

高压液相色谱法检测酸性乳饮料及酸奶中 对羟基苯甲酸酯类

袁凤琴*, 王佳, 孙佳美, 崔向云, 陈军, 林立民, 常建军, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

摘要: **目的** 建立酸性乳饮料及酸奶中对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯含量的高压液相色谱分析方法。**方法** 样品去蛋白后, 用甲醇提取, 提取液用高压液相色谱仪进行检测。**结果** 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯在 0~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 相关系数大于 0.999, 检出限分别为 0.48、0.45、0.47、0.49 mg/kg ; 在 1、2、5 mg/kg 3 个加标水平下, 样品中对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯的加标平均回收率分别为 95.59%~104.52%、93.21%~108.05%、97.75%~107.98%、97.48%~103.67%, 相对标准偏差均小于 10%。**结论** 本方法适用于乳与乳制品中对羟基苯甲酸(尼泊金)甲、乙、丙、丁酯含量的测定需要。

关键词: 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; 高压液相色谱

Determination of *p*-hydroxybenzoic acid esters in milk and dairy products by high pressure liquid chromatography

YUAN Feng-Qin*, WANG Jia, SUN Jia-Mei, CUI Xiang-Yun, CHEN Jun, LIN Li-Min,
CHANG Jian-Jun, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd, Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fast and accurate method for determining of methyl *p*-hydroxybenzoic acid ester, ethyl *p*-hydroxybenzoic acid ester, propyl *p*-hydroxybenzoic acid ester and butyl *p*-hydroxybenzoic acid ester in milk and dairy products by high pressure liquid chromatography(HPLC). **Methods** After precipitation of protein, the samples were extracted with methanol and the extracts were measured by HPLC. **Results** A good linear relationship between values of peak area and concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid esters was obtained in the range of 0~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the correlation coefficient above 0.999. The limits of detection for methyl *p*-hydroxybenzoic acid ester, ethyl *p*-hydroxybenzoic acid ester, propyl *p*-hydroxybenzoic acid ester and butyl *p*-hydroxybenzoic acid ester were 0.48, 0.45, 0.47, 0.49 mg/kg , respectively and the recoveries were 95.59%~104.52%, 93.21%~108.05%, 97.75%~107.98%, 97.48%~103.67% at three spike level of 1, 2, 5 mg/kg , with relative standard derivations less than 10%, respectively. **Conclusion** This method can meet the demand for determining of *p*-hydroxybenzoic acid esters in milk and dairy products.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10160504)

Fund: Supported by the National High Technology Research and Development Program(2012AA10160504)

*通讯作者: 袁凤琴, 分析员, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。E-mail:yuanfengqin2008@163.com

*Corresponding author: YUAN Feng-Qin, Analyst, Senior Engineer, Central Laboratory of Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd, Shengle Economic Park, Helingeer County, Hohhot 011500, China. E-mail:yuanfengqin2008@163.com

KEY WORDS: methyl *p*-hydroxybenzoic acid ester; ethyl *p*-hydroxybenzoic acid ester; propyl *p*-hydroxybenzoic acid ester; butyl *p*-hydroxybenzoic acid ester; high pressure liquid chromatography (HPLC)

对羟基苯甲酸甲酯又称尼泊金甲酯,对羟基苯甲酸乙酯又称尼泊金乙酯,它们对细菌、霉菌和酵母菌有很好的抑制作用,因低毒性、无刺激等特点而被广泛应用,常用作食品防腐剂^[1]。它们可以在 pH 4~8 的范围内发挥作用。由于大部分食品的 pH 为中性,苯甲酸(钠)、山梨酸(钾)在 pH 4~8 时抗菌活性极低,而对羟基苯甲酸丙酯仍保持良好的抗菌活性^[2, 3],这对食品工业有特别重要的意义,世界上许多国家和地区把对羟基苯甲酸丙酯作为食品防腐剂,我国也将其列为食品防腐剂,广泛应用于酱油、醋、饮料、啤酒、水果、蔬菜、果汁、果酱等行业^[4, 5]。对羟基苯甲酸丁酯是对羟基苯甲酸酯类中防腐抗菌作用最强的防腐剂。

对羟基苯甲酸酯类的防腐效果好,毒性较小,应用范围很广。目前其检测方法主要是仪器法。GB/T 5009.31-2003 适用于酱油、醋、水果汁及果酱中对羟基苯甲酸脂类的测定,SN/T 1303-2003 适用于蜂王浆中对羟基苯甲酸酯类的测定,DB 37/T 1100-2008 适用于酱油、醋、果酱、糕点及饮料中对羟基苯甲酸酯类的测定,上述三个标准的适用范围均不包括酸性乳饮料及酸奶。本文使用一种简单的前处理方式,通过加沉淀剂沉淀样品中的蛋白,利用甲醇提取样品,从而得到待测液上机检测,目的是为了能够简单、快速、准确测定酸性乳饮料及酸奶中的对羟基苯甲酸酯类含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:日立 2000 系列高压液相色谱仪,资生堂 AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 万分之一天平(XP-205 型,梅特勒-托利多集团);电热板(HP7 型,德国 IKA 集团);涡旋仪(MS 3 basic 型,德国 IKA 集团)。

试剂:甲醇(色谱纯);亚铁氰化钾、乙酸铵、乙酸锌均为分析纯;羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸乙酯、羟基苯甲酸丙酯、羟基苯甲酸丁酯(纯度为 99%,中国计量科学研究院)。

亚铁氰化钾溶液(92 g/L):称取亚铁氰化钾

[K₄Fe(CN)₆·3H₂O] 106 g,溶解于 1000 mL 容量瓶中,定容到刻度后混匀。

乙酸锌溶液(183 g/L):称取乙酸锌[Zn(CH₃COO)₂·2H₂O] 219 g,加入 32 mL 乙酸,用水溶解于 1000 mL 容量瓶中,定容到刻度后混匀。

1.2 色谱参考条件

色谱柱:反相 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温箱:35 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长扫描范围:210~400 nm;定量波长:256 nm;进样量:20 μL;流动相:20 mmol/L;乙酸铵:甲醇=50:50(v/v)。

1.3 样品前处理

称取 5.0 g 酸性乳饮料及酸奶样品于 50 mL 的离心管中,向离心管中加入 1.0 mL 亚铁氰化钾、1.0 mL 乙酸锌,涡旋 1 min,然后用甲醇定容到 25.0 mL,剧烈振动,于 4000 r/min 离心 3 min,有机滤膜过滤,用高压液相色谱仪进行分析检测。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

用甲醇分别配制浓度为 0.1、1.0、2.0、3.0、5.0、10 μg/mL 的对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯混合标准工作液,采用 1.2 色谱条件利用液相色谱仪进行检测,以标准物质的浓度为横坐标,对应峰面积为纵坐标进行线性回归分析,得到线性回归方程及其相关系数,并根据信噪比 $S/N=3$,计算 4 组分最低检测浓度(表 1)。结果表明:对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯在 0~10 μg/kg 范围内,浓度与峰面积有良好的线性关系,相关系数大于 0.999。图 1 为 4 种对羟基苯甲酸酯类的标准色谱图。

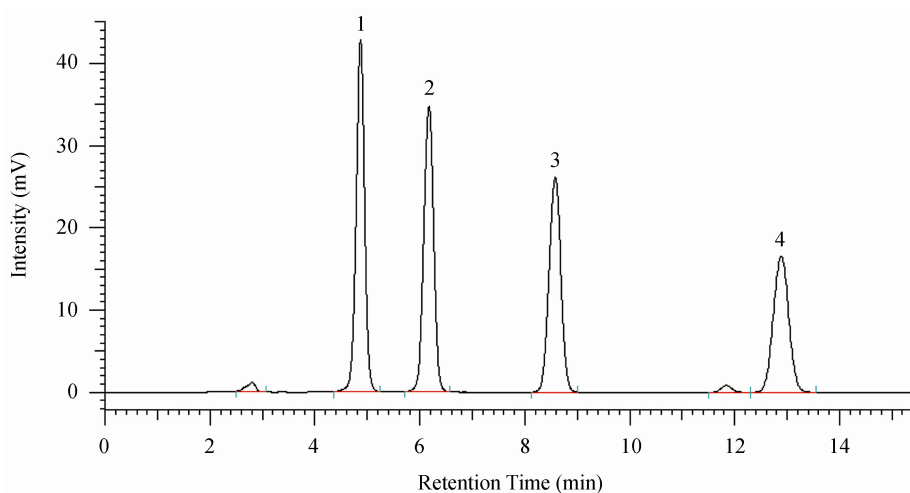
2.2 方法的回收率与精密度

分别向空白酸性乳饮料和酸奶中添加 3 个水平的混合标准溶液,每个加标水平取 16 个平行样,考察方法的回收率和精密度。结果如表 2 所示。样品中的加标色谱图见图 2。由表 2 可以看出,4 种防腐剂的

表 1 4 种对羟基苯甲酸酯的工作曲线、相关系数和检出限

Table 1 Calibration curves, correlation coefficients and limits of detection for 4 *p*-hydroxybenzoic acid esters

组分	线性回归方程	相关系数(R^2)	检出限(mg/kg)
对羟基苯甲酸甲酯	$Y=132993X+175.43$	0.9999	0.48
对羟基苯甲酸乙酯	$Y=113519X+33.796$	0.9999	0.45
对羟基苯甲酸丙酯	$Y=103981X+880.77$	0.9998	0.47
对羟基苯甲酸丁酯	$Y=86771X-374.9$	0.9998	0.49



注: 1 羟基苯甲酸甲酯, 2 对羟基苯甲酸乙酯, 3 对羟基苯甲酸丙酯, 4 对羟基苯甲酸丁酯

图 1 4 种对羟基苯甲酸酯类标准品色谱图

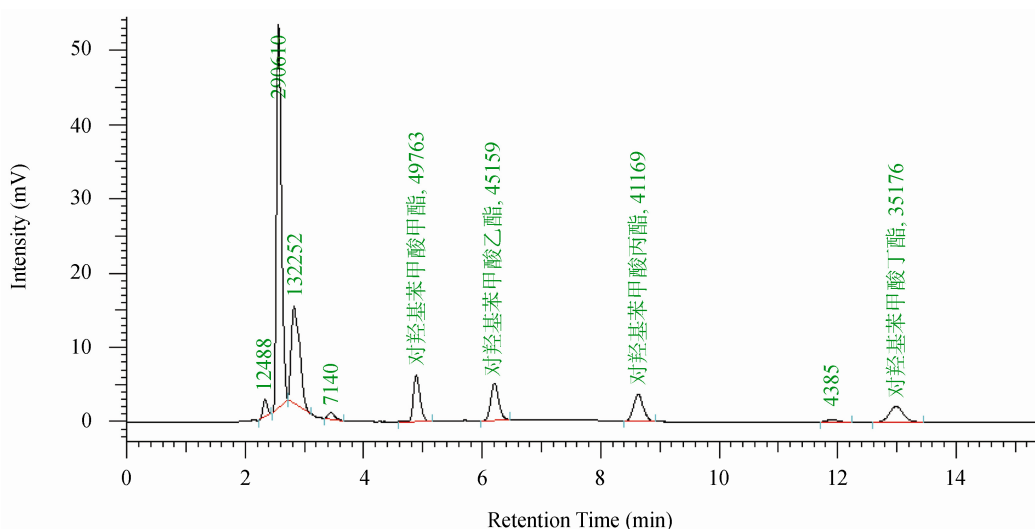
Fig. 1 Chromatogram for 4 *p*-hydroxybenzoic acid esters standard

图 2 样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of spiked samples

表2 样品中4种对羟基苯甲酸酯类防腐剂回收率
Table 2 Recoveries for 4 kinds of *p*-hydroxybenzoic acid esters in samples

化合物	添加水平(mg/kg)	样品	回收率(%)	相对标准偏差(%)
对羟基苯甲酸甲酯	1	酸性乳饮料	102.07	3.67
	2		95.59	
	5		99.44	
对羟基苯甲酸乙酯	1		99.33	6.13
	2		96.13	
	5		103.72	
对羟基苯甲酸丙酯	1		99.53	5.81
	2		105.57	
	5		101.07	
对羟基苯甲酸丁酯	1		96.48	4.88
	2		102.35	
	5		98.47	
对羟基苯甲酸甲酯	1	酸奶	104.52	3.33
	2		101.38	
	5		97.56	
对羟基苯甲酸乙酯	1		108.05	1.51
	2		100.37	
	5		93.21	
对羟基苯甲酸丙酯	1		100.60	4.85
	2		97.75	
	5		107.98	
对羟基苯甲酸丁酯	1		103.67	2.79
	2		98.21	
	5		97.59	

的平均回收率为 93.21%~108.05%，相对标准偏差为 1.51%~6.13%，表明该方法具有较好的准确度和精密度，满足残留检测的要求。

3 结论

采用高压液相法检测酸性乳饮料和酸奶中对羟基苯甲酸酯类的含量，前处理方法简便、易操作，该方法的重现性好、准确度高，其回收率及相对标准偏差都能够满足酸性乳饮料及酸奶中对羟基苯甲酸酯类的检测。

参考文献

- [1] 周晶, 戴发荣, 李拥军. 食品中对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯的气相色谱同时测定法[J]. 职业与健康, 2005, 21 (1): 41-42.
- [2] Zhou J, Dai FR, Li YJ. Para hydroxybenzoic acid and benzoic acid propyl ester by gas chromatographic method for simultaneous determination of food [J]. Occup Heal, 2005, 21 (1): 41-42.
- [3] 万素英, 李琳, 王慧君. 食品防腐和食品防腐剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998 .
- [4] Wan SY, Li L, Wang HJ. Food antiseptic and preservative[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998 .
- [5] 宋国胜, 郭祀远, 蔡妙颜, 等. 新型高效食品防腐剂 - 甘油单月桂酸酯[J]. 食品科技, 2002, (1): 37-39 .
- [6] Song GS, Guo QY, Cai MY, *et al.* New efficient food preservative-glycerol monolaurate [J]. Food Sci Technol, 2002, (1): 37-39.

- [4] 中国食品添加剂生产应用工业协会. 食品添加剂检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999 .
China Food Additive Production and Application Industry Association. Food Additive Inspection Manual [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 .
- [5] 凌关庭. 食品添加剂手册 [M]. 第 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2003 .
Ling GT. Handbook of Food Additives [M]. 3rd Edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.

(责任编辑:)

作者简介



袁凤琴, 分析员, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。
E-mail: yuanfengqin2008@163.com