

高效液相色谱法同时测定果蔬中 5种防腐杀菌剂

杨 涛, 靳 智, 李 明, 张煌涛

(新疆产品质量监督检验研究院, 新疆 乌鲁木齐, 830004)

摘 要 建立了同时测定果蔬中 5 种防腐杀菌剂(2,4-二氯苯氧乙酸、乙萘酚、乙氧基喹、对苯基苯酚、联苯醚)同时测定的高效液相色谱法。样品用 $V(\text{水}):V(\text{乙醇})=50:50$ 超声萃取, 过固相萃取小柱分离, 浓缩定容, 经 ZORBAX Extend XDB-C₁₈ 柱分离, 以 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=30:70$ (pH=8.0) 为流动相, 采用紫外检测器检测。5 种防腐杀菌剂分离良好并排除了样品中杂质峰的干扰, 加标平均回收率为 95.7%~105% 之间, 相对标准偏差为 0.81%~1.81%。检出限 0.03~0.12 mg/L。

关键词 高效液相色谱法, 防腐杀菌剂, 水果蔬菜

目前, 2,4-二氯苯氧乙酸(果蔬保鲜, 残留量 ≤ 2.0 mg/kg)、乙萘酚(柑橘保鲜, 残留量 ≤ 70 mg/kg)、乙氧基喹(苹果保鲜, 残留量 ≤ 1 mg/kg)、对苯基苯酚(柑橘保鲜, 残留量 ≤ 12 mg/kg)、联苯醚(柑橘保鲜, 残留量 ≤ 12 mg/kg)等广泛用于果蔬的防腐、保鲜^[1]。GB 2760《食品添加剂使用卫生标准》^[2]已规定了其使用范围、最大使用量和允许残留量。除了对乙氧基喹^[3]和 2,4-二氯苯氧乙酸^[4]制定了检验方法, 其他 3 种均没有检验。笔者在实际检验和文献查阅中发现缺乏这 5 种防腐杀菌剂同时检验的检测方法。本文建立了反相高效液相色谱法同时测定这 5 种防腐杀菌剂。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器, 搅拌器(珠海飞利浦电器公司), 匀质器(德国 IKA), 微型混合器(上海沪西仪器厂), 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2,4-二氯苯氧乙酸、乙萘酚、乙氧基喹(Sigma), 对苯基苯酚、联苯醚(Supelco), 甲醇(Fisher), 乙醇、甲酸、氨水、NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 为分析纯, 实验用水为超纯水, Oasis WCX (3cc 60mg 30 μ m) 固相萃取小柱。

标准储备液: 精确称取一定量 2,4-二氯苯氧乙酸、乙萘酚、乙氧基喹、对苯基苯酚、联苯醚于 100mL

棕色容量瓶, 甲醇溶解并定容, 使浓度均为 100 mg/mL, 再用超纯水稀释到 1~50 μ g/mL。

1.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm i. d. 5 μ m, Agilent); 流动相: 甲醇-水(pH=8.0, 0.02mol/L 磷酸盐缓冲体系), 梯度洗脱, 流动相变化见表 1。流速 1.0 mL/min, 初始波长 280 nm, 检测波长变化见表 2。柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

表 1 梯度变化表

时间 /min	流速 /mL \cdot min ⁻¹	水(pH=8.0)/%	甲醇/%	曲线
1 0.00	1.00	70.0	30.0	6
2 8.00	1.00	20.0	80.0	6
3 16.00	1.00	5.0	95.0	6
4 18.00	1.00	70.0	30.0	6
5 20.00	1.00	70.0	30.0	1

表 2 紫外波长变化表

时间/min	事件	通道	数值/nm
2 7.50	波长	通道 A	270
3 8.50	波长	通道 A	258
4 10.00	波长	通道 A	232
5 11.30	波长	通道 A	226

1.3 实验方法

称取均质后的样品 5g, 加 10 mL $V(\text{水}):V(\text{乙醇})=5:5$, 放入 50 mL 具塞聚四氟乙烯离心管中, 超声提取 30 min 后, 在高速离心机上离心 5 min(5 000 r/min), 取上清液 2mL 到预先平衡的 Oasis WCX 固相萃取小柱上, 用 10 mL 质量分数 5% 氨水清洗后, 用 10 mL 2% $V(\text{甲酸}):V(\text{甲醇})=10:9$ 溶

第一作者: 硕士研究生, 工程师。

收稿日期: 2007-12-10, 改回日期: 2008-03-19

液淋洗,收集淋出液浓缩后用甲醇定容到 5 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后待测。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

通过紫外光谱扫描,确定 5 种防腐杀菌剂的最大紫外吸收波长分别为 2,4-二氯苯氧乙酸 280 nm、乙萘酚 270 nm、对苯基苯酚 258 nm、乙氧基喹 232 nm、联苯醚 226 nm。为了增加检测的灵敏度,考虑到 Waters 2487 紫外检测器有波长变化功能,故全都采用最大吸收波长。

2.2 流动相的选择

2.2.1 流动相组成的选择

分别对甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.05 mol/L 乙酸铵)、甲醇-水(pH=2.8,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲体系)、甲醇-水(pH=8.0,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲体系)体系(初始体积均为有机相:无机相=30:70)进行了实验,在甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.05 mol/L 乙醇胺)、甲醇-水(pH=2.8,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液)体系中由于 2,4-二氯苯氧乙酸的酸性使其要不出峰很快,要不就是和其他峰重合,分离效果不理想;而在甲醇-水(pH=8.0,0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液)碱性体系下形成钠盐使其保留时间延长,再通过梯度洗脱和其他物质分开。结果表明水(pH=8.0)70%为初始流动相较为适合。

2.2.2 洗脱程序的设计

使用洗脱程序的主要有 2 个目:(1)把 2,4-二氯苯氧乙酸能和其他物质有效的分离开;(2)缩短联苯醚的保留时间,同时兼顾分离效果和色谱峰形;以 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=30:70$ (pH=8.0,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲体系)为流动相,流速始终保持 1.0 mL/min 的条件下,在前 8 min 以线性变化使甲醇在流动线的体积分数由 30%升到 80%,到 16 min 时甲醇的体积分数在线性变化到 95%,然后在 2 min 中内线性变回初始条件,再平衡 2 min。整个 6 个组分在 13 min 中前以全部完全分离。色谱图如图 1。

2.3 回归方程、线性范围和检出限

准确吸取一定量的标准储备液,用水配制成混合标准溶液,按所选择的色谱条件进样 10 μL ,获得不同质量浓度时 2,4-二氯苯氧乙酸、乙萘酚、乙氧基喹、对苯基苯酚、联苯醚、苯甲醇的峰面积。以质量浓度和峰面积绘制标准工作曲线。根据各组分在仪器响应的信噪比 >10 得出定量最低检出限。各组分

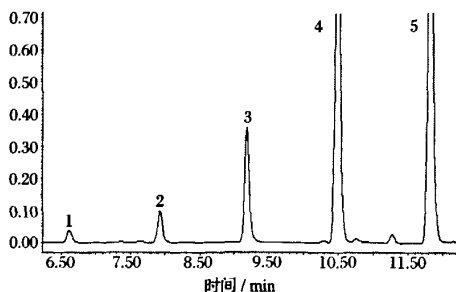


图 1 标准样品中防腐杀菌剂分离色谱图

1, 2,4-二氯苯氧乙酸; 2, 2-乙萘酚; 3, 对苯基苯酚;
4, 乙氧基喹; 5, 联苯醚

的线性方程、相关系数、线性范围及检出限列于表 3。从表 3 中看出各组分在线性范围内,线性关系良好。

表 3 回归方程、线性范围和检出限

组 分	线性范围 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	相关系数	检出限 (mg/L)
2,4-二氯苯氧乙酸	0.5~200	$Y=1\ 820X-438$	0.999 89	0.12
乙萘酚	0.5~500	$Y=2\ 569X-138$	0.999 99	0.05
对苯基苯酚	0.5~500	$Y=1\ 318X-563$	0.999 97	0.03
乙氧基喹	0.5~500	$Y=1\ 108X-785$	0.999 93	0.06
联苯醚	0.5~500	$Y=1\ 594X-446$	0.999 99	0.04

注: y ,峰面积($\text{mV} \cdot \text{s}$); X ,浓度($\mu\text{g/mL}$)。

2.4 方法的回收率和精密度

准确称取 6 份不含被测组分的水果蔬菜样品 5.00 g,分别加入一定量的 5 种组分标准品,按选定的条件进行分析,考察方法的回收率和精密度,结果见表 4。从表 4 中数据可以看出,各组分的回收率在 93.5%~105%之间,相对标准偏差为 0.81%~2.3%。

表 4 回收率和精密度

组分	添加量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	测得量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	回收率 /%	相对标准 偏差/%
2,4-二氯苯氧乙酸	0.05	0.04935	98.7	0.81
乙萘酚	0.01	0.01024	102	1.03
对苯基苯酚	0.01	0.00957	95.7	1.25
乙氧基喹	0.01	0.01048	105	1.64
联苯醚	0.01	0.00983	98.3	0.95

2.5 样品分析

采用本方法从超市,果蔬批发市场随机抽取了 10 批次果蔬进行了分析,测定其中的防腐剂乙萘酚、乙氧基喹、对苯基苯酚、联苯醚和杀菌剂 2,4-二氯苯氧乙酸,从表 5 中可以看出,2,4-二氯苯氧乙酸、乙氧基喹、对苯基苯酚、乙萘酚等还是使用的比较多,典型样品谱图如图 2 和图 3 所示,总体结果列于表 5。

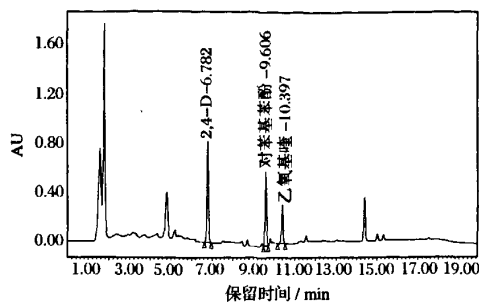


图2 实际样品分析(蜜橘)

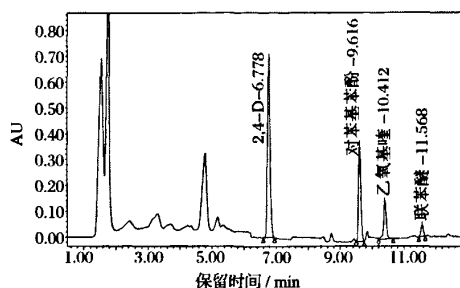


图3 实际样品分析谱图(巴西柑橘)

3 结 论

本文建立的实验方法,5种组分的回收率在95.7%~105%之间,回收率较高;相对标准偏差RSD在0.81%~1.64%之间,方法的精密度较好。通过对实际样品的检测证实该方法切实可行;同时发

现目前有多种防腐杀菌剂混合使用的趋势,因此该检测方法可以应用到果蔬中防腐杀菌剂的检测。

表5 实际样品分析 mg/kg

样品类型 ¹⁾	2,4-二氯苯 氧乙酸	乙萘酚	对苯基苯酚	乙氧基喹	联苯醚
巴西柑橘 1	1.38	0.54	5.67	—	0.21
巴西柑橘 2	0.64	2.37	6.24	—	—
无核蜜橘	1.56	—	10.24	0.55	—
橘子 1	2.59	—	3.17	—	1.28
橘子 2	2.67	—	3.28	—	0.61
苹 果	—	—	—	0.27	—
青蛇果	—	—	—	0.19	—
梨 子	—	—	—	—	—
青 椒	0.20	—	—	—	—
蒜 苔	—	—	—	—	—

注:1)1,2表示不同地点采抽取的同种样品。

参 考 文 献

- 1 胡国华. 食品添加剂在果蔬及糖果制品中的应用 [M]. 北京:化学工业出版社,2005. 6. 55~60
- 2 食品卫生国家标准汇编(5) [M]. 北京:中国标准出版社, 1999. 61~62
- 3 食品卫生检验方法 理化部分(二) [M]. 北京:中国标准出版社,2004. 139~142
- 4 食品卫生检验方法 理化部分(二) [M]. 北京:中国标准出版社,2004. 433~439

Simultaneous Determination of Six Preservatives and Bactericides in Fruits and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography

Yang Tao, Jin Zhi, Li Ming, Zhang Huangtao

(Institute of Xin Jiang Production Quality Inspection, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT An efficient method for analyzing five preservatives and bactericides, namely, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2-naphthalenol, ethoxyquin, p-phenylphenol and diphenylether by high performance liquid chromatography was developed. Samples were extracted with water-methanol (V/V=50/50) by ultrasonic, depurated with SPE, concentrated, separated through ZORBAX Extend XDB-C18 column and determined with UV detector. Methanol-water(pH8.0,V/V=30/70) was used as mobile phase. The average recoveries for the five preservatives and bactericides ranged from 95.7%~105% with relative standard deviations of 0.81~1.81%, and the limits of detection were from 0.03~0.12 mg/L. the method is suitable to simultaneous assay the five preservatives and bactericides in fruits and vegetables with simplicity and accuracy in a single injection.

Key words high performance liquid chromatography, preservatives and bactericides, fruits and vegetables