

Analysis and Investigation of Benzoic Acid in Food*

Xiaoyu Li, Na Jiang, Shongtao Niu, Hui Wang, Guanghao Li[#]

Dalian Nationalities University, Dalian
Email: #lghao@dlnu.edu.cn

Received: Jul. 4th, 2013; revised: Aug. 2nd, 2013; accepted: Aug. 10th, 2013

Copyright © 2013 Xiaoyu Li et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: In the paper, based on the situations nowadays, with the common preservative-benzoic acid as the inspection object and ginseng extract/ginseng beard as raw material, the content of benzoic was detected rapidly by means of solid phase extraction-HPLC. The optimal chromatographical conditions to detect benzoic in ginseng extract and ginseng beard were confirmed. The analytical method of solid phase extraction-HPLC to detect benzoic acid in ginseng extract and ginseng beard was investigated. The linear relationship was satisfying with the correlation coefficient ≥ 0.9994 , and the detection limit of this method was $0.039 \mu\text{g/mL}$, which meets the requirement of the inspection of benzoic acid content in ginseng extract and ginseng beard.

Keywords: Food; Preservatives; Benzoic Acid

食品中防腐剂苯甲酸的研究与分析*

李小玉, 姜娜, 牛松涛, 王慧, 李光浩[#]

大连民族学院, 大连
Email: #lghao@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2013年7月4日; 修回日期: 2013年8月2日; 录用日期: 2013年8月10日

摘要: 本文以目前最常用的防腐剂——苯甲酸作为检测对象, 运用固相萃取-高效液相色谱-质谱联用法对苯甲酸进行定量定性的快速分析研究。实验确定了检测食品防腐剂苯甲酸的最佳色谱条件, 并用于实际样品人参膏及人参须中苯甲酸的分析检测。苯甲酸分离效果较好, 线性关系良好, 相关系数 ≥ 0.9994 , 其检出限为 $0.039 \mu\text{g/mL}$, 能够满足食品防腐剂苯甲酸含量检测的要求。

关键词: 食品; 防腐剂; 苯甲酸

1. 引言

随着防腐剂使用过量的情况日益严重, 由此引发的食品安全问题受到了人们的越来越广泛的关注^[1-3]。因此发展可靠、快速及灵敏的防腐剂检测技术, 对于保证人类健康有着极其重大的意义, 也成为环境监测和食品检验的重要研究课题。

食品防腐剂是指为食品防腐和食品加工、储运的需要, 加入食品中的化学合成物质或天然物质, 以防止食品因微生物引起的腐败变质, 使食品在一般的自然环境中具有一定的保存期。苯甲酸及苯甲酸钠是我国目前使用最广泛的防腐剂, 其防腐机理是苯甲酸进入细胞体内电离酸化细胞内的碱储, 并抑制细胞的呼吸酶系的活性, 阻止乙酰辅酶 A 缩合反应, 从而达到食品防腐的目的。但超量的苯甲酸具有一定的毒性, 应限量使用。

*基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目资助。

[#]通讯作者。

目前,检测防腐剂苯甲酸的方法主要有分光光度法、薄层色谱法^[4]、毛细管电泳^[5]、气相色谱法^[6]、高效液相色谱法^[7]等。分光光度法和薄层色谱法所用的分析时间长、准确度差;毛细管电泳法尚没有得到普及。本文主要研究建立了固相萃取-高效液相色谱-质谱联用的苯甲酸定量定性分析方法,并通过该方法对实际人参膏样品中苯甲酸进行了检验。实验结果表明,该方法具有分离效果好、回收率高、操作简单、快速等特点,完全能够满足对食品防腐剂苯甲酸检测的要求。

2. 实验部分

2.1. 实验仪器

高效液相色谱/紫外/质谱仪: LC-20AB 系列,配有双泵系统、在线真空脱气装置、UV/MS 检测器、5 μL 六通阀进样器以及 CMB-20A 色谱工作站,日本 Shimadzu 公司。

高效液相色谱柱: 250 mm \times 4.6 mm ID, 5 μm C18 填料,配有保护柱,北京艾杰尔科技有限公司。

十二管柱固相萃取装置: 固相萃取(SPE)SCX 强阳离子交换柱。迪马(DIKMA)公司。

离心机: Primo R 台式高速冷冻离心机,德国贺利氏仪器公司。

2.2. 实验试剂

苯甲酸标准品; 甲醇; 正己烷。色谱纯,美国 Fisher 公司。

苯甲酸标准溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 称取适量苯甲酸标准品,用无水甲醇配制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准贮备溶液,根据需要用色谱级甲醇配制成适合质量浓度的标准工作溶液。

乙酸铵溶液(0.02 mol/L): 称取 0.7710 g 乙酸铵,用超纯水溶解,定容至 500 mL 容量瓶中,使用前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

超纯水,实验用水均为超纯水仪 Milli-Q 制得。

2.3. 实验方法

2.3.1. 仪器工作条件

液相色谱条件: 检测波长 225 nm; 流动相: (甲醇: 0.02 mol/L 乙酸铵为 50%:50%); 流动相流速 0.5

mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 5 μL 。

质谱条件: 电子轰击(EI)离子源温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 质量器温度为 200 $^{\circ}\text{C}$; 检测器电压 1.50 KV; 离子源电压 4.5 KV。使用离子全扫描模式检测,质量扫描范围是 m/z 50~1000,载气为氮气。

2.3.2. 实验方法

在最佳仪器工作条件下测定和绘制 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ ~250 $\mu\text{g}/\text{m}$ 标准溶液的工作曲线,并对该方法准确度和精密度的测量考察; 实际样品分析: 称取 2.0 克样品冷干粉碎后加入 20 mL 甲醇溶液重复超声溶解两次,每次 30 min。再经 9500 r/min 离心 30 min,取其上清液 10 mL 过固相萃取(SPE)交换柱,最后过 0.22 μm 滤膜供高效液相色谱-质谱定量定性分析。

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯甲酸标准样品的高效液相色谱图以及质谱图如图 1、2 所示。

3. 结果与讨论

3.1. 液相色谱条件优化

3.1.1. 流动相的选择

在高效液相色谱中,常用的极性溶剂有甲醇、乙腈等。分别选择甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸铵、乙腈-乙酸铵为流动相。试验结果表明,甲醇-乙酸铵作为流动相分离效果和灵敏度最佳。

3.1.2. 流动相流速的选择

流动相流速加大虽然能缩短实验分析时间,但得不到理想的分离; 流速过小会使分析时间加长,也不能获得理想的峰形。实验研究了 0.2 mL/min、0.5 mL/min、1.0 mL/min 三种流动相流速对分离效果的影响。从色谱图来看,当流速为 0.5 mL/min 时,样品中苯甲酸在 8.5 分钟之内达到完全分离,而且能够获得很好的峰形。

3.2. 固相萃取的选择

3.2.1. 固相萃取柱填料的选择

实验研究比较了不同的固相填料(C18、SCX)的吸附保留能力。将样品用超声处理并离心后取 10 mL 上清液分别过 C18、SCX 柱富集净化,然后进行液相色谱分析。同时将样品添加 2.0 μg 苯甲酸的标准样品,测其样品添加回收率。实验结果表明,选定 SCX 作

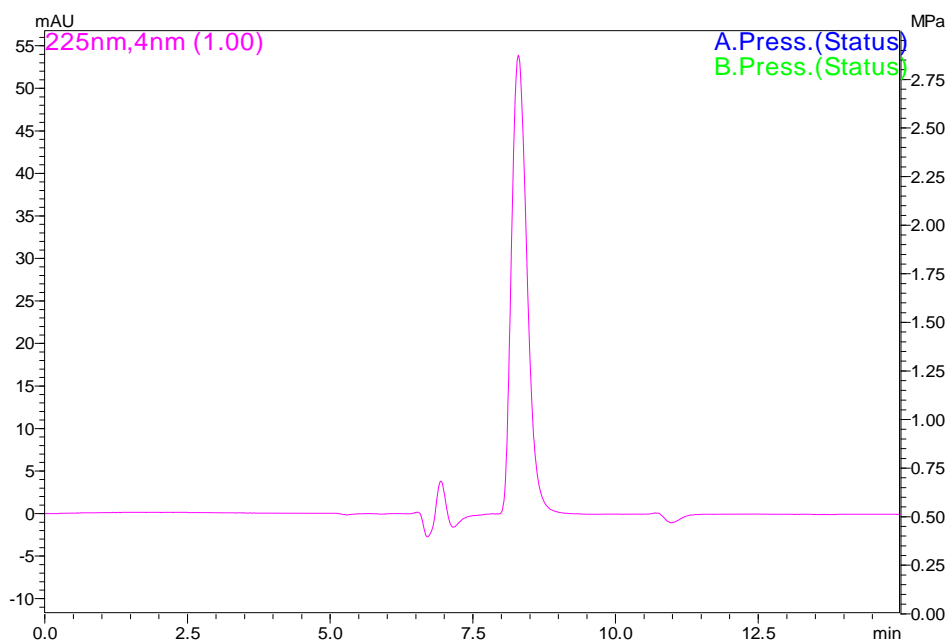


Figure 1. The chromatogram map of benzoic acid
图 1. 20 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲酸标准样品高效液相色谱图

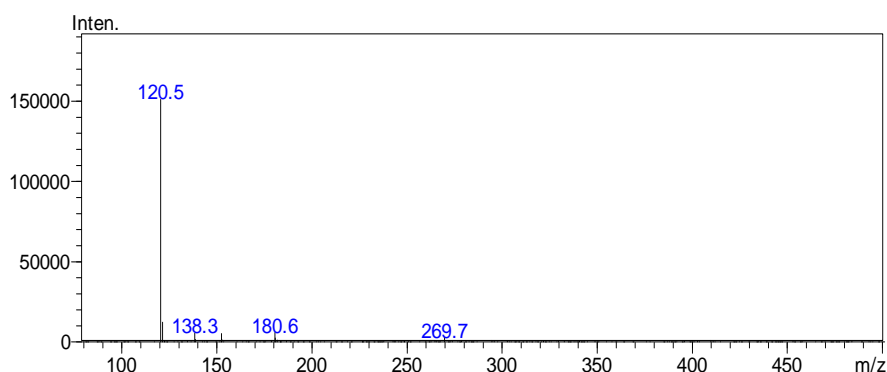


Figure 2. The mass spectrum map of benzoic acid
图 2. 20 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲酸标准样品质谱图

为固相萃取柱的填料效果最好。

3.2.2. 固相萃取洗脱剂的选择

样品进入萃取柱被吸附后，可先用较弱的溶剂将弱保留干扰化合物洗掉，然后再用较强的溶剂将目标物苯甲酸洗脱下来收集。当使用 SCX 固相萃取柱时，分别考察乙腈、丙酮作为洗脱液的分离效果。实验数据表明，乙腈的洗脱能力要好于丙酮。

3.3. 分析方法

3.3.1. 标准工作曲线

将配制的苯甲酸标准储备液逐级稀释，分别配制

成浓度为：1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。用高效液相色谱进样 5 μL 分析，取其多次测量值的平均值。以峰高与标准样品浓度作图得标准工作曲线，如图 3 所示。苯甲酸的线性回归方程为 $Y = 2900.9X - 926.25$ ，线性回归系数为 0.9994。

3.3.2. 分析方法的检出限

采用信噪比(N/S)的 3 倍作为方法的检出限。仪器的噪声由空白样品的液相色谱图基线确定，由此计算出苯甲酸的检出限为 0.039 $\mu\text{g/mL}$ ，可以满足日常食品防腐剂苯甲酸含量的检测要求。

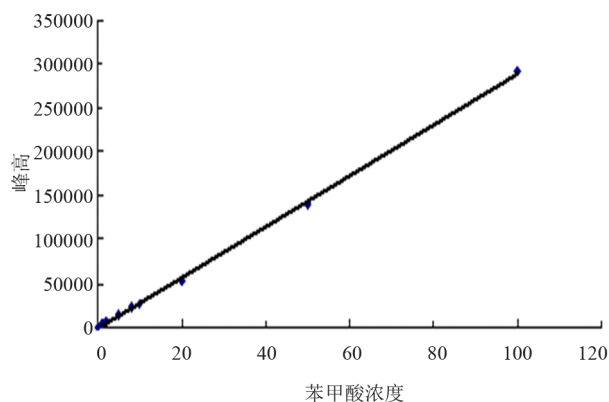


Figure 3. The standard curve of benzoic acid
图 3. 苯甲酸标准曲线图

3.3.3. 分析方法的回收率和精密度

取实际样品两份,测定其样品中苯甲酸的含量,再分别添加 2 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两个浓度水平的苯甲酸标准样品检验其分析方法的准确度(回收率)。同时每个浓度水平重复测定 5 次,计算其分析方法的精密度(RSD)(如表 1)。

4. 实际样品分析

从工厂分别采集成品人参膏、原料人参根须及提取剂乙醇三种样品,预处理后分别测定三种样品的苯甲酸含量。结果如表 2 所示。

分析结果表明,三种样品中,原料人参须中苯甲酸含量未检出,而人参膏中检出苯甲酸 66.52 $\mu\text{g/g}$,同时提取剂乙醇中也有苯甲酸被检出 78.33 $\mu\text{g/g}$,均已超过国家标准规定的苯甲酸含量(60 $\mu\text{g/g}$)。由此推断成品人参膏中苯甲酸含量超标来源于提取剂乙醇中含有杂质苯甲酸。

5. 结语

本文不但建立了一种快速、简单、准确、灵敏度的高效液相色谱-质谱法的进出口商品检测防腐剂苯品,获得了较高的回收率和精密度。同时应用于食

Table 1. Results for precision and recovery of benzoic acid in ginseng (n = 5)

表 1. 人参样品的添加回收率和精密度(n = 5)

样品编号	浓度($\mu\text{g/mL}$)	精密度(%)	回收率(%)
1	2	3.8	91.76
	50	1.3	97.23
2	2	2.8	92.57
	50	1.6	94.98

Table 2. Analytical data of benzoic acid in sample

表 2. 人参样品的分析结果

样品	1 ($\mu\text{g/g}$)	2 ($\mu\text{g/g}$)	3 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)
人参膏	65.55	67.75	66.26	66.52
人参根须	0	0	0	0
乙醇	78.45	77.38	79.15	78.33

品样品分析,解析了某市出产的人参膏因防腐剂苯甲酸含量超标的原因在于提取剂乙醇中含有苯甲酸杂质,导致产品人参膏中苯甲酸含量超标。

参考文献 (References)

- [1] M. H. Lee, N. W. Su, M. H. Yang, M. L. Wang and Y. M. Choong. A rapid method for determination of free cholesterol in liquids. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 1997, 36: 123-133.
- [2] M. L. Wang, M. H. Lee. Simple and rapid method for the determination of caffeine in beverages. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 1995, 33: 114-123.
- [3] R. Hajkova, P. Solich, M. Pospisilova, et al. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Analytica Chimica Acta, 2002, 467: 91.
- [4] M. Thomassin, E. Cavalli, Y. Guillaume, et al. Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, 15: 831-838.
- [5] 方明, 李勇. 饮料、酱菜中苯甲酸含量的高效毛细管电泳检测方法[J]. 中国食品添加剂, 2005, 8: 156-158.
- [6] 殷德荣. 毛细管气相色谱法同时测定食品中多种防腐剂[J]. 实用预防医学, 2005, 12(1): 168-171.
- [7] 邓小锋. 食品中苯甲酸和山梨酸的分离分析[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 88-90.