

液相色谱法测定葡萄酒中苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜

姚秀娟, 王志强

摘要: [目的] 建立同时测定葡萄酒中苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜的高效液相色谱方法。[方法] 样品经水浴加热除去乙醇, 调节 pH 至中性, 过滤定容后, 进液相色谱仪检测, 以保留时间定性, 峰面积定量。[结果] 该方法能同时分离苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜, 且分离效果良好, 方法检测限分别为: 山梨酸 1.6 mg/kg、苯甲酸 2.0 mg/kg、糖精钠 2.0 mg/kg、安赛蜜 2.5 mg/kg。在 1.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈线性关系, 相关系数均 >0.999 , 相对标准偏差为 1.6%~3.4% ($n=6$), 加标回收率为 92.0%~108.6%。[结论] 该方法灵敏、简便、快速、准确, 重复性好, 适合于葡萄酒中山梨酸、苯甲酸、糖精钠、安赛蜜的同时测定。

关键词: 高效液相色谱; 葡萄酒; 苯甲酸; 山梨酸; 糖精钠; 安赛蜜

Determination of Benzoic Acid, Sorbic Acid, Saccharin Sodium, and Acesulfame in Wine by Liquid Chromatography YAO Xiu-juan, WANG Zhi-qiang (Department of Physical and Chemical Test, Anyang Center for Disease Control and Prevention, Henan 455000, China) · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a simultaneous multi-agent measurement method by high performance liquid chromatography to determine benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium, and acesulfame in wine. [Methods] Samples were heated by water bath to remove ethanol, adjusted pH to 7.0, and filtered to perform liquid chromatography, using retention time for qualification and peak area for quantification. [Results] Effective simultaneous separation was achieved of benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium, and acesulfame. The method's detection limits were 1.6 mg/kg for sorbic acid, 2.0 mg/kg for benzoic acid, 2.0 mg/kg for saccharin sodium, and 2.5 mg/kg for acesulfame. A good linearity was found within 1.0-50.0 $\mu\text{g/mL}$, with correlation coefficient >0.999 , relative standard deviation of 1.6%-3.4% ($n=6$), and recovery rate of 92.0%-108.6%. [Conclusion] The sensitive, simple, rapid, accurate, and reproducible method is suitable for the determination of sorbic acid, benzoic acid, saccharin sodium, and acesulfame in wine simultaneously.

Key Words: high performance liquid chromatography; wine; benzoic acid; sorbic acid; saccharin sodium; acesulfame

苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜作为传统的防腐剂和甜味剂被广泛应用于各种食品的生产加工过程中, 在增加食品的口感, 延长食品保质期上有一定作用。《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[1]严格规定了防腐剂的种类、质量标准和添加剂量, 但违规或违法乱用、滥用食品防腐剂的现象却十分严重。过量食用防腐剂会对人身体产生一定的毒性^[2], 短时间大量使用甜味剂会引起血小板减少导致急性大出血, 引起恶性事件。开展对葡萄酒中防腐剂和甜味剂的检测非常重要。为满足工作需要, 本文在国家

标准方法^[3-5]以及文献^[6-8]基础上建立了同时测定葡萄酒中苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜的液相色谱方法, 且操作简便, 结果满意, 适合于大批量的日常检测需要。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 配自动进样器 SIL-20AT, 光电二极管阵列检测器 SPD-20MA); 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司, KQ-500B 型); PHS-3C 酸度计(上海精科仪器有限公司); Arium611 超纯水机(德国赛多利斯集团)。

1.2 试剂

苯甲酸[产品编号: GBW(E)100006]、山梨酸[产品编号: GBW(E)100007]、糖精钠[产品编号: GBW(E)100008]、安赛蜜[产品编号: GBW(E)

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14415

[作者简介] 姚秀娟(1982—), 女, 学士, 主管技师; 研究方向: 食品、水质、地方病、职业病危害的理化实验; E-mail: ayyaoxiujuanw@163.com

[作者单位] 安阳市疾病预防控制中心理化检验科, 河南 455000

100214]标准溶液浓度均为1.00 mg/mL(国家标准物质研究中心); 甲醇: 色谱纯, 纯度>99%; 氨水(洛阳市化学试剂厂, AR级); 醋酸铵(天津市大茂化学试剂厂, AR级); 实验用水为超纯水(过0.45 μm滤膜)。

1.3 样品前处理

称取样品2.0 g于25 mL比色管中, 加适量水, 水浴温热除去乙醇, 用氨水调节至中性, 加水定容至10.0 mL后, 过0.45 μm滤膜后测定。

1.4 测定方法

1.4.1 色谱分析条件 色谱柱: Inertsustain C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇+0.02 mol/L醋酸铵溶液(5+95); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 230 nm; 检测器: 光电二极管阵列检测器。以保留时间定性, 峰面积定量。

1.4.2 标准曲线 分别取各标准溶液10.0 mL于100 mL容量瓶中, 定容至刻度, 配制成100.0 μg/mL苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜4种混合标准储备液。逐级稀释该标准储备液, 配置成浓度为1.0、5.0、10.0、20.0、30.0、50.0 μg/mL苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜混合标准系列, 各进样量20 μL, 分别以峰面积对其质量浓度进行线性回归分析。

1.4.3 样品测量 分别按1.3样品前处理方法处理样品, 按照色谱分析条件, 进样20 μL, 在高效液相色谱仪上测定。

2 结果

2.1 水浴温度及时间的选择

根据实验要求, 水浴温度-时间分别选择90℃-10 min、80℃-15 min、70℃-15 min、70℃-10 min。结果发现, 水浴温度与时间成反比, 对实验结果影响不大, 只要除去乙醇干扰即可, 本实验选择70℃-15 min。

2.2 氨水浓度的影响

在国家标准^[3-4]中, 氨水浓度为(1+1), 实验表明此浓度偏大, 有的样品加1~2滴就能使样品pH达到10, 此时还需用醋酸进行回调。本实验选择20%~30%氨水浓度, 加入3~5滴, 可使样品近中性。

2.3 柱温的选择

选择柱温20℃、30℃、35℃、40℃进行试验, 发现柱温过低时, 出峰时间延长, 且当环境温度高于此温度时, 仪器停止运行, 等待降温。当温度过高时, 影响色谱柱使用寿命。综合考虑, 选择柱温30℃能取得较为满意的分离效果和较好的灵敏度。

2.4 色谱分离效果

本法选用的色谱条件可以同时快速分离安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠, 整个色谱分离需21 min, 出峰顺序分别为安赛蜜(9.070 min)、苯甲酸(10.694 min)、山梨酸(14.933 min)、糖精钠(20.887 min)。混合标准色谱图见图1。对某葡萄酒经处理后测定, 其色谱图见图2。

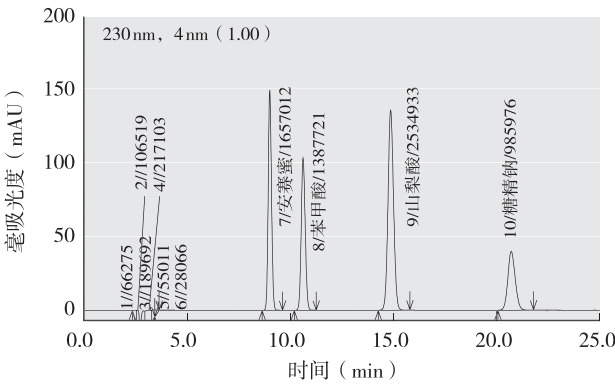


图1 混合标准色谱图

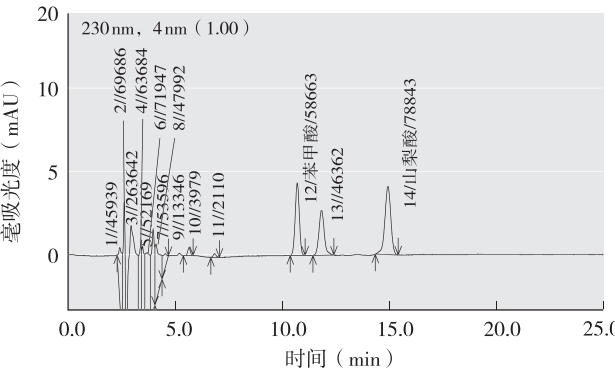


图2 某葡萄酒色谱图

2.5 干扰试验

取同一样品的3份平行样, 其中一份按1.3样品前处理方法处理(样品1), 一份过中性氧化铝柱除去葡萄酒中的有机酸、维生素、色素等干扰(样品2), 一份加100.0 μg/mL混标0.1 mL并同时过中性氧化铝柱(样品3), 分别进行测定。在本实验条件下, 样品中除去有机酸、维生素、色素等干扰物与未除去时结果一致, 葡萄酒中有机酸、维生素、色素等不影响安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠的测定。见表1。

表1 干扰试验结果比较

组分	样品1 (mg/kg)	样品2 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	样品3 (mg/kg)	回收率 (%)
安赛蜜	3.0	2.9	5.0	8.1	102.5
苯甲酸	未检出	未检出	5.0	4.9	98.0
山梨酸	未检出	未检出	5.0	5.1	102.0
糖精钠	2.1	2.1	5.0	6.9	97.2

2.6 线性范围与检出限

将1.4.2所配标准系列进行测定,分别绘制峰面积-含量标准曲线。在本实验条件下,4种添加剂在1.0~50.0 µg/mL范围内,浓度与峰面积成正比,相关系数 $r>0.9995$ 。以仪器基线3倍噪声相当的量为最低检出浓度,以取样2.0 g,定容至10.0 mL,进样量为20.0 µL计,上述4种添加剂的检出限结果见表2。

表2 标准曲线方程和最小检出限

组分	线性回归方程	相关系数 r	最小检出限(mg/kg)
苯甲酸	$\hat{y}=2.93 \times 10^{-4}x+0.15$	0.9998	2.0
山梨酸	$\hat{y}=9.80 \times 10^{-6}x+6.06 \times 10^{-2}$	0.9998	1.6
糖精钠	$\hat{y}=3.40 \times 10^{-4}x+0.49$	0.9996	2.0
安赛蜜	$\hat{y}=9.59 \times 10^{-5}x+3.03 \times 10^{-2}$	0.9995	2.5

2.7 方法精密度与准确度

取2份样品各10.0 mL,分别加入混标100.0 µL、10.0 µL,配成高、低两组样品,然后按1.3样品前处理方法处理样品,对每个样品连续测量6次,测得其回收率在92.0%~108.6%之间,相对标准偏差(RSD)在1.6%~3.4%($n=6$)之间,结果符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》方法确认的技术要求^[9]。见表3。

表3 不同样品准确度与精密度试验结果($n=6$)

样品名	组分名	本底值 (mg/kg)	加标值 (mg/kg)	实测值 ($\bar{x} \pm s$, mg/kg)	RSD (%)	回收率 (%)
葡萄酒1	苯甲酸	未检出	0.5	0.5 ± 0.1	2.1	98.0~102.0
	山梨酸	未检出	0.5	0.5 ± 0.2	1.6	96.0~104.0
	糖精钠	2.1	0.5	2.5 ± 0.1	2.5	92.3~100.0
	安赛蜜	3.0	0.5	3.6 ± 0.2	3.4	97.1~108.6
葡萄酒2	苯甲酸	未检出	5.0	4.9 ± 0.2	1.8	94.0~102.0
	山梨酸	2.9	5.0	8.0 ± 0.2	2.4	98.7~103.8
	糖精钠	未检出	5.0	4.9 ± 0.3	1.6	92.0~104.0
	安赛蜜	未检出	5.0	5.1 ± 0.3	2.6	96.0~108.0

3 讨论

近年来,人们对食品的安全性日益关注,食品中常用的添加剂特别是防腐剂(苯甲酸、山梨酸)和甜味剂(糖精钠、安赛蜜)的使用情况尤其引人注目。这些添加剂对人体有一定的毒副作用,在我国对这些添加剂的使用范围和最大使用限量均有严格的规定。

本文对常见的葡萄酒中苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜的高效液相色谱法测定做了相应研究,重点考察了水浴温度及时间的选择、氨水浓度、柱温对实验结果的影响,同时分析了葡萄酒中有机酸、维生素、色

素等对苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜测定的影响。

本实验结果表明,样品经去除乙醇,调pH至中性,过滤等处理后,用甲醇/醋酸铵0.02 mol/L(5+95)作流动相,以Inertsustain C18柱分离,检测波长为230 nm,光电二极管阵列检测器,高效液相色谱法同时检测葡萄酒中的苯甲酸、山梨酸、糖精钠、安赛蜜,该方法简便、准确、灵敏,在工作中有较强的实用性,可用于批量检测。

本方法与国标法相比较,具有以下优点:(1)快速。能一次同时对四个检测项目进行分析,大大节省了分析时间。(2)简便。样品只需要除乙醇、调pH值、过滤等处理后可以直接上机检测,前处理步骤简单。(3)实用。国家食品安全风险监测每年需要检验大批样品,应用本方法特别是自动进样器的使用,可以大大节省人力。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1]中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [2]黎源倩.食品理化检验[M].北京:人民卫生出版社,2013.
- [3]中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.28—2003 食品中糖精钠的测定[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [4]中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.29—2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [5]中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.140—2003 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [6]陈海红,王益萍,沈仁富,等.超声提取-高效液相色谱法测定豆制品中的苯甲酸、山梨酸和糖精钠[J].中国卫生检验杂志,2010,20(11):2734-2735.
- [7]曹云,杨海昕,张前龙. HPLC法同时测定食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠和安赛蜜的研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2443-2445.
- [8]陈海燕,俞幸幸,李平.高效液相色谱法同时测定黄酒中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠[J].中国卫生检验杂志,2012,22(08):1777-1778.
- [9]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].北京:中国标准出版社,2008.

(收稿日期:2014-06-13)

(英文编辑:汪源;编辑:张晶;校对:郑轻舟)