

气相色谱法同时快速测定食品中丙酸、山梨酸、苯甲酸及脱氢乙酸

高海军¹, 范自营¹, 张红云¹, 高敬铭¹, 郭静²

(1. 河南省粮油饲料产品质量监督检验中心, 河南 郑州 450008;

2. 中储粮油脂(新郑)有限公司, 河南 新郑 451100)

摘要:通过液液萃取净化样品研究,建立了食品中丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸及其盐含量气相色谱同时快速测定方法,适用于固体非酯(脂)类食品的检测。结果表明:丙酸的回收率在85.1%~91.3%之间,其余3种防腐剂的回收率均在95.2%~99.4%之间;实验室内变异系数(CV, n=6)最大值≤4.7%,4种防腐剂检出限均在0.002 g/kg以下。4种目标物在有杂质干扰时,可用不同的极性毛细管柱做进一步的确认。本方法具有适用范围广、检测效率高、重现性好、准确度高、检出限低的特点,推广应用对我国食品安全的监督检验具有重要的意义。

关键词:食品;检测;丙酸;山梨酸;苯甲酸;脱氢乙酸

中图分类号:TS 207.3 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2017)05-0047-05

Simultaneous and rapid determination of propionic acid, sorbic acid, benzoic acid and dehydroacetic acid in food by gas chromatography

GAO Hai-jun¹, FAN Zi-ying¹, ZHANG Hong-yun¹, GAO Jing-ming¹, GUO Jing²

(1. Henan Cereal, Oil & Feed Products Quality Supervision and Inspection Station, Zhengzhou Henan 450008;

2. Sinograin Oils (Xinzheng) Co., Ltd, Xinzheng Henan 451100)

Abstract: The method of simultaneous and rapid determination of propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid and their corresponding salt content in food by gas chromatography was established by liquid-liquid extraction purification, which was applicable to the detection of solid non ester kind food. The result showed that the recovery rate of propionic acid was 85.1% ~ 91.3%, the average recovery of the other three kinds of preservatives was 95.2% ~ 99.4%; the maximum coefficients of variation (CV, n = 6) in laboratory were less than or equal to 4.7%; the detection limit of the four kinds of preservatives were all below 0.002 g/kg. With the interference of impurity, they can be further confirmed by different polar capillary column. The method has the advantages of wide application range, high detection efficiency, good reproducibility, high accuracy and low detection limit, and the application is of great significance for the supervision and inspection of food safety in China.

Key words: food; determination; propionic acid; sorbic acid; benzoic acid; dehydroacetic acid

防腐剂是防止食品腐败变质、延长食品储存期的一类物质^[1],是食品常用的添加剂类别之一。据调查有标注添加防腐剂的食品样本占总样本的52.36%,标注添加山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、丙酸及其盐的样本占标注添加防腐剂食品样本的74.29%,排名分别为第一、第二、第四和第七位,说明上述4种物质是我国食品防腐剂中主要添加的品种^[2]。大量的研究结果表明上述4种防腐剂比较

安全,但过量使用仍会对人体产生一定的伤害;在一定程度上抑制骨骼生长,危害肾、肝脏的健康,导致体重下降、腹泻以及胃黏膜永久性损伤等^[3-6]。各国对其在食品中的含量都有严格的规定^[7],在我国现行的食品安全国家标准(GB 2760—2014 食品添加剂使用标准)中对上述4种防腐剂在食品中的含量也有明确规定,属限制使用含量的食品添加剂;一些食品生产厂家和手工作坊往往为延长食品保质期,过量使用这4种防腐剂;据本中心在2015年的一次市场食品样本抽检发现,4种防腐剂的总超标

收稿日期:2017-02-16

作者简介:高海军,1980年出生,男,硕士研究生,工程师/高级技师。

率在6%左右,甚至在一部分未标注上述4种防腐剂的食品中也有检出。因此,4种防腐剂的检测是食品安全监管必不可少的检测项目。

目前检测食品中丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸及其盐的国标方法主要有气相色谱法、液相色谱法以及薄层色谱法,仅仅山梨酸、苯甲酸可以同时检测。若使用国标方法检测上述4种物质至少需要3种方法进行检测^[8-12]。另外,由于食品基质复杂,大部分方法的前处理过于复杂,造成检测效率低下、费时费力。近几年,多种防腐剂同时检测的方法已有不少^[13-17]。随着质谱联用仪器的推广,也出现了气相色谱质谱联用法和液相色谱质谱联用法^[18-19]。但这些方法都局限于某种具体的食品,适用性差。且大部分方法的前处理仿照国标方法,虽然净化效果较好,但存在前处理复杂、试剂消耗量大、不利于环保、检测效率低、重复性、回收率、检出限都很难保证等问题^[20-21]。给含这4种防腐剂食品的安全监督检查工作增加了很大难度。急需建立一个适用范围广、效率高且重现性和检出限都符合要求的检测方法。

本实验研究建立一次处理即可同时检测这4种防腐剂的方法。该方法具有适用范围广、效率高、重现性好、检出限低等特点,而且4种防腐剂在有杂质干扰时,可用不同的极性毛细管柱做进一步的确认。对我国食品安全的监督检查和对添加一种或多种上述4种防腐剂的食品生产质量监控有着很大的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

风味小食品,酱菜,豆制品等。

1.1.2 标准物质

丙酸(色谱纯,≥99.5%):天津市博迪化工有限公司;山梨酸(99.0%±1%):国家标准物质研究中心;苯甲酸(99.95%~100.05%):上海同济微量元素研究所;脱氢乙酸(98%):Alfa Aesar公司。

1.1.3 试剂

所用试剂无特殊说明外,均为分析纯;水为实验室用三级水。石油醚(沸程60~90℃)、乙醚,均需重蒸馏;碳酸氢钠,氯化钠,盐酸。

1.1.4 仪器与设备

Agilent 7890A 气相色谱仪:美国 Agilent 公司;TGL-20B 高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;MTV-100 多管涡旋混合仪:北京优晟联合科技有

限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

10 g/L 碳酸氢钠水溶液:称取 10.00 g 碳酸氢钠,用水溶解后定容至 1 000 mL。

石油醚—乙醚混合溶液:3 体积的石油醚和 1 体积的乙醚混合均匀。

盐酸溶液:将 100 mL 盐酸加入到 100 mL 蒸馏水中,混合均匀。

标准混合储备液:准确称取丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸标准物质各 0.100 0 g,溶于 100 mL 容量瓶中,用石油醚—乙醚混合溶液溶解定容至刻度,该溶液每毫升相当于 1 mg 上述各标准物质。

标准混合使用液:分别移取上述标准混合储备液 1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 mL,用石油醚—乙醚混合溶液分别稀释定容至 50 mL,每毫升含上述各标准物质分别为 20、40、80、160、320 μg。

所有不同浓度标准溶液均保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 样品前处理方法

取适量食品样品,用组织捣碎机或小型电动研磨机磨碎后,贮存于广口瓶中冷藏备用。

准确称取磨碎的食品样品 2~3 g 于 50 mL 离心管中,加入 25 mL 10 g/L 碳酸氢钠水溶液,摇匀浸泡 3 min,加入 15 mL 石油醚—乙醚混合溶液,涡旋或剧烈振摇 1 min,静置分层(若乳化可离心分层),弃去上层溶液,若干扰物较多,可再次加入 10 mL 石油醚—乙醚混合溶液重复上述步骤,直至无明显干扰物;将下层溶液置于 50℃ 水浴中挥发至无明显气味,向离心管中加入 1.0 mL 盐酸溶液,轻轻振摇至无明显气泡后加入适量氯化钠,振荡溶解至饱和,准确加入 10 mL 石油醚—乙醚混合溶液,剧烈振摇 1 min,静置分层(若乳化可离心分层),上层溶液即为待测液。

1.2.3 色谱条件

氢火焰离子化检测器(FID),温度:240℃;分流/不分流进样口,温度:230℃;载气:高纯氮气(≥99.999%),恒流模式进样,流量:5 mL/min;进样量:1.0 μL,分流比 3:1。

DB-FFAP 色谱柱(30 m×530 μm×0.50 μm),柱温箱条件:初始温度 100℃,保持 1 min,以 20℃/min 升至 140℃,30℃/min 升至 170℃,10℃/min 升至 190℃,40℃/min 升至 230℃,保持 3 min。

DB-608 验证柱(30 m×530 μm×0.83 μm),

柱温箱条件:初始温度 60 ℃,保持 1 min,以 10 ℃/min 升至 80 ℃,30 ℃/min 升至 140 ℃,10 ℃/min 升至 170 ℃,30 ℃/min 升至 230 ℃,保持 3 min。

1.2.4 测定

将 1 μL 标准系列中各浓度标准使用液注入气相色谱分析,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。同样分析样品测试液,与标准曲线比较进行定量。

1.2.5 结果计算

样品中的上述 4 种防腐剂含量分别以丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸计,按式(1)进行计算:

$$X = \frac{C \times V}{M \times 1000} \quad (1)$$

式中: X —样品中防腐剂含量, g/kg; C —样品测试液中各防腐剂浓度, μg/mL; V —测试提取液体积, mL; M —试样质量, g。

若测定结果以丙酸钠(钙)、山梨酸钾(钠)、苯甲酸钠(钾)、脱氢乙酸钠等计时,则测得的酸含量乘以换算系数即可得对应盐的含量;换算系数为测定目标物盐的分子量除以相应酸的分子量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择和优化

在色谱条件的选择中,最重要的是选择合适的色谱柱,然后再做其它测试参数的优化。根据相关资料和相似相容原理,本方法选择极性色谱柱作为测定这 4 种防腐剂的色谱柱。由于内涂物的不同同样也会对目标物的分离、测定等产生影响,因此,为了筛选更好的色谱条件,本实验采用 3 种不同性质的极性毛细管柱(分别为 DB-FFAP, 30 m × 530 μm × 0.50 μm; DB-608, 30 m × 530 μm × 0.83 μm; LZP-930, 25 m × 530 μm × 0.50 μm)对同一浓度的标准混合液(80 μg/mL)按 1.2.3 进行测试,并对测试条件进行优化,测试图谱见图 1、图 2 和图 3。

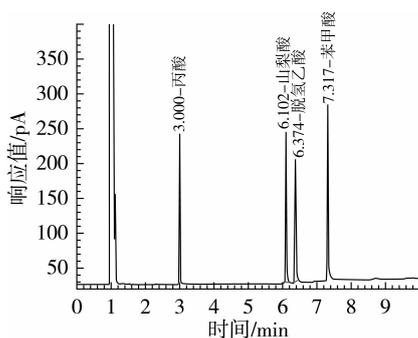


图1 丙酸、山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸标准混合使用液在 DB-FFAP 柱上的色谱图

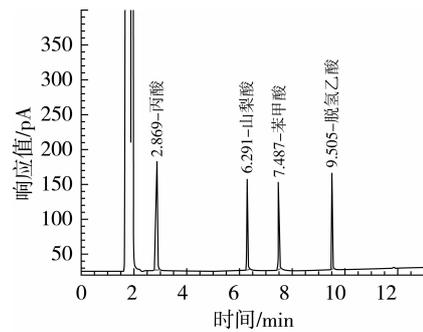


图2 丙酸、山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸标准混合使用液在 DB-608 柱上的色谱图

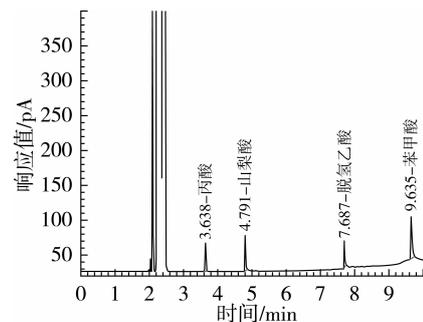


图3 丙酸、山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸标准混合使用液在 LZP-930 柱上的色谱图

注:柱温箱条件:初始温度 80 ℃,保持 1 min,以 20 ℃/min 升至 220 ℃,保持 2 min,其它参数同本文 1.2.3。

从图 1、图 2 和图 3 可知,选用色谱柱对所测 4 种防腐剂都有很好的分离效果;但响应值明显不同,DB-FFAP 色谱柱最高,DB-608 柱次之,LZP-930 柱最低;丙酸、山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸的出峰顺序和分离情况也不相同。由于目标物在 DB-FFAP 和 DB-608 色谱柱上的响应值差别不是很大,且脱氢乙酸和苯甲酸的出峰顺序和每个目标物之间的相对保留时间也不相同,这样可以利用此性质对测定中在一种柱子上存在干扰或假阳性的情况可更换成另一种色谱柱进行验证。因此,选择 DB-FFAP 色谱柱作为实验的测定用柱,而 DB-608 色谱柱作为实验排除干扰和假阳性的验证用柱。LZP-930 色谱柱由于目标物响应值低,造成检出限偏高,因此不采用。

2.2 被测物的线性响应分析

被测物质在测定条件下,峰面积和浓度有良好的相关性响应是衡量该检测方法好坏的重要因素。因此,本实验对一系列不同浓度的标准溶液进行测定,浓度分别为 10、20、40、80、160、320、1 000 μg/mL,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标建立标准曲线,其线性回归方程和相关系数见下表 1。

表1 4种防腐剂的标准曲线回归方程及相关系数

化合物名称	线性回归方程	相关系数(r)
丙酸	$Y = 4.126X - 3.320$	0.999 9
山梨酸	$Y = 5.737X - 2.578$	0.999 9
脱氢乙酸	$Y = 6.123X - 5.766$	0.999 9
苯甲酸	$Y = 5.857X - 3.185$	0.999 9

从表1中可以看出:4种防腐剂在10~1000 μg/mL的浓度范围内具有很高的相关性,若利用本法进行检测,则标准曲线的浓度范围对应至样品中的含量范围为0.05~5.0 g/kg,完全涵盖了4种防腐剂的常规添加量,说明本法的线性相关性能满足实际样品检测要求。

2.3 方法前处理分析

麻辣小食品中含有较多的脂肪、色素、添加剂等是影响分析的干扰物质,难于处理净化。本方法样品处理过程在1只50 mL的离心管中进行,使用了振摇、离心等常规操作,其空白样品图谱和4种防腐剂的添加回收色谱图见图4和图5。从图4、图5可以看出:本方法处理效果好,目标干扰物少。

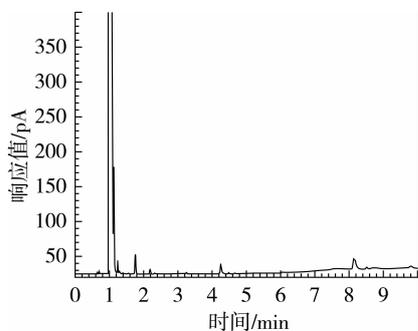


图4 麻辣小食品样品空白测试色谱图

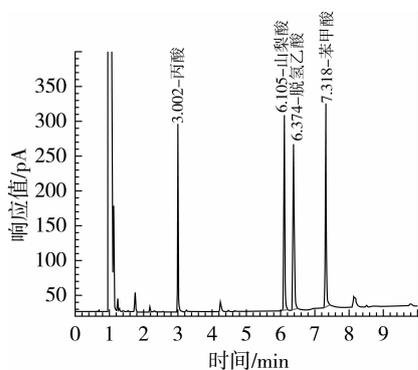


图5 麻辣小食品样品添加回收测试色谱图

2.4 方法的准确度

方法的准确度通常用添加回收率来反映。本实验以较难处理的几种常见固体非脂类食品作为方法的验证对象,向样品中添加不同浓度的4种防腐剂标物,混匀后进行检测,计算其回收率,测定结果见表2。

从表2可知,山梨酸的回收率在95.4%~

98.6%之间,脱氢乙酸的回收率在96.2%~99.4%之间,苯甲酸的回收率在95.2%~96.9%之间,加标量高的比加标量低的回收率高,主要是由于系统性测量损失造成的;这3种防腐剂的最低回收率均在95%以上,结果符合《GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范食品理化检测》附录F—检测方法确认技术要求中关于回收率的要求。

表2 4种防腐剂在不同食品中的回收率 %

化合物名称	麻辣小食品		酱菜		豆腐		糕点	
	1#	2#	1#	2#	1#	2#	1#	2#
丙酸	86.6	85.1	87.2	85.9	89.3	88.0	91.3	90.8
山梨酸	95.8	95.4	96.0	95.3	97.1	96.1	98.6	97.5
脱氢乙酸	96.7	96.5	96.9	96.2	97.6	96.7	99.4	98.9
苯甲酸	95.9	95.2	96.1	95.5	97.2	96.5	98.9	97.2

注:1#样品4种防腐剂的添加浓度均为0.5 g/kg,2#样品4种防腐剂的添加浓度为0.1 g/kg。

丙酸的回收率在85.1%~91.3%之间,丙酸回收率相对较低是因为丙酸具有与水互溶的性质,造成丙酸很难从水中提取出来,这也是气相色谱法测定丙酸普遍遇到的问题,属较难处理物质。另外,本实验对不同方法测定相同添加量(0.1 g/kg)下的丙酸回收率进行了比对,见图6。从图6可知,本方法测定丙酸的回收率和国标方法 GB 5009.120—2016《食品安全国家标准食品中丙酸钠、丙酸钙的测定》第二法—气相色谱法的回收率基本相同,基质干扰较少的食品类样品如豆腐、糕点等甚至高于国标方法。

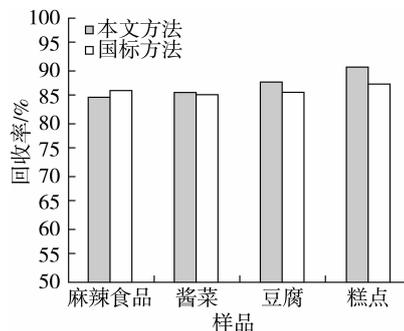


图6 不同方法检测丙酸的回收率对比图

从上述分析说明本法能满足检测需要,是一个适应范围广、准确度高的检测方法。另外,若用本法测定样品中的丙酸,应注意在实验过程中用氯化钠充分饱和和被提取的水溶液,以提高丙酸的回收率。

2.5 方法的精密度

本实验往干扰较大的空白麻辣小食品中加入较低量的4种标准物质(0.1 g/kg),充分混匀后测定6次,计算测定结果的实验室内变异系数 CV 值(相对标准偏差 RSD)来表示方法的精密度。结果见

表3。

从表3中可知,4种防腐剂测定结果的实验室内变异系数 $CV(n=6)$ 均小于5%,结果优于《GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范食品理化检测》附录F—检测方法确认的技术要求中关于精密度的要求。

2.6 方法的检测限

方法的检出限是方法能不能满足检测要求的根本保证。利用本法进行检测,检出限为3倍噪音除以灵敏度(标准曲线方程的斜率)的计算结果^[23],结果见表3。

从表3可知,4种防腐剂的检出限均在0.002 g/kg以下,比上述几种食品中国家规定的最低限量值(0.25 g/kg)还要低100多倍,说明该法检测限低,能满足食品安全检测的需要。

表3 4种防腐剂的精密度实验结果和检出限

化合物名称	变异系数 CV/%	检出限/(g/kg)
丙酸	4.7	0.001 7
山梨酸	3.9	0.001 7
脱氢乙酸	3.0	0.002 0
苯甲酸	3.2	0.001 4

2.7 方法在实际检测中的应用

利用本方法对市场上的风味小食品类、酱菜类、豆腐类、糕点类共计300份食品样品进行检测,取得了很好的应用效果,工作效率比使用国标方法分开检测提高10倍以上,样品中检出含有这4种防腐剂及其盐的情况为:丙酸检出率为14.0%,超标率为0.7%;山梨酸检出率为55.7%,超标率为1.7%;脱氢乙酸检出率为52.0%,超标率为2.3%;苯甲酸检出率为45.3%,超标率为1.3%;大部分样品中都添加了1~2种防腐剂。

3 结论

利用丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸及其盐在碱性条件下溶于水,酸性条件下溶于有机溶剂的性质,采取先除干扰物再提取目标物的思路,以基质复杂的风味小食品、酱菜等作为验证对象,研究建立了食品中丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸及其盐含量同时快速测定的检验方法,方法适用于固体非酯(脂)类食品的检测。结果表明:丙酸的回收率在85.1%~91.3%之间,其余3种防腐剂的回收率均在95.2%~99.4%之间;实验室内变异系数(CV, $n=6$)最大值 $\leq 4.7%$,4种防腐剂的检出限均在0.002 g/kg以下。4种防腐剂在使用DB-FFAP色谱柱测定中有杂质干扰时,可用DB-608毛细管柱

做进一步的确认。本方法具有适用范围广、检测效率高、重现性好、准确度高、检出限低的特点,推广应用对我国食品安全的监督检验具有重要的意义。

参考文献:

- [1] GB 2760—2014, 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
- [2] 朱小华,方东亚,刘幼兰,等. 2015年食品防腐剂使用调研及分析[J]. 亚热带农业研究, 2016, 12(2): 120-124.
- [3] 魏玉芳. 食品中苯甲酸、山梨酸的现状分析及检验方法研究[J]. 理论研讨中国市场, 2016, 31(898): 295-296.
- [4] 刘炜,杨晓凤,雷绍荣. 气相色谱法同时测定酱腌菜中山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸的含量[J]. 山西农业科学, 2016, 44(10): 1484-1486, 1496.
- [5] 雷宁生,苏小川,张瑞,等. 气相色谱—质谱联用法测定鲜湿米粉中的脱氢乙酸[J]. 应用预防医学, 2015, 21(3): 208-211.
- [6] 彭霞. 食品中苯甲酸检测研究[J]. 食品安全导刊, 2016, 18: 90.
- [7] 曾金,王天地. 食品中脱氢乙酸分析方法的最新研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 82-83, 86.
- [8] GB/T 5009.29—2003, 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S].
- [9] GB 5009.120—2016, 食品安全国家标准 食品中丙酸钠、丙酸钙的测定[S].
- [10] GB/T 5009.121—2003, 食品中脱氢乙酸的测定[S].
- [11] GB/T 23373—2009, 食品中脱氢乙酸的测定高效液相色谱法[S].
- [12] GB/T 23495—2009, 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定高效液相色谱法[S].
- [13] 王平,陈宁生. 计算机辅助高效液相色谱法对食品中7种防腐剂的检测[J]. 安徽工程大学学报, 2016, 31(4): 68-71, 82.
- [14] 杨金玲,江阳,薛勇,等. 超声分散液相萃取—气相色谱法同时测定食品中11种防腐剂[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(1): 47-50, 56.
- [15] 刘沛明. 毛细管柱气相色谱法同时测定月饼中苯甲酸、山梨酸、丙酸钙及脱氢乙酸[J]. 现代预防医学, 2015, 42(22): 4077-4080.
- [16] 杨晓凤,雷绍荣,杨树萍. 毛细管柱气相色谱法同时测定面制品中丙酸、山梨酸、苯甲酸及脱氢乙酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(18): 2611-2673.
- [17] 侯瑞霞,吴青. 气相色谱法同时测定食品中11种防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(4): 865-867.
- [18] 郝鹏飞,徐琴,牟志春,等. 气相色谱—质谱法同时测定葡萄酒中13种防腐剂[J]. 分析实验室, 2013, 32(7): 108-111.
- [19] 凌云,储晓刚,张峰,等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定调味料中的17种防腐剂和抗氧化剂[J]. 色谱, 2011, 29(8): 723-730.
- [20] 杨帛,刘锐萍,刘浩,等. 食品中多种防腐剂同时检测方法的优化研究[J]. 检测与分析, 2014, 17(11): 27-30.
- [21] 徐陆妹. 气相色谱法快速检测食品中的苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9): 2199-2201.
- [22] GB/T 27404—2008, 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
- [23] GB/T 5009.1—2003, 食品卫生检验方法理化部分总则[S].

完