

HPLC法检测乳品中对羟基苯甲酸酯类和纳他霉素

万 鹏, 赵 贞, 李翠枝*, 邵建波, 王云霞, 刘春霞
(内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要: 建立了乳制品中的对羟基苯甲酸酯类和纳他霉素的高效液相色谱分析方法。样品用甲醇提取后, 使用C₁₈反相色谱柱分离, 以甲醇-醋酸水溶液为流动相, 紫外检测器检测, 检测波长256nm和305nm条件下5种防腐剂在35min之内完全分离。在一定条件下各组分的相关系数均大于0.9990, 线性范围1~100mg/kg, 回收率为83.7%~103%。

关键词: 液相色谱法; 对羟基苯甲酸酯类; 纳他霉素; 乳制品

Determination of Parabens and Natamycin in Dairy Products by HPLC

WAN Peng, ZHAO Zhen, LI Cui-zhi*, SHAO Jian-bo, WANG Yun-xia, LIU Chun-xia
(Inner Mongolia Yili Industrial Group Co. Ltd., Hohhot 010010, China)

Abstract: A method for determining parabens and natamycin in dairy products by HPLC is described. Samples were extracted with methanol and separated on a C₁₈ column with methanol-acetic acid solution as mobile phase. UV detection was performed at 256 nm and 305 nm. Complete separation of pimaricin and four parabens, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate and butyl 4-hydroxybenzoate was achieved within 35 min. Under optimized conditions, the linear ranges for the food antiseptics was 1–100 mg/kg with a correlation coefficient greater than 0.9990, and their average recovery rates from blank real samples spiked at three different levels was between 83.7% and 103%. This method was simple, rapid and accurate.

Key words: HPLC; parabens; natamycin; dairy product

中图分类号: TS252.7

文献标志码: A

文章编号: 1671-5187(2013)03-0009-03

对羟基苯甲酸酯类又称尼泊金酯, 是世界上用量较大的防腐剂, 广泛用于食品、药品和化妆品等方面^[1-8]。纳他霉素是一种抗菌剂, 97年我国卫生部正式批准纳他霉素作为食品防腐剂, 主要应用于乳制品、肉制品、发酵酒、饮料果汁, 方便食品等的生产和保藏^[9-18]。我国对于以上防腐剂在乳制品中的添加限量有严格规定, 因此本实验拟建立一种方法同时测定对羟基苯甲酸酯类和纳他霉素5种防腐剂。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、冰乙酸均为色谱纯; 纳他霉素、对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯和丁酯标准品 美国Sigma公司。

纳他霉素标准贮备液: 准确称取0.01g纳他霉素标准品, 用甲醇溶解并定容至100mL, 质量浓度为100μg/mL, 冷冻保存。对羟基苯甲酸酯类标准贮备液: 分别准确称

取0.05g对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯和丁酯, 用无水乙醇溶解并定容至50mL, 质量浓度为1mg/mL, 冷冻保存。

三氯乙酸溶液: 称取三氯乙酸10g, 加水溶解后定容至1000mL容量瓶。

1.2 仪器与设备

1260液相色谱仪(带紫外检测器) 美国Agilent公司; FX-1200GD分析天平 北京中西远大科技有限公司; M305652超声波仪 上海雅鸿自控设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 测定条件

测定波长: 256nm条件0~12min, 305nm条件12~16min, 256nm条件16~35min; 色谱柱为Welch AQ-C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm); 流速1.0mL/min; 流动相为: A: 800mL水+50mL冰乙酸, B甲醇, A:B为45:55, V/V。

收稿日期: 2013-03-25

作者简介: 万鹏(1982—), 男, 工程师, 硕士研究生, 研究方向为乳制品检验。E-mail: wanpeng@yili.com

*通信作者: 李翠枝(1969—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为乳制品品质安全监控、产品研发。E-mail: lczg@yili.com

1.3.2 样品处理

液态奶样品：称取约10g(精确至0.1mg)样品于50mL容量瓶中，加入25mL甲醇振荡摇匀后用水定容，超声提取10min，混匀，静置10min，滤纸过滤后经0.45μm滤膜过滤，上机测定。

奶粉样品：称取约5g样品于50mL容量瓶中，用15mL 40~50℃水溶解，加入8mL三氯乙酸和20mL甲醇振荡摇匀后用水定容，超声提取10min，混匀，静置10min，滤纸过滤后经0.45μm滤膜过滤，上机测定。

酸奶、冷饮样品：称取约10g样品于50mL容量瓶中，加入8mL三氯乙酸和20mL甲醇振荡摇匀后用水定容，超声提取10min，混匀，静置10min，滤纸过滤，0.45μm滤膜过滤，上机测定。

1.3.3 含量计算公式

$$X = \frac{C \times V}{m}$$

式中：X为试样中对羟基苯甲酸酯类或纳他霉素的含量(μg/g)；C为由标准曲线得到样品溶液中对羟基苯甲酸酯类或纳他霉素的含量(μg/mL)；V为样品溶液定容体积/mL；m为称取样品的质量/g。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及谱图

纳他霉素、对羟基苯甲酸酯类标准工作液：将标准储备液分别用甲醇和水依次稀释成0.5、1.0、2.0、5.0、10.0μg/mL的系列标准溶液，溶液经0.45μm滤膜过滤，上机测定。

5种防腐剂标准曲线和线性关系见表1，由表1中可以看出5种防腐剂浓度和峰面积之间呈线性关系，相关系数均大于0.9990。

表1 5种防腐剂线性关系

Table 1 Linear equations of pimaricin and four parabens

名称	线性回归方程	相关系数
对羟基苯甲酸甲酯	y = 60.37x - 9.33	0.9990
对羟基苯甲酸乙酯	y = 63.85x - 7.56	0.9990
纳他霉素	y = 60.44x - 6.99	0.9991
对羟基苯甲酸丙酯	y = 57.44x - 6.88	0.9990
对羟基苯甲酸丁酯	y = 52.58x - 5.96	0.9990

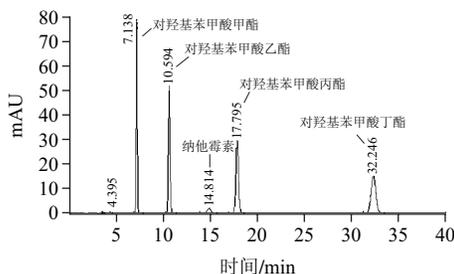


图1 5种防腐剂标准溶液HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standard solution of pimaricin and four parabens

由图1可以看出5种防腐剂完全分离，保留时间分别为7.138、10.594、14.814、17.795、32.246min；图2表明5种防腐剂无杂质峰干扰，可准确定量检测。

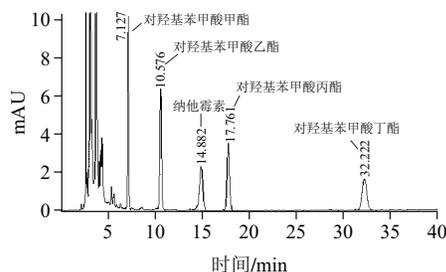


图2 牛奶样品中5种防腐剂的HPLC色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of milk sample

2.2 回收率和精密度实验

在液态奶、酸奶和冷饮的空白样品中加入不同浓度的5种防腐剂，平行测定3次，得出回收率结果见表2。

从表2可以得出，本方法测定不同乳制品中纳他霉素回收率为86%~103%，相对标准偏差(RSD)为3.29%~6.11%；对羟基苯甲酸甲酯回收率为83.8%~101%，RSD为3.85%~6.29%；对羟基苯甲酸乙酯回收率为83.7%~100.8%，RSD为3.06%~6.77%；对羟基苯甲酸丙酯回收率为86.0%~100.2%，RSD为3.43%~6.15%；对羟基苯甲酸丁酯回收率为88.3%~100.7%，RSD为3.26%~5.92%。5种物质均可达到分析要求。

表2 液态奶、酸奶和冷饮中羟基苯甲酸酯类和纳他霉素添加回收率结果
Table 2 Average recovery rates of pimaricin and four parabens from spiked liquid milk, yogurt and ice cream

目标物	添加量/(mg/kg)	纯牛奶		红枣酸奶		火炬冰淇淋	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
对羟基苯甲酸甲酯	1	87.7	5.85	83.8	3.87	88.7	4.41
	5	97.7	4.61	96.0	3.85	91.3	5.50
	10	101	6.29	94.7	4.93	89.5	4.59
对羟基苯甲酸乙酯	1	90.5	4.09	87.3	3.72	83.7	3.27
	5	92.5	6.77	100.8	3.06	92.3	3.27
	10	97.2	5.98	94.3	4.63	95.2	4.36
纳他霉素	0.5	86.0	3.29	89.7	4.03	89.7	4.03
	2	97.7	4.50	96.3	5.61	94.0	5.44
	5	103	5.93	96.8	6.11	98.2	4.71
对羟基苯甲酸丙酯	1	87.7	4.97	86.0	4.56	86.7	4.18
	5	97.3	6.15	93.5	3.73	92.8	4.88
	10	92.3	5.47	96	3.58	100.2	3.43
对羟基苯甲酸丁酯	1	93.8	4.62	88.3	5.28	91.2	5.63
	5	93.0	4.86	93.5	4.37	91.5	5.68
	10	99.2	5.31	98.7	3.26	100.7	5.92

对纯牛奶加标样品8次平行测定(表3)，得出各防腐剂的RSD值分别为3.69%、2.14%、2.50%、3.07%和4.22%。

表3 液态奶中对羟基苯甲酸酯类和纳他霉素检测精密度结果($n=8$)
Table 3 Precision of the method ($n=8$)

检测项目	测定值/(mg/kg)				RSD/%
对羟基苯甲酸甲酯	2.115	2.048	2.023	2.093	3.69
	1.886	2.069	2.016	1.957	
对羟基苯甲酸乙酯	2.158	2.143	2.203	2.085	2.14
	2.137	2.135	2.217	2.096	
对羟基苯甲酸丙酯	2.275	2.387	2.307	2.231	2.50
	2.238	2.209	2.264	2.313	
对羟基苯甲酸丁酯	2.012	1.945	2.134	2.039	3.07
	2.028	1.965	2.034	2.097	
纳他霉素	1.241	1.259	1.197	1.144	4.22
	1.296	1.224	1.157	1.244	

2.3 线性范围和检出限

本方法对羟基苯甲酸酯类定量检出限为1mg/kg, 线性范围1~100mg/kg, 纳他霉素定量检出限为0.5mg/kg, 线性范围0.5~100mg/kg。

3 结论

在本方法的实验条件中, 5种防腐剂与其他干扰杂质峰完全分离, 方法准确、快速, 回收率和重复性符合要求, 结果可靠, 适合乳制品中防腐剂的检测监控。

参考文献:

- [1] 王卫华, 徐锐锋, 张雯迪, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3183-3184.
- [2] 张群林, 刘毅, 李俊, 等. 食品和药品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂色谱分析法的研究进展[J]. 安徽医药, 2006, 10(4): 241-243.
- [3] 刑晓慧, 张淑玲, 刘庆斌, 等. 高效液相色谱法测定食品中的对羟基苯甲酸酯类[J]. 中国调味品, 2013, 38(2): 87-88.
- [4] 陈建文, 厉华明, 周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法[J]. 中国酿造, 2008, 185(8): 4-5
- [5] 潘媛, 李波, 祝红昆, 等. 超快速液相色谱测定食品中对羟基苯甲酸酯类[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(2): 105-107.
- [6] 高鹤娟, 朱风兰, 王天竺, 等. GB/T5009.31—2003食品中对羟基苯甲酸酯类的检测[S]. 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会, 2003: 251-254.
- [7] SHEN H Y, JIANG H L, MAO H L, et al. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods[J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(1): 48-54.
- [8] MARQUEZ-SILLERO I, AGUILERA -HERRADOR E, CARDENAS S, et al. Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(1): 1-6.
- [9] 巩强, 李波, 田夏. 高效液相色谱法检测牛乳中纳他霉素的几种前处理方法比较[J]. 食品工程, 2012, 6(2): 46-47.
- [10] 吴旭, 张雪峰, 其其格. 高效液相色谱法检测酸奶与奶酪中纳他霉素残留[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(11): 38-39.
- [11] 姜金斗, 杨金宝. RP-HPLC法测定酸牛奶中纳他霉素的含量[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 216-218.
- [12] 鄂志强, 王克新, 卢燕. 乳制品中纳他霉素的测定[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(7): 54-56.
- [13] 张慧, 吴颖, 朱蕾, 等. 超高效液相色谱法检测饮料中纳他霉素的含量[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 86-91.
- [14] 闫磊, 刘宁, 孙亚范, 等. 乳制品中纳他霉素的液相色谱检测方法[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 111-112.
- [15] 李乃洁, 张凯, 赵检, 等. 高效液相色谱法测定食品中纳他霉素[J]. 理化检验-化学分册, 2008, 44(12): 1221-1222.
- [16] 黄孟基, 郭新东, 王永华, 等. 高效液相色谱法测定月饼中纳他霉素残留[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 121-123.
- [17] 刘红梅. 纳他霉素在食品工业中的应用[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(11): 96-97.
- [18] 刘婷, 吴道澄. 食品中纳他霉素的使用及分析方法[J]. 中国调味品, 2012, 37(11): 13-15.