

# 高效液相色谱-二极管阵列检测食用绿色素中 叶绿素铜钠含量

吴芳华\*

(福州市产品质量检验所, 福州 350009)

**摘要: 目的** 建立高效液相色谱-二极管阵列检测食用绿色素中叶绿素铜钠含量的方法。**方法** 样品经超声处理后, 以 0.5%(V/V)乙酸溶液/甲醇/丙酮为流动相, 经 Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> 色谱柱进行梯度淋洗, 并于 405 nm 处进行定量检测。**结果** 在 1~200 μg/mL 线性范围内, 线性方程为  $Y=5.7834X-2.3787$ , 相关系数  $r^2=0.99938$ , 方法检出限为 0.21 mg/kg, 相对标准偏差为 1.4%。对 7 份食用绿色素样品进行检测, 均未发现叶绿素铜钠成分。**结论** 此方法实现了对食用绿色素中叶绿素铜钠含量的定性和定量分析, 与传统紫外分光光度检测法相比, 灵敏度和准确性有效提高。

**关键词:** 高效液相色谱-二极管阵列; 食用绿色素; 叶绿素铜钠

## Determination of sodium copper chlorophyllin in edible green pigments by high performance liquid chromatography-diode array

WU Fang-Hua\*

(Fuzhou Product Quality Inspection, Fuzhou 350009, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of sodium copper chlorophyllin in edible green pigments by high performance liquid chromatography-diode array. **Methods** After ultrasonic treatment, the samples were eluted by acetic acid solution(0.5%, V/V)/methanol/acetone, and then separated by Agilent TC-C<sub>18</sub> silica gel column. Quantitative detection was carried out at wavelength of 405 nm. **Results** The linear correlation was good in the concentration range of 1–200 μg/mL( $r^2=0.9998$ ). The limit of detection was 0.21 mg/kg and the relative standard deviation was 1.4%. No sodium copper chlorophyllin was found in 7 edible green pigments samples. **Conclusion** This method realized the qualitative and quantitative analysis of sodium copper chlorophyllin in edible green pigments. Compared with the traditional ultraviolet spectrophotometry, the sensitivity and accuracy is improved effectively.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-diode array; edible green pigment, sodium copper chlorophyllin

基金项目: 福建省质量技术监督局科技项目(FJQI2018043)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Fujian Quality and Technology Supervision (FJQI2018043)

\*通讯作者: 吴芳华, 工程师, 主要研究方向为液相色谱在食品安全检测方面的应用。E-mail: sophia1249@163.com

\*Corresponding author: WU Fang-Hua, Engineer, Fuzhou Institute of Product Quality Inspection, No. 372, Lubin Road, Jinshan District, Fuzhou 350009, China. E-mail: sophia1249@163.com

## 1 引言

现代食品工业中,为使加工食品保持鲜艳的色泽以增进消费者食欲,常于加工过程中添加着色剂(简称色素)<sup>[1,2]</sup>。市售加工食品中着色剂主要分为天然色素和人工合成色素 2 大类<sup>[3,4]</sup>。GB 2760-2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》<sup>[5]</sup>中规定,天然色素如红曲红等,通常可按生产需要量添加,而对赤藓红、胭脂红等合成着色剂则有严格的使用范围和允许添加量。叶绿素铜及其钠盐是 GB 2760-2014 中唯一允许添加于食品中的绿色素,同时由于其具有消炎、抗肿瘤等功效而在医药和保健食品领域具有潜在的应用前景<sup>[6,7]</sup>。

天然叶绿素主要由叶绿素 a 和叶绿素 b 组成,均具有卟吩结构,遇光、热、酸、碱等易分解。经提取、皂化、铜化、成盐等工艺,能够被修饰成为稳定的金属卟吩结构。然而由于提取加工过程易产生副产物,因此目标产物叶绿素铜钠是以金属卟吩结构为中心的一类复杂金属螯合物,与天然叶绿素类似,其中心为铜原子与卟吩环按 1:1 形成的稳定化合物,具体如图 1 所示<sup>[8]</sup>。

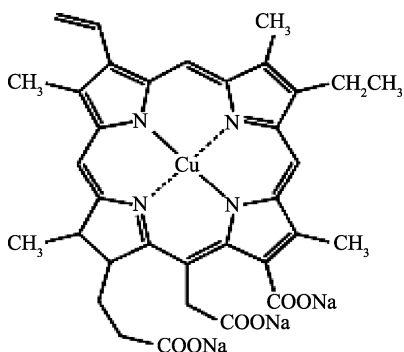


图 1 叶绿素铜钠结构式

Fig.1 Chemical structure of sodium copper chlorophyllin

根据 GB 26406-2011《食品安全国家标准 食品添加剂叶绿素铜钠盐》<sup>[9]</sup>,可应用于食品添加剂领域的叶绿素铜钠盐,主要有铜叶绿酸三钠和铜叶绿酸二钠 2 种。GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定,叶绿素铜及其钠盐可用于冷冻食品、饮料、糖果、配制酒等 10 类食品中,除在果蔬汁(浆)类饮料中可按生产需要量添加外,其它食品中最大使用量均为 0.5 g/kg。同时,柠檬黄、日落黄及亮蓝等合成着色剂经调配可使加工食品呈绿色,然其在上述 10 类食品中最大允许使用量仅为 0.025-0.100 g/kg,与叶绿素铜钠相比大幅下降。

目前,对食品中着色剂的检测方法包含紫外分光光度法<sup>[10]</sup>、液相色谱法<sup>[11]</sup>、液质联用法<sup>[12]</sup>、以及酶联免疫吸附法<sup>[13]</sup>。GB 5009.260-2016《食品安全国家标准 食品中叶绿素铜钠的测定》<sup>[14]</sup>中规定使用分光光度计在 405 nm 处

对食品样液中叶绿素铜钠进行测定,其方法检出限为 0.001 g/kg。本文采用高效液相色谱-二极管阵列检测器对食品中叶绿素铜钠进行分离检测,有效避免了复杂食品中其它杂质组分的干扰,同时通过实时光谱分析对目标物的定性和定量分析,可以为食用绿色素中叶绿素铜钠含量的准确检测提供依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪带二极管阵列检测器、Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 保护柱(4.6 mm×12.5 mm, 5 μm)(美国 Agilent Technologies 公司);明澈-D 24UV 超纯水系统(美国 Millipore 公司);KQ-500E 超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司);AL204 电子天平(美国 METTLER TOLEDO 公司);Genius 3 点动式涡旋仪(德国 IKA 公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);WondaSep WAX 60 mg/3 mL 固相萃取小柱(日本 SGLC 公司)。

叶绿素铜钠标准品(99.5%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲醇(色谱纯)、丙酮(色谱纯)、乙酸(分析纯)、甲酸(分析纯)、氨水(分析纯)、无水乙醇(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

食用叶绿素(样品 a,恒锐食品生物科技);食用叶绿素(样品 b,同发生物科技);食用叶绿素(样品 c,山东祥瑞原料商城);惠尔顿叶绿素可食用色素(样品 d,美国 Wilton industries 公司);展艺食用色素天然果蔬菠菜粉(样品 e,江苏萃谷食品有限公司);克拉农场大麦苗粉(样品 f,江苏振亚生物科技有限公司);抹茶粉(样品 g,浙江茗皇天然食品开发股份有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

准确称取 20 mg(精确到 0.01 mg)叶绿素铜钠标准品,加超纯水超声波振荡 5 min,溶解后定容至 100 mL,配制成 200 μg/mL 的标准储备溶液。临时用,准确移取 0.05、0.30、0.60、1.50、3.00 mL 标准储备液,用超纯水定容至 10 mL,得到浓度分别为 1.0、6.0、12.0、30.0、60.0 μg/mL 的标准使用溶液。

#### 2.2.2 色谱分析条件

Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> 色谱分析柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.5%(V/V)乙酸溶液/甲醇/丙酮按表 1 执行梯度淋洗程序;流速:1.0 mL/min;柱温:35 °C;进样量:20 μL;二极管阵列检测器:检测波长 405 nm,梯度洗脱程序见表 1。

#### 2.2.3 样品前处理

准确称取 3 g 样品(精确到 0.01 g),纯水溶解,定容于 25 mL 容量瓶,超声提取 5 min,将固相萃取小柱连接于玻

璃注射器下方, 吸取全部样液注入玻璃注射器, 调节真空泵使样液以 1~3 mL/min 稳定下滴。待样液滴尽, 依次用水和甲醇-甲酸混合溶液(6:4, V/V)洗涤 3 次, 再用水洗至中性后, 用乙醇-氨水-水(7:2:1, V/V)混合溶液解吸, 直至色素完全解吸, 氮气吹至近干, 加水涡旋溶解定容至 5 mL, 取上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤后待测。

表 1 流动相梯度淋洗程序  
Table 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间/min	0.5%乙酸/ //ss/(%)	甲醇/%	丙酮/%
0	15	75	10
12	0	50	50
16	0	50	50
22	15	75	10

### 3 结果与分析

#### 3.1 色谱条件选择

石志红等<sup>[15]</sup>研究了四苯基金属螯合物在  $\text{C}_{18}$  硅胶柱上的保留情况。祁超<sup>[16]</sup>进一步论述了流动相离子浓度、有机相成分、pH 值、柱温等条件对金属卟啉螯合物在反相色谱柱上保留时间的影响。本文综合考虑, 选择甲醇-丙酮体系作为流动相, 同时利用 0.5%(V/V)乙酸溶液调节流动相离子浓度及 pH 值, 经摸索调整, 最终确定了梯度淋洗程序,

程序见表 1。

由于叶绿素铜钠是由经植物提取的天然叶绿素与氯化铜反应制得, 而天然叶绿素成分复杂且反应进行不彻底, 形成最多可达 10 余种叶绿素类衍生物, 因此叶绿素铜钠标准物质经色谱柱分离后出现一系列特征峰。如图 2 所示, 在本研究选取的色谱条件下, 叶绿素铜钠标准物质分别在 7.78、7.90、9.28、9.96、10.64、11.66 min 处出峰(图中峰 a~f), 特征峰区分度明显。

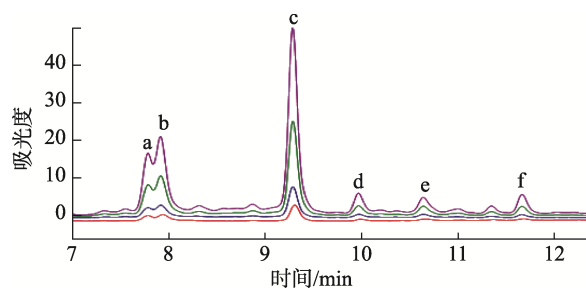


图 2 叶绿素铜钠系列标液色谱图

Fig.2 Chromatogram of series standard solution

#### 3.2 光谱扫描定性

对上述 6 个色谱峰顶点于 300~800 nm 波段进行光谱扫描, 不同保留时间(retention time, RT)的色谱峰顶点光谱图如图 3 所示。

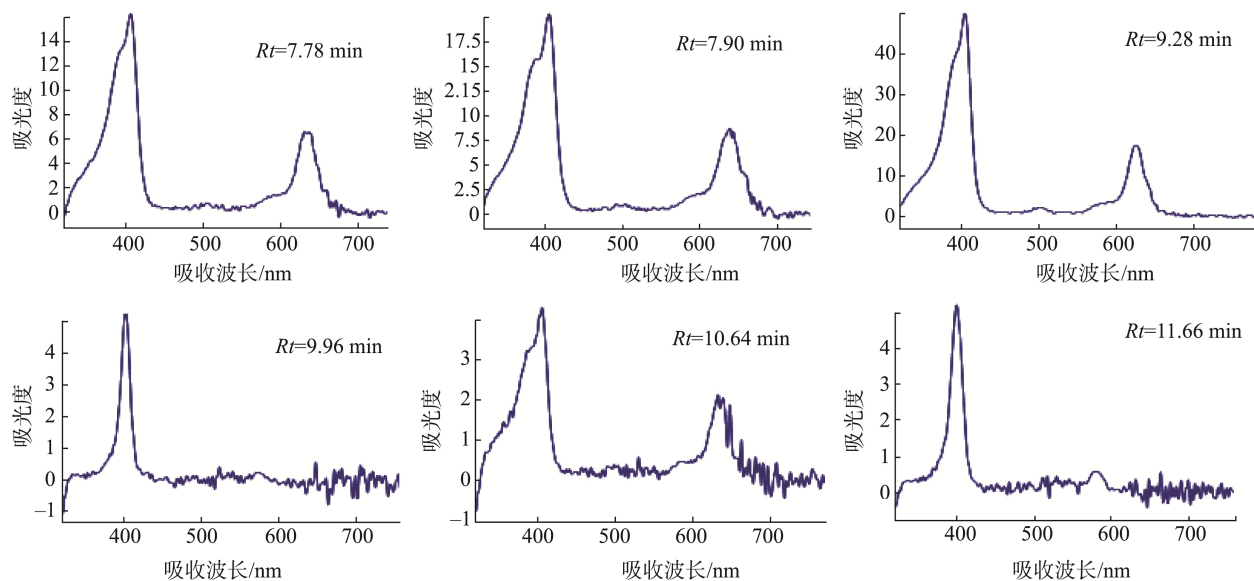


图 3 不同保留时间的色谱峰顶点光谱图

Fig.3 Spectrogram of top peaks with different retention time

从图 3 看出, 6 个色谱峰均在 400~435 nm 处有特征吸收, 部分色谱峰同时在 630 nm 处有特征吸收。卢东昱等<sup>[17]</sup>通过光学多通道分析器测定了叶绿素分子的吸收光谱特性, 郭莉等<sup>[18]</sup>利用叶绿素铜对纳米 TiO<sub>2</sub> 进行敏化, 并借助紫外-可见分光光度法进行分析, 发现其在 413 和 649 nm 处有明显吸收峰。结合文献推测, 此处 6 个特征峰均为以脱镁叶绿素及焦脱镁叶绿酸为主体结构的含铜化合物。为提高检测灵敏度, 本文选取峰型较好且相同浓度下峰面积最大的 9.28 min 处的色谱峰作为定量依据。

### 3.3 方法检出限和精密度实验

在 1~200 μg/mL 浓度范围内, 该特征峰面积与标准溶液浓度呈线性相关, 以标准溶液浓度为  $X$  轴, 峰面积为  $Y$  轴, 线性方程为  $Y=5.7834X-2.3787$ , 相关系数  $r^2=0.99938$ 。以样品 g 为本底, 分别吸取 0.2 mL 6 μg/mL、1 mL 6 μg/mL 及 1 mL 60 μg/mL 标准溶液形成 0.4、2、20 mg/kg 加标样。本底及不同浓度加标样色谱图详见图 4, 根据噪声及基线漂移情况, 得出方法检出限为 0.21 mg/kg。同时, 通过对系列标准溶液进行日间重复检测 ( $n=3$ ), 相对标准偏差为 1.4%, 方法精密度良好。

### 3.4 市售食用绿色素样品检测

本项目收集了市售 7 份食用绿色素, 含 4 种食用叶绿素(样品 a-d)、菠菜粉(e)、大麦苗粉(f)及抹茶粉(g)。按照 GB 5009.260 标准要求, 将样液 a~g 于 405 nm 处检测吸

光度, 均有吸收, 且吸光度与样液浓度呈线性相关, 随浓度上升而增加。

为进一步运用液相色谱吸附-解吸附效应及全波段光谱图进行定性判断, 故运用高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下对样液 a~g 进行检测, 叠加上色谱图如图 5, 均未发现叶绿素铜钠的特征色谱峰, 说明样液 a~g 中不存在叶绿素铜钠。

为检测这 7 种绿色素是否由人工合成柠檬黄、亮蓝合成着色剂调配而成, 本文参照 GB 5009.35-2016《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》<sup>[19]</sup>, 运用 C<sub>18</sub> 高效液相色谱柱, 在乙酸铵缓冲液和甲醇按一定比例梯度淋洗条件下, 于 254 nm 处进行检测, 色谱图如下。

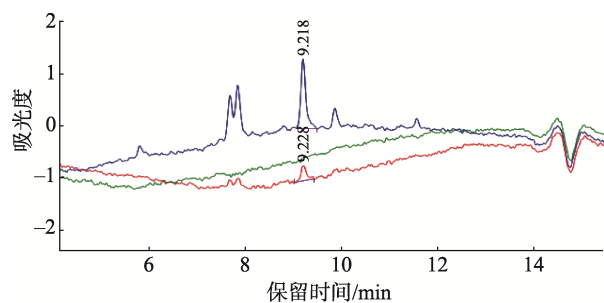


图 4 不同加标浓度的色谱图  
Fig.4 Spectrogram of background with different standard addition

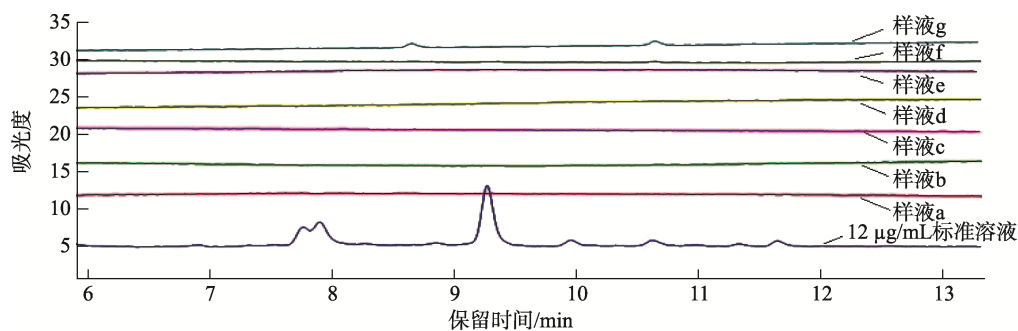


图 5 12 μg/mL 叶绿素铜钠标准溶液及食用绿色素样液色谱图  
Fig.5 Chromatogram of 12 μg/mL standard solution and edible green pigment samples

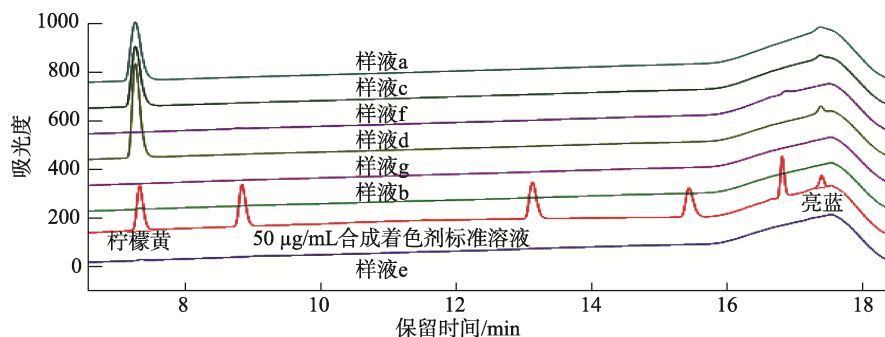


图 6 50 μg/mL 柠檬黄、亮蓝合成着色剂标准溶液与样液色谱图(参照 GB 5009.35 色谱条件)  
Fig.6 Chromatogram of 50 μg/mL lemon yellow and brilliant blue synthetic colorant standard solution and edible green pigments samples (following GB 5009.35)

从图6看出, 样品 a、c、d 是由柠檬黄与亮蓝调配而成, 样品 b、e 中含有少量柠檬黄, 而样品 f、g 未检出柠檬黄、亮蓝等合成着色剂。综上所述, 4 种食用绿色素、菠菜粉、大麦苗粉及抹茶粉 7 个样品均不含叶绿素铜钠, 其中部分是由合成着色剂调配。

#### 4 结论与讨论

本文建立了针对食用绿色素中叶绿素铜钠的高效液相色谱检测方法, 运用 Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> 色谱柱, 以 0.5%(V/V)乙酸溶液/甲醇/丙酮为流动相进行梯度淋洗, 同时利用二极管阵列检测器于 405 nm 处进行检测。结果表明, 在 1~200 μg/mL 范围内, 叶绿素铜钠特征峰面积与标准溶液浓度呈线性相关, 线性方程为  $Y=5.7834X-2.3787$ , 相关系数  $r^2=0.99938$ 。通过对不同浓度加标样进行检测, 得出方法检出限为 0.21 mg/kg, 与传统紫外分光光度法相比, 灵敏度与准确度显著提高, 为食品加工行业检测叶绿素铜钠提供依据。

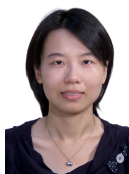
#### 参考文献

- [1] 陆雪华, 成坚, 白卫东. 我国食用色素工业的现状与对策[J]. 中国调味品, 2010, 35(5): 35-39.  
Lu XH, Cheng J, Bai WD. Present situation and countermeasures of the food pigment industry in our country [J]. China Cond, 2010, 35(5): 35-39.
- [2] 李东云. 浅谈食品着色剂的发展、使用和管理[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(9): 1255-1256.  
Li DY. Discussion on the development, use and management of food colorants [J]. Publ Med Forum Magaz, 2016, 20(9): 1255-1256.
- [3] 舒冠雄, 贾佳, 孙虎, 等. 天然色素的应用及发展[J]. 中国食品工业, 2017, (4): 64-66.  
Shu GX, Jia J, Sun H, et al. Application and development of natural pigment [J]. China Food Ind, 2017, (4): 64-66.
- [4] 张彦青, 李伟, 李亚茹, 等. 食用合成色素检测方法研究进展及其发展前景[J]. 山东化工, 2015, 44(11): 40-41.  
Zhang YQ, Li W, Li YR, et al. Research advances of detection methods and develop trends of synthetic edible pigments [J]. Shandong Chem Ind, 2015, 44(11): 40-41
- [5] 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 standard-Use standard of food additives [S].
- [6] 魏克民, 王守军, 浦锦宝, 等. 肝血宝(叶绿素铜钠盐)治疗白细胞减少症 985 例临床疗效分析[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(1): 64-65.  
Wei KM, Wang SJ, Pu JB, et al. The analysis of clinical effect of sodium copper chlorophyllin in the treatment of 985 cases of leukopenia [J]. Chin Tradit Med Sci Technol, 2009, 16(1): 64-65.
- [7] 王梦亮, 常如波, 刘滇生. 金属细菌叶绿素的合成及其对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 药理学, 2005, 40(10): 920-923.  
Wang ML, Chang RB, Liu DS. Synthesis and antitumour activity of metal complexes of bacteriochlorophyll [J]. Acta Pharma Sin, 2005, 40(10): 920-923.
- [8] 童晓滨, 谢好, 宋卫军. 雷竹叶绿素铜钠的制备及其光谱研究[J]. 化学工程师, 2008, (5): 21-23.  
Tong XB, Xie Y, Song WJ. Preparation of chlorophyll copper sodium from

- Lei bamboo leaves and spectral analysis [J]. Chem Eng, 2008, (5): 21-23.
- [9] GB 26406-2011 食品安全国家标准 食品添加剂 叶绿素铜钠盐[S].  
GB 26406-2011 National food safety standard-Food additives-Sodium copper chlorophyllin [S].
- [10] 司圣柱, 司娟. 小波变换-偏最小二乘法用于三种食用色素的可见分光光度法同时测定[J]. 分析仪器, 2007, (2): 48-51.  
Si SZ, Si W. Application of wavelet transform-partial least square method for simultaneous determination of three food pigments in mixed solution using spectrophotometry [J]. Anal Instrum, 2007, (2): 48-51.
- [11] 谭冬明. 糕点中常见食用合成色素的前处理方法优化及高效液相色谱分析[J]. 中国食品添加剂, 2016, (3): 156-162.  
Tan DM. Optimization of pretreatment method for the determination of common edible synthetic pigments in pastry by high performance liquid chromatography [J]. China Food Addit, 2016, (3): 156-162.
- [12] 王丽娟, 柯润辉, 安红梅, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定葡萄酒中甜味剂、防腐剂和色素[J]. 酿酒科技, 2019, (1): 120-125.  
Wang LJ, Ke RH, An HM, et al. Simultaneous determination of sweeteners, preservatives and pigments in grape wine by HPLC-MS/MS [J]. Liquor Mak Sci Technol, 2019, (1): 120-125.
- [13] 戚平, 刘佳, 毛新武, 等. 食品中色素检测的研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(11): 167-173.  
Qi P, Liu J, Mao XW, et al. Progresses on the detection of the food colours [J]. Food Mach, 2018, 34(11): 167-173.
- [14] GB 5009.260-2016 食品安全国家标准 食品中叶绿素铜钠的测定[S].  
GB 5009.260-2016 National food safety standard-Determination of sodium copper chlorophyllin in food [S].
- [15] 石志红, 王燕桓, 四苯基卟啉金属螯合物的反相高效液相保留行为研究[J]. 色谱, 2000, 18(1): 27-29.  
Shi ZH, Wang YH. Study on the retention behaviour of metal-tetraphenyl porphine chelates in reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2000, 18(1): 27-29.
- [16] 祁超. 四(4-三甲胺苯基)卟啉金属配合物的高效液相色谱分离与测定[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2002, 3(1): 17-20.  
Qi C. The separation and determination of metal complexes of TAPP with HPLC [J]. J Beihua Univ (Nat Sci), 2002, 3(1): 17-20.
- [17] 卢东昱, 崔新图, 黄镜荣, 等. 叶绿素吸收光谱的观测[J]. 大学物理, 2006, 25(1): 50-53.  
Lu DY, Chui XT, Huang JR, et al. Investigation on absorption spectrum of chlorophyll [J]. Coll Phys, 2006, 25(1): 50-53.
- [18] 郭莉, 王丹军, 付峰, 等. 叶绿素铜敏化二氧化钛光催化剂的合成及性能研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 819-823.  
Guo L, Wang DJ, Fu F, et al. Synthesis and properties of titanium dioxide catalyst sensitized by chlorophyll-copper [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 2010, 32(4): 819-823.
- [19] 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-Determination of synthetic colorants in food [S]

(责任编辑: 李磅礴)

#### 作者简介



吴芳华, 工程师, 主要研究方向为液相色谱在食品安全检测方面的应用。  
E-mail: sophia1249@163.com