

高效液相色谱法测定柑橘中 6 种防腐保鲜剂的残留

奉夏平, 曾宪远, 付丽敏, 唐丽娜, 黄秀丽, 陈清清
(广东省惠州市质量计量监督检测所, 广东惠州 516003)

摘要: 建立了同时对柑橘中 6 种防腐保鲜剂包括对羟基苯甲酸甲酯(尼泊金甲酯)、对羟基苯甲酸乙酯(尼泊金乙酯)、乙萘酚、4-苯基苯酚、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和联苯醚(二苯醚)残留量进行测定的高效液相色谱法。样品经乙醚提取后, 活性炭柱净化。C₁₈ 色谱柱分离, 流动相为甲醇:水(55:45, 磷酸调节 pH≈3), 二极管阵列检测器, 检测波长为 208 nm。结果表明: 6 种标准物质在 1.2~4.0 μg/mL 范围内呈良好线性关系, 相关系数均可达到 0.999, 在此范围内, 各防腐保鲜剂的加标回收率在 85.65~106.50% 之间, 相对标准偏差为 2.36~6.78%。该方法中乙萘酚的检测限为 0.5 mg/kg, 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、2,4-D、4-苯基苯酚和联苯醚的检测限为 1.0 mg/kg。该方法简便, 快速、准确、灵敏度高、重现性好, 能满足柑橘中 6 种防腐保鲜剂残留量的检测要求。

关键词: 高效液相色谱法; 柑橘; 防腐保鲜剂; 残留量

文章编号: 1673-9078(2013)8-2025-2029

Detection of 6 Preservative Residues of in Orange by High Performance Liquid Chromatography

FENG Xia-ping, ZENG Xian-yuan, FU Li-min, TANG Li-na, HUANG Xiu-li, CHEN Qing-qing
(Huizhou Quality and Measuring Supervision Testing Institute, Huizhou 516003, China)

Abstract: A method was established to detect 6 kinds of fruit preservatives including p-methyl hydroxybenzoate, p-ethyl hydroxybenzoate, ethyl naphthol, 4-phenyl phenol, 2,4-dichlorobenzene oxygen ethanoic acid (2,4-D) and diphenyl ether in orange by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The samples were extracted by ether and purified by activated carbon column and analyzed on a reversed phase C₁₈ column using 55% CH₃OH-45% H₂O (pH 3) as mobile phase with a Diode array detector at 208 nm. The calibration curves showed good linear relationship between the peak areas and concentrations of 6 preservatives in the range of 1.2~4.0 μg/mL, with correlation coefficients more than 0.999. Standard addition recovery ranged from 85.65% to 106.50% with relative standard deviation (RSD) from 2.36% to 6.78%. The limit of detection of ethyl naphthol was 0.5 μg/kg and the other five were 1.0 μg/kg. The method was simple, rapid and accurate, with high sensitivity and reproducibility, which was suitable for the analysis of the 6 preservatives mentioned above in orange.

Key words: HPLC; orange; preservatives; residue amount

防腐保鲜剂可以延长水果的保质期, 并且使水果的外观看起来比较鲜亮, 但是防腐保鲜剂多为化学防腐剂, 过量使用可能会给人们的身体健康带来巨大的危险^[1-3]。近年来有研究表明, 目前使用的防腐保鲜剂中 2,4-D、对羟基苯甲酸酯类及其钠盐、联苯醚和乙萘酚等对人体有一定的毒性^[4-9]。《食品添加剂使用标准》(GB2760-2011) 也对鲜水果中允许使用的保鲜剂种类及最大使用量、残留量作了明确的规定^[10]。因此, 加强对鲜水果中防腐保鲜剂的残留量的监管是非常必要的。

对羟基苯甲酸酯(甲酯、乙酯)、2,4-二氯苯氧乙

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 广东省惠州市科技局资助项目(2011g031)

作者简介: 奉夏平(1975-), 男, 工程师, 主要从事食品分析与检测技术研究

酸(2,4-D), 联苯醚、乙萘酚和 4-苯基苯酚是常用的鲜水果保鲜剂, 广泛应用于水果的防霉和杀菌处理, 以保持水果的新鲜和成色。采用色谱法以及色谱-质谱法对对羟基苯甲酸酯、2,4-D, 乙萘酚和 4-苯基苯酚残留量进行分别测定的方法已有报道^[11-14], 联苯醚作为柑橘类水果专用的防腐保鲜剂, 对其残留量进行测定的方法报道不多, 能同时对上述 6 种保鲜剂进行提取以及定量检测的方法则还未见报道。对每种防腐剂进行独立提取和测定, 耗时耗力, 不利于样品的批量分析。

本研究对柑橘中的对羟基苯甲酸酯(甲酯、乙酯)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D), 联苯醚、乙萘酚和 4-苯基苯酚 6 种防腐保鲜剂的提取和净化条件进行了优化, 建立了能同时测定这 6 种物质的高效液相色谱方法, 该方法具有较高的准确度和精密度, 可为柑橘中上述

6种防腐保鲜剂残留量的测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Agilent 1200 型液相色谱仪配二极管阵列检测器 (DAD); 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq 反相柱, 规格: 4.6×250 mm×5 μm。平行蒸发仪为 BüCHI Syncore。

标准品的购置: 对羟基苯甲酸甲酯 (99%)、对羟基苯甲酸乙酯 (99%) 和联苯醚 (99%), 购于百灵威科技有限公司; 乙萘酚 (99%)、4-苯基苯酚 (99.5%) 和 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D, 99%) 均购于美国 Dr Ehrenstorfer GmbH 公司; 丙酮、甲醇、乙酸乙酯均为色谱纯, 正己烷、二氯甲烷、乙醚为分析纯。活性炭小柱 (Supeclean™ ENVITM-Carb SPE Tubes, 3 mL, 0.25 g) 和 0.45 μm 有机滤膜均购于广州市华馨科学仪器有限公司。

1.2 标准溶液配制

储备液: 准确称取对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、乙萘酚、4-苯基苯酚、2,4-D 和联苯醚标准品各 0.05 g (精确到 0.001 g), 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 混匀。配制成浓度为 1.0 mg/mL 的储备液保存于 4 °C 冰箱。

工作溶液: 储备液用甲醇逐级稀释, 配制成浓度为 0.4、0.8、1.2、2.0、3.0、4.0 μg/mL 的工作溶液。

1.3 样品制备

1.3.1 提取

将柑橘去皮去籽, 称取 100 g 柑橘果肉放入捣碎机中捣碎, 搅拌均匀后待用。称取 2.0 g 样品 (精确至 0.001 g) 放入 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙醚, 涡旋振荡 2 min 后再超声提取 5 min, 加入 2.0 g 氯化钠再次涡旋 2 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取有机相。再分 2 次加入 10 mL 乙醚, 涡旋振荡 2 min 后离心 5 min (转数同上), 合并有机相。取 20 mL 有机相于平行蒸发仪 (压力 689 mbar) 上浓缩至约 1 mL, 用于净化处理。

1.3.2 净化

采用活性炭小柱净化。活性炭小柱先用 2 mL 丙酮:乙酸乙酯溶液 (体积比为 1:1) 活化, 将待净化液倒入固相萃取柱后用 5 mL 丙酮:乙酸乙酯溶液 (体积比为 1:1) 洗脱。洗脱液用氮气吹至近干, 用甲醇定容至 1 mL, 0.45 μm 有机滤膜过滤后供高效液相色谱

分析。

1.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-Aq 反相柱, Agilent 4.6×250 mm×5 μm; 流动相为甲醇:水 (55:45, 磷酸调节 pH≈3); 等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 28 °C; 检测波长为 208 nm; 进样量为 15 μL。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

以甲醇-水 (80:20) 为流动相时, 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、乙萘酚、4-苯基苯酚和 2, 4-D 保留时间短, 未能与溶剂峰分开; 以甲醇-水 (55:45) 为流动相时, 上述 5 种物质虽然都能与溶剂峰分开, 但是它们之间的分离度较差, 有重叠; 以酸性甲醇水 (55:45, 磷酸调节 pH≈3) 为流动相时, 6 种目标物质均得到了较好的分离效果。为此, 选择酸性甲醇-水 (55:45, 磷酸调节 pH≈3) 为流动相。

2.1.2 检测波长的选择

用二极管阵列检测器在 200~600 nm 之间对 6 种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 230 nm 处具有较高的灵敏度, 4 个组分在 258 nm 处具有较高的灵敏度, 而 6 个组分在 208 nm 处均具有较高的灵敏度, 因此选择 208 nm 作为检测波长。以酸性甲醇-水 (55:45, 磷酸调节 pH≈3) 为流动相, 检测波长为 208 nm, 6 种标准物质的液相色谱图见图 1。

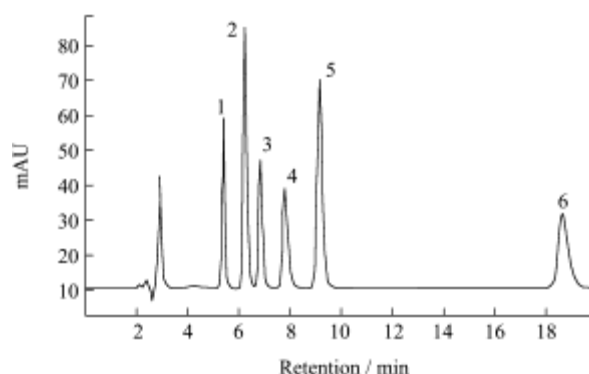


图 1 6 种混合标物 (4 μg/mL) 的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of 6 mixed standard substances (4 μg/mL)

注: 1: 对羟基苯甲酸甲酯; 2: 乙萘酚; 3: 对羟基苯甲酸乙酯; 4: 2,4-D; 5: 4-苯基苯酚; 6: 联苯醚。

2.2 目标物的提取及净化

2.2.1 提取溶剂的选择

6 种目标物均较易溶于醇、醚等多种有机溶剂，分别选用正己烷、乙酸乙酯、乙醚和二氯甲烷为提取溶剂进行回收率试验。结果表明，以正己烷和乙酸乙酯为提取溶剂时，联苯醚的回收率稍差，低于 70%，而以乙醚和二氯甲烷为提取溶剂时，6 种目标物的回收率均较好，在 80~120%之间。考虑到二氯甲烷毒性较大，故选用乙醚作为提取溶剂。

2.2.2 净化条件的选择

考察了两种固相萃取柱包括活性炭小柱和 C₁₈ 柱的净化效果，发现活性炭小柱去除样品中色素的效果优于 C₁₈ 小柱，且其对目标物的吸附能力也强。对 6 种目标物进行洗脱时，探讨了洗脱溶剂及体积对目标物洗脱效率的影响，结果见图 2。

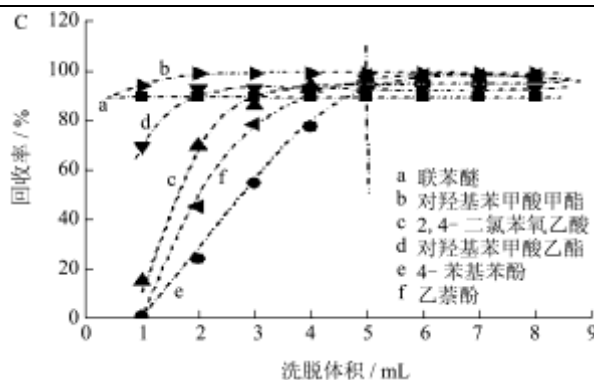


图 2 洗脱溶剂及体积对标准物质洗脱效率的影响

Fig.2 Effect of elution solvent and volume on standard substance elution efficiency

注：A：乙酸乙酯；B：丙酮；C：丙酮：乙酸乙酯=1:1；a：联苯醚；b：对羟基苯甲酸甲酯；c：2,4-D；d：对羟基苯甲酸乙酯；e：4-苯基苯酚；f：乙萘酚。

联苯醚和对羟基苯甲酸甲酯、乙酯较容易洗脱，乙酸乙酯对 2,4-D 的洗脱能力优于丙酮，而丙酮对乙萘酚和 4-苯基苯酚的洗脱能力优于乙酸乙酯。8 mL 的乙酸乙酯和丙酮洗脱后，6 种目标物的回收率均可达到 90% 以上。将乙酸乙酯和丙酮等体积混合后洗脱效果更佳，可将洗脱体积从 8 mL 降低至 5 mL。为此，选择活性炭小柱进行净化，丙酮：乙酸乙酯溶液（体积比为 1:1）为洗脱液。

2.3 工作曲线及检测限

在确定的色谱条件下对质量浓度为 0.0、0.4、0.8、1.2、2.0、3.0、4.0 μg/mL 的混合标准品分别进行测定，以各组分的峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X, μg/mL) 进行线性回归，结果见表 1。6 种标准物质在 1.2~4.0 μg/mL 范围内呈良好线性关系，相关系数均可达到 0.999。以信噪比 S/N=3 计算 6 种标准物质的检测限，乙萘酚为 0.5 mg/kg，对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、2,4-D、4-苯基苯酚和联苯醚的检测限为 1.0 mg/kg。

表 1 6 种标准物质的工作曲线及检出限

Table 1 Working curve and detection limits of six standard substances

编号	保留时间 /min	组分	线性方程	线性相关系数 R ²	检出限 /(mg/kg)
1	5.382	对羟基苯甲酸甲酯	Y=64.322X+1.391	0.99990	1.0
2	6.224	乙萘酚	Y=190.691X+0.900	0.99999	0.5
3	6.825	对羟基苯甲酸乙酯	Y=63.636X-0.222	0.99998	1.0
4	8.433	2,4-D	Y=42.203X+0.364	0.99995	1.0
5	9.115	4-苯基苯酚	Y=75.518X-0.261	0.99997	1.0
6	18.684	联苯醚	Y=31.220X+2.264	0.99910	1.0

2.4 方法回收率及精密度

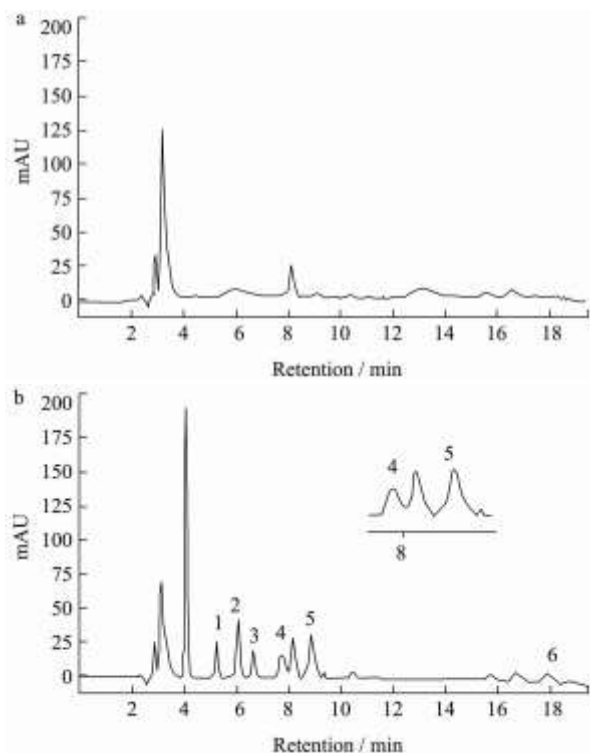


图3 柑橘及加标后的高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of orange standard addition recovery

表2 柑橘中6种标准物质的加标回收率和精密度分析 (n=5)

Table 2 Addition recovery and RSD of the six standard substances in orange

组分	本底值 (mg/kg)	加标浓度 (mg/kg)	测定结果 (n=5)				平均值	RSD /%	回收 率/%	
对羟基苯甲酸甲酯	0	2	2.028	1.896	2.079	2.01	2.007	2.004	3.34	94.80~103.95
对羟基苯甲酸乙酯	0	2	1.935	1.944	1.908	2.024	1.989	1.96	2.36	95.40~101.20
乙萘酚	0	2	2.13	1.899	1.914	1.983	1.77	1.9392	6.78	88.50~106.50
2,4-D	0	2	1.833	2.06	2.082	1.926	2.016	1.9834	5.20	91.65~104.10
4-苯基苯酚	0	2	2.1	1.968	1.938	1.923	2.019	1.9896	3.61	96.15~105.00
联苯醚	0	2	1.797	1.713	1.747	1.847	1.963	1.8134	5.39	85.65~98.15

参考文献

[1] 聂继云, 李静, 李海飞, 等. 我国水果防腐保鲜剂的使用及其检测方法[J]. 植物保护, 2007, 33(6): 26-30
Nie Y F, Li J, Li H F, et al. Use and detection method of fruit preservatives in China [J]. Plant Protection, 2007, 33(6): 26-30

[2] Droby S, Chalutz E, Wilson CL. Antagonisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables [J]. Postharvest News and Information, 1991, (2): 169-173

[3] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917

注: a: 柑橘空白样品; b: 柑橘添加浓度为 2 μg/mL 的 6 种混合标物; 1: 对羟基苯甲酸甲酯; 2: 乙萘酚; 3: 对羟基苯甲酸乙酯; 4: 2,4-D; 5: 4-苯基苯酚; 6: 联苯醚。

在柑橘样品中添加 2 μg/mL 的混合标物, 经上述方法提取、净化处理后进行 HPLC 测定, 样品空白和样品加标的高效液相色谱图如图 3 所示, 结果表明: 在此色谱条件下能很好的将这 6 种目标物质分离。

本研究按测量值和真实值计算回收率, 5 次重复计算变异系数, 加标回收率及精密度结果见表 2。6 种标准物质的平均回收率在 85.65~106.50% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.36~6.78%。

3 结论

本研究建立了能同时快速检测柑橘中 6 种防腐保鲜剂残留量的高效液相色谱分析方法, 6 种物质分别为对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸甲乙酯、乙萘酚、2,4-D、4-苯基苯酚和联苯醚。方法的加标回收率在 85.65~106.50% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.36~6.78%, 乙萘酚的检出限为 0.5 mg/kg, 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、2,4-D、4-苯基苯酚和联苯醚的检测限为 1.0 mg/kg。此方法具有操作简便、快速、重复性好等优点, 可以满足对柑橘中上述 6 种防腐保鲜剂残留量的检测要求。

[4] 耿志明, 陈明, 王冉, 等. 高效液相色谱法测定柑橘中 2,4-二氯苯氧乙酸残留[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(1): 67-70
Geng Z M, Chen M, Wang R, et al. Determination of the residual amount of 2,4-D in orange by HPLC [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2007, 23(1): 67-70

[5] 陈皓, 何乔桑, 王萍亚, 等. 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[J]. 色谱, 2009, 27(6): 804-808
Chen K, He Q S, Wang P Y, et al. Determination of the residual amount of p- hydroxybenzoate in fruit and jam [J]. Chromatographia, 2009, 27(6): 804-808

- [6] Routledge EJ, Parker J, Odum J, et al. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998, 153 (1): 12-19
- [7] 艾尔肯·依不拉音,李明,李兴,等.乌鲁木齐市场水果、蔬菜中防腐剂联苯、邻苯基苯酚和噻苯咪唑的残留分析[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(2): 128-132
- Arkin I, Li M, Li X, et al. Residue analysis of biphenyl, o-phenylphenol and thiabendazole in fruits and vegetables of Urumqi market [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(2): 128-132
- [8] Balakrishnan S, Eastmond DA. Evaluation of hyperdiploidy in the bladder epithelial cells of male F344 rats treated with ortho-phenylphenol [J]. *Mutation Research*, 2003, 537 (1): 11-20
- [9] Carballo MA, Hick AS. Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2006, 26(4): 293-300
- [10] 周建科,韩朝家,唐翠琴,等.固相分散萃取-液相色谱法测定番茄酱中 2-萘酚[J]. *食品工程*, 2011, 63(1): 57-58
- Zhou J K, Han C J, Tang C C, et al. Determination of 2-naphthol in tomato ketchup by Dispersive solid phase extraction-HPLC [J]. *Food Engineer*, 2011, 63 (1): 57-58
- [11] GB 2760-2011, 《食品添加剂使用标准》 [S]
- GB 2760-2011. Standards for uses of food additive [S]
- [12] Li X Q, Ji C, Sun Y Y, et al. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 692-700
- [13] Li X Q, Ji C, Sun Y Y, et al. Accurate screening for synthetic preservatives in beverage using high performance liquid chromatography with time of flight mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 608(2): 165-177
- [14] Li X Q, Ji C, Yong W, et al. UPLC-PDAD analysis for simultaneous determination of ten synthetic preservatives in foodstuff [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(1-2): 57-63