

# 固相萃取-高效液相色谱法测定食品基质中 5 种不同合成红色着色剂

曾楚莹\*, 王 露, 黎秀娟

(深圳市盐田区疾病预防控制中心, 深圳 518081)

**摘 要: 目的** 建立一种固相萃取-高效液相色谱法(solid phase extraction-high performance liquid chromatography, SPE-HPLC)测定食品中 5 种人工合成红色着色剂(新红、苋菜红、胭脂红、诱惑红、赤藓红)的方法。**方法** 比较 ProElut PWA-2, Cleanert PWAX 和 Sep-Pak Plus QMA 3 种不同 SPE 小柱的净化效果, 比较 Eclipse XDB C<sub>18</sub>、Venusil XBP C<sub>18</sub> 及 Agilent TC-C<sub>18</sub> 3 种色谱柱对 5 种着色剂的分离情况, 按照 GB 5009.35-2016 《食品中合成着色剂的测定》对食品中 5 种着色剂进行测定。**结果** ProElut PWA-2 SPE 固相萃取小柱进行样品净化效果最优, Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱在 10 min 内有较好的分离度。加标浓度为 0.5~50 mg/kg 时, 该方法回收率为 90.3%~103.9%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值为 1.18%~7.11%。**结论** 该方法快速、准确, 适用于不同食品基质中 5 种合成着色剂定性、定量测定。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱法; 食品; 红色合成着色剂

## Determination of 5 kinds of different synthetic red colorants in food substrates by solid phase extraction-high performance liquid chromatography

ZENG Chu-Ying\*, WANG Lu, LI Xiu-Juan

(Shenzhen Yantian District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518081, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 5 kinds of synthetic red colorants (new red, amaranth, carmine, temptation red and erythromycin) in food substrates by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Methods** The purification effects of three different SPE cartridges (ProElut PWA-2, Cleanert PWAX and Sep-Pak Plus QMA) were compared, and the separation of 5 colorants by Eclipse XDB C<sub>18</sub>, Venusil XBP C<sub>18</sub> and Agilent TC-C<sub>18</sub> columns were compared. Five kinds of colorants in food were detected according to GB 5009.35-2016 *Determination of synthetic colorants in food*. **Results** The ProElut PWA-2 SPE solid phase extraction cartridge provided the best sample purification. The Agilent TC-C<sub>18</sub> column had good resolution in 10 min. When the concentrations were 0.5-50 mg/kg, the recovery rates of the method were 90.3%-103.9%, and the relative standard deviations (RSDs) were 1.18%-7.11%. **Conclusion** This method is rapid and accurate, which is suitable for qualitative and quantitative determination of 5 kinds of synthetic colorants in different food matrices.

**KEY WORDS:** solid phase extraction; high performance liquid chromatography; food; synthetic red colorant

\*通讯作者: 曾楚莹, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品卫生与检验。E-mail: zengchuying123@sina.com

\*Corresponding author: ZENG Chu-Ying, Master, Technician, Yantian District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518081, China. E-mail: zengchuying123@sina.com

## 1 引言

食品着色剂是食品中经常使用的食品添加剂,主要是使食品具有悦人的色泽,即人们经常说的“卖相”,促进食欲,从而进一步提高市场价值。目前,红色作为诱人的颜色已被广泛使用,市场上用得较多的红色着色剂主要是人工合成着色剂,其以苯胺染料为原料通过化学合成制得,具有价格低廉、种类繁多、上色容易、色泽鲜亮诱人等特点<sup>[1]</sup>。然而过量摄入人工合成着色剂可能对人体导致慢性毒性,长期过量摄入则可能诱发中毒、过敏症状,严重的情况会有致癌、致畸、致突变等风险<sup>[2]</sup>。食品安全国家标准 GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》中明确规定了合成红色着色剂作为食品添加剂的最大使用限量。

人工合成着色剂的常用检测方法有 GB5009.35、GB/T 21916 和 SN/T 1743 等检测方法,传统的检测方法存在前处理复杂、耗时,反复洗涤、转移定容造成目标物回收率低<sup>[3]</sup>,极大影响了分析检测的准确度,SPE-HPLC 法也有前处理步骤繁琐,需要复杂的吸附-解析或液-液萃取等步骤,常有不同品牌,SPE 柱基质回收差异造成结果不准确、重现性不好等问题<sup>[4]</sup>。本研究针对 5 种不同合成红色着色剂,建立了一种固相萃取-高效液相色谱法(solid phase extraction-high performance liquid chromatography, SPE-HPLC)测定食品基质中 5 种不同合成红色着色剂,以期对相关工作人员的日常检测工作提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

5 种人工合成色素标准品:新红(90.5%)、苋菜红(92.5%)、胭脂红(90.5%)、诱惑红(87.2%)、赤藓红(91.5%)(上海安谱公司)。

甲醇、乙腈、乙醇、甲酸(色谱纯,德国 Merck);乙酸铵、氨水、柠檬酸(分析纯,国药试剂有限公司)。

SPE 固相萃取萃取小柱:Cleanert PWAX-SPE (150 mg/6 mL,北京博纳艾杰尔公司);Sep-Pak Plus QMA(360 mg,美国沃特世公司);ProElut PWA-2(150 mg/6 mL,北京迪马科技公司)。

酒、蜜饯、冰淇淋均购于深圳某大型超市。

### 2.2 仪器设备

Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国戴安公司);DC150 自动氮吹浓缩仪(杭州佑宁公司);TD5A-WS 台式低速离心机(湘仪公司);CPA224S 电子天平(德国赛多利斯公司);LHY-2A 水浴恒温振荡器(江苏金坛大中仪器)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 净化前处理方法

称取 2.00 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 无水乙

醇-氨水溶液-水混合溶液(7:2:1, V:V:V),涡旋振荡 1 min,在 80 °C 水浴中继续超声 10 min,最后在 8000 r/min 离心 5 min,按照上述步骤重复提取样品至少 3 次,直至溶液样品无色,合并上清液,用 20%柠檬酸水溶液调节 pH 至 6 左右。

#### 2.3.2 液相色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>(150 mm\*4.6 mm, 5 μm);柱温:30 °C;流速:1 mL/min;波长:510 nm;流动相:A:0.02 mol/L 乙酸铵溶液,B:甲醇,梯度洗脱条件如表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| Table 1 Gradient elution conditions for liquid chromatography |      |     |
|---------------------------------------------------------------|------|-----|
| 时间/min                                                        | A/%  | B/% |
| 0.00                                                          | 90   | 10  |
| 4.00                                                          | 60   | 40  |
| 7.00                                                          | 20   | 80  |
| 10.00                                                         | 20   | 80  |
| 10.50                                                         | 90   | 10  |
| 10.80                                                         | 停止运行 |     |

#### 2.3.3 检测方法

按照 GB 5009.35-2016《食品中合成着色剂的测定》<sup>[5]</sup>执行,数据分析、标准曲线及方差分析由液相色谱仪自带的软件自动分析所得。

## 3 结果与分析

### 3.1 液相色谱条件的优化及选择

不同厂家 C<sub>18</sub> 色谱柱制造工艺略有不同,其填料、极性、固定相及对于酸碱的耐受程度可能略有差异,测定 5 种人工合成红色着色剂性质相近,想要获得较好的分离度对色谱柱的要求较高。在仪器、流动相、柱温、进样量、梯度洗脱等条件相同的情况下,同为 4.6 mm×250 mm, 5 μm 规格的 Eclipse XDB C<sub>18</sub>、Venusil XBP C<sub>18</sub> 及 Agilent TC-C<sub>18</sub> 3 种色谱柱对 5 种着色剂分离情况进行研究。

5 种红色着色剂在 Eclipse XDB C<sub>18</sub> 上出峰时间较为集中(8~16 min),但赤藓红在色谱柱上有残留,峰型略微拖尾<sup>[6,7]</sup>,在大批量走样时易出现污染下个样品的情况;Venusil XBP C<sub>18</sub> 对赤藓红的结合度较低,适用于除赤藓红外的着色剂分离使用;Agilent TC-C<sub>18</sub> 在 10 min 内将目标峰全部洗脱出来,峰型和分离度都较好,峰展宽适中(见图 1),另外 Agilent TC-C<sub>18</sub> 柱效高,结果再现性好,分析速度较快,价格相对较为其他色谱柱便宜在行业内使用较多。

### 3.2 不同 SPE 小柱对回收率的影响

本研究比较了 3 种品牌固相萃取小柱净化处理效果,分别是 ProElut PWA-2, Cleanert PWAX 和 Sep-Pak Plus QMA。在空白样品(基质为红酒,不含着色剂)中加入

10 mg/kg 的 5 种红色着色剂标准品, 分别测定 3 种 SPE 小柱净化处理后的样品回收率情况, 结果见表 2。由表 2 可看出, PWAX 小柱对 5 种红色着色剂的回收率相较于其他 2 种小柱略低, 可能是其制作工艺上固定相较为松散, 不能对色素充分保留<sup>[8]</sup>; QMA 小柱对样品基质纯度要求较高, 对 pH 要求也较为严格, 从而导致前处理时间效率较低, 适用红酒、果冻等简单基质的样品, 复杂样品可能会出现假阳性<sup>[9]</sup>; 而 PWA-2 小柱在回收率和重复性均较好, 基质选择范围更广泛, 除杂净化效果也好<sup>[10]</sup>, 且价格与前 2 种基本相同。

3.3 线性回归和检出限

按照 GB 5009.35-2016《食品中合成着色剂的测定》要求, 折算色素对照品纯度后用水配制成 0.20、0.50、1.00、5.00、10.00、15.00、25.00、50.00 μg/mL 的 8 个系列浓度标准曲线, 绘制以峰面积为纵坐标 Y、5 种人工合成着色剂

的含量(μg/mL)为横坐标 X, 进行线性回归分析<sup>[11]</sup>, 回归方程如表 3, 结果显示, 采用 2.3.2 的色谱条件, 5 种人工合成着色剂在 0.20~50.00 μg/mL 范围内具有良好的线性关系, 以基线 3 倍噪音(S/N = 3)考察了 5 种人工合成着色剂的检出限, 检出限亦可满足检测要求<sup>[12]</sup>。

表 2 不同品牌 SPE 柱回收率情况比较(n=6)

Table 2 Comparison of recovery rates of SPE columns of different brands (n=6)

| 着色剂种类 | SPE 小柱品牌   |            |            |
|-------|------------|------------|------------|
|       | PWAX/%     | QMA/%      | PWA-2/%    |
| 新红    | 86.1~90.3  | 84.5~91.7  | 88.4~96.5  |
| 苋菜红   | 89.6~92.1  | 92.4~98.5  | 95.7~102.3 |
| 胭脂红   | 84.7~103.6 | 93.7~102.8 | 92.1~97.4  |
| 诱惑红   | 93.8~102.7 | 95.5~104.7 | 96.6~103.9 |
| 赤藓红   | 72.9~88.4  | 85.3~92.2  | 90.3~98.1  |

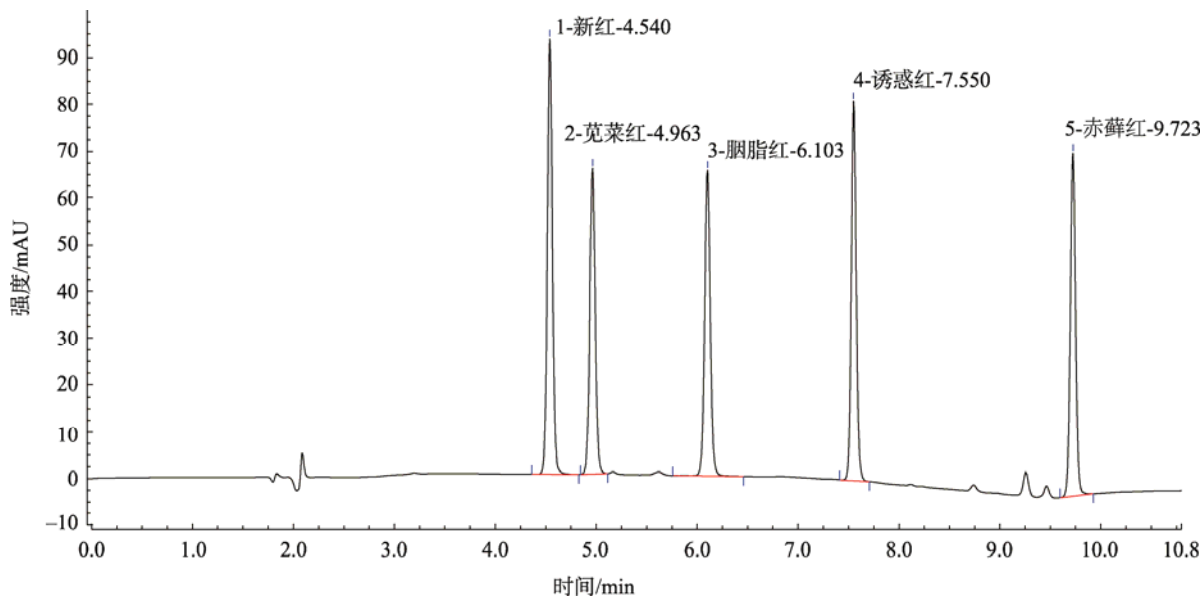


图 1 5 种红色合成着色剂在 Agilent TC-C<sub>18</sub> 分离情况  
Fig.1 Separation of 5 kinds of synthetic red colorants in Agilent TC-C<sub>18</sub>

表 3 5 种着色剂线性回归分析标准曲线及检出限

Table 3 Standard curves and detection limits for linear regression analysis of 5 kinds of colorants

| 着色剂种类 | 线性拟合方程                                     | 相关系数 $r^2$ | 检出限/(mg/kg) |
|-------|--------------------------------------------|------------|-------------|
| 新红    | $Y=2.321196\times10^4X+6.873521\times10^3$ | 0.9999     | 0.50        |
| 苋菜红   | $Y=3.570212\times10^4X+5.754201\times10^3$ | 0.9999     | 0.50        |
| 胭脂红   | $Y=4.222367\times10^4X-3.341636\times10^3$ | 0.9999     | 0.50        |
| 诱惑红   | $Y=2.116235\times10^4X+3.290734\times10^2$ | 0.9998     | 0.50        |
| 赤藓红   | $Y=1.983671\times10^4X-3.956791\times10^2$ | 0.9997     | 0.50        |

3.4 回收率和重复性

按照 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》附录 F 要求,选择相同基质的空白样品进行 3 个不同浓度范围的加标实验<sup>[13]</sup>,采用 PWA-2 小柱对样品进行前处理,上机测定,重复 6 次,经计算得出不同加标回收率和重复性,如表 4 所示。加标浓度为 0.5~50 mg/kg 时,该方法回收率为 90.3%~103.9%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值为 1.18%~7.11%,都能满足标准方法学要求<sup>[14]</sup>。

表 4 5 种着色剂的回收率结果(n=6)  
Table 4 Recovery results of 5 kinds of colorants (n=6)

| 着色剂<br>种类 | 加标浓度/(mg/kg) |       |           |       |           |       |
|-----------|--------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
|           | 0.5          |       | 25        |       | 50        |       |
|           | 回收率<br>/%    | RSD/% | 回收率<br>/% | RSD/% | 回收率<br>/% | RSD/% |
| 新红        | 91.2         | 6.23  | 95.3      | 3.21  | 96.5      | 2.56  |
| 苋菜红       | 90.6         | 7.11  | 96.3      | 2.64  | 102.3     | 2.27  |
| 胭脂红       | 92.4         | 5.45  | 97.5      | 3.07  | 97.4      | 1.18  |
| 诱惑红       | 96.6         | 6.89  | 101.1     | 4.11  | 103.9     | 3.02  |
| 赤藓红       | 90.3         | 6.47  | 98.4      | 3.36  | 98.1      | 2.78  |

3.5 样品检测情况

在市场上采购配制酒、蜜饯、冰淇淋等不同基质成分的样品,采用本实验确定的条件进行样品检测,检测其中的人工合成红色着色剂添加情况。结果如表 5 所示。结果发现,在所采购的配制酒、蜜饯、冰淇淋等样品中,不同种类的红色人工着色剂偶有检出,在某蜜饯中还出现了检测结果超出标准 GB 2760-2014<sup>[15]</sup>中规定的最大使用限量值的情况。

4 结 论

本实验建立了一种简便、高效的 5 种人工合成红色着色剂检测方法,并对色谱柱及 SPE 固相萃取小柱进行了比较研究。按照 GB 5009.35-2016《食品中合成着色剂的测定》进行检测,选择 ProElut PWA-2 150 mg/6 mL SPE 固相萃取小柱进行样品净化处理,使用该方法时,5 种人工合成红色着色剂实现在 10 min 内有较好的分离度,定性、定量结果可靠,不仅满足基层企业实验室应用,也能在第三方实验室加以推广。

表 5 不同种类样品 5 种人工合成着色剂检测情况  
Table 5 Detection of 5 kinds of artificial colorants in different species of samples

| 样品名称       | 着色剂种类 | 检测结果/(mg/kg) | 标准限量/(mg/kg) |
|------------|-------|--------------|--------------|
| 某品牌<br>配制酒 | 新红    | 未检出          | 50           |
|            | 苋菜红   | 2.9          | 50           |
|            | 胭脂红   | 未检出          | 50           |
|            | 诱惑红   | 20.2         | 50           |
|            | 赤藓红   | 未检出          | 50           |
| 某品牌<br>蜜饯  | 新红    | 未检出          | 50           |
|            | 苋菜红   | 未检出          | 50           |
|            | 胭脂红   | 98.7         | 50           |
|            | 诱惑红   | 未检出          | 50           |
|            | 赤藓红   | 未检出          | 50           |
| 某品牌<br>冰淇淋 | 新红    | 未检出          | 25           |
|            | 苋菜红   | 6.4          | 25           |
|            | 胭脂红   | 未检出          | 25           |
|            | 诱惑红   | 未检出          | 25           |
|            | 赤藓红   | 未检出          | 25           |

参考文献

[1] 奚星林, 邵仕萍, 徐娟, 等. 固相萃取高效液相色谱法同时测定食品中 12 种合成色素[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(3): 217-222.  
Xi XL, Shao SP, Xu J, et al. Simultaneous determination of 12 synthetic colorants in foods with solid-phase extracted high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2012, 24(3): 217-222.

[2] 刘谦, 李熙, 吴新欣, 等. 高效液相色谱法同时测定复杂食品基质中 8 种合成色素的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2017, 53(6): 693-696.  
Liu Q, Li X, Wu XX, et al. Simultaneous determination of 8 kinds of synthetic complex food matrix by HPLC [J]. Phys Test Chem Anal B, 2017, 53(6): 693-696.

[3] 陈彦凤, 肖白曼, 孙彦芳, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定肉制品中合成着色剂的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 428-430.  
Chen YF, Xiao BM, Sun YF, et al. Determination of synthetic colorants in meat products by SPE-HPLC [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(5): 428-430.

[4] 赵延胜, 董英, 张峰, 等. 食品中 46 种禁用合成色素的分级提取净化体系研究[J]. 分析化学, 2012, 40(2): 249-256.  
Zhao YS, Dong Y, Zhang F, et al. A study on system of sequential extraction and cleaning of 46 forbidden and limited synthetic pigments in food stuff [J]. Chin Anal Chem, 2012, 40(2): 249-256.

[5] GB 5009.35—2016 食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定[S].  
GB 5009.35—2016 National food safety standard-Standard for determination of synthetic colouring agents in foods [S].

[6] Gottlieb A, Shaw C, Smith A, et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation [J]. J Biotechnol, 2003, 101(1): 49-56.

[7] Tingting Z, Pingli H, Amangul Y, et al. Determination of seven synthetic

- dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors [J]. Food Chem, 2012, 138(2013): 1742–1748.
- [8] 杨晓倩, 刘素华, 曹小丽. 固相萃取-超高效液相色谱法同时测定肉制品中 5 种合成着色剂[J]. 食品与药品, 2015, 17(4): 259–262.
- Yang XQ, Liu SH, Cao XL. Simultaneous analysis of five kinds of synthetic colorants in meat products by SPE-UPLC [J]. Food Drug, 2015, 17(4): 259–262.
- [9] 毕小玲, 宋娟, 庄晓洪, 等. 固相萃取-HPLC 法检测熟肉制品中合成色素[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 180–183.
- Bi XL, Song J, Zhuang XH, *et al.* Determination of synthetic pigments in cooked meat by solid phase extraction and HPLC [J]. Food Res Dev, 2017, 38(5): 180–183
- [10] 尤妍. 高效液相色谱测定雪糕中 6 种合成色素[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(12): 147–152.
- You Y. Determination of six synthetic pigments in ice cream by high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2017, 38(12): 147–152.
- [11] 李小平, 赵永纲, 陈晓红, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄酒中 7 种合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(12): 2566–2569.
- Li XP, Zhao YG, Chen XH, *et al.* Simultaneous analysis of 7 synthetic colorants in grape wine by solid-phase extraction coupled with reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(12): 2566–2569.
- [12] 黄志强, 王飞, 俞文妍, 等. 固相萃取-液相色谱法测定蜜饯中 7 种常见合成色素[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1941–1947.
- Huang ZQ, Wang F, Yu WY, *et al.* Determination of 7 kinds of synthetic pigments in preserved fruits by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1941–1947.
- [13] 尤妍. 高效液相色谱测定雪糕中 6 种合成色素[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(12): 147–152.
- You Y. Determination of six synthetic pigments in ice cream by high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2017, 38(12): 147–152.
- [14] 蒋树新, 刘华良, 马永建, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱检测饮料中 5 种食用合成色素[J]. 分析测试学报, 2016, 35(12): 1581–1585.
- Jiang SX, Liu HL, Ma YJ, *et al.* Determination of 5 edible synthetic pigments in drinks by online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2016, 35(12): 1581–1585.
- [15] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
- GB 2760-2014 National food safety standards-Standards for the use of food additives [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

## 作者简介

曾楚莹, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品卫生与检验。

E-mail: zengchuying123@sina.com