高效液相色谱法同时测定食品中 7 种防腐剂

刘 佟, 王 浩, 苗雨田, 杨悠悠, 杨永坛*

(中粮营养健康研究院, 北京市营养健康与食品安全重点实验室, 北京 102209)

摘 要: 目的 建立一种采用高效液相色谱同时检测食品中苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯等 7 种防腐剂的方法, 并对葡萄酒、饮料、酱油、面包等 4 种基质进行测定。**方法** 样品经甲醇提取, 无水硫酸镁除水离心后取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 使用高效液相色谱二极管阵列检测器(DAD)对 7 种防腐剂含量进行测定。**结果** 在优选条件下, 方法线性范围为 0.1~10 mg/L, 线性相关系数 R^2 ≥0.9999, 检出限(*S*/*N*=3)为 50~100 μg/L, 样品回收率为 77.28%~106.81%, 相对标准偏差(RSD)为 0.46%~2.38%。**结论** 该方法操作简便, 灵敏度高, 适用于葡萄酒、饮料、酱油和面包 4 种基质中 7 种防腐剂的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 食品; 防腐剂; 苯甲酸; 山梨酸; 对羟基苯甲酸酯

Determination of 7 preservatives in food using high performance liquid chromatography

LIU Tong, WANG Hao, MIAO Yu-Tian, YANG You-You, YANG Yong-Tan*

(*Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety*, *COFCO Nutrition and Health Research Institute*, *Beijing* 102209, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 7 preservatives **(**benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl p-hydroxybenzoate, p-hydroxy benzoic acid ethyl ester, p-hydroxy benzoic acid n-propyl, and p-hydroxy benzoic acid butyl ester**)** in food by high performance liquid chromatography, and determine the wine, drink, soy sauce, and bread in the samples. **Methods** Samples were extracted with methanol, and assisted by $MgSO_4$ to remove the water before the centrifugation. After through 0.45 μm filter, 7 kinds of preservatives were detected by HPLC-DAD. **Results** Under the optimized conditions, the linear range was 0.1~ 10 mg/L with R^2≥0.9999. The limits of detection (LOD, *S*/*N*=3) were from 50 to 100 μg/L. Besides, recoveries were in the range of 77.28%~106.81%, and the RSDs of the peak areas were between 0.46%~2.38%. **Conclusion** This method is suitable for simple and sensitive determination of 7 kinds of preservatives in wine, drink, soy sauce and bread.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; food; preservatives; benzoic acid; sorbic acid; p-hydroxybenzoic acid ester

*通讯作者: 杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: yangyongtan@cofco.com

***Corresponding author:** YANG Yong-Tan, Senior Engineer, Food Quality & Safety Center, COFCO Nutrition & Health Research Institute, Road No.4, Future Science and Technology Park South, Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: yangyongtan@cofco.com

1　引　言

防腐剂是防止由微生物引起食品的腐败变质、延长食品保质期的添加剂。在我国, 食品生产中所使用的防腐剂大多是人工合成的, 过量使用会有一定副作用, 有些防腐剂甚至含有微量毒素, 长期过量摄入会危害人体健康[1]。因此我国出台了标准GB2760-2011《食品添加剂使用标准》[2]中严格规定了食品中防腐剂的使用限量, 且建立了防腐剂的标准检测方法[3-5]。目前国内外防腐剂多组分检测方法主要有高效液相色谱法[6-8]、液相色谱-质谱法[9]、离子色谱法[10]、气相色谱法[11,12]、气相色谱-质谱法[13-15], 其中部分防腐剂的前处理条件不同, 导致分析效率降低。本文尝试采用甲醇提取的方式, 建立采用高效液相色谱二极管阵列检测器同时测定葡萄酒、饮料、酱油、面包基质中的苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯等 7 种常见防腐剂的方法。

2　材料和方法

2.1　仪器与试剂

Ultimate 3000 液相色谱仪(配备梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、变色龙色谱管理软件, Thermo Scientific 公司); Milli-Q 超纯水机(Millipore 公司); 离心机(Allegra 64R, 美国贝克曼公司); 摇床(SHZ-88A, 上海一恒公司); 电子天平(万分之一, ME204/02, 梅特勒公司)。

苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯标准品(Sigma 公司); 无水硫酸镁、磷酸二氢铵(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 葡萄酒、柠檬果汁、酱油、面包购自本地超市。

2.2　色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C_8(4.6 m×150 mm, 3.5 μm); 进样量 10 μL; 柱温 30 ℃; 流速 1 mL/min; 流动相: 0~15 min 磷酸二氢铵:乙腈(20:80, *v*:*v*), 15.1~22 min 磷酸二氢铵:乙腈(60:40, *v*:*v*), 22.1~25 min 磷酸二氢铵:乙腈(40:60, *v*:*v*), 25.1~30 min 磷酸二氢铵:乙腈(20:80, *v*:*v*); 检测器波长: 230 nm、254 nm、293 nm。

2.3　标准溶液配制

准确称取苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯标准品各 10.0 mg(准确至 0.0001 g)于 10 mL 容量瓶中, 用纯甲醇定容至刻度, 此时苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯浓度为 1000 mg/L; 再用纯甲醇配制成浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg/L 的混合溶液。

2.4　样品前处理

葡萄酒、饮料、酱油样品: 准确称取液体样品 1.0~5.0 g 于 15 mL 离心管中, 加入 2.5 mL 甲醇溶液, 涡旋 2 min, 加入 2 g 无水硫酸镁, 继续涡旋 2 min, 5000 r/min 离心, 2 min, 取上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进样分析。

面包样品: 准确称取 1~5 g 已均质的样品于 15 mL 离心管中, 如果样品油脂含量较高, 可加入 5 mL 正己烷涡旋 2 min, 弃去上层正己烷层, 再加入 10 mL 甲醇, 于 200 r/min 摇床提取 20 min, 5000 r/min 离心 2 min, 取上清液 3 mL 加入 1 g 无水硫酸钠, 涡旋 2 min, 5000 r/min 离心 2 min, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进样分析。

3　结果与讨论

3.1　HPLC 色谱条件的优化

3.1.1　缓冲溶液的选择

乙酸铵、磷酸二氢钾和磷酸二氢铵是三种常用分析防腐剂的缓冲盐。由于乙酸在低紫外波长下有吸收, 所以乙酸铵用乙酸调节 pH 后会导致紫外检测器饱和; 磷酸二氢钾和磷酸二氢铵均可满足 7 种防腐剂的分离(图 1), 实验发现, 苯甲酸、山梨酸在磷酸二氢铵溶液中的分离度优于磷酸二氢钾溶液, 综合考虑, 选择磷酸二氢铵作为流动相。

3.1.2　有机溶液

甲醇和乙腈是最常用的有机溶剂, 实验发现, 当使用甲醇与缓冲液(pH=2.5)作为流动相时, 目标物保留能力过强, 需使用 80%有机相才可洗脱, 而此时苯甲酸与山梨酸分离度为 0.78, 且柱压过高; 当使用乙腈与缓冲液(磷酸二氢铵 pH=2.5)作为流动相时, 使用 20%有机相可使目标物满足分离, 苯甲酸、山梨酸分离度大于 1.5, 柱压在合理范围内。综合考虑, 选择乙腈作为该实验流动相。

3.1.3　流动相 pH 的优化

流动相 pH 能显著影响化合物的性质, 当 pH 小于苯甲酸、山梨酸或脱氢乙酸的 pKa 时, 此时部分有

机酸防腐剂会以酸的形式存在，从而与色谱柱之间的疏水作用加强，目标物保留性增加。本研究对 1.5、2.5 和 4.2 三个 pH 条件进行对比分析，研究发现当 pH 为 1.5 时，7 种防腐剂能达到基线分离，且样品中的杂质不干扰目标物能的分离，如图 2 所示。

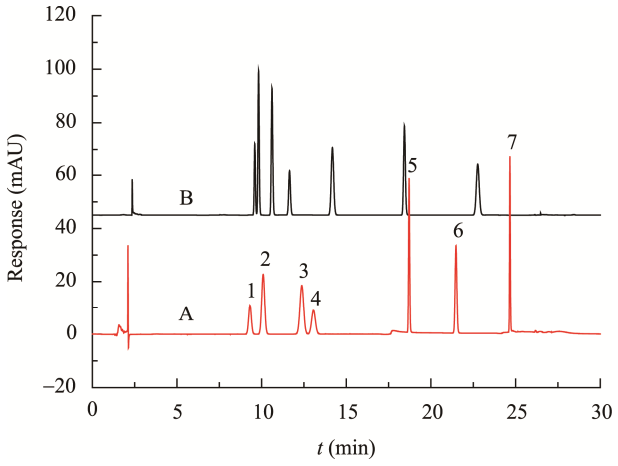

图 1 磷酸二氢铵/乙腈(pH=1.5) 5 mg/L 标准品图(A)；磷酸二氢钾/乙腈(pH=1.5) 5 mg/L 标准品图(B)

Fig. 1 Chromatogram of 5 mg/L standard using aqueous $NH_4H_2PO_4$solution/ACN as the mobile phase(A) and $K_2H_2PO_4$ solution/ACN as the mobile phase(B)

1. 山梨酸; 2. 苯甲酸; 3. 对羟基苯甲酸甲酯; 4. 脱氢乙酸; 5. 对羟基苯甲酸乙酯; 6. 对羟基苯甲酸丙酯; 7. 对羟基苯甲酸丁酯.

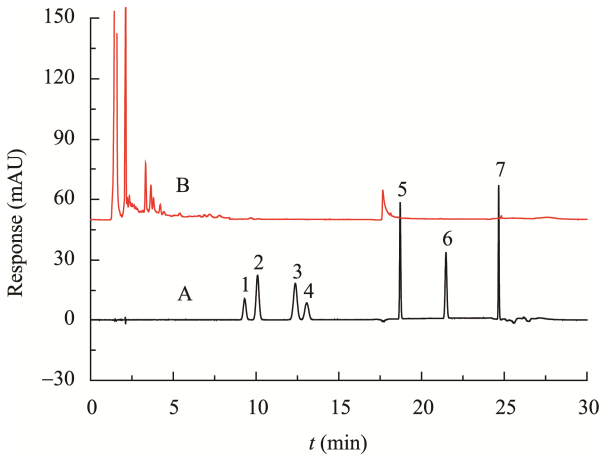

图 2 pH 1.5 的磷酸二氢铵/ACN 为流动相时 5 mg/L 标准品图(A)和葡萄酒样品(B)

Fig. 2 Chromatograms of 5 mg/Lstandard (A) andgrape wine sample (B) when using $NH_4H_2PO_4$ (pH 1.5)/ACN as the mobile phase

1. 山梨酸; 2. 苯甲酸; 3. 对羟基苯甲酸甲酯; 4. 脱氢乙酸; 5. 对羟基苯甲酸乙酯; 6. 对羟基苯甲酸丙酯; 7. 对羟基苯甲酸丁酯.

3.2 样品前处理优化

采用葡萄酒样品对样品的前处理方法进行考察，考察以下三种方式：对样品稀释后直接测定、亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法和甲醇提取如图 3 所示。结果表明，样品直接稀释对于葡萄酒、饮料等基质相对简单的样品适用，但对于酱油等基质复杂或固体样品不适用；亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法样品回收率随着沉淀剂的增加而降低，对羟基苯甲酸酯类目标物影响最大；而甲醇提取方法，简单快捷，回收率为 77.28~106.81%，满足实验要求，适用于葡萄酒、饮料、酱油、面包多种基质中 7 种防腐剂的测定。

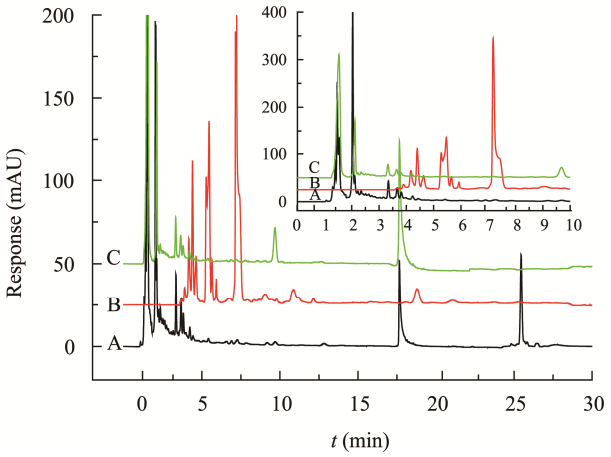

图 3 葡萄酒直接稀释(A)；葡萄酒经亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀(B)；葡萄酒经甲醇提取(C)

Fig. 3 Chromatograms of samples after dilution only (A); sample by potassium ferrocyanide-zinc acetate precipitation (B) and extraction with methanol (C)

3.3 方法线性范围、检出限

在优化条件下，进行方法学考察。以各目标物的峰面积对各目标物浓度作图，绘制标准曲线；线性相关系数(R^2)均大于 0.9999。以信噪比(S/N=3)计算各防腐剂方法检出限(LOD)。如表 1 所示，该方法具有良好的线性关系。

3.4 回收率及精密度的测定

分别称取葡萄酒、柠檬果汁、酱油、面包四种样品各 6 份，其中 3 份为样品空白，另外 3 份加入一定浓度的混合标准溶液，按上述前处理步骤进行实验，结果表明；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、对羟基苯甲酸丁酯回收率为 77.28~106.81%，相对标准偏差(RSD)为 0.46%~2.38%。实际样品色谱图见图 4，测定结果见表 2~表 3。

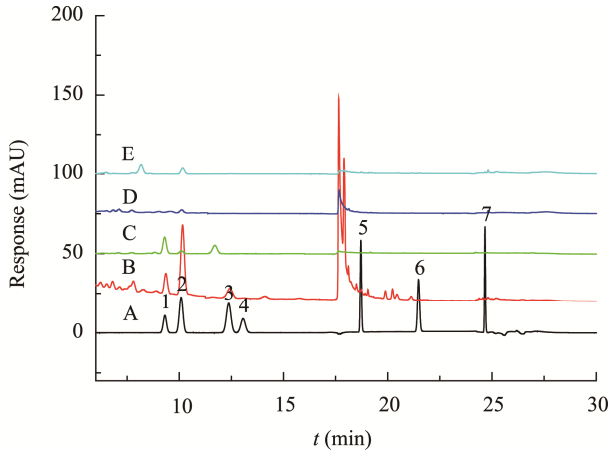

图 4　5 mg/L 标准品(A); 酱油样品(B); 面包样品(C); 红酒样品(D); 柠檬汁样品(E)色谱图

Fig. 4　Chromatograms of 5 mg/L standard(A), soy sauce(B), bread(C), wine(D), lemon juice(E)

1. 山梨酸; 2. 苯甲酸; 3. 对羟基苯甲酸甲酯; 4. 脱氢乙酸; 5. 对羟基苯甲酸乙酯; 6. 对羟基苯甲酸丙酯; 7. 对羟基苯甲酸丁酯.

3.5　实际样品测定

采用建立的方法分别对葡萄酒、柠檬汁、酱油、面包 4 种基质进行测定, 在 4 种食品中均测出山梨酸, 在酱油和面包中检测出苯甲酸, 至于对羟基苯甲酸酯类化合物, 仅在酱油中检测出, 含量为 4.63 mg/kg, 测定结果见表 4。

4　结　论

国标方法中液体样品多数为稀释后经滤膜过滤直接进样, 长期测定对色谱柱的寿命影响较大, 面包等固体样品提取后需经过固相萃取柱净化, 操作繁琐。本方法采用甲醇提取, 提取后经滤膜过滤利用高效液相色谱, 二极管阵列检测器同时对食品中 7 防腐剂进行检测。本方法统一了 7 种防腐剂的前处理方法, 提高其分析效率, 能达到更低的检出限。结果表明, 方法线性范围为 0.1~10 mg/L, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.9999$, 检出限(S/N=3)为 50~100 μg/L。

表 1　方法线性方程, 线性范围及检出限

Table 1　Linear equations, correlation coefficients, and LOD of 7 kinds of preservatives

防腐剂	线性回归方程	相关系数 (R^2)	线性范围 mg/L	检出限 LOD $Y^{\mu g}/L^{Y}$
山梨酸	Y=0.998X+0.010	0.99994	0.1~10	60
苯甲酸	Y=0.998X+0.009	0.99996	0.1~10	100
脱氢乙酸	Y=0.998X+0.016	0.99994	0.1~10	100
对羟基苯甲酸甲酯	Y=0.999X+0.002	0.99995	0.1~10	50
对羟基苯甲酸乙酯	Y=0.998X+0.007	0.99994	0.1~10	100
对羟基苯甲酸丙酯	Y=0.998X+0.013	0.99992	0.1~10	50
对羟基苯甲酸丁酯	Y=1.001X-0.010	0.99993	0.1~10	50

表 2　加标回收结果(n=3)

Table 2　Spiked recoveries of preservatives (n=3)

样品名称	回收率(%)						
	山梨酸	苯甲酸	脱氢锑酸	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯
葡萄酒	86.00	81.94	87.18	91.55	90.23	93.96	84.43
柠檬汁	85.19	89.43	92.20	92.11	94.76	95.96	94.34
酱油	80.37	80.36	77.90	77.72	82.93	78.34	77.28
面包	89.09	101.19	106.81	97.74	98.14	102.02	103.35

表 3 相对标准偏差(*n*=3)
Table 3 RSD of preservatives (*n*=3)

样品名称	相对标准偏差(RSD%)						
	山梨酸	苯甲酸	脱氢锑酸	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯
葡萄酒	1.98	1.64	1.11	1.30	1.37	1.35	1.19
柠檬汁	1.04	1.62	1.36	1.58	1.63	1.49	1.58
酱油	0.52	0.69	0.81	0.52	0.47	0.96	0.78
面包	2.38	1.63	0.84	0.93	0.51	0.46	1.89

表 4 4 种食品基质中 7 种防腐剂含量的测定(*n*=3)
Table 4 Content of preservatives in 4 kinds of food (*n*=3)

样品名称	样品含量 (mg/kg)						
	山梨酸	苯甲酸	脱氢锑酸	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸甲酯
葡萄酒	0.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND
柠檬汁	1.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND
酱油	22.65	12.73	ND	4.63	ND	ND	ND
面包	0.95	11.78	ND	ND	ND	ND	ND

* ND: not detected

参考文献

[1] 孔静. 防腐剂对人体是否有害[J]. 农村经济与科技, 2009, 20(11): 92–92.
Kong J. Preservatives are harmful to humans [J]. Rural Econ Sci Technol, 2009, 20(11): 92–92.

[2] GB 2760–2011 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2011 Standards for uses of food additives [S].

[3] GB/T 5009.29-2003 食品中苯甲酸、山梨酸的测定[S].
GB/T 5009.29-2003 Determination of benzoic acid, sorbic acidin foods [S].

[4] GB/T 23377-2009 食品中脱氢乙酸的测定[S].
GB/T 23377-2009 Determination of dehydroacetic acid in foods [S].

[5] GB/T 5009.31-2003 食品中对羟基苯甲酸甲酯类的测定[S].
GB/T 5009.31-2003 Determination of p-hydroxybenzoic acid methyl esters in foods [S].

[6] 陈尚文, 胡谦. 高效液相色谱法测定食品中有机酸[J]. 色谱, 1993, (3): 175–177.
Chen SW, Hu Q. Determination of organic acids in food by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 1993, (3): 175–177.

[7] 陈俊, 周路明. 亚铁氰化钾-乙酸锌在 HPLC 测定酱油中防腐剂的应用[J]. 中国调味品, 2007, (10): 72–74.
Chen J, Zhou LM. Potassium hexacyano ferrate-zine acetate is used in preservative of sauce by HPLC [J]. China Cond, 2007, (10): 72–74.

[8] 黄百芬, 张文娟, 沈向红, 等. 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.
Huang BF, Zhang WJ, Shen XH, e*t al*. Simultaneous determination of 8 kinds of preservatives in soy sauce or drink at the same time and 3 kinds of sweetener by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(10): 1208–1211.

[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, (9): 1057–1059.
Xu XM, Wu XM, Liang CS, *et al*. Determination of benzoic, sorbic acid, sodium saccharin in food by LC-MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, (9): 1057–1059.

[10] 胡巧茹, 李静. 离子色谱法同时测定食品中的三种甜味剂和两种防腐剂[C]. 离子色谱学术报告会, 2010.
Hu QR, Li J. Simultaneous determination of sweeteners and preservatives by ion chromatography method [C]. Chromatography, 2010

[11] 顾秀英, 欧菊芳, 王东铭, 等. 气相色谱内标法测定食品中多

种常见防腐剂的含量[J]. 食品科技, 2012, (12): 301–305.
Gu XY, Ou JF, Wang DM, *et al*. Determination of eleven preservatives in food by gas chromatography [J]. Sci Technol, 2012, (12): 301–305.

[12] 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.
Xin RZ, Ding M, Zheng XG, *et al*. Compound preservative and cyclamate determinate by gas chromatography [J]. Health Res, 2008, 37(4): 498–501.

[13] 高杨, 郑玉山. 气相色谱法及气相色谱-质谱法测定调味品中的对羟基苯甲酸酯[J]. 中国调味品, 2014, (8): 106–108.
Gao Y, Zheng YS. Determination of parabens in condiment by gas chromatography [J].China Cond, 2014, (8): 106–108.

[14] 鞠福龙, 李春娟, 李东刚. 气相色谱-质谱联用法同时检测调味品中 7 种防腐剂[J]. 中国调味品, 2009, 34(10): 79–81.
Ju FL, Li CJ, Li DG. Simultaneous testing 7 preservatives in condiments by GC-MS [J]. China Cond, 2009, 34(10): 79–81.

[15] 向俊. 气相色谱-质谱联用技术在食品药品分析中的应用[D]. 湖南: 湖南师范大学, 2010.
Xiang J. GC-MS technology application in the food and drug analysis [D]. Hunan: Hunan Normal University, 2010.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介

刘　佟, 主要研究方向为食品质量安全检测。
E-mail: liutong1@cofco.com

杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: yangyongtan@cofco.com