

饮料中防腐剂苯甲酸和山梨酸的高效液相色谱分析

1. 目的要求

- (1) 熟悉高效液相色谱仪的结构，掌握反相键合相色谱法的分离原理。
- (2) 了解高效液相色谱法在食品分析中的应用。
- (3) 学习外标法定量的操作步骤。

2. 实验原理

食品防腐剂是用于防止食品因微生物引起的变质，提高食品保存性能，延长食品保质期而使用的食品添加剂。常用的食品防腐剂有苯甲酸及其钠盐、山梨酸及其钾盐等。由于长期过量摄入防腐剂会对人体造成一定损害，因此需要严格控制食品中防腐剂的添加量。

高效液相色谱法（HPLC）是食品领域广泛使用的一类分析方法，其中的反相键合相色谱法最为常用。所谓反相色谱，是指流动相的极性大于固定相的极性的液相色谱方法。本实验采用反相键合相色谱法对饮料中苯甲酸和山梨酸的含量进行测定，以十八烷基键合硅胶作为固定相，醋酸铵水溶液/甲醇作为流动相。定量方法采用外标法，即分别以混合标准溶液色谱图中山梨酸和苯甲酸的峰面积对其浓度绘制标准曲线，再根据试样色谱图中山梨酸或苯甲酸的峰面积，由标准曲线计算出试样中防腐剂的含量。

3. 仪器试剂

(1) 仪器

高效液相色谱仪（紫外检测器），C18 色谱柱（4.6*150mm，5 μ m），50 μ L 微量注射器，超声波清洗机。

(2) 试剂

饮料；甲醇（HPLC 级）；醋酸铵（HPLC 级）；苯甲酸（分析纯）；山梨酸（分析纯）；纯水。

(3) 醋酸铵溶液的配制

称取醋酸铵 7.7g，加纯水溶解并稀释至约 100mL，配制成浓度约为 1.0 mol/L 的醋酸铵溶液。用 0.2 μ m 的水系滤膜过滤，滤液备用。

(4) 标准储备液的配制

取苯甲酸 0.25g，精密称定，以甲醇溶解并定容至 50mL，配制成浓度约为 5mg/mL 的苯甲酸标准储备液。

取山梨酸 0.25g，精密称定，以甲醇溶解并定容至 50mL，配制成浓度约为 5mg/mL 的山梨酸标准储备液。

4. 实验步骤

(1) 饮料的预处理

精密吸取饮料试样 1.00ml 于 10ml 容量瓶中，加水定容。

(2) 系列标准溶液的配制

苯甲酸、山梨酸混合中间储备液：精密吸取苯甲酸和山梨酸的标准储备液各 1.00mL，置于同一个 25mL 容量瓶中，以水定容，此混合中间储备液中苯甲酸、山梨酸的浓度均为约 200 μ g/mL。

分别精密吸取苯甲酸、山梨酸标准混合溶液各 200 μ L、400 μ L、600 μ L、800 μ L、1000 μ L，置于 5 个 10mL 容量瓶内，以水定容，配制成浓度分别约为 4 μ g/mL、8 μ g/mL、12 μ g/mL、16 μ g/mL 和 20 μ g/mL 的系列标准溶液。

(3) 定性标准溶液的配制

分别量取苯甲酸和山梨酸的标准储备液各约 100 μ L，置于两个 10mL 的容量瓶中，以水定容，作为定性用标准溶液。

(4) 流动相的配制

量取纯水 400mL，加入 1.0 mol/L 的醋酸铵溶液 8mL，混匀，再加入甲醇 100mL，混匀，超声脱气 20 分钟。

(5) 仪器运行

将仪器按照规定的操作步骤调节至进样状态（注意：本实验中使用的是含有缓冲盐的流动相，需事先用含水量较高的甲醇水溶液平衡色谱系统）。参考色谱条件如下：等度洗脱；流动相流速：0.8ml/min；柱温：室温；进样量：10 μ L；检测波长：227nm。

(6) 定性分析

待基线平稳后，分别吸取苯甲酸、山梨酸定性用标准溶液各 2 μ L，进样分析，以确定化合物的保留时间。

(7) 标准曲线的绘制

分别吸取不同浓度的系列标准溶液 10 μ L，进样分析，记录苯甲酸和山梨酸色谱峰的保留时间和峰面积。

(8) 样品分析

分别吸取各饮料稀释液 10 μ L，进样分析，记录苯甲酸和山梨酸色谱峰的保留时间和峰面积。

(9) 关机

实验完毕后，用含水量较高的甲醇水溶液冲洗管路及色谱柱，再甲醇冲洗色谱柱和系统 20 分钟，并按照液相色谱仪的操作规程关机。

5. 数据记录与结果分析

(1) 记录实验条件和相关参数

(2) 色谱定性分析结果

(3) 将实验数据列于下表中

		标 1	标 2	标 3	标 4	标 5	试样
山梨酸	保留时间 (min)						
	峰面积(mAu.s)						
	浓度 (mg/L)						
苯甲酸	保留时间 (min)						
	峰面积(mAu.s)						
	浓度 (mg/L)						

(4) 绘制标准曲线

(5) 计算饮料中防腐剂的含量

6. 思考题

(1) 流动相中加入醋酸铵的目的是什么？

(2) 常用的色谱定量方法有哪几种？外标法定量有什么优缺点？

(3) 根据结构式，苯甲酸和山梨酸能用离子色谱法分析吗？为什么？