

高效液相色谱法同时测定酱油中 6 种防腐剂

郑晓冰, 赵质创, 朱 虹, 黄文水
(汕头市质量计量监督检测所, 广东 汕头 515041)

摘 要: 建立高效液相色谱法同时测定酱油中 6 种常见防腐剂(苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、3 种对羟基苯甲酸酯)的检测方法。样品经 20% 甲醇溶液提取后, C_{18} 色谱柱分离, 以甲醇-1.55 g/L 乙酸铵溶液为流动相梯度洗脱, 采用二极管阵列检测器检测, 结果显示, 6 种组分分离完全, 线性良好, 加标回收率为 89%~103%, 相对标准偏差为 1.09%~2.81%。该方法灵敏度高、选择性好、回收率高、简单快捷, 能满足常规检测及酱油食品的安全控制需要。

关键词: 高效液相色谱; 防腐剂; 同时测定; 酱油

Simultaneous Determination of Six Preservatives in Soya Sauce by High Performance Liquid Chromatography

ZHENG Xiao-bing, ZHAO Zhi-chuang, ZHU Hong, HUANG Wen-shui
(Shantou Institute of Supervision and Quality and Metrology, Shantou 515041, China)

Abstract: In this paper, we report a method that allows the simultaneous determination of 6 preservatives including benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid and 3 p-hydroxybenzoates in soya sauce. The preservatives in samples were extracted with 20% methanol, separated on a C_{18} column using a mobile phase made up of methanol and 1.55 g/L ammonium acetate, and detected with a diode array detector. All six preservative compounds were separated successfully and showed a good linear relationship between their concentrations and peak areas. The mean recovery rates across three spike levels were 89%—103% with a RSD ranging from 1.09% to 2.81%. Our results demonstrate that this method is sensitive, selective, simple, convenient and high-recovery and allows the routine determination and food safety control of soya sauce.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); preservatives; simultaneous determination; soya sauce
中图分类号: O657.7; TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)22-0213-03

苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸以及对羟基苯甲酸酯类是食品行业中常用的食品防腐添加剂。这些防腐剂虽然有良好的防腐作用, 但也有一定的毒性。我国标准 GB 2760—2011《食品添加剂使用卫生标准》^[1]中明确规定酱油中防腐剂的使用种类和限量标准, 因此, 建立快速、同时检测多种防腐剂的方法对于食品行业的监管意义重大。

目前, 关于测定食品中防腐剂的方法研究很多, 多采用液相色谱法和气相色谱法^[2-13], 但大多数均需分类测定, 特别是对羟基苯甲酸酯类的检测, 国标方法使用填充柱气相色谱法, 过程较为繁琐。同时检测 6 种防腐剂(苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸酯)的研究仍较少, 标准 SN/T 1303—2003《蜂王浆中苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类检验方法》对苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类的同时测定进行研究,

但分离效果较差, 分离度过低。本实验对酱油中常见的 6 种防腐剂的同时测定进行研究, 拟建立酱油中常用防腐剂的快速准确检测技术, 满足实际应用要求。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

甲醇(色谱纯); 对羟基苯甲酸甲酯(尼泊金甲酯)、对羟基苯甲酸乙酯(尼泊金乙酯)、对羟基苯甲酸丙酯(尼泊金丙酯) 美国 Sigma 公司; 苯甲酸、山梨酸标准溶液(1.00 mg/mL) 国家标准物质研究中心; 脱氢乙酸 美国 Supelco 公司。

标准储备液: 称取 100 mg 脱氢乙酸, 用水溶解后定容于 100 mL 的容量瓶中; 分别称取尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯各 100 mg 用甲醇溶解并定容至 100 mL 的容量瓶中, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的标准

收稿日期: 2011-01-17

作者简介: 郑晓冰(1982—), 女, 硕士, 研究方向为食品检验检测。E-mail: narcissus.b@163.com

储备液,贮存于0~4℃冰箱中。混合标准液:分别吸取1mL脱氢乙酸储备液、尼泊金酯类储备液以及苯甲酸、山梨酸标准溶液于25mL容量瓶中,用水定容至刻度,配制成0.04mg/mL的混合标液。

1.55g/L乙酸铵溶液:称取1.55g乙酸铵,用适量水溶解并定容至1000mL。

1200 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器DAD)美国Agilent公司;超声波水浴器 上海科导超声仪器有限公司;无机滤膜(聚醚砜)和有机滤膜(尼龙)(13mm×0.45μm) 上海安谱科学仪器有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C-18柱(250mm×46mm, 5μm);流动相A为甲醇,流动相B为1.55g/L乙酸铵溶液,洗脱条件见表1;流速:1.0mL/min;柱温40℃;进样量10μL。

表1 HPLC梯度洗脱条件

Table 1 Mobile phase composition for HPLC gradient elution

时间/min	0	10	12	22
流动相A	20	20	70	70
流动相B	80	80	30	30

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的制备

将混合标液用纯水稀释配制成质量浓度为1、2、4、8、16μg/mL的标准混合溶液,进液相色谱分析,以各标准峰的保留时间定性,峰面积外标法定量,绘制标准曲线。

1.3.2 样品前处理方法的优化

分别用甲醇、水、80%甲醇溶液和20%甲醇溶液作为提取溶剂:分别称取4份2.000~5.000g的加标酱油样品于4支50mL带刻度具塞比色管中,加入提取溶剂定容至50mL,加塞混和后置于超声波水浴中处理15min,经0.45μm滤膜过滤后,进样测定。

1.3.3 精密度和加标回收率实验

对酱油样品进行3水平添加回收实验,每个添加水平取6个平行样,进行回收率实验。

1.3.4 方法最低检出限

选取空白样品添加标准溶液,添加浓度依次降低,对每个浓度样品测定3次,在信噪比 $R_{SN} \geq 3$ 条件下确定方法最低检出限。

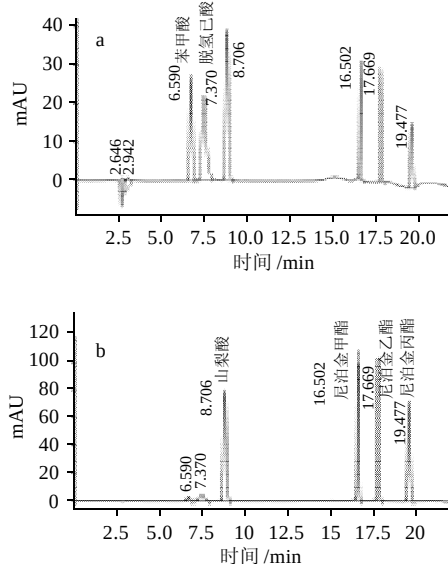
2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

分别取苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯质量浓度为0.04mg/mL的溶液,在200~400nm波长范围内扫描,结果显示苯甲酸、脱氢乙酸在230nm,山梨酸和尼泊金酯类在254nm处有强吸收,故选择苯甲酸和脱氢乙酸的检测波长为230nm,其他为254nm。

2.2 线性关系

将质量浓度为1、2、4、8、16μg/mL的混合标准溶液,在规定的色谱条件下进行测定,8μg/mL混合标准溶液的高效液相色谱图见图1,系列标准溶液所得的色谱峰峰面积和对应的质量浓度绘制成标准曲线,得到的线性方程见表2。各组分线性关系良好,符合定量要求。



a.检测波长230nm; b.检测波长254nm。

图1 8μg/mL混合标准溶液的高效液相色谱图

Fig.1 Chromatograms of 6 preservative standards (8 μg/mL each) detected at different wavelengths

表2 6种防腐剂标准曲线方程

Table 2 Linear equations with correlation coefficients of 6 preservative standards

防腐剂	标准曲线方程	相关系数r
苯甲酸	$y = 31628.727x - 11.421$	0.99994
山梨酸	$y = 121284.454x - 5.084$	0.99997
脱氢乙酸	$y = 53504.0054x + 9.932$	0.99988
尼泊金甲酯	$y = 71446.1368x + 3.4476$	0.99998
尼泊金乙酯	$y = 64058.5634x + 2.3986$	0.99998
尼泊金丙酯	$y = 58339.7321x + 1.9855$	0.99999

2.3 样品前处理方法的优化

由于6种防腐剂在水溶液及甲醇溶液中的溶解性能

各不相同,本研究分别用甲醇、水、80% 甲醇溶液和 20% 甲醇溶液作为提取溶剂对加标样品进行前处理,测定其回收率。由表 3 可见,以 20% 甲醇溶液作为提取溶剂,各组分提取效果最好,同时在液相色谱上也有很好的分离。

表 3 6 种防腐剂不同提取溶剂的回收率
Table 3 Effect of different extraction solvents on the recoveries of 6 preservatives

防腐剂	甲醇	80% 甲醇溶液	20% 甲醇溶液	水
苯甲酸	87	101	95	102
山梨酸	89	98	94	82
脱氢乙酸	104	95	98	84
尼泊金甲酯	95	91	100	89
尼泊金乙酯	92	88	98	91
尼泊金丙酯	94	94	99	88

2.4 精密度、加标回收率和最低检出限

对酱油样品进行 3 水平添加回收实验,每个添加水平取 6 个平行样,应用优化后的方法进行回收率实验,根据添加低添加量加标样品,以 3 倍信噪比值算出各分组的检出限。结果见表 4,加标回收率为 89%~103%,相对标准偏差(RSD)为 1.09%~2.81%,各组分检出限均为 0.5mg/kg。回收率较高,精密度较高,准确度和精密度符合实际样品的检测要求。

表 4 样品添加不同添加量混合标样的回收率及相对标准偏差
Table 4 Recovery rates, relative standard deviations and detection limits for 6 preservatives

防腐剂	加标量/(g/kg)	回收率/%	RSD/%	检出限/(mg/kg)
苯甲酸	0.005	89	2.35	0.5
	0.05	95	2.21	
	0.10	98	1.78	
山梨酸	0.005	94	2.41	0.5
	0.05	94	1.88	
	0.10	103	2.81	
脱氢乙酸	0.005	94	1.93	0.5
	0.05	98	1.65	
	0.10	101	1.10	
尼泊金甲酯	0.005	96	2.59	0.5
	0.10	100	1.36	
	0.01	99	2.34	
尼泊金乙酯	0.005	96	1.67	0.5
	0.10	98	1.13	
	0.01	97	1.58	
尼泊金丙酯	0.005	90	2.11	0.5
	0.10	99	1.38	
	0.01	97	1.09	

3 结 论

3.1 由于测定的组分中,尼泊金酯类与其他 3 种防腐剂极性相差较大,须选择优化流动相配比且使用梯度洗脱才能使各组分又快又好的分离。在尝试多种流动相配比后,确定以甲醇-乙酸铵溶液不同配比的梯度洗脱方式,结果证明,在该色谱条件下,苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸和 3 种尼泊金酯类具有良好的分离度,而且峰形完好,所有峰的保留时间和重现性均良好。

3.2 研究采用甲醇、水、80% 甲醇溶液和 20% 甲醇溶液作为提取溶剂进行实验。结果表明,4 种溶液均可较好地提取 6 种防腐剂,其中由以 20% 甲醇溶液作为提取溶剂,可保证 4 种组分同时被最高效率的提取,在液相色谱上有很好的分离。

3.3 精密度、回收率和最低检出限实验表明,该检测方法灵敏度、精密度和准确度均较高,符合检测要求。该方法一次性同时测定酱油中常见 6 种防腐剂,相比文献报道的方法^[2-13],提取步骤简便、易操作、方法符合检测要求,可以用于日常酱油中苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸和尼泊金酯类的同时测定。

参考文献:

- [1] GB 2760—2011 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [2] GB/T 5009.29—2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].
- [3] GB/T 5009.121—2003 食品中脱氢乙酸的测定[S].
- [4] GB/T 5009.31—2003 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定[S].
- [5] SN/T 1303—2003 蜂王浆中苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类检验方法:液相色谱法[S].
- [6] DB37/T 1100—2008 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定:高效液相色谱法[S].
- [7] 林小葵. 饮料等食品中常用防腐剂的高效液相色谱测定法[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 2(1): 248.
- [8] 吴玉娟. 固相萃取-液相色谱法测定糕点中脱氢乙酸、苯甲酸、山梨酸的方法研究[J]. 福建分析测试学, 2007, 16(4): 33-36.
- [9] 辛若竹, 丁梅, 郑贤光, 等. 气相色谱法测定面包、糕点、酱等食品中复合防腐剂及甜蜜素[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 498-501.
- [10] 王锋. 高效液相色谱法测定糕点中苯甲酸、山梨酸、糖精钠含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 8889-8890.
- [11] 王文清. 高效液相色谱法测定对羟基苯甲酸甲酯的含量及有关物质[J]. 中国药师, 2009, 12(1): 70-72.
- [12] 王萍亚, 周勇, 黄鹏, 等. 高效液相色谱法测定酱腌菜中 6 种对羟基苯甲酸酯[J]. 浙江海洋学院学报, 2008, 27(4): 425-429.
- [13] 李东刚, 李春娟, 刘敬东. GC-MS-SIM 检测糕点中的防腐剂和抗氧化剂[J]. 分析仪器, 2009(4): 56-60.