

## 实验技术与方法

## 超高效液相色谱法同时测定包衣糖果中5种铝色淀

杨奕,张晶,赵珊,邵兵

(北京市疾病预防控制中心,食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室,北京 100013)

**摘要:目的** 建立包衣糖果中柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红和亮蓝5种铝色淀的超高效液相色谱测定方法。**方法** 用NaOH溶液浸泡提取包衣糖果中的色淀,以乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)为流动相,梯度洗脱,多波长检测定量。**结果** 5种目标化合物在0.25~50 mg/L范围内呈良好的线性,相关系数 $R^2 > 0.999$ 。该方法中5种目标化合物的定量限(LOQ)均为1.0 mg/kg。在1、5、25 mg/kg三个添加浓度水平下,5种目标化合物的加标回收率为79.5%~116.4%,RSD为0.92%~6.48%。**结论** 该方法简单、快速、准确,适于包衣糖果中5种铝色淀的同时检测。**关键词:**超高效液相色谱;铝色淀;合成色素;食品添加剂

中图分类号:R155.5;TS202 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0148-04

**Simultaneous determination of five aluminum lake dyes in coated candy by ultra performance liquid chromatography**

Yang Yi, Zhang Jing, Zhao Shan, Shao Bing

(Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100030, China)

**Abstract: Objective** To develop a method for simultaneous determination of tartrazine Al lake, sunset yellow Al lake, ponceau 4R Al lake, allura red Al lake and brilliant blue Al lake in coated candy by ultra performance liquid chromatography. **Methods** Target analytes in coated candy were extracted by sodium hydroxide solution, separated by gradient elution with acetonitrile and 10 mmol/L acetic ammonium as mobile phase, and detected by photodiode array detector. **Results** Good linearities were achieved for five aluminum lake dyes in the range of 0.25-0.50 mg/L, with correlation coefficients  $R^2 > 0.999$ . The quantification limits of the method were 1.0 mg/kg. Mean recoveries of five target analytes (spiked at three concentration levels) ranged from 79.5% to 116.4%, with relative standard deviations between 0.92% and 6.48%. **Conclusion** This simple, rapid and accurate method could be applied in simultaneous detection of five aluminum lake dyes in coated candy.**Key words:** UPLC; aluminum lake dyes; synthetic colorants; food additives

铝色淀是色素和铝离子的络合物。与色素相比,前者具有更好的光稳定性,颜色更持久,是食品工业常用的添加剂之一,尤其在糖果加工中使用较多。但是,已有的研究表明长期食用含有色素或铝色淀的食物会引起过敏和哮喘<sup>[1-4]</sup>、DNA损伤<sup>[5]</sup>和致癌<sup>[6]</sup>等不良反应。因此世界多国对于色素及铝色淀的使用都有严格的规定。国家标准GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》<sup>[7]</sup>中仅允许柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红及亮蓝等11种合成色素及铝色淀在食品加工中使用。现阶段食品中色素检测方法的报道较多,主要有高效液相色谱法、离子色

谱法、毛细管电泳色谱法和薄层色谱法等<sup>[8]</sup>。由于色淀既不溶于水也不溶于有机溶剂,难以从样品中提取。本研究利用碱溶液提取结合超高效液相色谱技术建立了包衣糖果中5种合成色素铝色淀的快速检测方法。

**1 材料与方法****1.1 主要仪器与试剂**

超高效液相色谱仪、二级阵列管检测器、冷冻离心机、超纯水机、SA8涡漩式混合器、BS110S电子天平、15 ml具塞聚乙烯离心管。

柠檬黄铝色淀(纯度36%~39%)、日落黄铝色淀(纯度38%~42%)、胭脂红铝色淀(纯度32%~36%)、诱惑红铝色淀(纯度38%~42%)和亮蓝铝色淀(纯度28%~31%),均购自Colorcon公司;柠檬黄(纯度99%)、日落黄(纯度98%);胭脂红(纯度

收稿日期:2012-12-08

作者简介:杨奕 女 助理研究员 研究方向为食品污染物检测

E-mail:bmuyangyi@gmail.com

通信作者:邵兵 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail:

shaobingch@sina.com

75%);诱惑红(纯度 80%);亮蓝(纯度 90%),购自 Dr Ehrenstorfer 公司;超纯水(电阻率为  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ );乙腈(HPLC 级);氢氧化钠和乙酸铵均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品前处理

准确称取 1.00 g 样品,置于 15 ml 聚丙烯离心管中,加入 3.5 ml 0.02 mol/L NaOH 溶液,涡旋 30 s,浸泡 10 min 至固体残渣颜色完全褪去,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用去离子水定容至 4 ml,用于 UPLC 测定。

### 1.2.2 标准溶液配制及定量方法

本方法中所有色淀含量均以色素计。

准确称取柠檬黄铝色淀、日落黄铝色淀、胭脂红铝色淀、诱惑红铝色淀、亮蓝铝色淀各 0.010 0 g,分别用 0.02 mol/L 氢氧化钠溶解并定容至 10 ml,4 °C 冰箱中保存。临用前用 0.02 mol/L NaOH 稀释上述储备溶液,根据标定浓度配制加标工作液,置于 4 °C。

准确称取柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红、亮蓝各 0.010 0 g,分别用水溶解并定容至 10 ml,根据标品纯度折算其浓度,4 °C 冰箱中保存。临用前,用水稀释上述标准储备溶液,配制成 0.10、0.25、0.50、1.0、2.5、5、10、25、50 mg/L 的标准工作液,置于 4 °C。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。

### 1.2.3 液相色谱分析条件

Waters Acquity UPLC® BEH shield RP18 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),柱温 40 °C,样品温度 10 °C,进样体积 10 μl,流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液,流速为 0.4 ml/min,流动相线性梯度洗脱,洗脱程序见表 1。采用二级阵列管检测器,柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红和亮蓝的检测波长分别为 420、480、500、500 和 625 nm。

表 1 5 种色素测定的流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution program for 5 dyes analysis

时间(min)	乙腈(A,%)	10 mmol/L 乙酸铵(B,%)
0	1	99
1	1	99
4.5	60	40
6	60	40
6.1	1	99
8	1	99

## 2 结果与讨论

### 2.1 液相色谱条件的选择

本研究中 5 种合成着色剂均为磺酸盐类染料,这类化合物由于含有一个或多个磺酸基,流动相中必须加入缓冲盐才能具有较好的峰型。根据本实

验室之前的研究,对于普通的高效液相色谱柱,采用 50 mmol/L 的乙酸铵-乙腈系统流动相能使各个化合物具有良好的峰型,并且各物质分离良好<sup>[9]</sup>。本研究采用超高效液相色谱对目标化合物进行分离,实验发现 10 mmol/L 的乙酸铵可使 5 种目标化合物达到理想的分离。

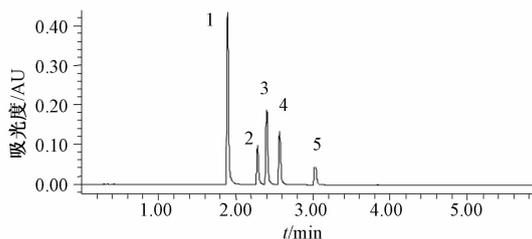
柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红及亮蓝具有不同的颜色,因此 5 种目标化合物具有不同的吸收光谱特征。为了使每个目标化合物都具有最佳的灵敏度,采用二级阵列管检测器进行光谱扫描(200 ~ 650 nm),选择各个目标化合物的特征最大吸收波长作为定量波长,同时用紫外吸收光谱图定性。根据 5 种目标化合物的光谱特征,分别以 420、480、500、500 和 625 nm 作为柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红、亮蓝的检测波长。

### 2.2 提取条件的选择

铝色淀为色素和铝离子的络合物,不溶于水和有机溶剂,因此常规的食品中色素的前处理方法很难将色淀提取出来。由于强酸或强碱能够破坏色素及铝离子之间的络合,本实验采用 NaOH 溶液作为提取溶剂。用不同浓度的 NaOH 溶液(0.02、0.025、0.125、0.25、0.5 mol/L)浸泡含有色淀的包衣糖果 10 min 并涡旋 30 s,实验结果发现 0.02 mol/L 的 NaOH 溶液可完全将色淀溶解,因此选用 0.02 mol/L NaOH 作为提取溶剂。

### 2.3 方法的线性范围、检出限、准确度及精密度

由于在碱性条件下色淀分解为色素和铝离子,且各国限量标准中,色淀的添加浓度均以其相应的色素计,因此,本实验中色淀含量也以色素计。分别取 0.25 ~ 50 mg/L 的色素混合标准工作溶液 10 μl 进样,5 种色素的标准色谱图见图 1。以各对照品溶液浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线并进行回归计算。5 种色素标准在 0.25 ~ 50 mg/L 范围内呈现良好线性,线性方程和相关系数见表 2。以添加实测法确定 5 种色素在包衣糖果中的方法定量限均为 1.0 mg/kg。



1:柠檬黄;2:胭脂红;3:日落黄;4:诱惑红;5:亮蓝

图 1 5 种色素标准(10 mg/L)在 420 nm 的液相色谱图  
Figure 1 Chromatogram of a standard dye solution (10 mg/L) in 420 nm of liquid chromatogram

表2 5种色素标准曲线及回归方程

Table 2 Calibration curves and correlation coefficients of 5 dyes

色素	保留时间 (min)	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 <i>r</i>
柠檬黄	1.92	0.25 ~ 50	$y = 5.62 \times 10^4 x + 5.11 \times 10^3$	0.999 9
日落黄	2.42	0.25 ~ 50	$y = 5.92 \times 10^4 x + 8.74 \times 10^3$	0.999 9
胭脂红	2.30	0.25 ~ 50	$y = 5.17 \times 10^4 x + 5.41 \times 10^3$	0.999 9
诱惑红	2.58	0.25 ~ 50	$y = 6.85 \times 10^4 x + 4.51 \times 10^3$	0.999 9
亮蓝	3.02	0.25 ~ 50	$y = 7.77 \times 10^4 x + 5.04 \times 10^3$	0.999 9

取不含色素及铝色淀的白色包衣糖果样品进行加标回收实验,添加相当于1、5、25 mg/kg (LOQ)三个色素浓度水平的5种色淀标准,进行加标回收实验。按本方法进行提取和定容,用超高效液相色谱测定,每个浓度水平重复6次,回收率及相对标准偏差(RSD)见表3。三个添加水平下,5种色淀的回收率在79.5%~116.4%之间,RSD为0.92%~6.48%,方法回收率较高,重现性很好。

表3 方法的回收率及精密性

Table 3 The recovery and precision of method

色素	添加浓度水平 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
柠檬黄铝色淀	1	113.9	5.70
	5	113.2	4.12
	25	116.4	2.41
日落黄铝色淀	1	84.9	6.24
	5	79.5	2.96
	25	85.7	0.92
胭脂红铝色淀	1	87.1	2.70
	5	94.4	1.13
	25	99.3	1.47
诱惑红铝色淀	1	94.4	4.88
	5	94.8	1.31
	25	103.9	1.26
亮蓝铝色淀	1	82.5	6.48
	5	81.8	1.94
	25	90.4	1.49

## 2.4 方法的应用

从北京超市或糖果专卖店购买不同品牌及口味的包衣糖果进行检测,包括巧克力豆、彩虹糖等共计11件,这些产品的标识中均注明含有铝色淀。对于9~11号样品,由于同一产品包装内含有多种颜色的包衣糖果,样品测定时,每种颜色的糖果各取1颗,混合后进行样品前处理。检测结果如表4所示,每件样品至少检出5种目标化合物中的3种。柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红和亮蓝的检出浓度范围分别为11.2~76.3、1.3~46.5、18.5~97.6、44.2~86.0、3.6~49.3 mg/kg。我国GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》规定这5种色素及其铝色淀在糖果包衣中的使用限量分别为100、200、100、85和50 mg/kg,所以此次抽检的11件样品中

只有10号样品中的诱惑红含量(86.0 mg/kg)超出国家限量标准,其余样品均未超出其国标限值。但是,由于以上结果是混合样品测定,如果扣除稀释因素,单一颜色的糖果颗粒则存在超标之虞。基于上述原因,我们分别测定了第9~11号样品中包含的各种颜色的糖果颗粒(表5),9号样品中橙色和褐色糖果中胭脂红含量分别为353.8和231.7 mg/kg,红色和褐色糖果中诱惑红含量为274.0和147.1 mg/kg,蓝色糖果中亮蓝含量为99.3 mg/kg;10号样品中绿色和黄色糖果中柠檬黄含量为187.3和194.0 mg/kg,橙色糖果中胭脂红含量为328.9 mg/kg,11号样品中褐色和橙色糖果中的胭脂红分别为121.7和255.7 mg/kg,红色颗粒中的诱惑红为181.5 mg/kg、蓝色糖果中亮蓝含量为67.9 mg/kg,以上结果表明不同颜色糖果颗粒中色素含量明显高于国标限值,存在安全隐患。鉴于包衣糖果的消费群体主要为对污染物暴露较为敏感的少年儿童,因此这类食品中铝色淀及色素的含量应当引起重视。

表4 包衣糖果样品中合成色素的含量

Table 4 Analyzed concentration of dyes in real coated candy samples

样品编号	含量 (mg/kg)				
	柠檬黄	日落黄	胭脂红	诱惑红	亮蓝
1	38.9	35.5	43.1	44.2	23.3
2	48.0	46.5	55.8	53.3	27.9
3	39.8	ND	18.5	ND	18.8
4	ND	22.1	43.7	51.0	48.9
5	50.8	30.1	50.1	51.0	49.3
6	49.4	29.0	47.9	48.9	47.8
7	47.1	29.5	49.4	48.9	48.3
8	46.7	28.0	47.3	49.4	46.6
9	15.2	1.5	97.6	70.5	21.7
10	76.3	1.3	65.8	86.0	3.6
11	15.3	1.2	62.9	43.6	15.5

注:ND为未检出。

## 3 结论

本方法建立了包衣糖果中5种人工合成着色剂铝色淀同时测定的超高效液相色谱方法,该方法简单快捷,回收率和重现性良好,适用于包衣类糖果中着色剂的快速检测,具有较高的实际应用价值。

表 5 9~11号样品不同颜色包衣糖果中合成色素的含量

Table 5 Analyzed concentration of dyes in different colours coated candy of 9~11 samples

样品编号 及颜色	含量(mg/kg)				
	柠檬黄	日落黄	胭脂红	诱惑红	亮蓝
9 绿色	13.9	ND	ND	ND	14.9
橙色	ND	3.2	353.8	ND	ND
蓝色	ND	ND	ND	ND	99.3
黄色	61.3	ND	ND	ND	ND
红色	ND	ND	ND	274.0	ND
褐色	16.1	ND	231.7	149.1	15.8
10 绿色	187.3	ND	ND	ND	16.0
紫色	ND	ND	ND	107.3	1.9
橙色	ND	1.5	328.9	ND	ND
黄色	194.0	ND	ND	ND	ND
红色	ND	ND	ND	322.7	ND
11 褐色	14.3	ND	121.7	80.1	11.8
绿色	11.2	ND	ND	ND	13.5
红色	ND	ND	ND	181.5	ND
橙色	ND	7.1	255.7	ND	ND
黄色	66.4	ND	ND	ND	ND
蓝色	ND	ND	ND	ND	67.6

注:ND为未检出。

## 参考文献

[ 1 ] Settlpone G A, Chafee F H, Postman I M, et al. Significance of

tartrazine sensitivity in chronic urticaria of unknown etiology[J]. J. Allergy Chin. Immunol, 1976, 57: 541-546.

[ 2 ] Ibero M, Esevenrrl J L, Barroso C, et al. Dyes, preservatives and salicylates in the induction of food intolerance and/or hypersensitivity in children[J]. Allergol Immunopath (Madr), 1982, 10(4): 263-268.

[ 3 ] Miller K. Sensitivity to tartrazine[J]. Brit. Med. J. (Clin Res Ed), 1982, 285: 1597-1598.

[ 4 ] Dipalma J R. Tartrazine sensitivity[J]. Am. Fam. Physician, 1990, 42: 1347-1350.

[ 5 ] Combes R D, Haveland-Smith R B. A review of the genoto-xicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes [ J ]. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1982, 98(2):101-248.

[ 6 ] JECFA,WHO. WHO food Additives Series[M]. Geneva: World Health Organization,1975.

[ 7 ] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

[ 8 ] Kucharska M, Grabka J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes[J]. Talanta, 2010, 80: 1045-1051.

[ 9 ] Yang Y, Yin J, Shao B. Simultaneous determination of five aluminum lake dyes in chewing gum by HPLC with photodiode array detection[J]. Food addit, 2011, 28:1159-1167.

## 《中国药物滥用防治杂志》2013 年度征稿征订启事

《中国药物滥用防治杂志》创刊于 1995 年,是经国家科学技术部批准,由中华人民共和国卫生部主管,中国药物滥用防治协会、中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所主办的国家级学术期刊,旨在进行药物滥用防治领域的报道和交流。国内统一刊号:CN 11-3742/R,国际刊号为:ISSN 1006-902X。本刊为双月刊,大 16 开,每期 64 页;已被中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)全文收录。

本刊国内外统一发行,邮发代号:82-768,全国各地邮局均可订阅,脱订者可直接通过编辑部订阅。

本刊设有“专论述评”、“论著”、“政策法规”、“论坛”、“综述”、“临床研究”、“合理用药”、“讲座”、“国外资料”、“调查报告”、“药物不良反应”等栏目,拟设“人文”、“动态”、“思考”等专栏。本刊审稿及时,对所有来稿一律免收审稿费,并支付作者稿费,欢迎广大读者积极投稿!

另,现有少量我刊《中国药物滥用防治杂志》2007-2008 年度及 2009-2010 年度合订本,200 元/套,有意购买者,请联系编辑部。

联系方式:北京市崇文区法华南里 11 号楼《中国药物滥用防治杂志》编辑部

邮编:100061 电话:(010)67633679 传真:(010)67157910

邮箱:zylf1995@163.com ;zylf@chinajournal.net.cn

网址:http://zylf.chinajournal.net.cn