

# 固相萃取-高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定饮料中10种合成着色剂

咸瑞卿, 王小兵, 李启艳, 石峰, 李俊婕

(山东省食品药品检验所, 山东济南 250101)

**摘要:** 本文建立了固相萃取-高效液相色谱-二极管阵列检测法(SPE-HPLC-PDA)同时测定饮料中10种合成着色剂(新红、柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红、酸性橙II)的含量。样品经Waters Oasis WAX固相萃取柱净化,采用Agilent TC-C18色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm),以甲醇和0.02 mol/L的乙酸铵溶液为流动相,梯度洗脱,PDA检测波长为210 nm~650 nm。以保留时间结合待测物的紫外吸收光谱进行定性分析,采用外标法进行定量分析。10种合成色素线性范围为1~20  $\mu\text{g/mL}$ ( $r > 0.999$ );方法检出限为0.01~0.02 mg/kg;加标回收率为90.2~100.6%,RSDs为0.44~2.48%( $n=6$ )。该方法简单、准确、灵敏,适用于饮料中合成着色剂的测定。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱; 合成着色剂; 二极管阵列; 饮料

文章编号: 1673-9078(2013)6-1413-1416

## Simultaneous Determination of 10 Synthetic Colors in Drink by Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC/Photodiode Array Detection

XIAN Rui-qing, WANG Xiao-bing, LI Qi-yan, SHI Feng, LI Jun-jie

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan, 250101)

**Abstract:** A method for simultaneous determination of 10 synthetic colors (new red, tartrazine, amaranth, indigotin, carmine red, sunset yellow, allura red, brilliant blue, acid orange II and erythrosine) in drink by solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-photodiode array detector was developed. The drink samples were cleaned up by Waters Oasis WAX and separated on an Agilent TC-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.60 mm) column with methanol-0.02 mol/L ammonium acetate as mobile phase by gradient elution. The wave lengths for detection were from 210 nm to 650 nm. Qualitative analysis of synthetic colors was based on their retention times and ultraviolet absorption spectra. External standard method was applied for quantitative analysis. The results showed that the linear ranges of 10 synthetic colors were 1~20  $\mu\text{g/mL}$  ( $r > 0.999$ ). The recoveries ranged from 90.2% to 101.6% with RSDs of 0.44~2.48% ( $n=6$ ). The detection limits were in the range of 0.01~0.02 mg/kg. The method was simple, accurate and sensitive, which was suitable for the simultaneous determination of synthetic colors in drink.

**Key words:** SPE; HPLC; synthetic color; PDA; drink

人工合成着色剂是一类重要的食品添加剂,与天然色素相比,具有成本低廉、色泽鲜艳、着色力强、性质稳定、配色方便等特点,被广泛应用于食品生产加工行业中。合成着色剂多由苯、甲苯、萘等化工产品为原料经多步反应制成,其化学中间体和成品均有一定毒性,因此各国均严格控制其应用范围和使用量<sup>[1-3]</sup>。饮料中添加合成着色剂的现象非常普遍,而且超标、超范围使用现象屡见不鲜,屡禁不止,给人们的身体健康带来巨大隐患。除了食用着色剂外,目前市上

还发现某些饮料中非法添加如酸性橙II等非食用

收稿日期: 2013-02-01

作者简介: 咸瑞卿,男,主管药师,主要研究方向:食品保健品分析面

色剂,这些着色作为工业用途的化工产品,属于食品中的禁用物质。因此建立准确、高效的分析方法用于饮料中合成色素的准确测定具有重要意义

目前国标中合成着色剂的测定主要是高效液相色谱法,方法中常用的前处理方法有:透析法、SPE固相萃取小柱法、聚酰胺粉吸附法、液-液提取法等<sup>[4-6]</sup>。本文采用弱阴离子交换-反相混合型固相萃取小柱对饮料进行净化处理,采用高效液相色谱-二极管阵列检测器于可见光区多波长同时测定新红、柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红、酸性橙II等10种合成着色剂,可有效减少基质干扰,提高检测灵敏度。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器; Milli-Q 超纯水机; GILSON GX-274 固相萃取装置; OrganomationN-EVAP 氮吹仪; GL-88B 涡旋混合器; Mettler Toledo MS 电子天平; KQ-500DE 型数控超声波清洗器。

乙酸铵(分析纯); 甲醇(色谱醇); 试验用水为超纯水; 5%氨水甲醇溶液(量取5 mL氨水与95 mL色谱甲醇, 混匀); 柠檬黄(GBW(E)100001 a)、苋菜红(GBW(E)100002 a)、日落黄(GBW(E)100003a)、胭脂红(GBW(E)100004 a)、亮蓝(BW(E)100005 a)为中国计量科学研究院提供; 赤藓红(GBW(E)100164)、诱惑红(GBW(E)100164)为北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司提供; 新红(SB05-219-2008)为农业部环境保护科研检测所提供, 靛蓝、酸性橙II购自Sigma公司。

样品1(红牛维生素功能饮料)、样品2(美年达橙味汽水)、样品3(康师傅菠萝汁饮品)、样品4(醒目苹果味汽水)均购自超市。

### 1.2 标准溶液的配制

用纯水将各标准品稀释成浓度为40  $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液, 再用水稀释成浓度为1.0、5.0、10、15、20  $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液, 临用前配制。

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 固相萃取柱活化

取Waters Oasis WAX(60 mg/3 mL/支), 先经5 mL甲醇滤过活化, 再加5 mL水置换, 保持萃取柱润湿状态, 待用。

#### 1.3.2 样品净化

精密称取5 g左右的样品(含二氧化碳的样品需超声振荡驱除二氧化碳), 调节待测液pH值 $6.0 \pm 0.1$ , 转移至已活化好的固相萃取柱中, 控制流速0.5~1 mL/min; 依次用5 mL水和5 mL甲醇淋洗, 控制淋洗速度小于2 mL/min, 弃去全部流出液; 再用5%的氨水甲醇溶液分5次洗脱吸附在固相萃取柱中的样品, 每次1.0 mL, 控制流速小于1 mL/min; 收集洗脱液后, 在40  $^{\circ}\text{C}$ 条件下氮气吹干, 精密加水5 mL, 涡旋混匀后, 用0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 滤液备用。

### 1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C18柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇(A)+0.02 mol/L乙酸铵(B), 梯度洗脱程序: 见表1; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; PDA检测器扫描范围: 210~650

nm; 检测波长: 新红506 nm、柠檬黄427 nm、苋菜红523 nm、靛蓝610 nm、胭脂红509 nm、日落黄485 nm、诱惑红511 nm、亮蓝628 nm、赤藓红530 nm、酸性橙II 484 nm。

表1 优化的梯度洗脱条件

Table 1 Optimal gradient elution conditions

时间/min	A/%	B/%
0	10	90
6	40	60
9	90	10
15	90	10
16	10	90
20	10	90

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件的选择

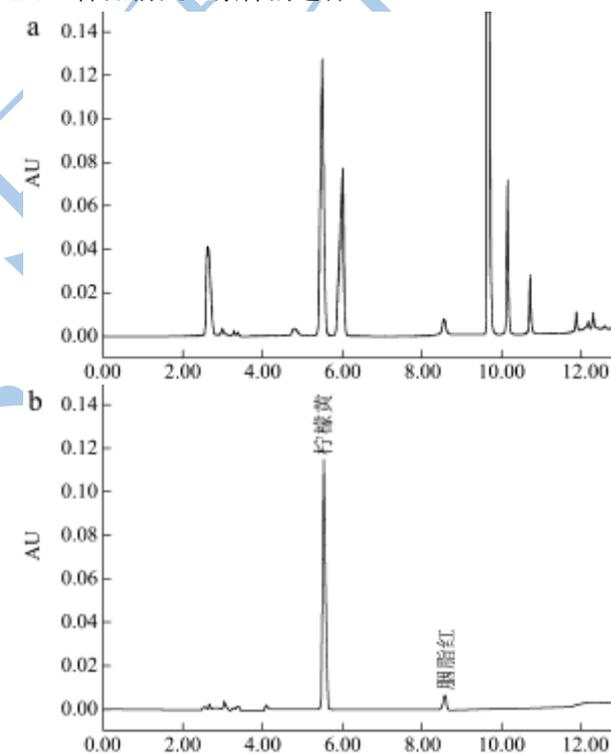


图1 样品1的色谱图(254 nm)

Fig.1 HPLC chromatograms of the sample 1

注: a: 未经净化处理; b: 经净化SPE处理。

饮料中成分复杂, 富含糖类、有机酸类、防腐剂类、天然色素类等成分, 不经净化直接进样会干扰待测成分的测定, 同时还会降低色谱柱的寿命。国标(GB/T 5009.35-2003)采用聚酰胺吸附法和或液-液萃取法(赤藓红)净化处理, 操作环境差, 费时繁琐, 损失大, 而且样品一些杂质仍无法除掉, 影响样品的测定。根据被测成分均具有芳环结构可以被反相吸附剂保留,  $\text{SO}_3^-$ 结构(赤藓红除外)可以被弱阴离子交换吸附剂

选择性吸附的特点,本试验选择弱阴离子交换-反相混合型固相萃取小柱(Waters Oasis WAX、Clearnt PWAX等)净化处理,可有效减少饮料中基质的干扰。实验发现,与其他被测成分相比,赤藓红与SPE中吸附剂的吸附能力稍弱,上样时控制上样液pH值 $6.0\pm 0.1$ ,流速 $0.5\sim 1\text{ mL/min}$ 可以保证被测物吸附充分,淋洗液选择超纯水和甲醇,在保证回收率90%以上的同时,净化效果也较满意。图1为样品1直接进样和净化后进样的色谱图,从图中可以看出,净化后杂质峰响应明显降低,净化效果良好。

## 2.2 色谱条件的优化

### 2.2.1 色谱柱的选择

实验考察了几种常用的C18色谱柱( $5\ \mu\text{m}$ ,  $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ )(Thermo ODS HYPERRSIL、Waters-Symmetry C18、Phenomenex Gemini C18、Aglient SB-C18、Aglient TC-C18)对10种着色剂的分离效能,发现在相同柱温和洗脱条件下,苋菜红、胭脂红、靛蓝、日落黄、诱惑红、酸性橙II在各色谱柱中峰形良好、分离度符合要求。但新红与柠檬黄的对色谱柱的选择性较强,在Phenomenex Gemini C18、Aglient TC-C18的分离效果较好,此外赤藓红对色谱柱也有较强的选择性,除Aglient TC-C18外,均存在出峰时间晚,峰形不好等问题。

### 2.2.2 柱温的选择

柱温对各成分的分度有显著影响,尤其对难分离的新红与柠檬黄,两者在 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 时分度分别为0.95、1.36、1.95、2.20。柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 时控温方便且各被测成分分度符合要求,因此选择最佳柱温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 2.2.3 梯度洗脱程序的选择

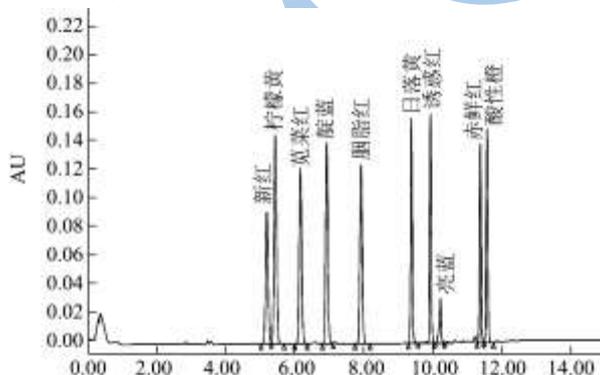


图2 10种着色剂标准品混合溶液色谱图(254 nm)

Fig.2 HPLC chromatogram of 10 synthetic colors (254 nm)

依据国标(GB/T 5009.35-2003)中梯度洗脱程序各被测成分分离度不理想。当选用甲醇与 $0.02\text{ mol/L}$ 乙酸铵溶液进行梯度洗脱时,若甲醇浓度上升过快,相邻成分间分离度降低;若上升过慢,赤藓红、酸性

橙II等保留时间过长,而且会使亮蓝峰分为2~3个不完全分离的同分异构体峰<sup>[7-8]</sup>,可能导致积分不准确或误判为杂质峰<sup>[9-12]</sup>。最终确定较佳洗脱梯度程序如表1所示,在12 min内10种着色剂分离度和峰形良好,出峰情况见图2。

### 2.2.4 检测波长的选择

国标(GB/T5009.35-2003)采用254 nm下同时测定8种色素,此波长下干扰物质多,检测灵敏度低,尤其是对亮蓝测定的干扰最大,在低浓度下难以测定。我本文采用二极管阵列检测器扫描得紫外-可见吸收光谱,各组分最大吸收波长为:新红(309、506 nm)、柠檬黄(258、427 nm)、苋菜红(523 nm)、靛蓝(287、610 nm)、胭脂红(332、509 nm)、日落黄(313、485 nm)、诱惑红(315、511 nm)、亮蓝(628 nm)、赤藓红(530 nm)、酸性橙II(484 nm)。考虑到多数干扰物在低波长处也有吸收,存在较大干扰,因此优先选择特征性较强的可见波长作为检测波长<sup>[13]</sup>,最终确定新红、柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红、酸性橙II分别在506、427、523、610、483、610、509、485、511、628、530、484 nm处检测,在优化的色谱条件下,消除了干扰,出峰单纯,大大提高了检测灵敏度且实际样品无干扰峰。

## 2.3 线性范围和检出限

在设定的色谱条件下,对不同浓度标准系列溶液进行分析,实验结果表明,各组分的浓度与其峰面积呈良好的线性关系。以3倍信噪比确定最低检出限。线性范围、线性方程、相关系数及检出限见表2。

表2 线性范围、线性方程、相关系数和检出限

Table 2 Linear range, regression equation, correlation coefficient and detection limits

待测成分	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	线性方程	相关系数 $R^2$	检出限 ( $\text{mg/kg}$ )
新红	1~20	$Y=36574X-13444$	0.9996	0.02
柠檬黄	1~20	$Y=38103X-25679$	1.0000	0.02
苋菜红	1~20	$Y=28724X-7994$	0.9998	0.03
靛蓝	1~20	$Y=33113X-12923$	0.9996	0.02
胭脂红	1~20	$Y=29115X-9919$	0.9997	0.02
日落黄	1~20	$Y=35788X-12257$	0.9997	0.02
诱惑红	1~20	$Y=40399X-7548$	0.9999	0.02
亮蓝	1~20	$Y=105227X-3594$	0.9997	0.01
酸性橙II	1~20	$Y=41069X-12291$	0.9996	0.02
赤藓红	1~20	$Y=73467X-19493$	0.9997	0.01

## 2.4 样品测定、方法精密度和回收率

对不同类型的饮料进行了测定,样品1中检出柠檬

黄8.6 mg/kg、胭脂红1.3 mg/kg, 样品2中检出柠檬黄11.7 mg/kg、胭脂红1.7 mg/kg、日落黄16.75 mg/kg, 样品3中检出柠檬黄7.1 mg/kg、亮蓝0.52 mg/kg, 样品4中10种合成着色剂均未检出。

表3 加标回收率和精密度 (n=6)

Table 3 The recovery and precision

待测成分	加入量/ $\mu\text{g}$	测定均值/ $\mu\text{g}$	回收率/%	RSD/%
新红	10	9.52	95.2	1.80
	50	48.3	96.6	0.98
	80	75.8	94.8	1.44
柠檬黄	10	9.67	96.7	1.10
	50	48.6	97.2	1.54
	80	76.9	96.1	1.25
苋菜红	10	9.53	95.3	1.90
	50	50.3	100.6	1.85
	80	79.8	99.8	0.76
靛蓝	10	9.46	94.6	2.11
	50	48.6	97.2	1.88
	80	77.8	97.3	0.79
胭脂红	10	9.62	96.2	1.84
	50	48.5	97.0	2.21
	80	77.2	96.5	2.48
日落黄	10	9.62	96.2	2.36
	50	49.8	99.6	1.45
	80	78.8	98.5	0.38
诱惑红	10	9.58	95.8	1.62
	50	48.3	96.6	1.48
	80	78.8	98.5	0.87
亮蓝	10	9.73	97.3	2.15
	50	48.6	97.2	1.96
	80	79.1	98.9	1.49
赤藓红	10	9.02	90.2	1.43
	50	46.9	93.8	0.44
	80	73.8	92.3	1.63
酸性橙II	10	9.64	96.4	1.24
	50	50.2	100.4	0.44
	80	78.8	98.5	1.83

以空白样品作为本底, 精密称取每份5 g左右, 分别加入一定量(三水平)的混合标准溶液(n=6), 按照1.3实验方法进行预处理, 在1.4设定的色谱条件下, 做回收率和精密度试验, 试验结果见表3。由表3

可知, 10种成分的加标回收率在90.2~100.6%之间, 相对标准偏差均小于2.5%, 由此可见, 该法测量结果可靠。

### 3 结论

本研究建立了弱阴离子交换-反相混合型固相萃取小柱对饮料样品进行前处理, 用高效液相色谱-二极管阵列检测器同时测定其中10种合成着色剂的方法。该法应用SPE法净化样品, 前处理简单、方便, 有效地减少了基体成分的干扰; 优化的色谱条件出峰较快、峰形良好, 分离度符合要求; 多波长检测提高了灵敏度, 适合饮料类产品中合成着色剂的定性、定量分析。

### 参考文献

- [1] 葛宇. 食品中人工合成色素使用法规及检测标准进展[J]. 质量与标准化, 2011, 9:31-35
- [2] GB2760-2011. 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011
- [3] 邱新建, 代龙, 贺文彦, 等. 中药咀嚼片研究进展[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(11):679-680
- [4] 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
- [5] GB/T5009.35-2008. 食品中人工合成色素的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [6] GB/T21916-2008. 水果罐头中合成着色剂的测定高效液相色谱法[S]. 2008
- [7] 张学忠, 牛之瑞, 冯雷, 等. 高效液相法测定饮料中合成着色剂预处理方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(2):94-96
- [8] 苏锡辉, 赵卉. 食用合成色素亮蓝标准样品制备中的纯化研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, 2:208-211
- [9] 刘立萍, 黄蔚, 唐序文, 等. 高效液相色谱法测定食品中亮蓝同分异构体[J]. 食品科学, 2012, 33(8):221-224
- [10] 丁怡, 邱佩丽, 黄秋婷. 固相萃取-高效液相色谱测定酒中合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6):1262-1264
- [11] 刘恒, 叶梅, 朱明星, 等. 食品中6种人工合成着色剂的快速检测[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(1):125-128
- [12] 袁旭, 张利鹏. 浅谈食品中合成着色剂高效液相色谱检测方法[J]. 科技传播, 2010, 23(1):150-151
- [13] 陈欣欣, 谢娅黎, 肖汉, 等. 超高效液相色谱快速检测葡萄酒中5种合成着色剂[J]. 现代食品科技, 2009, 25(9):1100-1098