

实验技术与方法

高效液相色谱法同时测定食品中 10 种合成着色剂

阮丽萍,吉文亮,刘华良,李莉,马永建
(江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立一种高效液相色谱法同时测定食品中 10 种合成着色剂(柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、喹啉黄、赤藓红)。方法 用 GB/T 5009.35—2003《食品中人工合成着色剂的测定方法》中试样处理方法制备样品溶液,聚酰胺吸附法提取色素,以甲醇/乙腈(3+1)+乙酸铵(0.02 mol/L, pH=4.0)为流动相,梯度淋洗分离,多波长检测定量。结果 线性范围分别为柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄于 0.94~30.00 $\mu\text{g/ml}$,新红于 0.94~30.00 $\mu\text{g/ml}$,诱惑红于 1.00~32.10 $\mu\text{g/ml}$,亮蓝于 0.31~10.00 $\mu\text{g/ml}$,喹啉黄于 1.21~9.68 $\mu\text{g/ml}$,赤藓红于 0.76~24.40 $\mu\text{g/ml}$,线性关系良好,相关系数 0.999 0~1.000 0,回收率 87.5%~101.4%,RSD 1.3%~5.7%,检出限分别为 0.03~0.9 mg/kg。结论 该方法简单、准确、灵敏,适用于食品中 10 种合成着色剂的定量分析。

关键词:合成着色剂;高效液相色谱法;食品

中图分类号:TS202 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0151-04

Simultaneous determination of 10 synthetic colorants in foods with
high performance liquid chromatography

Ruan Liping, Ji Wenliang, Liu Hualiang, Li Li, Ma Yongjian

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To establish a simple, sensitive and accurate method for the determination of ten kinds of synthetic colorant in food at the same time. **Methods** Synthetic colorants, including Tartrazine, New Red, Amaranth, Indigo Blue, Ponceau 4R, Sunset Yellow, Allura Red, Brillinat Blue, Quinoline Yellow and Erythrosine B in food samples were prepared with the procedures described in GB/T 5009.35 and were extracted by polyamide adsorption. Sample solutions were separated by reverse phase liquid chromatography with carbinol/acetonitrile (3+1) and acetic ammonium solution (0.02 mol/L, pH=4) mixture as mobile phase under gradient elution, and quantified by DAD (Photodiode Array Detector). **Results** The calibration curves showed a good linearity with correlation coefficients from 0.999 0 to 1.000 0. The linear range for the quantification of Tartrazine, Amaranth, Indigo Blue, Ponceau 4R and Sunset Yellow was 0.94-30.00 $\mu\text{g/ml}$, New Red was 0.94-30.00 $\mu\text{g/ml}$, Allura Red was 1.00-32.10 $\mu\text{g/ml}$, Brillinat Blue was 0.31-10.00 $\mu\text{g/ml}$, Quinoline Yellow was 1.21-9.68 $\mu\text{g/ml}$ and Erythrosine was 0.76-24.40 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit was from 0.03 to 0.9 mg/kg. The recovery of the method was from 87.5% to 101.4%, and the relative standard deviation (RSD) was from 1.3% to 5.7%. **Conclusion** The method is sensitive, simple and accurate, and can be used to quantify these synthetic colorant in foods at the same time. The method could meet the requirement for fast and accurate detection of synthetic colorants in food.

Key words: Synthetical colour; high performance liquid chromatography (HPLC); food

合成着色剂因其色彩亮丽、性质稳定、价格低廉,成为食品工业常用的添加剂之一。它们通常是以苯、甲苯、萘等化工原料合成,长期食用对人体健康具有一定的毒性,尤其是对少年儿童。世界各国对合成着色剂的使用范围和限量都有严格的规

定^[1]。我国 GB 2760—2007《食品添加剂使用卫生标准》^[2]中规定准许使用的人工合成色素有 11 种,分别为柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、喹啉黄、赤藓红和酸性红。GB/T 5009.35《食品中人工合成着色剂的测定方法》^[3]中规定高效液相色谱法同时测定胭脂红、苋菜红、柠檬黄、日落黄和亮蓝等 8 种合成着色剂。GB/T 5009.141《食品中诱惑红的测定方法》^[4]则规定采用纸层析-分光光度法测定诱惑红。喹啉黄尚未有

收稿日期:2010-05-22

作者简介:阮丽萍 女 副主任技师 研究方向为卫生检验

E-mail: ruan1964@sohu.com

法定的检测方法。目前,国内外用于合成着色剂的分析方法主要有 HPLC 法^[5]、HPLC-MS 法^[5],其他方法还有毛细管胶束电动色谱法^[6]、毛细管电泳法^[7]等。为了对食品中常用的合成着色剂进行更为全面的检测,对食品安全状态进行更有效的监督,本文借鉴国标中合成着色剂的前处理方法,对食品中的 10 种合成着色剂进行分离检测。

1 材料和方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪 Aglient LC 1100,DAD 检测器,安捷伦公司。

1.2 试剂

合成着色剂标准溶液(柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝) 0.5 mg/ml,购自国家标准物质中心;诱惑红(80%)购自 SIGMA-ALDRICH, Inc;新红、赤藓红、喹啉黄、靛蓝购自 Laboratories of Dr. Ehrenstorfer(Germany);聚酰胺过 200 目筛;pH 6 的水,蒸馏水加柠檬酸溶液(20%)调节 pH = 6;甲醇 + 甲酸液(6 + 4);无水乙醇 + 氨水 + 水(7 + 2 + 1);甲醇为液相色谱淋洗剂;水为密理博(MilliQ)水;其余所用试剂均为分析纯。

1.3 标准溶液的配制及定量方法

配制不同浓度的标准物质储备液,亮蓝,柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、靛蓝,诱惑红,赤藓红,新红,喹啉黄分别为:0.25、0.50、0.80、0.61、0.75、0.97 mg/ml。准确移取上述储备液 2 ml 于 50 ml 容量瓶中,加水定容,混匀,配成标准溶液。等量稀释(即分别稀释 2、4、8、16 和 32 倍),配成标准系列溶液,定容,0.45 μm 微孔滤膜过滤。以标准溶液浓度对相应的峰面积绘制标准曲线,外标法定量。

1.4 样品处理方法

参照 GB/T 5009.35—2003《食品中人工合成着色剂的测定方法》中试样处理方法制备样品溶液,参照聚酰胺吸附法提取色素,浓缩后的样品加水溶解定容(含有赤藓红的样品采用 50% 甲醇溶解定容),进行 HPLC 分析。

1.5 液相色谱分析条件

色谱柱 Agilent-ZORBAXSB-C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);以甲醇 + 乙腈(3 + 1)为有机相、0.02 mol/L 乙酸铵溶液为水相,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;进样量 10 μl;柱温 30 ℃。采用多通道检测,检测波长:靛蓝,柠檬黄、喹啉黄,日落黄,胭脂红、诱惑红,新红、苋菜红、赤藓红,亮蓝分别为 290、428、483、507、529、625 nm。

表 1 流动相梯度洗脱参考条件

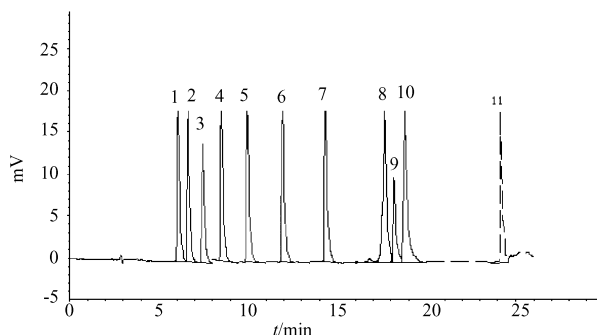
Table 1 Gradient elution program

时间 (min)	0.02 mol/L 乙酸铵溶液(%)	甲醇 + 乙腈 (3 + 1)(%)
0	94	6
11	68	32
13	55	45
20	55	45
22	20	80
25	20	80
26	94	6
30	94	6

2 结果

2.1 方法的线性范围

在设定的色谱条件下,10 种合成着色剂的出峰情况见图 1,各着色剂标准系列溶液的浓度与色谱峰面积线性相关,线性范围、线性方程及相关系数见表 2。



1:柠檬黄;2:新红;3:苋菜红;4:靛蓝;5:胭脂红;
6:日落黄;7:诱惑红;8:亮蓝;9、10:喹啉黄;11:赤藓红

图 1 10 种合成着色剂标准试样色谱图

Figure 1 HPLC chromatography of 10 synthetic colorant standards

表 2 10 种合成着色剂标准曲线回归方程及相关系数

Table 2 The calibration curves and correlation coefficients of 10 synthetic colorants

着色剂名称	保留时间(min)	线性范围(μg/ml)	线性方程	相关系数
柠檬黄	6.076	0.62 ~ 20.00	$y = 31.483x - 0.25$	1.0000
新红	6.632	0.94 ~ 30.00	$y = 19.128x - 0.26$	1.0000
苋菜红	7.458	0.62 ~ 20.00	$y = 23.588x - 0.20$	1.0000
靛蓝	8.503	0.62 ~ 20.00	$y = 22.954x - 1.33$	0.9998
胭脂红	9.958	0.62 ~ 20.00	$y = 24.558x - 0.54$	1.0000
日落黄	11.933	0.62 ~ 20.00	$y = 31.431x - 1.12$	0.9999
诱惑红	14.336	1.00 ~ 32.10	$y = 32.519x + 0.11$	1.0000
亮蓝	17.657	0.31 ~ 10.00	$y = 85.121x + 1.11$	0.9998
喹啉黄	18.175, 18.784	1.21 ~ 09.68	$y = 35.201x - 5.09$	0.9990
赤藓红	24.150	0.76 ~ 24.40	$y = 52.681x + 4.86$	1.0000

2.2 检出限

亮蓝,柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄,赤藓红,诱惑红,新红,喹啉黄分别为 0.03g、0.06、0.08、0.10、0.90 和 0.10 mg/kg。

2.3 回收率实验

以碳酸饮料为例,进行回收率试验,见表 3。

表 3 回收率实验

Table 3 The recovery rate of adding standards (n = 3)				
着色剂名称	本底值 (mg/kg)	加标量 (μg/ml)	平均测定值 (μg/ml)	回收率 (%)
柠檬黄	0.0	4.0	3.5	87.5
	3.2	10.0	13.0	98.5
	3.2	20.0	23.5	101.3
新红	0.0	4.6	4.2	91.3
	0.0	11.6	10.4	89.7
	0.0	23.3	22.6	97.0
苋菜红	0.0	4.0	3.8	95.0
	7.7	10.0	17.5	98.9
	7.7	20.0	28.4	102.5
靛蓝	0.0	3.8	3.6	94.7
	0.0	9.6	8.9	92.7
	0.0	19.2	18.7	97.4
胭脂红	0.0	4.0	3.9	97.5
	0.0	10.0	9.7	97.0
	0.0	20.0	19.4	97.0
日落黄	32.3	4.0	36.5	100.6
	0.0	10.0	9.8	98.0
	0.0	20.0	19.6	98.0
诱惑红	0.0	3.3	3.2	97.0
	0.0	8.2	8.1	98.8
	0.0	16.5	16.1	97.6
亮蓝	0.0	4.0	3.8	95.0
	0.0	10.0	9.6	96.0
	0.0	20.0	19.7	98.5
喹啉黄	0.0	4.0	3.9	97.5
	0.0	10.0	8.7	87.0
	0.0	20.0	18.6	93.0
赤藓红	0.0	5.0	5.0	100.0
	0.0	12.5	11.6	92.8
	0.0	25.0	23.5	94.0

2.4 精密度实验

准确精密量取碳酸饮料样品,加入一定量的混合标准溶液混合制成模拟样品,计算精密度,见表 4。

2.5 样品分析

采用本法对超市中 8 种有色食品进行检测,结果见表 5。2 种碳酸饮料、2 种果冻、2 种预调酒和葡萄酒中测定的色素品种与产品标示相同,含量未超过 GB 2760—2007《食品添加剂使用卫生标准》的相关规定。一种黄色果汁中未检测到色素(产品中未标示合成着色剂)。

表 4 方法的精密度

Table 4 Result of precision tests (n = 8)		
着色剂名称	平均浓度 (μg/ml)	相对标准偏差 (%)
柠檬黄	2.55	2.2
新红	2.19	2.6
苋菜红	3.58	1.6
靛蓝	1.70	3.9
胭脂红	1.90	1.4
日落黄	1.94	1.3
诱惑红	1.57	1.9
亮蓝	2.00	1.8
喹啉黄	1.74	3.5
赤藓红	2.46	5.7

表 5 食品样品中合成着色剂的含量

Table 5 The content of synthetic colorants in different food samples			
样品	着色剂名称	含量 (mg/kg)	最大使用量 (g/kg)
碳酸饮料 A	日落黄	32.3	0.1
碳酸饮料 B	柠檬黄	3.2	0.1
	苋菜红	7.7	0.05
果冻 A	胭脂红	2.5	0.05
果冻 B	柠檬黄	2.6	0.05
	日落黄	3.5	0.025
葡萄酒	苋菜红	14.0	0.05
果汁	ND		
预调酒 A	柠檬黄	10.7	0.1
	日落黄	1.8	0.1
预调酒 B	柠檬黄	53.3	0.1
	胭脂红	2.8	0.05

注:ND 为未检出。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本项实验目标是分离 10 种合成着色剂,必须采用梯度洗脱。以甲醇 + 0.02 mol/L 乙酸铵为流动相梯度洗脱时,前 7 种着色剂能较好分离,后 3 种着色剂不能完全分离。以甲醇 + 乙腈 (3 + 1) + 0.02 mol/L 乙酸铵为流动相梯度洗脱时,能将 10 种着色剂进行有效分离,且峰形良好,保留时间稳定。

3.2 测定波长的选择

GB/T 5009.35—2003 方法采用 254 nm 测定不同种类着色剂,其灵敏度不高,特异性不强,且食品中杂质成份会干扰着色剂的测定。为了使每种着色剂均获得较好的灵敏度,本法在确定最佳梯度后,对检测波长进行了优化。参照 GB/T 21916—2008《水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法》^[8]中着色剂的波长设定,利用二级管阵列检测器多通道检测功能对不同着色剂采用不同的检测波长,大大地提高了各种着色剂的灵敏度和特异性,特别是亮蓝。此法不但可以提高检测灵敏度,还能克服梯度洗脱时的基线漂移,减少共存物的干扰。

3.3 喹啉黄的测定

GB 2760—2007《食品添加剂使用卫生标准》规定,喹啉黄着色剂只允许在配制酒(仅限预调酒)中适量使用,最大使用量 0.1 g/L,在巧克力等其他食品中禁止使用。2009 年质检局曾检出进口食品 M&M'S 牛奶巧克力豆^[9]和哈瑞宝水果软糖中喹啉黄超标^[10],哈密瓜味冰淇淋粉、饼干味汁和英国蛋糕汁等标签上标有超范围使用的喹啉黄冰淇淋^[11]。目前没有法定方法对其进行检测,亦少有文献报道,建立喹啉黄的检测方法有现实意义。喹啉黄分子式为 2-(2-喹啉基)-2,3-二氢-1,3-茛二酮,难溶于水,目前用作食品添加剂的为喹啉黄磺酸钠盐,由于一分子喹啉黄可以结合 1~2 分子磺酸盐,因此可能为不同磺酸盐的混合物。于本色谱条件下,其色谱峰有 2 个,HPLC-MS 表明 2 个色谱峰对应的质谱图相似,均以 m/z 为 352 的离子 $[M + SO_3]^-$ 离子流强度最高。因此以 2 个峰的面积和为定量指标,结果表明亦有较好的线性关系。

3.4 赤藓红的测定

GB/T 5009.35—2003《食品中人工合成着色剂的测定方法》中,着色剂提取方法规定色素洗脱后浓缩、水定容,0.45 μm 滤膜过滤,HPLC 测定。在进行回收率和精密度实验时,发现水定容后的样品溶液中有红色沉淀析出。分离沉淀,用甲醇溶解,HPLC 分析,发现其为赤藓红。赤藓红为四碘荧光素钠盐,易溶于水,其溶解性与溶液的 pH 有关。因此当样品中有赤藓红时,样品宜采用 50% 甲醇定容。另外,滤膜过滤时易对色素产生吸附,有的滤膜吸附能力较强,过滤时使色素浓度发生改变,故过滤样品溶液时应选择吸附作用小或无吸附作用的滤膜。

4 结论

本方法采用梯度洗脱,多波长同时测定食品中

10 种合成着色剂,方法稳定,线性范围好,灵敏度高,精密度和准确度均获得满意的结果,受杂质峰干扰小,样品峰得到很好的分离,能满足食品中合成着色剂的分析要求,具有实际应用价值。

参考文献

- [1] 柴秋儿. 国外食品添加剂的管理法规及安全标准现状[J]. 中国市场,2009,17(4):62-63.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.35—2003 食品中人工合成着色剂的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.141—2003 食品中诱惑红的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [5] KUCHARSKA M, GRABKA J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes [J]. Talanta, 2010, 80: 1045-1051.
- [6] THOMPSON C O, TRENNERY V C. Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. J Chromatogr A, 1995, 704:195-201.
- [7] GIOVINE L D, BOCCA A P. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis [J]. Food Control, 2003, 14: 131-135.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 21916—2008 水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [9] 中国质量新闻网. 3 月中国检出不合格洋产品 142 批 [EB/OL]. [2009-04-27]. <http://www.cqn.com.cn/news/zjgg/jckspwgqy/257689.htm>.
- [10] 进出口食品安全局. 2009 年 6 月进境不合格食品、化妆品信息 [EB/OL]. [2009-08-19]. http://jckspaqj.aqsiq.gov.cn/jckspzpfxyj/jjzpfxyj/jjbhgsptb/200908/t20090819_124716.htm.
- [11] 中广网. 宁波口岸销毁一批意大利“问题食品” [EB/OL]. [2009-06-24]. http://www.cnr.cn/newscenter/gnxw/200906/t20090624_505378283.html.