

# 高效液相色谱法测定黄酒中苯甲酸、山梨酸和糖精钠含量

宋利军<sup>1\*</sup>, 周 鸿<sup>2</sup>, 刘成伟<sup>2</sup>, 谭洪涛<sup>2</sup>, 熊 丽<sup>2</sup>, 李腾根<sup>1</sup>, 周银古<sup>1</sup>

(1. 新余市疾病预防控制中心, 新余 338000; 2. 江西省疾病预防控制中心, 南昌 330000)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法测定黄酒中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的分析方法。**方法** 样品经称取、加热、定容, 利用高效液相色谱法检测, 甲醇水混合溶液作为流动相, PDA 检测器检测, 苯甲酸、山梨酸和糖精钠的检测波长为 230 nm。**结果** 苯甲酸和山梨酸在 0.05~0.30 mg/mL、糖精钠在 0.0025~0.0125 mg/mL 时, 都具有良好的线性关系, 相关系数( $r$ )均 > 0.999。苯甲酸、山梨酸和糖精钠的 LOD 分别为 1.8、1.2、0.1 g/kg, LOQ 分别为 5.4、3.6、0.3 mg/kg。平均加标回收率为 95.1%~96.4%, RSD 为 2.6%~3.8%。50 份黄酒样品中, 苯甲酸检出有 19 份, 检出率为 38.0%, 检测结果范围为 0.0025~1.48 g/kg; 山梨酸检出有 6 份, 检出率为 12.0%, 检测结果范围为 0.028~0.44 g/kg; 糖精钠检出有 24 份, 检出率为 48.0%, 检测结果范围为 0.005~0.73 g/kg。**结论** 该方法灵敏度高, 回收率高, 检测限低, 符合分析要求, 适合黄酒中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的检测要求。

**关键词:** 高效液相色谱法; 黄酒; 食品防腐剂; 苯甲酸; 山梨酸; 糖精钠

## Determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in rice wine by high performance liquid chromatography

SONG Li-Jun<sup>1\*</sup>, ZHOU Hong<sup>2</sup>, LIU Cheng-Wei<sup>2</sup>, TAN Hong-Tao<sup>2</sup>, XIONG Li<sup>2</sup>,  
LI Teng-Gen<sup>1</sup>, ZHOU Yin-Gu<sup>1</sup>

(1. Xinyu City Center for Disease Control and Prevention, Xinyu 338000, China; 2. Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in rice wine by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The samples were weighed, heated and fixed, then detected by HPLC with methanol water mixed solution as mobile phase, with PDA detector, and the detection wavelengths of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium were 230 nm. **Results** There were good linear relationships within 0.05~0.30 mg/mL for benzoic acid and sorbic acid, and 0.0025~0.0125 mg/mL for saccharin sodium, with the correlation coefficients ( $r$ ) > 0.999. The LODs of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium were 1.8, 1.2 and 0.1 mg/kg, and the LOQs were 5.4, 3.6 and 0.3 mg/kg, respectively. The average spiked recoveries were 95.1%~96.4%, and the relative standard deviations (RSDs) were 2.6%~3.8%. Among 50 rice wine samples, there were 19 samples of benzoic acid, 6 samples of sorbic acid and 24 samples of saccharin sodium

基金项目: 新余市科技计划项目(20123090851)

Fund: Supported by Xinyu City Science and Technology Project (20123090851)

\*通讯作者: 宋利军, 主管技师, 主要研究方向为国家食品安全风险监测。E-mail: song1984117@163.com

\*Corresponding author: SONG Li-Jun, Chief Technician, Xinyu City Center for Disease Control and Prevention, Xinyu 338000, China. E-mail: song1984117@163.com

detected, with the detection rates of 38%, 12.0% and 48.0%, and the detection range were 0.0025~1.48, 0.028~0.44 and 0.005~0.73 g/kg, respectively. **Conclusions** The established method has high sensitivity, high recovery rate, and low detection limit, which is suitable for the detection of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in rice wine.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography; rice wine; food additives; benzoic acid; sorbic acid; saccharin sodium

## 1 引言

黄酒因其香气浓郁, 甘甜味美, 风味醇厚, 并含有氨基酸、糖、醋、有机酸和多种维生素等特点而成为我们日常生活中必不可少的重要原料。然而, 为改善黄酒色、香、味等品质、防腐和满足加工工艺的要求, 需要添加食品防腐剂和甜味剂, 并且食品防腐剂和甜味剂的种类和用量都在增加。食品防腐剂包括苯甲酸、山梨酸等, 甜味剂包括糖精钠等。苯甲酸及其盐是一种广谱抗微生物试剂, 对酵母菌、霉菌、部分细菌作用效果很好, 在允许最大使用范围内, pH 值 4.5 以下, 对各种菌都有效<sup>[1]</sup>。食苯甲酸对小鼠骨髓细胞有致突变作用, 小鼠骨髓细胞微核试验及小鼠骨髓细胞染色体畸变试验均呈阳性( $P < 0.01$ ), 表明苯甲酸是染色体断裂剂, 而且对雄性动物的致突变作用更大<sup>[2]</sup>。同时如果人们长期摄入过量的苯甲酸, 会抑制人体的淋巴球生长, 进而抑制体重<sup>[3]</sup>。山梨酸  $\alpha$ 、 $\beta$  位上的双键阻止了霉菌的脱氢, 从而有效阻止了微生物的生长, 它还能与微生物酶系统中的巯基结合, 达到抑制微生物增殖及防腐的目的, 如能够抑制包括肉毒杆菌在内的各类病原体的滋生, 而对有益的菌丛基本上没有影响。山梨酸在体内参与正常的代谢活动, 最后被氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ , 它的毒性低于苯甲酸及其钠盐, 公认是比较安全的防腐剂<sup>[4]</sup>。研究显示用添加 15% 山梨酸的饲料喂小白鼠, 15 只小白鼠中有一半患了肝癌, 因此要控制其用量<sup>[5]</sup>。山梨酸除应用于食品防腐剂方面外, 还可用于杀虫剂的配制及合成橡胶工业等领域<sup>[6]</sup>。研究显示大剂量的糖精钠可导致雄性大鼠膀胱癌<sup>[7]</sup>。我国也采取了严格限制糖精钠使用政策, 并规定婴儿食品中不得使用糖精钠<sup>[8]</sup>。所以, 确保市场流通的黄酒品质安全是当前和今后的工作重点, 必须高度重视。

目前, 有关果酒中食品防腐剂和甜味剂残留的检测方法主要有分光光度法<sup>[9,10]</sup>、电化学方法<sup>[11,12]</sup>、毛细管电泳法<sup>[13,14]</sup>、离子色谱法<sup>[15,16]</sup>、气相色谱及气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[17-20]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)及液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[21-23]</sup>。高效液相色谱法具有分析速度快、分离效能高、灵敏度高、应用范围广、样品量少、容易回收等特点, 已经广泛应用于果酒中食品防腐剂和甜味剂的测定。本文通过考察色谱图、回收率与

精密度, 建立了高效液相色谱法测定黄酒中的食品防腐剂和甜味剂残留量的方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

仪器: LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); XK80-A 快速混匀器(江苏新康医疗器械有限公司); HC-2518R 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

试剂: 乙腈(色谱纯, 批号: 20140617, 美国 burdick & jackson®公司); 磷酸二氢钾(分析纯, 批号: 20140824, 国药集团化学试剂有限公司); 冰乙酸(优级纯, 批号: 20141015, 上海试剂一厂); 标准品: 苯甲酸、山梨酸和糖精钠(1.00 mg/mL, 批号: 201412, 中国计量科学研究院)。

### 2.2 试验方法

#### 2.2.1 混合标准使用液的配制

分别准确吸取苯甲酸和山梨酸各 1.0 mL、糖精钠 0.1 mL 标准溶液于 10 mL 的容量瓶中, 用 10% 的甲醇-水溶液配制成苯甲酸和山梨酸 0.10 mg/mL、糖精钠 0.01 mg/mL 的混合标准溶液。

#### 2.2.2 样品前处理

准确称取 2.0 g 样品于 50 mL 烧杯中, 水浴加热除去乙醇, 冷却至室温后转移至 10 mL 容量瓶, 加水定容, 混匀后过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 上机测定。

#### 2.2.3 色谱条件

Shim-pack VP-ODS 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量: 10  $\mu\text{L}$ , 流速: 1 mL/min, 流动相: 乙腈, 20 mmol/L 磷酸二氢钾溶液, 检测波长: 苯甲酸和山梨酸的检测波长为 230 nm。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件  
Table 1 Conditions of gradient elution

流动相组分	比例(%)					
	0 min	8 min	9 min	11 min	12 min	20 min
乙腈	10	45	70	70	10	10
磷酸二氢钾溶液	90	55	30	30	90	90

### 2.2.4 结果计算

样品中各种添加剂的浓度按式(1)进行计算:

$$X = \frac{5 \times C}{1000} \quad (1)$$

式中:

$X$ —样品中添加剂的含量, g/kg;

$C$ —由标准曲线求得的样品溶液浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

5—提取过程对样品的稀释倍数, 单位为 mL/g;

1000—样品浓度由  $\mu\text{g/g}$  换算成 g/kg 的换算系数。

## 3 结果与分析

### 3.1 苯甲酸、山梨酸和糖精钠的色谱图

分别配制苯甲酸和山梨酸浓度均为 0.10 mg/mL、糖精钠浓度为 0.01 mg/mL 的混合标准溶液进行定性检测。从图 1 中可以看出, 苯甲酸、山梨酸和糖精钠的出峰时间分别为 9.5、13.7 和 16.5 min 附近。

### 3.2 线性范围、检出限及定量限

分别吸取混合标准使用液用纯水稀释配制标准系列。苯甲酸和山梨酸的浓度系列为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg/mL, 糖精钠的浓度系列为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 。以目标物定量离子峰面积对溶液质量浓度绘制标准曲线, 得到线性回归方程见表 2。结果表明, 3 种食品防

腐剂具有良好的线性关系, 相关系数( $r$ )均 > 0.999。信噪比  $S/N=3$  时, 对应的样品质量浓度为检出限(LOD); 信噪比  $S/N=10$  时, 对应的样品质量浓度为定量限(LOQ)。苯甲酸、山梨酸、糖精钠的 LOD 分别为 1.8、1.2、0.1 g/kg, LOQ 分别为 5.4、3.6、0.3 mg/kg。结果见表 2。

### 3.3 方法的回收率及精密度

对阴性样品进行加标回收率和精密度试验, 添加 2 个水平的标准溶液, 苯甲酸和山梨酸的添加水平为 0.05、0.25 mg/mL, 糖精钠的添加水平为 0.0025、0.01 mg/mL, 加标样品充分混匀, 使目标物与样品基质充分接触, 再按照 2.2.2 操作, 每个加标水平分别进行 6 次平行测定, 得到的回收率和精密度结果见表 3。结果表明, 平均加标回收率为 95.1%~96.4%, RSD 为 2.6%~3.8%, 该方法的回收率及精密度满足试验要求。

### 3.4 实际样品检测

运用本文建立的方法对江西省吉安、萍乡、宜春和新余 4 地市范围内的 50 份黄酒样品进行检测, 其中, 苯甲酸检出有 19 份, 检出率为 38.0%, 检测结果范围为 0.0025~1.48 g/kg; 山梨酸检出有 6 份, 检出率为 12.0%, 检测结果范围为 0.028~0.44 g/kg; 糖精钠检出有 24 份, 检出率为 48.0%, 检测结果范围为 0.005~0.73 g/kg。

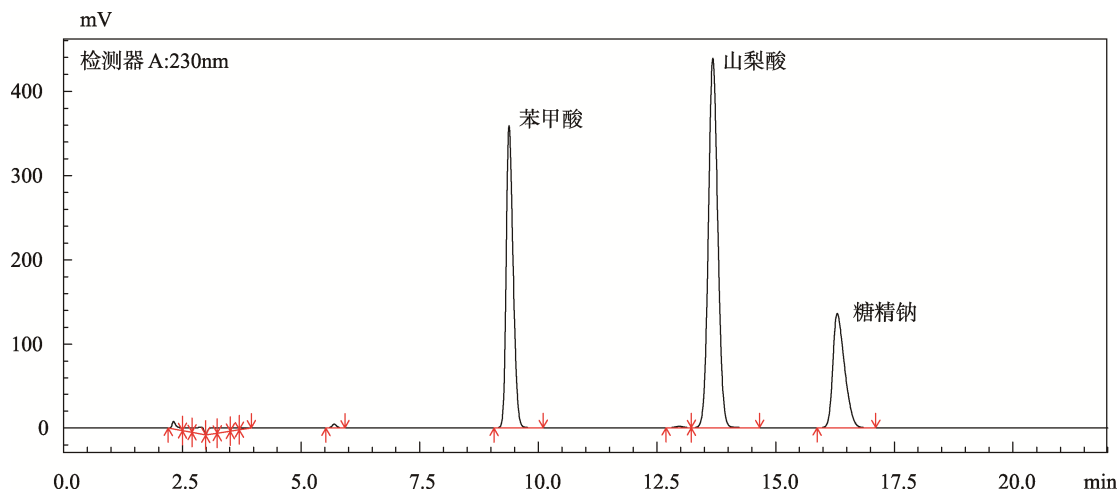


图 1 苯甲酸、山梨酸和糖精钠混合标准工作液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard working solution of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium

表 2 苯甲酸、山梨酸和糖精钠的线性范围、回归方程、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, regression equations, detection limits and quantitation limits of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium

序号	目标物	线性范围(mg/mL)	回归方程	相关系数	LOD(mg/kg)	LOQ(mg/kg)
1	苯甲酸	0.05~0.30	$Y=2.8 \times 10^8 X - 1.1 \times 10^{-3}$	0.9999	1.8	5.4
2	山梨酸	0.05~0.30	$Y=1.7 \times 10^8 X - 1.4 \times 10^{-3}$	0.9999	1.2	3.6
3	糖精钠	0.0025~0.0125	$Y=4.3 \times 10^8 X - 6.8 \times 10^{-4}$	0.9999	0.1	0.3

表 3 苯甲酸、山梨酸和糖精钠的方法回收率及精密度( $n=6$ )  
Table 3 Recoveries and precisions of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium ( $n=6$ )

序号	目标物	添加水平 (mg/mL)	回收率 范围(%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	苯甲酸	0.05	91.2~99.5	96.1	3.1
		0.25	91.3~99.4	95.2	3.6
2	山梨酸	0.05	93.2~99.6	95.5	2.6
		0.25	92.3~97.3	95.1	2.7
3	糖精钠	0.0025	91.4~99.2	95.9	3.0
		0.01	90.5~99.1	96.4	3.8

## 4 结 论

采用高效液相色谱法对黄酒中苯甲酸、山梨酸和糖精钠进行研究, 方法选择了合适的线性范围、回收率及精密度进行分析, 并对实际样品进行检测。结果表明, 高效液相色谱法具有灵敏度高、回收率高、检测限低等优点, 符合分析要求, 满足黄酒中的苯甲酸、山梨酸和糖精钠的分析测试。

## 参 考 文 献

- [1] 凌美庭, 唐述潮, 陶民强. 食品添加剂手册(第 3 版)(精)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.  
Ling GT, Tang SC, Tao MQ. Food additives manual (Version 3) (Essence) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [2] 李菊, 刘淑君, 黄雪琳. 苯甲酸和苯甲酸钠安全性与检测方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2012, 1(9): 49-51.  
Li J, Liu SJ, Huang XL. Research progress on the safety and detection of benzoic acid and sodium benzoate [J]. J Cere Oils, 2012, 1(9): 49-51.
- [3] 谢纲忠, 张全. 2013 年食品防腐剂的应用及发展趋势调研[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(11): 112-116.  
Xie GZ, Zhang Q. Research on the application and development trend of food preservatives in 2013 [J]. Food Res Dev, 2013, 34(11): 112-116.
- [4] 肖丽恒, 吕任一, 李萍. HPLC 法测定番茄果脯中的安赛蜜、苯甲酸、糖精钠和山梨酸[J]. 楚雄师范学院学报, 2013, 28(03): 35-38.  
Xiao LH, Lv YY, Li P. The determination of ameshonia, benzoic acid, saccharide and sorbic acid in the fruit of tomato pulp by HPLC method [J]. J Chuxiong Norm Univ, 2013, 28(03): 35-38.
- [5] 张泽生, 吴天宸, 郭擎, 等. 食品中苯甲酸和山梨酸检测样品前处理方法研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015, 2(5): 162-167.  
Zhang ZS, Wu TC, Guo Q, et al. Study on pretreatment of benzoic acid and sorbic acid in food [J]. China Food Addit, 2015, 2(5): 162-167.
- [6] Hamzah HH, Yusof NA, Salleh AB, et al. An optical test strip for the detection of benzoic acid in food [J]. Sensors, 2011, 11(8): 7302-7313.
- [7] Cysewski P. Pressure-imposed changes of benzoic acid crystals [J]. J Mol Mod, 2015, 21(4): 1-11.
- [8] Van BJ, Mj TD, Hellingwerf KJ, et al. Distinct effects of sorbic acid and acetic acid on the electrophysiology and metabolism of bacillus subtilis [J]. Appl Environ Micro, 2014, 80(19): 5918-5926.
- [9] Heydari R, Shamsipur M, Naleini N. Simultaneous determination of EDTA, sorbic acid, and diclofenac sodium in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography [J]. AAPS Pharm Sci Technol, 2013, 14(2): 764-764.
- [10] Parlee SD, Simon BR, Scheller EL, et al. Administration of saccharin to neonatal mice influences body composition of adult males and reduces body weight of females [J]. Endocrinology, 2014, 155(4): 1313-1326.
- [11] Logrip ML, Vendruscolo LF, Schlosburg JE, et al. Phosphodiesterase 10A regulates alcohol and saccharin self-administration in rats [J]. Neuropsychopharmacol, 2014, 39(7): 1722-1731.
- [12] 郭芳芳, 冯锋, 白云峰, 等. 高效毛细管电泳-紫外检测法同时检测雪糕中多种添加剂[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 206-210.  
Guo FF, Feng F, Bai YF, et al. High efficiency capillary electrophoresis-UV detection method is used to detect various additives in ice cream [J]. Food Sci, 2015, 36(8): 206-210.
- [13] 张礼春, 曾凯, 高舸, 等. 高效毛细管电泳法同时测定饮料中七种防腐剂[J]. 分析试验室, 2015, 34(1): 77-80.  
Zhang LC, Zeng K, Gao G, et al. High performance capillary electrophoresis was used to determine the seven kinds of preservatives in beverage [J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(1): 77-80.
- [14] 朱怀远, 庄亚东, 熊晓敏, 等. 离子色谱法直接测定食品添加剂中的甜蜜素[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 173-176.  
Zhu HY, Zhuang YD, Xiong XM, et al. Direct determination of the sweetness in food additives by Ion chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(2): 173-176.
- [15] 郭爱华, 袁佺, 王玮, 等. 气相色谱法和离子色谱法测定饮料中甜蜜素的方法比较[J]. 现代预防医学, 2015, 42(11): 1975-1978.  
Guo AH, Yuan T, Wang W, et al. The method of gas chromatography and ion chromatography for determination of the sweetness in beverages was compared [J]. Mod Prev Med, 2015, 42(11): 1975-1978.
- [16] 曹小妹, 吴晓燕, 李挥, 等. 固相萃取-气相色谱法测定食品包装材料中邻苯二甲酸酯类物质[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 251-254.  
Cao XS, Wu XY, Li H, et al. Determination of phthalate esters in food packaging materials by solid phase extraction-gas chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(10): 251-254.
- [17] 宗万里. 毛细管气相色谱法测定酱腌菜中对羟基苯甲酸酯类防腐剂含量[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(6): 67-70.  
Zong WL. The content of hydroxybenzoate preservatives was determined by capillary gas chromatography [J]. J Beijing Business Univ (Nat Sci Ed), 2012, 30(6): 67-70.
- [18] 艾连峰, 李玮, 王敬, 等. 气相色谱-串联质谱法测定牛奶中多氯联苯及多环芳烃[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 570-575.  
Ai LF, Li W, Wang J, et al. Determination of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2015, 34(5): 570-575.
- [19] 谢耀轩, 王淑红, 王铁杰, 等. 分散固相萃取-在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱法检测香港中成药中 20 种有机氯农药残留[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(7): 535-541.  
Xie YX, Wang SH, Wang TJ, et al. Detection of the residue of 20 organochlorine pesticides in Hong Kong by the dispersive solid phase extraction-online gel permeation chromatography-gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2014, 31(7): 535-541.

- [20] 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、山梨酸和糖精钠含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5):1434-1438.  
Yuan FQ, Wang J, Niu AH, *et al.* Detection of the content of acid milk beverage and icecream, benzoic acid, sorbic acid and sugar content by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(5): 1434-1438.
- [21] 毛希琴, 李春玲, 任国杰, 等. 高效液相色谱法同时检测化妆品中 38 种限用着色剂[J]. 色谱, 2015, 33(03): 282-290.  
Mao XQ, Li CL, Ren GJ, *et al.* Detection of 38 kinds of colorants in cosmetics by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Chromatography, 2015, 33(03): 282-290.
- [22] 周佳. 高效液相色谱法快速测定蜜饯类食品中防腐剂、甜味剂的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2013.  
Zhou J. Determination of the preservatives and sweeteners in

confectionary food by high performance liquid chromatography (HPLC) [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2013.

- [23] Huang Z, Ma J, Chen B, *et al.* Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2006, 555(2): 233-237.

(责任编辑: 武英华)

### 作者简介



宋利军, 主管技师, 主要研究方向为国家食品安全风险监测。

E-mail: song1984117@163.com

## 《功能性食品研究》专题征稿函

功能性食品是指具有营养功能、感觉功能和调节生理活动功能的食品。目前已研发的功能性食品主要包括: 增强人体体质(增强免疫能力, 激活淋巴系统等)的食品; 防止疾病(高血压、糖尿病、冠心病、便秘和肿瘤等)的食品; 恢复健康(控制胆固醇、防止血小板凝集、调节造血功能等)的食品; 调节身体节律(神经中枢、神经末梢、摄取与吸收功能等)的食品和延缓衰老的食品等。由于其特殊的营养功能, 越来越得到人们的关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“功能性食品研究”专题, 由南昌大学食品学院副院长邓泽元教授担任专题主编, 围绕功能性食品的营养研究、开发应用、安全质量控制等问题展开讨论, 计划在 2017 年 10 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及邓教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2017 年 9 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [jfoods@126.com](mailto:jfoods@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部