

实验技术与方法

高效液相色谱-二极管阵列法测定发酵面制品中合成着色剂

田兰,包综方,张继春,陈睿,储忠英,范晶
(上海市松江食品药品检验所,上海 201600)

摘要:目的 建立高效液相色谱-二极管阵列法同时测定发酵面制品中的柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红和亮蓝5种合成色素的方法。方法 采用Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,10 μm)。以甲醇+乙腈(1+1)和乙酸铵溶液(0.01 mol/L,pH=4.0)为流动相,梯度洗脱,流速1.0 ml/min,用二极管阵列检测器记录各个色谱峰的紫外吸收光谱,色谱检测波长254 nm。结果 各色素在1.56~50.0 μg/ml质量浓度范围内呈良好的线性关系,相关系数均为1.000 0。将该方法用于实际样品的检测,5种人工合成色素的加标回收率在98.9%~101.6%之间,相对标准偏差为0.11%~0.41%。结论 该方法操作简便、灵敏、结果可靠。

关键词:高效液相色谱-二极管阵列法;发酵面制品;合成着色剂;食品安全

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)05-0449-04

Simultaneous determination of synthetic colorants in fermented flour products by high-performance liquid chromatographic-diode array detector

Tian Lan, Bao Zongfang, Zhang Jichun, Chen Rui, Chu Zhongying, Fan Jing
(Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China)

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatographic-diode array detector for the simultaneous determination of Lemon Yellow, Carmine, Sunset Yellow, Allura Red and Bright Blue in fermented flour products.

Methods The separation was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 10 μm) with methanol/ acetonitrile (1:1, V/V) and ammonium acetate (0.01 mol/L, pH = 4.0) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 254 nm and the peaks of UV spectra were captured by a photodiode array detector (DAD).

Results The method showed a good linearity in the range of 1.56 – 50.0 μg/ml ($r = 1.000\ 0$). The average recoveries of colorants ranged from 98.9% to 101.6%, with RSDs of 0.11% – 0.41%. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and reliable.

Key words: High performance liquid chromatographic-diode array detector; fermented flour products; synthetic colorants; food safety

目前针对食品中合成着色剂的检测方法有国标、高效液相色谱法等方法^[1-7],这些色谱条件待测组分出峰时间太早,不适宜检测发酵面制品这种含淀粉比较多且粘稠的样品,如果样品不进行特殊的前处理并改变色谱条件,将会影响检测结果。因此建立准确、高效的分析方法用于发酵面制品中合成色素的准确测定具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪,Kromasil C₁₈

色谱柱(250 mm×4.6 mm,10 μm),HP-1100系列四元泵,二极管阵列检测器,自动进样器,色谱柱恒温装置。

1.2 标准物质

柠檬黄(GBW(E)100001a)、胭脂红(GBW(E)100004a)、日落黄(GBW(E)100003a)、亮蓝(GBW(E)100005a)均购自中国计量科学研究院,浓度均为0.500 mg/ml。诱惑红(GBW(E)100020a)天津市卫生防病中心研制,浓度为1.00 mg/ml。

1.3 试剂

甲醇(色谱纯),乙醇、乙酸铵、柠檬酸、甲酸和氨水(均为分析纯),聚酰胺粉(100~200目)、水为超纯水(电阻率18.2 MΩ·cm)。

1.4 标准溶液的配制

精密吸取柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝标准

收稿日期:2012-05-09

作者简介:田兰女 主管药师 研究方向食品药品卫生检验

E-mail: tianlagogo@126.com

品溶液 (0.500 mg/ml) 各 10.00 ml 和诱惑红标准溶液 (1.00 mg/ml) 5.00 ml 于 100 ml 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 得质量浓度为 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合色素标准储备液。

1.5 方法

1.5.1 样品来源及前处理

选取市场中销售发酵面制品, 包括玉米馒头、黄金糕、青团等。

1.5.2 样品前处理

分别称取粉碎均匀的样品约 1.000 0 ~ 10.000 0 g, 加入无水乙醇 + 氨水 + 水 (7 + 2 + 1) 溶液 30 ml, 超声 5 min, 用脱脂棉漏斗过滤, 用 15 ml 无水乙醇 + 氨水 + 水 (7 + 2 + 1) 溶液分 3 次清洗滤渣。收集洗脱液, 置水浴上蒸发至近干, 加超纯水 10 ml, 用柠檬酸溶液 (20 g/100 ml) 调节 pH 值到 4 为试样溶液, 备用。

1.5.3 色素的提取

按 GB/T 5009.35—2003^[8] 进行, 取试样溶液加热至 60 $^{\circ}\text{C}$, 将 1.0 ~ 2.0 g 聚酰胺粉加少许 pH = 4 的水调成粥状, 倒入试样溶液中, 搅拌均匀, 以 G3 垂融漏斗抽滤, 用 pH = 4 的水 (60 $^{\circ}\text{C}$) 洗涤 4 次, 然后用甲醇 + 甲酸 (6 + 4) 混合溶液洗涤 3 ~ 5 次, 每次 10 ml, 再用水洗至中性。用乙醇 + 氨水 + 水溶液解吸 4 ~ 6 次, 每次 10 ml。收集洗脱液, 蒸发到近干, 用超纯水定容至 10.00 ml, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液进高效液相色谱系统测定。

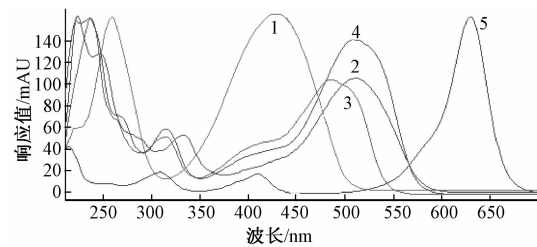
1.6 色谱条件

1.6.1 检测波长的选择

通过对各色素的波长扫描, 找到各色素主要吸收波长, 将不同色素吸收波长进行对比, 在 254 nm 下 5 种合成着色剂都存在吸收峰 (见图 1), 故确定本组的最佳测定波长为 254 nm。结合二极管阵列检测器的联用, 可对被分离组分在全波长范围内扫描获得其吸收光谱。图 1 是二极管阵列检测器在线采集的柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红和亮蓝 5 种合成色素的吸收光谱, 在 200 ~ 700 nm 范围内 5 种合成色素均有最大吸收波长和特征吸收峰。在测定中, 将流动相甲醇 + 乙腈 (1 + 1) + 乙酸铵 (0.01 mol/L, pH = 4.0) 按不同比例混合, 得到最佳分析条件, 在这些条件下, 各着色剂分离完全, 灵敏度高, 出峰时间较短, 分析速度快。

1.6.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 10 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 ml/min; 进样



1: 柠檬黄, 2: 胭脂红, 3: 日落黄, 4: 诱惑红, 5: 亮蓝

图 1 5 种色素标准品的光谱图

Figure 1 Spectra of five colorants standards

量: 10 μl ; 二极管阵列检测波长 254 nm, DAD 采集波长光谱检测范围为 200 ~ 700 nm。流动相: A 相乙酸铵溶液 (0.01 mol/L, pH = 4.0), B 相甲醇 + 乙腈 (1 + 1); 梯度洗脱程序为: 0 ~ 4 min B 相 13% 保持, 4 ~ 14 min B 相 13% ~ 35%, 14 ~ 21 min B 相 35% ~ 98%, 21 ~ 27 min B 相 98%。

2 方法学考察

2.1 线性关系

将 50 mg/ml 的混合色素标准储备液稀释成质量浓度分别为 1.56、3.12、6.25、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准工作溶液, 按优化色谱条件测定并绘制标准曲线, 结果表明 5 种合成色素在 1.56 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内具有良好的线性关系, 线性相关系数均为 1.000 0。

2.2 精密度试验

精密称取粉碎均匀的玉米馒头 1.000 0 g, 在 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加标水平下平行检测 6 次, 柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红和亮蓝相对标准偏差分别为 0.16%、0.12%、0.11%、0.16% 和 0.41%, 方法显示了较好的精密度。

2.3 稳定性试验

取精密度试验下的试样溶液 (试样: 玉米馒头), 测定 6 次, 每次间隔 4 h, 测得峰面积积分值, 柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红和亮蓝相对标准偏差分别为 0.10%、0.15%、0.15%、0.10% 和 0.53%; 表明试样溶液中 5 种合成色素在 24 h 内稳定。

2.4 重现性试验

取同一样品 (玉米馒头), 按检测方法重复进行 6 次试验, 检出柠檬黄平均含量为 0.194 2 g/kg, RSD 为 0.82%, 胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝均未检出, 证明此方法重现性良好。

2.5 加标回收率

准确称取 1.000 0 g 玉米馒头样品 9 份, 在 25.0、100、250 μg 每个加标水平加 3 份下, 每个量各平行检测 3 次, 计算加标回收率和相对标准偏

差, 结果见表 1。可以看出: 5 种色素的平均回收率 为 98.9% ~ 101.6%, 相对标准偏差 不大于 4.00%。

表 1 样品加混标时各色素的回收率及精密度

Table1 Recoveries and RSDs of five synthetic colorants from spiked sample (n=9)

色素名	称样量 (g)	加入量 (μg)	测定值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
柠檬黄	0.8929, 0.8935, 0.8953	25.0	198.2082, 198.4284, 198.5992	99.23, 99.64, 98.93	100.3	0.93
	0.8954, 0.8975, 0.8953	100	274.3622, 273.2319, 274.7887	100.48, 99.94, 100.92		
	0.8992, 0.9101, 0.9227	250	429.4653, 428.7116, 430.4099	101.94, 100.79, 100.49		
胭脂红	0.8929, 0.8935, 0.8953	25.0	24.9651, 24.9972, 25.0509	99.86, 99.99, 100.20	100.4	0.67
	0.8954, 0.8975, 0.8953	100	99.9125, 99.7314, 100.2062	99.91, 99.73, 100.21		
	0.8992, 0.9101, 0.9227	250	253.1837, 253.0524, 253.6543	101.27, 101.22, 101.46		
日落黄	0.8929, 0.8935, 0.8953	25.0	25.0372, 25.0575, 24.9988	100.15, 100.23, 100.00	100.5	0.64
	0.8954, 0.8975, 0.8953	100	100.2827, 99.8260, 100.1516	100.28, 99.83, 100.15		
	0.8992, 0.9101, 0.9227	250	252.6428, 252.5040, 254.5159	101.06, 101.00, 101.81		
诱惑红	0.8929, 0.8935, 0.8953	25.0	25.1714, 25.1577, 24.9973	100.69, 100.63, 99.99	101.6	0.98
	0.8954, 0.8975, 0.8953	100	102.4535, 102.0585, 102.6965	102.45, 102.06, 102.70		
	0.8992, 0.9101, 0.9227	250	256.2677, 255.8894, 253.5271	102.51, 102.36, 101.41		
亮蓝	0.8929, 0.8935, 0.8953	25.0	24.0258, 24.3260, 22.8607	96.10, 97.30, 91.44	98.9	3.47
	0.8954, 0.8975, 0.8953	100	100.2961, 99.1085, 100.4779	100.30, 99.11, 100.48		
	0.8992, 0.9101, 0.9227	250	253.5395, 252.8859, 256.0003	101.42, 101.15, 102.40		

2.6 定性确证

对于基质比较复杂的样品, 尽管采用有效的前处理方法, 仍会出现发酵面制品中的未知成分干扰待测组分测定的情况, 若仅以保留时间对组分定性会受到色谱仪状态、色谱柱状态、流动相组成微小变化等因素的影响, 从而影响检测结果的准确性。二极管阵列检测器的使用, 得到被测组分的光谱信息, 是保留时间定性的一种补充^[9]。图 2 是玉米馒头样品的色谱分离图谱, 可以看出在保留时间 4.406 min 出现了 1 个色谱峰, 与 4.400 min 柠檬黄标准品的保留时间吻合 (图 3), 初步判断该处是柠檬黄。为排除假阳性, 考察由二极管阵列检测器在线采集到的吸收光谱, 图 4 为玉米馒头中 4.406 min 峰与 4.400 min 柠檬黄标准品吸收光谱的重叠, 可以看出, 样品中色谱峰 4.406 min 的吸收光谱与 4.400 min 柠檬黄标准品吸收光谱吻合, 并结合二极管阵列检测器得出的匹配度和峰纯度, 从而可以确证样品中含有柠檬黄色素, 避免出现假阳性的结果。

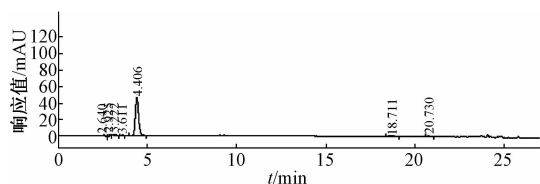
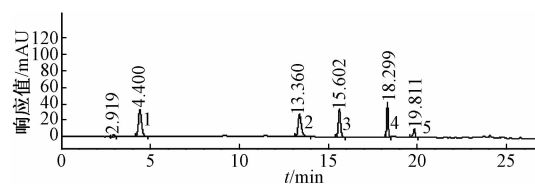


图 2 试样溶液高效液相色谱图
Figure 2 Chromatorams of sample

2.7 最低检出限

以 3 倍基线噪声所相当柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝的量计算检出限, 结果分别为



1: 柠檬黄, 2: 胭脂红, 3: 日落黄, 4: 诱惑红, 5: 亮蓝
图 3 5 种合成色素标准品高效液相色谱图
Figure 3 HPLC chromatograms of five synthetic colorants standards

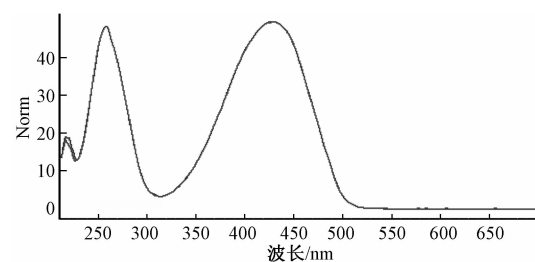


图 4 试样与柠檬黄标准品吸收光谱
Figure4 Spectra of sample and lemon yellow standard

0.21、0.69、0.21、0.81、0.81 ng。

2.8 最低定量限

以 10 倍基线噪声所相当于柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝的量计算最低定量限, 本方法最低定量限分别为 0.70、2.3、0.70、2.7、2.7 ng。

2.9 干扰试验

在此条件下对标准品溶液、试样溶液及同法制备的空白溶液进行测定, 试样溶液色谱图中在与标准品溶液相同位置具有吸收峰, 空白溶液结果则为阴性 (见图 5), 且标准品测定无干扰。同时为检查常用食品添加剂对本实验的干扰, 在此

色谱条件下, 分别对 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯甲酸、山梨酸、糖精钠混合标准品溶液和 5 种合成色素与苯甲酸、山梨酸、糖精钠混合标准品进行进样, 均不干扰上述 5 种合成色素出峰。见图 6。

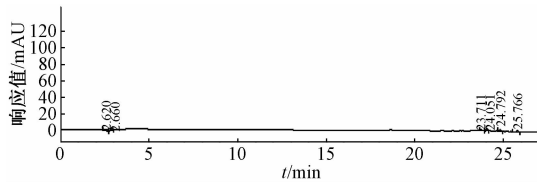
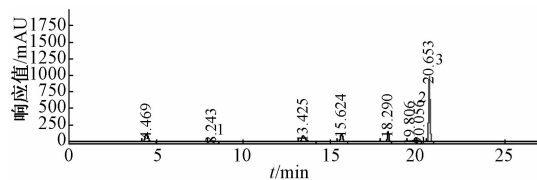


图 5 空白高效液相色谱图

Figure 5 Chromatograms of blank



1: 糖精钠, 2: 苯甲酸, 3: 山梨酸

图 6 5 种合成色素与苯甲酸、山梨酸、糖精钠混合标准品高效液相色谱图

Figure 6 HPLC chromatograms of five synthetic colorants and benzoic acid, sorbic acid, saccharin sodium mixed standard

2.10 样品的测定

分别取不同厂家生产的玉米馒头、青团、高粱馒头、黄金糕的样品制成不同浓度的样品, 按上述方法测定, 结果: 玉米馒头、青团、高粱馒头均未检出柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝, 黄金糕检出柠檬黄, 其余 4 种合成着色剂均未被检出。

3 讨论

现在市面上的有色馒头有 3 种, 分别为颜色来自于食品本身的天然色素, 来自于添加的色素, 来自于食品本身的色素和人为添加的色素。第三种样品前处理最难, 由于天然色素的干扰使合成色素不能完全洗脱, 致使样品重现性较差。本方法先将色素从样品中提取出, 再进行吸附、解析, 该方法可使合成色素洗脱完全, 重现性好。

对于黏性比较强的试样, 如青团等用糯米粉制成的食品, 样品前处理中超声的时间对合成色素含量影响很大, 如样品不经过超声处理, 其中的合成色素不能完全溶出, 超声过长又会造成样品中淀粉以极细微粒分散在溶液中, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热溶液会变粘稠, 用 G3 垂融漏斗抽滤时, 会导致 G3 垂融漏斗的砂芯滤板堵塞, 解吸时解析液流不下

或造成解析液浑浊。如果解析液太浑浊, 当解析液蒸发到近干时, 溶液中的微小颗粒会吸附大量合成色素, 用微孔滤膜过滤后进样, 滤膜会把吸附大量合成色素的微粒过滤了, 不能准确测定色素的含量。为控制好试样超声时间, 考察不同的提取时间对合成色素含量的影响, 在提取时间分别为 0、5、15、30、60 min 的情况下分别测定其含量 ($n=5$)。结果表明超声处理 5 min 即可使柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝测定结果稳定、准确、可靠。

聚酰胺主要是通过氢键来吸附, 当然必须在酸性条件下, 日落黄、胭脂红、亮蓝等合成色素具有磺酸基, 氢键作用强, 聚酰胺吸附色素牢固, 同时用甲醇+甲酸(6+4)混合溶液不会洗脱; 碱性条件, 氢键作用降低, 色素被洗脱下来。在 GB/T 5009.35—2003 中试样溶液加柠檬酸溶液(20 g/100 ml)调 pH 值到 6, 聚酰胺上色谱在洗涤过程中容易脱落下来。经过试验表明试样溶液加柠檬酸(20 g/100 ml)调 pH 值到 4, 能使各色素特别是亮蓝吸附完全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国出入境检验检疫局, 国家质量监督局. SN/T 1743—2006 食品中诱惑红、酸性红、亮蓝、日落黄的含量检测高效液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [2] 邹建宏, 陈卫东, 邵景东. 反相高效液相色谱法同时测定果汁中 8 种添加剂 [J]. 分析化学, 2001, 29 (10): 1192-1195.
- [3] 张正尧. 高效液相色谱法测定肉禽、乳制品中合成色素的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (8): 928.
- [4] 何继保, 汪莉. 反相高效液相色谱法测定食品中多种合成色素 [J]. 现代预防医学, 2008, 35 (13): 2487-2488.
- [5] 管敏娅, 张立义. 食品中 5 种合成食用色素高效液相色谱检测方法的探讨 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (6): 1105-1106.
- [6] 汪辉, 曹小彦, 李林, 等. 反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中 14 种常见食品添加剂的快速测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28 (10): 1194-1197.
- [7] MINIOTI K S, SAKELLARJOU C F, THOMAIDIS N S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector [J]. Anal Chim Acta, 2007, 583 (1): 103-110.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.35—2003 食品中合成着色剂的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [9] 于世林. 高效液相色谱方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 35-36.