

萃取法对样品中的维生素 D₃ 进行提取,参照文献 [6-12] 中报道的维生素 D₃ 样品处理方法与本研究做对比,本研究优势主要在于提取方法快速、简便,分析成本低,准确度和重现性好。通过试验探究,得出微波萃取钙片中维生素 D₃ 的最优条件,为钙片中维生素 D₃ 的快速提取和检测提供依据。

参考文献

[1] 冯志华,刘观忠,张义明. 维生素 D 在动物营养中的应用研究 [J]. 中国畜牧兽医,2004,31(8):16-18.
 [2] 张敏,游理军,唐俊,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定婴幼儿食品中的维生素 D₂、D₃ [J]. 中国食品添加剂,2014,(2):240-242.
 [3] 王尚,郑枫,丁黎. RP-HPLC 法测定维生素 D₃ 制剂中的有关物质 [J]. 中国药科大学学报,2012,43(1):55-59.
 [4] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 2010 年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 52-53.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.9—2010 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
 [6] 许强,刘金生,王铁鹏,等. 反相高效液相色谱法测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ [J]. 理化检验,2011,47(10):1168-1172.
 [7] 赵榕,薛颖,吴国华,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定钙强化食品中的维生素 D [J]. 色谱,2008,26(1):113-115.
 [8] 贺利民,吕岱竹,吴莉宇,等. 高效液相色谱法同时测定无骨海鱼中的维生素 A、D 和 E [J]. 分析试验室,2004,23(5):77-79.
 [9] 刘红河,尹江伟,仲岳桐,等. HPLC-DAD 同时测定食品中维生素 A、D、E 研究 [J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(9):1047-1049.
 [10] 周提军,王莎,李兵,等. 基于柱切换技术的高压液相色谱法检测奶粉中的维生素 D [J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(2):467-471.
 [11] 刘永刚,高玉丛,朱俊平,等. 食品添加剂中维生素 A、D 和 E 的检测方法研究 [J]. 中国乳品工业,2004,32(12):47-48.
 [12] 曾义. 高效液相色谱-质谱法检测血清中维生素 D 含量 [J]. 中国药业,2013,22(20):17-18.

实验技术与方法

高效液相色谱法同时测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸

许秀敏^{1,2}, 梁旭霞², 龙朝阳², 高燕红², 黄湘东², 杨杏芬²

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430)

摘要:目的 建立同时测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的高效液相色谱检测方法。方法 样品中过氧化苯甲酰和苯甲酸用无水乙醇进行提取,采用色谱柱为 Symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长 235 nm。结果 过氧化苯甲酰、苯甲酸与杂质基线分离,过氧化苯甲酰和苯甲酸在 0.10~20 mg/L 浓度范围内线性良好,相关系数 *r* 均在 0.999 9 以上。过氧化苯甲酰和苯甲酸回收率分别为 95.2%~99.5% 和 95.3%~105%,方法检出限分别为 0.10 和 0.08 mg/kg,定量限分别为 0.30 和 0.24 mg/kg。结论 本方法操作简便、灵敏度高、结果准确,适用于小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸同时分析。

关键词:小麦粉及其制品; 过氧化苯甲酰; 苯甲酸; 高效液相色谱; 违法添加物

中图分类号:R155; S512.1; TS213.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0033-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.009

Simultaneous determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour and its products by high performance liquid chromatography

XU Xiu-min, LIANG Xu-xia, LONG Chao-yang, GAO Yan-hong, HUANG Xiang-dong, YANG Xing-fen
 (School of Public Health, Zhongshan University, Guangdong Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To develop an analytical method for the simultaneous separation and determination of residual benzoyl peroxide (BPO) and benzoic acid (BA) in flour and wheat products by HPLC. **Methods** BPO and BA were extracted by ethanol, and separation and determination were carried out on Symmetry C₁₈ column using a gradient mobile phase by HPLC at 235 nm. **Results** BPO and BA showed good linearity (*r* > 0.999 9) in the range of 0.10-20 mg/L. For BPO and BA, the recoveries were 95.2%-99.5% and 95.3%-106%, respectively; the limits of detection (LOD) were 0.10 and 0.08 mg/kg; the limits of quantification (LOQ) were 0.30 and 0.24 mg/kg. **Conclusion** The method is

收稿日期:2014-10-08

作者简介:许秀敏 女 副主任技师 研究方向为食品安全 E-mail:48546862@qq.com

通讯作者:杨杏芬 女 教授 研究方向为应用毒理学和食品安全风险评估 E-mail:yangxingfen@21cn.com

simple and reliable for the determination of BPO and BA in wheat flour and its products.

Key words: Wheat flour and its products; benzoyl peroxide; benzoic acid; high performance liquid chromatography; illegal additives

过氧化苯甲酰(BPO),作为一种重要的食品改良剂,具有抑制微生物生长、促进小麦粉熟化、增加白度等优点,被广泛应用于小麦粉中。研究表明^[1-3],小麦粉中适当添加一定浓度的过氧化苯甲酰,并不会造成食品安全问题。但过氧化苯甲酰本身不仅会破坏面粉中的营养成分,其分解产物也存在着一定的健康危害风险;苯甲酸(BA)短期过量食用会导致神经衰弱等,长期过量食用会造成肝脏损害。我国已于2011年撤销过氧化苯甲酰作为食品添加剂的许可,禁止在面粉生产中添加,且加强了对小麦粉及其制品的监督力度,以保障小麦粉及其制品的食用安全。

目前小麦粉中过氧化苯甲酰的检测方法包括化学分析法^[4]、光谱法^[5-7]、色谱法^[8-18]和质谱法^[19]等。其中,化学分析法和光谱法由于灵敏度较低,不适用低浓度过氧化苯甲酰的检测。质谱法仪器昂贵不普及。此外,多数检测方法采用间接测定方式^[8-9],通过将样品中过氧化苯甲酰还原为苯甲酸后进行测定,以苯甲酸结果乘以系数折算出样品中过氧化苯甲酰的含量,方法操作繁琐且试验结果不能反映样品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的真实水平,从而造成产品质量异议。张艳等^[13-19]采用单一或混合有机溶剂进行提取,液相色谱法同时测定样品中的过氧化苯甲酰和苯甲酸。但这些方法亦存在一定的不足:样品前处理笼统单一;在上述色谱条件下,溶剂峰或杂质容易干扰目标物质检测;分析时间长,效率低。因此,本方法在上述研究的基础上,对前处理条件以及色谱条件进行了优化,适用于小麦粉及其各种制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的检测,结果准确可靠。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪(配四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器,美国 Agilent)、超声波清洗器、超速离心机、涡旋混合器、超纯水机、搅拌机、2 ml 超速离心管、0.45 μm 有机相针筒微孔滤膜(天津津腾公司)。

过氧化苯甲酰标准品(00213-100G)、苯甲酸标准品(12353-25G)纯度均 $\geq 98\%$,均购自美国 Fluka、甲醇(色谱纯);磷酸、无水乙醇均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

称取过氧化苯甲酰和苯甲酸标准品各 0.1 g(精

确到 0.000 1 g)至 100 ml 棕色容量瓶中,加适量无水乙醇超声 10 min,冷却至室温,用无水乙醇定容至刻度,得质量浓度为 1.000 mg/ml 标准储备液。使用前配制成最终浓度分别为 0.100、0.500、5.00、10.0、15.0、20.0 mg/L 的混合标准溶液。

1.2.2 样品前处理

小麦粉和生干性面制品:样品粉碎并混匀,称取 1 g(精确到 0.001 g)至 10 ml 具塞比色管中,准确加入 10 ml 无水乙醇,涡旋混匀后超声震荡提取 10 min,取适量溶液至超速离心管 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 有机相滤膜,待高效液相色谱测定。该方法适用于小麦粉、面糊(如用于鱼和禽肉的拖面糊)、裹粉、煎炸粉、挂面等样品的前处理。

生湿性面制品和发酵性面制品:样品去馅后切细,经搅拌机绞碎并混匀。称取 2 g(精确到 0.001 g)至 25 ml 具塞比色管中,准确加入 10 ml 无水乙醇,其余步骤同上。该方法适用于湿面条、饺子皮、馄饨皮、烧麦皮、包子、馒头、花卷等样品的前处理。

1.2.3 仪器条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.1% 磷酸水溶液,B 为甲醇,梯度洗脱;流速 1.0 ml/min,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 235 nm,进样量 10 μl 。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	30	70
15.0	20	80
17.0	20	80

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

2.1.1 提取溶剂的选择

参考目标物的化学性质和相关文献报导^[12-14],过氧化苯甲酰和苯甲酸提取液主要有石油醚、乙醚、丙酮、乙醇、乙腈、无水乙醇等。亦有文献报导采用含有一定比例水的有机溶剂提取样品中目标物,但是,本研究发现有有机溶剂与一定比例水混合,不仅带入大量的水溶性杂质干扰检测,而且会加速过氧化苯甲酰的分解,故本文采用单一有机溶剂丙酮、乙醇、乙腈、无水乙醇作为提取剂对样品进行试验。结果显示:丙酮(图 1A)溶剂峰与苯甲酸吸收峰重叠;甲醇(图 1B)、乙腈(图 1C)提取液中脂溶

性杂质多,对苯甲酸检测存在一定干扰,而采用无水乙醇则杂质干扰少、色谱基线平稳、提取效率高(图1D)。因此,本研究选择无水乙醇作为提取液。

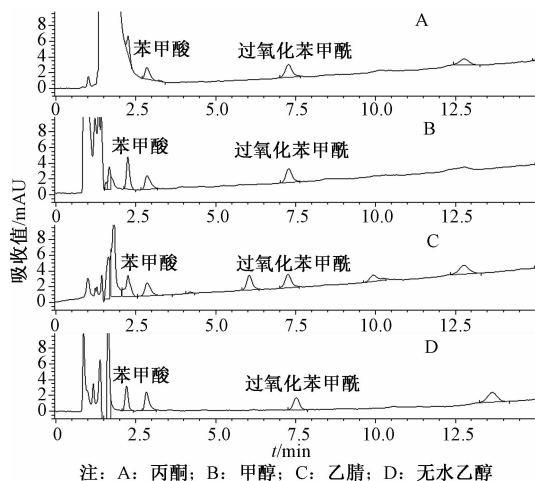


图1 不同提取液对过氧化苯甲酰和苯甲酸的色谱图

Figure 1 Different extraction liquid chromatogram

2.1.2 提取时间的选择

本研究通过测定在 25 ℃ 时不同超声提取时间(5、10、15、20 和 25 min)对空白小麦粉基质加标样品(加标水平为 4 mg/kg)的峰面积,来比较提取时间对过氧化苯甲酰和苯甲酸的影响,结果见图 2。随着提取时间的增加,过氧化苯甲酰的含量逐渐降低,而苯甲酸的含量逐渐增加,但二者的总和基本维持在同一水平。提示超声波能加速基质中过氧化苯甲酰分解成为苯甲酸。

本研究同时考察了在超声条件下,过氧化苯甲酰和苯甲酸在无水乙醇中的溶解时间。结果发现,过氧化苯甲酰和苯甲酸各 100 mg 在 100 ml 无水乙醇中超声 6 ~ 10 min 才能完全溶解。综合考虑,本研究选择最佳提取时间为 10 min。

2.1.3 提取温度的选择

本研究考察了在不同提取温度条件下(25、30、35、40 ℃)超声 10 min,空白小麦粉加标回收样品(加标水平为 4.0 mg/kg)的目标化合物峰面积。如图 3 所示,

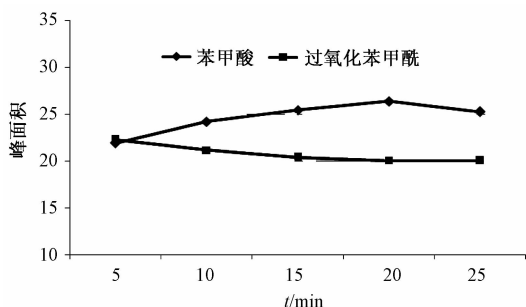


图2 不同提取时间对过氧化苯甲酰和苯甲酸的影响
Figure 2 Influence of different extraction time of benzoyl peroxide and benzoic acid

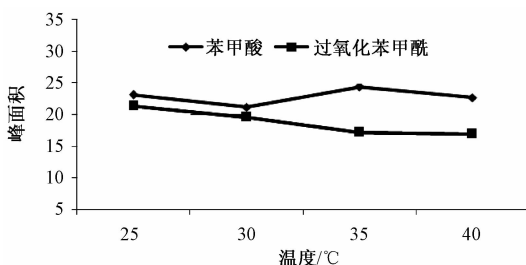


图3 不同提取温度对过氧化苯甲酰和苯甲酸的影响
Figure 3 Influence of different extraction temperature of benzoyl peroxide and benzoic acid

随着提取温度的升高,过氧化苯甲酰峰面积逐渐下降,提示加热会导致过氧化苯甲酰的缓慢分解。除提取温度外,过氧化苯甲酰的分解亦可能影响苯甲酸的含量变化。考虑过氧化苯甲酰不稳定及苯甲酸在 50 ℃ 以上也有少量挥发,因此提取的温度不宜过高,故本研究最终选择最佳提取温度为室温 25 ~ 30 ℃。

2.2 色谱条件选择

2.2.1 检测波长的选择

采用 DAD 检测器对过氧化苯甲酰和苯甲酸乙醇提取液在 200 ~ 400 nm 波长范围进行扫描,结果见图 4。苯甲酸、过氧化苯甲酰最大吸收波长范围均在 220 ~ 250 nm。根据波长选择原则:两种目标物吸收尽量大,干扰物吸收尽量小,本研究选取 235 nm 作为最佳检测波长。

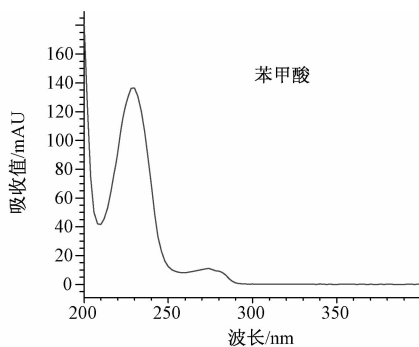
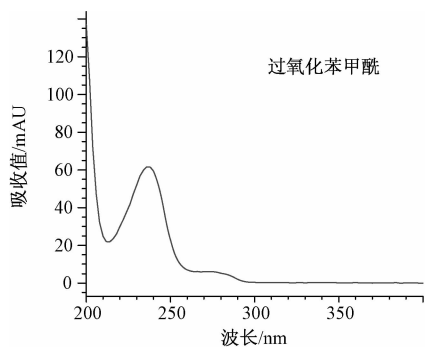


图4 235 nm 下过氧化苯甲酰和苯甲酸的全扫描光谱图

Figure 4 Spectrogram of benzoyl peroxide and benzoic acid in 235 nm

2.2.2 色谱柱的选择

本研究考察了4种不同品牌的C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)对目标化合物分离度的影响。从色谱图5A可知,Symmetry C₁₈色谱柱能有效分离苯甲酸和杂质,灵敏度高,色谱峰峰形对称。

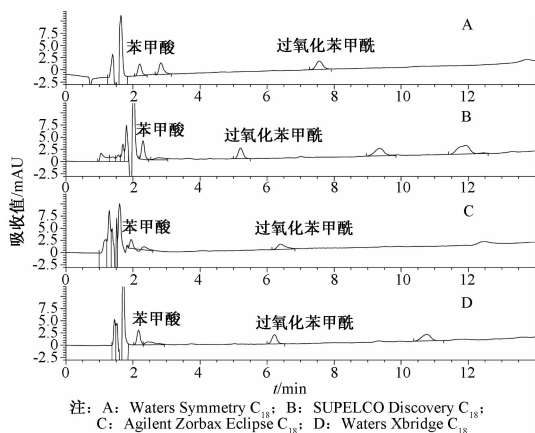


图5 不同色谱柱对过氧化苯甲酰和苯甲酸分离度的色谱图
Figure 5 Different chromatographic column chromatogram of benzoyl peroxide and benzoic acid isolation

2.2.3 洗脱条件的选择

本研究依据过氧化苯甲酰和苯甲酸的化学性质和极性,通过试验,采用甲醇-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,并对比了参考文献中不同洗脱条件(甲醇-乙酸铵溶液梯度洗脱^[17]、甲醇-磷酸水溶液等度洗脱^[15])。结果表明,甲醇-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱条件下,过氧化苯甲酰与苯甲酸能实现良好的分离,且能保障苯甲酸与杂质的良好分离,基线平稳,见图6。流动相中的磷酸能起抑制目标物的解离作用,减少拖尾从而解决峰形对称问题;梯度洗脱可令先出峰的苯甲酸能与杂质达到良好的分离,并控制过氧化苯甲酰在8 min内出峰,提高分析效率。

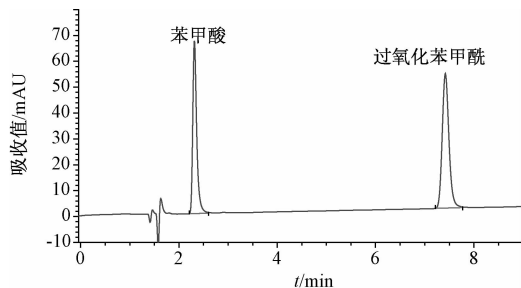


图6 苯甲酸和过氧化苯甲酰的标准色谱图
(浓度均为8.0 mg/L)

Figure 6 Standard chromatograms of benzoic acid and benzoyl peroxide

2.3 线性范围、检出限和定量限

在上述试验条件下,测定不同质量浓度的标准溶液,以峰面积比质量浓度绘制标准曲线,以曲线的相关系数衡量方法的线性。在0.10~20 mg/L浓度范

围内,过氧化苯甲酰的回归方程为 $y = 58.0x - 3.8$, 苯甲酸的回归方程为 $y = 49.3x + 1.0$, 相关系数 r 均 > 0.9999 , 说明方法线性良好。样品逐级降低加标水平并按1.2.3仪器条件测定,以目标峰3倍信噪比(S/N)对应的浓度作为方法检出限,当称样量为1 g无水乙醇定容至10 ml时,过氧化苯甲酰和苯甲酸的方法检出限分别为0.10和0.08 mg/kg,方法定量限分别为0.30和0.24 mg/kg。

2.4 准确度和精密度

选取空白生湿面制品、生干面制品、发酵面制品、裹粉等面制品作为代表性基质,以空白加标回收试验的回收率来衡量方法的准确度,以回收率结果的相对标准偏差(RSD)来衡量方法的精密度。加标水平分别为10.0、20.0、100 mg/kg,结果见表2。不同水平空白样品加标,过氧化苯甲酰和苯甲酸的回收率均介于94.1%~102%之间, RSD 均 $< 5\%$ 。说明该方法的精密度和准确度良好,适用于小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的同时测定。

表2 回收率及精密度测定结果($n=6$)

Table 2 Results of recovery rate and precision of determination

样品	加标水平 (mg/kg)	过氧化苯甲酰		苯甲酸	
		平均回收 率/%	RSD /%	平均回收 率/%	RSD /%
小麦粉	4.00	97.5	1.4	102	1.1
	10.0	99.4	1.4	98.3	2.1
	20.0	96.7	1.3	95.3	1.1
挂面	4.00	97.8	1.1	100	0.8
	10.0	99.4	1.4	96.9	1.8
	20.0	99.5	1.7	97.1	1.4
馒头	4.00	95.2	0.7	103	1.2
	10.0	96.6	0.2	97.8	0.9
	20.0	97.8	0.7	99.3	0.6
湿面条	4.00	96.1	1.5	106	1.2
	10.0	95.5	1.9	101	1.4
	20.0	96.6	0.9	99.2	0.7
炸粉	4.00	96.6	1.3	105	2.4
	10.0	95.6	1.1	98.1	2.0
	20.0	97.6	1.1	100	1.6

2.5 稳定性试验

称取空白小麦粉添加过氧化苯甲酰和苯甲酸标准溶液(添加水平为100 mg/kg)并按1.2.2条件进行前处理,在室温下每隔一定时间测定其峰面积考察其稳定性,结果见图7。随时间变化苯甲酸峰面积响应值逐渐增加,在7 h内增加了0.3%,29 h内增加了3.6%。随时间变化过氧化苯甲酰峰面积响应值呈下降趋势,在7 h内过氧化苯甲酰下降率为1.0%;29 h内过氧化苯甲酰的下降率3.3%。在一定的时间内过氧化苯甲酰和苯甲酸相对稳定,为保证检测结果的准确性,建议样品前处理后应尽快上高效液相色谱仪检测。

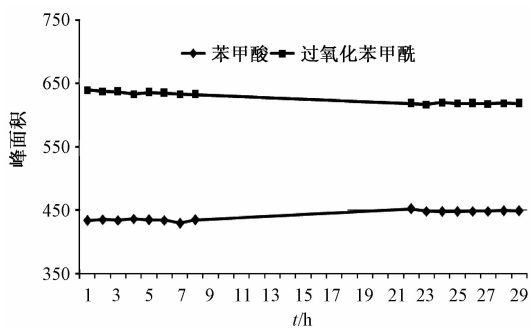


图7 不同时间对过氧化苯甲酰和苯甲酸稳定性的影响
Figure 7 Different time impact on the stability of benzoyl peroxide and benzoic acid

2.6 方法学对比

称取空白小麦粉添加过氧化苯甲酰和苯甲酸标准溶液(添加水平均为 4.0 mg/kg),采用 GB/T 22325—2008《小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 高效液相色谱法》^[20]与本试验方法分别进行结果比对。国标法把测定结果苯甲酸含量折算为过氧化苯甲酰含量 7.9 mg/kg;采用本方法的测定结果苯甲酸含量为 4.1 mg/kg,过氧化苯甲酰 3.8 mg/kg。本方法同时提取并测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸各自含量,无需氧化还原或破坏目标物的化学结构直接测定,检验指标明确,试验操作简单,试验结果科学可靠。

2.7 实际样品检测

采用本试验方法对 2012 年广东省食品安全风险监测中 60 份小麦粉及其制品进行检测。结果显示:所有样品中均未检出过氧化苯甲酰;苯甲酸检出率为 8.3%,检出范围为 0.026 ~ 3.75 g/kg。说明该方法可用于实际小麦粉及其制品的检测。

3 小结

本研究针对不同种类小麦粉及其制品,分别优化了前处理条件和仪器条件,建立了过氧化苯甲酰和苯甲酸同时测定的高效液相色谱检测方法。该方法操作简单快捷、灵敏度高、结果准确可靠,适用于小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的含量的同时测定,方法明显优于之前的研究报道。

参考文献

[1] 刘林,彭蜀晋.小麦粉添加剂过氧化苯甲酰的作用机理及安全性研究[J].安徽农业科学,2011,39(6):3669-3671.

[2] 李伟,赵全年,宋卫东.过氧化苯甲酰毒性的研究进展[J].疾病监测与控制杂志,2010,4(7):9-10.

[3] 姜培珍.食品添加剂使用中的安全问题与管理对策[J].上海预防医学杂志,2004,6(6):280-282.

[4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB 19825—2005 食品添加剂稀释过氧化苯甲酰[S].北京:中国标准出版社,2005.

[5] 沙鸥,李亚鑫.碘化钾-罗丹明 6G 分光亮度法测定面粉中过氧化苯甲酰[J].分析检测,2012,33(22):177-180.

[6] 杜娟,孙丹.罗丹明 B 光谱探针测定面粉中过氧化苯甲酰[J].食品科学,2009,30(10):156-158.

[7] 吴迎春,聂峰.流动注射化学发光法测定面粉中过氧化苯甲酰[J].食品科学,2010,31(22):439-441.

[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 18415—2001 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定方法[S].北京:中国标准出版社,2001.

[9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 22325—2008 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2008.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.SN/T 3148—2012 出口食品中过氧化苯甲酰含量的测定 高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2012.

[11] Saiz A I, Manrique G D, Fritz R. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid levels by HPLC during wheat flour bleaching process[J].Agric Food Chem,2001,49(1):98-102.

[12] 王艳芳,石俊杰.毛细管气相色谱测定小麦粉中过氧化苯甲酰方法的改进[J].粮食加工,2011,36(1):74-76.

[13] 王金,杨更亮,张骥.胶束毛细管电泳在线吹扫富集技术测定面粉中的增白剂过氧化苯甲酰[J].色谱,2007,25(3):341-343.

[14] 冯吉,李忠,黄琼,等.离子色谱-抑制电导法同时测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰与溴酸钾的方法研究[J].食品科技,2011,36(7):290-293.

[15] 张艳,陈剑刚,冯翠霞.高效液相色谱法同时测定面粉中的过氧化苯甲酰和苯甲酸[J].中国卫生检验杂志,2010,20(6):1335-1336.

[16] 高艾英,张昊,许芬,等.高效液相色谱法测定小麦粉中过氧化苯甲酰及其还原产物苯甲酸[J].山东农业科学,2009(1):97-98.

[17] 奚星林,李宪华,陈毓芳,等.梯度洗脱 HPLC 法同时测定小麦粉中过氧化苯甲酰和苯甲酸[J].中国卫生检验杂志,2007,17(3):411-412.

[18] 郑云峰,诸葛庆,葛乐勇,等.高效液相色谱法同时测定小麦粉及其制品中的苯甲酸和过氧化苯甲酰[J].粮食与工业,2010(5):58-60.

[19] Yukiko A O, Chikako Y, Naoki S, et al. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high-performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1040 (2): 209-214.

[20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 22325—2008 小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2008.