

高效液相色谱法同时测定豆制品中 4种对羟基苯甲酸酯的研究

徐爱萍¹, 何鹏妍¹, 金米聪²

(1. 浙江省宁海县疾病预防控制中心, 浙江宁海 315600 2 浙江省宁波市疾病预防控制中心, 浙江宁波 315000)

[摘要] 目的: 建立豆制品中对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯等防腐剂的高效液相色谱同时测定方法。方法: 样品经甲醇/水(50:50, V/V)提取后, 采用 C₁₈ 色谱柱, 以乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH=5.5)/乙腈为流动相, 采用梯度洗脱分离, 在紫外 226 nm 波长进行检测。结果: 4种对羟基苯甲酸酯的加标回收率在 87.0%~99.8% 范围, 其相对标准偏差在 1.6%~4.9% 范围, 在 0.1 mg/L~25.0 mg/L 范围均具有良好的线性, 其回归系数均大于 0.999 检出限(LOD)均为 0.2 mg/kg 最低定量检出限(LOQ)为 0.7 mg/kg。结论: 本方法简便、灵敏、重现性好, 能满足豆制品中对羟基苯甲酸酯类残留的监测要求。

[关键词] 液相色谱法; 豆制品; 防腐剂; 对羟基苯甲酸酯; 残留测定

[中图分类号] O657.7+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)04-0829-03

Simultaneous analysis of four p-hydroxybenzoate preservatives in soybean products by high-performance liquid chromatography

XU Ai-ping¹, HE Peng-yan¹, JIN Mi-cong²

(1. Ninghai Center for Disease Control and Prevention, Ninghai 315600, China; 2. Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315000, China)

[Abstract] **Objective** To set up an assay for the simultaneous analysis of four p-hydroxybenzoate preservatives such as methylparaben, ethylparaben, propyl p-hydroxybenzoate and butyl p-hydroxybenzoate in soybean products by high-performance liquid chromatography. **Methods** After the p-hydroxybenzoates were extracted by methanol/water (50:50, V/V), the sample was separated on a C₁₈ column by a mobile phase consisting of ammonium acetate-acetate acid (0.02 mol/L, pH=5.5)/acetonitrile in gradient elution. Detection was carried out by an ultraviolet detector at 226 nm. **Results** Calibration curves of the four preservatives were linear within the range of 0.1 mg/L~25.0 mg/L with correlation coefficients of more than 0.999, the limits of detection (LOD) were 0.2 mg/kg and the limits of quantification (LOQ) were 0.7 mg/kg. The extraction recoveries were between 87.0%~99.8%, and the RSDs were between 1.6%~4.9%. **Conclusion** This method is simple, sensitive, and accurate and was suitable for monitoring the p-hydroxybenzoates residues in soybean products.

[Key words] High-performance liquid chromatography; Soybean products; Preservatives; P-hydroxybenzoates; Residue analysis

对羟基苯甲酸酯是一类新一代高效低毒消毒杀菌防腐剂, 它的抗菌能力比苯甲酸和山梨酸及其盐类强, 应用 pH 范围比苯甲酸和山梨酸及其盐类广, 用量比苯甲酸和山梨酸及其盐类低得多, 并且使用安全, 经济方便, 对人体刺激较小。但 Routledge 等^[1]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%。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)^[2-3]、毛细管电泳法^[1]和气相色谱法^[4-5]等。GB/T 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^[5], 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 (对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯), 从而限制了它的使用范围。高效液相色谱和高效液相色谱质谱联用法是目前主要的食品安全检测方法并且已有广泛的应用^[6-10]。有关豆制品中对羟基苯甲酸酯的液相色谱法测定尚未见报道。本文建立了液相色谱法同时测定豆制品中的 4 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂含量的方法, 用于豆制品中防腐剂的监测, 获得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

乙腈、乙酸均为 HPLC 级 (德国 Merck 公司), 乙酸铵为分析纯; 所有的溶剂使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤; 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯标准品 (>98.0%, Sigma 公司);

[作者简介] 徐爱萍 (1959-), 女, 副主任技师, 主要从事理化检测研究工作。

对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯标准贮备液(1.0 mg/ml):分别准确称取 10.0 mg 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯标准品于 4 个 10 ml 容量瓶中,分别用少量乙腈溶解后,并用乙腈定容至刻度;

实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

1.2 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括四元泵、在线真空脱气机、紫外检测器、柱温箱、自动进样器及 Breeze 化学工作站(美国 Waters 公司);全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters 公司);SB25-12D 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司);5 号砂蕊漏斗;Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm);流速:1.0 ml/min;柱温:35°C;流动相:流动相为乙酸-乙酸铵缓冲溶液(0.02 mol/L, pH = 5.5)乙腈,梯度洗脱程序:其中乙腈:0 → 3.0 min 保持 30%;3.0 min → 7.0 min 乙腈 30% → 80%;7.0 min → 15.0 min 乙腈保持 80%。紫外检测波长为 226 nm,进样体积:20 μl

1.4 样品处理

将样品剪碎混匀或捣碎匀浆,取混匀后的试样 10.0 g 放入烧杯中,加甲醇/水(50/50 V/V)50 ml 超声提取 10 min 后,提取液用 5 号砂蕊漏斗过滤转移至 100 ml 容量瓶中,再用甲醇/水(50/50 V/V)25 ml 重复提取,合并提取液并用纯水定容至刻度,经 0.45 μm 滤膜过滤后,注入 HPLC 进行测定。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

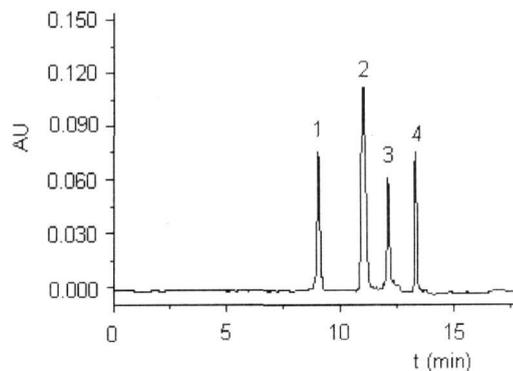
以纯乙腈作为流动相时,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯两两未能达到完全分离,增加流动相中乙酸-乙酸铵缓冲溶液的含量,4 种对羟基苯甲酸酯的分离度显著增大,但对羟基苯甲酸丁酯的出峰时间过长,当以 V(乙腈)/V(水) = 75:25 的流动相等度洗脱时,对羟基苯甲酸丁酯的出峰时间超过了 40 min 故考虑采用梯度洗脱。本文采用梯度洗脱,流动相为乙酸-乙酸铵缓冲液(0.02 mol/L, pH = 5.5)乙腈,梯度洗脱程序:其中乙腈:0 min → 3.0 min 保持 30%;3.0 min → 7.0 min 乙腈 30% → 80%;7.0 min → 15.0 min 乙腈保持 80%。获得了较好的分离效果,在 15 min 内可使 4 种组分完全分离,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯的保留时间分别为 8.95 min、11.05 min、12.13 min 和 13.62 min 见图 1。

2.2 流速的选择

分别选择流速为 0.5 ml/min、0.8 ml/min、1.0 ml/min 和 1.5 ml/min 进行试验。流速为 0.5 ml/min 时,4 种待测物虽然能完全分开,但是分析时间太长,峰形过宽,灵敏度下降。流速为 1.5 ml/min 时,虽然出峰时间短,峰形尖锐,但是两两之间难以分离。本研究选择流速为 1.0 ml/min,4 种对羟基苯甲酸酯防腐剂能完全分开,分析时间适宜,峰形好,灵敏度高。

2.3 检测波长的选择

分别对 4 种对羟基苯甲酸酯在 190 nm ~ 400 nm 之间进行全波长扫描,尽管它们的紫外吸收峰有一定的差异,但在



1-对羟基苯甲酸甲酯;2-对羟基苯甲酸乙酯;3-对羟基苯甲酸丙酯;4-对羟基苯甲酸丁酯

图 1 4种对羟基苯甲酸酯的标准谱图

205 nm、226 nm 和 272 nm 处均有 3 个特征吸收峰,吸收强度依次增大,但我们在试验中发现 272 nm 处干扰较多,综合考虑吸收强度及干扰因素,选择 226 nm 作为检测波长,在此波长下各组分均有较好的检测灵敏度。

2.4 线性范围及检出限

准确吸取浓度为 1.0 mg/ml 的对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯各 1.0 ml 于 10 ml 容量瓶中,用乙腈+乙酸-乙酸铵缓冲溶液(10+90 V/V)定容至 10 ml 此混合中间液的浓度为 0.10 mg/ml,分别吸取混合中间液 0.01 ml、0.05 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.5 ml 和 2.5 ml 用乙腈+乙酸-乙酸铵缓冲溶液(10+90 V/V)定容至 10 ml 配成浓度分别为 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L 和 25.0 mg/L 的标准溶液系列。按所述的色谱条件进样 20 μl 进行分析,获得不同质量浓度下各组分的峰面积,以质量浓度(C, mg/L)对峰面积(A)进行线性回归,结果见表 1。由表 1 可知,4 种对羟基苯甲酸酯防腐剂在 0.1 mg/L ~ 25.0 mg/L 范围均具有良好的线性,其相关系数均大于 0.999。同时采用不含对羟基苯甲酸酯的空白样品进行检测,按色谱峰高为噪声高 3 倍(S/N = 3)相对应的浓度为检出限(LOD),结果表明豆制品中 4 种待测物的 LOD 均为 0.2 mg/kg,按 10 倍(S/N = 10)相对应的浓度为最低定量检出限(LOQ),豆制品中 4 种待测物的 LOQ 均为 0.7 mg/kg 见表 1。

表 1 各组分的线性范围及检出限

化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 (r)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
对羟基苯甲酸甲酯	0.1~25.0	A = 112.03C - 1.28	0.9992	0.2	0.7
对羟基苯甲酸乙酯	0.1~25.0	A = 135.29C - 1.65	0.9994	0.2	0.7
对羟基苯甲酸丙酯	0.1~25.0	A = 103.41C - 2.03	0.9992	0.2	0.7
对羟基苯甲酸丁酯	0.1~25.0	A = 107.32C - 1.22	0.9991	0.2	0.7

2.5 方法的回收率与精密度

取一定量的不添加任何防腐剂的空白豆制品样品,加入一定量的对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯的标准溶液,使其最终的添加浓

度为 1.0 mg/kg、10.0 mg/kg 和 100.0 mg/kg 然后按 1.4 方法处理, 进样分析, 平行测定 6 次, 计算其回收率, 结果见表 2。由表 2 可知, 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯的回收率在 87.0% ~ 99.8% 范围, RSD 在 1.6% ~ 4.9% 范围, 表明本方法具有较好的回收率和测定精密度。

表 2 回收率与精密度试验

化合物	加入量 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
对羟基苯甲酸甲酯	1.0	0.93 ± 0.03	93.0	3.3
	10.0	9.43 ± 0.15	94.3	1.6
	100.0	98.5 ± 1.76	98.5	1.8
对羟基苯甲酸乙酯	1.0	0.87 ± 0.03	87.0	3.4
	10.0	9.44 ± 0.41	94.4	4.3
	100.0	88.3 ± 1.52	88.3	1.7
对羟基苯甲酸丙酯	1.0	0.97 ± 0.04	97.0	4.2
	10.0	9.45 ± 0.47	94.5	4.9
	100.0	99.8 ± 1.91	99.8	1.9
对羟基苯甲酸丁酯	1.0	0.98 ± 0.04	98.0	4.1
	10.0	9.33 ± 0.29	93.3	3.1
	100.0	88.8 ± 1.58	88.8	1.8

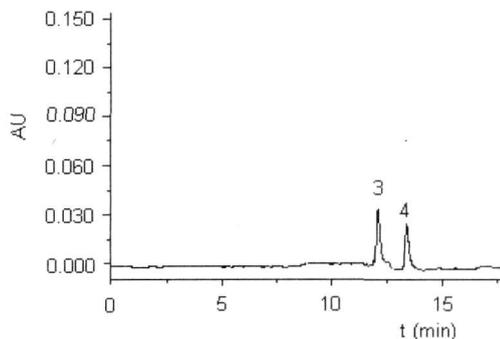
2.6 样品分析

采用本方法, 分别对市售的腐乳、豆腐皮、五香豆腐干和豆腐等样品进行了检测, 结果见表 3。由表 3 可知, 市售的腐乳、豆腐皮、五香豆腐干和豆腐等豆制品中均含有一定量的对羟基苯甲酸酯, 其含量在 0 mg/kg ~ 172.0 mg/kg 范围, 图 2 给出了豆腐样品的色谱图。

表 3 实际样品检测结果 (n = 5)

化合物	样品名称 (mg/kg)			
	腐乳	豆腐皮	五香豆腐干	豆腐
对羟基苯甲酸甲酯	ND	24.0 ± 1.7	85.6 ± 2.4	ND
对羟基苯甲酸乙酯	172.0 ± 4.5	ND	ND	ND
对羟基苯甲酸丙酯	63.7 ± 2.3	55.9 ± 2.7	ND	43.9 ± 1.5
对羟基苯甲酸丁酯	ND	ND	52.0 ± 1.2	46.5 ± 0.6

注: ND 代表小于检出限



3- 对羟基苯甲酸丙酯; 4- 对羟基苯甲酸丁酯
图 2 豆腐样品色谱图

3 结论

建立的高效液相色谱测定方法可同时测定豆制品中 4 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂, 具有准确、快速、简便的优点, 能用于豆制品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂的实际监测。

[参考文献]

[1] Routledge E.J, Parker J, Odum J, et al. Some alkylhydroxybenzoate preservatives (parabens) are estrogenic [J]. Toxicol Appl Pharm, 1998, 153(1): 12- 19

[2] 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.

[3] 王美丽, 陈海婷, 张会娜, 等. 高效液相色谱测定肉制品中五种邻苯二甲酸酯 [J]. 分析试验室, 2009, 28(6): 49- 53

[4] 沈昊宇, 应丽艳, 曹云峰, 等. 固相萃取 - 气相色谱 / 质谱法同时测定化妆品中的邻苯二甲酸酯和对羟基苯甲酸酯 [J]. 色谱, 2007, 25(2): 272- 275

[5] GB/T 5009.31- 2003 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定方法 [S].

[6] 陈晓红, 仇佩虹, 金米聪, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱柱后衍生法测定水中痕量 N - 甲基氨基甲酸酯 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 9- 11.

[7] 吕文妮, 陈晓红, 金米聪. 鼠药杀鼠酮和异杀鼠酮的离子阱质谱快速鉴定方法 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(5): 965- 967.

[8] 陈晓红, 蔡美强, 金米聪. 高效液相色谱 - 离子阱质谱快速鉴定茚满二酮类鼠药 [J]. 卫生研究, 2010, 39(5): 586- 590.

[9] 陈晓红, 盛雪飞, 金米聪. 超快速液相色谱 - 串联质谱联用法测定牛奶中 8 种孕激素残留研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 2671- 2675

[10] 陈晓红, 金米聪. 采用液相色谱 - 串联质谱法检测血清中痕量异杀鼠酮 [J]. 中华预防医学, 2010, 44(11): 1060- 1063

(收稿日期: 2011- 01- 10)