高效液相色谱法同时测定果蔬中多种防腐剂

綦艳[1]，黄秋研[1]，梁德沛[1]，周勇[1]，樊垚[2]，黄翠莉[1]
（1. 广东产品质量监督检验研究院，广东佛山 528300）（2. 中南林业科技大学，湖南长沙 410004）

摘要：建立了高效液相色谱法同时测定水果及蔬菜中联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2, 4-二氯苯氧乙酸的方法。样品用碱性乙醚提取，浓缩后甲醇定容，经 ODS-SP C_{18}（4.6×150 mm, 5 μm）柱分离，以甲醇-磷酸盐缓冲液（pH=6.8）为流动相，流速 0.8 mL/min 梯度洗脱，二极管阵列检测器（DAD）检测。此方法相关系数范围 0.9991~0.9997，加标回收率范围 88.0~97.4%，相对标准偏差 0.53~3.9%。实验结果表明，该方法操作简单，结果灵敏准确，适用于水果及蔬菜中多种防腐剂的同时测定。

关键词：高效液相色谱；果蔬；防腐剂
文章篇号：1673-9078(2013)6-1409-1412

Simultaneous Determination of Multiple Preservatives in Fruits and Vegetables by HPLC

QI Yan[1], HUANG Qiu-yan[1], LIANG De-pei[1], ZHOU Yong[1], FAN Yao[2], HUANG Cui-li[1]
(1.Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)
(2.Central south University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: A HPLC method was developed for the determination of multiple preservatives in fruits and vegetables, including ortho-phenyl phenol, thiabendazole, imazalil, carbendazim, cinnamaldehyde, 2-naphthol, and 2,4-dichlorobenzene oxygen ethanoic acid. Samples were extracted by alkaline ether. The extract was dissolved in methanol and finally injected into the HPLC system after the extraction solution was evaporated to dry on a rotary evaporator. The separations were effected by the gradient elution mode using a mobile phase composed of methanol-phosphate buffer (pH 6.8) at the flow of 0.8 mL/min. The eight preservatives were separated on an ODS-SP C_{18} column and then detected using a DAD detector with detection wavelength of 190~400 nm. The correlation coefficient of this method ranged from 0.9991 to 0.9997. The recoveries at spiked levels ranged from 93.4% to 97.4% and the relative standard deviations (RSD) ranged from 0.53 to 1.96. The results demonstrated that this method was simple, sensitive and accurate, which had a promising potential for practical applications in the determination of preservatives.

Key words: HPLC; fruits and vegetables; preservatives

防腐剂是指防止食品腐败变质、延长食品贮存期的物质，广义上的理解应该包括抗微生物剂、抗氧化剂和螯合剂[1~3]。联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2,4-二氯苯氧乙酸等高效防腐杀菌剂，具有强效的抑霉作用，对果蔬中常见的青霉病、绿霉病等有很好的防治作用，故主要用于柑橘类、葡萄、香蕉、苹果、草莓及马铃薯、蒜苔、菜花、番茄等水果蔬菜，起到防腐保鲜的作用。这些防腐剂具有良好的防腐保鲜作用，但同时也具有一定的毒性，甚至可能威胁生命[4]。为此，我国已建立了相关标准对其使用限量做出了规定[5]。但是，随着防腐剂种类及适用范围的不断扩大，单一的检测手段已经不能完全满足检验的需要，且国标中大多只针对某一种防腐剂进行测定，而关于果蔬中同时测定联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2,4-二氯苯氧乙酸等 8 种防腐剂的文献也未见报道。

常见的防腐剂检测方法主要有液相色谱法[6~7]、气相色谱法[8]、毛细管电泳法[9]、薄层色谱法[10]等，但大多针对饮料、食品等项目。本研究建立了高效液相色谱法同时测定果蔬中 8 种防腐剂的方法，前处理操作简单，结果灵敏准确，为果蔬中防腐剂测定提供了新的技术手段，具有重要的现实意义。

收稿日期：2013-03-07
基金项目：广东省质量技术监督局科技项目（2011CS08）
作者简介：綦艳（1978-），女，硕士，工程师，主要从事食品及相关产品检测技术研究与开发

1 材料与方法

1.1 实验仪器

高效液相色谱仪，带二极管阵列检测器，美国 Aglient 公司；Eyela SB-1100 旋转蒸发仪，东京理化器械株式会社；涡旋混匀器，德国 IKA；高速冷冻离心机，美国 Sigma 公司。

1.2 实验试剂

氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、丙酮、乙酸乙酯、十二烷基磺酸钠、磷酸（分析纯）；乙醚、甲醇（色谱纯，德国 CNW Technologies GmbH 公司）；实验用水为超纯水；联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2,4-二氯苯氧乙酸（国家标准物质中心）。

1.3 实验样品

从市场随机抽取水果及蔬菜若干。

1.4 实验方法

1.4.1 配制标准品溶液

用甲醇分别配制浓度为 1000 μg/mL 的联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2,4-二氯苯氧乙酸标准储备液，4 ℃下保存。

1.4.2 样品前处理

取水果或蔬菜样品匀浆物 10 g，置 50 mL 聚四氟乙烯离心管中，加入 10 mL 水和 10 g 氯化钠，用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 12，再加乙醚 25 mL，涡旋提取 10 min，5000 r/min 离心 5 min，取上层有机相于 100 mL 磨口圆底烧瓶中，沉淀物再加 20 mL 乙醚重复提取一次，合并提取液，30 ℃旋转蒸发浓缩至近干，残留物用甲醇溶解并定容至 5 mL，过 0.45 μm 有机滤膜后按 1.4.3 色谱条件进行测定。

1.4.3 色谱条件

色谱柱：Inertsil ODS-SP C18 柱；流动相：A.磷酸盐缓冲液（1.38 g 磷酸二氢钠和 1.41 g 磷酸氢二钠溶于 900 mL 水中，1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH=6.8，水定容至 1000 mL），B.甲醇，梯度洗脱，流速：0.8 mL/min；二极管阵列检测器；柱温：30 ℃；进样体积：5 μL；

检测波长：0~7.5 min，波长为 275 nm，7.5~28.0 min，波长为 230 nm。

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

通过 DAD 检测器在 190~400 nm 范围内进行全波段扫描可知，8 种物质的最大吸收波长分别为桂醛 275 nm，2, 4-二氯苯氧乙酸 285 nm、多菌灵 286 nm、噻苯咪唑 300 nm、乙萘酚 230 nm、邻苯基苯酚 254 nm、抑霉唑 230 nm、联苯 254 nm。结合各组出峰顺序，设计了变化波长如下：0~7.5 min 波长为 275 nm，可以兼顾出峰较早的桂醛、2, 4-二氯苯氧乙酸、多菌灵、噻苯咪唑，该波长是它们的最大或较大的吸收波长；7.5~28.0 min 波长为 230 nm，该波长是乙萘酚和抑霉唑的最大吸收波长，同时兼顾响应值比较小的邻苯基苯酚和联苯，对整体方法的灵敏度有所提高。

2.2 流动相的选择

表 1 线性梯度洗脱条件

Table 1 Gradient chromatography separation conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	70	30
6.00	38	62
6.10	35	65
16.00	35	65
23.00	5	95
24.00	70	30
28.00	70	30

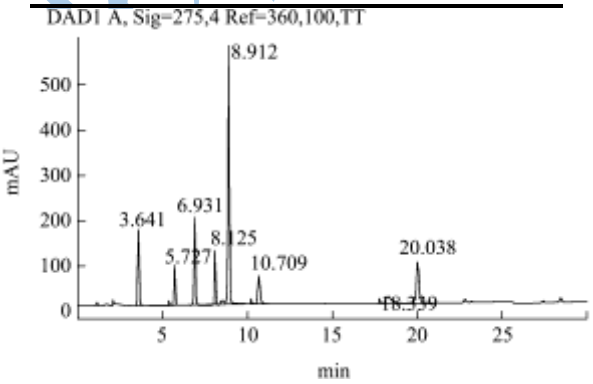


图 1 防腐剂标准品色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of standards of the preservatives

表 2 各防腐剂标准品出峰时间

Table 2 The retention times of the standards of the preservatives

目标物	桂醛	2,4-二氯苯氧乙酸	多菌灵	噻苯咪唑	乙萘酚	邻苯基苯酚	抑霉唑	联苯
出峰时间/min	3.6	5.7	6.9	8.1	8.9	10.7	18.3	20

分别使用甲醇-水，甲醇-磷酸盐缓冲液（pH=3.0），甲醇-乙腈-5 mmol/L 十二烷基磺酸钠溶液（55:10:35，磷酸调节 pH=4.5），甲醇-磷酸盐缓冲液（pH=6.8）流动相进行了试验。结果表明，前两种流动相体系中各组分在色谱柱上弱保留，桂醛、乙萘酚、2, 4-二氯苯氧乙酸这三种物质分离度较小，其它物质峰形严重拖尾；甲醇-乙腈-5 mmol/L 十二烷基磺酸钠溶液（55:10:35，磷酸调节 pH=4.5）流动相体系中联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑峰形较好，但是其它组分难以

洗脱出来，且十二烷基磺酸钠溶液为离子对试剂，系统平衡时间较长，不宜采用；使用磷酸盐缓冲液（pH=6.8）-甲醇时，碱性体系下各物质与流动相的保留作用明显加强，因此最终选定磷酸盐缓冲溶液(A)（pH=6.8）-甲醇（B）作为流动相。线性梯度洗脱条件见表 1，通过调节梯度洗脱程序，把抑霉唑出峰时间提前，同时与联苯分开，兼顾了分离效果和改善峰形。8 种防腐剂混合标准溶液的色谱图如图 1 所示，出峰时间见表 2。由表 2 可知，8 种组分在 22 min 内全部分离。

2.3 提取液的选择

果蔬防腐剂中常用的提取溶剂有乙醚、丙酮、乙酸乙酯和甲醇[11]。分别选择乙醚、丙酮、乙酸乙酯和甲醇对样品进行提取。由于甲醇和丙酮是亲水性溶剂，不利于消除基质中一些水溶性成分，因此不适合作为提取溶剂。用乙酸乙酯作为提取溶剂，在提取过程中容易发生乳化。乙醚的沸点较低，可在较低温度下旋转蒸发，避免桂醛和联苯的挥发，故选择乙醚作为提取溶剂。空白样品及加标样品的色谱图分别见图 2、图 3。

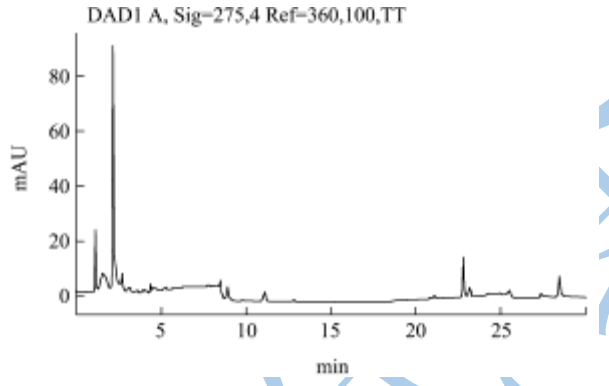


图 2 空白样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of a preservative-free sample

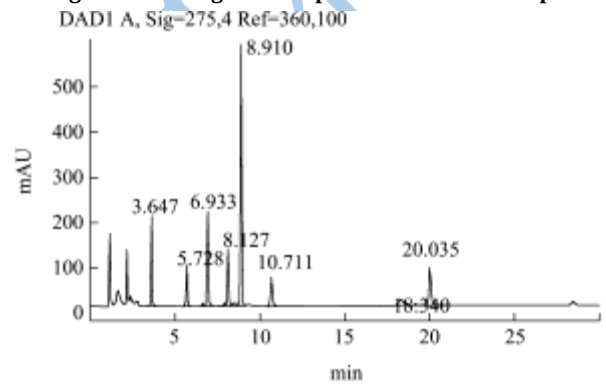


图3 加标样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of a sample spiked with standards

2.4 回归方程、线性范围及检出限

精密量取标准品储备液适量到容量瓶中，甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL、1000 μg/mL 的混合标准溶液系列。进样 5 μL，以峰面积为纵坐标，对照品浓度为横坐标，计算回归方程及相关系数。根据各组分在仪器响应的 3 倍信噪比计算检出限。回归方程、线性范围、相关系数及检出限见表 3。

表 3 线性关系及检出限

Table 3 Linear relations and detection limits

组分	回归方程	线性范围/(μg/mL)	相关系数 r	检出限/(μg/mL)
桂醛	Y=34.6171x-9.6859	1~1000	0.9997	0.20
2,4-二氯苯氧乙酸	Y=17.3128x-1.4128	1~1000	0.9997	0.20
多菌灵	Y=22.1484x-0.2084	1~1000	0.9993	0.20
噻苯咪唑	Y=28.1855x-0.6933	1~1000	0.9997	0.20
乙萘酚	Y=106.083x+161.751	1~1000	0.9992	0.10
邻苯基苯酚	Y=18.7354x-0.9021	1~1000	0.9991	0.40
抑霉唑	Y=13.1361x-10.9762	1~1000	0.9991	0.40
联苯	Y=40.4800x-3.3340	1~1000	0.9996	0.20

由表 3 可知，该方法在 1~1000 μg/mL 较宽的范围内线性良好，相关系数均大于 0.999；检出限在 0.10~0.40 μg/mL，可满足定量分析的要求。

2.5 回收率实验

对空白样品进行加标回收实验，加标水平分别为 0.5、2.0、10.0 mg/kg，按 1.4.2 处理平行测定 5 份，结果见表 4。

由表 4 可知，加标回收率范围 88.0~97.4%，相对标准偏差 0.53~3.9%，表明该方法有较好的重复性及准确性，符合防腐剂残留分析要求。

2.6 实际样品分析

从超市、批发市场随机抽取 8 批次果蔬，按“1.4.2”方法每种样品重复测定 3 次，其中 3 批次水果检出桂醛，其余的均未检出，结果见表 5。

由表 5 可知，桂醛在进出口水果中使用较多。根据我国 GB2760-2011《食品添加剂使用标准》，桂醛是按生产需要适量使用。专家认为桂醛是绿色安全，建议果农果商、菜农菜商，可以使用桂醛进行果蔬防腐。

3 结论

本文研究了高效液相色谱法同时测定果蔬中联苯、邻苯基苯酚、噻苯咪唑、抑霉唑、多菌灵、桂醛、乙萘酚、2,4-二氯苯氧乙酸等 8 种防腐剂的方法。通过对流动相的梯度洗脱及检测波长的改变，提高了检测方法的灵敏度。该方法操作简单，准确度高，精密度好，大大提高了果蔬中防腐剂的检测效率，缩短了分析时间，可作为一种快速新型的检测手段进行推广。

表4 样品加标回收率试验

Table 4 The recoveries of the spiked samples

组分	加标量/(mg/kg)	测定量/(mg/kg)	回收率/%	标准偏差(RSD)/%
桂醛	0.5, 2.0, 10.0	0.48, 1.90, 9.72	96.0, 95.0, 97.2	1.4, 1.1, 1.3
2,4-二氯苯氧乙酸	0.5, 2.0, 10.0	0.47, 1.92, 9.74	94.0, 96.0, 97.4	2.1, 1.9, 2.3
多菌灵	0.5, 2.0, 10.0	0.48, 1.89, 9.71	96.0, 94.5, 97.1	1.0, 1.7,1.4
噻苯咪唑	0.5, 2.0, 10.0	0.45, 1.85,9.44	90.0, 92.5, 94.4	1.2, 1.2, 0.82
乙萘酚	0.5, 2.0, 10.0	0.44, 1.83, 8.89	88.0, 91.5, 88.9	1.5, 1.0, 0.77
邻苯基苯酚	0.5, 2.0, 10.0	0.46, 1.91, 9.64	92.0, 95.5, 96.4	2.0, 1.5, 1.6
抑霉唑	0.5, 2.0, 10.0	0.47, 1.90, 9.55	94.0, 95.0, 95.5	3.9, 2.5, 2.7
联苯	0.5, 2.0, 10.0	0.45, 1.87, 9.26	90.0, 93.5, 92.6	1.0, 0.53, 0.79

表 5 抽样检测果蔬样品中防腐剂结果

Table 5 Results of sampling testing preservatives in fruits and vegetables

样品类型	桂醛/(mg/kg)	2, 4-二氯苯氧乙酸/(mg/kg)	多菌灵/(mg/kg)	噻苯咪唑/(mg/kg)	乙萘酚/(mg/kg)	邻苯基苯酚/(mg/kg)	抑霉唑/(mg/kg)	联苯/(mg/kg)
蛇果	0.328	-	-	-	-	-	-	-
红提	0.136	-	-	-	-	-	-	-
橙子	0.281	-	-	-	-	-	-	-
枇杷	-	-	-	-	-	-	-	-
白菜	-	-	-	-	-	-	-	-
苦瓜	-	-	-	-	-	-	-	-
青瓜	-	-	-	-	-	-	-	-
西红柿	-	-	-	-	-	-	-	-

参考文献

[1] 高玉荣,王雪平.食品化学防腐剂与纳他霉素的协同抑菌作用研究[J].现代食品科技,2010,26(6):558-561

[2] 吴晖,刘磊,李晓凤,等.防霉剂富马酸二甲酯的研究现状及应用[J].中国粮油学报,2007,22(6):160-163

[3] 凌云,储晓刚,张峰.超高效液相色谱法测定食品中的多种防腐剂[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):198-203

[4] 刘引.论我国食品添加剂与食品质量安全[J].计量与测试技术,2010,37(6):82-84

[5] GB 2760-2011.食品添加剂使用标准[S]

[6] 汪辉,曹小彦,李林,等.反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中 14 种常见食品添加剂的快速测定[J].分析测试学,2009,28(10):1194-1197

[7] 赵笑虹,刘浩,李秀敏.高效液相色谱法同时测定饮料中十二种食品添加剂[J].食品工业科技,2009,30(11):294-298

[8] 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

[9] 王洪杰,翟翔天,宋风华.毛细管电泳法同时测定 4 种食品添加剂[J].解放军预防医学杂志,2007,25(3):196-197

[10] 桂云,段乐.薄层层析法测定五种食品添加剂实验条件选择[J].安徽预防医学杂志,1999,5(1):40-42

[11] Ganzera M, Aberham A, Siuppner H. Development and validation of an HPLC/UV/MS method forsimultaneous determination of 18 pre-servatives in grapefruit seed extract [J]. Journal of Agricultural and Food Chemstry, 2006, 54(11): 3768-3772