

高效液相色谱法测定竹木制食品相关产品中 7 种抗菌防腐剂的残留量

周铭林¹, 王 邱¹, 刘德群¹, 黄雅静², 李 聪^{1*}

(1. 广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300; 2. 广东药科大学, 中山 528400)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定竹木制食品相关产品中 7 种抗菌防腐剂。**方法** 样品经甲醇提取, 选用色谱柱 Agilent (ZORBAX SB-C₁₈) 色谱柱分离, 在 0.02 mol/L 乙酸铵(含 0.03% 乙酸)和甲醇溶液为流动相条件下进行梯度洗脱, 采用二极管阵列检测器, 在 220 nm 波长下检测, 外标法对 7 种抗菌防腐剂的进行定性定量分析。**结果** 该方法分析时间适中, 7 种组分均可分离完全, 线性良好, 相关系数均大于 0.990, 检出限为 1.0~12.0 mg/kg, 平均回收率为 73.96%~108.29%, 相对标准偏差为 0.11%~7.78%(*n*=3)。**结论** 该方法操作简单, 精密度高, 重复性好, 满足同时检测竹木制食品相关产品中 7 种抗菌防腐剂的检测要求。

关键词: 竹木制食品相关产品; 抗菌防腐剂; 高效液相色谱法

Determination of 7 kinds of antibacterial preservatives residues in bamboo and wooden products related food by high performance liquid chromatography

ZHOU Ming-Lin¹, WANG Qiu¹, LIU De-Qun¹, HUANG Ya-Jing², LI Cong^{1*}

(1. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 7 antimicrobial preservatives in bamboo and wooden products related food by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was extracted by methanol and separated on an Agilent (ZORBAX SB-C₁₈) chromatographic column by gradient elution using 0.02 mol/L ammonium acetate (containing 0.03% acetic acid) and methanol solution as mobile phase, and the components were detected by diode array detector at 220 nm wavelength. The qualitative and quantitative analysis of 7 kinds of antiseptic and anti-mould agents were realized by external standard method. **Results** The analysis time of the method was moderate, the 7 components could be separated completely, the linearity was good, the correlation coefficient was greater than 0.990, and the limits of detection were 1.0-12.0 mg/kg. The average recoveries were 73.96%-108.29%, and the relative standard deviation was 0.11%-7.78% (*n*=3). **Conclusion** This method has the advantages of simple operation, high precision and good repeatability, and can meet the requirements for the simultaneous detection of 7 antiseptic agents in bamboo and wood products related food.

KEY WORDS: bamboo and wooden products related food; antibacterial preservatives; high performance liquid

基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目(2017ZPZ03)

Fund: Supported by Quality and Technology Supervision of Guangdong Province (2017ZPZ03)

*通讯作者: 李聪, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验与风险监测。E-mail: 511182821@qq.com

*Corresponding author: LI Cong, Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Shunde 528300, China. E-mail: 511182821@qq.com

chromatography

1 引言

竹木制食品相关产品是以竹材、木材为主要原材料,经过适当的材质预处理,再进行加工后用于食品接触的产品^[1],如竹木筷、竹木砧板、蒸笼等。近年来,随着线上订餐、物流行业的迅速发展,使得一次性筷子、竹签等竹木制产品的产量及用量快速增长^[2],与此同时暴露出不同的卫生监控问题^[3-5],而霉变腐烂问题尤为突出^[6-8],部分生产企业由于质量意识、安全意识欠缺,过量采用具有高效广谱杀菌效果的化学防腐防腐剂,导致该类添加剂在产品中残留超标的风险增加,从而增加了食品用竹木产品的安全隐患^[9,10]。因此,建立高效、简便的检测方法实现竹木制食品相关产品中多种防腐防腐剂同时检测,对该行业的安全监控具有重要意义^[11]。

目前,我国竹木制食品相关产品尚未纳入生产许可管理产品类别,相关的技术规范、产品国家标准尚不完善,仅包括 GB 19790.1-2005《一次性筷子第 1 部分:木筷》和 GB 19790.2-2005《一次性筷子第 2 部分:竹筷》^[12,13],其余竹木制食品相关产品标准尚处于空白阶段^[14],多数竹木制产品检测参照上述 2 个标准,而该标准中只有噻苯咪唑、邻苯基苯酚、联苯、抑霉唑具有相应的检测方法,其余可能使用的防腐防腐剂,如苯甲醇、碘丙炔醇丁基氨甲酸酯(iodopropynyl butylcarbamate, IPBC)、百菌清等没有具体表明,且目前多种防腐防腐剂同时快速检测的方法较少^[15-20],因此现阶段的竹木制食品相关产品缺乏快速有效的检测监控手段。

本研究运用二极管检测器,建立高效液相色谱法,同时分离检测苯甲醇、多菌灵、IPBC、克菌丹、百菌清、戊唑醇、联苯 7 种常用竹木制食品相关产品的防腐防腐剂,拟为检测竹木制食品相关产品中的防腐防腐剂提供快速有效的检测监控手段,填补现阶段的竹木制食品相关产品检测监控手段空白。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

甲醇(分析纯,天津致远化学试剂有限公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯,美国天地有限公司);苯甲醇标准品(纯度 99.9%,批号:41028)、多菌灵标准品(纯度 99.64%,批号 G133709)、IPBC 标准品(纯度 97%)、克菌丹标准品(纯度 97.9%,批号 G128435)、百菌清标准品(纯度 98.5%,批号 G139791)、戊唑醇标准品(纯度 99%,批号 G142375)、联苯(纯度 99.9%,批号 G138186)(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司)。

随机选取市售的 50 批次竹木制食品相关产品(竹木筷子、竹签、竹蒸笼)。

2.2 仪器与设备

LC-30 超高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器,日本岛津公司);JP-0600 超声波清洗机(广州吉普超声波电子有限公司);JJ500Y 电子天平(常熟市金羊砝码仪器有限公司);Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司)。

2.3 方法

2.3.1 标准溶液的配制

准确称取或移取一定量固体标品及标准储备液至容量瓶中,甲醇定容配制为混合中间液,使用时根据浓度用甲醇逐级稀释成系列浓度标准溶液。

2.3.2 样品溶液的配制

将固体样品切割并剪磨为粒径小于 5 mm×5 mm 的颗粒,准确称取约 1 g(准确至 0.001 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇,涡旋混匀后超声提取 20 min,然后在旋涡混匀器上混匀 3 min,3000 r/min 离心 3 min,上清液转移至鸡心瓶中用旋转蒸发器蒸发至近干,用甲醇定容至 1 mL,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

2.3.3 色谱条件

色谱柱:Agilent (ZORBAX SB-C₁₈);柱温:30 ℃;进样量:20 μL;流动相:A 为 0.02 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.03%乙酸),B 为甲醇;流速:1.0 mL/min;梯度洗脱;实验过程中流动相梯度见表 1。

表 1 流动相梯度变化
Table 1 Gradient program of mobile phase

时间 /min	甲醇/%	乙酸铵溶液- 含 0.03%乙酸/%	流速/(mL/min)
0.00	40	60	1.0
15.00	90	10	1.0
18.00	90	10	1.0
21.00	40	60	1.0
24.00	40	60	1.0

3 结果与分析

3.1 检测波长的确定

实验采用二极管阵列检测器,在 190~400 nm 范围内对 7 种防腐防腐剂的标准溶液进行扫描,所有组分均在测试范围内具有吸收峰,其中苯甲醇为 210 nm、多菌灵为 285 nm、IPBC 为 203 nm、克菌丹为 207 nm,百菌清为 233 nm、戊唑醇为 220 nm,联苯为 245 nm。由于 7 种组分

除多菌灵外吸收峰集中在 210~230 nm, 而多菌灵在 210~230 nm 下仍有较大吸收。选择 220 nm 或 230 nm 作为检测波长, 考虑在相同浓度下, 苯甲醇于 220 nm 处的响应比 230 nm 处大约 50 倍, 戊唑醇于 220 nm 处的响应比 230 nm 处大约 3 倍, 确定以上 7 种组分的检测波长为 220 nm, 采用单波长检测即可兼顾各组分离灵敏度。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 流动相体系的确定

实验参照对比了食品、化妆品、木材中防腐防腐菌剂检测常用流动相^[20]: 甲醇-0.1 mol/L 乙酸铵(pH=4.65), 乙腈-5 mmol/L 磷酸二氢钠、甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(含 0.03% 乙酸)下各组分的分离效果及出峰时间。结果表明: 流动相为甲醇-0.1 mol/L 乙酸铵(pH=4.65), 百菌清出现双峰, 且克菌丹未能正常出峰。流动相为乙腈-5 mmol/L 磷酸二氢钠下, 克菌丹未能正常出峰。流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.03% 乙酸), 7 种组分可以正常出峰, 且各组分分离效果保持良好。因此, 实验选用甲醇-乙酸铵(含 0.03% 乙酸)作为流动相。

流动相体系确认后, 实验对甲醇初始比例进行优化(5%、30%、40%、50%), 甲醇比例低于 30% 时, 7 种组分全部出峰需时约 26 min, 逐步提高初始甲醇浓度至 40%, 20 min 时 7 种组分均可全部出峰, 且分离效果保持良好, 进一步增大甲醇浓度至 50%, 苯甲醇与多菌灵色谱峰出现部分重叠。因此, 以 40% 作为初始甲醇浓度。

流动相体系及初始甲醇浓度确认后, 对比不同乙酸铵浓度对分析时间及分离效果的影响(0.02、0.05、0.1 mol/L), 在 3 种不同浓度乙酸铵条件下, 各组分保留时间及分离效果变化不大, 因此保留乙酸铵浓度为 0.02 mol/L。

3.2.2 色谱柱的选择

实验比较了 3 款食品中防腐防腐菌剂检测常用 C₁₈ 柱, Agilent 5 TC- C₁₈(2) 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)条件下, 戊唑醇与联苯色谱峰部分重叠, 未能完全分离。Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)及耐酸色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)条件下, 各组分保留时间及分离效果变化不大, 而 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 在酸性实验条件下, 具备良好的稳定性, 因此选用耐酸性的 Zorbax SB-C₁₈ 作为实验用色谱柱。

3.2.3 流速的选择

实验比较了不同流速(0.6、0.8、1.0 mL/min)对各组分分离效果的影响, 实验表明, 流速为 0.6 mL/min 时, 所有组分出峰需时 25 min, 流速提升至 1.0 mL/min, 20 min 所有待测组分均可出峰。因此, 选用 1.0 mL/min 作为实验用流速。在最优实验条件下获得的标准样品图见图 1。

3.3 方法的线性范围与检出限

在上述色谱条件下, 对混合标准溶液进行测定, 以峰面积为纵坐标 Y, 质量浓度为横坐标 X, 得到各化合物的线性回归方程, 以 3 倍信噪比计算方法检出限, 结果见表 2。

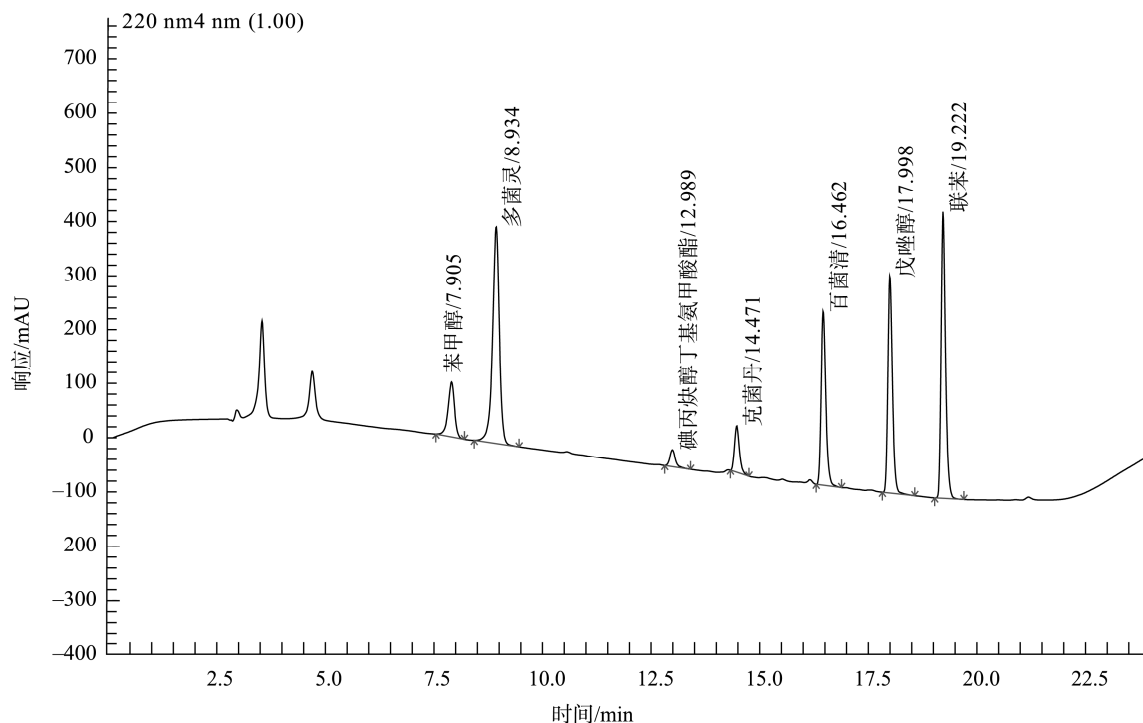


图 1 7 种标准品图谱

Fig.1 Chromatograms of 7 kinds of standard products

表 2 线性范围、回归方程与检出限
Table 2 Calibration range, regression equations and LOD

组分	线性范围/(mg/L)	回归方程	线性相关系数(r^2)	LOD/(mg/kg)
苯甲醇	11.1~111.1	$Y=15952.7X-486.812$	0.9993	6.0
多菌灵	11.1~111.1	$Y=70549.3X-66116.6$	0.9975	1.0
IPBC	22.2~222.2	$Y=2074.86X-2542$	0.9997	12.0
克菌丹	23.6~236.2	$Y=4502.30X+26044.8$	0.9985	12.0
百菌清	11.3~113.3	$Y=34971X+29973.6$	0.9998	1.0
戊唑醇	12.5~124.8	$Y=38221.9X+58750.5$	0.9995	1.0
联苯	11.1~111.1	$Y=55197.4X+82068.7$	0.9997	1.0

3.4 方法的准确度与精密度

选取阴性样品,采用实验前处理方法处理后,于阴性样品中添加 3 种不同水平的标准溶液,每个添加水平重复测定 6 次,计算平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),即为批内精密度,结果见表 3。另取 5 批次阴性样品,添加 3 种水平不同的标准溶液获得实测值,计算 RSD,即为批间精密度,结果见表 4。

表 3 样品的加标回收率及精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and precisions of the sample ($n=6$)

分析物	添加值/(mg/kg)	平均实测值/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差(RSD)/%
苯甲醇	22.22	20.95	94.27	0.66
	55.56	52.86	95.13	0.64
	88.90	86.33	97.11	0.44
多菌灵	22.22	22.03	99.14	0.92
	55.56	52.06	93.69	0.44
	88.90	83.37	93.77	0.20
IPBC	44.44	38.57	86.79	7.20
	111.11	96.68	87.02	3.82
	177.80	156.88	88.24	4.07
克菌丹	47.24	34.94	73.96	7.78
	118.11	119.83	101.45	3.64
	189.00	204.68	108.29	1.04
百菌清	22.67	21.59	95.23	0.24
	56.67	54.12	95.49	0.53
	90.70	87.69	96.68	0.49
戊唑醇	24.96	23.39	93.73	0.11
	62.39	59.28	95.02	0.22
	99.80	96.06	96.25	0.62
联苯	22.22	21.92	98.64	0.34
	55.56	54.18	97.51	0.20
	88.90	86.67	97.50	0.37

表 4 批间回收试验结果
Table 4 Result of inter-batch recoveries

分析物	添加值/(mg/kg)	平均实测值/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差(RSD)/%
苯甲醇	22.22	20.66	92.98	0.78
	55.56	51.99	93.57	0.56
	88.90	84.56	95.12	0.41
多菌灵	22.22	21.46	96.58	1.62
	55.56	54.00	97.19	0.67
	88.90	80.87	90.97	0.33
IPBC	44.44	39.22	88.25	6.44
	111.11	94.84	85.36	4.56
	177.80	160.29	90.15	3.08
克菌丹	47.24	37.88	80.19	5.98
	118.11	110.87	93.87	4.25
	189.00	200.56	106.12	1.63
百菌清	22.67	21.75	95.94	0.35
	56.67	57.88	102.14	1.87
	90.70	86.25	95.09	0.66
戊唑醇	24.96	22.98	92.07	0.93
	62.39	58.72	94.12	0.27
	99.80	96.27	96.46	0.55
联苯	22.22	20.39	91.76	2.83
	55.56	54.29	97.71	0.45
	88.90	86.77	97.60	0.29

3.5 实际样品分析

随机选取市售的 50 批次竹木制食品相关产品(竹木筷子、竹签、竹蒸笼)按照上述实验步骤进行处理, 测定样品

中 7 种防腐防腐剂含量, 结果 50 批次产品中, 1 个批次产品检出联苯, 质量浓度为 2.20 mg/kg, 该阳性样品结果见图 2。其余样品结果均未检出。

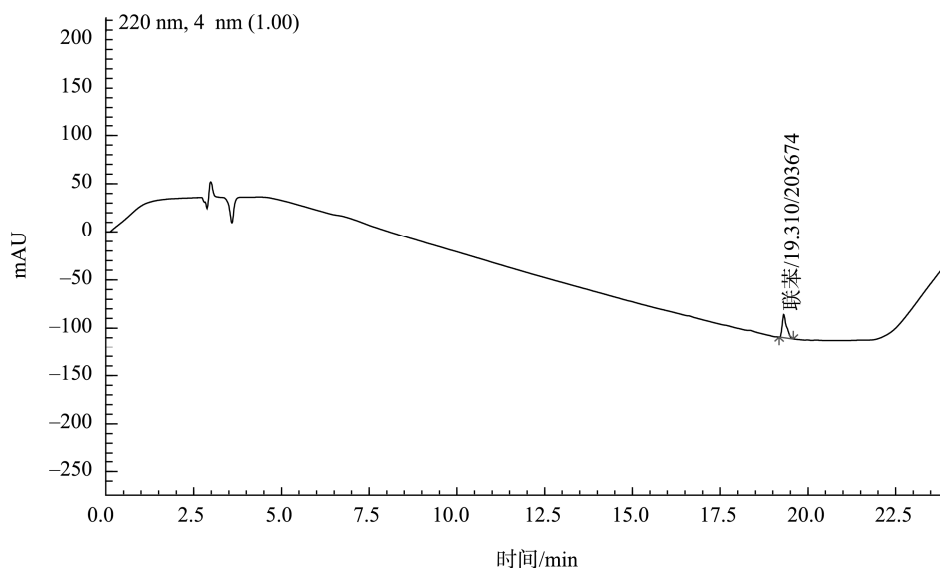


图 2 联苯检出样品

Fig.2 Positive sample of biphenyls

4 结 论

本研究建立了一种同时测定竹木制食品相关产品中 7 种防腐防腐剂的液相色谱检测方法, 对色谱分离条件进行了优化, 采用二极管阵列检测器及 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(含 0.03%乙酸)为流动相进行梯度洗脱, 24 min 内可完成所有组分检测且分离效果良好。该方法简便、高效, 能为竹木制食品相关产品中防腐防腐剂的检测提供科学基础。

参考文献

- [1] 潘争光, 陈丰云, 贺磊, 等. 一次性竹木筷产品质量安全风险[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(24): 54-58.
Pan ZG, Chen FY, He L, et al. Quality and safety risk analysis of disposable bamboo chopsticks [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(24): 54-58.
- [2] 梁建国, 师响. 浅析食品相关产品——竹木筷子存在的安全风险[J]. 中国包装, 2018, 38(9): 58-60.
Liang JG, Shi S. Analysis on safety risk—bamboo chopsticks in food related products [J]. China Packag, 2018, 38(9): 58-60.
- [3] 曾阳俊, 凌莉, 周玲旭, 等. 乐山地区 51 份一次性筷子样品中霉菌污染状况调查[J]. 现代预防医学, 2016, 43(12): 2271-2274.
Zeng YJ, Ling L, Zhou LX, et al. Investigation in the mold contamination status on disposable chopsticks in Leshan region [J]. Mod Prev Med, 2016, 43(12): 2271-2274.
- [4] 刘丽霞, 杨丽, 郁强, 等. 一次性竹筷产品质量风险监测分析报告[J]. 中国质量技术监督, 2018, (12): 62-65.
Liu LX, Yang L, Yu Q, et al. Monitoring and analysis report on quality risk of disposable bamboo chopsticks [J]. China Qual Superv, 2018, (12): 62-65.
- [5] 赵英, 黄力飞, 杨大华, 等. 一次性筷子的细菌与硫化物含量调查分析[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2010, (8): 102-103, 107.
Zhao Y, Huang FL, Yang DH, et al. Investigation and analysis of bacteria and sulfide content in disposable chopsticks [J]. J Nanchang Univ: Med Sci Ed, 2010, (8): 102-103, 107.
- [6] 颜妍, 周紫玉, 荆芳. 关于一次性筷子有害微生物的调查[J]. 现代食品, 2018, (22): 193-196.
Yan Y, Zhou ZY, Jing F. Investigation on harmful microorganisms in disposable chopsticks [J]. Mod Food, 2018, (22): 193-196.
- [7] 李霞镇, 徐金梅, 徐明, 等. 食品接触用木竹制品质量安全评价[J]. 世界林业研究, 2015, 28(5): 56-61.
Li XZ, Xu JM, Xu M, et al. Evaluation on quality and safety of wood-bamboo utensils for food [J]. World Forest Res, 2015, 28(5): 56-61.
- [8] 王炼, 程瑞香. 规范一次性筷子行业健康的发展[J]. 木材加工机械, 2006, 17(5): 42-44.
Wang L, Cheng RX. Normalizing development of disposable chopsticks industry [J]. Wood Process Mach, 2006, 17(5): 42-44.
- [9] Yoshioka N, Akiyama Y, Teranishi K. Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization [J]. J Chromatogr A, 2004, 1022(1-2): 145-150.
- [10] Ito Y, Goto T, Oka H, et al. Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(4): 861.
- [11] 张双灵, 赵奎浩, 郭康权, 等. 食品包装化学物迁移研究的现状及对策

- 分析[J]. 食品工业科技, 2007, (9): 169–172.
- Zhang SL, Zhao KH, Guo KQ, *et al.* Analysis on the present situation and countermeasures of chemical migration in food packaging [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, (9): 169–172.
- [12] GB/T 19790.1-2005 食品安全国家标准 一次性筷子 第 1 部分: 木筷 [S]
GB/T 19790.1-2005 National food safety standard-Disposable chopsticks—Part 1: Wooden chopsticks [S].
- [13] GB 19790.2-2005 食品安全国家标准 一次性筷子 第 2 部分: 竹筷[S]
GB 19790.2-2005 National food safety standard-Disposable chopsticks—Part 2: Bamboo chopsticks [S].
- [14] 孙魁魁, 廖文彬, 陈启镔, 等. 气相色谱-质谱联用法测定竹木制食品相关产品中邻苯基苯酚、抑霉唑、联苯、百菌清、克菌丹的残留量[J]. 广东化工, 2019, (21): 116–117.
Sun KK, Liao WB, Chen QJ, *et al.* Simultaneous determination of o-Phenylphenol, imazalil, biphenyl, chlorothalonil and captan residues in bamboo and wooden products by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2019, (21): 116–117.
- [15] 何淑娟, 范斌, 李润岩, 等. 高效液相色谱法测定竹筷中噻苯咪唑、邻苯基苯酚和联苯[J]. 食品科学, 2011, (16): 319–321.
He SJ, Fan B, Li RY, *et al.* Determination of thiabendazole, o-phenylphenol and diphenyl residues in chopsticks by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2011, (16): 319–321.
- [16] Hu Y, Yang X, Wang Z, *et al.* Determination of carbendazim and thiabendazole in tomatoes by solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection [J]. *Chin J Chromatogr*, 2005, 23(6): 581–584.
- [17] Lin L, Peng Z, Yang CL, *et al.* Determination of imidacloprid, carbendazim and thiabendazole residues in vegetables and fruits by HPLC [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 781–784: 1392–1396.
- [18] 王卉卉, 叶曦雯, 于世涛, 等. 橡胶及橡胶制品中 4 种酚类防霉剂的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(3): 226–231.
Wang HH, Ye XW, Yu ST, *et al.* Determination of four phenolic antiseptics in rubber and rubber products by high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2010, 29(3): 226–231.
- [19] 马康, 蒋孝雄, 赵敏, 等. 高效液相色谱法同时测定软饮料中 20 种食品添加剂[J]. 分析化学, 2012, (11): 36–42.
Ma K, Jiang XX, Zhao M, *et al.* Simultaneous determination of 20 food additives in soft drinks by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, (11): 36–42.
- [20] 周六军, 曹赵云, 周蓉, 等. 高效液相色谱法同时测定 5 种食品中的 12 种添加剂[J]. 农产品质量与安全, 2018, (5): 69–73, 79.
Zhou LJ, Cao ZY, Zhou R, *et al.* Simultaneous determination of 12 additives in 5 foods by high performance liquid chromatography [J]. *Qual Saf Agro-prod*, 2018, (5): 69–73, 79.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

周铭林, 硕士, 主要研究方向为食品安全检验与风险监测。
E-mail: 532944584@qq.com

李 聪, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验与风险监测。
E-mail: 511182821@qq.com