

# HPLC 法测定保健食品包衣片中合成色素的研究

张连龙, 周华生, 叶科航, 成恒嵩

(无锡健特药业有限公司, 江苏 无锡 214091)

**摘要:** 本文研究了高效液相色谱法测定某保健食品包衣片中人工合成色素柠檬黄、靛蓝和诱惑红的含量。聚酰胺纯化样品, 柱: Lichrospher C<sub>18</sub>, 流动相: 甲醇-乙酸铵溶液 (pH 4.0, 0.02 mol/L), 梯度洗脱: 甲醇 20%~35%, 3%/min; 35%~98%, 9%/min; 98%持续 6min, 流速: 1 ml/min, 检测器: 单波长, UV 254 nm; 多波长, 分段设置最佳波长, 柠檬黄 428 nm, 靛蓝 610 nm, 诱惑红 500nm, 均取得较好结果。线性范围: 0~100 μg/ml; 回收率: 91.3%~103.1%; 标准差: 2.11%~5.63%; 最低检测量: 2 ng~11 ng, 其中尤以多波长测定最佳。

**关键词:** 高效液相色谱; 保健食品; 合成色素; 测定

**中图分类号:** TS207.3; **文献标识码:** B; **文章篇号:** 1673-9078(2007)01-0096-04

## Determination of Synthetic Colors in Coating Tablet of a Health Food by HPLC

ZHANG Lian-long, ZHOU Hua-sheng, YE Ke-hang, CHENG Heng-song

(Wuxi Giant Pharmaceutical CO., LTd, Wuxi 4091, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determinate the content of artificial synthetic colors in coating tablet of a healthful food, including tartrazine, indigo carmine and allure red. After purified by polyamide, the samples were assayed by HPLC on a Lichrospher C18 column using a Dual Absorbance Detector. The mobile phase was a mixture of methanol and ammonium acetate (pH 4.0, 0.02 mol/L), with a liner gradient of: methanol from 20% to 35% in 5 min, continuing to increase methanol content in the mobile phase from 35% to 98% in 7 min, and then maintaining for 6 min in 98%. The flow rate was 1 ml/min and solo-wavelength was set at UV 254 nm. The optimal multi-wavelength for Tartrazine, Indigo Carmine and Allure red were 428 nm, 610 nm and 500 nm, respectively. Results also showed that the linearity range, recovery range, relative standard deviation and the detection limit were 0~100 μg/ml, 91.3%~103.1%, 2.11%~5.63%, and 2 ng~11 ng, respectively.

**Key words:** HPLC; Healthful foods; Synthetic colors; Determination.

一些保健食品的剂型为包衣片剂。包衣目的是使该产品避免光、气、水、温对营养物质的影响, 增强稳定性, 同时掩盖某些矿物质不良口味, 增加适口性, 改善片剂外观等。包衣剂的主要成分为天然和人工合成色素。天然色素无毒害作用, 但人工合成色素多以苯、甲苯、萘等化工产品为原料, 经过磺化、硝化、偶氮化等一系列有机反应化合而成, 含有 R-N=N-R', 苯环或有氧杂蒽结构化合物, 它影响人体细胞代谢、酶的活力, 甚至能引起癌变。

所以许多国家加强了对其使用的管理, 并开展这类物质检测的研究<sup>[1-3]</sup>。我国在食品添加剂使用卫生标准 GB 2760-1996<sup>[4]</sup>及预包装食品标签通则 GB 7718-2004<sup>[5]</sup>中明确规定了食品中使用各种人工食用合成色

收稿日期: 2006-09-04

作者简介: 张连龙: 高工, 主要从事保健食品的新产品研制和分析测试工作

素品种和用量, 但对其跟踪测定相对滞后, 故对包衣片中人工合成色素测定研究有一定现实意义。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料和仪器

##### 1.1.1 材料

保健食品: 黄金搭档, 无锡健特药业有限公司生产, 品种包括儿童及青少年多种维生素咀嚼片, 女士多种维生素片, 中老年多种维生素片, 男士多种维生素片 4 种。

聚酰胺 100 目, 层析用, 国药集团化学试剂公司。

包衣片: 上海卡乐康包衣技术有限公司。

无水乙醇、甲酸、乙酸、氨水、乙酸铵、柠檬酸为分析纯; 甲醇, 色谱纯; 水为重蒸水。

甲醇-甲酸溶液: 6+4; 无水乙醇-氨水 (2%, V/V)

-水: 7+2+1, 柠檬酸溶液: 20%; pH 4 及 pH 6 的水: 分别用蒸馏水和 20%柠檬酸溶液调配。

标准品: 柠檬黄、靛蓝、诱惑红为 Sigma 公司。

### 1.1.2 仪器

高效液相色谱仪: 美国 Waters 2695 型, 附有自动进样器, 四元梯度泵, 2487 双通道多波长检测器 (DAD), Empower 软件系统; pH S-3 精密数显酸度计: 上海天达仪器有限公司; HH-S1S 型恒温水浴锅: 金坛市大地自动化仪器厂; 分析天平: AE-240 型, Mettler 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 色谱条件

#### 1.2.1.1 单波长检测

色谱柱: Lichrospher C18, 250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm;

流动相: 甲醇-乙酸铵溶液 (0.02 mol/L, 乙酸调 pH=4.0), 0.45 μm 膜过滤;

梯度洗脱: 运行总时间 23 min。20%~35%甲醇洗脱 5 min, 速率 3%/min; 35%~98%甲醇洗脱 7 min, 速率 9%/min; 98%甲醇洗脱 6 min, 平衡 5 min, 速率 20%/min。

流速: 1 ml/min;

进样量: 20 μL;

检测波长: UV 254 nm。

#### 1.2.1.2 多波长检测

色谱柱、流动相、梯度洗脱、流速、进样量, 同 1.2.1.1, 利用 Empower 软件分段设置每种色素最佳吸收波长, 其中 0 min~5 min 柠檬黄出峰时段, 设置测定波长 428 nm; 5 min~9 min 靛蓝出峰时段, 设置测定波长 610 nm; 9 min~12 min 诱惑红出峰时段, 设置波长 500 nm。

### 1.2.2 标准品配制及标准曲线的制备

#### 1.2.2.1 标准溶液配制

贮备液: 准确称取按其纯度折算为 100%含量的柠檬黄、靛蓝、诱惑红各 0.1000g, 置于小烧杯中, 加 pH 6 的水溶解, 转移到 100ml 容量瓶中, 用此水溶液定容至刻度, 浓度 1mg/ml。

使用液: 吸取 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 ml 标准贮备液至 50 ml 容量瓶中, 用 pH 6 的水稀释至刻度, 该系列标准使用液分别为 0.0 μg/ml、20.0 μg/ml、40.0 μg/ml、60.0 μg/ml、80.0 μg/ml、100.0 μg/ml, 0.45 μm 膜过滤。

#### 1.2.2.2 标准曲线制备

在上述色谱条件下, 分别进样测定, 以各色素浓

度对峰面积计算回归方程, 相关系数等。

### 1.2.3 样品处理

#### 1.2.3.1 粉碎提取法

随机抽取一定量片剂, 经高速粉碎机粉碎, 细度 200 目。精确称取约 5 g 样品放入 100 ml 烧杯中, 加 30ml 水搅拌均匀, 用 20%柠檬酸溶液调 pH 6, 水浴加热至 60 °C, 1 g 聚酰胺加少许水调成粥状, 倒入样品溶液中, 玻璃棒搅拌 5 min, 使色素完全被吸附, 倒入 G3 号砂芯漏斗中抽滤; 60 °C pH 4 水洗涤 3 次-5 次, 每次 15ml, 然后用甲醇-甲酸溶液洗涤 3 次-5 次, 每次 10ml, 洗至流出液无色, 再用蒸馏水洗至中性, 弃去洗涤液, 最后用无水乙醇-氨水-水溶液洗脱, 使吸附在聚酰胺上色素解吸, 洗脱 3 次-5 次, 每次 5 ml, 收集洗脱液, 用乙酸调至中性, 置蒸发皿中, 80 °C 水浴蒸发至近干, 加水溶解, 定容至 10 ml, 0.45 μm 膜过滤, 待测。

#### 1.2.3.2 漂洗法

精确称取一定量片剂, 约 5 g, 放入 100 ml 烧杯中, 用蒸馏水反复漂洗, 直到外层包衣剂洗净为止, 合并洗涤液, 用 20%柠檬酸溶液调 pH 至 6, 以下处理同粉碎提取法。

### 1.2.4 计算

$$X = [(C - C_0) \times V \times n] / m$$

式中:  $X$ -被测色素含量, μg/g;  $C$ -标准曲线上求得色素浓度 (μg/ml);  $C_0$ -标准曲线上求得空白色素的浓度 (μg/ml);  $V$ -提取液定容体积 (ml);  $n$ -样品稀释倍数;  $m$ -样品质量 (g)。

## 2 试验结果

### 2.1 标准曲线的回归方程及相关系数

由于标准品纯度高, 杂质干扰少, 无杂峰出现, 用单波长和多波长测定都能较好分离, 分离度高, 达到基线分离, 噪音界线低, 待测色素均呈直线回归, 相关性好 (表 1), 说明能精确地定量测定。但多波长测定可提高靛蓝的灵敏度, 使最低检出量从 11 ng 降低至 7 ng。

表 1 标准品的回归方程和相关系数

测定波长	色素	回归方程	相关系数/R	线性范围/(μg/ml)	最低检出量/ng
单波长	柠檬黄	$Y = -0.762 + 1.421X$	0.9997	0-100	2
	靛蓝	$Y = 0.0267 + 0.0742X$	0.9989	0-100	11
	诱惑红	$Y = 0.0121 + 0.0312X$	0.9992	0-100	3
多波长	柠檬黄	$Y = 0.011 + 1.342X$	0.9998	0-100	2
	靛蓝	$Y = 0.221 + 0.0645X$	0.9991	0-100	7
	诱惑红	$Y = 0.0127 + 0.0355X$	0.9992	0-100	3

## 2.2 样品测定色谱图

用单波长和多波长分别对样品进行测定, 其色谱图见图 1、图 2。

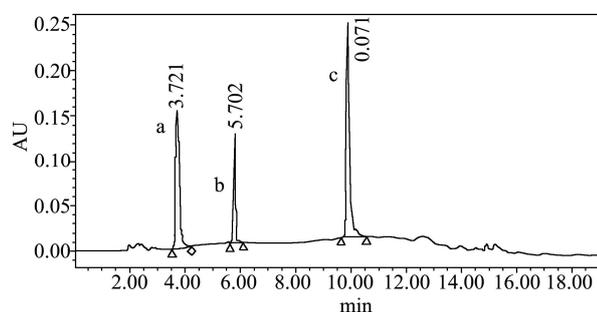


图 1 单波长样品测定色谱图

a.柠檬黄 b.靛蓝 c.诱惑红

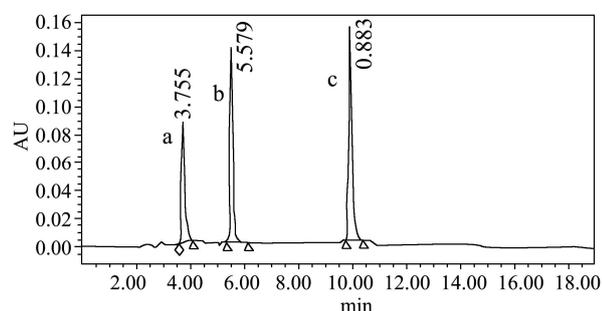


图 2 多波长样品测定色谱图

a.柠檬黄 b.靛蓝 c.诱惑红

从图 1、图 2 知, 样品能很好分离, 通过标准品

确定, 样品中含有柠檬黄、靛蓝、诱惑红 3 种色素。由于流动相相同, 同一种色素, 在不同色谱图上, 保留时间一致, 其中单波长测定, 有少量杂峰, 靛蓝的响应值较低, 而多波长测定, 无杂峰, 靛蓝的响应值明显提高, 基线更加平稳。

## 2.3 不同前处理方法测定结果

以儿童及青少年多种维生素咀嚼片为例, 结果见表 2, 无论用单波长还是多波长测定, 其粉碎提取法柠檬黄、靛蓝、诱惑红的含量均高于漂洗法, 平均提高 14%~28%。其它类型的多种维生素片亦类似。试验证明粉碎提取法测定结果比较符合实际。

表 2 不同前处理方法测定结果

色素	漂洗法/( $\mu\text{g/g}$ )		粉碎提取法/( $\mu\text{g/g}$ )		两法结果	
	单波长	多波长	单波长	多波长	平均	提高率
柠檬黄	13	12	15	15	15	18
靛蓝	7	4	9	5	7	24
诱惑红	36	36	41	42	41.5	14

## 2.4 回收率和重现性

按试验方法进行处理, 先测定样品中各色素的含量, 在此基础上, 加入一定量的标准品连续测定 5 次, 其单波长测定的回收率 91.3%~103.1%。相对标准差 2.25%~5.63%; 多波长测定回收率 96.4%~101.2%, 相对标准差 2.11%~2.75%, 均取得满意的效果, 但多波长测定, 靛蓝的回收率较高, 精确度更好(表 3)。

表 3 各色素的回收率和重复性 (n=5)

色素	样品量/( $\mu\text{g/ml}$ )	加入量/( $\mu\text{g/ml}$ )	单波长			多波长		
			实测值/( $\mu\text{g/ml}$ )	回收率/%	RSD/%	实测值/( $\mu\text{g/ml}$ )	回收率/%	RSD/%
柠檬黄	11.2	20.0	30.6	98.2	2.74	30.9	98.9	2.63
靛蓝	7.8	30.0	34.5	91.3	5.63	36.4	96.4	2.75
诱惑红	15.2	15.1	31.1	103.1	2.25	30.6	101.2	2.11

## 3 讨论

3.1 近年来人工合成色素测定研究主要集中于样品前处理和测定方法的遴选<sup>[6,7]</sup>。样品前处理主要是样品纯化技术, 如吸附剂和萃取剂选择, 柱和离心分离等。测定方法有纸层析、薄层色谱、紫外分光光度、高效液相色谱、示波极谱法等。考虑到保健食品成分比较复杂, 色素品种多, 色系(红、黄、蓝)齐全, 选用聚酰胺作吸附剂, 高效液相色谱法测定, 是比较快速、先进、有效的方法。国标法 GB/T 5009.141-2003<sup>[8]</sup>将诱惑红用纸层析法测定, GB/T 5009.35-2003<sup>[9]</sup>将柠檬黄、靛蓝用 HPLC 法测定, 本研究将这 3 种色素统一用 HPLC 法, 测定结果相同, 且更加适用。

3.2 聚酰胺是一类化学纤维物质, 由己二酸与乙二胺

聚合而成, 含有大量的酰胺基, 以氢键的形式与色素结合和解脱, 有极强的选择吸附与解吸附能力, 因此在样品前处理过程中, 每一具体步骤, 都有特定含义。如在酸性条件它吸附天然色素和人工合成色素, 不吸附蛋白质、脂肪、淀粉等大分子有机物质, 这样除去大量的有机物质, 再用 pH4 水洗去无机物质。而酸性的甲醇-甲酸洗去天然色素, 保留人工合成色素, 最后用碱性的无水乙醇-氨水-水溶液使人工合成色素解吸附, 通过这些步骤, 使待测样品高度纯化<sup>[10]</sup>。

3.3 样品前处理方法对测定结果有一定影响, 同样以聚酰胺为吸附剂, 其粉碎提取比直接漂洗提取测定结果偏高, 这是因为样品高速粉碎后, 粒子变小, 色素分子高度分散, 比表面积增加, 与聚酰胺吸附更充分, 同时粉碎样品抽滤比较容易, 缩短分析时间, 可提高

分析速度,其测定结果比较符合实际。

3.4 对单一色素和成分不复杂样品,用甲醇-乙酸铵作流动相可不必梯度洗脱<sup>[11]</sup>,而成分复杂的保健食品和色素品种多的包衣片剂应选择梯度洗脱<sup>[12-14]</sup>,本研究如不采用梯度洗脱,这3种色素就无法分离。梯度洗脱时要控制甲醇流量和速率变化,如起始(0~5min)甲醇浓度过高和变化速率较快,靛蓝和诱惑红不能很好分离,5~12min甲醇浓度过低,变化速率较慢,靛蓝和诱惑红不能分离,12min后高浓度甲醇要稳定6min,使柱中残留洗净,最后20%甲醇还要保留5min,使柱体平衡,进行下一个样品测定重现性较好。

3.5 梯度洗脱,UV 254 nm 单波长测定,虽效果较好,但紫外吸收容易引起杂质干扰,靛蓝的响应值偏低。而多波长测定选择各种色素的最佳波长,如柠檬黄(428 nm)、靛蓝(610 nm)、诱惑红(500 nm),这些都是可见光,杂质干扰少,同时多波长切换可减少洗脱的基线漂移,因此可大大提高靛蓝的响应值,使测定回收率、重复性明显高于单一波长的测定结果<sup>[15]</sup>。

#### 4 总结

保健食品黄金搭档包衣片中食用合成色素是限定指标,为了保障食用者的安全,必须选择快速、准确、灵敏的测定方法。本研究采用HPLC测定法,取得满意效果。样品前处理用粉碎提取法和漂洗法,聚酰胺吸附纯化, Lichrospher C<sub>18</sub>柱,甲醇-乙酸铵流动相,梯度洗脱,单波长或多波长测定柠檬黄、靛蓝、诱惑红3种色素。其线性范围宽,0~100 μg/ml,回收率高,91.3%~103.1%,重现性好,RSD 2.11%~5.63%,最低检测量,2~11 ng。其中尤以粉碎提取法,梯度洗脱,多波长检测效果更佳。该方法的建立对保健食品中添加的食用合成色素测定有较大参考价值。

#### 参考文献

(上接第102页)

- [17] Sipahioglu O, Barringer SA. Dielectric Properties of Vegetables and Fruits as a Function of Temperature, Ash, and Moisture Content[J]. J Food Sci, 2003,68(1): 234-239
- [18] Sipahioglu O, Barringer SA, et al. Modeling the Dielectric Properties of Ham as a Function of Temperature and Composition [J]. J Food Sci, 2003,68(3): 904-909
- [19] Sipahioglu O, et al. Characterization and Modeling of Dielectric Properties of Turkey Meat [J]. J Food Sci,2003, 68(2):521-527
- [20] Guan D, Cheng M, Wang Y, Tang J. Dielectric Properties of Mashed Potatoes Relevant to Microwave and Radio- frequ

- [1] Collicr S W, Storm J E, Bronaugh R L. Reduction of azodyes during in vitro percutaneous absorption[J]. Toxicology and Applied pharmacology,1993(118):73-79.
- [2] 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,1997. 14-24.
- [3] 郑云雁译. 美国的食品添加剂管理[J]. 中国食品卫生杂志. 1999, 11 (2):78-79.
- [4] GB 2760-1996. 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [5] GB 7718-2004. 预包装食品标签通则[S].
- [6] 李必斌. 食用合成色素检测方法的研究进展[J]. 中国卫生检验检疫杂志,2002,12(6):758-759.
- [7] 聂晶,齐兴娟. 食品合成色素研究动态[J]中国食品卫生杂志,2002,14(1):58-61.
- [8] GB/T 5009.141-2003. 食品中诱惑红的测定[S].
- [9] GB/T 5009.35-2003. 食品中合成着色剂的测定[S].
- [10] 中山大学生物系编. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社,1978:153-156.
- [11] 李维念,史红. 注水西瓜中人工合成色素的高效液相色谱测定法[J]. 计量与测试技术,2001(5):41-42
- [12] Kiseleva.M.G, Pimenova.V.V, Eller.K.I. Optimization of conditions for the HPLC determination of synthetic dyes in food[J]. Journal of analytical chemistry.2003,58(7):685-690
- [13] 蔡颖,相大鹏,苏建晖. 用高效液相色谱法检测食品中非我国允许使用合成着色剂[J]. 中国公共卫生.2002,18(1):100-101
- [14] 王春荣,张济,刘岚铮. 食品中多种合成色素的反相高效液相色谱法测定[J]. 中国公共卫生.2005,21(3):359-360
- [15] 刘奋,林奕芝,戴京晶等. 高效液相色谱多波长测定人工合成着色剂[J]. 现代预防医学.2001,28(1):81-83

ency Pasteurization and Sterilization Processes [J]. J Food Sci, 2004, 69(1): E30-7

- [21] 胥芳, 张立彬, 周国君, 贾灿纯. 无损检测桃子电特性的试验研究[J]. 农业工程学报,1997,13(1):202-206
- [22] 张立彬, 陈子辰. 苹果内部品质的电特性无损检测研究[J]. 农业工程学报.2000,16(3): 104-106
- [23] 郭文川, 朱新华,等. 西红柿成熟度与电特性关系的无损检测研究[J]. 农业现代化研究.2002, 26 (3): 458-460
- [24] 郭文川, 等. 基于介电特性的果品种类识别试验[J]. 农业机械学报, 2005, 36 (7) : 158-160
- [25] 秦文, 等. 利用介电特性对食品加工过程进行非破坏性检测技术的研究[J]. 农产品加工学刊.2005(4): 8-11