

葡萄酒中苯甲酸的测定测量审核结果分析

李跃红^{1,2*}, 徐孟怀^{1,2}, 冉茂乾^{1,2}, 赵阳^{1,2}, 焦彦朝²

(1. 六盘水市口岸服务中心, 六盘水 553000; 2. 贵阳海关综合技术中心果蔬实验室, 六盘水 553000)

摘要: 目的 参加 MA-GW-010 项目“葡萄酒中苯甲酸的测定”测量审核, 提升实验室对食品中苯甲酸的检测能力和实验室综合检测水平。**方法** 以 GB 5009.28—2016《食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》第一法为依据, 采用高效液相色谱法二极管阵列检测器对样品进行检测, 并按照实验室多种内部质量控制方式对检测结果进行综合评价。**结果** MA20-839 样品中苯甲酸检测结果为 59.4 mg/L, 样品 Z 值为 -0.6, 检测结果满意。**结论** 本次测量审核样本检测结果与制样单位反馈结果一致, 本次测量审核不仅丰富了检测人员的检测经验, 同时也提高了实验室的检测水平。

关键词: 葡萄酒; 苯甲酸; 测量审核; 高效液相色谱法; 综合评价

Analysis of measurement audit results for the determination of benzoic acid in wine

LI Yue-Hong^{1,2*}, XU Meng-Huai^{1,2}, RAN Mao-Qian^{1,2}, ZHAO Yang^{1,2}, JIAO Yan-Chao²

(1. Liupanshui Port Service Center, Liupanshui 553000, China; 2. Laboratory of Fruit and Vegetable Products of Comprehensive Technical Center of Guiyang Customs, Liupanshui 553000, China)

ABSTRACT: Objective To improve the benzoic acid detection ability and laboratory comprehensive detection level in food by participating in the MA-GW-010 project *Determination of benzoic acid in wine* measurement audit. **Methods** Based on the first method of GB 5009.28—2016 *National food safety standard-Determination of benzoic acid, sorbic acid and sacconin sodium in food*, the samples were detected by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector, and the detection results were comprehensively evaluated according to various internal quality control methods in the laboratory. **Results** The content of benzoic acid in the MA20-839 was 59.4 mg/L, and the Z-score was -0.6, meaning that the detection results was regarded as satisfaction. **Conclusion** The results of this measurement audit sample are consistent with the feedback results of sample preparation units, which enriches the detection experience of the testing personnel and improves the detection level of the laboratory.

KEY WORDS: wine; benzoic acid; measurement audit; high performance liquid chromatography; comprehensive evaluation

基金项目: 海关总署科研计划项目(2018IK053)

Fund: Supported by the Research Projects of General Administration of Customs(2018IK053)

*通信作者: 李跃红, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品分析与检验检测研究。E-mail: 1944629455@qq.com

*Corresponding author: LI Yue-Hong, Master, Assistant Engineer, Liupanshui Port Service Center, Liupanshui 553000, China. E-mail: 1944629455@qq.com

0 引言

苯甲酸(benzoic acid, BA)又名安息香酸,是使用较早的常见的酸性食品防腐剂,广泛应用于植物性饮料、调味料、果蔬汁和配制酒等食品中。在酸性条件下(pH2.5~4.0),苯甲酸能使微生物细胞的呼吸系统发生障碍,阻碍细胞膜的正常生理作用,破坏微生物的正常代谢,抑制微生物的生长和繁殖^[1]。然而有研究表明,食用含有过量苯甲酸的食物,会影响人体对钙和维生素的吸收,造成肝脏代谢功能障碍、血压升高、肾功能异常等不良现象^[2-4]。因此,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)与联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)严格规定了各类食品中苯甲酸的限量标准,我国也出台了 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[5],严格规定了不同食品中苯甲酸的限量范围,并且建立了 GB 5009.28—2016《食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》^[6],监控食品中苯甲酸的不合理使用行为。

能力验证是利用相同项目的实验室间比对判断参加者的能力,是实验室重要的外部质量控制活动,但由于受检测领域和频次的制约,有时实验室需要确认的能力未在能力验证计划之内,而测量审核就是能力验证的有效补充,是对参加者将检测结果与样品参考值进行“一对一”比较的能力评价活动。检测结果的满意度是判断实验室验证或校准该项目能力的标准,也是中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)判断实验室能力的重要技术依据^[7-8]。质量控制作为实验室质量管理中重要的组成部分,不仅能够保障检测结果的准确性,而且能够完善质量管理体系,其主要通过外部质量控制和内部质量控制,进一步检验和提高对食品中防腐剂的检测能力及实验室的综合检测水平,确保实验室外部质量控制和质量管理体系的有效运行^[9]。本实验室参加了中国检验检疫科学研究院测试评价中心的“葡萄酒中苯甲酸的测定”的测量审核(项目编号:MA-GW-010,样品编号:MA20-839)。结合 MA20-839 测量审核报告,本研究对本次测量审核过程中实验设计、测定结果和质量控制措施等关键控制点进行分析,讨论检测过程中要点和难点,进一步完善和提升实验室的检测能力,以期对日后工作中的监管执法提供有力的技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品

测量审核样品:葡萄酒(包装于塑料瓶中,约 350 mL,受理编号:ACAS-20-MA-198,样品编号:MA20-A839,中国检验检疫科学研究院测试评价中心)。

质控样品:葡萄酒(包装于塑料瓶中,约 350 mL,货号:

QC-GW-705,中国检验检疫科学研究院测试评价中心)。

1.1.2 试剂与仪器

苯甲酸标准物质(浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$,北京坛墨质检标准物质中心);甲醇(色谱纯,德国 CNW 公司);乙酸铵(色谱纯)、乙酸锌、亚铁氰化钾(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);实验室自制超纯水。

UFLC-XR 高效液相色谱仪,配紫外检测器(日本岛津公司);ME303E 分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);ST16R 离心机、MicroPure UV/UF 超纯水仪(美国 Thermo Fisher 公司);IKA Vortex 3 涡旋混合器(德国 IKA 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

(1)加入蛋白沉淀剂

准确移取试样 2 mL,于 50 mL 离心管中,加入(20~25) mL 超纯水,混匀,分别加入 2 mL 92 g/L 亚铁氰化钾溶液和 183 g/L 乙酸锌溶液,摇匀,于 8000 r/min 离心 5 min,将水相转移至 50 mL 容量瓶中,于残渣中加水 20 mL,重复提取,将水相转移到同一容量瓶中,加水稀释并定容,充分摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

(2)未加入蛋白沉淀剂

准确移取试样 2 mL,于 50 mL 离心管中,加入 20~25 mL 超纯水,混匀,加水稀释并定容,充分摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

1.2.2 仪器条件

色谱柱: C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm);流动相:甲醇:乙酸铵溶液(5:95, V:V);流速 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL ;检测波长 230 nm。

1.2.3 标准溶液的配制

精密移取浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲酸标准储备溶液 100 μL ,加水稀释并定容至 1 mL,摇匀,配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的中间使用液。根据预实验结果,准确移取适量的中间使用液,配制成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 的系列标准溶液。

1.2.4 质量控制方法

为确保测量审核数据的准确性,本次测量审核根据样品 MA20-A839 中苯甲酸的含量,选择的仪器方法以及实验室条件,对苯甲酸的测定采用以下质量控制措施:平行性实验、留样再测实验、加标回收实验、质控样品实验、人员比对实验。测量审核的实验组别安排如表 1 所示。

表 1 测量审核的实验组别
Table 1 Experimental group of measurement audit

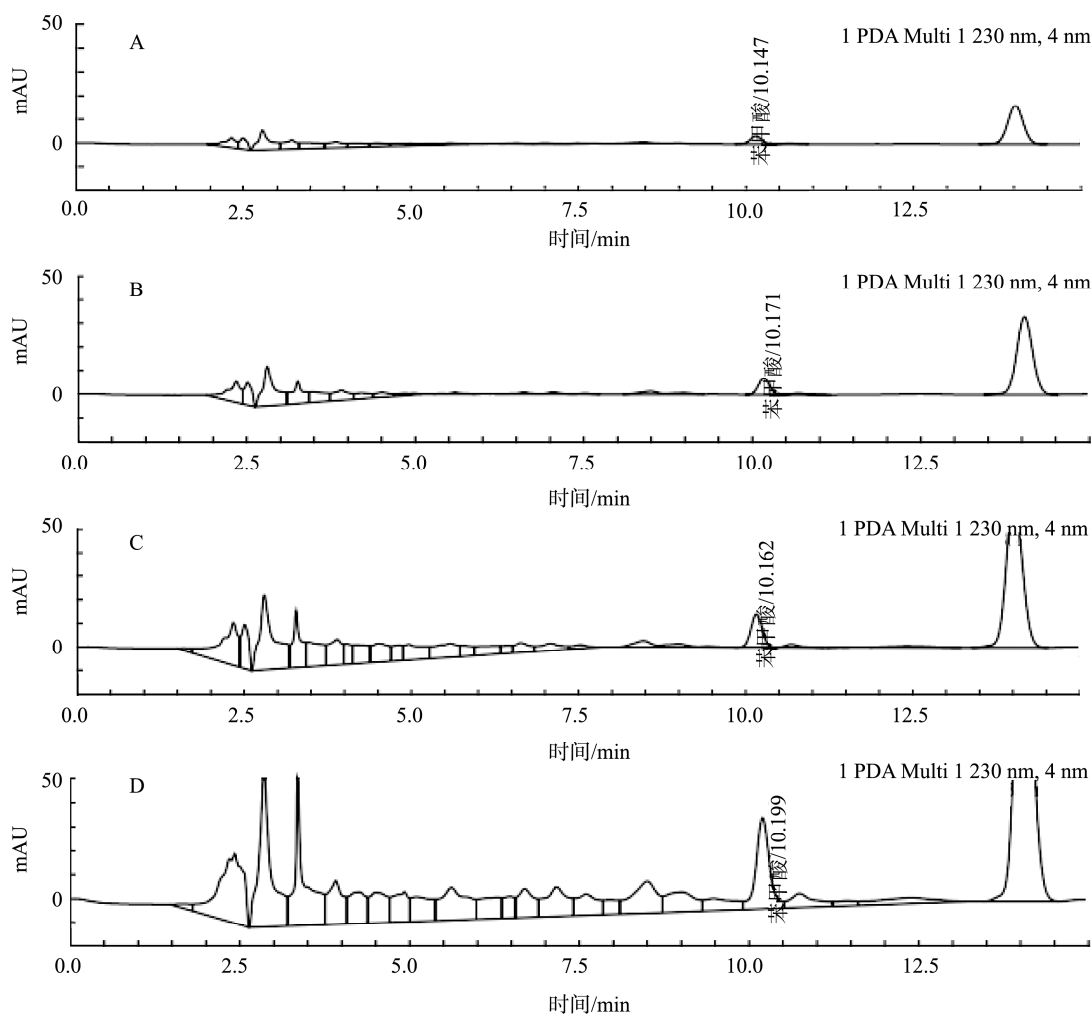
实验组序号	实验员	测定方法
1	A	高效液相色谱法
2	B	高效液相色谱法

2 结果与分析

2.1 进样量和标准曲线范围的确定

进样量和标准曲线浓度范围的选择是保证检测结果准确度和精密度的关键因素之一,进样时原则上应考虑待测组分浓度落在标准曲线浓度范围的 $1/3 \sim 2/3$ 处为宜^[10],在此范围内,检测结果的准确度和精密度较高;其次考虑加标浓度一般为待测组分浓度的 $0.5 \sim 2.0$ 倍,而且待测组分浓度和加标液的浓度之和应不超过标准曲线浓度范围的 90% ^[11]。根据上述原则,为了使测量审核的测定结果更加

准确,按照 1.2.1 样品前处理方法和实验室条件,分别进样 5、10、20 和 50 μL 进行预实验(见图 1),结果苯甲酸含量范围在 $13.88 \sim 193 \text{ mg/L}$ 之间,当进样量为 5 和 10 μL 时,测定苯甲酸峰面积较小,浓度较低;而当进样量为 50 μL 时,苯甲酸的目标峰与杂质峰分离度不好,容易产生较大的定量误差,影响结果的准确性,分析原因可能是进样量过载。根据预实验结果和标准曲线范围选择原则的基础上,并结合加标浓度全面考虑,最终确定进样量为 20 μL ,线性回归方程结果见表 2,2 组实验相关系数均大于 0.9999,表明线性关系良好。



注: A、B、C、D 进样量分别为 5、10、20、50 μL 。

图 1 测量审核样品色谱图

Fig.1 The chromatogram of measurement audit sample

表 2 线性回归方程的相关系数

Table 2 The linear equations and correlation coefficients

实验组序号	线性方程	相关系数 r^2	系列标准溶液浓度/(mg/L)
1	$Y=67888.4X+2782.2$	0.99999	0.5、1.0、2.0、5.0、10.0
2	$Y=70069.8X+4112.4$	0.99998	0.5、1.0、2.0、5.0、10.0

2.2 精密度考察

为了检验该方法的精密度, 选取浓度为2.0 mg/L的苯甲酸标准溶液, 按照实验条件, 连续进样6次, 记录苯甲酸的峰面积并计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表3。由表3可见, RSD值小于5%, 符合有关规定, 表明仪器精密度良好。

2.3 样品处理方法选择

由于食品体系复杂, 在检测食品中苯甲酸过程中, 食品体系中往往存在大量的蛋白质、脂肪等大分子物质, 为了消除影响苯甲酸测定的干扰物质, 常利用适当的沉淀剂去除这些大分子物质, 提高食品检测的准确性和延长仪器的使用寿命。本研究对前处理过程有无加入蛋白质沉淀剂的效果进行了对比, 采用3次平行实验, 测定结果见表4。由表4可知, 蛋白沉淀剂添加组苯甲酸平均值为58.57 mg/L, 未添加组苯甲酸平均值为59.64 mg/L, 两组结果均在质控样品特性值区间53.19~70.55 mg/L内, 满足实验室内部质量控制要求, 而未添加组平均值更接近于质控样品的特性值61.87 mg/L, 分析可能原因为: 乙酸锌与亚铁氰化钾是水系蛋白沉淀剂, 其原理是利用乙酸锌与亚铁氰化钾反应生成的亚铁氰酸锌沉淀来吸附蛋白质等干扰物质, 发生共同沉淀作用, 而苯甲酸是有机弱酸, 微溶于水,

可能在沉淀吸附过程中也有部分目标物质被吸附沉淀带走, 从而导致样液中苯甲酸含量降低。综合考虑试剂成本、实验步骤、分析效率等方面, 本研究选择未加亚铁氰化钾和乙酸锌溶液处理进行。

2.4 质控样品实验

质控样品是指在质量控制过程中使用的已知浓度的分析样品, 在同样的分析条件下, 定量测定质控样品, 其值与特性值比较, 判断检测结果是否处于稳定和可控状态, 并可用来分析待测样品检测结果的准确度。准确移取3份质控样品, 根据样品未加蛋白沉淀剂处理方法, 测定各份样品中苯甲酸含量, 并计算苯甲酸的RSD, 结果见表4。由表4可知, 两组平行实验的平均值分别为59.89和59.07 mg/L, 均在质控样品的特性值区间内, 检测结果处于可控状态, 满足实验室内部质量控制要求。

2.5 平行实验

按照1.2.1(2)样品未加蛋白沉淀剂处理方法, 采取双人6次平行实验, 测定测量审核样品中苯甲酸含量, 并计算苯甲酸的RSD, 结果见表5。由表5可知, 两组实验的6次平行实验平均值分别为59.44 mg/L和59.27 mg/L, RSD分别为0.29%和0.51%, 表明检测结果重复性较好。

表3 精密度实验结果
Table 3 Results of precision test

峰面积						平均值	RSD/%
147036	146566	147493	146660	146204	146444	146734	0.31

表4 质控样品实验结果
Table 4 Results of reference material test

实验组序号	平行实验结果/(mg/L)			平均值	质控样品特性值/(mg/L)	质控样品特性值区间/(mg/L)	RSD/%
	1	2	3	/(mg/L)			
1	59.90	59.93	59.85	59.89	61.87	53.19~70.55	0.06
2	59.83	58.68	58.70	59.07			1.11
未添加沉淀剂	59.53	60.28	59.13	59.64			0.98
添加沉淀剂	58.70	58.53	58.48	58.57			0.20

表5 平行性实验结果
Table 5 Results of parallel test

实验组序号	平行实验结果/(mg/L)						平均值/(mg/L)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
1	59.55	59.38	59.18	59.35	59.50	59.68	59.44	0.29
2	58.80	58.98	59.53	59.43	59.48	59.40	59.27	0.51

2.6 加标回收实验

加标回收实验是指在待测样品中加入一定量的待测组分标准物质, 并同待测样同一处理和测定, 得到的差值与理论值之比, 即为样品加标回收率。加标回收率能够反映出检测结果的准确度和精密度, 当加标回收率越接近 100% 时, 检测结果的准确度越高。按照 1.4 样品前处理方法, 在已知含量的苯甲酸溶液中分别加入低、中、高 3 个水平(25、50、100 mg/L)的苯甲酸标准储备溶液, 进行测定, 计算加标回收率, 结果见表 6。由表 6 可知, 加标量分别在 25、50 和 100 mg/L 3 个水平时, 平均加标回收率分别为 101.4%、100.2% 和 98.4%, RSD 分别为 0.36%、3.03% 和 0.14%, 表明检测结果的准确度较高。

2.7 人员比对实验

比对实验是体现重复性和复现性的重要质控手段, 比对方法主要有人员比对、仪器比对、方法比对。人员比对是指在相同的环境条件下, 由不同的检测人员利用相同的仪器和检测方法对同一样品进行检测的试验, 并对检测的数据进行统计分析评价。本试验选取实验室 2 名经验较丰富的检测人员进行比对, 结果显示, 测量审核样品中苯甲酸的人员比对结果平均值的相对标准偏差为 0.23%, 质控样品人员比对结果平均值的相对标准偏差为 0.97%, 可见人员比对结果差异 < 5%, 表明检测结果受检测人员差

异的影响较小。

2.8 留样再测实验

留样再测是内部质量监控和追溯的常规方式, 在不同的时间段, 检验人员对同一样品进行再次检测, 通过比较前后 2 次测定结果的一致性, 验证检验数据的可靠性和稳定性。取测量审核样品 1 份进行前处理, 在上述色谱条件下, 分别于 0、8、16、24 和 32 h 进样检测, 记录峰面积并计算苯甲酸含量, 结果见表 7, 苯甲酸含量平均值为 59.33 mg/L, RSD 为 0.46%, 与平行测定实验结果没有明显差异, 表明稳定性较好。

2.9 测量审核样品中苯甲酸的确定和评价

通过采取多种内部质量控制措施, 本次测量审核设计的实验标准曲线范围较为适合, 线性较好, 仪器精密度良好, 人员比对和留样再测结果无显著差异, 2 组质控样品的测定值均接近样品特性值, 加标回收率均满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[12]相关要求。故本次测量审核以 2 组实验的平均值 59.4 mg/L 作为葡萄酒中苯甲酸含量的结果报送到制样单位, 中国检验检疫科学研究院测试评价中心反馈结果 Z 值为 -0.6, 按照 $|Z| \leq 2.0$ 为满意结果, $2.0 < |Z| < 3.0$ 为可疑结果, $|Z| \geq 3.0$ 为离群结果的原则^[13], 此次测量审核结果为满意。

表 6 回收率实验结果
Table 6 Results of recovery rate test

本底平均值/(mg/L)	加标量/(mg/L)	加标后值/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
59.35	25	84.80	101.8	101.4	0.36
	25	84.68	101.3		
	25	84.63	101.1		
	50	110.30	101.9	100.2	3.03
	50	110.45	102.2		
	50	107.75	96.8		
	100	157.60	98.25	98.4	0.14
	100	157.68	98.33		
	100	157.88	98.53		

表 7 留样再测实验结果
Table 7 Results of retention samples and test

留样再测实验结果/(mg/L)					平均值/(mg/L)	RSD/%
0 h	8 h	16 h	24 h	32 h		
59.41	59.48	59.08	59.68	59.03	59.33	0.46

3 结论与讨论

本实验室参加 MA-GW-010 项目“葡萄酒中苯甲酸的测定”测量审核外部质量控制活动, 结果显示, MA20-839 样品中苯甲酸含量的测定结果为 59.4 mg/L, Z 值为-0.6, 测量审核结果满意。同时, 在本次测量审核中, 对实验过程中使用的国标方法从样品前处理优化、进样量和标准曲线选择等进行探讨, 并采用平行性实验、留样再测实验、加标回收实验、质控样品和人员比对实验等多种措施进行有效的内部质量控制, 评价结果较为一致。此次测量审核结果, 有助于评价实验室检测数据的可靠性, 发现和纠正自身存在问题, 提高了实验室质量管理体系水平, 增强了实验室的综合检测水平和竞争力。

参考文献

- [1] 叶研, 胡丽, 蔡卫红, 等. 苯甲酸对人群健康影响的研究进展[J]. 环境卫生学杂志, 2016, 6(6): 451-456.
YE Y, HU L, CAI WH, *et al.* Research progress on effect of benzoic acid to human health [J]. J Environ Hyg, 2016, 6(6): 451-456.
- [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, 25(9): 49-51.
LI J, LIU SJ, HUANG XL. Safety and determination benzoic acid and sodium benzoate [J]. Cere Oil, 2012, 25(9): 49-51.
- [3] 黄艳娥, 刘海波. 食品防腐剂对人体健康的影响及发展趋势[J]. 化工中间体, 2005, (7): 1-6.
HUANG YE, LIU HB. The affect of food preservatives on human health and the future development [J]. Chem Intermediat, 2005, (7): 1-6.
- [4] 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. 2013's Food preservative applications and trends research [J]. Food Res Dev, 2013, 34(11): 112-116.
- [5] 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 standard-Use standard of additives in foods [S].
- [6] GB 5009.28—2016 食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定[S].
GB 5009.28—2016 National food safety standard-Determination of

benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in food [S].

- [7] 刘颖, 薛靓. 测量审核的实施方法及满意度评定[J]. 中国测试, 2012, 38(S1): 107-110.
LIU Y, XIE L. Implementation of measurement audit and satisfaction evaluation [J]. China Meas Test, 2012, 38(S1): 107-110.
- [8] 区伟珍. 浅谈实验室质量控制的方法[J]. 广东化工, 2015, 42(7): 116, 83.
OU WZ. The methods of laboratory quality control [J]. Guangdong Chem Ind, 2015, 42(7): 116, 83.
- [9] 崔森. 质量控制-实验室质量管理的关键[J]. 中国纤检, 2018, (5): 80-81.
CUI M. Quality control-The key to the laboratory quality management [J]. China Fiber Inspect, 2018, (5): 80-81.
- [10] 庞玉龙, 聂灿军, 黄家明. 饲料中重金属元素检测方法验证[J]. 广东饲料, 2015, 24(1): 37-41.
PANG YL, NIE CJ, HUANG JM. Verification for determination of heavy metal elements in feeds [J]. Guangdong Feed, 2015, 24(1): 37-41.
- [11] 吴维群, 汪国权, 卢大胜, 等. FAPAS 实验室能力比对的质量控制水平分析[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(4): 371-374.
WU WQ, WANG QQ, LU DS, *et al.* The quality control level analysis of FAPAS examining lab's performance assessments [J]. J Environ Occup Med, 2008, 25(4): 371-374.
- [12] GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404—2008 Criterion on quality control of laboratories—Chemical testing of food [S].
- [13] 侯美倩. 实验室比对结果评价方法[J]. 山东化工, 2018, 47(20): 60-62.
HOU MQ. Evaluation method of laboratory comparison results [J]. Shandong Chem Ind, 2018, 47(20): 60-62.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李跃红, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品分析与检验检测研究。
E-mail: 1944629455@qq.com