

苯甲酸、山梨酸、水杨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂的 液相色谱方法开发

检测项目：苯甲酸、山梨酸、水杨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂液相色谱方法开发

仪器型号：Ultimate 3000 系列：

LPG-3400SD

WPS 3000SL ANALYTICAL TCC-3000SD

VWD-3400RS

色谱条件：

色谱柱：Acclaim C18 (150 × 2.1mm, 3μm)

流动相：甲醇 (A) -20mmol/L 醋酸铵 (B)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
18	10	90
35	65	35
50	65	35
51	10	90
80	10	90

流速：0.2ml/min

检测波长：0-18min: λ 230nm; 18-50min: λ 248nm。

柱温：30℃

理论板数苯甲酸不低于 2300；山梨酸不低于 3500；水杨酸不低于 3500；对羟基苯甲酸甲酯不低于 130000；对羟基苯甲酸乙酯不低于 180000；对羟基苯甲酸丙酯不低于 150000。

说明

1. 由于对照品采用分析纯试剂，在对羟基苯甲酸酯类的色谱图中存在少许杂质峰干扰，但不影响主峰辨认。
2. 苯甲酸、山梨酸、水杨酸色谱峰有少许拖尾，可能与柱外体积太大有关。
3. 本方法采用波长切换技术，在波长切换时，可导致基线波动，因而波长切换时间点要注意保持与前后色谱峰一定距离。

1 样品前处理方法:

醋、酱油、汽水、果汁、茶饮料等: 各取适量, 置量瓶中, 加适量甲醇摇匀后, 超声 5 分钟, 放冷, 再加甲醇使样品稀释 10 倍, 摇匀, 过微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

注: ① 碳酸饮料要振摇除去二氧化碳后进行取样, 否则会导致取样不准确。

② 酱油, 果汁等样品, 加入甲醇后, 会形成明显的絮状沉淀, 因而需要继续振摇均匀, 并且超声, 防止沉淀吸附所测成分。

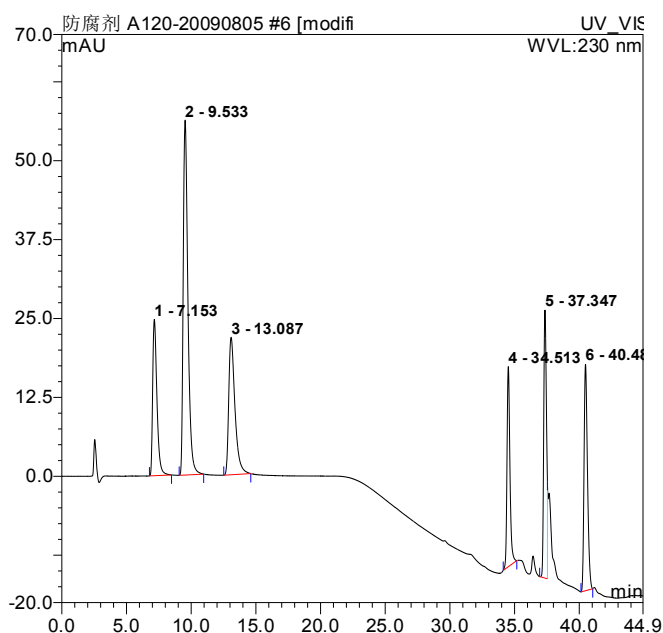
③ 过微孔滤膜应弃去前面适量溶液, 取续滤液测定, 一是防止微孔滤膜中的残留杂质干扰测定; 二是防止微孔滤膜对样品的吸附作用而导致所测成分损失。

2 方法开发:

2.1 检测通道及波长的选择:

Method 1: 采用 VWD-3400RS 双通道 λ 230nm, λ 248nm 分别检测, 图谱分别如下:

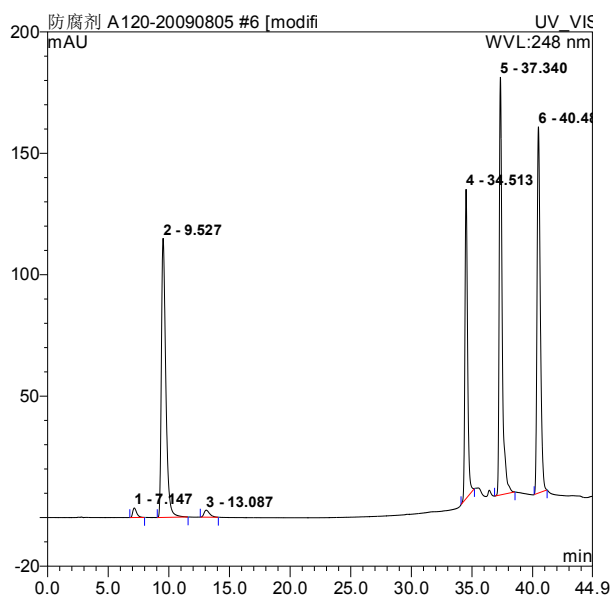
λ 230nm:



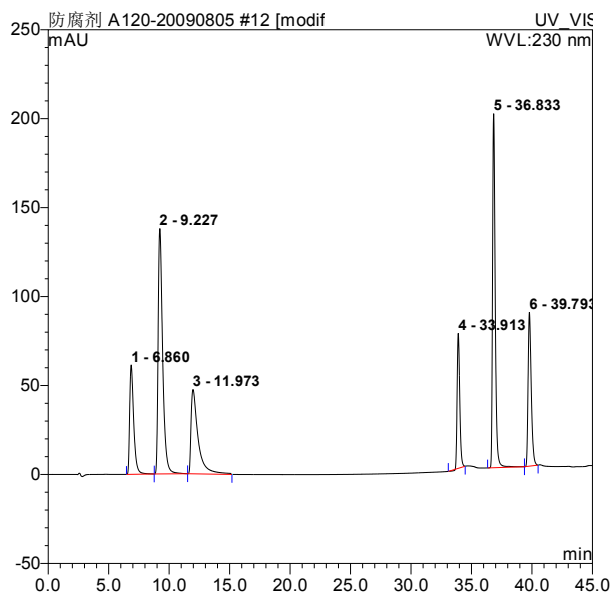
Peak No.: 1: 苯甲酸; 2: 山梨酸; 3: 水杨酸; 4: 对羟基苯甲酸甲酯;

5: 对羟基苯甲酸乙酯; 6: 对羟基苯甲酸丙酯 (下同)

λ 248nm:



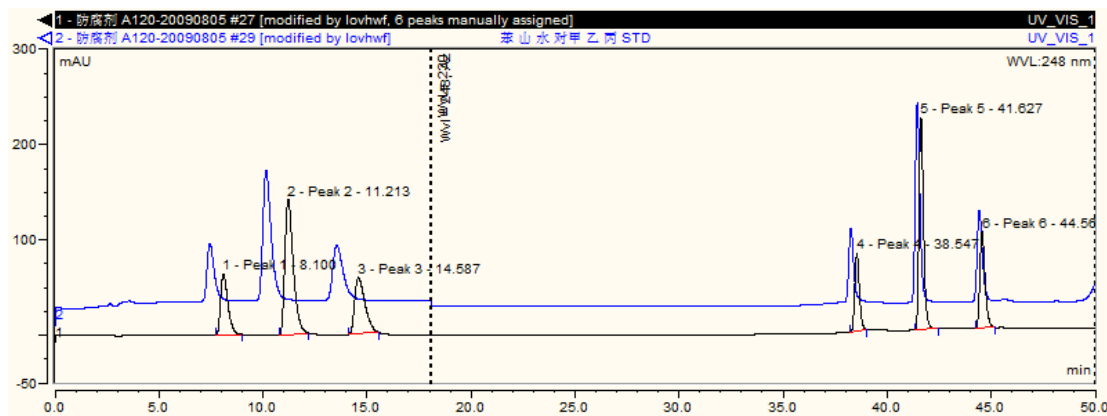
Method 2: 采用 VWD-3400RS 的波长切换技术, 在前 18min 采用 λ 230nm 检测, 在后 32min 采用 λ 248nm 检测, 图谱如下:



注: 根据上述图谱, 如果采用 Method 1 双通道检测, 由于苯甲酸、山梨酸、水杨酸与对羟基苯甲酸酯类的最大吸收不同, 检测灵敏度不同, 因此在处理数据时要分别处理 λ 230nm, λ 248nm 下的数据, 操作繁琐、耗时; 采用 Method 2 单通道波长切换技术, 则可以使苯甲酸、山梨酸、水杨酸和对羟基苯甲酸酯类在一次运行中同时获得较高灵敏度, 在数据处理时减少重复处理操作。

2.2 NH₄OAC 浓度对峰形及分离的影响

分别采用 20mmol/L、50mmol/L NH₄OAC 进行色谱条件的摸索，结果如图：1（黑色）为 20mmol/L NH₄OAC 色谱图，2（蓝色）为 50mmol/L NH₄OAC 色谱图，显示不同的盐浓度在上述色谱条件下对峰形及分离度无明显影响。

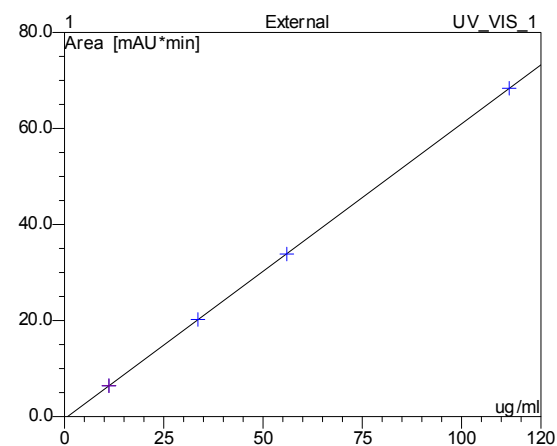


2.3 线性关系及线性图

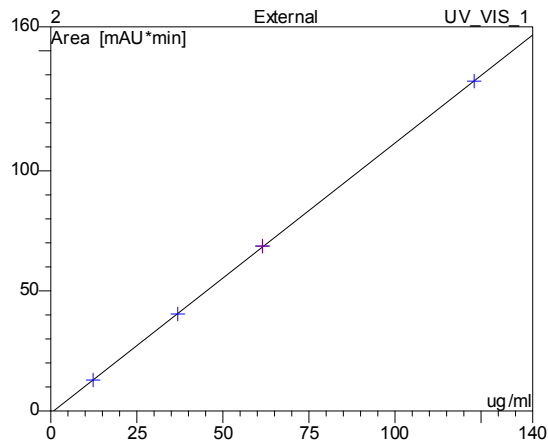
Ret.Time (min)	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. (%)	Offset	Slope	Curve
7.41	1	LOff	4	99.9874	0.1152	0.5959	0.0000
10.10	2	LOff	4	99.9894	-0.2769	1.1078	0.0000
13.06	3	LOff	4	99.9915	-0.1656	0.4873	0.0000
38.16	4	LOff	4	99.9985	-0.4862	0.9192	0.0000
41.39	5	LOff	4	99.9955	-0.2702	0.7899	0.0000
44.41	6	LOff	4	99.9921	0.1281	0.7725	0.0000

注：Peak Name: 1: 苯甲酸; 2: 山梨酸; 3: 水杨酸; 4: 对羟基苯甲酸甲酯; 5: 对羟基苯甲酸乙酯; 6: 对羟基苯甲酸丙酯

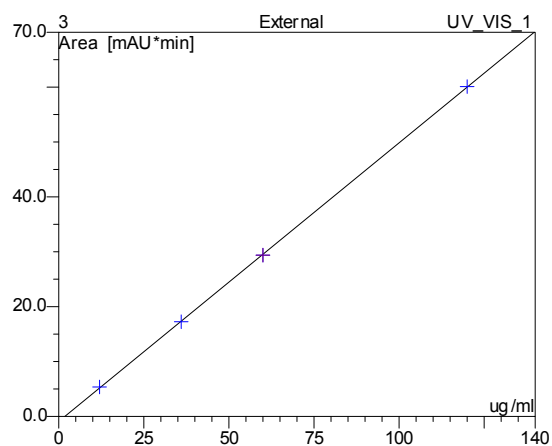
苯甲酸:



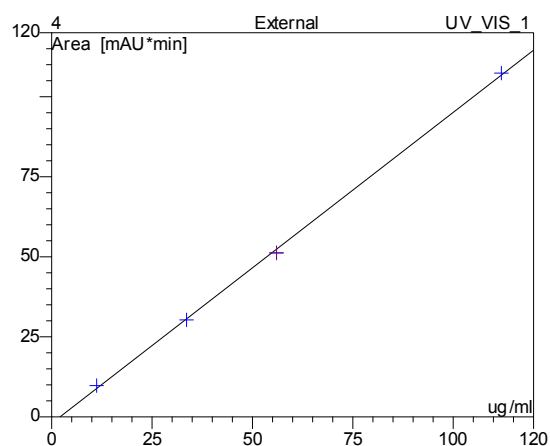
山梨酸:



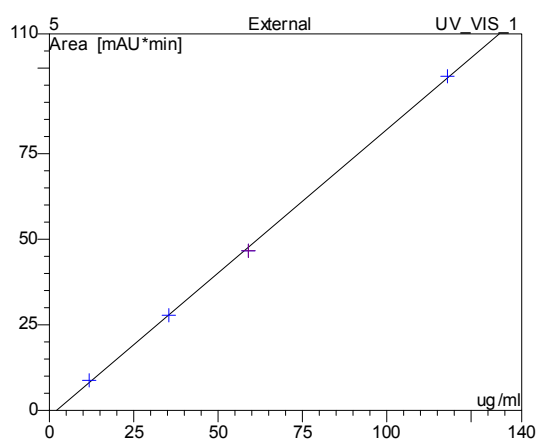
水杨酸:



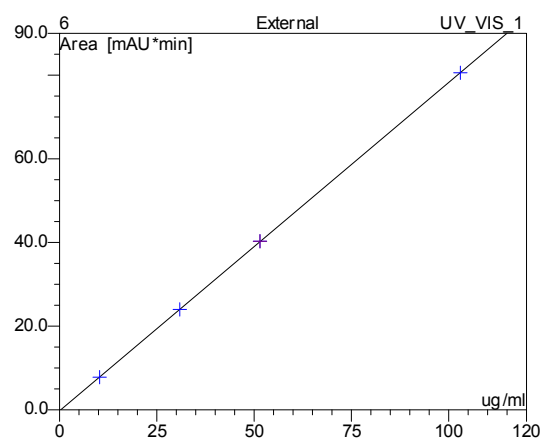
对羟基苯甲酸甲酯:



对羟基苯甲酸乙酯:

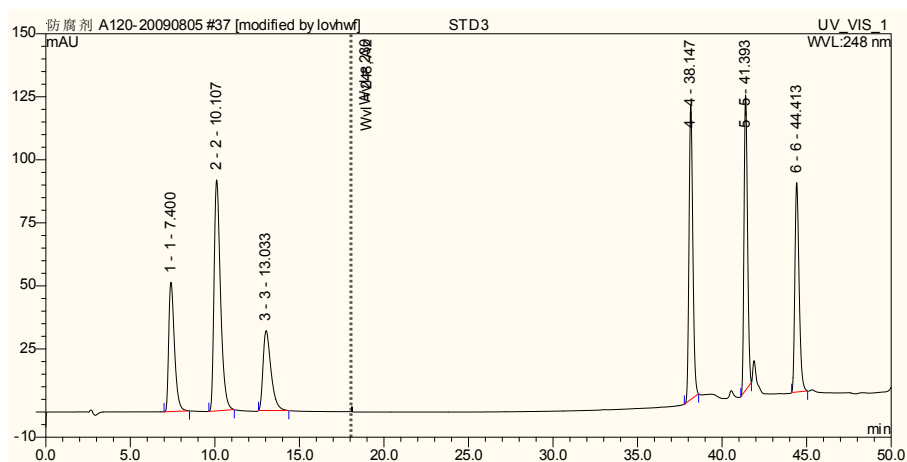


对羟基苯甲酸丙酯:

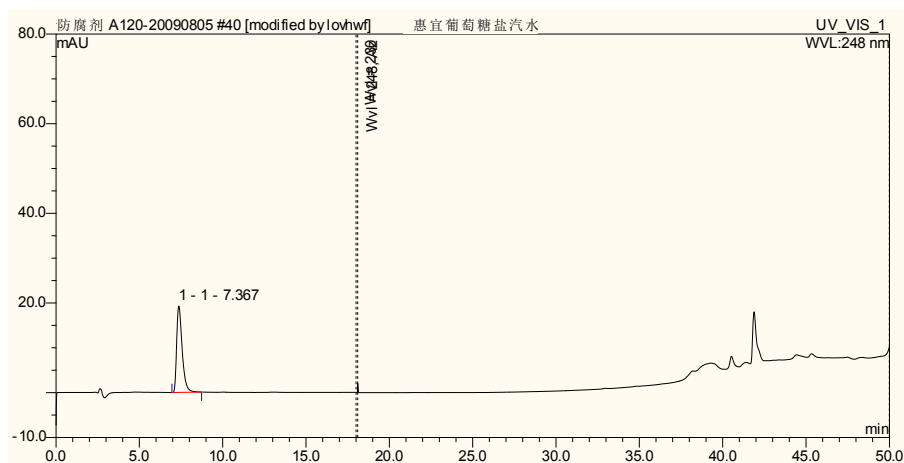


3 标准及样品分离图谱

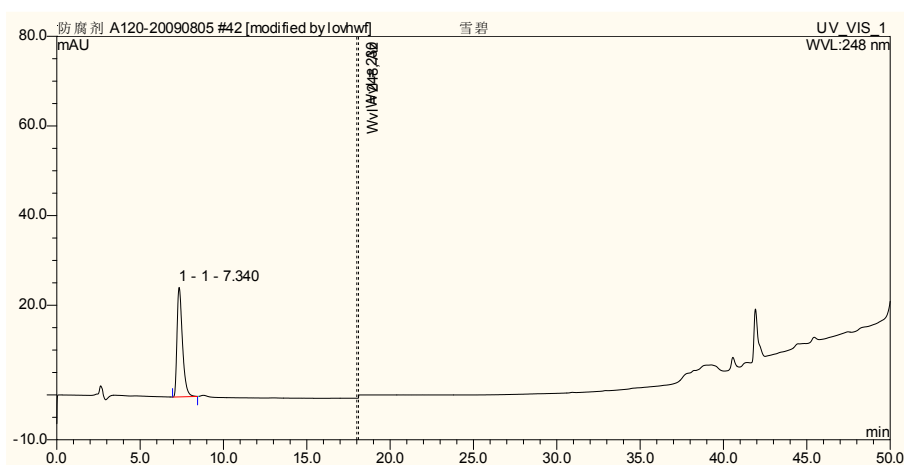
标准图谱: 1



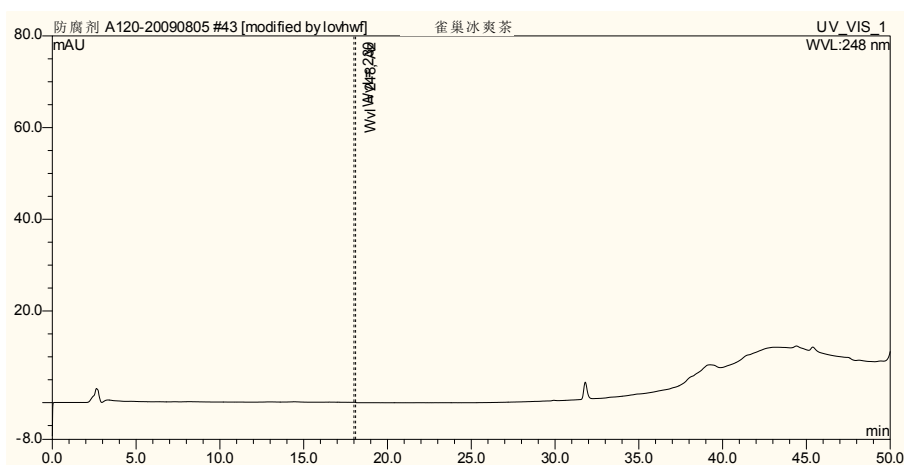
惠宜葡萄糖盐汽水:



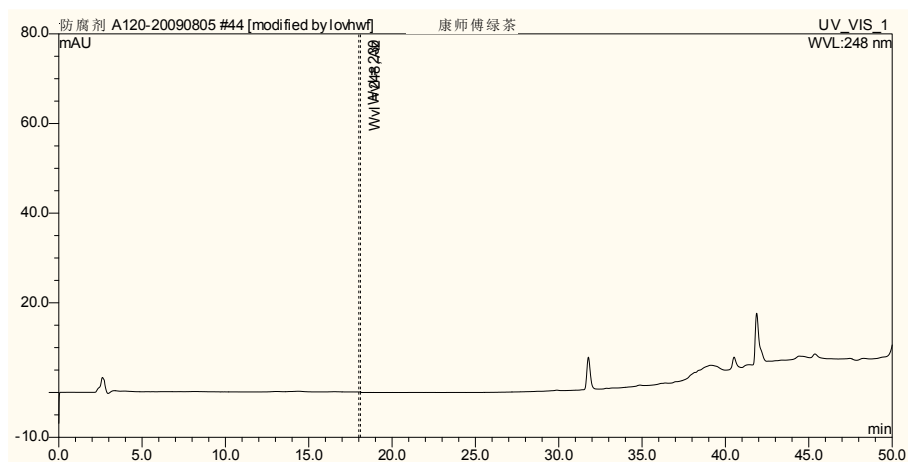
雪碧:



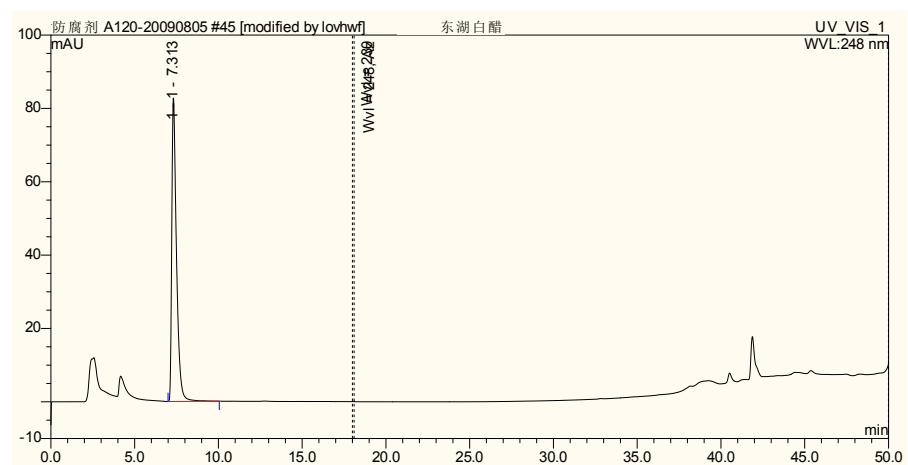
雀巢冰爽茶:



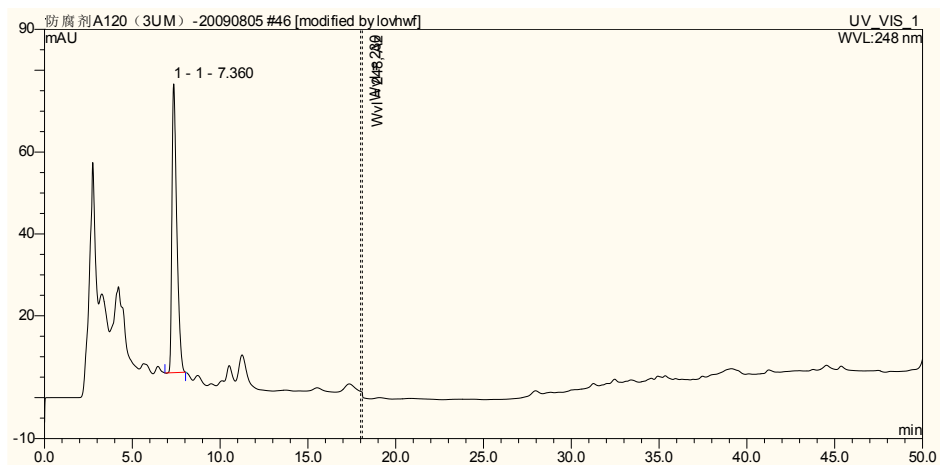
康师傅绿茶:



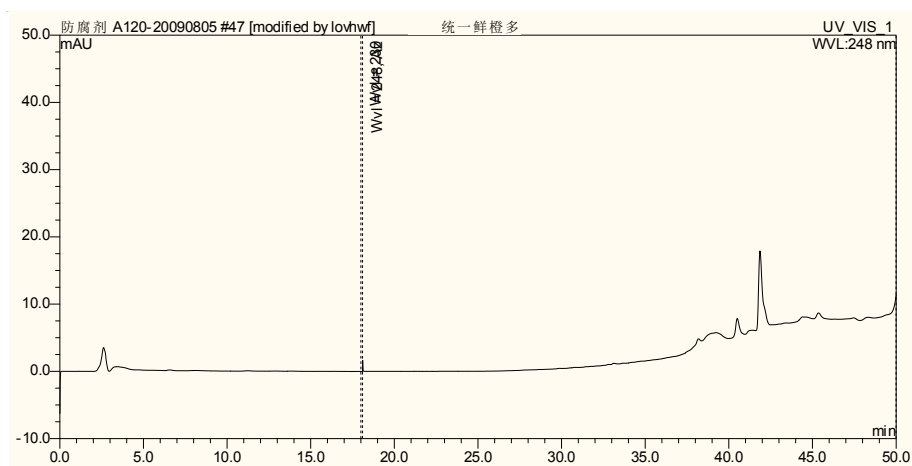
东湖白醋:



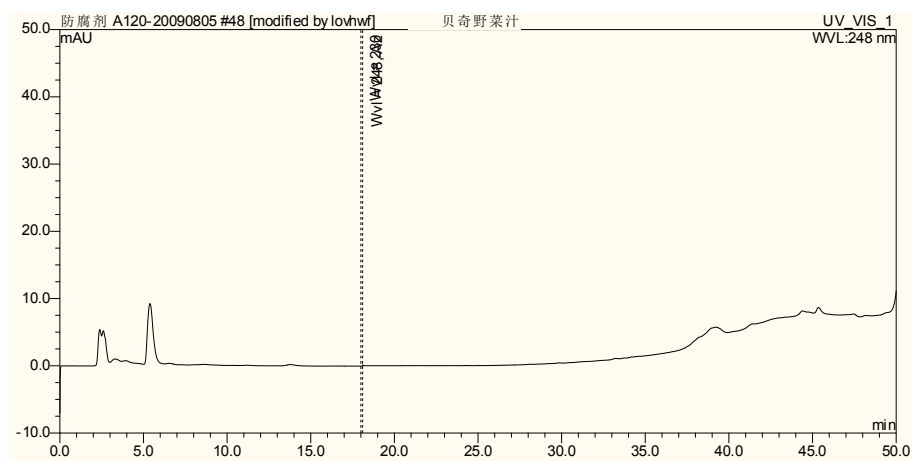
东湖老陈醋:



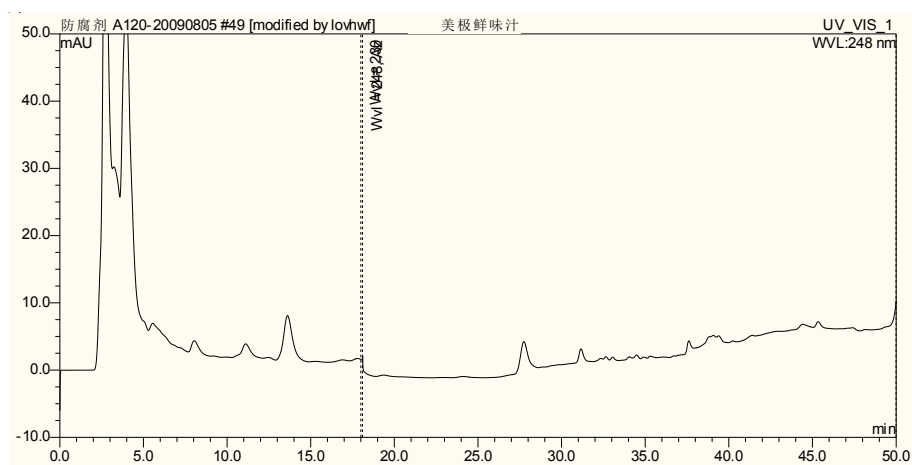
统一鲜橙多:



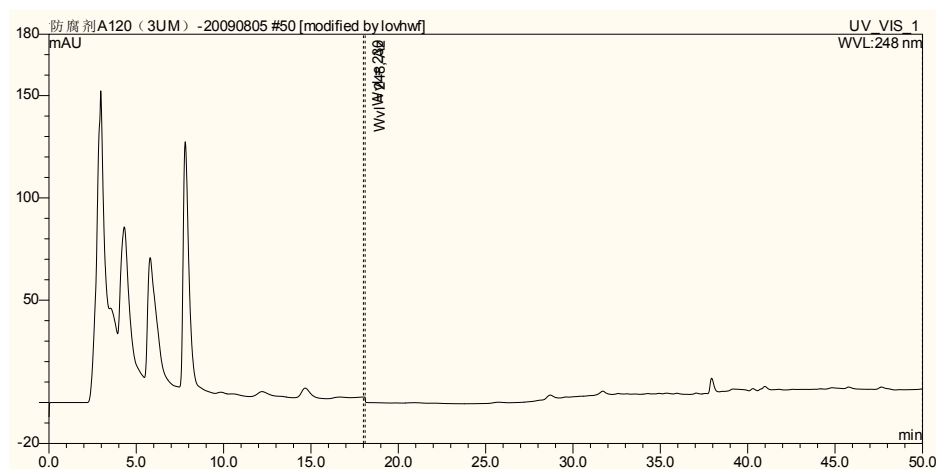
贝奇野菜汁:



美极鲜味汁:

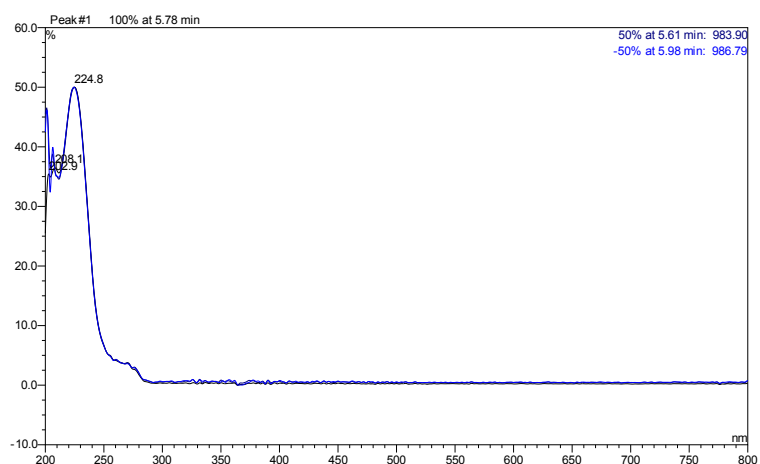


美富达酱油:

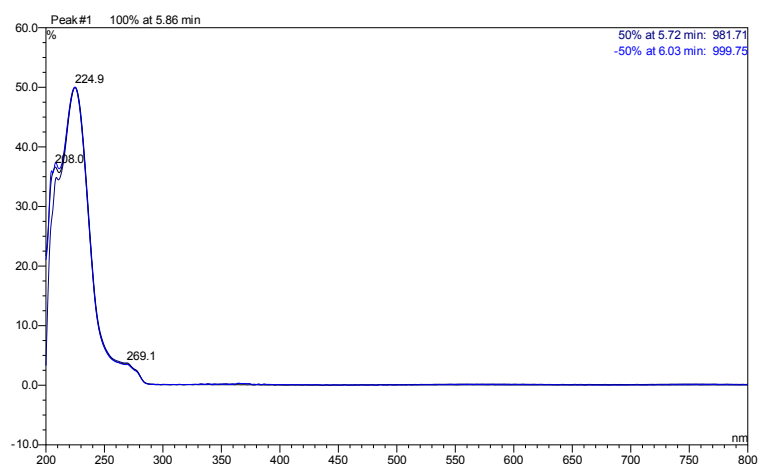


注: 在东湖白醋、东湖老陈醋以及美富达酱油中杂质干扰较多, 对测定的苯甲酸成分进行了 PDA 确证。结果显示样品中苯甲酸峰光谱与苯甲酸峰光谱基本一致, 光谱如下:

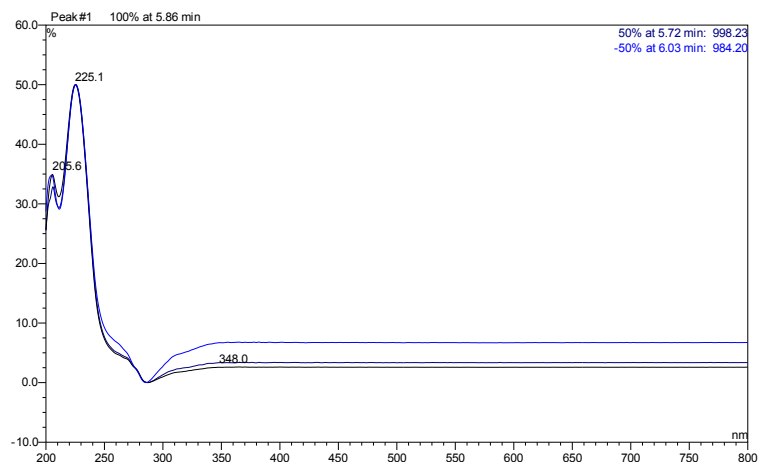
苯甲酸光谱:



东湖白醋中对应苯甲酸峰光谱:



东湖老陈醋对应苯甲酸峰光谱:



4 结果与分析

4.1 样品测定结果

样品 \ 成分	苯甲酸 ug/ml	山梨酸 ug/ml	水杨酸 ug/ml	对羟基苯甲酸 甲酯 ug/ml	对羟基苯甲酸 乙酯 ug/ml	对羟基苯甲酸 丙酯 ug/ml
惠宜葡萄糖盐汽水	122.22	-	-	-	-	-
雪碧	152.80	-	-	-	-	-
雀巢冰爽茶	-	-	-	-	-	-
康师傅绿茶	-	-	-	-	-	-
东湖白醋	452.10	-	-	-	-	-
东湖老陈醋	398.12	-	-	-	-	-
统一鲜橙多	-	-	-	-	-	-
贝奇野菜汁	-	-	-	-	-	-
美极鲜味汁	-	-	-	-	-	-
美富达酱油	-	-	-	-	-	-

注 1: 结果分析:

在已分析的样品中, 果汁、茶饮料等, 未检出上述六种防腐剂; 在汽水、醋中均检出较高浓度的苯甲酸。

对于酱油等颜色较深的样品, 由于苯甲酸、山梨酸以及水杨酸出峰较快, 可能存在干扰, 准确定量需要一定的前处理方法摸索。

上述已检出防腐剂均符合国标 GB 2760-2014 食品添加剂使用卫生标准的要求。

4.2 加标回收率

加标样品处理: 各类型样品各取 1 种进行试验, 分别吸取样品溶液 2.5 ml, 加入对照溶液 1 ml(含苯甲酸 0.462 mg, 山梨酸 0.544 mg, 水杨酸 0.406 mg, 对羟基苯甲酸甲酯 0.454 mg, 对羟基苯甲酸乙酯 0.420 mg, 对羟基苯甲酸丙酯 0.410 mg), 再加适量甲醇, 置 50 ml 量瓶中, 摇匀, 超声 5 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

		样品中量 (mg)	加入量 (mg)	加标样品浓度 (ug/ml)	加标样品总 量 (mg)	回收率 (%)
雪碧	苯甲酸	0.382	0.462	16.8394	0.842	99.57
	山梨酸	0	0.544	10.7933	0.540	99.26
	水杨酸	0	0.406	8.0156	0.401	98.77
	对羟基苯甲酸甲酯	0	0.454	8.9383	0.447	98.46
	对羟基苯甲酸乙酯	0	0.420	8.4027	0.420	100.00
	对羟基苯甲酸丙酯	0	0.410	8.2422	0.412	100.49
雀巢冰爽茶	苯甲酸	0	0.462	9.0734	0.454	98.27
	山梨酸	0	0.544	10.6761	0.534	98.16
	水杨酸	0	0.406	7.9193	0.396	97.54
	对羟基苯甲酸甲酯	0	0.454	8.7637	0.438	96.48
	对羟基苯甲酸乙酯	0	0.420	8.2650	0.413	98.33
	对羟基苯甲酸丙酯	0	0.410	8.1746	0.409	99.76
统一鲜橙多	苯甲酸	0	0.462	9.0563	0.453	98.05
	山梨酸	0	0.544	10.6271	0.531	97.61
	水杨酸	0	0.406	7.9016	0.395	97.29
	对羟基苯甲酸甲酯	0	0.454	8.8284	0.441	97.14
	对羟基苯甲酸乙酯	0	0.420	8.2846	0.414	98.57
	对羟基苯甲酸丙酯	0	0.410	8.1823	0.409	99.76
东湖老陈醋	苯甲酸	0.995	0.462	30.0349	1.502	109.74
	山梨酸	0	0.544	11.4435	0.572	105.15
	水杨酸	0	0.406	8.1367	0.407	100.25
	对羟基苯甲酸甲酯	0	0.454	8.8229	0.441	97.14
	对羟基苯甲酸乙酯	0	0.420	8.3116	0.415	98.81
	对羟基苯甲酸丙酯	0	0.410	8.4068	0.420	102.44
美极鲜味汁	苯甲酸	0	0.462	9.0126	0.451	97.62
	山梨酸	0	0.544	10.5521	0.528	97.06
	水杨酸	0	0.406	7.4780	0.374	92.12
	对羟基苯甲酸甲酯	0	0.454	8.8354	0.442	97.36
	对羟基苯甲酸乙酯	0	0.420	8.1180	0.406	96.67
	对羟基苯甲酸丙酯	0	0.410	7.9788	0.399	97.32

注 2: 方法分析:

本方法分析苯甲酸等, 参考了 GB 5009.28-2016 中的测定条件。由于对羟基苯甲酸酯类防腐剂在 GB 2760-2014 规定也可用于食品, 因而本方法在等度分析苯甲酸后, 加入了梯度方法分析该类防腐剂。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com