

高效液相色谱法同时测定冰淇淋 中的10种合成色素

霍艳敏*, 王 骏, 张 卉, 祝建华, 刘艳明, 王艳丽, 宿书芳

(山东省产品质量监督检验研究院 国家加工食品质量监督检验中心(山东), 山东 济南 250103)

摘要: 建立了一种同时测定冰淇淋中靛蓝、新红、亮蓝、柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、偶氮玉红、诱惑红、赤藓红10种合成色素的高效液相色谱分析方法。对提取试剂、流动相条件、最大吸收波长进行了研究, 确定了最佳提取方法及色谱条件。待测样品经甲醇-水提取, 加水稀释后上机分析, 采用 Symmetry C₁₈柱(25 cm × 4.6 mm × 5 μm), 以甲醇-20 mmol/L 醋酸铵为流动相, 在最佳梯度洗脱条件下对10种合成色素进行分离, 二极管阵列检测器检测, 外标法定量。结果表明, 各组分在0.5~10.0 mg/L范围内呈良好线性, 相关系数(*r*)均大于0.997, 在2、10、50 mg/kg 3个加标水平下的平均回收率为76%~108%, 相对标准偏差(RSD)为0.56%~2.8%, 检出限为0.2~1.0 mg/kg。该方法简单、快速、灵敏、准确, 可用于冰淇淋中10种合成色素的日常检测。

关键词: 冰淇淋; 色素; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.72; F407.82 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)06-0670-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.06.015

Simultaneous Determination of Ten Synthetic Colours in Ice-cream by High Performance Liquid Chromatography

HUO Yan-min*, WANG Jun, ZHANG Hui, ZHU Jian-hua, LIU Yan-ming, WANG Yan-li, SU Shu-fang

(National Center for Quality Supervision and Inspection of Processed Food(Shandong), Shandong Supervision and Inspection Institute for Product Quality, Jinan 250103, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of 10 synthetic colours such as indigotin, new red, brilliant blue, tartrazine, sunset yellow, amaranth, ponceau 4R, carmoisine, allura red and erythrosine in ice-cream. The optimal extraction conditions and HPLC chromatographic conditions were confirmed by investigating the extracting solvent, mobile phase type and maximum absorption wavelength. The sample was extracted with methanol water solution, and the extract diluted with water was separated on a Symmetry C₁₈ (25 cm × 4.6 mm × 5 μm) column using methanol - 20 mmol/L ammonium acetate as mobile phase by gradient elution. The target compounds were confirmed by diode-array detection and quantified by the external standard method. Under the optimal conditions, the calibration curves of 10 synthetic colours showed good linearities in the range of 0.5 - 10.0 mg/L, with their correlative coefficients more than 0.997. The mean recoveries at 3 spiked levels of 2, 10, 50 mg/kg ranged from 76% to 108% with RSDs of 0.56% - 2.8%. The detection limits were in the range of 0.2 - 1.0 mg/kg. The method was simple, rapid, sensitive and accurate, and was suitable for the determination of 10 synthetic colours in ice-cream.

Key words: ice-cream; synthetic colour; high performance liquid chromatography

随着食品工业的发展, 人工合成色素由于可有效改善食品的色泽, 广泛应用于食品加工工业。但色素由化工原料经多步反应制得, 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。我国 GB 2760-2007 《食品添加剂使用卫生标准》^[1]对冰淇淋中色素的使用也进行了严格的规定和限量。冰淇淋富含乳粉、油脂, 基质较复杂, 使用国标 GB/T 5009.35-2003^[2]方法测定其色素

收稿日期: 2011-01-23; 修回日期: 2011-02-23

* 通讯作者: 霍艳敏, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品检测, Tel: 0531-89701895, E-mail: huoyanmin0628@163.com

费时,且结果不理想,因此非常有必要建立一种简单、有效的检测冰淇淋中色素的分析方法。目前,色素的测定方法主要有极谱法^[3]、薄层色谱法^[4]、高效液相色谱法^[5-7]。其中,高效液相色谱法得到了广泛的应用,在该方法中,前处理方法报道最多的是聚酰胺吸附法^[2,8-9]和固相萃取法^[10-12],但这2种处理方法步骤繁琐、操作费时,且聚酰胺吸附法经常出现难抽滤的现象,不利于样品的批量处理。色素的提取试剂多使用水、乙醇-氨水^[13-15],而本研究发现甲醇对冰淇淋中的色素有较高的提取率,且处理后样品基质与提取液能较好地分离,提取液经水稀释后直接上机,可避免使用聚酰胺时的吸附,有效地解决了难抽滤和操作费时的困难。处理液经高效液相色谱仪配二极管阵列检测器检测,外标法定量,可同时测定10种合成色素,该方法用于实际样品的检测取得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪配二极管阵列检测器; AL204 电子天平(感量为 0.000 1 g,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); MS3 基本型旋涡混合仪(德国 IKA); KQ5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 冷冻离心机(Sigma 公司)。

甲醇(色谱纯); 醋酸铵(分析纯); 亮蓝、柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、诱惑红标准物质(国家标准物质中心),靛蓝、偶氮玉红、赤藓红、新红(Dr. Ehrenstorfer 公司)。

1.2 标准溶液的制备

将10种色素配制成质量浓度均为50 mg/L的混合标准储备液,此溶液于4℃冰箱中可储存1个月。将混合标准储备液用甲醇-水(3:7,体积比)依次稀释成0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L的标准系列溶液,现用现配。

1.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈柱(25 cm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A为甲醇, B为20 mmol/L醋酸铵溶液; 梯度洗脱程序: 0~12.0 min, 5% A; 12.0~30.0 min, 5%~35% A; 30.0~35.0 min, 35%~98% A; 35.0~35.1 min, 98%~5% A; 35.1~55 min, 5% A。流速: 1.0 mL/min; PDA检测器扫描范围: 200~630 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 30 μL。

1.4 样品处理

待样品溶化后,搅拌均匀,带巧克力皮的样品需粉碎混匀,称取混匀样品5 g于25 mL比色管中,加入15 mL甲醇,旋涡混合1 min,超声提取15 min(每隔5 min振摇1次),加入5 mL水,用甲醇定容,摇匀,转入30 mL离心管中。以10 000 r/min离心5 min,取5 mL上清液,加水1:1稀释,取1.5 mL上清液于2 mL塑料离心管中,以12 000 r/min离心5 min,上清液供HPLC测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

10种目标色素除赤藓红外均为偶氮染料,适合用反相色谱分离^[4],由于各色素均带有酸性基团,故采用甲醇-20 mmol/L醋酸铵缓冲溶液为流动相;为保证各组分能快速、有效分离,采用梯度洗脱,最佳洗脱模式如“1.3”所述。各组分经色谱分离后,由二极管阵列检测器扫描得紫外吸收光谱,各组分的最大吸收波长为:柠檬黄(257、429 nm)、新红(504 nm)、苋菜红(523 nm)、胭脂红(509 nm)、日落黄(483 nm)、诱惑红(505 nm)、偶氮玉红(521 nm)、赤藓红(531 nm)、靛蓝(288、612 nm)、亮蓝(628 nm)。因此,确定柠檬黄在430 nm处检测,新红、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红、偶氮玉红、赤藓红在500 nm处同时检测,靛蓝、亮蓝在600 nm处同时检测。在优化的色谱条件下,目标物得到了有效分离,且实际样品无干扰峰。图1为空白基质加标样品的色谱图。

2.2 提取方法的确定

分别用纯水、乙醇-氨水和甲醇对冰淇淋中的色素进行提取,结果发现,以纯水作提取试剂,样品难以净化,处理液混浊,过膜困难,各色素在样品中的加标回收率仅为5%~20%;用乙醇-氨水溶液作提取试剂时,加标回收率仍较低(20%左右),且氨水需去除,步骤繁琐;用甲醇作提取试剂时,

样品中的色素提取较完全,能够得到理想的加标回收率(结果见表 1),且样品净化效果好,但甲醇含量太高会对个别色素如柠檬黄的峰形产生较大影响。因此,需在提取液中加入少量水,再将离心清液用水等体积稀释后上机,此时各色素均可得到良好的峰形。由于混合纤维素酯膜对赤藓红有较强的吸附,样品宜采用离心代替过滤。上清液供 HPLC 测定。

2.3 方法的线性范围与检出限

分别配制质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 的色素混合标准溶液,按优化的检测条件进样分析,以峰面积 Y 对相应的质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归,检出限以 3 倍噪音计算。各色素的线性回归方程、相关系数及方法检出限见表 1。结果表明,10 种合成色素在 0.5 ~ 10.0 mg/L 范围内有良好的线性,相关系数 r 均大于 0.997,检出限为 0.2 ~ 1.0 mg/kg。

2.4 方法回收率与精密度

在不含目标色素的冰淇淋中,添加各色素含量为 2、10、50 mg/kg 3 个水平的标样,按实验方法测定,外标法定量,回收率结果见表 1。结果显示,色素添加量为 2、10 mg/kg 时,10 种色素的加标回收率为 97%~108%,色素添加量为 50 mg/kg 时,10 种色素的加标回收率为 76%~83%,说明本法所用提取剂在一定浓度范围内对目标色素具有较高的提取效率,当样品中色素含量较高时,由于样品基质的吸附竞争作用增强导致回收率降低。因此,对色素含量较高的样品进行检测时,需适当减少样品称样量以降低样品对色素的吸附,增大提取剂对色素的提取效率。

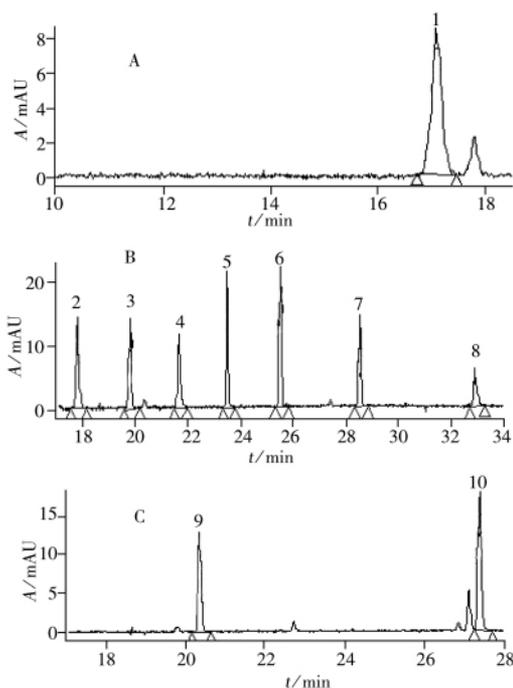


图 1 空白基质加标样品中 10 种合成色素的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of 10 synthetic colours in ice-cream
1. tatzazine, 2. new red, 3. amaranth, 4. ponceau 4R, 5. sunset yellow, 6. allura red, 7. carmoisine, 8. erythrosine, 9. indigotin, 10. brilliant blue; detection wavelength: A. 430 nm, B. 500 nm, C. 600 nm

表 1 10 种色素的线性方程、加标回收率与检出限

Table 1 Linear equations, spiked recoveries and detection limits(LOD) of 10 synthetic colours

Compound	Linear equation	r	Added	Found	Recovery	LOD
			$w/(mg \cdot kg^{-1})$	$w/(mg \cdot kg^{-1})$	$R/\%$	$w/(mg \cdot kg^{-1})$
Tatzazine(柠檬黄)	$Y = 3.66 \times 10^4 X + 5.94 \times 10^4$	0.999 95	2, 10, 50	2.05, 10.15, 39.25	102, 102, 78	1.0
New red(新红)	$Y = 3.25 \times 10^4 X + 2.28 \times 10^3$	0.999 91	2, 10, 50	2.06, 9.87, 38.20	103, 99, 76	1.0
Amaranth(苋菜红)	$Y = 2.16 \times 10^4 X + 1.68 \times 10^3$	0.999 95	2, 10, 50	2.13, 10.52, 38.00	106, 105, 76	1.0
Ponceau 4R(胭脂红)	$Y = 2.39 \times 10^4 X - 1.39 \times 10^2$	0.997 04	2, 10, 50	2.17, 10.62, 41.15	108, 106, 82	0.5
Sunset yellow(日落黄)	$Y = 3.00 \times 10^4 X + 1.27 \times 10^3$	0.999 92	2, 10, 50	2.06, 9.83, 39.40	103, 98, 79	0.2
Allura red(诱惑红)	$Y = 3.18 \times 10^4 X + 1.86 \times 10^3$	0.999 97	2, 10, 50	2.10, 9.68, 41.55	105, 97, 83	0.2
Carmoisine(偶氮玉红)	$Y = 2.16 \times 10^4 X + 9.41 \times 10^2$	0.999 90	2, 10, 50	1.98, 10.08, 40.10	99, 101, 80	0.2
Erythrosine(赤藓红)	$Y = 1.85 \times 10^4 X - 7.97 \times 10^3$	0.997 10	2, 10, 50	1.92, 10.11, 38.30	96, 101, 77	0.5
Indigotin(靛蓝)	$Y = 2.83 \times 10^4 X + 7.42 \times 10^2$	0.999 98	2, 10, 50	2.05, 9.84, 39.45	103, 98, 79	0.5
Brilliant blue(亮蓝)	$Y = 1.74 \times 10^4 X + 1.27 \times 10^3$	0.999 39	2, 10, 50	2.00, 9.87, 40.65	100, 99, 81	0.2

在优化条件下,对冰淇淋中 10 种合成色素加标 10 mg/kg 的样品平行测定 6 次,得到方法的相对标准偏差(RSD)为 0.56%~2.8%,表明该方法精密度良好。

3 结论

本文探讨了高效液相色谱法检测冰淇淋中 10 种常用合成色素的样品前处理方法及最佳检测条件,采用甲醇作为萃取溶剂,经水稀释后直接上机。本方法操作简单,且赤藓红能与其它色素同时处理,具有前处理简单、快速、测定通量高、结果准确可靠等优点,可用于冰淇淋中 10 种色素的同时测定,具有较高的实际应用价值。

参考文献:

- [1] GB 2760-2007. 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [2] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 35-2003. 食品中合成着色剂的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [3] 宋新, 纪双利, 杨丽, 李新波. 示波极谱法在食品合成食用色素测定中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 422-423.
- [4] 严浩英, 张军, 李树华, 鲁长豪. 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): 193-195.
- [5] 沈坚, 潘旭, 王全林, 应璐. 鱼子酱中的合成色素反相高效液相色谱法同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 584-588.
- [6] 蒲云霞, 王春辉, 杨剑业, 徐晓枫. 反相高效液相色谱法检测熟肉制品中的合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1414-1415.
- [7] 喻凌寒, 苏流坤, 牟德海. 糖类食品和肉制品中胭脂虫红色素的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 648-650.
- [8] 陈艳, 刘思洁, 李皓. 高效液相色谱法测定果冻中的合成色素[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 487-490.
- [9] 刁晓霞. 高效液相色谱法测定乳制品中的合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 769-785.
- [10] 高洁, 宁尚勇, 许志强. 固相萃取高效液相色谱法检测食品中的非食用色素[J]. 分析试验室, 2008, 27(8): 33-35.
- [11] 潘旭, 王全林, 沈坚, 傅晓, 应璐. 蟹制品中合成色素的多组分同时测定方法研究[J]. 分析试验室, 2010, 29(9): 47-51.
- [12] 倪蓉, 杨龙彪, 刘兰侠. 固相萃取-高效液相色谱法测定饮料中8种色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(5): 991-992.
- [13] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 郭启雷, 石海良, 阎龙宝. 固相萃取-HPLC法同时测定糕点中8种人工合成色素[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(2): 139-142.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1743-2006. 食品中的诱惑红、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.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21916-2008. 水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.