

- [21] 柳茵,吴斌,殷耀,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定芽苗类蔬菜及其来源豆类中 4 种非法添加物的残留量[J]. 色谱, 2013,31(1):22-26.

[22] 冯家望,吴洁珊,曹桂云,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中对氯苯氧乙酸的残留量[J]. 理化检验化学分册, 2012,48(10):1219-1221.

实验技术与方法

高效液相色谱法测定饮料中 10 种防腐杀菌剂

徐宜宏,金雁,姜玲玲,于丽,赵颖,蒋施,刘瑜,钟钰,李晓东,周建南
(沈阳出入境检验检疫局,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立了同时测定饮料中 10 种防腐杀菌剂的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)测定方法。方法 样品用甲醇提取,通过 C₈ 固相萃取柱净化,以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵为流动相,经 C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm,5.0 μm)分离,二极管阵列检测器检测,外标法定量。结果 10 种防腐杀菌剂在 0.1~10.0 μg/ml 范围内线性关系良好($r\geq 0.995$),检出限为 0.25~1.0 μg/ml($S/N=10$),10 种防腐杀菌剂在两种饮料基质(果汁饮料、碳酸饮料)中添加 3 个水平的样品中的回收率 74.1%~94.1%;相对标准偏差为 5.3%~15.1%。结论 该方法操作简单、快速、检出限低,满足国内外对饮料类食品中上述 10 种防腐杀菌剂的限量要求,适用于饮料中 10 种防腐杀菌剂的检测。

关键词:固相萃取; 高效液相色谱; 防腐剂; 饮料; 食品安全

中图分类号:R155.5;TS254;TS273 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0445-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.009

Simultaneous determination of 10 preservatives and bactericides in drinks
using high performance liquid chromatography

XU Yi-hong, JIN Yan, JIANG Ling-ling, YU Li, ZHAO Ying, JIANG Shi, LIU Yu,
ZHONG Yu, LI Xiao-dong, ZHOU Jian-nan

(Shenyang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Liaoning Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective A method was developed for the determination of 10 preservatives and bactericides in drinks by HPLC-DAD. **Methods** The samples were extracted by methanol and purified by solid phase extraction with a C₈ SPE column. The analytes were separated on a C₁₈ column, eluted by a gradient elution with 0.02 mol/L ammonium acetate buffer and methanol, detected by diode assay detector, and quantified by external standard method. **Results** The calibration curve was linear within the concentration range of 0.1-10.0 μg/mL ($r\geq 0.995$). The lower limit of detection in drink was 0.25-1.0 μg/ml ($S/N=10$). The relative recoveries of 10 preservatives-bactericides in fruit juice drinks and carbonated drinks with 3 spiked levels were 74.1%-94.1%, and relative standard deviations (*RSD*) were 5.3%-15.1%. **Conclusion** The method was simple, fast, low detection limit, meet for drinks foods at home and abroad in the above 10 kinds of antiseptic fungicide limited requirements, applicable to 10 kinds of preservatives and bactericides in drinks.

Key words: Solid phase extract; high performance liquid chromatography; preservatives; drinks; food safety

近年来,防腐杀菌剂被广泛应用于各种水果储藏运输及饮料的生产加工中,但是过量使用食品保鲜剂及非法添加剂导致的大量残留会对人体

健康造成损害。因此,中国、加拿大、欧盟等国家和国际组织对食品中防腐杀菌剂的使用制定了添加限量^[1]。目前,食品中邻苯基苯酚的检测方法已有行标方法^[2],而食品中苯氧乙醇、对氯间二甲苯酚、水杨酸、间甲酚、邻苯基苯酚等防腐杀菌剂的检测方法也有文献^[3-10]报道,但这些检测方法大多都是针对单一目标物的检测,能够同时测定食品中多组分的方法较少。对饮料等食品中苯氧乙醇、对氯间二甲苯酚、三氯羟基二苯醚、联苯醚、

收稿日期:2014-06-09
基金项目:国家质检总局科技计划项目(2011IK215,2014IK129);
“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAK10B04-9)
作者简介:徐宜宏 女 工程师 研究方向为食品中有毒有害物质残留
E-mail: daicybear1101@163.com

水杨酸、挥发酚、间甲酚、对苯基苯酚、邻苯基苯酚、双氯酚 10 种物质同时分析的检测方法,尚无文献报道。本研究选取果汁饮料和碳酸饮料两种基质建立了饮料中上述 10 种防腐杀菌剂的检测方法,结果表明,该方法操作简单、快速、检出限低,满足国内外对饮料类食品中上述 10 种防腐杀菌剂的限量要求,适用于饮料中 10 种防腐杀菌剂的检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

HP 1200 高效液相色谱仪(PDAD 二极管阵列检测器,美国 Agilent)、C₈ 固相萃取小柱(500 mg,3 mm,美国 DIKMA)、超纯水仪、电子天平。

苯氧乙醇(编号:1441000)、联苯醚(编号:1388000)、双氯酚(编号:1032200)均购自美国 Chem Service,对氯间二甲苯酚(编号:MKBH7621V)、三氯羟基二苯醚(编号:BCBG0479V)均购自美国 SIGMA-ALDRICH,水杨酸(编号:4312785)、挥发酚(编号:7352906)均购自美国迪马,间甲酚[编号:GBW(E) 080471,中国计量科学研究院],对苯基苯酚(编号:506842)、邻苯基苯酚(编号:467952)均购自美国 SUPELCO,标准品纯度均>95.0%;甲醇(色谱纯),其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

称取 5.0 g 试样(含酒精和 CO₂ 的样品需在超声波上脱气驱赶酒精及 CO₂),置于 50 ml 三角瓶中,加甲醇 10 ml 超声提取 5 min,用稀氨水或盐酸调节溶液的 pH 至 7.0,用甲醇定容至 25 ml,过 0.45 μm 微孔滤膜,进行高效液相色谱法测定。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5.0 μm),柱温 30℃,流速 1.0 ml/min,进样量 10 μl,检测器:二极管阵列检测器,检测波长:280 nm;流动相:A 为甲醇;B 为 0.02 mol/L 乙酸铵溶液,pH=6.5。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Condition of gradient elution

时间/min	流速/(ml/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	1	20.0	80.0
20	1	45.0	55.0
30	1	70.0	30.0
40	1	85.0	15.0
47	1	85.0	15.0
65	1	20.0	80.0

2 结果与分析

2.1 提取方法的优化

相同条件下,以果汁饮料为研究对象,对比了涡混提取、振荡提取、超声提取三种提取方式。综合 10 种待测物的整体提取效果,超声提取的效果最佳,样品回收率较高。因此选择超声提取作为提取方式,结果见图 1。

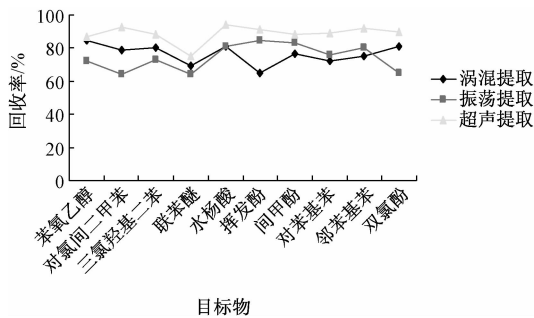


图 1 不同提取方式样品回收率比较

Figure 1 Comparison of different extraction methods of sample recovery rate

2.2 提取液 pH 值的确定

相同条件下,以果汁饮料为研究对象,分别考察了提取液 pH=3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 时,对样品回收率的影响。结果表明,在 pH=7.0 时,10 种化合物的回收率均较高,结果见图 2。这是因为甲醇极性较大,对极性较小的目标物提取效果不好,而在中性条件下,各目标物在此提取环境中可达到较好的电离平衡,兼顾了 10 种目标物的极性,从而得到较高的提取效率。因此,确定提取液 pH=7.0。

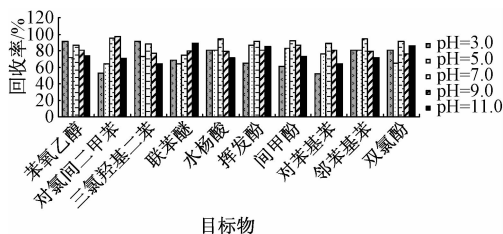
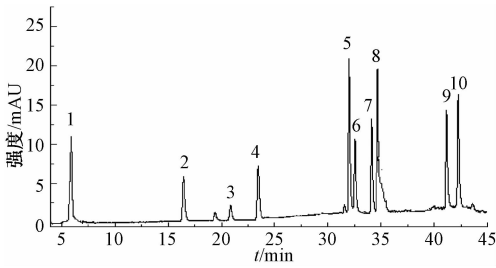


图 2 提取液 pH 值对回收率的影响

Figure 2 Effects of different extracting pH on recovery

2.3 流动相的选择

在参考文献[3-10]的基础上,以碳酸饮料为研究对象,分别选择乙腈-乙酸铵、甲醇-水、甲醇-乙酸铵、甲醇-磷酸二氢钠进行了对比,结果表明,甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵作为流动相进行梯度洗脱时,乙酸铵缓冲液与有机溶剂兼容性较好,使得极性大的化合物得到良好分离,极性小的化合物也得到了适当保留,同时缩短了分析周期。10 种目标物标准溶液色谱图见图 3。



注:1. 水杨酸; 2. 挥发酚; 3. 苯氧乙醇; 4. 间甲酚;
5. 邻苯基苯酚; 6. 对苯基苯酚; 7. 对氯间二苯酚;
8. 双氯酚; 9. 联苯醚; 10. 三氯羟基二苯醚

图 3 10 种待测物混合标准溶液的液相色谱图

Figure 3 Chromatogram of standard solution of 10 compounds

表 2 线性回归方程、相关系数、定量限、回收率和精密度结果 (n = 7)

Table 2 Regression equation, correlation coefficient, LOQ, recoveries and RSD of 10 preservatives-bactericides

待测组分	线性方程	相关系数	定量限 /(μg/ml)	果汁饮料		碳酸饮料	
				平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
苯氧乙醇	$y = 17.045x - 55.57$	0.997 6	0.50	83.25	7.41	91.05	8.61
对氯间二甲苯酚	$y = 37.901x - 6.75$	0.995 6	0.25	80.32	14.20	85.05	9.68
三氯羟基二苯醚	$y = 3.572x - 2.498$	0.995 2	0.50	74.09	8.35	84.05	9.45
联苯醚	$y = 5.105x + 1.298$	0.995 6	0.60	82.19	7.67	87.26	10.10
水杨酸	$y = 14.664x + 1.808$	0.998 2	0.80	91.22	9.34	94.09	8.30
挥发酚	$y = 38.947x + 7.699$	0.995 6	1.00	80.16	7.28	82.48	5.33
间甲酚	$y = 4.213x + 1.043$	0.995 1	0.25	81.19	15.10	91.26	11.50
对苯基苯酚	$y = 9.681x + 0.957$	0.995 9	0.50	85.08	8.26	90.16	14.50
邻苯基苯酚	$y = 12.664x + 1.318$	0.996 1	0.50	87.97	6.79	88.06	11.30
双氯酚	$y = 6.661x - 4.481$	0.995 6	1.00	84.13	8.76	80.22	8.63

2.5 实际样品的测定

在市场上采购了苹果汁、葡萄汁、橙汁和 3 种碳酸饮料等样品,应用本研究所建立的方法对其中上述 10 种防腐杀菌剂进行测定。测定结果见表 3,从中可以看出果汁中所含防腐杀菌剂较多,主要是由于在水果保存运输过程中所喷洒的防腐剂残留所致。结果表明,该方法适用于饮料中上述 10 种防腐杀菌剂的测定。

表 3 饮料中 10 种防腐杀菌含量的测定结果 (mg/kg)

Table 3 Contents of 10 preservatives-bactericides in drinks

待测组分	苹果汁	葡萄汁	橙汁	碳酸 饮料 1	碳酸 饮料 2	碳酸 饮料 3
苯氧乙醇	ND	ND	ND	ND	ND	ND
对氯间二甲苯酚	ND	ND	ND	ND	ND	ND
三氯羟基二苯醚	ND	0.39	0.25	ND	ND	ND
联苯醚	ND	ND	ND	ND	ND	ND
水杨酸	0.96	ND	0.25	0.47	ND	ND
挥发酚	ND	1.36	ND	ND	1.21	ND
间甲酚	ND	ND	ND	0.30	ND	ND
对苯基苯酚	ND	ND	1.14	ND	ND	ND
邻苯基苯酚	2.12	1.51	ND	ND	ND	ND
双氯酚	0.99	ND	1.30	ND	ND	ND

注:ND 为未检出

2.4 线性关系、定量限、回收率和精密度

配制浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/ml 的混合标准溶液,在选定色谱条件下,分别以峰面积对浓度作图。浓度在 0.1 ~ 10 μg/ml 范围内线性关系良好, $r \geq 0.995\ 1$ 。以 10 倍信噪比作为定量限。各组分的线性方程、相关系数及定量限见表 2。

在两种空白饮料基质(果汁饮料、碳酸饮料)中,分别添加混合标准溶液,添加水平均为 0.5、1.0、10.0 μg/g 的模拟加标样品,按上述试验条件进行测定,每个添加水平测定 7 次,各组分的平均回收率和相对标准偏差见表 2。

相萃取-高效液相色谱测定方法。选用 pH = 7.0 的甲醇溶液为提取溶剂,C₈ 固相萃取柱净化,甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵作为流动相进行梯度洗脱,采用 C₁₈反相色谱柱分离,二极管阵列检测器进行检测,试验结果表明,该方法操作简单,准确性和重现性好,能满足国内外对饮料中相关防腐杀菌剂的检测要求。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

[2] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0659—1997 出口蔬菜中邻苯基苯酚残留量检验方法液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,1997.

[3] 杨涛,靳智,李明,等. 高效液相色谱法同时测定果蔬中 5 种防腐杀菌剂[J]. 食品与发酵工业,2008,34(6):132-134.

[4] 王颖,赵海燕,刘丽萍,等. 反相液相色谱法测定消毒液中的对氯间二甲苯酚[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(9):1102-1113.

[5] 徐惠金,奚星林,林海丹. 化妆品中苯甲酸、山梨酸、水杨酸和苯氧乙醇的测定[J]. 现代测量与实验室管理,2012,20(3):6-8.

[6] 张婕,彭黔荣,杨敏,等. 偏最小二乘-带荧光检测器的高效液相色谱法测定间-甲酚和对-甲酚异构体及其他酚的研究[J]. 河北化工,2008,31(5):13-15.

[7] 杜达安,谢剑锋,胡静,等. 消毒剂中有效成分——对氯间二甲苯酚、三氯羟基二苯醚的高效液相色谱测定法[J]. 环境与

3 小结

本文建立了饮料中 10 种防腐杀菌剂残留的固

- 健康杂志,2004,21(6):408-409.
- [8] 陈莹,莫连峰,唐宁. HPLC 法测定复方水杨酸冰片软膏中水杨酸和苯甲酸的含量[J]. 中国药品标准,2009,10(6):465-467.
- [9] 赵敏,宁啸骏,周耀斌. 高效液相色谱法测定化妆品中邻苯基
- 苯酚的含量[J]. 香精香料化妆品,2010,12(6):25-27.
- [10] 白娟娟,艾尔肯·依不拉音,麦麦提·艾合麦提. 固相萃取逐步分离果实保鲜防腐剂噻本咪唑、邻苯基苯酚残留检测的研究[J]. 新疆医科大学学报,2012,35(5):594-598.

实验技术与方法

面粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱测定方法的优化

宋书锋,王丹,刘卿,杨杰,方从容,鲁杰、赵云峰
(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 建立面粉中偶氮甲酰胺测定的高效液相色谱法(HPLC)。方法 以丙酮为提取液,样品提取液经离心浓缩后,用水复溶残渣,采用 BDS HYPERSIL Cyano 色谱柱(4.6 mm×250 mm,4.6 μm)分离,二极管阵列检测器检测。结果 在 2~40 μg/ml 范围内,线性关系良好($r=0.999\ 8$),3 个添加水平的回收率为 74%~118%,相对标准偏差 $RSD<5\%$ 。方法的定量限为 3 mg/kg。结论 本方法特异性强,前处理简单,适用于面粉中添加的偶氮甲酰胺快速筛查和定量。

关键词:面粉;偶氮甲酰胺;高效液相色谱法;测定;面粉处理剂;食品添加剂;食品安全

中图分类号:R155;O657.7;TS202.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0448-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.010

Optimization for determination of azodicarbonamide in flour by high performance liquid chromatography
SONG Shu-feng, WANG Dan, LIU Qing, YANG Jie, FANG Cong-rong, LU Jie, ZHAO Yun-feng
(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National
Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination (ADA) of azodicarbonamide in flour. **Methods** Samples were extracted with acetone, then centrifuged and concentrated, the residue was dissolved with water. The injection was separated by cyano column and detected by photo-diode array. **Results** The method showed a good linearity in the range of 2-40 μg/ml ($r=0.999\ 8$). The recoveries of ADA from flour spiked at three levels were in the range of 74%-118% with the relative standard deviations less than 5%. The limit of quantification (LOQ) was 3 mg/kg. **Conclusion** This method could be used for screening and quantification of ADA in flour for its strong specificity and simple preparation.

Key words: Flour; azodicarbonamide; high performance liquid chromatography; determination; flour treatment agents; food additives; food safety

偶氮甲酰胺(azodicarbonamide,ADA)为常用的化工试剂,在水和大多数有机溶剂中几乎不溶,在二甲基亚砜(DMSO)中微溶,加热 180℃以上分解^[1]。有报道显示^[2],ADA 自身与面粉不发生作

用,但在加水后可与面粉蛋白质中氨基酸的巯基键(-SH)作用,使其转化为二硫键(-S-S-),从而达到增筋和漂白的作用。国际食品法典委员会(CAC)、美国、加拿大、韩国和我国台湾地区均允许 ADA 作为面粉处理剂,使用量为 45 mg/kg。我国 GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》规定 ADA 作为面粉处理剂的允许使用量为 45 mg/kg^[3]。有研究显示^[4-5],面粉中的 ADA 与水接触后,立即快速分解为联二脒,进一步加热处理产生氨基脒(SEM)。SEM 是一种与硝基咪唑类药物-咪唑西林代谢产物一致的化合物,具有致突变和致癌作用,因此 ADA

收稿日期:2014-07-14
基金项目:973“食品加工过程安全性评价及危害物风险评估”(2012CB720804)
作者简介:宋书锋 男 副研究员 研究方向为食品添加剂检测技术 E-mail:songsf@cfsa.net.cn
通讯作者:赵云峰 男 研究员 研究方向为食品化学检验 E-mail:zhaoyf@cfsa.net.cn