

工作简报

高效液相色谱法测定果汁和果蔬中
柑橘红 2 号染料

陈毓芳, 林海丹, 李为鹏, 谢玉珊, 邹志飞
(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: 应用高效液相色谱法测定果汁、果蔬中柑橘红 2 号染料的含量。样品用丙酮正己烷 (1+3) 混合溶剂提取, 提取液于 45 °C 蒸发至干。用甲酸-乙腈 (0.5+99.5) 溶液 (经正己烷饱和) 溶解残渣, 正己烷脱脂。以 Agilent TC C₁₈ 色谱柱为分离柱, 以乙腈与甲酸 (0.1+99.9) 溶液按体积比 92 比 8 混合作为流动相, 用二极管阵列检测器在波长 508 nm 处进行测定。柑橘红 2 号染料的质量浓度在 0.25~10.0 mg·L⁻¹ 范围内与其峰面积呈线性关系, 测定下限 (10S/N) 为 0.1 mg·kg⁻¹。以果汁、鲜橙和胡萝卜样品为基体, 加入 3 种不同浓度水平的柑橘红 2 号标准溶液做回收试验, 测得回收率在 96.3%~104.0% 之间, 相对标准偏差 ($n=6$) 在 1.0%~3.6% 之间。

关键词: 高效液相色谱法; 果汁; 果蔬; 柑橘红 2 号

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)05-0536-03

HPLC Determination of Citrus Red 2 in Fruit Juices, Fruits and Vegetables

CHEN Yu-fang, LIN Hai-dan, LI Wei-peng, XIE Yu-shan, ZOU Zhi-fei

(Technical Center of Inspection and Quarantine, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: HPLC was applied to the determination of citrus red 2 in fruit juices, fruits and vegetables. The sample was extracted with acetone hexane (1+3) solution, and the extract was evaporated to dryness at 45 °C. The residue obtained was dissolved in formic acid acetonitrile (0.5+99.5) solution (saturated with n hexane), and defatted with n hexane. The Agilent TC C₁₈ column was used as stationary phase, a mixture of acetonitrile and formic acid solution (0.1+99.9) mixed in the ratio of 92 to 8 by volume was used as mobile phase, and DAD at 508 nm was used in the determination. Linear relationship between values of peak area and mass concentration of citrus red 2 was obtained in the range of 0.25–10.0 mg·L⁻¹, with lower limit of determination (10S/N) of 0.1 mg·kg⁻¹. Test for recovery was made by addition of standard citrus red 2 at 3 different concentration levels to samples of fruit juice, orange and carrot as matrixes, values of recovery found were in the range from 96.3% to 104.0%. Values of RSD's ($n=6$) found were in the range of 1.0%–3.6%.

Keywords: HPLC; Fruit juices; Fruits and vegetables; Citrus red 2

柑橘红 2 号染料为橘红色粉末, 不溶于水, 溶于芳烃类溶剂, 作为染色剂增加甜橙 (主要是脐橙) 果

实的红色色泽与着色均匀度, 提高果实的市场竞争力。但由于其可能的致癌性, 柑橘红 2 号色素被欧盟和日本等国家和地区所禁用, 美国国家食品药品监督管理局 (FDA) 明确规定经处理过的果实全果 (以干重计) 中柑橘红 2 号染料最大残留量不得超过 2 mg·L⁻¹ [1]。

国家标准 GB 2760–2007《食品添加剂使用卫

收稿日期: 2010-04-28

基金项目: 中国检验检疫科学研究院资助项目 (No. 2009JK011)

作者简介: 陈毓芳 (1968–), 女, 广东揭西人, 高级工程师, 学士, 主要从事食品、化妆品检测研究。

生标准》对柑橘红 2 号染料能否用于柑橘类水果增色未做出规定, 也未制定柑橘水果中柑橘红 2 号残留量标准。目前国内还没有制定出标准的检测方法。因此有必要建立果汁、果蔬中柑橘红 2 号染料的检测方法。本工作对果汁、果蔬中柑橘红 2 号染料的测定进行试验, 对样品提取溶剂、色谱条件进行筛选, 建立了高效液相色谱法测定果汁、果蔬中柑橘红 2 号染料含量的方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters Acquity 超高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器。

甲酸溶液: 移取 1 mL 甲酸用水定容至 1 L, 过 0.22 μm 滤膜备用。

甲酸-乙腈正己烷饱和溶液: 甲酸-乙腈(0.5+99.5)加正己烷充分混合至饱和, 容器上层清晰可见一层正己烷层, 静置分层, 收集下层溶液。

柑橘红 2 号标准储备溶液: 称取柑橘红 2 号标准品 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中, 以乙腈超声 10 min 溶解, 冷却后定容至刻度, 配成 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准储备溶液。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存, 保存期半年。

柑橘红 2 号标准溶液: 分别移取适量标准储备溶液至 50 mL 容量瓶, 用甲酸-乙腈正己烷饱和溶液定容至刻度, 配成 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存, 保存期三个月。

乙腈为色谱纯, 甲酸、丙酮、正己烷均为分析纯, 水为超纯水。

1.2 仪器的工作条件

Agilent TC C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); Phenomenex C_{18} 保护柱(3.0 mm \times 4 mm); 流动相为乙腈与甲酸-水(0.1+99.9)溶液以体积比 92 比 8 混合的溶液, 流量 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL , 检测波长 508 nm。

1.3 试验方法

称取试样 5.00 g 于 50 mL 具塞离心管中, 加入丙酮-正己烷(1+3)混合溶剂 20 mL, 置水平往复振荡器振荡 15 min(若样品为黏稠的果汁或果蔬, 振荡前先均浆 1 min, 加水至 30 mL), 以 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 6 min, 吸取正己烷层至 30 mL 吹氮管。离心管中再加入正己烷 15 mL, 重复提取一次, 合并提取液于吹氮管中, 在氮吹仪中于 45 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发至

干。加入 1 mL 甲酸-乙腈正己烷饱和溶液溶解残渣, 涡旋混合 1 min, 超声 1 min, 加入正己烷 0.5 mL, 涡旋混合 1 min, 移至 1.5 mL 具塞离心管中, 以 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 8 min, 弃去正己烷层, 离心管中再加入正己烷 0.5 mL 重复提取一次, 下层清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 在仪器工作条件下进行测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

柑橘红 2 号与苏丹红 1 号染料的分子结构较为相似。由于果汁、果蔬中水分、水溶性物质较多, 且柑橘红 2 号具有不溶于水的性质, 参考国家标准 GB/T 19681-2005 食品中苏丹红染料的检测方法, 采用丙酮-正己烷(1+3)混合溶剂提取, 再经液-液萃取与水相分离, 能很好地去除水溶性杂质并把样品中柑橘红 2 号提取出来, 试验选择丙酮-正己烷(1+3)混合溶剂作为提取溶剂, 液-液萃取方法提取样品中柑橘红 2 号。

2.2 净化条件的选择

由于用丙酮-正己烷(1+3)混合溶剂提取样品时, 会同时提取出一些类脂物, 为达到较好的净化效果, 试验用甲酸-乙腈正己烷饱和溶液溶解残渣后, 加入正己烷, 采用甲酸-乙腈(0.5+99.5)溶液与正己烷液-液分配脱脂, 试验结果表明: 柑橘红 2 号的回收率理想, 能较好地达到净化油脂的目的。

2.3 色谱条件的选择

在色谱条件下对柑橘红 2 号标准溶液进行测定, 结果表明: 柑橘红 2 号在 508 nm 附近吸收最大, 试验选择 508 nm 作为检测波长。

试验用 Agilent TC C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 用乙腈与甲酸-水(0.1+99.9)溶液以体积 92 比 8 混合溶液作为流动相, 结果表明: 在柑橘红 2 号染料保留时间附近无干扰峰。柑橘红 2 号标准溶液及加标果汁样品溶液的色谱图见图 1。

2.4 干扰试验

在色谱条件下进行了柑橘红 2 号染料与苏丹红 1 号的干扰试验, 结果表明: 在优化的试验条件下, 苏丹红 1 号与柑橘红 2 号完全分离, 苏丹红 1 号对柑橘红 2 号测定无干扰。

2.5 标准曲线

在色谱条件下对柑橘红 2 号标准溶液系列进行了测定, 线性范围在 0.25~10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 线

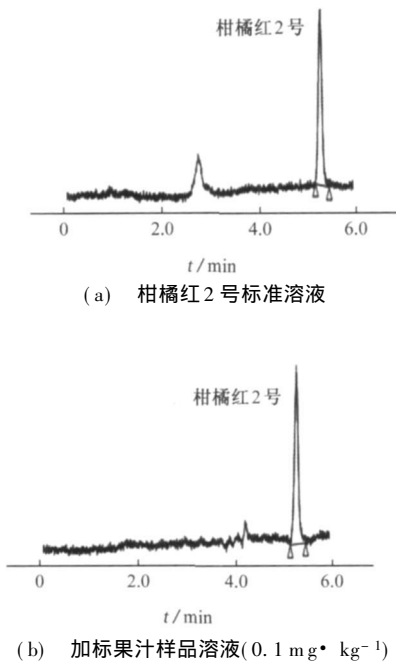


图 1 柑橘红 2 号色谱图

Fig. 1 Chromatograms of citrus red 2

样品分别加入 0.100, 0.200, 1.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 柑橘红 2 号标准溶液, 按试验方法处理样品, 在色谱条件下测定并计算其回收率和相对标准偏差, 结果见表 1。

表 1 回收率和精密度试验结果($n=6$)
Tab. 1 Results of tests for recovery and precision

样品	加入量 $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收量 $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率 /%	RSD /%
果汁	0.100	0.103	103.0	2.3
	0.200	0.199	99.6	1.3
	1.00	0.970	97.0	2.0
鲜橙	0.100	1.02	102.0	1.6
	0.200	0.194	97.0	1.7
	1.00	0.97	97.4	1.0
胡萝卜	0.100	0.104	104.0	3.6
	0.200	0.199	99.6	2.0
	1.00	0.963	96.3	1.2

本方法符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》对检测方法确认的回收率和精密度等技术要求, 方法适用于果汁、果蔬样品中柑橘红 2 号染料的测定。

参考文献:

[1] 张云贵, 周心智, 张义刚. 柑橘染色处理在甜橙上的应用与现实意义[J]. 中国果菜, 2007(5): 46-47.

性回归方程为 $A = 2.73 \times 10^4 \rho - 8.37 \times 10^2$, 相关系数为 0.999 97, 方法的测定下限 ($10S/N$) 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.6 方法的回收率和精密度

选用不含柑橘红 2 号染料的果汁、鲜橙、胡萝卜

(上接第 535 页)

[3] 鲍忠定, 许荣年, 许佳飞. 气相色谱内标法测定食品中防腐剂脱氢乙酸、苯甲酸和山梨酸[J]. 食品工业科技, 2001, 22(2): 78-80.

[4] 殷德荣. 毛细管气相色谱法同时测定食品中山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、尼泊金丙酯[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 469-471.

[5] 罗晓燕, 刘莉治, 李晓东, 等. HPLC 法测定月饼中的脱氢乙酸钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(3): 301-302.

[6] 赵舰, 甘源, 顾万江, 等. 反相高效液相色谱法同时测定食品中的苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸[J]. 卫生研究, 2008, 37(5): 615-616.

[7] 陈英, 谢晓峰, 狄俊伟. 高效液相色谱法测定食品中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠、脱氢乙酸[J]. 理化检验化学分册, 2007, 43(10): 887-888.

[8] 张辉珍, 马爱国, 梁惠, 等. 高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸的方法研究[J]. 卫生研究, 2007, 36(6): 748-750.

[9] 曾丽娟. 高效液相色谱法测定月饼中防腐剂的方法研

究[J]. 计量与测试技术, 2005, 32(9): 42-43.

[10] 杨红梅, 刘艳琴, 殷晓燕, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠以及脱氢乙酸[J]. 食品科技, 2007(10): 213-214.

[11] 余涛, 叶坚, 刘昶. 高效液相色谱同时测定食品中多种甜味剂和防腐剂的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2014-2015.

[12] ANASTASSIADES M, MASTOVSKA K, LEHOTAY S J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides[J]. J Chromatogr A, 2003, 1015: 163-164.

[13] 贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 气相色谱分析农药残留的基质效应及其解决方法[J]. 色谱, 2008, 26(1): 98-104.

[14] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412-413.