

高效液相色谱法同时测定饮料中十种着色剂

易声伟, 朱永红, 屠大伟, 龚迎昆, 赵博

(重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401123)

摘要:建立了饮料中 10 种人工着色剂(柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、诱惑红、赤藓红、亮蓝、新红、酸性红、罗丹明 B) 的高效液相色谱测定方法。样品调 pH 值后, 采用 Welch Ultimate XB-C18 色谱柱 (4.6mm×150mm, 5 μ m), 以 0.02mol/L 乙酸铵和甲醇梯度洗脱, 采用紫外检测器检测。10 种人工合成色素在 0.8–40mg/L 范围内线性良好, 相关系数(r)都在 0.999 以上, 方法加标回收率为 90.3–108.0%。该方法简便, 易操作, 灵敏度高, 分离度好, 适用于饮料中 10 种着色剂的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 着色剂; 饮料

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-506X(2013)03-0068-0004

Determination of Ten Synthetic Colours in Drinks by HPLC

YI Sheng-wei, ZHU Yong-hong, TU Da-wei, GONG Ying-kun, ZHAO Bo

(Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401123, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) methods for determination of 10 synthetic colours (tartrazine, sunset yellow, carmine, amaranth, allura red, erythrosine, brilliant blue, new red, azorubine, Rhodamine B) in drinks was developed. The sample pH value was adjusted and then HPLC analysis was performed on pretreated samples. The pigments were separated on a Welch Ultimate XB-C18 column (5 μ m, 4.6mm×250mm) by gradient elution with a mobile phases made up of 0.02mol/L NH₄Ac and methanol, and detected by a UV detector. The ten kinds of synthetic colours had good linearity in the range of 0.8–40mg/L, the correlation coefficient (r) was higher than 0.999, and method recovery was 92.0–108.0%. This method was simple, easy to operate, the results were also good, accurate and reliable. This method has met the requirement of analysis method of 10 synthetic colours.

Key words: high performance liquid chromatography; synthetic colours; drinks

doi: 10.3969/j.issn.1674-506X.2013.03-019

食品的色泽是食品感官重要的项目之一。它不仅能引起人产生食欲同时还影响人们对风味和甜味的感觉。因此, 为改善食品的感官性能, 保持良好的色泽, 在食品加工过程中加入食用色素来提高食品的商品性。食品色素按来源不同可分为天然色素和人工合成色素两大类。合成色素主要指用人工合成的方法从煤焦油中制取或以苯、甲苯、萘等芳香烃化

合物为原料合成的有机色素。合成色素性质稳定, 着色力强, 可任意调色, 成本低廉, 使用方便, 因此被广泛使用。更有甚者, 不少食品生产经营单位和个体生产者为了美化食品的外观, 追求低廉成本, 无视有关法规使用苏丹红、罗丹明 B、碱性橙 (王金黄)、碱性嫩黄 O、酸性橙、美术绿等 6 种工业色素。目前, 我国已出台 GB2760-2011 《食品安全标准 食品添加

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 重庆市质量技术监督局科技项目 (KY201103)。

作者简介: 易声伟 (1982-), 女, 工程师, 硕士研究生。主要研究方向为食品检测。

剂使用标准》,对食品中食品添加剂的类别和限量做了明确规定^[1]。卫生部全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治领导小组自 2008 年以来陆续发布了 5 批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单》,其中就包括胭脂红色素、罗丹明 B 染料等。目前检测色素的方法有很多,但是同时检测色素和染料的方法却不多见^[2-4]。本文采用高效液相色谱(HPLC)法对常见的柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、诱惑红、赤藓红、亮蓝、新红、酸性红、罗丹明 B 等 10 种色素、染料进行同时测定,结果令人满意,可以为食品监管部门提供技术支持和参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

普析 L6-P6 高效液相色谱仪(配有四元梯度泵、紫外可见光检测器),Welch Ultimate XB-C18 柱(4.6mm×150mm,5 μ m),超声波振荡器,高速离心机、真空泵,抽滤器。

1.2 试剂

甲醇(honeywell 色谱纯),0.02mol/L 的乙酸铵(AR),1+1 氨水(AR),20%柠檬酸(AR),亚铁氰化钾溶液(109g/L),乙酸锌溶液(219g/L):称取 219g 乙酸锌,加 30mL 冰乙酸,加水溶解并稀释至 1000mL。8 种色素标准溶液:柠檬黄(GBW(E)10158,浓度 1mg/mL)、日落黄(GBW(E)10159,浓度 1mg/mL)、胭脂红(GBW(E)10162,浓度 1mg/mL)、苋菜红(GBW(E)10160,浓度 1mg/mL)、诱惑红(GBW(E)10164,浓度 1mg/mL)、赤藓红(GBW(E)10163,浓度 1mg/mL)、亮蓝(GBW(E)10162,浓度 1mg/mL)以上 8 种标准溶液由国家标准物质研究中心提供,标准品:新红(纯度:92.0%)(Dr.Ehrenstorfer GmbH, Lot:00611)、酸性红(纯度:99.0%)(Dr.Ehrenstorfer GmbH, Lot:10504)、罗丹明 B(纯度:95.0%)(Dr.Ehrenstorfer GmbH, Lot:10201)。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线

新红、酸性红和罗丹明 B 标准储备溶液:1g/L。分别准确称取 0.05g 新红、酸性红和罗丹明 B 标准物质于 50mL 容量瓶中,用水溶解并且定容至刻度,摇匀,作为标准储备溶液,于 0-4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝、诱惑红、赤藓红标准储备溶液:1g/L。分别精确吸取各标准储备溶液各 4mL 于 50mL 容量瓶,用水定容至刻度,摇匀,配成 0.08mg/mL 混合标准溶液。再采用逐级稀释配成

40mg/L、20mg/L、8mg/L、3.2mg/L、0.8mg/L 标准使用液。

1.3.2 样品处理

1.3.2.1 汽水、果汁类取适量样品,用 1+1 氨水或者 20%柠檬酸调 pH 值至 6 左右,含二氧化碳试样超声波振荡 10min,定容,过 0.45 μ m 水相滤膜,收集滤液备用。

1.3.2.2 配制酒等取适量样品,水浴加热去除乙醇,同 1.3.2.1 调 pH 值至 6 左右,定容,过 0.45 μ m 水相滤膜,收集滤液备用。

1.3.2.3 乳饮料、植物蛋白饮料等含蛋白质较多的样品:称取 5g 左右样品于 10mL 容量瓶中,加入 2mL 亚铁氰化钾溶液,摇匀,再加入 2mL 乙酸锌溶液摇匀,以沉淀蛋白质,加水定容至刻度,4000r/min 离心 10min,取上清液,经微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate XB-C18 柱(4.6mm×150mm,5 μ m),流动相 A 为乙酸铵溶液(0.02mol/L),B 为甲醇,流速 1.0mL/min,进样量 10 μ L,检测波长:254nm。梯度洗脱设置见表 1。

表 1 流动相梯度

Tab.1 The gradients of mobile phase

| 时间/min | A/% | B/% |
|--------|-----|-----|
| 0 | 90 | 10 |
| 10 | 80 | 20 |
| 15 | 65 | 35 |
| 22 | 2 | 98 |
| 30 | 2 | 98 |
| 32 | 90 | 10 |
| 38 | 90 | 10 |

2 结果与讨论

2.1 流动相 pH 的选择

用乙酸调节流动相(pH 分别为 4)及不调 pH 而直接用乙酸铵溶液(酸度计测定 pH 为 5.7-5.8),pH 等于 4 情况下,出峰较快,考虑到流动相 pH 过低或过高对色谱柱和仪器不利,另外可以简化操作,最终确定流动相为直接配制的不调 pH 的乙酸铵溶液。

2.2 洗脱梯度优化

不同的色素极性差异很大,采用等梯度洗脱不能得到理想的分离效果,故采用梯度洗脱方法。本实验先参照 GB/T 5009.35 方法用甲醇、乙酸铵进行梯度洗脱^[2]。实验出现以下问题:(1)柠檬黄出峰较快,容易与山梨酸等防腐剂色谱峰混淆,(2)甲醇浓度变

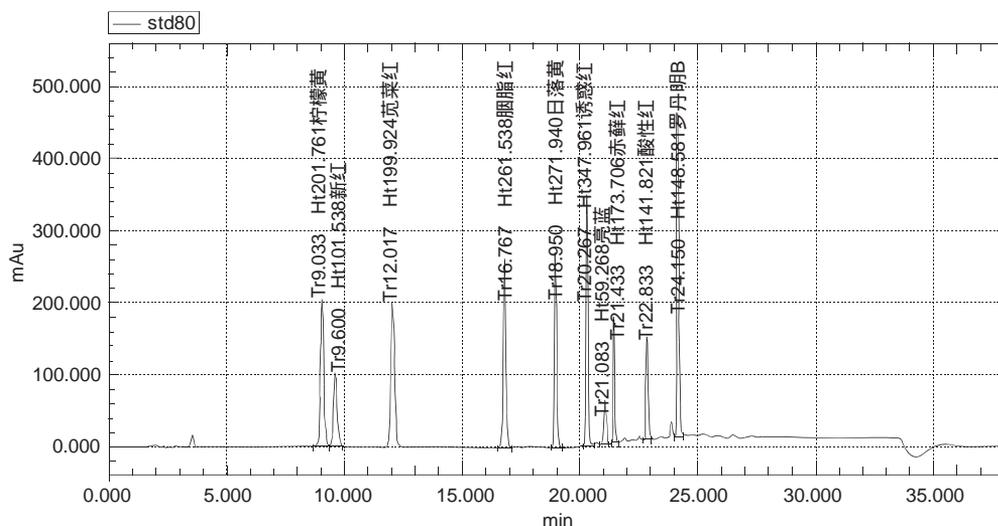


图1 标准色谱图

Fig.1 The chromatogram of standards

化过快,柠檬黄、新红不能很好的分离,采用甲醇首先缓慢上升而后参照 GB/T 5009.35 方法进行梯度洗脱,使 10 种色素得到较好的分离。图 1 为 10 种色素在本实验条件下得到的色谱峰。

2.3 标准曲线与检出限

分别配制各组份浓度相等的混合标准序列,以浓度为纵坐标,峰面积为横坐标绘制标准曲线,进行线性回归,线性范围 0.8–40mg/L,各组份相关系数均在 0.999 以上。方法的检出限按 3 倍信噪比计算。回归方程、相关系数和信噪比见表 2。

表 2 标准曲线及相关系数
Tab.2 Regression equation and correlated

| 化合物名称 | 标准曲线 | 相关系数 | 检出限/mg/kg |
|-------|----------------------------|--------|-----------|
| 柠檬黄 | $Y=3.4349 \times 10^{-5}x$ | 0.9999 | 0.16 |
| 新红 | $Y=7.0957 \times 10^{-5}x$ | 0.9999 | 0.30 |
| 苋菜红 | $Y=3.3241 \times 10^{-5}x$ | 0.9999 | 0.16 |
| 胭脂红 | $Y=3.5805 \times 10^{-5}x$ | 0.9999 | 0.11 |
| 日落黄 | $Y=4.1263 \times 10^{-5}x$ | 0.9998 | 0.11 |
| 诱惑红 | $Y=3.9177 \times 10^{-5}x$ | 0.9999 | 0.10 |
| 亮蓝 | $Y=1.9573 \times 10^{-4}x$ | 0.9998 | 0.7 |
| 赤藓红 | $Y=8.4495 \times 10^{-5}x$ | 0.9996 | 0.17 |
| 酸性红 | $Y=9.8089 \times 10^{-5}x$ | 0.9996 | 0.19 |
| 罗丹明 B | $Y=3.2110 \times 10^{-5}x$ | 0.9996 | 0.09 |

2.4 方法回收率与精密度

在样品中加入 2.4mg/L、15.0mg/L 色素混合标准溶液,测定回收率,见表 3。该方法回收率在 90.3–108.0%,说明方法准确度良好。

2.5 实际样品检测

用上述方法对样品 A 碳酸饮料, B 果味饮料进

表 3 回收率实验

Tab.3 The recovery experiment

| 化合物名称 | 加标值/mg/L | 检测值/mg/L | 回收率/% |
|-------|----------|----------|-------|
| 柠檬黄 | 2.4 | 2.592 | 108.0 |
| | 15.0 | 15.484 | 103.2 |
| 新红 | 2.4 | 2.559 | 106.6 |
| | 15.0 | 15.792 | 105.3 |
| 苋菜红 | 2.4 | 2.406 | 100.2 |
| | 15.0 | 14.322 | 95.5 |
| 胭脂红 | 2.4 | 2.533 | 105.5 |
| | 15.0 | 14.613 | 97.4 |
| 日落黄 | 2.4 | 2.574 | 107.2 |
| | 15.0 | 15.806 | 105.4 |
| 诱惑红 | 2.4 | 2.457 | 102.4 |
| | 15.0 | 14.575 | 97.2 |
| 亮蓝 | 2.4 | 2.56 | 106.7 |
| | 15.0 | 14.544 | 97.0 |
| 赤藓红 | 2.4 | 2.428 | 101.2 |
| | 15.0 | 13.648 | 91.0 |
| 酸性红 | 2.4 | 2.405 | 100.2 |
| | 15.0 | 15.023 | 100.2 |
| 罗丹明 B | 2.4 | 2.213 | 92.2 |
| | 15.0 | 13.546 | 90.3 |

行分析,外标法定量。色谱图见图 2、图 3。样品 A 检出柠檬黄、日落黄,柠檬黄含量为 2.6mg/kg,日落黄为 6.1mg/kg。样品 B 中检出诱惑红,其含量为 2.2mg/kg。两个样品中未发现不能在饮料中使用的酸性红和罗丹明 B,使用的柠檬黄、日落黄、诱惑红也未超出国家标准。

3 结论

本文建立了应用高效液相色谱法同时测定饮料

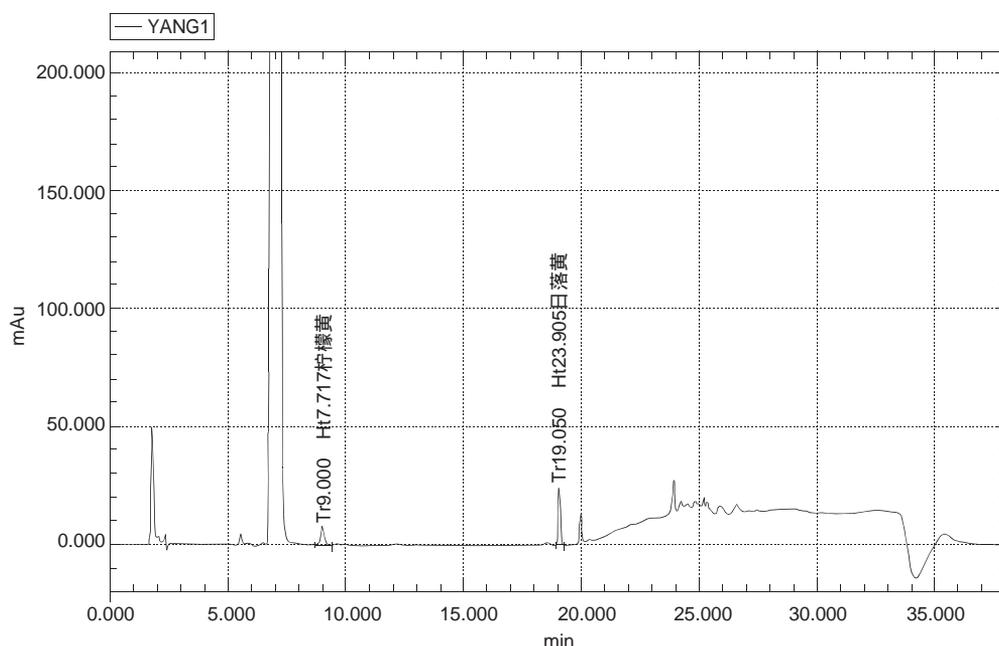


图2 样品A的色谱图

Fig.2 The chromatogram of sample A

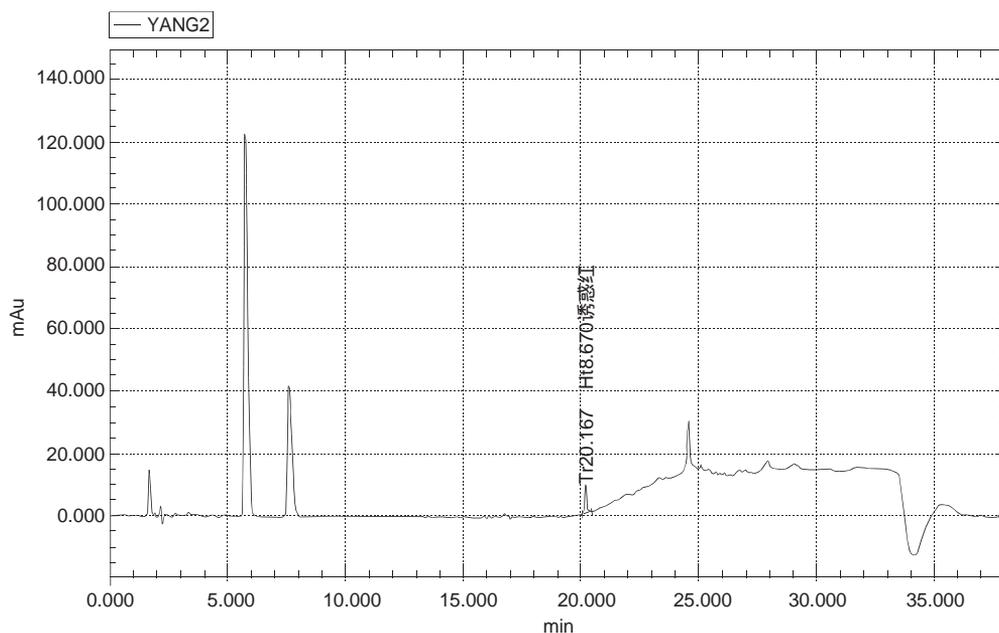


图3 样品B的色谱图

Fig.3 The chromatogram of sample B

中 10 种色素的含量。根据研究结果,液相色谱采用甲醇和 0.02mol/L 乙酸铵水溶液为流动相,梯度洗脱方式分离效果好。各组分的线性相关系数均大于 0.999,加标回收率在 90.3–108.0%之间。该方法简单快速,结果准确可靠,适用于饮料中多种色素的同时测定。

参考文献

[1] GB2760–2011. 国家安全标准 食品添加剂使用标准[S].

北京:中国标准出版社,2011.

[2] GB/T 5009.35–2003. 食品中人工合成色素的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[3] 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,2003.

[4] SN/T 2430–2010. 进出口食品中罗丹明 B 的检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003.