

高效液相色谱法测定起酥油中的苯甲酸和山梨酸

叶景文¹, 严丽娟², 郑向华², 郭彩华³, 徐敦明², 方恩华^{2*}

(1. 集美大学诚毅学院, 厦门 361021; 2. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 厦门 361026;
3. 集美大学食品与生物工程学院, 厦门 361021)

摘要: **目的** 建立起酥油中苯甲酸和山梨酸的高效液相色谱法测定方法, 对 GB/T 5009.29 中没有涉及的食品类型的检测方法进行补充。**方法** 样品使用弱碱水提取, 用弱酸液体将溶液调至弱酸性(pH 约为 6), 经过 0.2 μm 微孔过滤膜过滤; 进样分析。色谱柱: CNW C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: B 相, 甲醇溶液, 5%; C 相, 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(50 mL 甲醇+950 mL 超纯水, 0.77 g 乙酸铵), 95%; 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 3.0 μL ; 采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。**结果** 在 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 苯甲酸和山梨酸的相关系数均大于 0.99, 平均回收率 93.76%和 98.00%, 相对标准偏差 9.22%和 10.93%, 检出限都是 1 mg/kg。**结论** 该方法具有样品预处理简单、分析速度快、灵敏度高的特点, 可用于起酥油中苯甲酸和山梨酸的同时快速检测。

关键词: 高效液相色谱法; 起酥油; 苯甲酸; 山梨酸

Determination of benzoic acid and sorbic acid in shortening oil by high performance liquid chromatography

YE Jing-Wen¹, YAN Li-Juan², ZHENG Xiang-Hua², GUO Cai-Hua³, XU Dun-Ming², FANG En-Hua^{2*}

(1. Chengyi College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Technical Center of Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China; 3. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography method for determination of benzoic acid and sorbic acid in shortening oil, which food type does not involved in GB/T 5009.29 detection ruler. **Methods** The sample was extracted by weak base water and converted the extraction liquid to weak acidic (pH about 6) with weak acid solution, then the sample was analyzed after filtering with 0.2 μm microfiltration membrane. The detection condition was as column: CNW C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase: B phase, methanol solution, 5%; C phase, 10 mmol/L ammonium acetate solution (50 mL of methanol +950 mL ultrapure water, 0.77 g ammonium acetate), 95%; detection wavelength: 230 nm; flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: room temperature; and injection volume: 3.0 μL . Finally, the benzoic acid and sorbic acid in shortening oil were qualitatively analyzed with chromatographic peak retention time and quantitatively analyzed with external standard peak area, respectively. **Results** This method showed a good linearity in 1~50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r^2>0.99$), the average recoveries were 93.76% and 98.00%, and relative standard

基金项目: 国家质检总局科研项目 (2014IK111, 2013IK186, 2012IK193)

Fund: Supported by Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China (2014IK111, 2013IK186, 2012IK193)

*通讯作者: 方恩华, 高级工程师, 主要从事食品安全分析研究。E-mail: fangeh@xmciq.gov.cn

*Corresponding author: FANG En-Hua, Senior Engineer, Technical Center of Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.2165, Jiangong Road, Haicang District, Xiamen 361026, China. E-mail: fangeh@xmciq.gov.cn

deviation were 9.22% and 10.93%, and the detection limit was 1 mg/kg. **Conclusion** The sample preparation method is simple, rapid and high sensitive, which can be used for the rapid detection of benzoic acid and sorbic acid in shortening oil.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; shortening oil; benzoic acid; sorbic acid

1 引言

现代的起酥油产品是通过使用精制动、植物油、氢化油或上述混合油脂,经过速冷、捏合等工艺生产出的固体油脂产品^[1]。或者不经过以上工艺而生产出的呈固状、半固状或流动状且具有良好起酥性能的油脂产品^[2]。起酥油一般呈白色或淡黄色,质地均匀,细腻柔软,无杂质,气味良好。根据熔点不同,可将起酥油分为 33~38 °C, 38~43 °C, 43~47 °C 和大于 47 °C 等不同规格,其生产工艺一般是将精炼后的食用油经速冷、捏和、充氮等工序制成半成品,包装后在恒温下(25~28 °C)养晶 72 h,使食用油形成稳定的晶型,即为成品^[3]。起酥油不同于人造奶油不能直接食用^[4],在食品工业中一般用于油炸烤炙、面包和蛋糕加工等^[5]。

山梨酸及其钾盐作为防腐剂、抗氧化剂和稳定剂可以在起酥油中使用,台湾地区将山梨酸称为“己二烯酸”^[6]。GB 2760-2014 食品添加剂使用标准中对人造黄油(人造奶油)及其类似制品中山梨酸及其钾盐的最大使用量规定为 1.0 g/kg,其中山梨酸钾使用量以山梨酸计^[7],市场商品中有超量添加山梨酸的情况。同样作为常用防腐剂的苯甲酸,国标中规定的适用范围却不包括人造黄油,但因为苯甲酸较为便宜有可能违规添加,因此有必要开发一种快速、简单和适用于起酥油的防腐剂检测方法。

目前,国内关于苯甲酸和山梨酸的检测主要使用高效液相色谱法(HPLC)^[8-12],气相色谱法^[13],高效毛细管电泳法^[14]等,其中 HPLC 较为常用,但是对起酥油这种高油脂样品,缺乏相关报道。文献中的前处理方法适用性不强,针对去除油脂干扰的考虑不多。本研究旨在建立一种同时测定起酥油中两种目标物的 HPLC,并满足法规 GB2760^[15]的检测限量要求。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

苯甲酸和山梨酸标准品购自德国 Dr.Ehrenstorfer

公司,纯度均大于 99.0%,用超纯水配制成 10.0 mg/mL 的母液。供试样品来自台湾地区 A 公司瓶装起酥油(规格为 33~38 °C)。

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器(美国 Agilent 公司),CNW C₁₈柱(250 mm×4.6mm i.d., 5.0 μm, 上海安谱);IKA T18 Basic 均质器(德国 IKA 公司);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司),其他试剂为分析纯,实验用水为去离子水。

2.2 标准溶液的配制

准确移取苯甲酸、山梨酸标准溶液(10.0 mg/mL)各 1.00 mL 于一个 10 mL 容量瓶中,用超纯水定容至刻度,得到 1000 μg/mL 的混合标准工作液。临用时,逐级稀释成质量浓度分别为 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 的系列混合标准溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: CNW C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: A 相, 甲醇溶液, 5%; B 相, 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(50 mL 甲醇+950 mL 超纯水, 0.77 g 乙酸铵), 95%;检测波长: 230 nm;流速: 1.0 mL/min;柱温: 室温;进样量: 3.0 μL;采用色谱峰保留时间定性,外标法峰面积定量。

2.4 样品处理

称取来自于台湾地区的瓶装起酥油(规格为 33~38 °C)1.00 g 样品于离心管中,加入 10 mL 弱碱水(1000 mL 蒸馏水+136 μL 1 mol/L NaOH, pH 约为 8),盖上盖子,水浴加热至溶解完全;待冷却后从下层用吸管分取 5 mL 到刻度试管(注意不要取到上层油),加 34 μL 弱酸液体(弱酸液体:加入 25.5 μL 1 mol/L 盐酸到 200 mL 水中得到, pH 约为 6)将溶液调至弱酸性(pH 约为 6);超纯水定容 10 mL,总体相当于样品稀释 20 倍;经 0.2 μm 微孔过滤膜过滤;进样分析。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理优化

为优化称样量和稀释倍数,称取不同质量的含

有山梨酸的阳性样品, 并稀释不同倍数, 以确定最佳称样质量和最佳稀释倍数。结果见表 1, 结果表明, 称取 2.00 g 样品和称取 1.00 g 样品, 稀释同样的倍数, 测得 1.00 g 样品浓度较高; 同样称取 1.00 g 样品稀释不同的倍数, 发现稀释 20 倍时样品浓度最高, 其他稀释 40 倍、60 倍和 80 倍的样品浓度相差不大。

表 1 阳性样品稀释实验
Table 1 Positive sample dilution experiments

| 称取样品/g | 稀释倍数 | 样品瓶浓度 /mg/kg | 样品浓度 /mg/kg |
|--------|------|--------------|-------------|
| 1.0 | 20.0 | 14.80 | 296.0 |
| 1.0 | 40.0 | 6.61 | 264.4 |
| 1.0 | 60.0 | 4.17 | 250.2 |
| 1.0 | 80.0 | 3.50 | 280.0 |
| 2.0 | 40.0 | 6.18 | 247.2 |

综合考虑, 样品应取 1.00 g, 前处理过程中的总体稀释倍数以 20 倍为宜。

由图 1 看出, 苯甲酸, 山梨酸标准品中苯甲酸和山梨酸的保留时间分别为 6.746 min 和 9.018 min。可根据采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。

由图 2 看出, 样品的色谱图中山梨酸的保留时间为 9.053 min, 与标准品的山梨酸保留时间 9.018 min 相近, 因此可判断此样品中含有山梨酸。

3.2 方法的线性范围、检出限

通过计算得出在 1.00 g 样品中添加 50、100、200 μL 混合标准工作液(浓度 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时相当于样品本底浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

称取 1.00 g 未测出苯甲酸, 山梨酸的起酥油样品(阴性样品)于离心管中, 分别加入不同体积的标准工作液(50、100、200 μg), 按上述步骤处理, 进样分析。

从表 2 中看出, 加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{g}$ 时的回收率最高, 说明此浓度下, 测得数据较为准确。

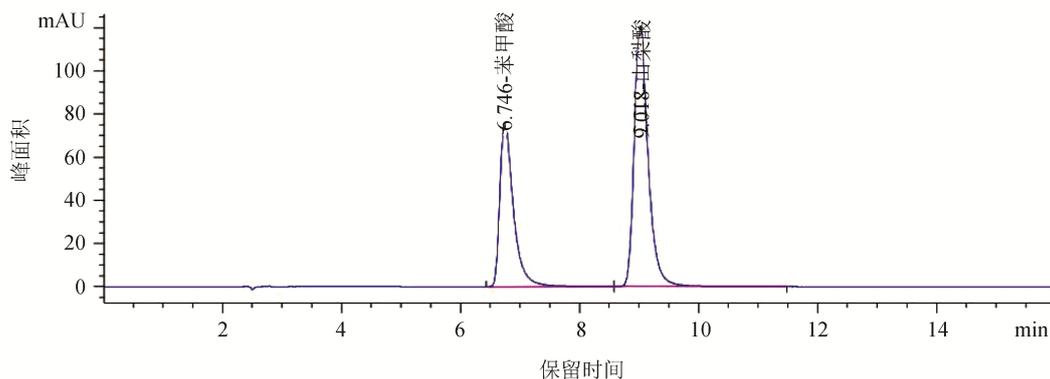


图 1 标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard sample

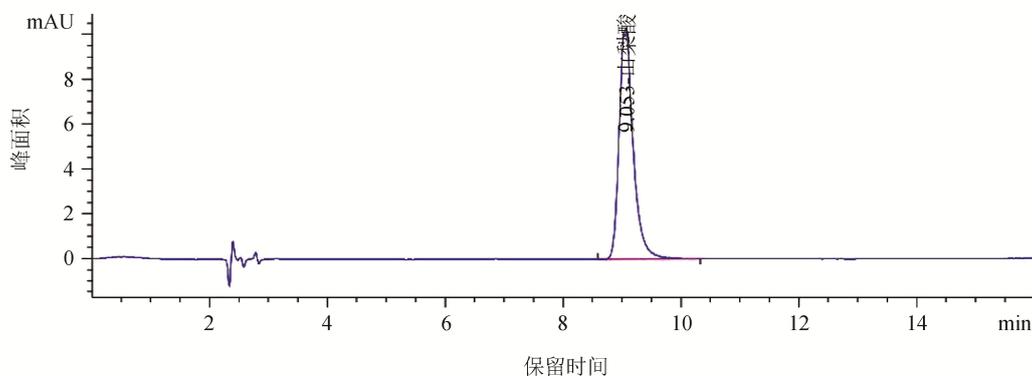


图 2 阳性样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of positive sample

表2 阴性样品加标实验 ($n=3$)
Table 2 Addition test of negative samples ($n=3$)

| 加标浓度/ $\mu\text{g/g}$ | 稀释倍数 | 样品瓶浓度/ $\mu\text{g/mL}$ | | 样品浓度/ $\mu\text{g/mL}$ | | 回收率 | |
|-----------------------|------|-------------------------|------|------------------------|-------|--------|--------|
| | | 苯甲酸 | 山梨酸 | 苯甲酸 | 山梨酸 | 苯甲酸 | 山梨酸 |
| 0 | 20 | 0 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 0.00% | 0.00% |
| 50 | 20 | 2.56 | 2.46 | 51.2 | 49.2 | 102.4% | 98.40% |
| 100 | 20 | 4.78 | 4.78 | 95.6 | 95.6 | 95.6% | 95.60% |
| 200 | 20 | 8.18 | 8.18 | 163.6 | 163.6 | 81.8% | 81.80% |

注: 样品瓶浓度是指进样分析时的浓度(稀释后的样品浓度), 样品浓度是指样品的实际浓度(样品含量)

表3 线性范围、检出限
Table 3 The results of linear range and detection limit of benzoic acid and sorbic acid

| 组份 | 测定范围($\mu\text{g/L}$) | 线性方程 | r^2 | 方法检出限(mg/kg) |
|-----|-------------------------|--------------------|--------|-------------------------|
| 苯甲酸 | 1~50 | $Y=33.171X-9.7263$ | 0.9985 | 1 |
| 山梨酸 | 1~50 | $Y=54.263X-16.421$ | 0.9985 | 1 |

移取混合标准工作液逐级稀释, 配成一系列浓度的工作溶液, 在选定条件下, 以 X (质量浓度)对 Y (峰面积)绘制工作曲线, 两个目标组分的线性方程及相关系数, 见表3和图3、图4所示。

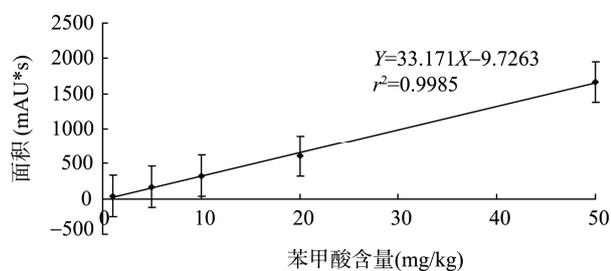


图3 苯甲酸标准曲线图

Fig. 3 Calibration curve of benzoic acid

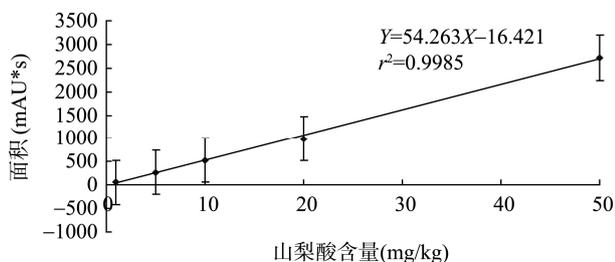


图4 山梨酸标准曲线图

Fig. 4 Calibration curve of sorbic acid

3.3 准确度与精密度试验

在最优化条件下, 考察苯甲酸和山梨酸在起酥油样品中的加标回收率, 分别称取 1.00 g 未测出苯甲酸、山梨酸的起酥油阴性样品(见图5)于离心管中, 加入含量各为 50 μg 的苯甲酸、山梨酸混合标准工作液, 按上述步骤进行处理, 进样分析。进行 6 次平行测定, 结果见表4。

表4 加标回收率及其相对标准偏差 ($n=6$)
Table 4 Recoveries and relative standard deviation of samples ($n=6$)

| 组份 | 加入量(mg/kg) | 回收率(%) | RSD (%) |
|-----|-----------------------|--------|---------|
| 苯甲酸 | 50 | 93.76% | 9.22% |
| 山梨酸 | 50 | 98.00% | 10.93% |

阴性样品加标后(见图6), 其中苯甲酸和山梨酸的保留时间分别为 6.832 min 和 9.071 min。可根据色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。

从以上实验数据得出, 苯甲酸回收率为 93.76%, 山梨酸回收率为 98.00%, 相对标准偏差(RSDs)分别为 9.22%、10.93%; 本法对起酥油基质中的防腐剂测定具有较好的准确度与精密度。

3.4 样品测定

在优化后的色谱条件下, 我们对市售起酥油样品进行筛查测定, 发现大部分起酥油样品为阴性, 仅个别起酥油样品中检出山梨酸。

根据初步筛查结果, 对山梨酸阳性的起酥油样品按上述步骤处理, 进行 6 次平行测定, 该阳性样品的典型色谱图见图 7。图中山梨酸的保留时间为 9.059 min, 与标准品中山梨酸的保留时间 9.018 min 相近, 因此可判断此样品中含有山梨酸。经过计算, 山梨酸的平均含量为 248.5 mg/kg, 见表 5。

表 5 阳性样品中山梨酸含量平行实验($n=6$)
Table 5 Positive samples of sorbic parallel experiments ($n=6$)

| 序号 | 样品瓶浓度/ $\mu\text{g/mL}$ | 样品浓度/ mg/kg |
|----|-------------------------|----------------------|
| 1 | 11.50 | 230 |
| 2 | 8.68 | 173.6 |
| 3 | 13.50 | 270 |
| 4 | 12.85 | 257 |
| 5 | 14.40 | 288 |
| 6 | 12.80 | 256 |

注: 样品瓶浓度是指进样分析时的浓度(稀释后的样品浓度), 样品浓度是指样品的实际浓度(样品含量)

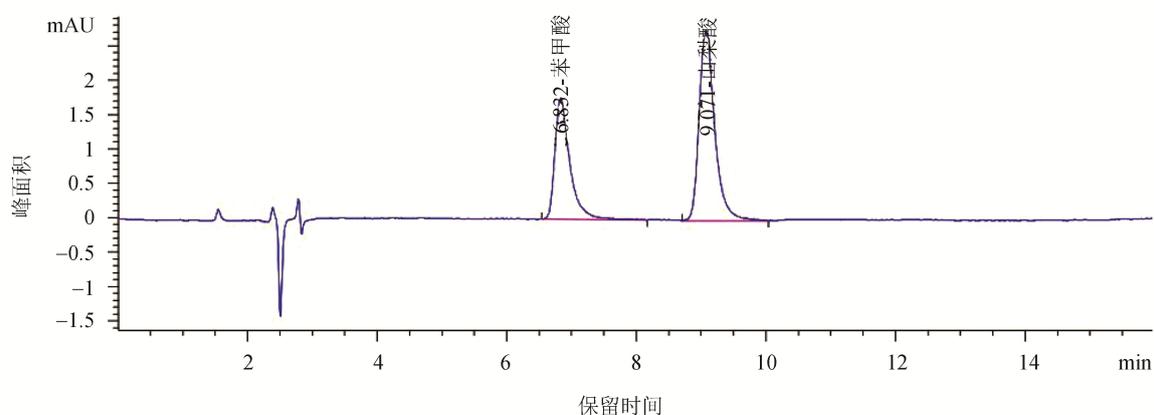


图 5 阴性样品色谱图

Fig. 5 Chromatogram of samples

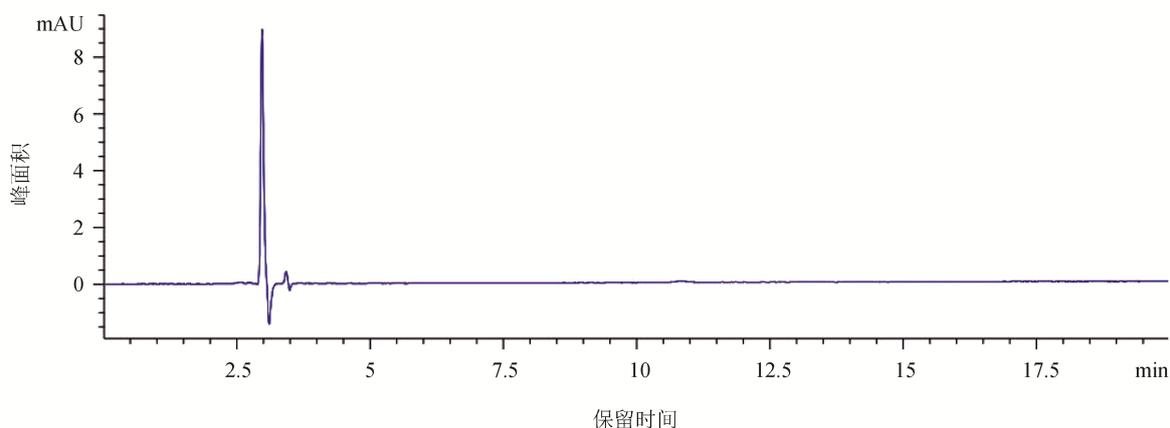


图 6 阴性样品加标色谱图

Fig. 6 Chromatogram of negative samples spiked

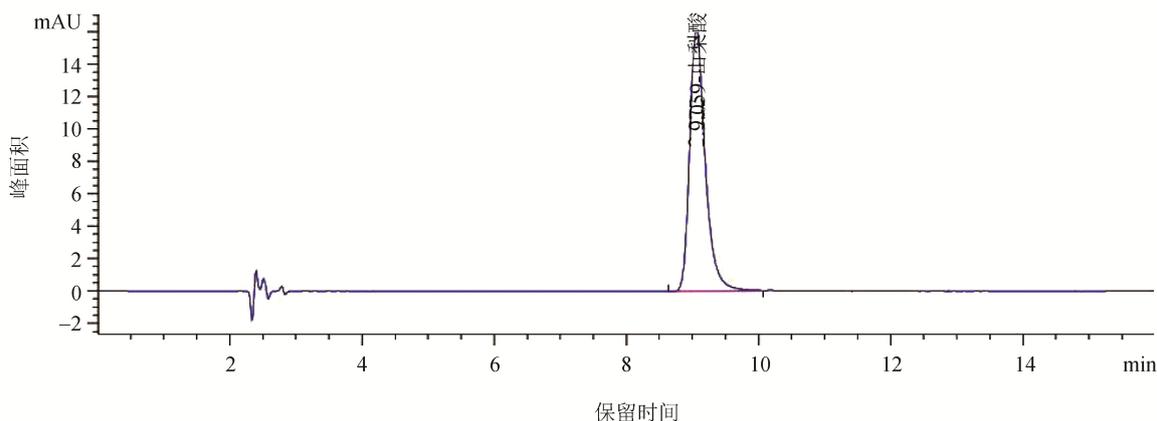


图7 山梨酸阳性样品色谱图
Fig. 7 Chromatogram of samples

4 结论

通过对液相色谱法同时检测苯甲酸和山梨酸所采用前处理方法的优化研究,本研究建立了一种同时测定起酥油中两种目标物的高效液相色谱分析方法。与文献方法相比,该方法扩展了样品基质类型,具有样品预处理简单、分析速度快、灵敏度高的特点,可以用于起酥油中苯甲酸和山梨酸的同时快速测定。

参考文献

- [1] 牛建国. 起酥油概说[J]. 油脂科技, 1983, (03): 1-7.
Niu JG. A summary of shortening [J]. Fat Technol, 1983, (03): 1-7.
- [2] 徐得琼. 起酥油及乳化剂让冷饮更“良”[J]. 中国食品工业, 2005, (2): 53-54.
Xu DQ. Pastry margarine & ester for cold drink [J]. China Food Ind, 2005, (2): 53-54.
- [3] 肖庆敏, 陈刚. 起酥油和人造奶油在冷食生产中的优缺点比较[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2000, (4): 7-9.
Xiao QM, Chen G. Compared to butter and margarine in cold production advantages and disadvantages [J]. Frozen Food Ind, 2000, (4): 7-9.
- [4] 丁纯孝. 起酥油简介[J]. 食品科学, 1988, (06): 34-37.
Ding CX. Shortening profile [J]. Food Sci, 1988, (06): 34-37.
- [5] 华聘聘, 黄祖德. 流态起酥油的用途和制备[J]. 粮食与油脂, 2000, (02): 22-23.
Hua PP, Huang ZD. The use and preparation of fluid shortening [J]. Cereal Oil, 2000, (02): 22-23.
- [6] 徐敦明, 李云露, 李建军, 等. 海峡两岸食品防腐剂法规标准对比研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(05):1563-1573.
Xu DM, Li YL, Li JJ, *et al.* Comparison study on regulation standards of food preservatives between two sides of Taiwan Strait [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(05):1563-1573.
- [7] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standards of food additives using standard [S].
- [8] 李静娜, 黄常刚, 朱其明, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、糖精钠的方法研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2011, 22(4): 91-93.
Li JN, Huang CG, Zhu QM, *et al.* High performance liquid chromatography determination of benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, sodium saccharin method [J]. J Pub Health Prev Med, 2011, 22(4): 91-93.
- [9] 程春梅, 李歆, 董刘敏, 等. 月饼中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸检测方法研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(11): 102-103.
Chen CM, Li Q, Dong LM, *et al.* Moon cake acesulfame study, sodium saccharin, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid detection method [J]. Jiangxi Agric Sci, 2009, 21(11): 102-103.
- [10] 刘佟, 王浩, 苗雨田, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中7种防腐剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (4): 1148-1153.
Liu T, Wang H, Miao YT, *et al.* Determination of 7 preservatives in food using high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, (4): 1148-1153.
- [11] 王震, 石丽珠. 超高效液相色谱-串联质谱测定饮料和酒中防腐剂与甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, (4):

- 1179–1184.
- Wang Z, Shi LZ. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry beverages and wine preservatives and sweeteners [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (4): 1179–1184.
- [12] 魏杰, 郭志谋, 章飞芳, 等. 高压液相色谱法快速测定饮料中的五种食品添加剂[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, (2): 395–400.
- Wei J, Guo ZM, Zhang FF, *et al.* Rapid determination of 5 food additives in soft drinks by high pressure liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, (2): 395–400.
- [13] 方萍. 气相色谱法测定液态、固液混合态食品中山梨酸、苯甲酸方法的研究[J]. *工艺技术*, 2006, (4): 34–36.
- Fang P. Studies liquid, solid-liquid mixed state of sorbic acid, benzoic acid method [J]. *Gas Chromatogr Technol*, 2006, (4): 34–36.
- [14] 曹小妹, 薛江超, 高文惠, 等. 高效毛细管电泳法同时检测饲料中七种防腐剂[J]. *饲料工业*, 2012, 33(15): 61–64.
- Cao XM, Xue JC, Gao WH, *et al.* Capillary electrophoresis method for simultaneous determination of 7 feed preservative [J]. *Feed Ind*, 2012, 33(15): 61–64.
- [15] GB/T 5009.29-2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].
- GB/T 5009.29-2003 Determination of sorbic acid and benzoic acid in food [S].

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



叶景文, 学生, 本科在读, 主要研究方向为食品安全检测方向。

E-mail: 704579524@qq.com



方恩华, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析。

E-mail: fangeh@xmciq.gov.cn