

HPLC 法测定发酵面制品中苯甲酸和山梨酸的含量

田莉, 李静峰, 张仁正, 宋晓宁, 方灿, 高源* (贵州省食品检验检测所, 贵州贵阳 550004)

摘要 [目的]建立 HPLC 法测定发酵面制品中苯甲酸、山梨酸含量的方法。[方法]色谱柱为 Thermo Acclaim™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液 (7:93, V/V); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 230 nm; 柱温 35 ℃。[结果]该方法具有良好的精密度与稳定性, 苯甲酸、山梨酸分别在 2.33~27.96、2.22~26.63 μg/mL 线性良好, 其平均回收率分别为 93.0%、94.7%。[结论]该方法简便、易操作、结果准确、重现性好, 适用于发酵面制品中苯甲酸、山梨酸含量的检测。

关键词 高效液相色谱法; 发酵面制品; 苯甲酸; 山梨酸

中图分类号 TS 202.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)22-0157-02

Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Fermented Flour Products by HPLC

TIAN Li, LI Jing-feng, ZHANG Ren-zheng et al (Guizhou Institute for Food Control, Guiyang, Guizhou 550004)

Abstract [Objective]The research aimed to establish method for determination of benzoic acid and sorbic acid in the fermented flour products by HPLC. [Method]The chromatographic separation was performed on Thermo Acclaim™ C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) using methanol-0.02 mol/L ammonium acetate solution as mobile phase of 7:93 at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 35 ℃. The detection wavelength was 230 nm. [Result]The method had good precision and stability. The calibration curves established showed good linearity over the concentration ranges of 2.33~27.96 (benzoic acid), 2.22~26.63 μg/mL (sorbic acid), and average recovery was 91.8%, 93.1% respectively. [Conclusion]The method is simple, accurate and reproducible, it is suitable for determination of benzoic acid and sorbic acid in the fermented flour products, it is applicable to determine benzoic acid and sorbic acid in the fermented flour products.

Key words HPLC; Fermented flour products; Benzoic acid; Sorbic acid

发酵面制品是以小麦粉和水为原料, 添加或不添加杂粮, 加入以酵母菌为主的发酵剂, 经和面、发酵、中和、加入其他调味料、揉和成型、醒发、汽蒸、冷却而成的食品^[1]。发酵面制品是我国居民的主要食品, 尤其在北方地区, 发酵面制品占主食的 70% 以上, 主要是家庭自制或作坊式的小规模生产, 也有食品企业加工好的冷冻发酵面制品。

苯甲酸、山梨酸是常用的防腐剂, 苯甲酸可以用作食品、饲料、乳胶、牙膏的防腐剂, 在酸性条件下, 对霉菌、酵母和细菌均有抑制作用。山梨酸是国际粮农组织和卫生组织推荐的高效安全的防腐保鲜剂, 广泛用于食品、烟草、农药、化妆品等行业, 对酵母、霉菌和许多真菌都有抑制作用。山梨酸的毒副作用比苯甲酸小得多, 不会对人的身体健康造成不利影响。

发酵面制品作为我国居民的主要食品, 是国家食品安全监督每年必抽检项目, 检验其中防腐剂、甜味剂、微生物等指标, 监督其质量安全和卫生状况。根据 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》的规定^[2], 在发酵面制品中不得使用苯甲酸、山梨酸。但有些商家为了延长面制品的保质期, 在其中非法加入苯甲酸和山梨酸等防腐剂。这些防腐剂对人的身体或多或少都有影响, 长期食用或食用过量会对人体产生毒副作用, 因此对发酵面制品等主食进行质量安全控制尤为重要^[3-4]。此前, 也有很多关于食品中苯甲酸和山梨酸含量测定的文献^[5-7], 但是并无发酵面制品防腐剂的相关报道。笔者以高效液相色谱法 (HPLC)^[8]测定发酵面制品中苯甲酸、山梨酸的含量, 为其防腐剂的检验提供了方

法, 也为监督发酵面制品的质量安全提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 戴安 Ultimate 3000 液相色谱仪 (带紫外检测器); 梅特勒电子天平 (感量 0.01 mg); Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 有限公司); KQ-500DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 苯甲酸对照品 (批号 30618, 纯度 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH); 山梨酸对照品 (批号 90622, 纯度 99.0%, Dr. Ehrenstorfer GmbH); 乙酸铵 (分析纯, 成都市科龙化工试剂厂), 甲醇 (色谱纯, Tedia Company, Inc)。水为超纯水。微孔滤膜: 水系 0.45 μm。

1.3 阳性样品的制备 称取 500 g 面粉, 放于容器内, 在 250 mL 水中加入一定量食品级苯甲酸、山梨酸及 5.00 g 酵母, 混匀, 将上述水溶液倒入面粉中, 将其揉匀, 待发酵后, 蒸熟, 即得模拟阳性样品。

1.4 对照品溶液的配制

1.4.1 对照品储备液。 分别精密称取对照品苯甲酸 0.011 71 g、山梨酸 0.011 21 g, 分别置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解, 定容至刻度, 即得。

1.4.2 混合对照品溶液。 分别精密量取 10 mL 苯甲酸储备液、5 mL 山梨酸储备液一起置于 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 其浓度分别为 23.30、11.10 μg/mL。

1.5 供试品溶液的制备 将上述阳性样品粉碎均匀, 称取 5.00 g 均匀样品, 置于 50 mL 具塞离心管中, 加水 30 mL, 摇匀, 在 40 ℃ 水浴中超声 15 min, 定容至刻度, 离心 5 min (8 000 r/min), 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 待测。

1.6 色谱条件 色谱柱为 Thermo Acclaim™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液 (7:93, V/V); 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 230 nm;

基金项目 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2017] 2841)。

作者简介 田莉 (1988—), 女, 贵州石阡人, 主管技师, 硕士, 从事食品安全检测及其标准研究。* 通讯作者, 副主任药师, 硕士, 从事食品药品质量安全研究。

收稿日期 2018-04-08

柱温 35 ℃。

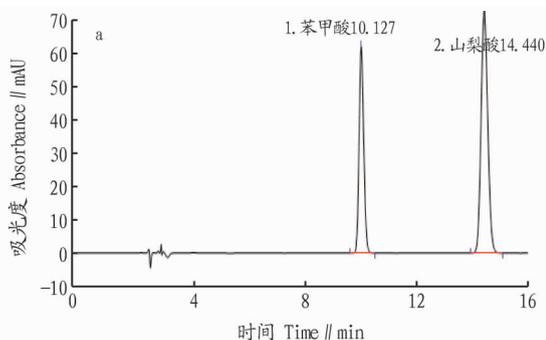
1.7 方法学考察

1.7.1 线性关系考察 分别精密吸取苯甲酸、山梨酸储备液 0.1、0.3、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 置于 10 mL 容量瓶中,定容至刻度。分别注入液相色谱仪测定,进样体积为 10 μL。

1.7.2 重复性试验 精密称取模拟阳性样品 5 g,共 6 份,按“1.5”方法制备供试品液,按“1.6”色谱条件测定,计算苯甲酸、山梨酸相对峰面积的 RSD,要求该值小于 3%。

1.7.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 6 次,按“1.6”色谱条件进行测定,计算苯甲酸、山梨酸峰面积的 RSD,要求该值小于 3%。

1.7.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,按“1.6”色谱条件测定,计算所测苯甲酸、山梨酸峰面积的 RSD,要求其值小于 3%。



1.7.5 检出限的测定 精密量取 4.661 μg/mL 苯甲酸、4.439 μg/mL 山梨酸混合对照品液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 分别置于装有空白样品的容量瓶中,按照“1.5”方法制备供试品溶液,按“1.6”色谱条件测定,记录相应保留时间处这 2 种物质的峰高,与基线噪音峰高之比,以信噪比为 3:1 来确定最低检出限。

1.7.6 加样回收率试验 分别精密量取 23.30 μg/mL 苯甲酸、11.10 μg/mL 山梨酸混合对照品溶液 10、20、30 mL,加入到模拟阳性样品中,按“1.5”方法制备供试品溶液;分别注入液相色谱仪,计算苯甲酸、山梨酸的含量,计算加样回收率及 RSD。

2 结果与分析

2.1 对照和样品色谱图 分别吸取对照混合溶液及阳性样品溶液注入液相色谱仪,按“1.6”色谱条件运行,记录色谱图,对照色谱峰与相邻色谱峰完全分离,见图 1。

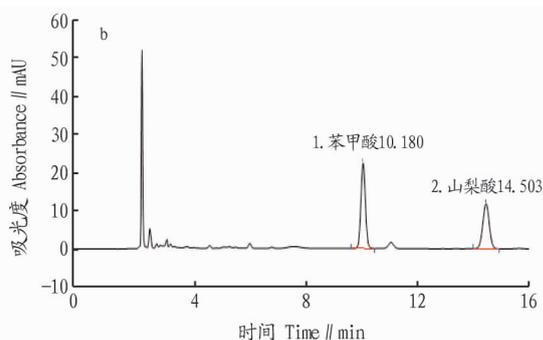


图 1 对照品(a)和阳性样品(b)的 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of standard(a) and sample(b)

2.2 线性关系考察 按“1.6”色谱条件测定,记录色谱图,以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得出苯甲酸和山梨酸的回归方程分别为 $y = 0.417 0x - 0.080 7$ ($r = 0.999 5$)、 $y = 0.735 0x - 0.115 9$ ($r = 0.999 4$),表明其分别在 2.33~27.96、2.22~26.63 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.3 重复性试验 将 6 份试样,按“1.5”方法制备供试品溶液,“1.6”色谱条件进行测定,测得苯甲酸、山梨酸相对峰面积的 RSD 分别为 0.80%、0.75%,表明该方法操作重复性良好。

2.4 精密度试验 同一供试品溶液连续进样 6 次,按“1.6”色谱条件进行测定,得出苯甲酸、山梨酸峰面积的 RSD 分别为 0.19%、0.20%,表明该方法与仪器具有良好的精密度。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,按“1.6”色谱条件测定,所测苯甲酸、山梨酸峰面积的 RSD 分别为 1.20%、0.91%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 检出限的测定 按照“1.7.5”操作,结果表明以苯甲酸 0.5 mL、山梨酸 0.4 mL 作为检出限。当称样量为 5.00 g,苯甲酸、山梨酸的检出限分别为 0.47、0.36 mg/kg。

2.7 加样回收率试验 分别精密量取 23.30 μg/mL 苯甲酸、11.10 μg/mL 山梨酸混合对照品溶液 10、20、30 mL,加入到模拟阳性样品中,苯甲酸、山梨酸的含量、回收率和 RSD 的结果见表 1。由表 1 可知,苯甲酸、山梨酸的平均回收率分别为

93.0%、94.7%,RSD 分别为 1.8%和 1.2%。

3 讨论与结论

在国家标准 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》中,规定了部分食品品种中苯甲酸、山梨酸的检测方法。按照此方法,需要试剂、离心 2 次,超声 20 min 等步骤提取,如果是大批次检测,其提取方法还是会花费大量时间和成本,该试验的提取方法简单、准确,不用任何试剂,在时间和成本上均有很大的优势。

该试验中苯甲酸、山梨酸分别在 2.33~27.96、2.22~26.63 μg/mL 线性良好,其平均回收率分别为 93.0%、94.7%,RSD 分别为 1.8%和 1.2%。表明该方法简便、易操作、结果准确、重现性好,适用于发酵面制品中苯甲酸、山梨酸含量的检测。

在发酵面制品的抽检工作中,每年都有样品检出苯甲酸、山梨酸的情况,但是根据 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》,苯甲酸、山梨酸在发酵面制品中是不得使用的。在市场上,各类包子的面皮也是发酵面制品。针对包子样品,该试验是把馅料全去掉,只做面皮,大部分样品中也会有微量的苯甲酸或(和)山梨酸检出,刚开始出现这种情况时,每次都会把馅料也检测,和面皮做对比判断。结果发现,低含量的阳性样品是馅料带入的,因为在各种馅料制作过程中,一般会加入酱油、酱、酱腌菜类或其他调味料

(下转第 178 页)

7 结论

贵州由于经济较为落后,考虑到农民对供水水价的承受能力,按电价0.5元/(kW·h)进行测算,参照表2,一般情况提水扬程小于300m,供水总成本为1.3~5.0元/m³,单位经营成本为0.8~4.0元/m³,能确保工程长久发挥效益、良性运行,可以考虑提水;对于特别缺水的地区,提水扬程500m以内的可考虑提水。综合考虑工程规模和提水扬程,参照表2成本测算,贵州的农村安全饮水工程,规模大于50m³/d,提水扬程小于300m的可考虑提水;特别缺水地区,规模大于500m³/d,提水扬程500m以内的可考虑提水。

综上,在贵州山区和石漠化地区对于居住较为分散、高程较高、同等高程无可靠水源的农村群众,项目区供水总人数大于500人,工程规模大于50m³/d,提水扬程小于300m的地区,可通过高扬程提水的方式,将原水提至高位水池,在高位水池统一对水质进行消毒处理,并由专人对泵站进行管理,确保工程正常运行。该方式既可提高工程供水保证率,也可提供供水水质达标率,是解决位置较高居民饮水安全问题的主要途径。

(上接第158页)

(在这些调味料中苯甲酸、山梨酸是可以使用的)。当检出低

参考文献

- [1] 亢春萍.农村饮水安全工程经济评价方法应用分析[J].财经界(学术版),2013(21):264.
- [2] 何莲,程吉林,张汉松.农民安全饮水水价承受能力的定量分析研究[J].灌溉排水学报,2011,30(4):22-26.
- [3] 周诗海.谈泵站变压器容量的选择[J].排灌机械工程学报,1997(1):32-34.
- [4] 张玲玲,王宗志,魏延福.保障农村饮水安全的水价模式研究[J].资源开发与市场,2009,25(10):880-882.
- [5] FALLSIDE F, PERRY P F. Hierarchical optimisation of a water-supply network[J]. Electrical engineers proceedings of the institution of, 1975, 122(2):202-208.
- [6] 张文丽,李宁,李经纬.农村饮水安全供水工程输配水管网优化布置[J].内蒙古水利,2014(6):77-78.
- [7] 刘建强,金丽,郑强.农村饮水安全工程供水泵站输配水管网优化计算方法研究[J].地下水,2008,30(6):133-135.
- [8] 李明亮,杨秋石,程琛.湖北省农村饮水安全管理的几种典型模式[J].农村经济与科技,2011,22(11):47-48.
- [9] 王学震.农村饮水工程概算编制中借用其他定额的方法[J].现代农业科技,2015(10):202-203.
- [10] 张龙云,曹升乐.农村饮水水价测算方法研究[J].水电能源科学,2007(6):11-13.
- [11] 王秀,林正雨.农村饮水安全工程实践及效益研究:以自贡市团结镇供水工程为例[J].安徽农业科学,2008,36(27):11959-11961.
- [12] 马燕.水窖在高山缺水地区人畜饮水工程中的应用[J].水资源与水工程学报,2007,18(2):92-94.
- [13] 唐天培.浅谈泵站水泵的选型与动力机配套[J].排灌机械,1988(1):19-20.

含量的苯甲酸或(和)山梨酸时,根据馅料的种类,应该考虑“带入原则”,以免误判样品不合格。

表1 样品加标回收率
Table 1 Recoveries of sample

组分 Component	样品中含量 Sample content μg	加入量 Amount added μg	测得量 Measured quantity//μg	回收率 Recovery %	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
苯甲酸 Benzoic acid	502.06	233	717.71	92.55	93.0	1.8
	502.04	233	716.27	91.94		
	502.16	466	940.73	94.11		
	502.21	466	949.00	95.88		
	505.14	699	1 148.29	92.01		
山梨酸 Sorbic acid	502.82	699	1 143.01	91.59	94.7	1.2
	223.08	111	327.95	94.48		
	223.07	111	326.18	92.90		
	223.12	222	436.52	96.13		
	223.14	222	435.03	95.44		
	224.45	333	538.36	94.27		
	223.42	333	539.59	94.95		

参考文献

- [1] 河南省卫生和计划生育委员会.发酵型蒸制面制品:DBS 41/002—2015[S].河南省卫生和计划生育委员会,2015.
- [2] 中华人民共和国卫生部.中国国家标准化管理委员会.食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [3] 刘志皋,高彦祥.食品添加剂基础[M].北京:中国轻工业出版社,2012:45-46,168-169.
- [4] 苏建国,彭进.UPLC同时测定风味饮料中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸方法研究[J].中国食品添加剂,2011,21(2):243-245.
- [5] 田莉,张仁正,李静峰,等.HPLC法测定熟肉制品中苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的含量[J].中国食品添加剂,2016(10):172-175.
- [6] 田莉,张炯怡,李静峰,等.HPLC法测定凉拌菜中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的含量[J].中国调味品,2016,41(6):132-134.
- [7] 陈青川.软饮料中苯甲酸山梨酸含量的测定及其调查[J].中国公共卫生,2000,16(8):741-742.
- [8] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定:GB 5009.28—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号,不要使用国家已废除了的单位。如面积用hm²(公顷)、m²(平方米),不用亩、尺²等;质量用t(吨)、kg(千克)、mg(毫克),不用再担等;表示浓度的ppm一律改用mg/kg、mg/L或μL/L。