

固相萃取-高效液相色谱法测定水果和果酱中的 6 种对羟基苯甲酸酯

陈 皓¹, 何乔桑², 王萍亚^{1*}, 周 勇¹, 黄 鹂¹,
许镇坚¹, 赵 华¹, 张薇英¹

(1. 国家海洋食品质量监督检验中心, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江省食品质量安全检测院, 浙江 杭州 310013)

摘要: 建立了固相萃取-高效液相色谱(SPE-HPLC)同时测定水果和果酱中 6 种对羟基苯甲酸酯(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸异丙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸异丁酯和对羟基苯甲酸丁酯)含量的方法。经 Oasis HLB 固相萃取柱净化的样品采用 HPLC 分离, 优化的色谱条件为采用 Symmetry-C₁₈ 色谱柱分离, 流动相为柠檬酸缓冲液-甲醇(体积比为 48:52), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 258 nm, 测定温度 40 °C。6 种对羟基苯甲酸酯的线性范围为 0.1 ~ 20.0 mg/L ($r = 0.9999$), 回收率为 82.8% ~ 115.5%, 相对标准偏差为 0.2% ~ 6.8% ($n = 6$)。对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸异丙酯、对羟基苯甲酸丙酯的检出限($S/N = 3$)为 0.1 mg/kg, 定量限($S/N = 10$)为 0.3 mg/kg; 对羟基苯甲酸异丁酯和对羟基苯甲酸丁酯的检出限为 0.2 mg/kg, 定量限为 0.6 mg/kg。该方法简便快速、结果准确、重现性好, 可作为测定水果及果酱中多种对羟基苯甲酸酯的有效方法。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱法; 对羟基苯甲酸酯; 水果; 果酱

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)06-0804-05 栏目类别: 研究论文

Determination of six *p*-hydroxybenzoates in fruits and jams using solid-phase extraction-high performance liquid chromatography

CHEN Ai¹, HE Qiaosang², WANG Pingya^{1*}, ZHOU Yong¹, HUANG Li¹,
XU Zhenjian¹, ZHAO Hua¹, ZHANG Weiyin¹

(1. National Marine Food Quality Supervision and Testing Center, Zhoushan 316021, China;

2. Zhejiang Province Food Quality and Safety Test Center, Hangzhou 310013, China)

Abstract: A method was developed for the determination of 6 *p*-hydroxybenzoates (methyl *p*-hydroxybenzoate (MHB), ethyl *p*-hydroxybenzoate (EHB), isopropyl *p*-hydroxybenzoate (IPHB), propyl *p*-hydroxybenzoate (PHB), isobutyl *p*-hydroxybenzoate (IBHB) and butyl *p*-hydroxybenzoate (BHB)) in fruits and jams using the combination of solid-phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). Two different extraction solutions and three different mobile phases were tested for *p*-hydroxybenzoates analysis, and finally ethanol was used as the extraction solvent and methanol-citric acid buffer was selected as the mobile phase. The sample was extracted, and purified by an Oasis HLB solid-phase extraction cartridge, then separated on a Symmetry-C₁₈ column and detected at the wave length of 258 nm. The results showed that all the calibration graphs were linear in the concentration range of 0.1 ~ 20.0 mg/L ($r = 0.9999$). The detection limits and quantification limits were 0.1 mg/kg ($S/N = 3$) and 0.3 mg/kg ($S/N = 10$) respectively for MHB, EHB, IPHB and PHB, 0.2 mg/kg ($S/N = 3$) and 0.6 mg/kg ($S/N = 10$) respectively for IBHB and BHB. The average recoveries were between 82.8% and 115.5% with the relative standard deviations (RSDs) of 0.2% ~ 6.8% ($n = 6$). The method is simple, rapid, sensitive and reproducible, and can be used for the routine

* 通讯联系人: 王萍亚, 教授级高级工程师, 主要从事食品检测技术研究. Tel: (0580)2080538, E-mail: zxhuaxueshi@163.com.
基金项目: 浙江省重大科技计划项目(No. 2007C13067).

analysis of the *p*-hydroxybenzoates in fruits and jams.

Key words : solid phase extraction (SPE) ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; *p*-hydroxybenzoates ; fruits ; jams

防腐剂是现代食品生产、加工、储存等过程中广泛使用的添加剂,它通过抑制微生物繁殖来达到延长食品保质期的目的^[1,2]。对羟基苯甲酸酯(*p*-hydroxybenzoates),又称尼泊尔金酯,是一类非挥发性的防腐剂,因其pH适用范围广、杀菌性能稳定而在果蔬、酱油、水果汁等食品以及化妆品中应用广泛^[3,4],目前使用较多的是对羟基苯甲酸甲酯(methyl *p*-hydroxybenzoate, MHB)、对羟基苯甲酸乙酯(ethyl *p*-hydroxybenzoate, EHB)、对羟基苯甲酸异丙酯(isopropyl *p*-hydroxybenzoate, IPHB)、对羟基苯甲酸丙酯(propyl *p*-hydroxybenzoate, PHB)、对羟基苯甲酸异丁酯(isobutyl *p*-hydroxybenzoate, IBHB)和对羟基苯甲酸丁酯(butyl *p*-hydroxybenzoate, BHB)。由于对羟基苯甲酸酯的酸性和腐蚀性较强,胃酸过多的病人和儿童不宜食用含此类防腐剂的食品。Routledge等^[5]首次发现对羟基苯甲酸酯具有弱雌激素活性,这一发现对原有的“对羟基苯甲酸酯低毒性”的观点提出了挑战。欧洲经济共同体(EEC)明确规定:以对羟基苯甲酸计,食品中对羟基苯甲酸酯的最高允许含量为0.1%;当几种对羟基苯甲酸酯复配使用时,其总量不得超过0.1%。我国GB 2760《食品添加剂使用卫生标准》规定:对羟基苯甲酸酯类化合物及其钠盐(以对羟基苯甲酸计)用于新鲜水果蔬菜保鲜的最大允许使用量为0.012 g/kg,果汁型饮料、果酱(不含罐头)、酱油、酱料中的限量为0.25 g/kg等。

目前,对羟基苯甲酸酯类化合物的测定方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]、薄层色谱法^[9]、毛细管电泳法^[10,11]、气相色谱法^[12,13]等。GB 5009.31-2003采用气相色谱-氢火焰离子化检测器测定酱油、醋等食品中的对羟基苯甲酸酯^[14],但该方法存在样品前处理步骤繁琐、灵敏度不高的弱点,且只测定两种酯类(EHB和PHB),从而限制了它的使用范围。有关水果、果酱制品中对羟基苯甲酸酯的液相色谱测定方法尚未见报道。本文建立了固相萃取(SPE)-HPLC同时检测水果和果酱中上述6种对羟基苯甲酸酯的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters公司2695型高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器)、Symmetry-C₁₈(250 mm × 4.6

mm, 5 μm)色谱柱、Waters Oasis HLB固相萃取柱(6 mL, 200 mg);美国Supelco公司Supelco LC-C₁₈固相萃取柱(3 mL)。

6种对羟基苯甲酸酯标准品的纯度均不低于99%(美国Sigma公司);甲醇为色谱纯(美国天地试剂公司);乙醇、柠檬酸均为分析纯;实验用水由Millipore超纯水装置制备。

标准工作溶液:用甲醇配制6种对羟基苯甲酸酯的单标储备液,质量浓度均为100 mg/L。按实际检测要求,用甲醇稀释得到质量浓度分别为0.10, 0.50, 2.0, 5.0, 10.0和20.0 mg/L的系列混合标准工作溶液。

1.2 样品准备和处理

称取5.0 g混合均匀的样品,置于50 mL具塞离心管中,加入20 mL乙醇-水-柠檬酸(体积比为70:29.5:0.5)混合液,置于水浴中超声波辅助提取15 min,在4000 r/min速率下离心10 min,将上清液转入容量瓶中;残留物再用20 mL提取液重复提取1次。合并上清液,用提取液定容至50.0 mL,过滤、离心后,取25 mL上清液上样于已预先用10 mL甲醇、10 mL蒸馏水活化处理过的SPE柱,以自然流速过柱,再用10 mL蒸馏水淋洗SPE柱,抽干;用3.0 mL甲醇洗脱,控制洗脱液的流速不超过1 mL/min;收集洗脱液,并用甲醇定容至5.0 mL,经0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液供HPLC测定。

1.3 色谱条件

流动相:柠檬酸缓冲液-甲醇(体积比为48:52);流速:1.0 mL/min;检测波长:258 nm;柱温:40 °C;进样量:20 μL。以保留时间定性,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 色谱柱的选择

考察了美国Waters公司的Symmetry-C₁₈和XBridge™色谱柱的分离效果,结果表明两者均能较好地分离待测组分。本文选用Symmetry-C₁₈色谱柱进行色谱分离。

2.1.2 流动相的选择

分别对乙腈-水、甲醇-水和甲醇-柠檬酸缓冲液3种流动相体系进行考察,结果表明,以乙腈-水为流动相时分离度较差,且出现严重的重叠现象;以甲醇-水为流动相时,虽然目标物的分离度较前者要

好,但该体系需采用梯度洗脱进行分离,而梯度洗脱导致基线不稳定,且使分析时间明显延长;以甲醇-柠檬酸缓冲液为流动相,在同等条件下能较好地分离 6 种对羟基苯甲酸酯类,且能有效地缩短总的分析时间。此外,还考察了不同体积比的甲醇-柠檬酸缓冲液对各组分分离的影响,结果显示,以甲醇-柠檬酸缓冲液(体积比为 52:48)为流动相最为适合,分离效果好,色谱峰明显,且保留时间(t_R)合适。

2.1.3 检测波长的选择

用二极管阵列检测器在 210 ~ 400 nm 之间对各组分的标准溶液进行光谱扫描。结果显示,6 个组分中有 2 个组分在 256.8 nm 处具有较高的灵敏度,而另 4 个组分在 258 nm 处有高的灵敏度,因此本文选择 258 nm 作为检测波长。

2.2 提取溶剂的选择

对羟基苯甲酸酯类化合物难溶于水,易溶于乙醇、乙醚等有机溶剂。分别选用乙醇、甲醇作为提取溶剂进行回收率试验。结果表明,以乙醇和甲醇为提取溶剂均能获得较高的提取率,且两者的差异不显著,但甲醇的毒性大,故本文选用乙醇作为提取溶剂。由于对羟基苯甲酸酯类化合物呈弱酸性,调节样品溶液的 pH 值为酸性使其以分子状态存在,有利于被有机溶剂萃取。用柠檬酸溶液调节样品溶液为酸性进行提取,使被测组分的回收率大幅度提高。因此,本文确定采用在酸性条件下以乙醇为提取溶剂进行提取。

2.3 固相萃取条件的选择

2.3.1 固相萃取柱的选择

根据对羟基苯甲酸酯类化合物的化学性质,考察了 HLB 和 LC-C₁₈ 两种固相萃取柱的提取、净化效果,结果表明两者均可对样品中的对羟基苯甲酸酯类化合物进行提取和净化,但 HLB 柱的吸附容量更大(为 C₁₈ 柱的 3 ~ 10 倍),且该柱在干涸情况下不影响被测组分的回收率,得到的提取回收率更高,故本文采用 HLB 固相萃取柱对样品进行提取和净化。

2.3.2 洗脱剂(甲醇)用量的选择

用 1.0 ~ 5.0 mL 甲醇洗脱固相萃取柱,测定被测组分的回收率,得到的淋洗曲线(见图 1)表明,用 3 mL 甲醇洗脱时,被测组分的回收率趋于稳定,且均在 88% 以上,因此选择用 3 mL 甲醇洗脱固相萃取柱。

2.4 方法的评价

2.4.1 标准曲线的线性范围

在确定的色谱条件下对质量浓度为 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0 和 20.0 mg/L 的混合标准工作液分别进行测定,以各组分的峰面积(Y)对其质量浓度

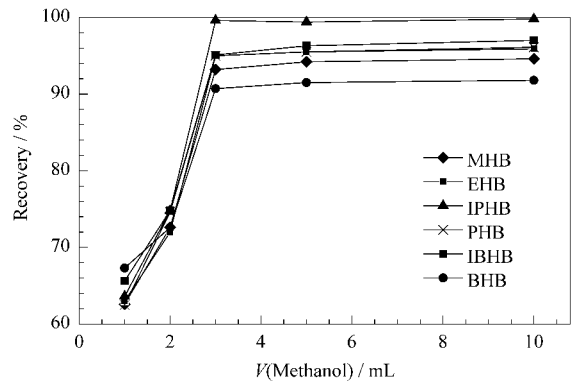


图 1 不同体积的甲醇对 HLB 萃取柱上的 6 种对羟基苯甲酸酯的淋洗曲线

Fig. 1 Elution curves of 6 *p*-hydroxybenzoates on an HLB SPE column eluted with different volumes of methanol

(X , mg/L) 进行线性回归。结果显示,6 种对羟基苯甲酸酯类化合物在 0.1 ~ 20.0 mg/L 的范围内呈良好的线性关系,相关系数均为 0.999 9。6 种对羟基苯甲酸酯类化合物标准溶液的色谱图见图 2。

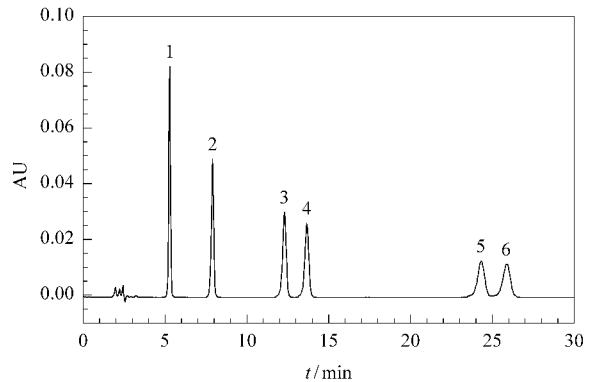


图 2 6 种对羟基苯甲酸酯类化合物标准溶液的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of a mixed solution of 6 *p*-hydroxybenzoate standards

1. MHB; 2. EHB; 3. IPHB; 4. PHB; 5. IBHB; 6. BHB.

2.4.2 检出限和定量限

选取苹果和果酱样品,按 1.2 和 1.3 节方法操作,测定方法的检出限和定量限。结果显示,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸异丙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸异丁酯和对羟基苯甲酸丁酯的检出限($S/N=3$)分别为 0.1, 0.1, 0.1, 0.1, 0.2 和 0.2 mg/kg; 最低定量限($S/N=10$)分别为 0.3, 0.3, 0.3, 0.3, 0.6 和 0.6 mg/kg。

2.4.3 准确度和精密度

选取苹果、雪梨以及果酱样品,分别添加 0.1, 0.5, 5.0 和 20.0 mg/kg 4 个水平的对羟基苯甲酸酯类化合物标准品,按 1.2 和 1.3 节方法进行加标回收率测定,每一加标水平平行测定 6 次,计算平均回收率。同时做样品空白实验。结果表明,6 种对

羟基苯甲酸酯类化合物的加标回收率在 82.8% ~ 115.5% 之间,不同样品在不同加标水平下的回收率较稳定;不同加标水平下对羟基苯甲酸酯在苹果、雪梨和果酱样品中的相对标准偏差(RSD)分别为

0.5% ~ 6.8%, 0.3% ~ 5.4% 和 0.2% ~ 5.9%,其精密度满足水果和果酱中对羟基苯甲酸酯类化合物含量的分析要求。加标回收率和精密度结果见表 1。果酱样品加标色谱图见图 3。

表 1 水果和果酱中对羟基苯甲酸酯的加标回收率和测定精密度($n=6$)

Table 1 Recoveries and precisions of the method for *p*-hydroxybenzoates in fruits and jams ($n=6$)

Compound	Added/ (mg/kg)	Apple		Snow pear		Jam	
		recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%
MHB	0.1	88.3	3.7	88.5	3.0	86.8	4.4
	0.5	89.4	2.5	90.1	2.4	90.7	3.4
	5.0	95.6	0.7	96.4	0.4	95.2	1.0
	20.0	100.3	0.9	102.7	0.5	100.3	0.7
EHB	0.1	89.7	2.9	90.7	2.5	95.2	4.5
	0.5	92.3	2.1	92.7	1.6	93.1	2.4
	5.0	96.0	1.1	98.5	0.7	96.7	1.0
	20.0	104.3	2.3	106.3	0.3	105.6	1.8
IPHB	0.1	91.3	6.0	91.3	1.9	90.8	5.9
	0.5	97.3	2.8	97.4	1.0	97.5	2.8
	5.0	104.8	0.8	107.8	1.3	105.1	1.5
	20.0	109.1	1.6	115.5	0.6	109.7	1.2
PHB	0.1	86.5	4.8	94.3	2.7	85.5	4.5
	0.5	94.1	2.8	92.6	2.0	93.5	2.3
	5.0	94.6	1.5	102.6	2.2	95.0	0.9
	20.0	97.5	0.7	102.0	0.8	97.7	0.5
IBHB	0.2	85.0	5.8	85.8	5.4	87.5	4.8
	0.5	89.3	3.4	89.8	4.8	92.8	1.5
	5.0	94.8	1.3	94.8	2.0	95.2	1.1
	20.0	95.2	0.8	94.6	1.0	94.8	0.3
BHB	0.2	85.3	6.8	86.3	5.1	82.8	4.0
	0.5	86.9	3.2	88.6	3.1	86.8	1.7
	5.0	92.6	1.0	92.2	1.6	93.2	1.0
	20.0	93.5	0.5	93.0	1.3	93.8	0.2

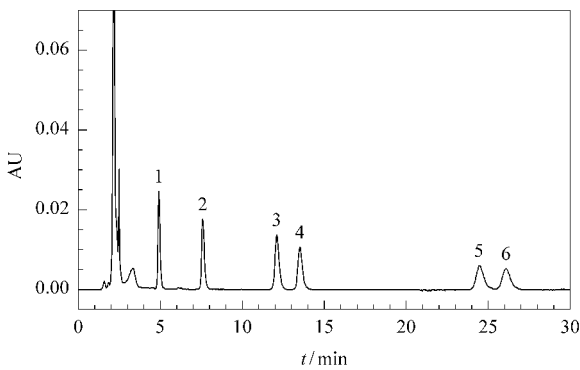


图 3 果酱样品中添加 6 种对羟基苯甲酸酯标准品的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of a jam sample added with 6 *p*-hydroxybenzoate standards

1. MHB; 2. EHB; 3. IPHB; 4. PHB; 5. IBHB; 6. BHB.

2.4.4 抗干扰实验

实验证明,与对羟基苯甲酸酯类化合物在同一色谱条件下进行测定,常用防腐剂苯甲酸($t_R=3.64$ min)、山梨酸($t_R=4.57$ min)和常见甜味剂安赛蜜($t_R=2.73$ min)、糖精钠($t_R=2.80$ min)不影响对羟基苯甲酸酯类化合物的测定,实际样品中未见其他杂峰干扰。

2.5 样品的测定

应用所建立的方法,对经某研究机构保鲜试验处理的芦柑、橙子样品和两种果酱样品中的对羟基苯甲酸酯类化合物含量进行测定,结果两种水果样品和两种果酱样品中均检出对羟基苯甲酸酯类化合物成分。其中果酱样品的色谱图如图 4 所示,测定结果见表 2。

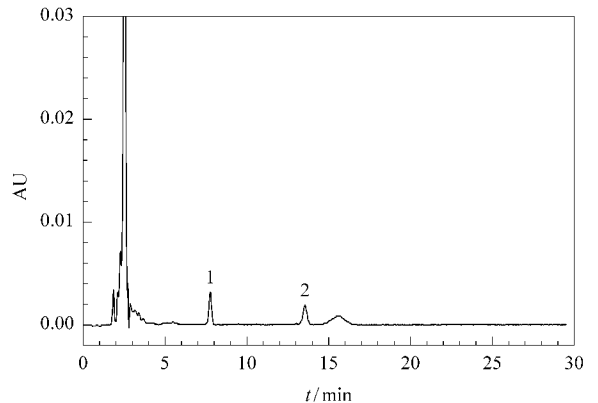


图 4 果酱样品中对羟基苯甲酸酯类化合物的高效液相色谱图
Fig. 4 HPLC chromatogram of *p*-hydroxybenzoates in a jam sample

1. EHB; 2. PHB.

表 2 果酱、芦柑和橙子样品中对羟基苯甲酸酯类化合物的含量($n=6$)
 Table 2 Contents of *p*-hydroxybenzoates in jam, ponkan and orange samples ($n=6$)

Compound	Jam 1 [#]		Jam 2 [#]		Ponkan		Orange	
	content/(mg/kg)	RSD/%	content/(mg/kg)	RSD/%	content/(mg/kg)	RSD/%	content/(mg/kg)	RSD/%
EHB	9.68	2.6	8.60	3.2	-	-	0.68	0.6
PHB	12.07	1.7	15.10	2.1	1.65	0.6	1.10	1.8

3 结语

本文建立了高效液相色谱测定水果和果酱食品中对羟基苯甲酸酯类化合物含量的方法。该方法有效地减少了复杂基体成分的干扰,获得了满意的分离效果和检测灵敏度。对羟基苯甲酸异丁酯和对羟基苯甲酸丁酯的检出限为 0.2 mg/kg,其余 4 种对羟基苯甲酸酯的检出限可达到 0.1 mg/kg。该方法净化效果稳定、操作简单、重现性好、结果准确。

参考文献:

- [1] Brul S, Coote P. Int J Food Microbiol, 1999, 50(1): 1
- [2] Mu G W, Li G H. Food and Fermentation Industries (牟冠文, 李光浩. 食品与发酵工业), 2006, 32(10): 103
- [3] Shen H Y, Ying L Y, Cao Y F, et al. Chinese Journal of Chromatography (沈昊宇, 应丽艳, 曹云峰, 等. 色谱), 2007, 25(2): 272
- [4] Zhang Q L, Liu Y, Li J, et al. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal (张群林, 刘毅, 李俊, 等. 安徽医药), 2006, 10(4): 241
- [5] Routledge E J, Parker J, Odum J, et al. Toxicol Appl Pharm, 1998, 153(19): 12
- [6] Saad B, Bari M F, Saleh M I, et al. J Chromatogr A, 2005, 1073(1): 393
- [7] Chen C Z, Xie W P, Zeng Z D. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (陈春祝, 谢维平, 曾志定. 中国卫生检验杂志), 2006, 16(1): 49
- [8] Zhou J K, Wang L S, Zhao R F. Food Science and Technology (周建科, 王立双, 赵瑞峰. 食品科技), 2008, 33(5): 237
- [9] Wang P. Journal of Environment and Health (王萍. 环境与健康杂志), 1997, 14(4): 171
- [10] Wang P, Ding X J. Chinese Journal of Chromatography (王萍, 丁晓静. 色谱), 2005, 23(3): 315
- [11] Peng Z L, Bo T, Gong S X, et al. Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition (彭振磊, 薄涛, 贡素萱, 等. 广西师范大学学报: 自然科学版), 2003, 21(3): 93
- [12] Pang N N, Malike D, Niu B. Chinese Journal of Analysis Laboratory (庞楠楠, 迪丽努尔·马力克, 牛蓓. 分析试验室), 2005, 24(3): 48
- [13] Jin Y X, Zhang L L, Liu W J. Modern Food Science and Technology (晋玉霞, 张莉莉, 刘文杰. 现代食品科技), 2007, 23(3): 78
- [14] GB/T 5009.31-2003