

高效液相色谱法测定酱油、醋中苯甲酸、山梨酸含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定酱油、醋中苯甲酸、山梨酸的含量。色谱条件: C_{18} 4.6×250mm, 5 μ m, 流速为 1.0mL/min, 柱温为 35°C, 进样量为 10 μ L, 检测波长为 230nm。实验结果: 苯甲酸和山梨酸在测定浓度范围内具有良好的线性关系 ($R^2=0.9998$); 苯甲酸和山梨酸的仪器检出限均小于 0.2 μ g/mL, 仪器定量限均小于 0.4 μ g/mL。按照标准规定称样量进行测定, 测定结果满足《GB 5009.28-2016 食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》中高效液相色谱法的检出限为 0.005g/kg 和定量限为 0.01g/kg 的要求。

关键词: 苯甲酸;山梨酸

苯甲酸又名安息香酸, 一种芳香酸类有机化合物, 以游离态或以苯甲酸盐、酯的形式广泛存在于自然界, 有杀菌和抑制细菌生长的作用, 且低毒无味, 因而它们广泛地用作防腐剂。在食品工业中, 苯甲酸, 苯甲酸钠可作酱油, 泡菜、苹果酒、果汁、饲料等的防腐剂。

山梨酸又称为 2,4-己二烯酸。山梨酸和山梨酸钾是国际上应用最广的防腐剂, 具有较高的抗菌性能, 抑制霉菌的生长繁殖, 广泛用于食品、饮料、酱菜、烟草、医药、化妆品、农产品等行业。还应用于防腐剂、防霉剂、虫剂配制及合成橡胶工业; 霉菌和酵母菌的抑制剂; 食品防霉剂; 干性油类变性剂, 杀菌剂。

苯甲酸、山梨酸在《GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中对于酱油和醋的添加限量有明确的规定, 均为 1.0g/kg。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

甲醇: 色谱纯;

乙酸锌: 分析纯;

亚铁氰化钾: 分析纯;

乙酸铵: 色谱纯;

冰乙酸: 色谱纯

乙酸锌溶液（质量浓度为 183g/L）：准确称取 220g 乙酸锌溶于少量水中，加入 30mL 冰乙酸，用水定容至 1000mL，混匀备用；

亚铁氰化钾溶液（质量浓度为 92g/L）：准确称取 106g 亚铁氰化钾于 1L 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀备用；

乙酸铵溶液（20mmol/L）：准确称取 1.54g 乙酸铵于 1000mL 容量瓶中，用水溶解并定容至 1000mL，混匀备用；

苯甲酸钠标准品：CAS 号：532-32-1，纯度为 99.9%；

山梨酸钾标准品：CAS 号：590-00-1，纯度为 99.9%；

苯甲酸标准储备液：准确称取一定量的苯甲酸钠标准品于 10mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，配制成苯甲酸浓度为 821.230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存；

山梨酸标准储备液：准确称取一定量的山梨酸钾标准品于 10mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，配制成山梨酸浓度为 723.321 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存；

苯甲酸、山梨酸混合标准工作液：将苯甲酸、山梨酸标准储备液用水稀释并定容配制成标准工作液，苯甲酸系列浓度依次为 0.821 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.642 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8.212 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16.425 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、41.06280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、82.123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 164.246 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；山梨酸系列浓度依次为 0.723 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.447 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.617 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7.233 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、14.466 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36.166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、72.332 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 144.664 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；微孔滤膜：0.22 μm ，水相。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡器；

离心机：转速不低于 4000r/min；

超声波清洗机；

离心管：10mL、50mL，带盖；

容量瓶：10mL、50mL、1000mL，棕色带刻度。

3 测定步骤

3.1 样品前处理

样品提取：称取 5g（精确至 0.001g）样品于 50mL 容量瓶中，加水 25mL，涡旋混匀，于

50°C水浴超声20min，冷却至室温后加亚铁氰化钾（3.8）2mL和乙酸锌溶液（3.7）2mL，用水定容至刻度，于4000r/min离心5min，取上清液过膜，待液相色谱测定。

3.2 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 4.6×250mm，5μm 或者相当的色谱柱；
- b) 流动相：乙酸铵溶液（3.9）：甲醇=95:5；
- c) 柱温：35°C；
- d) 进样量：10μL；
- e) 流速：1.0mL/min；
- f) 波长：230nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件（5.2）进行采集，苯甲酸、山梨酸混合标准溶液（苯甲酸浓度为16.425μg/mL，山梨酸浓度为14.466μg/mL）的色谱图如图1所示，积分结果如表1所示。

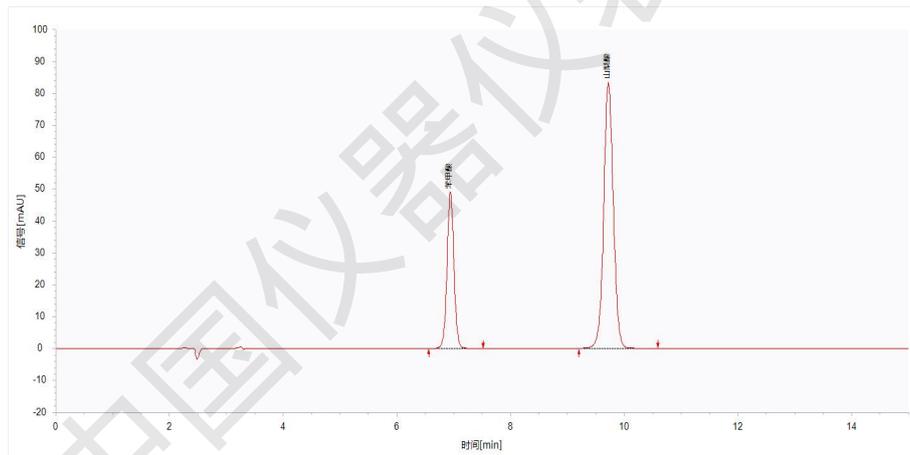


图1 苯甲酸、山梨酸混合标准溶液的色谱图

表1 苯甲酸、山梨酸混合标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因子
苯甲酸	6.942	409.771	48.913	16534	-	1.09
山梨酸	9.725	978.418	83.298	16603	10.75	1.03

由表1可知，苯甲酸的理论塔板数为16534，拖尾因子为1.09，山梨酸的理论塔板数为16603，拖尾因子为1.03，具有较好的峰型。

将苯甲酸、山梨酸混合标准溶液连续进样7针，叠加的色谱图如图2所示，结果见表2。

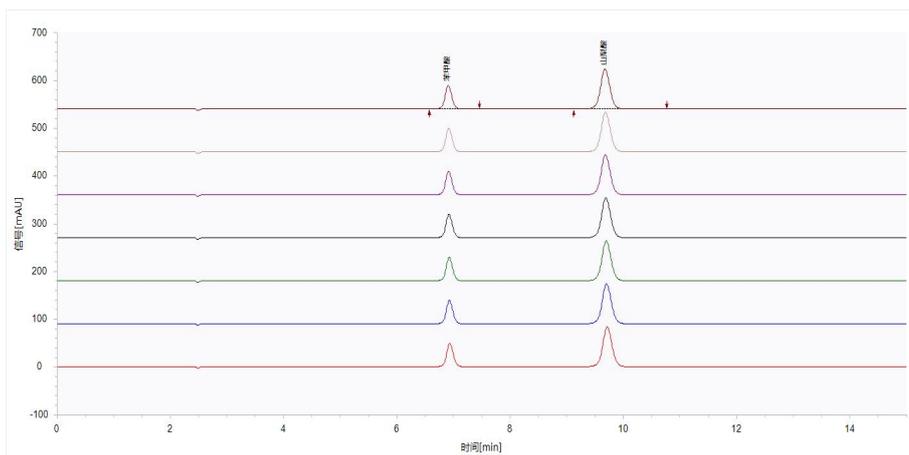


图 2 苯甲酸、山梨酸混合溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 苯甲酸、山梨酸混合溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%	
苯甲酸	保留时间	6.942	6.933	6.933	6.925	6.925	6.925	6.917	6.929	0.117
	峰面积	409.488	409.433	409.547	409.675	409.656	409.590	409.463	409.550	0.023
山梨酸	保留时间	9.717	9.708	9.700	9.692	9.692	9.692	9.683	9.698	0.119
	峰面积	978.747	978.182	977.524	977.636	977.653	977.742	978.253	977.962	0.046

由表 2 可知, 苯甲酸、山梨酸混合溶液连续进样 7 针, 苯甲酸保留时间的 RSD 为 0.117%, 峰面积的 RSD 为 0.023%; 山梨酸保留时间的 RSD 为 0.119%, 峰面积的 RSD 为 0.046%。

4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

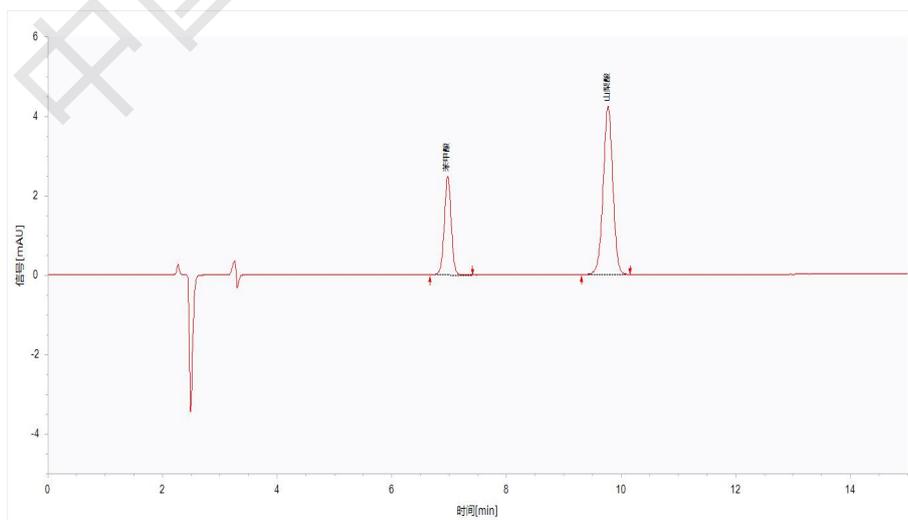


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

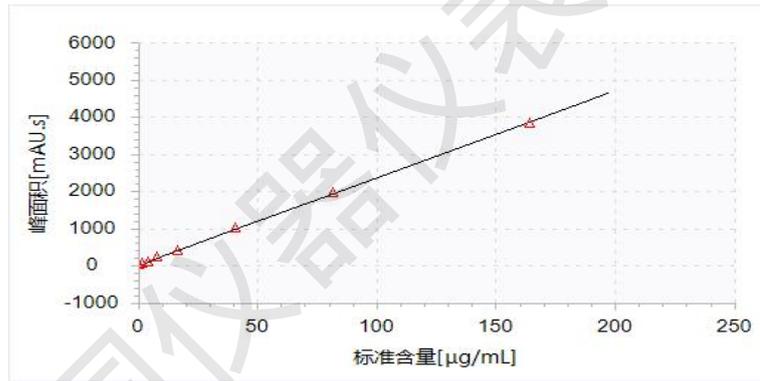
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
苯甲酸	0.887	2.489	0.022	113.1	0.024	0.078
山梨酸	0.770	4.249	0.022	193.1	0.012	0.040

由表 3 可知，苯甲酸的仪器检出限为 $0.024\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.078\mu\text{g/mL}$ ，山梨酸的仪器检出限为 $0.012\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.040\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线

将配制好的苯甲酸、山梨酸混合溶液（3.14）在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及相关系数见图 4 及图 5，叠加色谱图见图 6。苯甲酸和山梨酸在测定浓度范围内，曲线的相关系数 R^2 均达到 0.9998，线性关系良好。



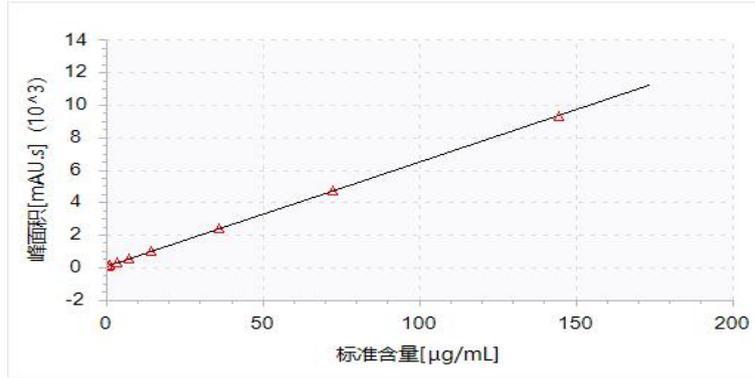
方程式 $y=23.54248*x$

相关系数(R) 0.99991655

确定系数(R^2) 0.99983311

最大方差 21.202174

图 4 苯甲酸标准溶液的校准曲线



方程式 $y=64.50154*x$

相关系数(R) 0.99994994

确定系数(R²) 0.99989988

最大方差 40.38488

图5 山梨酸标准溶液的校准曲线

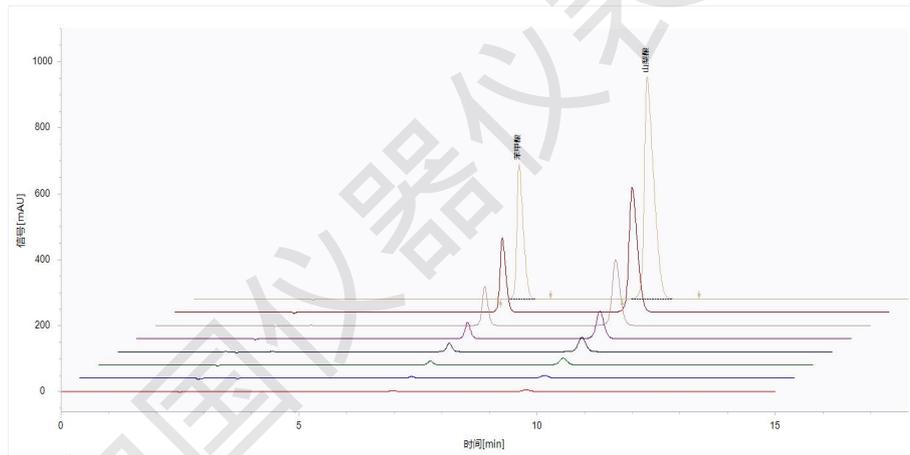


图6 苯甲酸、山梨酸标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

4.3.2 样品含量测定

以客户提供的酱油、醋作为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理，并根据样品的含量，对样品进行加标回收实验。按照公式（1）进行计算，样品的色谱图及样品加标的色谱图如图 7-图 10 所示。

$$\omega = \frac{C \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \quad \text{---公式 (1)}$$

式中： ω ---为样品中苯甲酸或山梨酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ---为通过校准曲线计算的样品中苯甲酸或山梨酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ---为样品的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ---为样品质量，单位为克（g）；

f ---为稀释倍数；

1000---为换算系数。

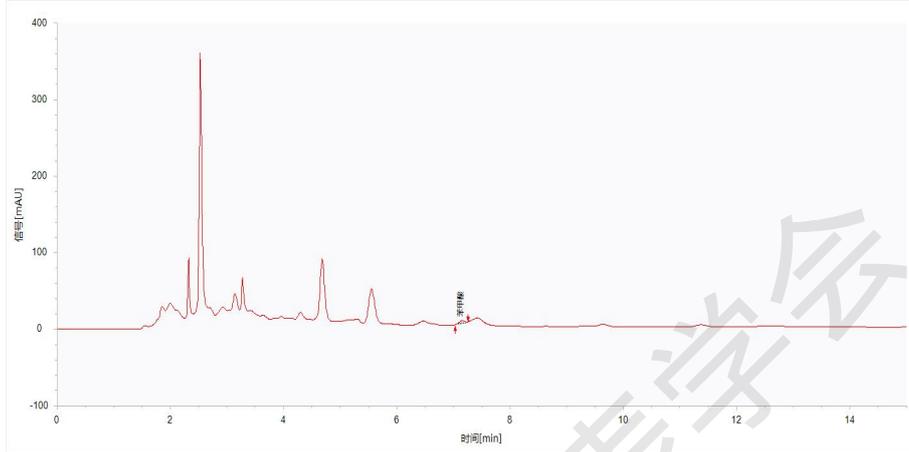


图 7 酱油样品的色谱图

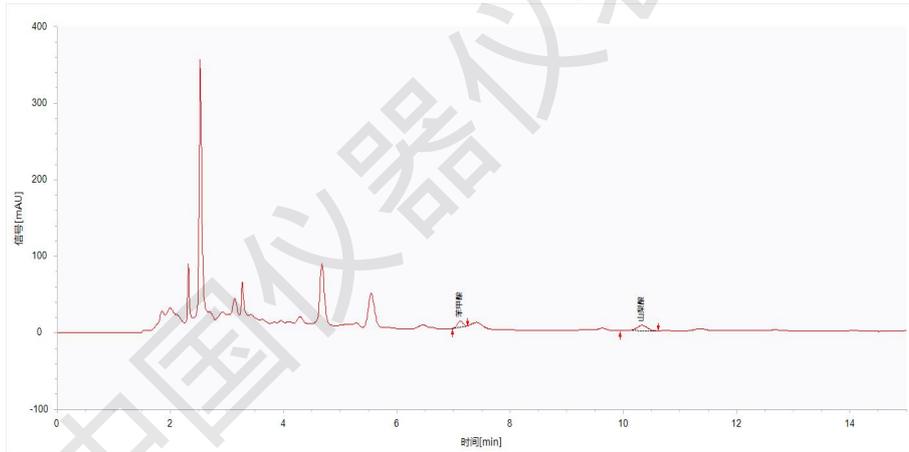


图 8 酱油样品加标的色谱图

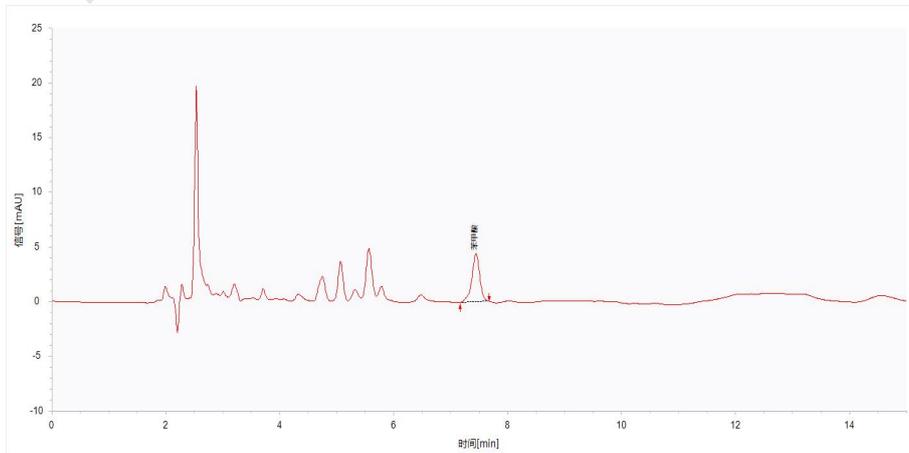


图 9 醋样品的色谱图

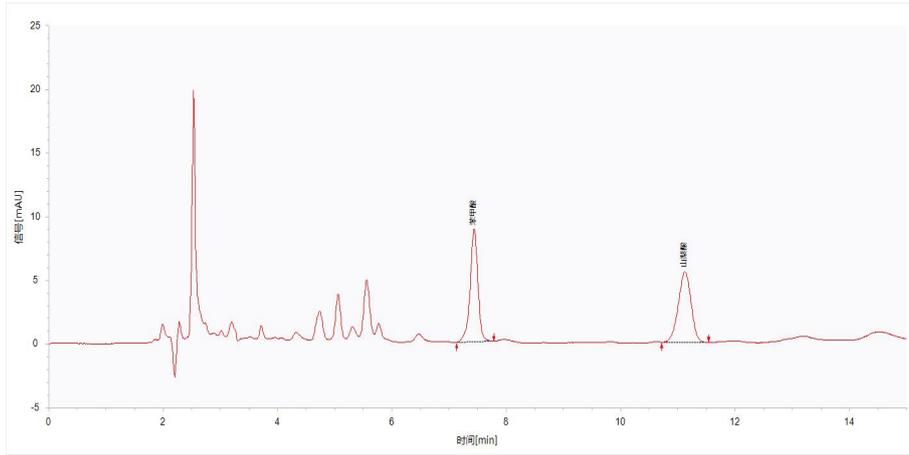


图 10 醋样品加标的色谱图

表 4 酱油样品中苯甲酸、山梨酸含量

	苯甲酸	山梨酸
酱油样品	0.0103g/kg	未检出
酱油样品加标	0.0241g/kg	0.0147g/kg
回收率	85.1%	102.5%

表 5 醋样品中苯甲酸、山梨酸含量

	苯甲酸	山梨酸
醋样品	0.0193g/kg	未检出
醋样品加标	0.0359g/kg	0.0134g/kg
回收率	102.5%	92.8%

(注：结果仅供参考，可能受实验环境等因素的影响)

经计算，此酱油样品中苯甲酸的含量为 0.0103g/kg，山梨酸的含量为未检出，醋样品中苯甲酸的含量为 0.0193g/kg，山梨酸的含量为未检出（注：结果仅供参考，可能受实验环境等因素的影响）。

5 结果和讨论

5.1 结论

通过对苯甲酸、山梨酸的峰型、重复性、灵敏度、线性的测试以及对酱油、醋样品中苯甲酸、山梨酸的含量进行测定，实验结果表明：用 K2025 测定苯甲酸、山梨酸，苯甲酸峰的理论塔板数为 16534，对称因子为 1.09，山梨酸峰的理论塔板数为 16603，对称因子为 1.03，峰型良好；在测定浓度范围内，苯甲酸、山梨酸具有良好的线性关系，确定系数 R^2 均大于 0.9998；重复性测试中，连续进样 7 针，苯甲酸、山梨酸保留时间的 RSD 均小于 0.12%，峰

面积的RSD均小于0.05%，定性定量均有良好的重复性；苯甲酸的仪器检出限为0.024 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为0.078 $\mu\text{g/mL}$ ，山梨酸的仪器检出限为0.012 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为0.040 $\mu\text{g/mL}$ ；酱油样品中苯甲酸的含量为0.0103g/kg，山梨酸的含量为未检出，醋样品中苯甲酸的含量为0.0193g/kg，山梨酸的含量为未检出。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《GB 5009.28-2016 食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定（第一法）》中使用高效液相色谱法测定苯甲酸、山梨酸含量的需求。

5.2 讨论

根据《GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》的规定，苯甲酸与山梨酸是允许在酱油和醋中进行添加的，且限量均为1.0g/kg，如下图所示，则这两个样品均为合格样品。如果，样品宣称为“零添加”，则这两种样品为不合格样品。

附 1:

苯甲酸及其钠盐 benzoic acid, sodium benzoate
 CNS号 17.001,17.002 INS号 210,211
 功能 防腐剂

食品分类号	食品名称	最大使用量/(g/kg)	备注
03.03	风味冰、冰棍类	1.0	以苯甲酸计
04.01.02.05	果酱(罐头除外)	1.0	以苯甲酸计
04.01.02.08	蜜饯凉果	0.5	以苯甲酸计
04.02.02.03	腌渍的蔬菜	1.0	以苯甲酸计
05.02.01	胶基糖果	1.5	以苯甲酸计
05.02.02	除胶基糖果以外的其他糖果	0.8	以苯甲酸计
11.05	调味糖浆	1.0	以苯甲酸计
12.03	醋	1.0	以苯甲酸计
12.04	酱油	1.0	以苯甲酸计
12.05	酱及酱制品	1.0	以苯甲酸计
12.10	复合调味料	0.6	以苯甲酸计
12.10.02	半固体复合调味料	1.0	以苯甲酸计
12.10.03	液体复合调味料(不包括 12.03, 12.04)	1.0	以苯甲酸计

山梨酸及其钾盐 sorbic acid, potassium sorbate
 CNS号 17.003,17.004 INS号 200,202
 功能 防腐剂、抗氧化剂、稳定剂

食品分类号	食品名称	最大使用量/(g/kg)	备注
12.03	醋	1.0	以山梨酸计
12.04	酱油	1.0	以山梨酸计

附 2

相关产品信息

名称	设备型号	仪器配置
悟空 HPLC	K2025	K2025 P2 二元高压输液泵

K2025 AS 自动进样器

K2025 CO 柱温箱

K2025 UVD 紫外-可见光检测器

Wookinglab 色谱工作站

中国仪器仪表学会