

# 高效液相色谱-质谱联用法 测定饮料中的苯甲酸含量<sup>①</sup>

洪爱华<sup>②</sup> 尹平河 马义<sup>a</sup> 梁志红

(暨南大学分析测试中心 广州市黄埔大道西 601 号 510632)

<sup>a</sup>(暨南大学生物工程研究所 广州市黄埔大道西 601 号 510632)

**摘要** 建立了高效液相色谱-质谱联用法检测饮料中的苯甲酸。选用 ZORBAX XDB-C<sub>18</sub> 柱 (50mm × 2.1mm, 3.5μm) 为分析柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速为 200μL · min<sup>-1</sup>; 质谱条件选用气动辅助电喷雾离子源 (ESI), 检测方式为负离子多离子反应检测 (MRM); 苯甲酸校准曲线线性范围为 1—500μg/L; 方法加标回收率为 92.5%—97.9%; 相对标准偏差为 3.13%—6.94% (n=5); 方法检出限为 0.1μg/L (以 3 倍信噪比为检出限)。结果表明该方法简便、准确、灵敏、特异, 适用于饮料中苯甲酸的测定。

**关键词** 高效液相色谱-质谱联用法; 苯甲酸; 饮料

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)02-0970-03

## 1 引言

苯甲酸常作为防腐剂广泛添加到饮料中, 但过量摄入苯甲酸对人体造成危害, 因此国家标准 GB 2760-2007 《食品添加剂使用卫生标准》<sup>[1]</sup> 对其最高限量作了规定, 需要对其含量进行检测, 确保消费者的食用安全。目前我国关于饮料中苯甲酸的分析主要是按照国家标准 GB/T 5009.29-2003 《食品中山梨酸、苯甲酸的测定方法》进行<sup>[2]</sup>, 该标准规定苯甲酸的含量测定采用气相色谱法和液相色谱法。由于单纯的色谱法只通过保留时间进行定性, 专属性和特异性较差, 易产生假阳性或假阴性结果。本文用固相萃取法进行样品前处理, 高效液相色谱-串联质谱联用仪的多离子反应检测扫描方式能更准确的定性定量, 此检测目前国内未见报道, 效果满意。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂和材料

ABI4000 Q TRAP 三级四极杆质谱仪(美国 AB 公司), 配有电喷雾离子源 (ESI); 1100 液相色谱系统(美国 Agilent 公司); Mill-Q A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

苯甲酸标准品(纯度 ≥ 99.9%, 美国 Sigma 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司)。实验用水为超纯水(蒸馏水经过超纯水系统制备)。

### 2.2 分析条件

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX XDB-C<sub>18</sub> 柱(50mm × 2.1mm, 3.5μm, 美国 Agilent 公司); 流动相为梯度洗脱程序: 0min, 53% 水 : 47% 乙腈; 1.5 min, 40% 水 : 60% 乙腈; 2.01—8min,

① 广东省自然科学基金(9451063201002336; 10151063201000058)

② 联系人, 电话: (020) 85220280 或 (020) 85220435; E-mail: hah\_angel@126.com

作者简介: 洪爱华(1977—), 女, 广东省汕头市人, 实验师, 硕士, 主要从事仪器分析和化学分析方面的工作。

收稿日期: 2011-01-23; 接受日期: 2011-01-28

53% 水 : 47% 乙腈; 流速为  $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量  $5 \mu\text{L}$ 。

质谱条件: 电喷雾 ESI 离子源; 气帘气:  $0.10 \text{MPa}$ ; 雾化气 (GAS1):  $0.38 \text{MPa}$ ; 加热辅助气 (GAS2):  $0.38 \text{MPa}$ ; 碰撞气 CAD: 高; 喷雾电压 IS:  $-4500 \text{V}$ ; 雾化温度:  $500^\circ\text{C}$ ; 检测方式: 负离子多离子反应检测 (MRM); 定性定量离子对:  $m/Z$  121/77。

### 2.3 样品预处理

取  $1 \text{mL}$  样品, 用 50% 乙腈和 50% 水溶液定容为  $500 \text{mL}$ , Waters 固相萃取仪为固相萃取辅助装置, Waters Oasis HLB 柱 ( $3 \text{mL}$ ,  $60 \text{mg}$ , 美国 Waters 公司) 依次用甲醇和水各  $2 \text{mL}$  活化, 取稀释样  $5 \text{mL}$ , 减压恒速通过 SPE 柱, 然后用水  $2 \text{mL}$  清洗小柱, 抽干, 最后用甲醇  $2 \text{mL}$  洗脱, 收集洗脱液<sup>[3]</sup>,  $35^\circ\text{C}$  水浴氮气流下吹干, 残留物用流动相 (乙腈 : 水 =  $47 : 53, V/V$ )  $1 \text{mL}$  充分溶解后, 过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜, 取  $5 \mu\text{L}$  进样, 进行 HPLC-MS/MS 分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 液相色谱分析方法的优化

色谱柱选择 ZORBAX XDB-C<sub>18</sub> 柱 ( $50 \text{mm} \times 2.1 \text{mm}$ ,  $3.5 \mu\text{m}$ ), 考察甲醇、乙腈、超纯水、乙酸铵等多种流动相组合条件<sup>[4-7]</sup>, 发现流动相为乙腈-超纯水梯度洗脱时, 苯甲酸的基质干扰少, 质谱响应信号较强。在该条件下, 苯甲酸保留时间为  $1.18 \text{min}$ , 其色谱图见图 1。

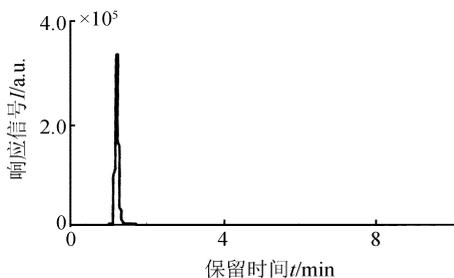


图 1 苯甲酸的 MRM 谱图

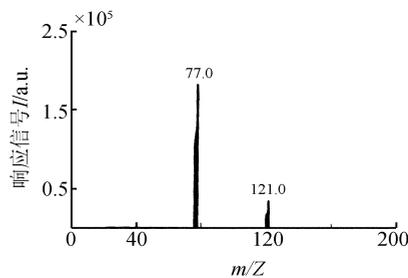


图 2 苯甲酸的 MS/MS 谱图

### 3.2 质谱分析方法的优化

苯甲酸容易失去质子带负电荷, 以苯甲酸标准溶液在质谱 ESI 离子源上正负电压模式同时进行 Q1 全扫描, 证实负电压模式的质谱信号比正电压模式的信号强, 故选择负离子检测模式。苯甲酸的一级质谱丰度最高的离子峰是  $m/Z$  121.0 ( $[\text{M} - \text{H}]^-$ ), 对母离子作二级质谱 (见图 2), 碎片  $m/Z$  77 是苯甲酸母离子丢失甲酸根 ( $[\text{M} - \text{COO}^-]$ ) 形成的。选择丰度较高的子离子进行负离子多离子反应监测 (MRM), 在 MRM 模式优化质谱参数后, 选择  $m/Z$  121.0/77.0 为定性定量分析的离子对。以保留时间、母离子和子离子作为定性分析标准, 使方法的专属性更强, 有效避免了样品基体杂质的干扰。

### 3.3 样品前处理条件的优化

采用固相萃取方法操作简便快速, 能获得良好的富集倍数, 回收率高, 能减少样品干扰峰和缩短测定时间。对比不同的洗脱液, 发现甲醇比乙腈、二氯甲烷洗脱效果好。

### 3.4 线性范围、线性方程与检出限

配制一系列浓度为  $1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  系列标准溶液, 对方法的线性范围进行了实验, 以测得的峰面积  $y$  对浓度  $x$  作直线回归, 线性关系良好, 校准曲线回归方程为:

$y = 27800x + 24400, r = 0.9998$ ; 定量检出限为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.5 方法的回收率和精密度

采用 2.3 节实验方法, 分别添加不同水平的苯甲酸标准溶液, 每个浓度的平行样为 5 份, 将添加标样处理后的样品上机测定, 其不同添加水平的回收率及精密度取得理想效果, 结果见表 1。

表 1 苯甲酸标样不同添加水平的回收率及精密度 ( $n=5$ )

化合物	添加水平 $w$ (mg/L)	平均回收率 (%)	RSD (%)
苯甲酸	5	92.5	6.94
	50	97.9	3.13
	500	96.1	4.72

### 3.6 实际样品的测定

采用本方法测定国家实验室比对实验中果汁饮料的苯甲酸含量, 结果为  $133.5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 采用国家标准方法中液相色谱法所得结果为  $134.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 本方法所得结果与国家标准方法测得的结果基本一致, 符合要求。

## 4 结论

本研究建立的高效液相色谱-质谱联用法测定饮料中的苯甲酸不需要复杂的衍生化操作, 前处理方法简便, 测定方法准确、灵敏度高。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国国家标准汇编. 食品添加剂使用卫生标准[S]. GB 2760-2007. 北京: 中国标准出版社, 2007. 90—182.
- [2] 中华人民共和国国家标准汇编. 食品中山梨酸、苯甲酸的测定方法[S]. GB/T 5009.29-2003. 北京: 中国标准出版社, 2003. 233—236.
- [3] 陈春祝, 谢维平, 曾志定等. 固相萃取-高效液相色谱法测定 6 种常见食品添加剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 49—50.
- [4] 罗志刚, 唐昊天, 孙伯文等. 高效液相色谱法同时测定饮料中合成色素、甜味剂和防腐剂[J]. 实用预防医学, 2010, 17(8): 1656—1658.
- [5] 余明池, 汪道发. 反相高效液相色谱法同时测定饮料中 10 种添加剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 241—242.
- [6] 景立新, 张岩, 张黎黎等. 高效液相色谱法同时测定饮料中苯甲酸和山梨酸[J]. 光谱实验室, 2008, 25(3): 352—355.
- [7] 倪蓉, 杨龙彪, 张燕等. 高效液相色谱法同时测定果味饮料中 8 种添加剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(10): 1196—1197.

## Determination of Benzoic Acid in Drink by HPLC-MS/MS

HONG Ai-Hua YIN Ping-He MA Yi<sup>a</sup> LIANG Zhi-Hong

(Experimental Technology Center, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

<sup>a</sup>(Bio-Engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

**Abstract** A method for the determination of the content of benzoic acid in drink was established by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). ZORBAX XDB-C18 column (50mm × 2.1mm, 3.5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-water at flow rate of  $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  and gradient elution. Gas auxiliary electrospray ionization source (ESI) was used to detect the benzoic acid by the negative electrospray ionization and multiple reaction monitoring mode (MRM). The calibration curve of benzoic acid was linear in the range of  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the detection of limitation was  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The recovery was 92.5%—97.9%, and the RSD was 3.13%—6.94%. The method is accurate, sensitive, and specific, and suitable for determination of benzoic acid in drink.

**Key words** HPLC-MS/MS; Benzoic Acid; Drink