

高效液相色谱法测定高脂类酱腌菜中 苯甲酸、山梨酸的含量

尹桂豪, 韩红新, 徐 志

(中国热带农业科学院 分析测试中心, 海南 海口 571101)

摘 要: 建立了高效液相色谱法测定高脂类酱腌菜中苯甲酸、山梨酸含量的测定方法. 样品用乙醚高速匀浆的方法提取后, 通过改变其酸碱度而改变其在有机相和水相中分配比的方法, 去除脂肪等杂质的干扰, 采用 C_{18} 分离柱, 用甲醇: 乙酸胺溶液(5: 95, V/V) 作为流动相, 检测波长为 230 nm, 同时测定苯甲酸、山梨酸. 2 种组分的检出限分别为 0.3 mg/kg、0.25 mg/kg, 回收率在 94.1% ~ 105.0% 之间, 测定结果的相对标准偏差为 1.3% ~ 2.1%.

关键词: 高效液相色谱法; 苯甲酸; 山梨酸

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2007)04-0268-04

当前, 酱腌菜类食品质量安全已成消费者关心的热点问题. 防腐剂是酱腌菜类添加剂中引起高度重视的最大一个品种, 苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸和山梨酸钠都是常用的防腐剂. 由于在一定条件下能对霉菌和酵母的繁殖起到抑制作用, 能延长食品保存时间, 广泛应用于碳酸和果汁饮料、果酒、酱菜、蜜饯、果冻、糕点、酱油、食醋和调味料^[1,2]. 如果使用量过大就会对人体带来一定的危害. 国家标准 GB2760《食品添加剂使用卫生标准》规定, 酱菜加工中可以添加苯甲酸和山梨酸, 最大使用量不能超过 0.5 g/kg, 而绿色食品标准 NY/T 437-2000《绿色食品酱腌菜》规定, 苯甲酸不得检出, 山梨酸不能超过 0.25 g/kg. 在实际生产中超标使用和非法使用的现象时有发生. 国家标准 GB/T 5009.29-2003 规定了气相色谱法、液相色谱法和薄层色谱法测定酱油、水果汁和果酱等中的苯甲酸和山梨酸的测定. 但该方法应用于高油脂类酱腌菜中防腐剂的测定, 就会出现油脂的干扰, 影响检测结果的准确度. 目前多数文献报道使用国标方法气相色谱法检测, 多数采用分流 20 倍以上的进样方法, 对于禁止使用的产品检测, 就存在着一定的漏检风险. 本研究采用乙醚双萃取的高效液相色谱法检测, 建立了一种既准确又可靠的检测高脂类酱腌菜中苯甲酸和山梨酸的方法.

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪: Waters 紫外可见检测器 (Waters 公司). 色谱柱: XTerra® RP18 4.6mm × 250mm × 5μm (Waters 公司).

岛津 UV-1601 紫外分光光度计 (日本 SHIMADZU 公司).

高速分散均质机: 1 000~ 20 000 rpm (上海标本模型厂).

旋转蒸发器: R-210 (瑞士 buchi 公司).

乙酸胺溶液 (0.02 mol/L): 称取 1.54 g 乙酸胺, 加水至 1 000 mL, 溶解, 过 0.45 μm 滤膜.

盐酸 (1+1): 分析纯.

氢氧化钠溶液: 0.1 mol/L.

乙醚: 分析纯.

甲醇: 色谱纯.

样品: 黄花什锦、麻辣三丝、红油豆瓣酱、郫县豆瓣 (产地均来自四川); 豆瓣酱 (产地山东); 油辣椒 (产地贵州), 购自广西超市; 辣椒酱、豆瓣酱 (散装和有包装), 购自海口市农贸市场.

标准溶液: 准确称取苯甲酸、山梨酸 (国家标准物质中心) 各 0.05 g 用丙酮定容至 100 mL 容量瓶

收稿日期: 2007-07-26; 修订日期: 2007-09-05.

作者简介: 尹桂豪 (1975—), 男, 工程师, 从事热带农产品 (食品) 质量安全分析及研究.

中. 临用时用流动相将上述混标稀释成 1、2、4、8、10 和 20 mg/L 标准使用液.

1.2 样品测定

称取 2.50 g 混合均匀的样品, 置于 50 mL 具塞离心管中, 加入 0.5 mL 盐酸(1+ 1)酸化, 加入 25 mL 乙醚, 高速匀浆 1 min, 静置分层 1 min, 将乙醚层转入 125 mL 分液漏斗中, 加入 50 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 振荡 1 min, 静置分层后, 弃去上层有机相, 再加入 20 mL 乙醚, 振荡, 静置分层后, 弃去上层有机相. 用盐酸(1+ 1)溶液调 pH 值到 1~ 2, 用 25 mL 乙醚萃取, 收集有机相, 旋转蒸发近干, 用流动相定容至 2 mL, 过滤膜供液相色谱分析.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测器及检测波长的选择

取稀释适当浓度的苯甲酸和山梨酸标准溶液, 在 UV-1601 紫外可见分光光度计于 190~ 400 nm 处进行波长扫描, 得到苯甲酸和山梨酸标准最大紫外吸收波长分别为 225 nm 和 234 nm. 为了兼顾两种被测组分的灵敏度, 本文采用测定波长为 230 nm.

2.1.2 流动相的选择

采用甲醇-乙酸胺溶液作流动相, 采用甲醇与乙酸胺溶液二者不同体积比 3: 97、5: 95、8: 92 进行实验, 得出当甲醇与乙酸胺溶液的体积比 5: 95 时, 可以同时得到样品中两组分的较大峰面积, 灵敏度最高, 苯甲酸的保留时间为 5.81 min, 山梨酸的保留时间为 8.28 min, 见图 1 与图 2(色谱条件: 流动相为甲醇: 乙酸胺溶液(5: 95, V/V); 流速

1 mL/min; 检测波长 230nm; 进样量 10μL; 根据保留时间定性, 峰面积定量).

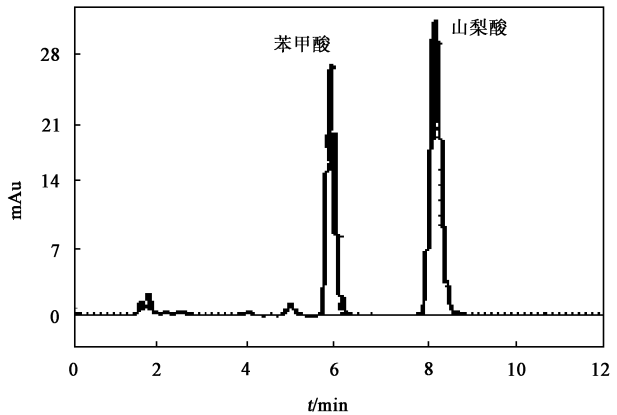


图 2 油辣椒样品色谱图

Fig. 2 The standard chromatogram of fried pepper sauce

2.2 样品前处理

2.2.1 提取溶剂的选择

选用乙醚和石油醚+ 乙醚(3+ 1)两种溶剂对样品进行提取, 发现两种溶剂提取效果基本一致, 考虑到石油醚中杂质对后续检测有一定的影响, 选择乙醚作为提取溶剂和去除脂肪溶剂.

2.2.2 匀浆和提取次数的选择

根据文献[3]采用高速均质机匀浆提取, 匀浆时间选择 0.5、1.0、2.0 min, 发现匀浆 0.5 min 提取不完全, 匀浆超过 1.5 min 以上, 离心管开始发热, 容易产生乙醚的挥发. 综合考虑, 选择匀浆 1 min. 同时, 在匀浆次数和去脂肪后的提取次数测试中, 匀浆 1 次就可以满足检测的要求, 提取 1 次和 2 次的差别不大, 理论上 2 次提取可以将样品中的苯甲酸和山梨酸提取充分, 考虑简化前处理过程, 乙醚对人体的危害, 选择 1 次提取法. 结果见表 1.

2.3 标准曲线与检出限

配制浓度为 1、2、4、8、10、20 mg/L 的苯甲酸、山梨酸混标溶液进行分析, 当组分浓度在 5~ 100 mg/L 之间时, 线性回归方程、相关系数、3 倍信噪比计算检出限结果见表 2.

2.4 加标回收实验

向空白样品(不含苯甲酸和山梨酸酱腌菜)中加入一定量的苯甲酸、山梨酸混合标准溶液, 验证方法的回收率和准确度见表 3.

2.5 实际样品检测结果

从超市和市场中购买的酱腌菜, 有 8 个样品检

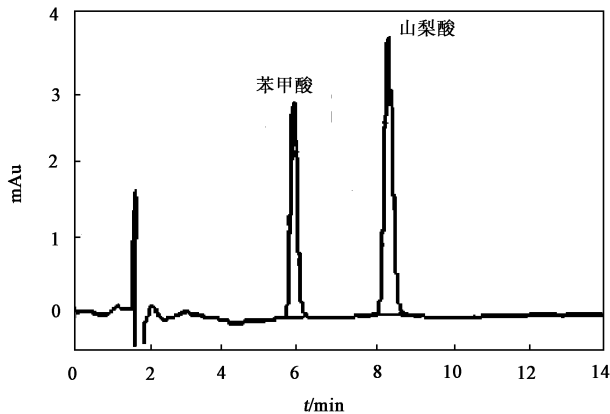


图 1 苯甲酸、山梨酸标准色谱图

Fig 1 The standard chromatogram of benzoic acid and sorbic acid

表 1 不同提取次数的回收试验结果($n= 5$)

Table 1 Results of recovery experiments ($n= 5$)

样品名称	提取次数	组分	本底值/ μg	添加量/ μg	实测量/ μg	回收率/%	RSD/ %
黄花什锦	1 次	苯甲酸	0	10.0	9.23	92.3	1.5
		山梨酸	0	10.0	9.42	94.2	1.6
	2 次	苯甲酸	0	10.0	9.18	91.8	1.3
		山梨酸	0	10.0	9.54	95.4	1.8

表 2 线性回归方程、相关系数和检出限($n= 6$)

Table 2 Regression equation correlation coefficient and detection limit($n= 6$)

组分	回归方程	相关系数 r^2	检出限/ mg/kg
苯甲酸	$y= 3.206 \times 10^4 x+ 6.087 \times 10^3$	0.999	0.30
山梨酸	$y= 6.053 \times 10^4 x- 2.327 \times 10^4$	0.997	0.25

表 3 回收试验结果($n= 5$)

Table 3 Results of recovery experiments ($n= 5$)

组分	添加量/ μg	实测量/ μg	回收率/%	RSD/ %
苯甲酸	5.00	5.23	105.0	2.1
	10.0	9.41	94.1	1.4
	20.0	19.10	95.5	1.6
山梨酸	5.00	4.95	99.0	2.2
	10.0	9.52	95.2	1.3
	20.0	19.3	96.5	1.7

出苯甲酸(0.16 ~ 0.84 g/kg),4 个样品检出山梨酸(0.13 ~ 0.29 g/kg).

3 结论

采用溶剂去油脂的高效液相色谱法检测高脂类酱腌菜中的苯甲酸和山梨酸,含量准确度和精密度较好,可以满足绿色食品酱腌菜的质量监测要求,减少了毛细管柱气相色谱分析分流分析带来的检测风险.

参考文献:

[1] 林海. 对国家标准中苯甲酸、苯甲酸钠使用范围及限量的补充[J]. 监督与选择, 2003, 10: 45.
[2] 杨华. 山梨酸生产应用与市场分析[J]. 化工中间体, 2003, 24: 14.
[3] 陈子雷. 气相色谱法测定高脂类食品中山梨酸、苯甲酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (12) : 1471-1472.

High performance Liquid Chromatography for Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acidin in Soybean paste and salted vegetable

YIN Gui-hao, HAN Hong-xin, XU Zhi

(Analysis and Testing Center of Chinese

Academy of Tropic Agriculture Science, Haikou 571101, China)

Abstract: A method for the determination of sorbic acid and benzoic acid in Soybean paste and salted

vegetable was established. The sample was mashed at a high speed meanwhile sorbic acid and benzoic acid was extracted by diethyl ether. The fat in the sample would be removed by changing the pH of the liquor. Sorbic acid and benzoic acid were detected by HPLC. Using C₁₈ stainless column with methanol/Ammonium acetate (5: 95, V/V) measure sorbic acid and benzoic acid, detection wave length was 230 nm. The limit of detection (LOD) were 0.3 mg/kg for benzoic acid and 0.25 mg/kg for sorbic acid. The recovery was between 94.1%~105.0% and the relative standard deviation was between 1.3%~2.1%.

Key words: HPLC; benzoic acid; sorbic acid

Classifying number: 0657.32

仪器行业专门的在线技术交流平台— 仪器论坛

仪器论坛(<http://bbs.instrument.com.cn>)是由仪器信息网(<http://www.instrument.com.cn>)与中国分析测试协会、北京大学化学系、清华大学分析中心等多个单位共同建设,也是仪器行业内有影响力的技术交流平台,每天都有2万多人访问论坛,每日发帖量超过1500篇。仪器论坛有着良好的互助氛围,只要有人在论坛提出自己的问题和疑惑,总会有很多热心的同行积极地帮忙寻找答案,从而通常提问者都能得到满意的专业答复,同时还有可能在交流的同时找到真正志同道合的朋友

论坛由具有丰富仪器行业工作经验的工作人员和专家根据仪器种类和应用领域划分为150余个版块,如最热门的液相色谱、气相色谱、原子吸收光谱、质谱、物性测试、RoHS/WEEE指令等版块。

仪器论坛还最新推出"厂商论坛"和"产品论坛",让仪器厂商以公司名义在仪器论坛开设专门版面,充分利用仪器论坛这个平台为广大用户提供方便的在线售前售后服务和咨询,同时也方便使用同一公司仪器的用户们能够更有针对性的进行技术交流。仪器论坛中的厂商论坛都由厂商指定的销售和技术支持人员担任版主为大家服务,所提供的信息和技术资料都是官方正式的、值得信赖的信息。目前已有江苏汉邦、上海伍丰、岛津、安捷伦四家仪器公司开设了厂商论坛或产品论坛,欢迎这些厂商的用户及对这两家公司的产品感兴趣的用户前往相应版面参加讨论。

为更好地建设仪器论坛,我们衷心希望更多的用户能加入到版主队伍中来,和我们一起共同建设这个仪器行业难得的技术交流平台。目前已经有100多位热心用户在论坛中担任版主为大家服务,其中既有经验丰富的仪器操作人员,也不乏行业内著名的分析专家。做版主是一个义务性质的工作,在为大家服务的同时,自己也可以得到提高并结交新朋友。论坛每半年会评选一次优秀版主,获奖版主将得到1000~3000元不等的奖金。申请版主者必须是仪器信息网已注册的认证VIP用户,有一定的专业技术背景和空闲时间,原则上注册时间超过3个月,论坛发帖量超过50篇。

版主在线申请: <http://www.instrument.com.cn/resume/bm.asp>

论坛客服电话: 010-51299927-104

E-Mail: xiaoyu@instrument.com.cn; 4077@instrument.com.cn

(仪器信息网 www.instrument.com.cn 供稿)

2007-6-11