

发酵乳中苯甲酸和山梨酸检测的前处理方法 优化研究

刘 杰¹, 卢智华¹, 刘 超¹, 王 佳¹, 李 梅¹, 吴丰吉², 彭 翔^{1*}

[1.蒙牛乳制品（天津）有限责任公司，天津 301739；2.蒙牛乳业（唐山）有限责任公司，唐山 064000]

摘 要：[目的]本研究旨在探索基于《GB 5009.28—2016食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》中第一法（液相色谱法）检测发酵乳中苯甲酸和山梨酸时，提升回收率的优化研究。[方法]通过改进提取发酵乳样品的前处理方法，即将试样称量至50 mL具塞离心管中变更为称量至50 mL容量瓶中并进行超声提取，并对比优化前后目标分析物的加标回收率。[结果]优化后目标分析物的回收率显著提高，平均提高3.80%~6.09%，且其重复性测定结果符合要求。[结论]经本研究优化后，将样品直接称量至50 mL容量瓶中，并在容量瓶中进行所有前处理步骤，最终定容体积精准控制为50 mL。同时，在实际计算公式中，采用的体积同为50 mL。该法所得检测回收率接近理论值，表现出较高的准确性与良好的重复性。

关键词：液相色谱法；发酵乳；苯甲酸；山梨酸

文章编号：1671-4393（2026）04-0080-06

DOI:10.12377/1671-4393.26.04.13

Improvement Study on Pre-treatment Methods for Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Fermented Milk

LIU Jie, LU Zhihua, LIU Chao, WANG Jia, LI Mei, WU Fengji, PENG Xiang^{*}

[1.Mengniu Dairy Products（Tianjin）Co., Ltd., Tianjin 301739；2.Mengniu Dairy（Tangshan）Co., Ltd., Tangshan 064000]

Abstract: [Objective]This study aimed to conduct an optimization research on improving the recovery rate when

作者简介：刘 杰（1985-），女，天津人，本科，工程师，研究方向为食品安全分析、乳品检验分析、乳品质量控制；
卢智华（1983-），女，天津人，硕士，食品质量与安全工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
刘 超（1985-），女，天津人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
王 佳（1985-），男，内蒙古呼和浩特人，硕士，高级工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
李 梅（1988-），女，吉林洮南人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
吴丰吉（1988-），男，内蒙古乌兰浩特人，硕士，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制。

***通信作者：**彭 翔（1984-），女，四川宜宾人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制。

determining benzoic acid and sorbic acid in fermented milk using the first method (liquid chromatography) as stipulated in “GB 5009.28—2016 Food Safety National Standard Determination of Benzoic Acid, Sorbic Acid and Saccharin Sodium in Food”.[Method]By improving the pre-treatment method for extracting fermented milk samples, the sample was weighed into a 50 mL conical centrifugal tube instead of a 50 mL volumetric flask, and then ultrasonic extraction was performed. The recovery rates of the target analytes before and after optimization were compared.[Result]After optimization, the recovery rate of the target analytes were significantly improved, with an average increase of 3.80% to 6.09%, and the repeatability test results met the requirements.[Conclusion]When using the national standard method for sample pre-treatment, after weighing the samples in a centrifuge tube and conducting ultrasonic extraction, a precipitant needs to be added for centrifugation before transferring the sample to a volumetric flasks.It is worth noting that the final volume of dilution was not included in the experiment, as it did not account for the 2 mL of ferrocyanide potassium solution and 2 mL of zinc acetate solution added. The theoretical final dilution volume should be 54 mL, but the actual calculation formula used a volume of 50 mL, which will result in a lower recovery rate result. After optimization in this study, the samples were directly weighed into a 50 mL volumetric flask, and all the pre-treatment steps were carried out in the flask. The final volume of the solution was precisely controlled at 50 mL. At the same time, in the actual calculation formula, the volume used was also 50 mL. The detection recovery rate obtained by this method was close to the theoretical value, demonstrating high accuracy and good repeatability.

Keywords: liquid chromatography; fermented milk; benzoic acid; sorbic acid

苯甲酸为白色结晶固体，有微弱芳香气味。其制备方法主要由安息香树脂或甲苯氧化提取。作为一种多功能有机化合物，苯甲酸在多个行业中被广泛应用。尤其在食品与饮料行业中，苯甲酸及其钠盐作为防腐剂^[1]，通过抑制细菌和真菌的生长以用于延长产品保质期。

山梨酸为白色结晶性粉末，难溶于水，易溶于乙醇和其他有机溶剂，适宜在pH值4.5~6.0范围内使用。其作用机制是与微生物酶中的巯基结合，从而破坏酶的活性中心，导致酶功能失活，进而有效抑制微生物的增殖。山梨酸及其钾盐能抑制霉菌生长，尤其在低pH值环境中，其以未离解酸的形式发挥防腐作用，因此山梨酸及其钾盐常被用作防腐剂以抑制霉菌等微生物的生长与繁殖^[2]。

乳制品营养丰富，是人体所需多种营养素的重要来源。其中，发酵乳制品口味众多，口感丰富，

不仅钙质含量较高，而且其营养成分（如磷、蛋白质、维生素等）之间可相互搭配，更有利于人体吸收。但发酵乳制品保质期较短，适量添加防腐剂可有效延长其保质期，所以此类添加剂在发酵乳制品的生产中得到了广泛应用^[3]。一些不法生产商和经销商为延长乳制品的保质期，违规过量添加防腐剂，其中以苯甲酸和山梨酸较为常见。过量摄入苯甲酸和山梨酸等防腐剂，将对健康产生危害^[4]。

探索一种检测准确性更高的方法，以实现精准检测乳制品中苯甲酸和山梨酸含量，对指导消费者健康消费，进而更有效地保障公众健康，具有重要的现实意义^[5]。

1 材料与试剂

本方法所用水为《GB/T 6682—2008 分析实验室用水国家标准》^[6]中规定的一级水。

1.1 材料

0.22 μm水相滤膜针头过滤器、50 mL具塞离心管，天津市领航实验设备股份有限公司；1 mL注射器，安徽江南医疗器械股份有限公司；0.22 μm水相微孔滤膜，上海市新亚净化器件厂。

1.2 试剂

甲醇、乙酸铵（色谱纯），常州科莱玛生物科技有限公司；亚铁氰化钾、乙酸锌、冰乙酸（分析纯），福晨（天津）化学试剂有限公司。

1.3 标准品

苯甲酸标准品（CAS 65-85-0标准值1.00 mg/mL）、山梨酸标准品（CAS 110-44-1标准值1.00 mg/mL），中国计量科学研究院。

2 仪器和设备

高效液相色谱仪（Ultimate 3000，配紫外检测器），美国ThermoFisher公司；分析天平（ME2002E/02，感量为1 mg和10 mg），梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；漩涡混合振荡器（MS3 basic），德国IKA公司；超声波清洗机（JPC900），广州市吉普超声波电子设备有限公司；高速冷冻离心机（TGL-16M，转速>8 000 r/min），上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

3 检测方法

3.1 试剂配制

亚铁氰化钾溶液（92 g/L）：称取106 g亚铁氰化钾，加入适量水溶解，用水定容至1 000 mL；乙酸锌溶液（183 g/L）：称取220 g乙酸锌，溶于少量水中，加入30 mL冰乙酸，用水定容至1 000 mL；乙酸铵溶液（20 mmol/L）：称取1.54 g乙酸铵，加入适量水溶解，用水定容至1 000 mL，经0.22 μm水相微孔滤膜过滤后备用。

3.2 标准溶液配制

（1）苯甲酸、山梨酸混合标准中间液（0.2000 g/L）：分别准确吸取苯甲酸、山梨酸标准储备液各2 mL于10 mL容量瓶中，用水定容。于（4±2）℃条件下可

保存3个月。

（2）苯甲酸、山梨酸混合标准系列工作液：分别准确吸取苯甲酸、山梨酸混合标准中间液0、25、50、75、100、125、150、200 μL，用水定容至10 mL，配制成质量浓度分别为0、0.000 5、0.001 0、0.001 5、0.002 0、0.002 5、0.003 0、0.004 0 g/L混合标准系列工作液。临用现配。

3.3 试样提取

3.3.1 依据国家标准中液相色谱法规定的试样前处理方法

依据《GB 5009.28—2016食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定》^[7]规定，准确称取2 g（精确至0.001 g）试样于50 mL具塞离心管中，加水约25 mL，涡旋混匀，于50℃水浴超声20 min，冷却至室温后加2 mL亚铁氰化钾和2 mL乙酸锌，涡旋混匀，于8 000 r/min离心5 min，将水相转移至50 mL容量瓶中，于残渣中加水20 mL，涡旋混匀后超声5 min，于8 000 r/min离心5 min，将水相转移到同一50 mL容量瓶中，并用水定容至刻度，混匀。取适量上清液过0.22 μm水相微孔滤膜，待液相色谱测定。

3.3.2 改进试样前处理方法

准确称取2 g（精确至0.001 g）试样于50 mL容量瓶中，加水约25 mL，涡旋混匀，于50℃水浴超声20 min，冷却至室温后加2 mL亚铁氰化钾和2 mL乙酸锌，涡旋混匀。加水定容至50 mL容量瓶中，超声5 min。冷却至室温后于8 000 r/min离心5 min。取适量上清液过0.22 μm水相微孔滤膜，待液相色谱测定。

3.4 仪器参考条件

色谱柱：Agela C18柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或等效色谱柱；流动相：甲醇+乙酸铵溶液=5+95；流速：1 mL/min；检测波长：230 nm；进样量：10 μL。

3.5 标准曲线绘制

将混合标准系列工作溶液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以混合标准系列工作液的

质量浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

4 前处理方法优化前后结果对比分析

4.1 优化前后苯甲酸加标回收率对比

优化前，依据GB 5009.28—2016第一法液相色谱法中试样提取方法，采用发酵乳基质为本底进行苯甲酸加标6平行检测，加标浓度点分别为1倍定量限0.01 g/kg、2倍定量限0.02 g/kg、5倍定量限0.05 g/kg，优化前后苯甲酸加标检测结果和加标回收率见表1。

对比前处理方法优化前后3个浓度点的苯甲酸加标回收率，检测结果符合《GB 5009.295—2023食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》^[8]中回收率要求（80%~110%），其重复性也符合该标准中相应要求（≤10%）。

通过对1倍定量限0.01 g/kg、2倍定量限0.02 g/kg、5倍定量限0.05 g/kg三个浓度点的加标回收率进行ANOVA分析，*P*值分别为0.000 001、0.004、≈0.000 0，均<0.05，无显著差异。前处理方法优化后，三个浓度点的加标回收率分别显著提升了5.83%、2.41%、3.16%，其原因可能在于，优化后的前处理过程减少了从离心管到容量

瓶中间步骤的转移损失，并且改为直接向容量瓶中加入2 mL亚铁氰化钾溶液和2 mL乙酸锌溶液，确保试样最终定容体积精准为50 mL，与计算公式中的50 mL定容体积相符，从而显著提升加标回收率。

4.2 优化前后山梨酸加标回收率对比

优化前，依据3.3.1 GB 5009.28—2016^[7]第一法液相色谱法中试样提取方法，采用发酵乳基质为本底进行山梨酸加标检测，加标浓度点分别为1倍定量限0.01 g/kg、2倍定量限0.02 g/kg、5倍定量限0.05 g/kg，优化前后山梨酸加标回收率检测结果见表2。

对比前处理方法优化前后3个浓度点的山梨酸加标回收率，检测结果符合GB 5009.295—2023^[8]中回收率要求（80%~110%），其重复性也符合该标准中相应要求（≤10%）。

通过对1倍定量限0.01 g/kg、2倍定量限0.02 g/kg、5倍定量限0.05 g/kg三个浓度点的回收率进行ANOVA分析，*P*值分别为0.000 2、≈0.000 0、≈0.000 0，均<0.05（显著性水平α）。前处理方法优化后，三个浓度点的加标回收率分别显著提升了1.69%、8.41%、8.17%，其原因可能与4.1节所述一致。

表 1 前处理方法优化前后苯甲酸加标检测结果和加标回收率

Table 1 Detection Results and Recovery Rate of Benzoic Acid Before and After Optimization of Pre-treatment Methods						
加标浓度点 (g/kg)	优化前			优化后		
	加标检测结果 (g/kg)	加标回收率 (%)	重复性 (%)	加标检测结果 (g/kg)	加标回收率 (%)	重复性 (%)
1 倍定量限 (0.01)	0.009 26、0.009 23	92.6、92.3	1.29	0.009 79、0.010 00	97.9、100.0	0.96
	0.009 46、0.009 46	94.6、94.6		0.010 00、0.009 90	100.0、99.0	
	0.009 30、0.009 18	93.0、91.8		0.009 87、0.009 79	98.7、97.9	
2 倍定量限 (0.02)	0.018 70、0.018 60	93.5、93.0	0.63	0.019 20、0.018 20	96.0、91.0	2.53
	0.018 90、0.018 70	94.5、93.5		0.019 40、0.019 40	97.0、97.0	
	0.018 60、0.018 60	93.0、93.0		0.019 30、0.019 50	96.5、97.5	
5 倍定量限 (0.05)	0.046 00、0.046 30	92.0、92.6	0.70	0.047 40、0.047 40	94.8、94.8	0.50
	0.046 00、0.046 00	92.0、92.0		0.047 50、0.047 90	95.0、95.8	
	0.045 50、0.045 50	91.0、91.0		0.047 20、0.047 40	94.4、94.8	

表 2 前处理方法优化前后山梨酸加标检测结果和加标回收率

Table 2 Detection Results and Recovery Rate of Sorbic Acid Before and After Optimization of Pre-treatment Methods

加标浓度点（g/kg）	改进前			改进后		
	加标检测结果（g/kg）	加标回收率（%）	重复性（%）	加标检测结果（g/kg）	加标回收率（%）	重复性（%）
1 倍定量限（0.01）	0.009 21、0.009 41	92.1、94.1	0.75	0.009 37、0.009 52	93.7、95.2	1.01
	0.009 29、0.009 29	92.9、92.9		0.009 60、0.009 47	96.0、94.7	
	0.009 24、0.009 32	92.4、93.2		0.009 40、0.009 41	94.0、94.1	
2 倍定量限（0.02）	0.017 50、0.017 60	87.5、88.0	0.85	0.019 10、0.018 50	95.5、92.5	1.59
	0.017 40、0.017 20	87.0、86.0		0.019 30、0.019 20	96.5、96.0	
	0.017 30、0.017 30	86.5、86.5		0.019 00、0.019 30	95.0、96.5	
5 倍定量限（0.05）	0.041 10、0.041 60	82.2、83.2	1.03	0.045 70、0.045 40	91.4、90.8	0.59
	0.041 30、0.041 20	82.6、82.4		0.045 70、0.046 10	91.4、92.2	
	0.042 00、0.042 10	84.0、84.2		0.045 50、0.045 40	91.0、90.8	

5 讨论

本研究基于GB 5009.28—2016^[7]第一法液相色谱法，针对其在发酵乳苯甲酸和山梨酸检测过程中存在的实际操作问题展开探讨。通过优化前处理方法提升目标分析物的加标回收率，其核心逻辑与试验结果均体现出明确的科学严谨性和实际应用价值。

5.1 国标方法在实际操作中存在体积未校正的问题及改进必要性

在GB 5009.28—2016^[7]规定的前处理方法中，试样需先称量至50 mL具塞离心管中完成提取、沉淀，再转移至50 mL容量瓶定容。该操作存在两个关键误差：其一，离心管至容量瓶的转移过程中，试样溶液易因管壁吸附、转移残留导致目标物损失，尤其发酵乳基质较为黏稠，易附着于离心管内壁，造成回收率偏低；其二，提取过程中添加沉淀剂后的体积变化无法校正，而后续计算公式默认以50 mL定容体积为基准，导致实际参与检测的体积与理论体积存在偏差，最终影响定量结果的准确性。在食品检测领域，定量误差可能导致合格样品误判或不合格样品漏检，因此针对该流程的优化具有重要的实际意义，是保障食品安全检测数据可靠性的关键环节。

5.2 方法改善的核心机制与优势分析

本研究将前处理容器直接优化为50 mL容量瓶，

其核心设计思路是“减少转移步骤、实现体积精准控制”。一方面，试样直接在容量瓶中进行超声提取，省去离心管转移至容量瓶环节，从源头避免了目标物的吸附损失；另一方面，沉淀剂（2 mL亚铁氰化钾溶液和2 mL乙酸锌溶液）直接加入容量瓶，与试样提取液充分混合后，最终通过定容操作使总体积精准达到50 mL，匹配国标方法计算公式中对定容体积的要求。超声提取作为成熟的样品前处理技术，其高效的提取效率已在食品中多种有机物检测中得到验证，本研究未改变提取方式、仅优化容器，既保证了目标物提取的充分性，又降低了方法优化的复杂度，提升了实际应用中的可操作性。

5.3 研究局限性与未来展望

本研究仅针对发酵乳基质中的苯甲酸和山梨酸检测进行改进，对于其他食品基质（如液态乳、乳饮料、植物蛋白发酵食品等）的适用性尚未验证，后续可拓展研究范围，探索该前处理方法在不同基质食品添加剂检测中的应用效果。

同时，本研究未对沉淀剂用量、超声时间、离心转速等关键参数进行正交试验优化，仅在原标准参数基础上将试样称量至50 mL具塞离心管中变更为称量至50 mL容量瓶中进行超声提取。未来可通过设计正交试验，筛选沉淀剂最佳用量、超声功率与时间、离心条件等参数，进一步提升方法的检测性能，如实现更低检出限、更高回收率等目标。

此外，随着检测技术的发展，液相色谱-质谱联用（LC-MS/MS）技术在食品添加剂检测中的应用日益广泛，后续可将本优化前处理方法与LC-MS/MS技术结合，探索其在复杂基质中低浓度苯甲酸、山梨酸检测中的应用潜力，为食品质量安全监管提供更灵敏、更准确的技术支持。

6 结论

本研究通过对前处理流程进行优化，显著提升了发酵乳中苯甲酸与山梨酸检测的加标回收率，验证了该优化方法的可行性。经优化后，苯甲酸与山梨酸的平均回收率平均显著提升了3.80%~6.09%；检测结果满足GB 5009.295—2023^[8]中关于回收率的规定（80%~110%）；检测结果的重复性也符合该标准要求（≤10%），所获回收率接近理论预期值。该方法具备操作简便、准确性高、重复性良好等优点，能够更为精确地测定发酵乳中苯甲酸与山梨酸的含量。

参考文献

[1] 杨忠芳, 陈玲, 林青雯, 等.食品中苯甲酸和山梨酸检测方法研究进展[J].食品工业, 2024, 45（3）: 190-194.

[2] 琚小路.食品防腐剂检验检测技术的研究现状及进展[J].中国食品工业, 2023（10）: 77-78, 82.

[3] 张作松, 施震地.液相色谱法测定食品中的糖精钠、安赛蜜、苯甲酸、山梨酸[J].食品安全导刊, 2020（27）: 134-135.

[4] 张思然.高效液相色谱法测定传统奶食品中的苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸的含量[J].化学与粘合, 2025, 47（1）: 91-95.

[5] 王淑敏.常见食品防腐剂的检测方法研究[J].食品安全导刊, 2025（4）: 123-125.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会.GB/T 6682—2008 分析实验室用水国家标准[S].

[7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局.GB 5009.28—2016 食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定[S].

[8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局.GB 5009.295—2023 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则[S].