

多波长高效液相色谱法测定米豆腐中4种色素

雷德卿^{*}

(长沙市食品药品检验所, 长沙 410008)

摘要: **目的** 建立多波长高效液相色谱法监测米豆腐中添加柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝等4种人工色素。**方法** 氨碱性条件下用水作溶剂超声提取米豆腐中色素, 提取液用柠檬酸溶液调节pH值至弱酸性, 高效液相色谱在线分离。经 Waters C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离; 以 0.02 mol/L 乙酸铵(pH 值 5.5)—甲醇为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 以各组分的最大吸收波长为检测波长, 外标法定量。**结果** 4种组分在 1.00~100 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数在 0.9993~0.9997 ($n=7$), 平均加标回收率在 87.4%~89.5% ($n=3$)。**结论** 该方法同时测定米豆腐中4种人工色素, 前处理简单、快速, 定量准确, 灵敏度高, 可用于米豆腐的质量控制。

关键词: 米豆腐; 色素; 多波长; 高效液相色谱法

Determination of 4 kinds of pigment in rice tofu by multi-wavelength high performance liquid chromatography

LEI De-Qing^{*}

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410008, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of lemon yellow, carmine, sunset yellow and brilliant blue in rice tofu by multi-wavelength high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Four kinds of artificial pigments in rice tofu were extracted by water under ammonia alkaline condition. The sample solution was acidified by citric acid solution, and then separated online by HPLC. The samples were separated with a Waters C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) at the flow rate of 1.0 mL/min by gradient elution using 0.02 mol/L ammonium acetate (pH 5.5) and methanol, and the column temperature was 30 ℃, the maximum absorption wavelength of each component was taken as the detected wavelength, they were quantified by external standard method. **Results** The 4 kinds of artificial pigments showed a good linear range at 1.00-100 μg/mL, the correlation coefficients were 0.9993-0.9997 ($n=7$), and the average recoveries were 87.4%-89.5% ($n=3$). **Conclusion** This method is accurate, simple and reliable, which can be used for the quality control of artificial pigments in rice tofu.

KEY WORDS: rice tofu; pigment; multi-wavelength; high performance liquid chromatography

^{*}通讯作者: 雷德卿, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。E-mail: 53829816@qq.com

^{*}Corresponding author: LEI De-Qing, Master, Associate Chief Pharmacist, Changsha Institute for Food and Drug Control, No.149 weier road furong district, Changsha 410008, China. E-mail: 53829816@qq.com

1 引言

人工合成色素色彩鲜艳, 价格低廉, 能增强食品外观美感, 被广泛用于食品加工。过量的人工色素在体内蓄积, 可能会对人体器官和机能造成损害, 甚至致癌^[1]。米豆腐润滑鲜嫩、清新舒爽, 是人们喜爱的小吃。一些生产者为了改善米豆腐外观, 提高人们食欲, 在米豆腐中添加人工色素。我国目前没有米豆腐的检验标准, 也没有检测米豆腐中人工色素的相关文献资料。人工色素的检测方法有分光光度法、毛细管电泳法、薄层扫描法、极谱法^[2-7], 目前应用较多的是高效液相色谱法^[8-12]和液相色谱-串联质谱法^[13-16]。液质联用法多用于阳性样品定性确认, 但仪器价格昂贵, 运行成本高, 一般不用于实验室常规检测。高效液相色谱法检测成本较低, 方法简单, 普及较广, 是日常检验工作中的常规手段。

本研究根据前期市场走访调查的情况, 选择柠檬黄、日落黄、胭脂红和亮蓝 4 个最常添加的人工色素作为指标, 对提取方法和色谱条件进行研究, 建立简单、准确的高效液相色谱法, 以期为米豆腐的质量控制提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪、2996 PDA 检测器、717 自动进样器(美国沃特斯公司); MS205DU 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

甲醇(色谱纯)、乙酸铵(分析纯)、柠檬酸(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 亚铁氰化钾、乙酸锌(分析纯, 湖南汇虹试剂有限公司); 超纯水由实验室自制; 柠檬黄(批号: GBW(E) 100158)、胭脂红(批号: GBW(E) 100161)、日落黄(批号: GBW(E) 100159)、亮蓝(批号: GBW(E) 100162)(1.00 mg/mL, 中国标准物质中心)。

31 批米豆腐样品从市场购置, 编号分别为 1 号~31 号。其中 31 号样品为我们向米豆腐生产者定制, 并现场监督制作, 未添加任何色素。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.02 mol/L 乙酸铵(0.1 mol/L 柠檬酸溶液调节 pH 值至 5.5), B 为甲醇; 梯度洗脱: 洗脱程序见表 1; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 柠檬黄 428 nm, 日落黄 482 nm, 胭脂红 508 nm, 亮蓝 630 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.3 标准溶液的配制

分别精密量取柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝标准物质溶液适量, 用流动相 A 稀释成含柠檬黄、胭脂红、日落

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	8	14	22	30	31	40
A%	95	70	70	20	20	95	95
B%	5	30	30	80	80	5	5

黄、亮蓝质量浓度均为 1.00、2.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100 μg/mL 的混合标准系列工作溶液。

2.4 样品溶液的制备

将适量样品粉碎混匀, 精密称取约 10 g, 置比色管中, 加水 20 mL, 加浓氨溶液 0.1 mL, 漩涡混旋 3 min, 超声 20 min, 加 10%(g/mL)亚铁氰化钾溶液(临用新配)和 10%(g/mL)乙酸锌溶液各 2 mL, 混旋 1 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液至 50 mL 量瓶中。残渣加水 10 mL, 漩涡混匀 2 min, 离心, 取上清液, 重复上述操作 1 次。合并上清液, 用 0.1 mol/L 柠檬酸溶液调节 pH 值至 5.5, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3 结果与分析

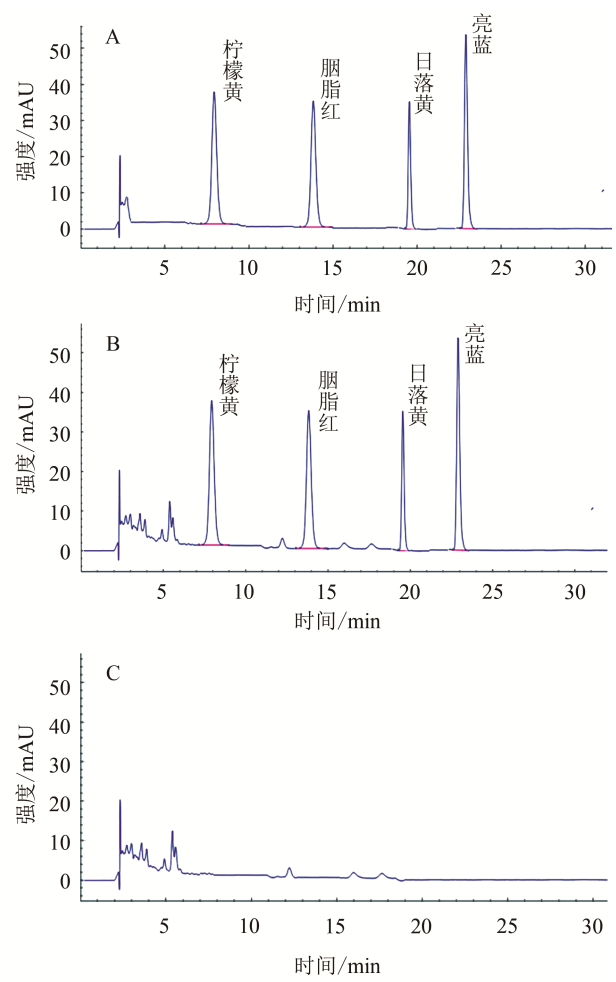
3.1 提取方法优化

GB 5009.35-2016《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》^[17]采用聚酰胺吸附法分离提取样品中色素, 本研究采用 2.4 项下的氨碱性水提法, 比较 2 种方法的加标回收率, 聚酰胺吸附法中的柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝回收率分别为: 86.9%、89.5%、88.3%、89.2%, 氨碱性水提法中相应的回收率分别为: 88.7%、88.1%、87.4%、89.5%, 2 种方法回收率均较好, 无明显差异。但聚酰胺吸附法操作繁琐, 效率较低, 氨碱性水提法简单快速, 可提高工作效率。柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝均为弱酸性染料, 易溶于水, 在柠檬酸溶液中稳定。在氨碱性条件下可完全提取 4 种组分, 回收率较高; 大米中蛋白含量约 7%, 加入 10%(g/mL)亚铁氰化钾溶液和 10%(g/mL)乙酸锌溶液沉淀蛋白, 无需过萃取小柱, 可以防止干扰目标峰和污染色谱柱; 提取液用 0.1 mol/L 柠檬酸调节 pH 值至 5.5, 用水相流动相稀释定容, 取样品溶液于 0、4、8、16、24、36、48 h 进样, 以峰面积计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.2%, 可见用柠檬酸调节样品溶液 pH 值至弱酸性, 待测组分在 48 h 内稳定。

3.2 色谱条件选择

柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝结构中含有数量不等的苯磺酸基团, 具有较大的共轭结构, 在可见光区有较强烈的特征吸收。用 PDA 检测器在 200~700 nm 波长范围扫描, 以各组分最大吸收波长作为检测波长, 并按照 4 个组分的

保留时间, 实时改变检测波长。根据实验结果在 0~8 min 选择 428 nm 检测柠檬黄, 8~14 min 选择 508 nm 检测胭脂红, 14~22 min 选择 482 nm 检测日落黄, 22~30 min 选择 630 nm 检测亮蓝, 可以保证各个组分响应值达到最大。与采用 254 nm 单波长检测相比较, 4 组分检测灵敏度均有提高, 其中亮蓝采用 630 nm 比采用 254 nm 时检出限和定量限提高 10 倍以上。调节流动相 pH 值至 5.5 左右, 可以改善峰形, 防止拖尾。在此条件下, 4 种组分完全分离, 峰形良好, 其他组分没有干扰(结果见图 1)。



注: A: 混合标准物质; B: 样品溶液; C: 阴性对照图

图 1 样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of samples

3.3 线性范围与检测限

取上述混合标准工作系列溶液各 10 μ L 进样, 测定峰面积, 以柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝浓度为横坐标(X), 相应峰面积为纵坐标(Y), 分别绘制标准曲线, 得回归方程。结果见表 2, 柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝在 1.00~100 μ g/mL 范围内线性关系良好。在取样 10 g 定容至 50 mL 的情况下, 方法检出限(按 $S/N=3$ 计算)分别为 0.4、0.4、0.4、

0.2 mg/kg, 方法定量限(按 $S/N=10$ 计算)分别为 1.0、1.2、1.1、0.6 mg/kg。

表 2 4 种色素的线性方程与相关系数($n=7$)
Table 2 Linear equations and correlation coefficients of 4 kinds of pigment ($n=7$)

	线性范围 /(μ g/mL)	回归方程	相关系数 r^2
柠檬黄	1.00~100	$Y=3471.52X+482.82$	0.9993
胭脂红	1.00~100	$Y=3124.09X+533.62$	0.9996
日落黄	1.00~100	$Y=3718.15X-265.16$	0.9995
亮蓝	1.00~100	$Y=4122.60X+174.25$	0.9997

3.4 加标回收率实验

称取不含柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝的 31 号样品约 10 g, 共 9 份, 分别加不同浓度的混合标准工作溶液, 加入的混合标准溶液的量分别相当于线性范围的低限、中间值和高限。按 2.4 项的方法制备加标回收率实验溶液, 按 2.2 项色谱条件测定柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝的含量, 计算回收率, 结果见表 3。柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝平均回收率为 88.7%、88.1%、87.4%、89.5%, 回收率较好, RSD 为 1.9%~2.1%。

表 3 回收率实验结果($n=3$)
Table 3 Results of recoveries ($n=3$)

加入标准物质的 浓度/(μ g/mL)	柠檬黄回 收率/%	胭脂红回 收率/%	日落黄回 收率/%	亮蓝回收 率/%
2.00	85.7	88.5	84.9	87.7
2.00	89.2	86.1	86.4	86.9
2.00	86.3	85.9	85.2	88.3
50.0	88.6	88.7	89.3	91.4
50.0	88.1	91.1	87.3	88.9
50.0	89.5	87.8	87.9	89.5
100	90.3	87.2	90.0	88.7
100	89.7	89.6	88.5	92.3
100	91.2	88.1	87.1	91.7
平均	88.7	88.1	87.4	89.5
RSD/%	2.0	1.9	2.0	2.1

3.5 样品测定

取 31 批米豆腐样品, 照上述样品溶液制备方法和色谱条件, 测定样品中柠檬黄、胭脂红、日落黄、亮蓝的含量。结果 21 批样品未检出, 有 2 批样品同时检出柠檬黄和亮蓝, 2 批样品同时检出柠檬黄和胭脂红, 1 批样品同时检出日落黄和亮蓝, 3 批样品检出柠檬黄, 2 批样品检出日落黄。

4 结 论

从市场购买的31批米豆腐样品,10批检出人工色素,阳性率达到32%,其中7批检出柠檬黄,超过20%,可见确实有必要建立完善的质量标准,控制米豆腐的质量安全。本研究建立氨碱性水提法提取米豆腐样品中人工色素,优化高效液相色谱条件,前处理简单、快速,定量准确,灵敏度高,可用于检测米豆腐中人工色素的含量,控制产品质量。

参考文献

- [1] 周伟娥,凌云,张元,等.食品中合成色素的前处理与检测分析方法研究进展[J].中国食品添加剂,2015,2(9):150-156.
Zhou WE, Ling Y, Zhang Y, *et al.* Research progress on pretreatment and detecting of synthetic pigments in food [J]. China Food Addit, 2015, 2(9): 150-156.
- [2] 谢君红,冯辉,付晓陆.固相萃取-高效液相色谱法多波长测定食品中的9种合成着色剂[J].食品安全导刊,2013,7(5):29-30.
Xie JH, Feng H, Fu XL. Determination of 9 kinds of colorants in food by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. China Food Saf Magazine, 2013, 7(5): 29-30.
- [3] 玉萍.食品中合成色素的应用及其检测技术研究进展[J].农产品质量与安全,2013,11(5):44-47.
Zhang YP. Research progress in the application of synthetic pigment in food and its detection technology [J]. Qual Saf Agro-products, 2013, 11(5): 44-47.
- [4] 郭光美.紫外分光光度法同时测定食品中多组分人工合成色素[J].食品科技,2014,40(9):324-327.
Guo GM. Simultaneous determination of synthetic pigments in food by ultraviolet spectrophotometry [J]. Food Sci Technol, 2014, 40(9): 324-327.
- [5] 王丽芳,丁晓静,解娜,等.毛细管电泳法测定糖果及调制酒中10种人工合成色素[J].食品科学,2014,35(14):145-150.
Wang LF, Ding XJ, Xie N, *et al.* Simultaneous determination of 10 synthetic food colorants in alcoholic beverages and candies by capillary electrophoresis [J]. Food Sci, 2014, 35(14): 145-150.
- [6] 严浩英,张军,李树华,等.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):193-194.
Yan HY, Zhang J, Li SH, *et al.* Thin layer chromatography scanning analysis for five kinds coloring agents of food [J]. Mod Prev Med, 1997, 24(2): 193-194.
- [7] 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.
Song X, Ji SL, Yang L, *et al.* Application of oscillopolarography in synthetic food colorants determination [J]. Cnin J Food Hyg, 2009, 21(5): 422-423.
- [8] 王宏伟,于同月,李莎莎,等.高效液相色谱法测定食品中的日落黄和柠檬黄[J].中国食品添加剂,2013,24(6):190-194.
Wang HW, Yu TY, Li SS, *et al.* Determination of sunset yellow and tartrazine in food by high performance liquid chromatography [J]. China Food Addit, 2013, 24(6): 190-194.
- [9] 黄方取,杨朝琳,严继东.固相萃取-高效液相色谱法测定肉制品中8种人工合成色素[J].中国卫生检验杂志,2016,26(6):800-802.
Huang FQ, Yang ZL, Yan JD. Determination of 8 synthetic pigments in meat product by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(6): 800-802.
- [10] 马雪丰.高效液相色谱法对膨化食品中合成色素的测定[J].中国食品添加剂,2015,(6):184-187.
Ma XF. Determination of synthesized pigments in puffed food by high-performance liquid chromatography [J]. China Food Addit, 2015, (6): 184-187.
- [11] Liang J, Li D, Wang MD, *et al.* Application of orthogonal design to the extraction and HPLC analysis of sedimentary pigments from lakes of the Tibetan Plateau [J]. Sci China (Earth Sci), 2016, 21(6): 1195-1205.
- [12] Katerina S, Miniolia, Christina F, *et al.* Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector [J]. Anal Chim Acta, 2007, 583(1): 103-110.
- [13] 杨熙,吴慧勤,黄芳,等.高效液相色谱串联质谱法同时测定粉条中6种人工合成色素[J].分析实验室,2015,34(6):672-676.
Yang X, Wu HF, Huang F, *et al.* Simultaneous determination of 6 synthetic pigments in vermicelli by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(6): 672-676.
- [14] 郑新华,王乐,韩焕美,等.液相色谱串联质谱法检测食品中4种人工合成着色剂[J].食品安全质量检测学报,2016,7(4):1412-1418.
Zhen XH, Wang L, Han HM, *et al.* Determination of 4 kinds of synthetic colorants in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(4): 1412-1418.
- [15] 徐昱婷,张学博,苏静,等.超高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定中药材(饮片)中非法添加6种水溶性红色素通用方法的研究[J].世界科学技术(中医现代化),2016,18(5):911-918.
Xu YT, Zhang XB, Su J, *et al.* General approaches to determining six water-soluble red pigments illegally added in crude drug (prepare slices) by UPLC-ESI-MS/MS [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2016, 18(5): 911-918.
- [16] 栗有志,刘俊,李艳美,等.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定枸杞中9种红色合成色素[J].分析科学学报,2016,32(6):846-850.
Su YZ, Liu J, Li YM, *et al.* Determination of 9 kinds of red synthetic pigments in chinese wolfberry by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2016, 32(6): 846-850.
- [17] GB/T 5009.35-2016 食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定[S].
GB/T 5009.35-2016 National food safety standard-Determination of synthetic colorant in foods [S].

(责任编辑:韩晓红)

作者简介



雷德卿,硕士,副主任药师,主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。
E-mail: 53829816@qq.com