

HPLC – DAD 法测定馒头中喹啉黄、食用绿 S 和亮绿 3 种色素含量的研究

杨 勇^{1,2}, 罗 奕³, 吴琳琳³, 杨娟艳¹,
史 蕙², 许乾丽², 游正琴³

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550004;
3. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

摘 要:建立了高效液相色谱(HPLC)串联紫外器(DAD)测定馒头中3种色素含量的方法。以无水乙醇—氨水—水(7:2:1)溶液作为提取溶剂,用超声辅助提取样品中的色素,用HPLC—DAD进行检测,检测波长425 nm、624 nm,色谱柱为PAK CAPCELL C₁₈(5 μm, 4.6 × 200 mm),流速1.0 mL · min⁻¹,柱温35℃,以甲醇—乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱。结果表明:3种色素分离度较好,具有良好的线性关系($r=0.999\ 9$),重现性、精密度良好(RSD%均小于3%),检出限食用绿 S 为0.848 4 ng、喹啉黄为6.833 9 ng、亮绿为1.336 0 ng,平均加标回收率为91%~105%。该方法简单、快速、灵敏度高、回收率高、检出限低,适用于馒头中喹啉黄、食用绿 S、亮绿含量的测定。

关键词:高效液相色谱—紫外检测器(HPLC—DAD);馒头;色素含量测定

中图分类号:TS 213.2;R 115 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)06-0071-05

Study on determination of 3 kinds of pigment content of yellow, green S and bright green in steamed bread by HPLC – DAD method

YANG Yong^{1,2}, LUO Yi³, WU Lin-lin³, YANG Juan-yan¹, SHI Hui², XU Qian-li², YOU Zheng-qin³

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou 550002;

2. Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang Guizhou 550004;

3. Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550004)

Abstract: The contents of 3 kinds of pigment in steamed bread were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) tandem ultraviolet (DAD). Anhydrous alcohol – ammonia – water (7:2:1) solution was selected as the extraction solvent. The contents of pigments were extracted by ultrasound – assisted extraction. Detected by HPLC – DAD, with detection wavelength 425 nm, 624 nm, column chromatography: PAK capcell C₁₈ (5 μm, 4.6 × 200 mm), flow rate 1.0 mL min⁻¹, column temperature 35℃, with methanol – ammonium acetate solution as mobile phase to gradient elution. The result showed that the resolutions of the three kinds of pigment were good with good linear relationship ($r=0.999\ 9$), reproducibility and precision (RSD less than 3%); the detection limit of edible green was 0.848 4 ng, quinoxaline yellow 6.833 9 ng, and the bright green 1.336 0 ng; the average recovery rate was 91%~105%. This method is simple, fast and sensitive, with high recovery rate and low detection limit, which is suitable for the determination of the content of yellow, green S and bright green in steamed bread.

Key words: high performance liquid chromatography – ultraviolet detector (HPLC – DAD); steamed bread; determination of pigment content

收稿日期:2015-07-18

基金项目:食品药品非法添加化工原料的快速检测及相关数据库的研究(黔科合SY字[2011]3090号);贵州省食品、保健食品和化妆品监测检测平台(黔科平台[2012]4001);国家食品药品监督管理局研究课题

作者简介:杨勇,1991年出生,男,在读研究生。

通讯作者:许乾丽,1964年出生,女,主任药师。

喹啉黄、食用绿 S 和亮绿 3 种色素均属于合成色素,但是上海“染色馒头”事件的发生,证实目前一些不法商贩为了谋取暴利,在小麦粉中添加合成色素,以冒充玉米、高粱、荞麦等杂粮馒头。人体过

量的摄入合成色素后会在体内蓄积,并分解成致突变原前体芳香胺类化合物,有些甚至可能转化形成致癌物质,对消费者的健康造成极大的危害^[1-3]。我国国标 GB/T 5009.35—2003《食品中合成着色剂的测定》^[4]也对新红、柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、赤藓红、亮蓝等色素做出了明确规定,GB/T 21916—2008《水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法》^[5]也规定了柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红等色素的限量,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》^[6]也给出了诱惑红、酸性红、亮蓝、日落黄四种色素使用规定。然而对于喹啉黄、食用绿 S、亮绿三种色素的测定方法未做规定,特别是针对餐饮食品中主食(面食制品)中合成色素允许使用品种、使用范围以及最大使用量(或残留量)未作明确规定。目前我国国标中测定合成色素的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、示极波谱法和分光光度法^[7-17]。因此建立简便、快捷、准确的分析方法检测馒头中的喹啉黄、食用绿 S 和亮绿具有重要意义。本实验旨在建立同时测定馒头中上述 3 种合成色素的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

粗粮馒头:贵州省食品药品检验所提供。

甲醇(色谱纯):美国 Tedia 试剂公司;乙酸铵(色谱纯):美国 Mreda 公司;冰醋酸(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;氨水(分析纯):重庆川东化工(集团)有限公司;3 种色素标准品:喹啉黄(纯度 97.1%)、食用绿 S(纯度 86.0%)、亮绿(纯度 96.0%):德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:美国戴安公司;TD6M 医用离心机:长沙平凡仪器有限公司;BT2202S 电子分析天平:德国 Sanorius 公司;KQ5200DE 型超声波清洗器:江苏昆山市超声仪器有限公司;DZKW-4 电子恒温水浴锅:南昌市恒顺化验设备制备有限公司;0.45 μm 的微孔滤膜。

1.3 实验方法

1.3.1 标准样品溶液的制备

1.3.1.1 标准储备液的制备

分别精密称取喹啉黄标准品 0.010 35 g、食用绿 S 标准品 0.015 42 g 和亮绿标准品 0.011 60 g

(按照纯度折算),分别置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇—水(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,得到每毫升含喹啉黄 200.97 μg、食用绿 S 265.22 μg 和亮绿 222.72 μg 的标准样品储备液(4℃保存)。

1.3.1.2 混合对照溶液的制备

精密量取上述标准样品储备液喹啉黄 3.40 mL、食用绿 S 0.32 mL 和亮绿 0.60 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加甲醇—水(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,制得每毫升含喹啉黄 6.832 9 μg、食用绿 S 0.848 7 μg 和亮绿 1.336 3 μg 的混合对照溶液(临用前现配)。

1.3.2 供试样品溶液的制备

将食品样品置于匀浆机中,搅碎混匀,称取 10 g(准确至 0.01 g),置于 100 mL 容量瓶中,加入无水乙醇—氨水—水(7:2:1)溶液约 80 mL,超声 30 min,取出,放置室温,用无水乙醇—氨水—水(7:2:1)溶液定容,摇匀,滤过,弃去初滤液约 10 mL,精密吸取续滤液 20 mL 置于蒸发皿中,水浴蒸至近干,以水溶解残渣,并转移至 5 mL 容量瓶中,以水定容,摇匀。再转移到 10 mL 离心管中,以 5 000 r/min 速度离心 5 min,取上清液为供试品溶液。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:PAK CAPCELL C₁₈(5 μm, 4.6 × 200 mm)。流动相 A:甲醇,流动相 B:20 mmol/L 乙酸铵溶液,梯度洗脱,检测器:紫外检测器,检测设置为多波长通道,喹啉黄(425 nm)、食用绿 S、亮绿(624 nm),流速:1.0 mL/min,柱温:35℃,进样量:10 μL。3 种色素最佳梯度洗脱条件见表 1。

表 1 三种合成色素最佳梯度洗脱条件

时间/min	A(甲醇)/%	B(20 mmol/L 乙酸铵)/%
0	14	86
5	22	78
18	50	50
26	90	10
30	14	86
35	14	86

2 结果与分析

2.1 系统适应性试验

分别取混合标准溶液、阴性样品溶液和模拟样品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1~图 7。从图中可见,阴性样品溶液在喹啉黄位置处无干扰

峰,喹啉黄的保留时间分别为 9.4、11.4、20.3、21.7,食用绿 S 和亮绿的保留时间分别为 15.1、27.2 min。供试品溶液中各目标组分分离完全(分离度 >1.5)。

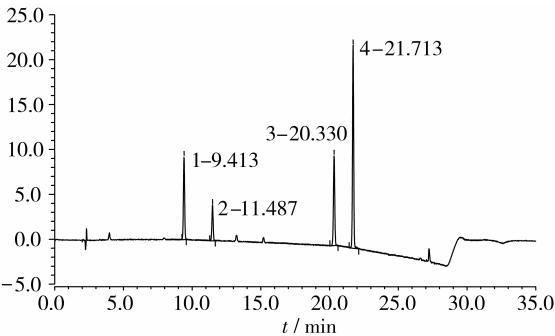


图 1 喹啉黄色谱图(混标 425 nm)

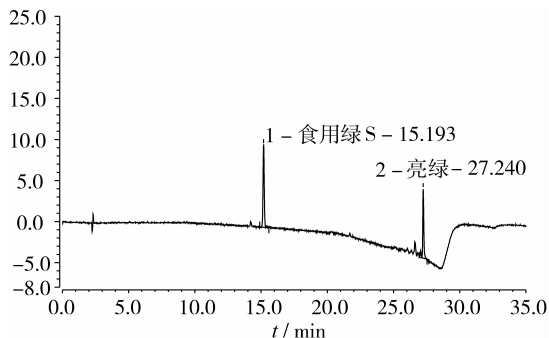


图 2 食用绿 S、亮绿色谱图(混标 624 nm)

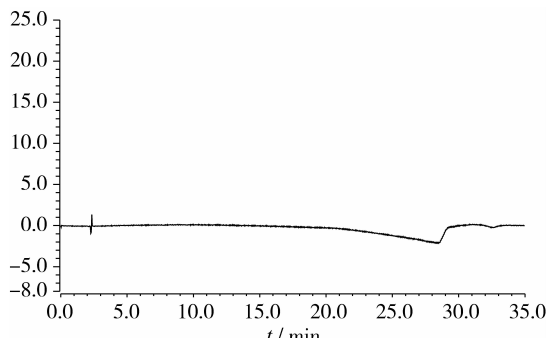


图 3 阴性样品色谱图(425 nm)

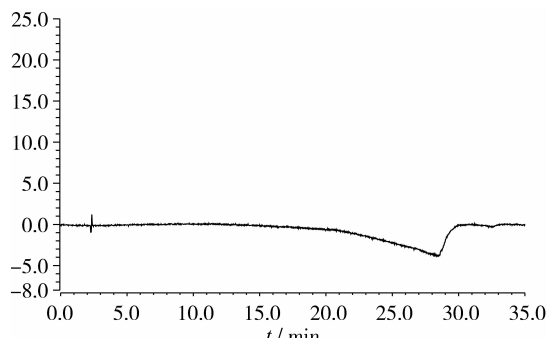


图 4 阴性样品色谱图(624 nm)

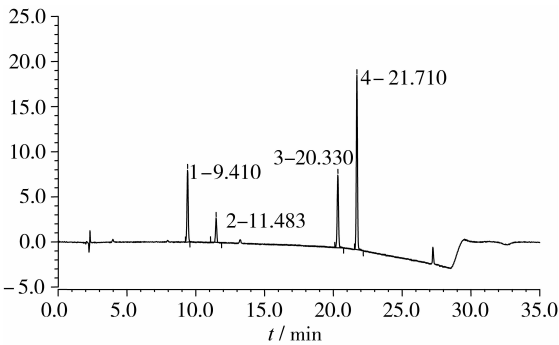


图 5 喹啉黄标准品色谱图(425 nm)

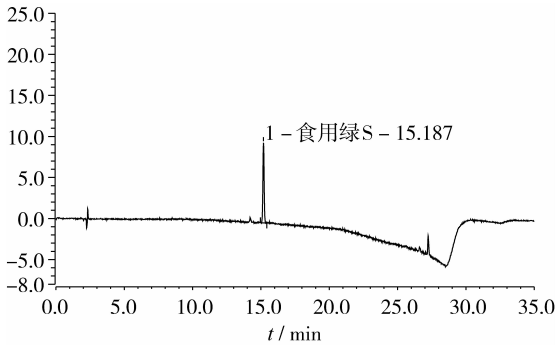


图 6 食用绿 S 标准品色谱图(624 nm)

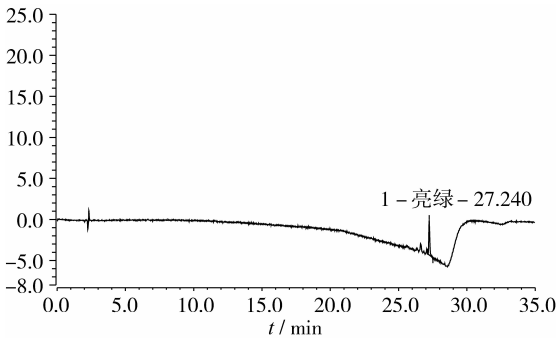


图 7 亮绿标准品色谱图(624 nm)

2.2 线性关系考察

分别精密吸取混合标准溶液(喹啉黄 6.833 9 $\mu\text{g/mL}$ 、食用绿 S 0.848 7 $\mu\text{g/mL}$ 、亮绿 1.336 3 $\mu\text{g/mL}$)1、2、4、6、8、10、12、15 和 20 μL ,注入液相色谱仪进行分析。以混合对标准溶液的进样量(ng)为横坐标(X),以相应的峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得线性回归方程,结果见表 2。

表 2 3 种合成色素线性关系考察结果

组分	回归方程	相关系数	线性范围/ ng
喹啉黄	$y = 0.529x - 0.259$	$R = 0.999\ 9$	6.832 9 ~ 136.658 0
食用绿 S	$y = 0.117x - 0.050$	$R = 0.999\ 9$	0.848 7 ~ 16.974 0
亮绿	$y = 0.085x - 0.079$	$R = 0.999\ 9$	1.336 3 ~ 26.726 0

2.3 精密度试验

取混合标准样品溶液,连续进样 6 次,测定峰面

积,计算 RSD%。结果表明:喹啉黄、食用绿 S 和亮绿的平均峰面积分别为 4. 789 8、0. 485 0 和 1. 079 4;RSD 分别为 2. 52%、1. 28%、0. 65%,说明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验

按供试样品溶液的制备方法制备供试样品,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,测定峰面积,计算 RSD%。结果表明:喹啉黄、食用绿 S 和亮绿的平均峰面积分别为 4. 858 0、1. 083 3 和 0. 546 5;RSD 分别为 2. 15%、0. 23%、0. 19%,3 种合成色素的 RSD 均小于 3%,说明 3 种合成色素在供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

2.5 重复性试验

取同一批供试样品,按供试品溶液制备方法制成供试品溶液,测定峰面积,计算 RSD%。结果表明:喹啉黄、食用绿 S 和亮绿的平均峰面积分别为 2. 153 0、0. 524 4 和 0. 569 6;RSD 分别为 0. 51%、0. 41%、2. 05%,3 种色素的 RSD 值均小于 3%,说明本方法重复性好。

2.6 检出限与定量限的考察

取混合标准样品溶液,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇—水溶液不断稀释,摇匀,精密吸取适量稀释液注入液相色谱仪进行分析,记录峰高,并与噪音相比较,计算检出限和定量限,结果喹啉黄检出限为 6. 833 9 ng、定量限 16. 501 7 ng,食用绿 S 检出限为 0. 848 7 ng、定量限 2. 501 6 ng,亮绿检出限为 1. 336 0 ng、定量限 4. 008 9 ng。

2.7 回收率试验

按“2. 1. 2”制备一定浓度(喹啉黄 6. 832 9 μg/mL、食用绿 S 0. 848 7 μg/mL 和亮绿 1. 336 3 μg/mL)的混合标准样品溶液,取阴性样品作为供试样品,称取供试样品 5. 00 g(精确至 0. 01 g),分别加入 0. 05、0. 25、0. 5 mL 三个梯度体积的混合标准样品溶液。按“2. 2”制备方法制备供试样品溶液,进样分析,测定峰面积,每个梯度平行制备 3 份。结果表明喹啉黄平均回收率为 102. 98%,RSD 为 0. 24%;食用绿 S 平均回收率为 101. 51%,RSD 为 1. 27%;亮绿平均回收率为 93. 33%,RSD

为 0. 51%。测定结果见表 3。

表 3 3 种合成色素回收率试验结果

	称样量 /g	峰面积	测得量 /μg	加入量 /μg	回收率 /%	平均值 回收率 /%	RSD /%
喹 啉 黄	5. 01	0. 223 8	0. 354 9	0. 341 6	103. 8 9	102. 98	0. 24
	5. 04	0. 221 5	0. 350 9	0. 341 6	102. 7 2		
	5. 02	0. 225 3	0. 356 9	0. 341 6	104. 4 7		
	5. 03	1. 097 1	1. 740 8	1. 708 2	101. 91		
	5. 02	1. 096 5	1. 739 8	1. 708 2	101. 85		
	5. 03	1. 095 6	1. 738 4	1. 708 2	101. 77		
	5. 04	2. 219 4	3. 521 6	3. 416 4	103. 08		
	5. 01	2. 228 9	3. 536 7	3. 416 4	103. 52		
	5. 05	2. 231 2	3. 540 3	3. 416 4	103. 6 3		
	5. 01	0. 055 8	0. 043 1	0. 042 4	101. 68		
食 用 绿 S	5. 04	0. 055 0	0. 041 1	0. 042 4	96. 97	101. 51	1. 27
	5. 02	0. 054 1	0. 040 5	0. 042 4	95. 62		
	5. 03	0. 279 1	0. 225 9	0. 212 2	106. 46		
	5. 02	0. 275 2	0. 222 7	0. 212 2	104. 95		
	5. 03	0. 270 2	0. 218 7	0. 212 2	103. 06		
	5. 04	0. 524 0	0. 423 8	0. 424 3	99. 88		
	5. 01	0. 532 9	0. 431 0	0. 424 3	101. 58		
	5. 05	0. 542 1	0. 438 5	0. 424 3	103. 35		
	5. 01	0. 052 2	0. 061 5	0. 066 8	92. 11		
	5. 04	0. 052 3	0. 062 3	0. 066 8	93. 26		
亮 绿	5. 02	0. 051 4	0. 061 4	0. 066 8	91. 90	93. 33	0. 51
	5. 03	0. 261 2	0. 325 8	0. 334 1	97. 50		
	5. 02	0. 261 4	0. 319 3	0. 334 1	95. 56		
	5. 03	0. 256 9	0. 320 4	0. 334 1	95. 91		
	5. 04	0. 522 4	0. 612 7	0. 668 1	91. 71		
	5. 01	0. 522 9	0. 613 3	0. 668 1	91. 80		
	5. 05	0. 513 8	0. 602 6	0. 668 1	90. 19		

2.8 样品中三种色素含量的测定

取 10 批样品,按“2. 2”制备供试样品溶液,进行测定,结果表明:10 批样品中 3 种合成色素均未检出。通过对 10 批结果分析可知,本实验建立的 HPLC 法快速、准确,适用于实际分析工作。

3 结论

通过喹啉黄色谱图可知,喹啉黄并不是一个单一成分,而是由 4 个成分组成,在实际分析过程中,考虑到每个成分的量的不同,在做检出限、定量限

时,选择以最小峰面积的2号色谱峰作为参考峰,对其检出限、定量限进行测定。

色谱条件的考察首先通过最大吸收峰找到了每个成分的最大吸收波长,最终确定喹啉黄为425 nm、食用绿S和亮为624 nm;其次对流动相进行了考察,最后得出以甲醇和20 mmol/L 乙酸铵作为流动相,三种色素可以分离完全,并且峰形较好;最后也对进样量、柱温、流速等做了考察,最后得出最佳色谱条件为进样量10 μL 、柱温35 $^{\circ}\text{C}$ 和流速为1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

本实验所建立的方法,样品前处理简单、快速、结果准确,适用于馒头中喹啉黄、食用绿S、亮绿3种色素的含量测定。

参考文献:

- [1] AMIN K, HAMEID H, ABD E A. Effect of food azodyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(10): 2994–2999.
- [2] NEERA M V, MEENAL M, RICHA K J, et al. Effect of sunset yellow on testis in rats [J]. Ecophysiol Occup Health, 2005, 5(1/2): 1–3.
- [3] POL M, JARRY G, ELHKIM M O, et al. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(2): 443–448.
- [4] GB/T 5009.35—2003, 食品中合成着色剂的测定[S].
- [5] 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].
- [6] 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].
- [7] KIRSCHBAUM J, KRAUSE C, PFALZGRAF S, et al. Development and evaluation of an HPLC–DAD method for determination of synthetic food colorants [J]. Chromatographia, 2003, 57(1): S115–S119.
- [8] 王冬妍, 杨书宁. 高效液相色谱法测定杏罐头中的柠檬黄、日落黄 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(9): 134–136.
- [9] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 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.
- [10] 符锋, 范会平, 秦学磊. 高效液相色谱法对挂面中食用合成色素的测定 [J]. 食品科学, 2011, 31(18): 325–328.
- [11] 刘长勇, 罗小玲, 郝家勇, 等. 高效液相色谱法测定玉米面馒头中着色剂柠檬黄 [J]. 化学分析计量, 2011, 20(5): 68–69.
- [12] 田兰, 包综方, 张继春, 等. 高效液相色谱–二极管阵列法测定发酵面制品中合成着色剂 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 449–452.
- [13] 王淑惠, 左书梅, 解彦平, 等. 高效液相色谱–二极管阵列检测器法测定馒头中的合成色素 [J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1282–1286.
- [14] 辛若竹, 王静, 韩建秋. 示波极谱法测定食品中合成着色剂的抗干扰性的研究 [J]. 中国酿造, 2007(1): 65–66.
- [15] 宋新, 纪双利, 杨丽, 等. 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.
- [16] 张永生, 魏新军, 南海娟, 等. 支持向量回归分光光度法同时测定饮料中柠檬黄与日落黄 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(8): 138–140.
- [17] 林壮森, 蔡泽凤. 分光光度法快速检测饮料中柠檬黄的研究 [J]. 广西轻工业, 2011, 27(2): 8–9. ㊞