

高效液相色谱法同时测定食品中12种防腐剂和甜味剂

谭建林, 冯雷, 俸金梅, 牛之瑞*, 王吉祥, 王世波, 王亚琴, 张晓红
(云南省产品质量监督检验研究院, 国家热带农副产品质量监督检验中心, 昆明 650223)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定食品中12种防腐剂和甜味剂的含量。**方法** 样品经甲醇-水(30:70, V:V)提取, 经 Agilent TC C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇/20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 采用二极管阵列检测器进行检测, 检测波长为 230 nm。**结果** 12种防腐剂和甜味剂在 0.2~20 µg/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系, r^2 0.9992, 回收率在 70.9%~115.6%之间, 方法的检出限为 0.001~0.005 g/kg。**结论** 该方法具有高通量、操作简便等优点, 可适用于食品中12种防腐剂和甜味剂的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 食品; 防腐剂; 甜味剂

Simultaneous determination of 12 kinds of preservatives and sweeteners in food by high performance liquid chromatography

TAN Jian-Lin, FENG Lei, FENG Jin-Mei, NIU Zhi-Rui*, WANG Ji-Xiang, WANG Shi-Bo, WANG Ya-Qin, ZHANG Xiao-Hong

(Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Kunming 650223, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 12 kinds of preservatives and sweeteners in food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were extracted with methanol-water mixtures (30:70, V:V), separated by Agilent TC C₁₈ column for gradient elution with mobile phase of methanol and 20 mmol/L ammonium acetate at the flow rate of 1.0 mL/min, and then detected by photo diode array detector (PDA) at 230 nm. **Results** Twelve kinds of preservatives and sweeteners showed good linearities over the concentration range of 0.2~20 µg/mL with r^2 not less than 0.9992. The recoveries varied from 70.9% to 115.6%, and the limits of determination (LODs) were 0.001~0.005 g/kg. **Conclusion** The method has advantages of high throughput and simple operation, which can be used for the determination of 12 kinds of preservatives and sweeteners in food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; food; preservatives; sweeteners

基金项目: 云南省质量技术监督局科技计划项目(2013ynzjkj11)

Fund: Supported by Yunnan Province Quality Technology Supervision Bureau of Science and Technology Plan Projects (2013ynzjkj11)

*通讯作者: 牛之瑞, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全和理化检测。E-mail: bull.nzr@163.com

*Corresponding author: NIU Zhi-Rui, Master, Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Kunming 650223, China. E-mail: bull.nzr@163.com

1 引言

食品是人类赖以生存和发展的物质基础,食品分析与其他领域化学分析的不同之处在于食品种类多样、成分复杂、基质干扰严重,因此,快速、准确、可靠的检验结果是正确评价食品质量和保障食品安全的先决条件。

防腐剂及甜味剂是现代食品加工生产中使用比较广泛的食品添加剂^[1],其中苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、4种对羟基苯甲酸酯及安赛蜜(乙酰磺胺酸钾)和糖精钠等是最常用的防腐剂和甜味剂,也是各个质检机构日常检验中经常涉及的检验项目。国家对防腐剂及甜味剂的使用有着严格的限量标准^[2],如果超标使用,可能会对人类身体健康造成一定的伤害^[3]。

目前对防腐剂及甜味剂的检测方法主要包括液相色谱法^[4-6]、气相色谱法^[7]、离子色谱法^[8]、液相色谱-质谱法^[9]、液相色谱-串联质谱法^[10]等。本研究中采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定食品中12种防腐剂和甜味剂苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、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、对羟基苯甲酸异丁酯、富马酸二甲酯、新橙皮苷二氢查尔酮、安赛蜜、糖精钠的含量,相对于国家标准中的食品防腐剂和甜味剂的检测方法^[11-15],该方法可以实现高通量和快速测定。

2 材料与方 法

2.1 材料、试剂与仪器

苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、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、对羟基苯甲酸异丁酯、富马酸二甲酯、新橙皮苷二氢查尔酮、安赛蜜、糖精钠(标准品,美国Sigma公司);甲醇(色谱纯,德国Meker公司);超纯水(>18.2 MΩ·cm,德国Sartorius公司)。

样品(蜜饯、饮料、糕点、乳制品、肉类)均为本地商场购买。

LC-20A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); BS 223S 电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司); TG16 离心机(长沙市英泰仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

将各类固体食品取出,用粉碎机粉碎均匀。准确称取 5.0 g 样品于 25 mL 容量瓶中,用甲醇-水(30:70, V:V)定容至刻度,超声 30 min。转移至 50 mL 离心管中,以 5500 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪测定。

2.2.2 标准溶液的配制

分别精密称取 12 种防腐剂和甜味剂标准物质 20 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇-水(30:70, V:V)定容至刻度,摇匀,得到相应的 2 mg/mL 标准储备液,于 4 °C 冰箱保存。

分别准确移取 0.5 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中,得到 100 μg/mL 的混合标准溶液;移取适量混合标准溶液,使用甲醇水溶液(30:70, V:V)稀释,配制成 0.2~20 μg/mL 的系列线性标准工作溶液,供高效液相色谱仪测定。

2.2.3 仪器条件

色谱柱为 Agilent TC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm),流动相 A 为 20 mmol/L 乙酸铵水溶液,流动相 B 为甲醇,流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm,进样量:10 μL;柱温:35 °C,梯度洗脱程序见表 1。

3 结果与分析

3.1 色谱分离条件的优化

分别考察了 Shiseido capcell PAK C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5.0 μm), GRACE AlltimaTM C₁₈ (4.6×150 mm, 5.0 μm) 和 Agilent TC C₁₈ (4.6×150 mm, 5.0 μm) 3 种不同的色谱柱。相对来说,Agilent TC C₁₈ 色谱柱能更好地分离 12 种防腐剂和甜味剂,并将目标检测峰和样品中杂质峰分离。同时也比较了不同的有机相(甲醇和乙腈)和乙酸铵水溶液(5、10、20、25 和 30 mmol/L)作为流动相对分离度、灵敏度和峰形的影响,结果表明,使用 20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为水相,甲醇作为有机相,相对其他体系来说峰形更好,灵敏度更高,且对 12 种防腐剂和甜味剂有着更好的分离度,因此选用甲醇/20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相。12 种防腐剂和甜味剂标准品溶液的色谱图见图 1。

3.2 方法线性范围和检出限

将 2.2.2 中 12 种防腐剂和甜味剂的系列标准工作溶液(线性范围为 0.2~20 μg/mL)在 2.2.3 仪器条件下进行分析,

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	14	17	18	35	42	45	46	50
流动相 B/%	5.4	5.4	35	35	50	65	65	5.4	5.4

并建立标准工作曲线, 12 种防腐剂和甜味剂的线性相关系数(r^2)均达到 0.9992 以上, 以信噪比 $S/N=3$ 计算检出限。12 种防腐剂和甜味剂标准工作溶液的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限见表 2。

3.3 方法的加标回收率和精密度

在不同类食品的空白样品中添加 0.01、0.05 g/kg 不同浓度的标准溶液, 按照 2.2.2 项下进行前处理, 并按 2.2.3

仪器条件下进行分析, 添加量为 0.01、0.05 g/kg 的样品平行测定 6 次, 方法在 2 种不同浓度水平的回收率为 70.9%~115.6%, RSD 为 0.92%~5.92%, 结果见表 3。

3.4 样品分析

采用本试验方法对 25 批次从本地市场采购的各类食品样品进行检测, 均未检测出上述 12 种防腐剂和甜味剂。

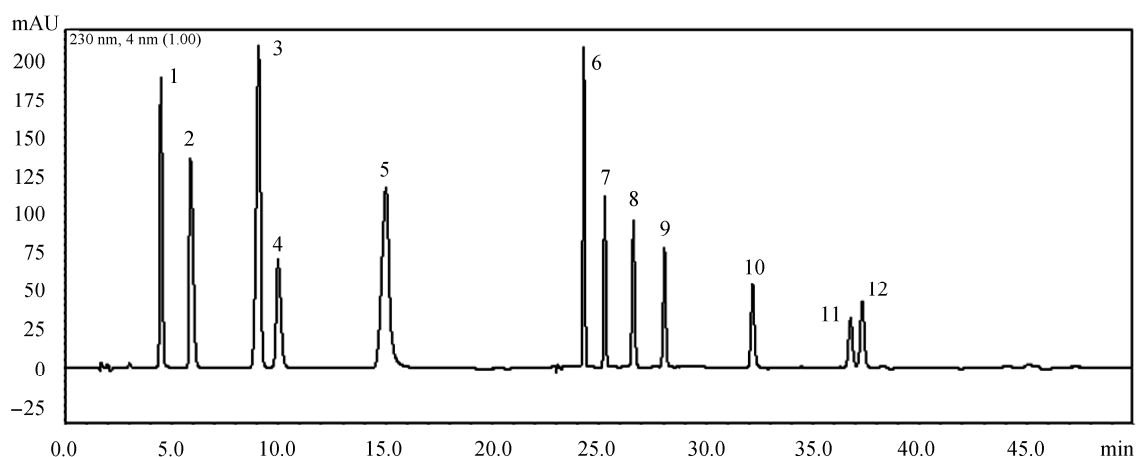


图 1 12 种防腐剂和甜味剂标准品溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 12 kinds of preservatives and sweeteners standard

注: 峰 1: 安赛蜜; 2: 苯甲酸; 3: 山梨酸; 4: 糖精钠; 5: 脱氢乙酸; 6: 富马酸二甲酯; 7: 对羟基苯甲酸甲酯; 8: 对羟基苯甲酸乙酯; 9: 对羟基苯甲酸丙酯; 10: 新橙皮苷二氢查尔酮; 11: 对羟基苯甲酸异丁酯; 12: 对羟基苯甲酸丁酯

表 2 12 种防腐剂和甜味剂的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, liner ranges, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of 12 kinds of preservatives and sweeteners

名称	线性方程	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	相关系数(r^2)	检出限(g/kg)	定量限(g/kg)
苯甲酸	$Y = 3.11e^8X - 2.50e^4$	0.2~20	0.9999	0.002	0.008
山梨酸	$Y = 1.72e^8X - 1.29e^4$	0.2~20	0.9999	0.001	0.004
脱氢乙酸	$Y = 1.71e^8X + 1.52e^4$	0.2~20	1.0000	0.002	0.008
对羟基苯甲酸甲酯	$Y = 7.21e^8X - 4.07e^4$	0.2~20	0.9999	0.002	0.008
对羟基苯甲酸乙酯	$Y = 6.25e^8X - 5.28e^4$	0.2~20	0.9999	0.002	0.008
对羟基苯甲酸丙酯	$Y = 7.57e^8X - 2.53e^4$	0.2~20	0.9999	0.002	0.008
对羟基苯甲酸丁酯	$Y = 9.20e^8X - 5.74e^4$	0.2~20	1.0000	0.005	0.020
对羟基苯甲酸异丁酯	$Y = 1.23e^7X - 4.18e^4$	0.2~20	0.9999	0.005	0.020
富马酸二甲酯	$Y = 4.46e^8X - 4.99e^4$	0.2~20	0.9997	0.001	0.004
新橙皮苷二氢查尔酮	$Y = 8.29e^8X - 6.57e^4$	0.2~20	0.9992	0.005	0.020
安赛蜜	$Y = 3.44e^8X - 1.85e^4$	0.2~20	1.0000	0.001	0.004
糖精钠	$Y = 4.81e^8X - 2.28e^4$	0.2~20	0.9999	0.005	0.020

表3 加标回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and RSDs ($n=6$)

名称	添加值 (g/kg)	蜜饯		饮料		糕点		乳制品		肉类	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
苯甲酸	0.01	103.1	3.15	107.2	4.80	76.8	5.92	107.8	3.32	102.3	1.90
	0.05	108.6	4.30	110.8	4.13	80.9	4.14	111.1	2.61	80.2	2.03
山梨酸	0.01	101.0	2.98	107.1	3.16	72.3	4.80	108.3	4.52	104.3	2.41
	0.05	109.2	4.18	107.4	2.51	81.8	3.68	111.3	4.08	89.6	2.68
脱氢乙酸	0.01	98.0	3.64	107.3	4.01	102.2	3.86	112.3	4.64	80.4	4.45
	0.05	108.8	1.58	106.6	3.72	75.8	3.67	107.2	4.17	74.6	4.23
对羟基苯甲酸甲酯	0.01	102.3	1.84	97.7	2.23	85.7	4.03	103.8	2.84	87.7	2.83
	0.05	103.0	2.29	104.0	1.76	109.5	3.71	112.7	1.80	86.4	2.93
对羟基苯甲酸乙酯	0.01	114.8	1.19	91.4	5.28	93.3	3.04	71.2	4.73	83.8	4.08
	0.05	107.2	1.94	98.8	4.74	111.9	2.88	75.9	4.34	84.0	3.90
对羟基苯甲酸丙酯	0.01	104.3	1.85	105.0	1.34	88.1	2.56	110.1	4.23	79.3	4.95
	0.05	103.9	4.25	101.8	0.92	100.2	2.50	113.2	2.76	79.2	4.63
对羟基苯甲酸丁酯	0.01	98.4	2.67	100.5	4.52	85.0	3.69	106.1	2.78	91.5	3.67
	0.05	99.6	3.59	91.3	3.94	113.8	2.72	107.7	2.44	85.2	3.00
对羟基苯甲酸异丁酯	0.01	115.2	2.54	109.0	4.65	109.6	3.44	101.5	3.10	111.7	3.71
	0.05	102.6	4.08	114.6	4.44	90.4	2.93	102.4	2.27	100.9	4.74
富马酸二甲酯	0.01	82.0	3.75	70.9	4.20	84.2	3.18	105.0	3.36	115.0	3.50
	0.05	81.6	4.91	71.4	3.98	93.7	3.43	111.0	2.84	104.7	2.28
新橙皮苷二氢查尔酮	0.01	99.0	3.76	101.1	3.42	93.6	2.83	112.4	4.94	79.0	3.98
	0.05	101.6	3.01	98.2	3.30	102.9	1.74	99.0	4.47	76.0	2.44
安赛蜜	0.01	110.9	3.21	106.8	2.86	98.6	4.12	110.9	3.02	82.0	3.41
	0.05	109.1	2.60	111.6	2.61	104.8	3.49	113.8	2.53	80.9	2.60
糖精钠	0.01	105.6	2.79	107.9	4.57	78.0	3.20	109.4	2.44	80.0	5.15
	0.05	108.6	3.94	109.8	4.28	115.6	2.44	113.0	2.35	89.4	4.55

4 结论

本研究采用高效液相色谱法同时检测食品中 12 种防腐剂和甜味剂,通过对色谱条件的优化,最终确定以甲醇水溶液作为提取溶液,甲醇/20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相,本方法操作简便、精密度好,回收率高,能够满足食品中 12 种防腐剂和甜味剂的高通量检测。因此,该方法可用于食品中防腐剂和甜味剂的质量控制,进一步完善食品中违禁添加剂的管理,更好地有利于食品安全健康。

参考文献

[1] 赵凯, 杨大进. 防腐剂、甜味剂、着色剂 LC-MS 测定方法研究进展[J].

中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1310-1312.

Zhao K, Yang DJ. LC-MS determination method research progress of preservatives, sweeteners and coloring agent [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(5): 1310-1312.

[2] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. GB 2760-2014 Standards for uses of food additives [S].

[3] 吕泉福, 储晓刚, 李竞, 等. 食品防腐剂的的分析方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(8): 170-174.

Lu QF, Chu XG, Li J, et al. Research development of detection techniques for the preservatives in food [J]. Food Res Dev, 2011, 32(8): 170-174.

[4] 徐焯, 李丽君, 王乃芝, 等. 高效液相色谱法测定饮料中防腐剂和甜味剂[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 339-341.

Xu Y, Li LJ, Wang NZ, et al. HPLC determination of preservatives and

- sweeteners in carbonic drink [J]. Food Sci, 2008, 29(6): 339-341.
- [5] 袁凤琴, 王佳, 牛爱华, 等. 高效液相色谱法同时检测酸性乳饮料及冰淇淋中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸和糖精钠[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5): 1434-1438.
Yuan FQ, Wang J, Niu AH, *et al.* Determination of acesulfame, benzoic acid, sorbic and sodium saccharin in acidic milk drink and ice cream by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(5): 1434-1438.
- [6] 朱小梅, 黄柳霞, 廖权丰. 反相高效液相色谱法同时测定黄豆酱中的苯甲酸、山梨酸、安赛蜜[J]. 中国食品添加剂, 2015, 136(6): 194-202.
Zhu XM, Huang LX, Liao QF. Determination of benzoic acid, sorbic and acesulfame potassium in soya bean jam by RP-HPLC [J]. China Food Addit, 2015, 136(6): 194-202.
- [7] 罗云, 李铁强. 测定食品中山梨酸、苯甲酸的气相色谱法的改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 477-492.
Luo Y, Li TQ. Improvement of gas chromatographic method for the determination of sorbic acid and benzoic acid in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(4): 477-492.
- [8] 林华影, 张琼, 盛丽娜. 离子色谱法同时测定食品中的五种添加剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(5): 556-558.
Lin HY, Zhang Q, Sheng LN, *et al.* Simultaneous determination of five kinds of additives in food by ion chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, 14(5): 556-558.
- [9] 许秀敏, 吴西梅, 梁春穗, 等. 液相色谱-质谱联用检测食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1057-1059.
Xu XM, Wu XM, Liang CH, *et al.* Determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in food by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(9): 1057-1059.
- [10] 陈晓红, 赵永纲, 姚珊珊, 等. 超快速液相色谱-串联质谱法测定黄酒和葡萄酒中的 9 种防腐剂和甜味剂[J]. 色谱, 2011, 29(12): 1147-1154.
Chen XH, Zhao YG, Yao SS, *et al.* Simultaneous determination of nine preservatives and sweeteners in yellow wine and wine by ultrafast liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(12): 1147-1154.
- [11] GB/T 23495-2009 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 23495-2009 Determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in foods-High performance liquid chromatography method [S].
- [12] GB/T 5009.31-2003 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定[S].
GB/T 5009.31-2003 Determination of p-hydroxybenzoic acid esters in foods [S].
- [13] GB/T 23377-2009 食品中脱氢乙酸的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 23377-2009 Determination of dehydroacetic acid in food-High performance liquid chromatography [S].
- [14] SN/T 3623-2013 出口食品中富马酸二甲酯的测定方法 [S].
SN/T 3623-2013 Determination of dimethyl fumarate in foods for export [S].
- [15] GB/T 5009.140-2003 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定 [S].
GB/T 5009.140-2003 Determination of acesulfame potassium in beverages [S].

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



谭建林, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品污染物检测。
E-mail: ynzjtg@126.com



牛之瑞, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全和理化检测。
E-mail: bull.nzr@163.com