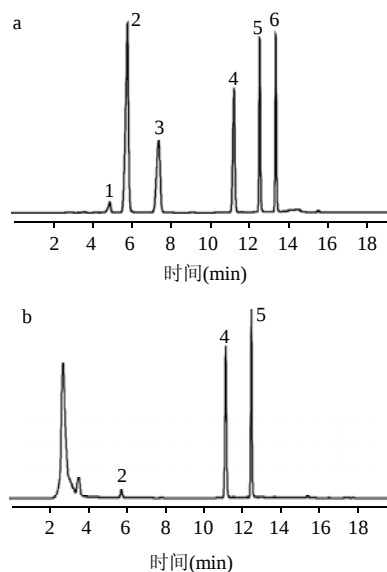
蚝油等 30 种样品 市购。

乙腈、甲醇(色谱纯) 德国 Merck 公司;乙醇、乙酸胺(分析纯) 广州化学试剂厂;二次蒸馏水,苯甲酸、山梨酸和对-羟基苯甲酸甲酯对照品 Supelco 公司;对-羟基苯甲酸乙酯、对-羟基苯甲酸丙酯和对-羟基苯甲酸丁酯 Dr 公司;所有试剂纯度都大于 98%。

1.2 仪器与设备

Agilent1200 型高效液相色谱仪(配 Agilent 色谱工作站、自动进样器、真空脱气机、四元泵和紫外、二极管阵列检测器;Elix/RIOS 自动纯水系统;HN1006B 型超声仪 中国华南超声设备厂。

1.3 液相色谱条件



1. 苯甲酸; 2. 山梨酸; 3. 对羟基苯甲酸甲酯; 4. 对羟基苯甲酸乙酯; 5. 对羟基苯甲酸丙酯; 6. 对羟基苯甲酸丁酯; a. 混合对照品; b. 蚝油。

图 1 混合对照品和蚝油的 HPLC-VWD 图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixture of 6 standard preservatives (a) and pretreated oyster sauce (b)

色谱柱: Discovery C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm) 美国 Supelco 公司; 流动相: A 相为乙酸铵缓冲溶液(pH4.4), B 相为乙腈。流速: 1ml/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 254nm^[15]; 进样量为 20 μl。线性梯度程序为: 开始 30% B; 保持 6min; 6~10min 内 B 相从 30% 升到 80%; 10~15min 内 B 相从 80% 降至 70%; 15~20min 内 B 相从 70% 降至 30%。在此条件下得到的色谱图如图 1。

1.4 样品制备

准确称取各测定样品约 1.0g, 置 25ml 容量瓶中, 加溶剂水: 甲醇(5:95, V/V)20ml, 超声 35min, 冷却至室温, 用溶剂定容至刻度, 混匀、离心, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 提取条件优化

实验比较了甲醇、乙醇、不同比例的甲醇和水的提取溶剂, 结果表明水: 甲醇(5:95, V/V)为提取溶剂时提取率最高(图 2), 且提取后杂质峰较少。同时对提取时间进行考察, 最后确定超声提取时间为 35min。

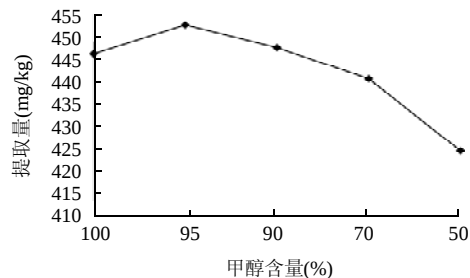


图 2 不同比例甲醇溶剂对样品中防腐剂提取量的影响

Fig.2 Effects of volume of methanol to water on extraction yield of preservative

2.2 分析条件的优化

为了得到快速高效的色谱条件, 分别对流动相、梯度程序和流速进行优化。苯甲酸和山梨酸在中性条件下峰型不对称, 因此选用乙酸铵缓冲溶液(pH4.4)代替水相, 消除了峰的不对称现象。当选用与提取溶剂相同的溶剂甲醇为有机相时, 峰都有明显的前伸, 因此改用乙腈为有机相, 有效地消除前伸峰现象。经多次反复实验筛选比较, 最终选用的流动相: A 相为乙酸铵缓冲溶液(pH4.4), B 相为乙腈。为了选择最佳的洗脱条件分离 6 种物质, 曾使用了不同的线性梯度洗脱程序分离测定, 结果线性梯度程序为: 开始 30% B; 保持 6min; 6~10min, 30%~80% B; 10~15min, 80%~70% B; 15~20min, 70%~30% B(见 1.3 节)。此条件下色谱峰

形对称, 分离度好。较高的流速可以得到较快的分离, 但是过高的流速会造成柱效降低, 综合考虑以 1.0ml/min 的流速为分析流速。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线

在 1.2 节所述色谱条件下, 各成分标准溶液分别在 5 个浓度点, 平行测定 3 次。以平行测定的平均峰面积与对照品的绝对进样量计算, 得回归方程、线性范围、相关系数和检出限($S/N=3$)见表 1。结果表明各成分在各自浓度范围内线性关系良好。

表 1 各成分标准曲线和检出限

Table 1 Regression equations and limits of detection for 6 preservatives

对照品	回归方程	相关系数	线性范围($\mu\text{g/ml}$)	检出限($\mu\text{g/ml}$)
苯甲酸	$y=7.0233x-4.6289$	1.0000	5~100	0.43
山梨酸	$y=249.6x+74.4$	0.9998	5~100	0.012
对-羟基苯甲酸甲酯	$y=122.89x+32.179$	0.9998	5~100	0.024
对-羟基苯甲酸乙酯	$y=112.92x+30.005$	0.9998	5~100	0.027
对-羟基苯甲酸丙酯	$y=101.91x+37.973$	0.9997	5~100	0.029
对-羟基苯甲酸丁酯	$y=96.976x+50.17$	0.9997	5~100	0.031

2.3.2 重复性、稳定性及回收率实验

表 2 方法学考察结果

Table 2 Results of method evaluation (RSDs of precision and stability and average spike recoveries)

对照品	RSD(%)		添加量 ($\mu\text{g/g}$)	平均回收率 (%, $n=3$)
	精密度($n=5$)	稳定性($n=6$)		
苯甲酸	1.63	1.65	10	102.0
			50	96.7
			100	94.7
山梨酸	1.79	0.15	10	101.0
			50	96.8
			100	97.0
对-羟基苯甲酸甲酯	1.12	0.18	10	105.5
			50	99.0
			100	95.7
对-羟基苯甲酸乙酯	1.74	0.15	10	106.3
			50	102.2
			100	98.0
对-羟基苯甲酸丙酯	0.72	0.24	10	91.8
			50	95.4
			100	94.3
对-羟基苯甲酸丁酯	0.58	0.24	10	91.3
			50	90.1
			100	93.2

以 6 种标准品的混合溶液, 重复进样 5 次, 以峰面积值为指标计算相对标准偏差(RSD), 考察方法的精密度。以 6 种标准品的混合溶液, 分别在 0、2、4、8、16 和 24h 测定各成分含量, 以峰面积值为指标计算

RSD 值, 考察方法的样品稳定性。在已知各成分含量的供试品溶液中分别定量加入各成分标准品, 考察方法的平均回收率。精密度、稳定性及回收率结果见表 2, 从表 2 可知精密度和稳定性的 RSD 值都小于 2%, 回收率在 90.1%~106.3%。

2.4 样品的测定

为了考察本实验的适用性, 测定了 8 个不同厂家的 16 种出口调味品、6 种进口果馅和 8 种保健品, 其中有 2 种酱料加了苯甲酸, 11 种加了山梨酸, 2 种加了对-羟基苯甲酸乙酯, 1 种加了对-羟基苯甲酸丙酯, 其余的 14 个样品都同时添加了几种防腐剂。结果见表 3。

表 3 样品中防腐剂的含量

Table 3 Contents of 6 preservatives in 30 different imported and exported food samples determined by this method

序号	样品 (厂家)	含量($\mu\text{g/g}$)					
		苯甲酸	山梨酸	对-羟基苯甲酸甲酯	对-羟基苯甲酸乙酯	对-羟基苯甲酸丙酯	对-羟基苯甲酸丁酯
1	耗油(1)	ND	555.53	ND	ND	ND	ND
2	海鲜酱(1)	ND	422.22	0.45	53.76	ND	ND
3	叉烧酱(1)	ND	381.48	ND	ND	ND	ND
4	四川酱(2)	ND	346.20	ND	54.19	ND	28.79
5	耗油(2)	ND	425.20	ND	ND	ND	ND
6	生抽(2)	ND	ND	ND	ND	433.08	ND
7	耗油(3)	ND	ND	ND	216.74	224.14	ND
8	海鲜酱(3)	ND	ND	ND	239.40	235.01	ND
9	黄豆酱(3)	ND	ND	5.08	116.13	115.28	ND
10	金标生抽(3)	722.36	ND	ND	ND	ND	ND
11	生抽王(4)	ND	329.55	ND	ND	ND	ND
12	鲍鱼汁(5)	ND	425.89	ND	ND	ND	ND
13	精选老抽(6)	356.21	ND	ND	ND	ND	ND
14	金标蚝油(6)	ND	1.58	ND	223.56	232.41	ND
15	生抽王(7)	ND	ND	ND	103.01	92.85	ND
16	柱候酱(8)	ND	262.54	9.05	189.47	ND	ND
17	巧克力果胶	ND	675.15	ND	ND	ND	ND
18	蓝莓水果肉馅	ND	718.97	ND	ND	ND	ND
19	苹果水果肉馅	ND	750.28	ND	ND	ND	ND
20	菠萝水果肉馅	ND	713.35	ND	ND	ND	ND
21	凤梨馅	ND	332.93	ND	ND	ND	ND
22	纯正红莲蓉	ND	675.10	ND	ND	ND	ND
23	大豆蛋白粉	ND	ND	ND	0.97	0.86	1.14
24	大蒜浓缩物软胶囊	ND	ND	ND	1409.87	ND	ND
25	鲨鱼提取物软胶囊	ND	ND	ND	601.65	60.67	ND
26	鱼胶原蛋白软胶囊	ND	ND	ND	689.73	3.22	ND
27	多种纤维素复合胶囊	ND	ND	ND	61.76	41.58	72.09
28	贯叶连翘提取物复合胶囊	ND	55.44	125.74	190.86	ND	ND
29	月见草油软胶囊	ND	ND	ND	566.24	240.82	ND
30	番茄提取物软胶囊	ND	ND	ND	1060.44	ND	ND

注: ND. 低于本方法检出限。

3 结论

本研究采用 HPLC 和 95% 甲醇溶液一步超声提取, 实现了调味品(16 种)、果酱(6 种)和保健品(8 种)中 6 种防

腐剂的分离和测定,简化了样品预处理过程,缩短了样品的分析时间。样品分析结果表明,不同厂家的相同样品,加入防腐剂的种类是不同的,很多样品中都同时添加了几种防腐剂,所以该方法也有较强的实际应用价值。

参考文献:

- [1] 凌关庭,唐述潮,陶民强.食品添加剂手册[M].北京:化学工业出版社,2003: 646.
- [2] GARCIA I, ORTIZ M C, SARABIA L. Advances in methodology for the validation of methods according to the international organization for standardization - application to the determination of benzoic and sorbic acids in soft drinks by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 992(17): 11-27.
- [3] WEN Y, WANG Y, FENG Y Q. A simple and rapid method for simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in food using in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388: 1779-1787.
- [4] ITTIPON T K K, RANEE S K K. Analysis of benzoic acid and sorbic acid in Thai rice wines and distillates by solid-phase sorbent extraction and high-performance liquid chromatograph[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20(3/4): 220-225.
- [5] HAJKOVA R, SOLICH P, POSPISILOVA M. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 467(1/2): 91-96.
- [6] 陈青川,于文莲,王静.高效液相色谱法同时测定多种食品添加剂[J]. *色谱*, 2001, 19(2): 105-108.
- [7] THOMASSIN M, CAVALLI E, GUILLAUME Y. Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15(6): 831-838.
- [8] MIKAMI E, GOTO T, OHNO T. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 28(2): 261-267.
- [9] SOTTOFATTORI E, ANZALDI M, BAIBI A. Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 18(1/2): 213-217.
- [10] LABAT L, KUMMER E, DALLET P. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, 23(4): 763-769.
- [11] GROSA G, GROSSO E D, RUSSO R. HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(3): 798-803.
- [12] GONZALEZ M, GALLEGOM, VALCARCEL M. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 848(1/2): 529-536.
- [13] BAYOUMI-EL, TAWAKKOL M S, DIAB J M. Spectrodenditometric determination of methyl and propyl parabens benzoic and sorbic acids in bulk powder, foods, and pharmaceutical formulatuions[J]. *Spectroscopy letters*, 1997, 30(2): 355-366.
- [14] 黄百芬,张文娟,沈向红.高效液相色谱法同时测定酱油或饮料中的8种防腐剂和3种甜味剂[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(10): 1208-1211.
- [15] BAHRUDDIN S, MD F B, MUHAMMAD I S. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1073(1): 393-397.