

# 固相萃取-液相色谱法测定蜜饯中7种 常见合成色素

黄志强\*, 王飞, 俞文妍, 杨献青  
(建德市疾病预防控制中心, 建德 311600)

**摘要:** **目的** 建立一种同时测定蜜饯中7种常见合成色素(柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝、诱惑红、赤藓红)的固相萃取-高效液相色谱(solid-phase extraction-high performance liquid chromatography, SPE-HPLC)分析方法。 **方法** 样品经水提取后, 采用 Anpelclean PA 聚酰胺 SPE 小柱净化, 氮吹后定容, 以甲醇和 20 mmol/L 乙酸铵为流动相, 通过 Waters 公司 XBridge C<sub>18</sub> 柱梯度洗脱分离, 在特异性波长下进行测定。 **结果** 7种常见合成色素在 0.50~10.0 μg/mL 范围内峰面积与其实际浓度线性相关性良好( $r^2$  0.9987), 在 0.5、2.5、5.0 mg/kg 三个加标水平上回收率在 74.3%~97.5%之间, RSD 在 0.47%~4.80%之间。检出限在 0.02~0.10 mg/kg 之间, 定量限在 0.06~0.30 mg/kg 之间。 **结论** 本方法灵敏度高, 分离效果好, 精密度好, 准确度高, 适用于蜜饯中7种常见合成色素的测定。

**关键词:** 固相萃取; 蜜饯; 合成色素; 高效液相色谱法

## Determination of 7 kinds of synthetic pigments in preserved fruits by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography

HUANG Zhi-Qiang\*, WANG Fei, YU Wen-Yan, YANG Xian-Qing  
(Jiande Center for Disease Control and Prevention, Jiande 311600, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous determination of 7 kinds of synthetic pigments (lemon yellow, amaranth, ponceau 4r, sunset yellow, coomassie brilliant blue, allura red and erythrosine) in preserved fruits with solid-phase extraction-high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). **Methods** The homogenized samples were extracted by water, purified by Anpelclean PA- SPE column, and adjusted to constant volume after nitrogen blowing. HPLC analysis was conducted using methanol and 20 mmol/L ammonium acetate as mobile phase with a xbridge-C<sub>18</sub> column from Waters company for gradient elution and separation. Specific wavelengths were applied for quantitative detection of the synthetic pigments in the samples. **Results** There was a good linearity between peak areas and concentrations of 7 kinds of synthetic pigments in the concentration range of 0.50~10.0 μg/mL ( $r^2$  0.9987). The recovery rates fell in the scope of 74.3%~97.5% and RSDs ranged from 0.47% to 4.80% under the standard addition levels of 0.5, 2.5 and 5.0 mg/kg. The detection limits were between 0.02 and 0.10 mg/kg and the quantification limits between 0.06 and 0.30 mg/kg. **Conclusion** The method has high sensitivity, good separation effect, good precision and high accuracy, thus, it's suitable for the simultaneous determination of 7 kinds of common fruit pigments in

\*通讯作者: 黄志强, 技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: hzqwsjy@163.com

\*Corresponding author: HUANG Zhi-Qiang, Technician, Jiande Center of Disease Control and Prevention, No.66 Kang'an Road, Xin'An River Street, Jiande 311600, China. E-mail: hzqwsjy@163.com

preserved fruits.

**KEY WORDS:** solid-phase extraction; preserved fruits; synthetic pigments; high performance liquid chromatography

## 1 引言

合成色素即人工合成的色素,其具有一定的优点,如色泽鲜艳、着色力强、色调丰富,但它也存在毒性、致泻性和致癌性等缺点。这是由于食用合成色素多以苯、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,因此多为含有 R-N=N-Rc 键、苯环或氧杂蒽结构的化合物,它们对人体存在一定的危害性<sup>[1]</sup>。当前,一些蜜饯生产企业在生产过程中添加合成色素,以增加产品的外观美感。如果合成色素添加量超标,则会对人体产生危害<sup>[2]</sup>。我国国家标准 GB 2760-2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<sup>[3]</sup>中对各种合成色素的添加都有严格的规定。目前测定合成色素最普遍方法是液相色谱法<sup>[4-10]</sup>。前处理有聚酰胺粉吸附法、液-液分配法、羊毛绒吸附法<sup>[11]</sup>。常用的聚酰胺粉吸附法吸附效果差,且难以批量处理样品,液-液分配法比较繁琐,且要用到大量有机试剂,不适用于日常样品检测<sup>[12]</sup>。本文采用成品化的聚酰胺固相萃取小柱进行前处理,可以克服聚酰胺粉吸附法效果差、不易批量处理的缺点,并可以同时检测 7 种常见合成色素,所用的试剂量也大大节省。由于可以批量进行处理,所以极大地提高了蜜饯中合成色素的检测效率,能够很好地满足实际工作的需要。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Waters E2695 液相色谱仪、2489 紫外可变波长检测器(美国沃特世公司); KL512J 氮吹仪(北京康林科技有限责任公司); Delta320 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); Anpelclean PA 聚酰胺小柱(300 mg, 6 mL)(上海安谱科学仪器有限公司); GM-1.0A 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司); Mediwax 固相萃取装置(美国 Mediwax 公司)。

柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝标准液(0.500 mg/mL, 中国计量科学研究院); 诱惑红、赤藓红标准液(1.00 mg/mL, 北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司)。

甲醇、乙酸铵(色谱纯, 上海安谱科学仪器有限公司); 无水乙醇(优级纯, 国药集团有限公司); 氨水(分析纯, 杭州长征化学有限公司); 柠檬酸(分析纯, 杭州化工试验厂); 甲酸(分析纯, 上海试剂一厂); 水为超纯水。

乙酸铵溶液(0.02 mol/L): 称取 1.54 g 乙酸铵, 加超纯水至 1000 mL, 溶解, 经 0.45 μm 滤膜过滤。

无水乙醇-氨水-超纯水(7:2:1, V:V:V)溶液: 分别量取无水乙醇 70 mL、氨水 20 mL、水 10 mL, 混匀。

柠檬酸溶液(pH=6.0): 在超纯水中滴加浓柠檬酸溶液, 调至 pH 为 6.0。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品前处理

称取 5.00 g 蜜饯可食部分, 放入小烧杯中, 加超纯水 30 mL, 60 °C 水浴提取 15 min, 过玻璃棉, 反复提取 3 次, 过滤后合并滤液备用。若试样 pH 过高则用柠檬酸溶液调 pH 值至 6 左右。柱的预处理: 用 pH=6.0 的柠檬酸水溶液湿润聚酰胺小柱。上样: 将滤液转移到预处理过的小柱中, 弃去。洗涤: 依次用 5 mL pH=6.0 的柠檬酸溶液, 5 mL 甲醇-甲酸(3:2, V:V)溶液洗涤一次, 超纯水冲洗至中性(反复 3~5 次)(用 pH 试纸测试), 抽干。洗脱: 用无水乙醇-氨水-超纯水溶液(7:2:1, V:V:V)洗脱, 抽干, 收集洗脱液。浓缩: 在 60 °C 水浴下, 用氮气吹干至 1~2 mL, 冷却后用乙酸调节 pH 至中性, 用超纯水定容至 5 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 备用待测<sup>[13]</sup>。

#### 2.2.2 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: A 相甲醇, B 相乙酸铵溶液(0.02 mol/L)。流动相梯度条件和波长设置条件如表 1、表 2。

表 1 流动相梯度洗脱表

Table 1 Table of mobile phase gradient elution

时间(min)	A 相(%)	B 相(%)
0	5	95
8	15	85
15	35	65
20	80	20
22	80	20
23	5	95
30	5	95

注: 流动相所占比例均为线性增加/减少

表 2 波长设置表  
Table 2 Table of setting wavelength

时间(min)	波长(nm)
0~6	254
6~8	428
8~14	521
14~16	509
16~18	483
18~20	507
20~21	625
21~30	529

### 2.2.3 标准曲线的配制

准确吸取柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝标准溶液各 5.0 mL 以及诱惑红、赤藓红标准溶液各 2.5 mL 至 50.0 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 配制各色素浓度均为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准溶液。再分别吸取 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mL 混合标准溶液至 50.0 mL 容量瓶中, 用超纯水定容, 得到浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准系列溶液。在 2.2.2 中所述色谱条件下进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标建立标准曲线。

## 3 结果与讨论

### 3.1 样品前处理条件的确定

蜜饯类样品中的果胶成分很容易堵住小柱, 所以上柱之前需过滤, 而普通的滤纸会吸附色素, 故采

用玻璃棉替代<sup>[14]</sup>。所用洗脱程序参照国标 GB/T 5009.35-2003《食品中合成着色剂的测定》<sup>[15]</sup>, 并进行了一定的改进。由于赤藓红不耐酸, 所以选择在 pH 值为 6 的条件下用聚酰胺粉吸附色素和洗涤干扰物质。吸附在室温下进行, 并不会影响色素回收率<sup>[13,15,16]</sup>。

### 3.2 色谱分离条件的确定

国标 GB/T 5009.35-2003<sup>[15]</sup>中规定的合成色素液相色谱分析波长为 254 nm, 但是此波长下赤藓红和亮蓝不出峰, 且实验结果受蜜饯中杂质的干扰非常严重。因此, 参考国标 GB/T 21916-2008《水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法》<sup>[17]</sup>中规定的测定波长: 柠檬黄为 428 nm, 苋菜红为 521 nm, 胭脂红为 509 nm, 日落黄为 483 nm, 诱惑红为 507 nm, 亮蓝为 625 nm, 赤藓红为 529 nm。根据国标 GB/T 5009.35-2003<sup>[15]</sup>和 GB/T 21916-2008<sup>[17]</sup>中的方法进行测定时发现, 梯度洗脱出峰时间太短, 导致柠檬黄、苋菜红两种出峰快的色素和杂质分离度差, 无法定量。而采用本实验的方法, 可以得到很好的分离度。如图 1, 柠檬黄和苋菜红保留时间相差 2.1 min, 可以较好分离。图 2 为情人梅实际样品的高效液相色谱图, 其中出峰最快的柠檬黄也不受杂质干扰。

### 3.3 标准曲线与检出限

在 0.50~10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内, 7 种合成色素峰面积与其实际浓度值之间线性关系良好。在上述实验条件下, 以 3 倍噪声计算检出限, 以 10 倍噪声计算出

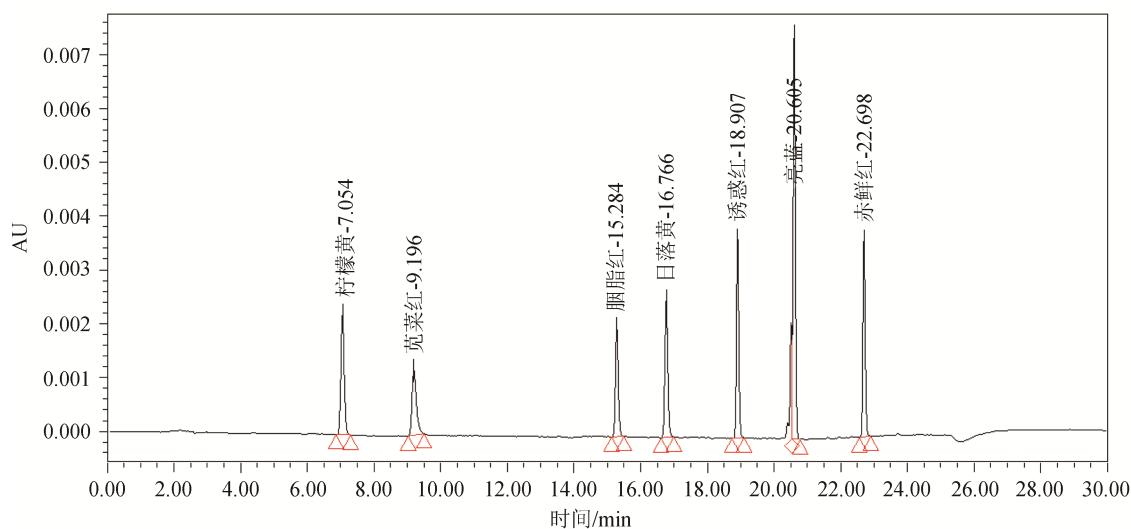


图 1 标准色谱图

Fig. 1 Standard chromatogram

定量限, 结果如表3所示。GB/T 5009.35-2003<sup>[15]</sup>中规定的检测方法规定此7种合成色素的检出限在0.16~1.04 mg/kg之间, 而本方法检出限在0.02~0.10 mg/kg之间, 各色素对应检出限比国标法中更优。GB 2760-2011<sup>[3]</sup>中规定的7种合成色素的最大使用量为0.025~0.1 g/kg, 本方法定量限在0.06~0.30 mg/kg之间, 能满足检测的需要。

### 3.4 方法的精密度和加标回收率

在芒果蜜饯、情人梅样品中分别加入0.5、2.5、5.0 mg/kg三个浓度的7种合成色素, 按2.2.2中所述实验方法进行检测, 计算精密度和加标回收率。实验表明, 3种浓度下, 芒果蜜饯类样品加标回收率在74.3%~97.5%之间, 平均回收率为91.8%, RSD在

0.47%~4.80%之间。3种浓度下情人梅样品加标回收率在75.6%~96.8%之间, 平均回收率为91.0%, RSD在0.61%~4.60%之间。结果见图3、图4、表4。

## 4 结论

本方法是在国标GB/T 5009.35-2003《食品中合成着色剂的测定》和GB/T 21916-2008《水果罐头中合成着色剂的测定 高效液相色谱法》基础上建立的同时检测7种常见合成色素的改进方法。采用本方法检测蜜饯类样品中柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝、诱惑红、赤藓红7种合成色素, 在0.5、2.5、5.0 mg/kg三个加标水平上回收率在74.3%~97.5%之间, RSD在0.47%~4.80%之间, 检出限在0.02~0.10 mg/kg

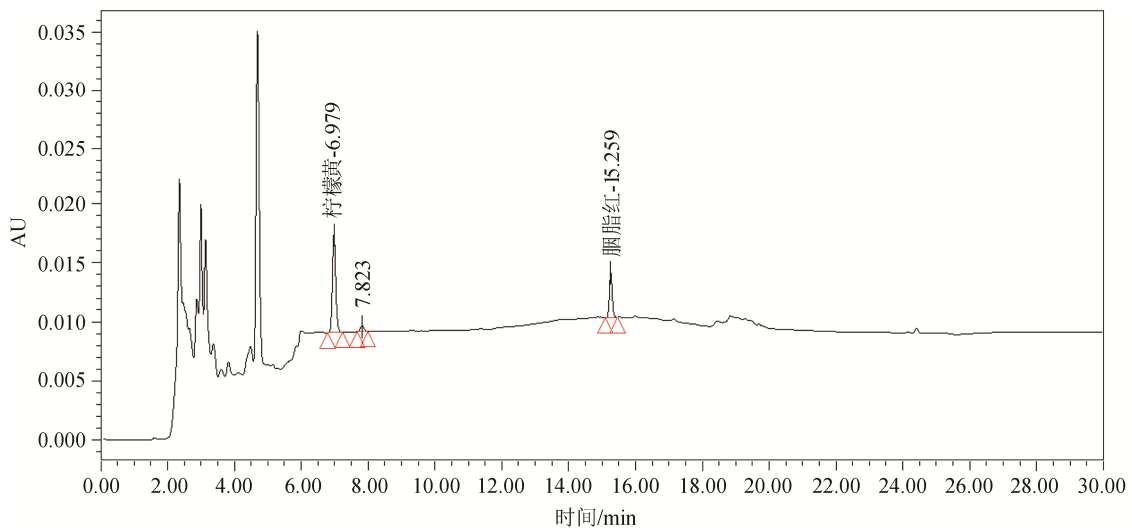


图2 情人梅色谱图

Fig. 2 Chromatogram of lover plum sample

表3 7种合成色素标准曲线回归方程、线性系数、检出限和定量限

Table 3 Standard curves, regression equations, linear coefficients, detection limits and quantification limits of 7 kinds of synthetic pigments

色素	回归方程	$r^2$	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
柠檬黄	$Y=3.16 \times 10^4 X + 1.06 \times 10^3$	0.9999	0.05	0.15
苋菜红	$Y=2.49 \times 10^4 X - 1.71 \times 10^3$	1.0000	0.10	0.30
胭脂红	$Y=2.51 \times 10^4 X - 1.17 \times 10^2$	0.9999	0.06	0.18
日落黄	$Y=3.21 \times 10^4 X + 5.92 \times 10^2$	0.9999	0.09	0.27
诱惑红	$Y=3.67 \times 10^4 X + 1.30 \times 10^3$	0.9999	0.10	0.30
亮蓝	$Y=8.74 \times 10^4 X - 5.69 \times 10^4$	0.9987	0.02	0.06
赤藓红	$Y=3.81 \times 10^4 X - 1.07 \times 10^3$	0.9999	0.03	0.09

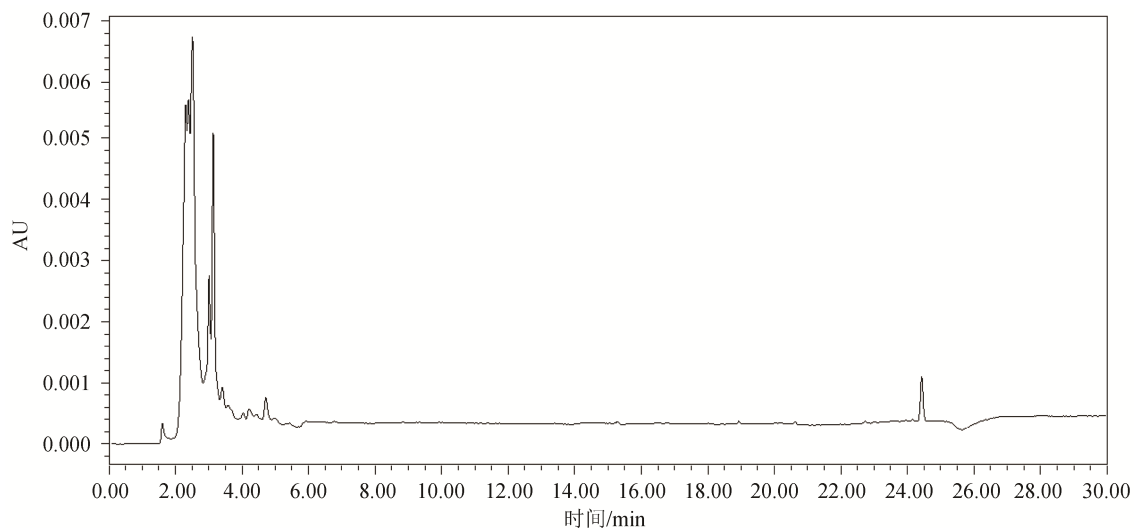


图 3 芒果蜜饯样品本底色谱图

Fig. 3 Chromatogram of preserved mango samples

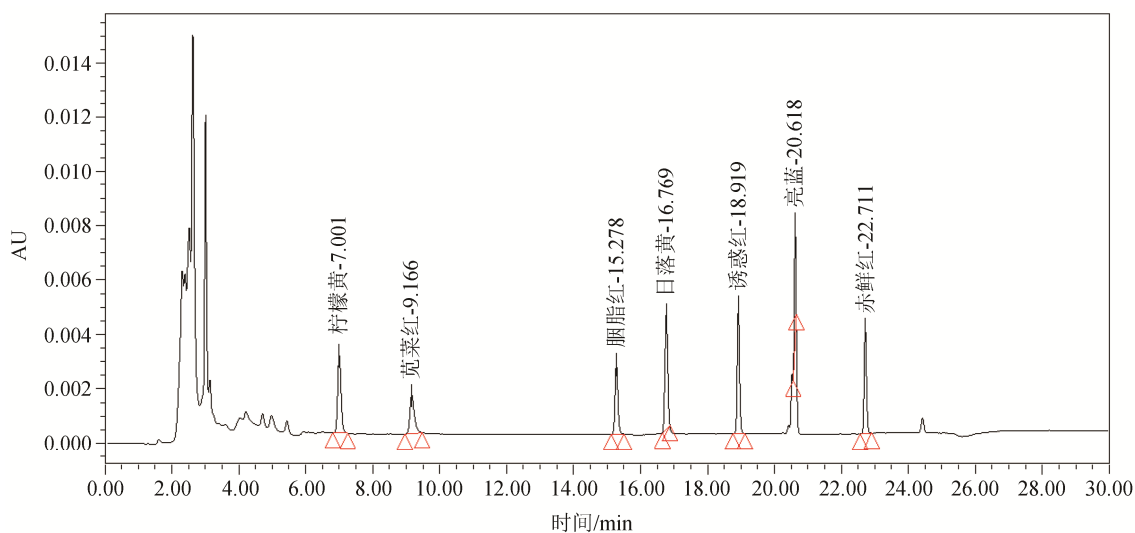


图 4 芒果蜜饯样品加标(0.5 mg/kg)色谱图

Fig. 4 Chromatogram of spiked preserved mango sample (0.5 mg/kg)

表 4 7 种色素加标回收率结果( $n=6$ )Table 4 The recovery rates of 7 kinds of pigments ( $n=6$ )

色素名称	加标量(mg/kg)	芒果蜜饯		情人梅	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
柠檬黄	0.5	85.3	1.47	82.4	1.59
	2.5	96.1	2.30	95.1	2.70
	5	97.4	4.60	96.8	3.32
苋菜红	0.5	92.0	1.54	93.3	2.32
	2.5	94.3	1.89	96.2	3.48
	5	96.4	3.20	94.3	4.37

续表 4

色素名称	加标量(mg/kg)	芒果蜜饯		情人梅	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
胭脂红	0.5	89.5	0.47	82.3	0.90
	2.5	90.3	1.02	85.4	1.83
	5	91.6	4.80	90.3	2.01
日落黄	0.5	93.3	0.68	95.6	0.61
	2.5	96.4	2.21	93.7	3.54
	5	97.5	2.10	96.6	3.67
诱惑红	0.5	84.7	1.46	94.3	1.82
	2.5	93.8	1.72	87.4	2.34
	5	96.8	3.20	93.7	4.60
亮蓝	0.5	85.3	1.23	82.3	0.98
	2.5	93.2	2.34	94.3	3.34
	5	94.6	2.84	95.3	3.42
赤藓红	0.5	74.3	1.47	75.6	1.87
	2.5	91.2	1.98	89.3	2.35
	5	93.3	2.85	96.4	3.59

之间, 定量限在 0.06~0.30 mg/kg 之间。本方法灵敏度高, 分离效果好, 精密度好, 准确度高, 不需对赤藓红单独进行前处理, 且可通过固相萃取装置进行大批量样品前处理, 极大地提高了实验效率, 适用于蜜饯类样品中 7 种常见色素的测定。

#### 参考文献

- [1] Collier SW, Storm JE, Bronaugh RL. Reduction of azodyes during invitro percutaneous absorption [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, (118): 73-79.
- [2] 文君, 孙丹红, 胡晓科. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中七种合成色素[J]. *中国卫生检验*, 2013, 23(7): 1717-1719.  
Wen J, Sun DH, Hu XK. Simultaneous determination of 7 kinds of synthetic pigments in foods by SPE-HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, 23(7): 1717-1719.
- [3] GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].  
GB 2760-2007 National food safety standards-Hygienic standards for uses of food additives [S].
- [4] 刘英, 尹州, 邹晓筱, 等. 高效液相色谱法同时测定蜜饯中 16 种食品添加剂[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(6): 651-655.  
Liu Y, Yin Z, Zou XX, *et al.* Determination of 16 kinds of food additives in preserved fruits by high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(6): 651-655.
- [5] 华永有, 林坚, 林宏林. HPLC 测定保健食品中的 8 种合成色素的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(1): 64-67.  
Hua YY, Lin J, Lin HL. Determination of synthetic pigment in health foods by HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, 23(1): 64-67.
- [6] 孔聪, 沈晓盛, 于慧娟, 等. 富含蛋白食品中的 8 种合成色素的高效液相色谱测定方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(12): 4085-4091.  
Kong C, Shen XS, Yu HJ, *et al.* Determination of 8 synthetic food colorants in protein-rich samples with high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(12): 4085-4091.
- [7] 鄢兵, 胡海山, 张云伟, 等. 超高效液相色谱法同时测定食品中 7 种合成色素[J]. *分析科学学报*, 2014, 30(4): 527-528.  
Yan B, Hu HS, Zhang YW, *et al.* Determination of 7 kinds of synthetic pigments in foods by ultra performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 2014, 30(4): 527-528.
- [8] 周蓉, 牟仁祥, 许萍, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 7 种合成色素[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(6): 70-86.  
Zhou R, Mou RX, Xu P, *et al.* Determination of 7 kinds of synthetic pigments in food by HPLC [J]. *Cereal Food Ind*, 2014, 21(6): 70-86.

- [9] 郝鹏飞, 宫萍, 刘琳, 等. 高效液相色谱法同时测定熟肉制品中日落黄、胭脂红和诱惑红[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3795-3801.  
Hao PF, Gong P, Liu L, *et al.* Determination of sunset yellow, carmine and allura red in cooked meat products by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(12): 3795-3801.
- [10] 陈沛金, 张毅, 肖锋, 等. 高效液相色谱法测定糖果、蜜饯和饮料中 19 种食品添加剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3487-3494.  
Chen PJ, Zhang Y, Xiao F, *et al.* Determination of 19 kinds of food additives in candies, preserves and beverages by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(11): 3487-3494.
- [11] 邢晓慧, 尹未华, 韩春菊, 等. 高效液相色谱法测定蜜饯中食用合成色素 [J]. 食品研究与开发, 2007, 128(10): 133-135.  
Xing XH, Yin WH, Han CJ, *et al.* Method for determination of synthetic colors in preserved fruit [J]. *Food Res Dev*, 2007, 128(10): 133-135.
- [12] 杨伟强. 全自动固相萃取/超高效液相色谱串联质谱法检测食品中的 9 种合成色素 [J]. 福建分析测试, 2014, 23(5):1-5.  
Yang WQ. Determination of 9 kinds of synthetic colorants in food by auto-solid phase extraction/ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Fujian Anal Test*, 2014, 23(5): 1-5.
- [13] 肖亮, 于忠飞, 薛芳, 等. 聚酰胺小柱净化-反相液相色谱同时测定海米中 4 种合成着色剂[J]. 中国食品添加剂, 2014, (6):167-171.  
Xiao L, Yu ZF, Xue F, *et al.* Simultaneous determination of four synthetic colorants in dried shrimps by polyamide cartridge and HPLC [J]. *Chin Food Addit*, 2014, (6): 167-171.
- [14] 张建扬. 高效液相色谱法测定蜜饯中的合成着色剂 [J]. 凯里学院学报, 2010, 28(3): 63-65.  
Zhang JY. Determination of synthetic colour in glazed fruit by high performance liquid chromatography [J]. *J Kaili Univ*, 2010, 28(3): 63-65.
- [15] GB/T 5009.35-2003 食品中合成着色剂的测定[S].  
GB/T 5009.35-2003 Determination of synthetic colour in foods [S].
- [16] 迟秋池, 刘畅, 闫超. 固相萃取-高效液相色谱法测定食品中的赤藓红和靛蓝[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(22): 3221-3223.  
Chi QC, Liu C, Yan C. Simultaneous determination of indigo and erythrosine in foods with solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 24(22): 3221-3223.
- [17] 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].  
GB/T 21916-2008 Determination of synthetic colour in fruit tins-high performance liquid chromatography [S].

(责任编辑: 卢 忆)

## 作者简介



黄志强, 技师, 主要研究方向为食品理化检验。

E-mail: hzqwsjy@163.com