

# 高效液相色谱法同时测定饮料中 十种食用合成着色剂

郭平<sup>1</sup> 金会会<sup>1</sup> 李瑾瑾<sup>2</sup> 郑燕<sup>2</sup> 王远兴<sup>2\*</sup> 李海燕<sup>1</sup>

(1.江西出入境检验检疫局,江西南昌 330002;

2.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047)

**摘要:**建立了一种多波长同时测定饮料中十种食用合成着色剂(柠檬黄,苋菜红,胭脂红,日落黄,诱惑红,亮绿 SF, 监牢绿,亮蓝,酸性橙,碱性嫩黄 O)的高效液相色谱法。样品在酸性条件下于 60℃ 水浴聚酰胺粉吸附 30min,碱性条件下无水乙醇-氨水-水(体积比为 70:1:29)解吸,采用高效液相色谱法分离,可变波长检测器检测,外标法定量。结果表明,十种合成着色剂在 0.1~10.0 μg/mL 范围内线性关系良好,相关系数为 0.9981~0.9998。当添加水平在 0.5~10.0 μg/mL 范围内,样品加标平均回收率在 76.6%~108%,日内精密密度范围在 1.0%~7.5%,日间精密密度在 2.1%~12.0%。其中柠檬黄,苋菜红,胭脂红,日落黄,诱惑红,监牢绿,亮蓝,碱性嫩黄 O 的检出限为 0.1 μg/mL,亮绿和酸性橙为 0.2 μg/mL。该方法灵敏度高,重现性好,完全满足合成着色剂多残留分析的要求。

**关键词:**高效液相色谱,残留分析,合成着色剂,饮料

## Determination of ten synthetic colorant in beverage products by high performance liquid chromatography with variable wavelength detector

GUO Ping<sup>1</sup>, JIN Hui-hui<sup>1</sup>, LI Jin-jin<sup>2</sup>, ZHENG Yan<sup>2</sup>, WANG Yuan-xing<sup>2\*</sup>, LI Hai-yan<sup>1</sup>

(1. Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanchang 330002, China;

2. Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** An analysis method for the determination of synthetic colorant residue in beverage products by high performance liquid chromatography-Variable Wavelength Detector was developed. Under acid condition, samples were adsorbed for 30 minutes by polyamide powder in 60℃ and then desorbed by alkaline ethanol-ammonia-water (volume ratio 70:1:29) under alkaline condition. The residues were determined by high performance liquid chromatography with Variable Wavelength Detector by external standard method. The results showed that the linear correlation of residue solvents was good in the range of 0.1~10.0 μg/mL and the linear correlation coefficient was in the range of 0.9981~0.9998. When 0.5~10.0 μg/mL samples were added, the average recoveries were 76.6%~108% and the intra- and inter-day rates were in the range of 1.0%~7.5% and 2.1%~12.0% respectively. The detection limit of Tartrazine (E102), Amaranth, Ponceau 4R, Sunset yellow, Allura acid AC (E129), Fast green FCF, Brilliant blue and Auramine O were 0.1 μg/mL, and Light green SF yellowish and Acid orange were 0.2 μg/mL. This method was suitable for the analysis of synthetic colorants residue in beverage products.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); residues analysis; synthetic colorant; beverage

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)08-0400-04

现在市场上的饮料品种越来越多,消耗量也日益增大,但是五颜六色的饮料中的色素又让人堪忧。色素按来源分为天然色素和合成色素。天然色素由于提取成本较高,并且在加工中很不稳定,且难以调

色,实际应用很有局限,而合成色素具有着色力强、价格便宜等优点,在食品、化妆品等行业中有着广泛的应用。合成着色剂,又称为苯胺色素、焦油色素,多为含有 R-N=N-R 键、苯环或氧杂蒽结构的化合物,且多以苯、甲苯、萘等化工产品为原料,经过磺化、硝化、卤化、偶氮化等一系列有机反应化合而成。有研究证明,合成着色剂对人体存在一定的不安全性或者有害作用<sup>[1-2]</sup>,主要包括毒性、致泻性、致突变性与致癌作用等。我国以及许多西方国家加强了对食用合成色素的使用管理,多种合成色素已被禁止

收稿日期:2010-07-28 \* 通讯联系人

作者简介:郭平,男,硕士研究生。

基金项目:食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助课题(SKLF-TS-200915);出入境检验检疫行业标准制定计划(2009B538)。

或严格限量使用。因此对食品中合成色素的准确测定具有重要意义。目前报道的对食品中合成着色剂的检测方法主要有紫外分光光度法<sup>[3-4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5-9]</sup>、高效液相色谱-质谱-质谱法<sup>[10]</sup>、薄层色谱法<sup>[11-12]</sup>、示波极谱法<sup>[13]</sup>、毛细管电泳法<sup>[14]</sup>和试剂盒法<sup>[15]</sup>等。对于液相色谱-质谱-质谱法来说,仪器条件和方法检测要求比较高,相对来说,高效液相色谱法的应用更广泛。但是已报道的对饮料中着色剂的多残留检测并不多,仅限于柠檬黄、诱惑红、日落黄等常见色素的检测,而如今对饮料的着色多用拼色,另外多数报道中都仅用单波长检测,特异性不强,且容易受干扰,因此亟需实现对合成着色剂的多残留的多波长高效液相色谱法的检测。本文建立了可变波长同时测定饮料中十种食用合成着色剂的高效液相色谱法,该法重复性强,灵敏度高,具有很强的实用性。随着国内外对食用合成着色剂的使用种类和使用限量地进一步要求,我国饮料行业进出口发展的瓶颈很可能会因此产生。而现行国标仅覆盖一些常见的着色剂如柠檬黄,日落黄,诱惑红等的检测,不能满足进出口的要求,且国标中仅用单波长进行检测,这无疑会降低某些组分的检测灵敏度,因此现阶段亟待建立一种快速灵敏的检测饮料中合成着色剂多残留的方法,使之应用于进出口检验检疫部门,打破贸易进出口的壁垒。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

标准品 柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮绿 SF、监牢绿、亮蓝、酸性橙、碱性嫩黄 O (1.0mg/mL) 购自于日本东京化成工业株式会社; 水 Millipore 超纯水; 乙腈, 甲醇 HPLC 级, 美国 Fisher 公司; 氨水 分析纯, 江西洪都生物化学公司; 甲酸 分析纯, 天津福晨化学试剂厂; 混合标准储备液 吸取 500 $\mu$ L 各标准液于 10mL 容量瓶中, 用水稀释 配制成 50 $\mu$ g/mL 的混合标准储备液。

Agilent 1200 高效液相色谱仪 配有 VWD 检测器, 安捷伦公司; MS1 Minishaker 漩涡混匀器 广州 IKA 公司; KQ 600B 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; KD-S26 型电热恒温水浴锅 上海森信实验仪器有限公司。

### 1.2 实验条件

1.2.1 样品前处理 称取液体样品 5.0g (精确至 0.01g), 对于含有酒精或碳酸的样品, 放入数片小瓷片, 加热驱除酒精或碳酸后加水定容至 20mL (若是果粒饮料则先要匀浆)。用柠檬酸溶液 (200g/L) 调节样液 pH 至 6, 加 2.0g 聚酰胺粉并置于 60 $^{\circ}$ C 水浴吸附 30min, 布氏漏斗抽滤, 用 pH 为 4 的水洗 3~5 次, 然后用甲醇-甲酸 (6+4) 混合液洗涤 3~5 次, 再用水洗至中性, 用乙醇-氨水-水 (7+1+29) 混合溶液解吸 5 次, 每次 5mL, 收集解吸液, 之后再用砂芯 G3 漏斗抽滤一次以除去少量的聚酰胺粉, 80 $^{\circ}$ C 平板蒸发至近干除去氨水和乙醇, 加水溶解定容至 10mL, 移液器取 1mL 高速离心后进高效液相色谱仪测定。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: Waters 5C<sub>18</sub>-MS-II (250  $\times$

4.6mm (i.d.)); 流动相: 乙腈-10mmol/L 乙酸铵; 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。流速为 1.0mL/min; 检测器: VWD 检测器; 检测波长: 422 520 440 580 436nm 五个波长下分段检测; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样体积 10 $\mu$ L。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

时间 (min)	乙腈 (%)	10mmol/L 乙酸铵 (%)
0	8	92
3	8	92
8	20	80
12	25	75
16	30	70
20	40	60
20.1	60	40
25	90	10
25.1	8	92
35	8	92

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件的选择

对着色剂的前处理方法主要有羊毛染色法, 聚酰胺吸附法, 固相萃取法等。实验对比了三种方法的添加回收率。结果发现, 虽然羊毛染色法比较简单, 但是对色素的吸附往往不完全, 尤其是很难实现对多种色素的同时吸附, 从而导致回收率明显偏低, 且对亮绿 SF、酸性橙、亮蓝和胭脂红基本无回收。

用固相萃取柱进行色素的富集与洗脱的实验时发现, 由于大多数饮料含糖量较高, 样液在浓缩以后粘度太大很难过柱, 另外一些颜色较深的果肉样品中, 基质成分较杂, 天然色素成分较多, 实验过程中不能将其有效地去除, 在过柱时易沉积下来造成柱子堵塞, 难以实现过柱。此外, 固相萃取柱法的成本也较高, 因此不选用此种方法。

聚酰胺粉吸附法是目前国家标准方法 GB/T 5009.35-2003<sup>[16]</sup> 推荐的色素的吸附与解吸附方法, 聚酰胺是具有酸碱二极性的化合物, 在酸性条件下与水溶性酸性染料结合, 而与天然色素、蛋白质、脂肪、淀粉等物质分离, 然后再在碱性条件下解吸色素, 结果表明, 此种方法下十种色素的回收率均高于 76.6% (回收率数据情况见表 2), 基质基本无干扰, 且成本较低, 因此选用聚酰胺吸附法进行样品的前处理。

### 2.2 色谱条件的选择

2.2.1 流动相的选择 甲醇、乙腈、水是液相色谱分析常用试剂, 但是实验中仅利用甲醇或乙腈等有机溶剂与水为流动相进行洗脱实验, 即使在梯度条件下也很难实现十种着色剂的完全分离。

为了改善分离条件, 实验采用加入缓冲液的方式以优化十种组分的分离。在反相液相色谱方法中, 正确选择缓冲液对于优化尖峰, 检出限和稳定的保留时间十分重要。实验比较了以不同浓度的磷酸溶液、乙酸铵、甲酸溶液与乙腈配比为流动相梯度洗脱, 而其它色谱条件不变情况下的十种合成着色剂的色谱分离情况。

比较发现, 用乙腈与不同浓度磷酸、甲酸配比作流动相, 十种色素色谱分离情况都不是很理想, 而乙腈-10mmol/L 乙酸铵为流动相, 按照表 1 梯度洗脱程序洗脱时, 十种合成着色剂混合标准样品分离较

表3 10种着色剂的平均回收率及日内(n=5)、日间精密性(n=3)

分析物 添加浓度(μg/mL)	平均回收率(%)			日内精密性(%)			日间精密性(%)		
	0.5	2	10	0.5	2	10	0.5	2	10
柠檬黄	90.6	99.8	108.0	1.0	4.8	4.5	2.9	9.3	10.2
苋菜红	81.3	86.2	87.2	6.0	4.5	1.9	5.5	8.2	8.8
胭脂红	79.6	82.3	87.7	1.2	5.7	3.1	2.1	6.4	3.1
日落黄	84.2	90.0	93.1	6.8	5.8	2.1	10.4	9.2	2.9
诱惑红	89.6	97.5	94.7	6.3	7.5	1.9	6.6	11.0	5.5
亮绿	77.1	87.0	87.4	2.1	2.4	3.2	6.6	5.6	6.9
监牢绿	78.0	89.1	78.1	5.7	10.5	2.8	6.9	6.1	7.6
亮蓝	89.7	84.5	90.6	1.1	5.4	2.1	4.2	12.0	5.4
酸性橙	76.6	87.7	88.9	5.2	4.4	2.6	5.5	5.5	3.0
碱性嫩黄 O	82.5	89.1	86.4	5.7	3.2	4.8	5.9	8.3	6.2

好,峰形尖锐。虽说乙酸铵浓度在20mmol/L时,峰型较10mmol/L对称性略微更好,但是缓冲盐浓度过高,易造成仪器的腐蚀,清洗较困难,因此实验选择10mmol/L乙酸铵作为缓冲溶液。另外对于一般的反相液相色谱柱,当pH范围在2.0~8.0之间时,不利于柱子性能维护,pH小于2时,会导致柱子键合相水解,10mmol/L乙酸铵pH接近中性,可以满足色谱柱的要求。

2.2.2 色谱柱与柱温的选择 选用了250×4.6mm(i.d.)的Sunfire™ C<sub>18</sub>柱、Kromasil C<sub>18</sub>柱、Waters 5 C<sub>18</sub>-MS-II柱进行实验,都能对十种着色剂实现良好分离,但是由于色素比较费柱子,Sunfire™ C<sub>18</sub>柱在用了一段时间后,柱效明显下降,综合考虑保留时间、峰形情况等因素,最后选择了Waters 5C<sub>18</sub>-MS-II250×4.6mm(i.d.)色谱柱。

对残留的分析一般要求在常温下,温度过高会造成色谱柱流失加大,也可能造成分析物的分解,而温度过低又容易造成色谱峰拖尾,在以上确定的色谱条件下分别以20、25、30、40℃进行实验,结果表明,柱温的升高能缩短分析时间,降低柱压,但减小了分离度,实验测得,在柱温为30℃时,各组分已达到基线分离,因此实验选择在30℃柱温下进行分析。

2.2.3 检测波长 选择合适的检测波长通常需要考虑尽可能选择最大吸收波长,同时尽可能使得干扰成分相应值较小,而在选择单波长进行多残留检测时,往往是顾此失彼。本方法采用可见波长测定,实验先用紫外对各种色素进行单扫,没有颜色的成分不会吸收,基线相对平稳,然后通过保留时间的不同设定五个不同的检测波长,分别为422、520、440、580、436nm,提高了检测灵敏度,特异性强。

流速直接影响色谱柱系统的压力、各组分分离度、洗脱时间等,实验考察了0.6、0.8、1.0、1.2mL/min的流速对分离和测定的影响,最终确定最佳流速为1.0mL/min。

进样量对检测结果的影响也不容忽视。若进样量太小,则干扰太大,不准确,而进样量太大,则有可能造成柱过载,减少色谱柱寿命。实验分别取5、10、15、20μL进样分析,结果表明,随着进样量的增加,测定灵敏度增强,峰面积增大,但当进样量为15μL及以上时,色谱峰变宽,对称性下降。综合考虑峰型、分离度以及灵敏度等因素,实验选择进样量为10μL。

## 2.3 方法线性范围

取50μg/mL混合标准储备液,用水逐级稀释至0.5、1、2、5、10μg/mL五个浓度,按照上述色谱条件进样,以各分析物峰面积Y对浓度X(μg/mL)绘制标准曲线,进行线性回归分析,标准曲线见图1,线性关系和相关系数见表2,由图表可知十种合成着色剂在0.5~10.0μg/mL内线性关系良好。

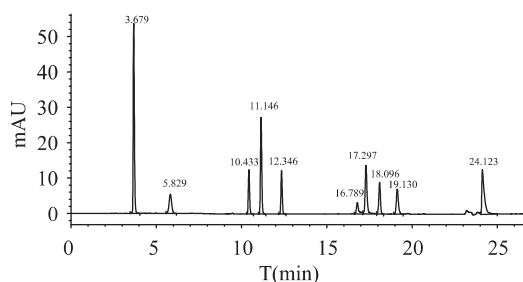


图1 十种混标图谱(std 5.0μg/mL)

表2 标准曲线方程及线性回归系数

分析物	保留时间 (min)	回归方程	相关系数	检测波长 (nm)
柠檬黄	3.679	Y = 24352X + 4108	0.9998	422
苋菜红	5.829	Y = 5325.45X + 143.1	0.9997	422
胭脂红	10.433	Y = 6316.11X + 858.4	0.9997	520
日落黄	11.146	Y = 1389.99X + 2138	0.9998	440
诱惑红	12.346	Y = 6207.50X + 933.2	0.9997	440
亮绿 SF	16.789	Y = 2699.6X - 918	0.9981	580
监牢绿	17.297	Y = 9311.38X + 816.3	0.9993	580
亮蓝	18.096	Y = 4958.68X + 834.2	0.9997	580
酸性橙	19.130	Y = 2805.88X + 179.2	0.9983	580
碱性嫩黄 O	24.123	Y = 5736.31X + 675.2	0.9991	436

## 2.4 回收率

十种着色剂低、中、高3个浓度的样品添加回收率和日内、日间精密性见表3。由表3可知,饮料在0.5、2、10μg/mL三个添加水平,平均回收率在76.6%~108%,日内精密性范围在1.0%~7.5%之间,日间精密性在2.1%~12.0%之间,可见该法回收率高、稳定性强、重复性好。

## 2.5 方法检测限

取空白样品,做6个平行,按上述样品前处理方法处理、色谱条件进样,得到空白样品色谱图,测得基线噪音值,取平均值,将信噪比S/N=3求得值作为检测限(LOD),其中柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落



黄、诱惑红、监牢绿、亮蓝和碱性嫩黄 O 的检测限为  $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ , 亮绿 SF 和酸性橙为  $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.6 实际样品的检测

应用本实验方法分别对不同企业送检的饮料样品进行合成着色剂残留检测, 其中某品牌送检的果粒饮料空白和加标图谱见图 2、图 3。从中可以看出, 该方法适用性较好, 杂质干扰小。

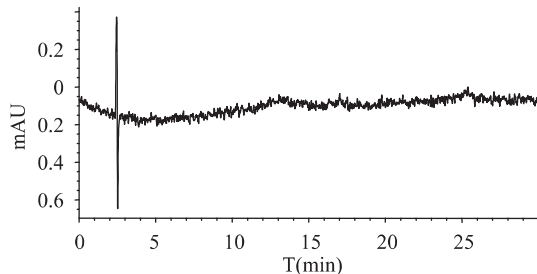


图 2 饮料样品空白谱图

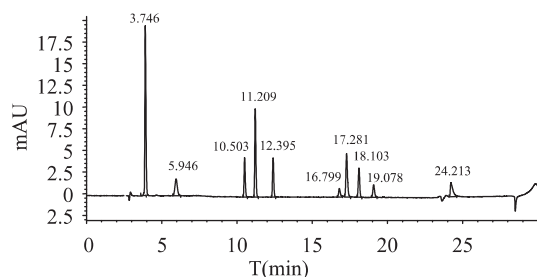


图 3 饮料中添加  $2.0\mu\text{g}/\text{mL}$  混标的色谱图

## 3 结论

本实验过程中, 利用检测器特有的可变波长功能, 根据各组分的出峰顺序, 建立了在不同时间段分别用最佳检测波长进行检测的高效液相色谱法。此法不但可以提高检测灵敏度, 同时还能克服梯度洗脱时的基线漂移, 减少共存物的干扰。本文所建立的可变程序波长同时测定饮料中十种食用合成着色剂的高效液相色谱法, 快速、简便、重现性好, 现已应用于江西出入境检验检疫局报检样品的检测。

### 参考文献

[1] Collier SW, Storm J E, Bronaugh R L. Reduction of azodyes

(上接第 399 页)

[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 20.

[5] 何勇, 李晓丽, 邵咏妮. 基于主成分分析和神经网络的近红外光谱苹果品种鉴别方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(5): 850.

[6] 李晓丽, 唐月明, 何勇, 等. 基于近红外光谱的水稻品种快速鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 582-585.

[7] 何勇, 冯水娟, 李晓丽. 应用近红外光谱快速鉴别酸奶品种的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(11): 2021.

[8] SHAO Y N, HE Y, ANTIHUS H G, et al. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics [J]. Food Engineering, 2007, 81: 672-678.

[9] 董晓星, 鲍一丹, 何勇. 应用近红外光谱技术快速鉴别酱油

during in vitro percutaneous absorption [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1993, 118: 73-79.

[2] Marmion DM, Handbook of US Colorants for foods, drugs, and cosmetics and Medical Devices [M]. Second Edition. John Wiley & Sons, 1984: 232-235.

[3] 高倩. 紫外分光同时测定四种食用合成色素[J]. 食品科学, 1999: 56-58.

[4] 刘慧, 胡仰栋, 等. 连续波长紫外分光光度法对合成食用色素混合体系的同时定量测定[J]. 食品工业科技, 2006, 27(9): 164-166.

[5] 王红梅, 郭伟, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中食用合成色素的含量[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(6): 106-108.

[6] Simone PA, Daniel MB, et al. Determination of synthetic dyes in selected food stuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1).

[7] 徐明敏, 陈波. 变波长紫外液相色谱法测定果汁中 5 种人工合成色素[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(5): 93-94.

[8] Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. Talanta, 2008, 74: 1408-1413.

[9] 夏虹, 杨洁, 涂一名, 等. 离子对高效液相色谱法测定果汁中的合成色素[J]. 分析科学学报, 2005, 21(2): 223-224.

[10] 李帮锐, 冯家力, 潘振球, 等. 高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定饮料中的人工合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(4): 579-580.

[11] 肉和肉制品(食用)色素的检测. 薄层色谱法[S]. ISO 13496-2000.

[12] 严浩英, 张军, 李树华, 等. 五种人工合成食用色素的薄层色谱扫描分析[J]. 现代预防医学, 1997, 24(2): 192-194.

[13] 刘红, 曹红, 戴永强, 等. 3 种食用合成色素的示波极谱测定[J]. 农垦医学, 2003, 25(4).

[14] 赵新颖, 贾丽, 周晓晶, 等. 毛细管电泳法同时测定糖果中人工合成色素的含量[J]. 现代仪器, 2008(4): 58-60.

[15] 谢俊平, 卢新. 食品合成色素检测盒优势突出[J]. 食品安全导刊, 2008(6): 50-51.

[16] GB-T 5009.35-2003. 食品中合成着色剂的测定[S].

品牌的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 597-601.

[10] 王莉, 刘飞, 何勇. 应用可见-近红外光谱技术进行白醋品牌和 pH 的快速检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(4): 813-816.

[11] 邵咏妮, 何勇, 鲍一丹. 基于独立组分分析和 BP 神经网络的可见/近红外光谱蜂蜜品牌的鉴别[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 602-605.

[12] 许禄, 邵学广. 化学计量学方法[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 359.

[13] 陆婉珍. 代近红外光谱分析技术[M]. 第二版. 北京: 中国石化出版社, 2006: 31, 73.

[14] 毛建江, 张玉杰, 徐经纬, 傅里叶近红外光谱法用于鹿茸的定性分析[J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43(1): 33-35.