

聚酰胺吸附法和超声提取法在合成着色剂分析中的应用对比

于 辉,张鹏飞,杜 娟,马 霖,邵 帅,万晓冬

(即墨区综合检验检测中心,山东 青岛 266200)

摘要: 分别采用聚酰胺吸附法和超声提取法对饮料中合成着色剂进行提取,高效液相色谱分析. 对比研究上述 2 种样品前处理方法在饮料中合成着色剂分析中的应用. 研究表明,2 种前处理方法的检测结果无显著差异,但在分析时间、操作复杂性、分析成本及杂质峰的影响等方面有显著差别.

关键词: 合成着色剂;高效液相色谱;聚酰胺吸附;超声提取

中图分类号: O657.3

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2018)02-0124-05

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2018.02.011

Comparative Study on Analysis of Synthetic Colorants by Polyamide Adsorption and Ultrasonic Extraction Methods

YU Hui, ZHANG Peng-fei, DU Juan, MA Lin, SHAO Shuai, WAN Xiao-dong

(Jimo Comprehensive Inspection and Testing Center, Qingdao 266200, Shandong China)

Abstract: In this work, sample pretreatment methods of polyamide adsorption method and ultrasonic extraction method were used for the extraction of synthetic colorants in beverages using high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis. The application of the above two sample pretreatment methods for the analysis of synthetic colorants in beverages was compared, and the results showed that there was no significant difference based on two different pretreatment methods, but there were significant differences in the analysis time, operation complexity, analysis costs and the influence of impurity peaks.

Key words: synthetic colorants; HPLC; polyamide adsorption; ultrasonic extraction

人工合成着色剂具有着色力强、色泽鲜艳、不易褪色、稳定性好、易溶解和成本低等特点,被广泛应用于食品的生产、加工过程中^[1-2]. 然而合成着色剂多以苯、甲苯和萘等化工产品为原料,经过磺化、硝化、卤化、偶氮化等一系列有机反应制成,使得食用色素化学结构多为偶氮化合物类,它们在体内代谢产生 β -萘胺和 α -氨基-1-萘酚等致癌物,过多食用存在一定的危害性^[3-4]. 此外,研究发现儿童过多摄入着色剂可能会引起异常行为^[5-6],如日落黄、喹啉

黄、偶氮玉红、诱惑红、柠檬黄、胭脂红等 6 种色素被认为可能与儿童多动症有关^[7]. 鉴于合成着色剂的有害性,国家制定了相关规定对各类食用色素的最大用量、使用范围作出说明. 因此对食品中合成着色剂的准确测定具有重要意义.

目前报道的有关食品着色剂检测方法主要有薄层色谱法^[3,8]、高效液相色谱法^[5,9]、紫外分光光度法^[10]和毛细管电泳法^[11]等. 其中,高效液相色谱法是被广泛应用的测定方法,常用的前处理方法有固

收稿日期: 2018-04-09; 修订日期: 2018-05-17.

作者简介: 于辉 (1990-), 女, 博士, 主要研究方向为分离分析新方法, E-mail: yhtortolong@126.com.

相萃取小柱吸附法、聚酰胺吸附法和超声提取法等。聚酰胺吸附法是目前国家标准方法 GB 5009.35-2016《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》推荐的着色剂前处理方法。超声提取法是 SN/T 4457-2016《出口饮料、冰淇淋等食品中 11 种合成着色剂的检测 液相色谱法》所推荐的着色剂前处理方法。这 2 种前处理方法在饮料合成着色剂的液相色谱分析中被广泛应用,也各有其优缺点。本文对 GB 5009.35-2016 和 SN/T 4457-2016 的样品前处理方法进行对比研究,分析其优缺点,为日常检测工作方法的选择上提供一定的试验依据。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters e2695 液相色谱,超纯水制备系统(青岛富勒姆科技有限公司),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),梅特勒 FE20 型 pH 计,恒温水浴锅(金怡 SHA-C),Sigma 高速离心机(3-16KL),旋转蒸发仪(上海亚荣 RE-2000)。

柠檬黄、胭脂红、日落黄(坛墨质检标准物质中心),聚酰胺(台州市路桥四甲生化塑料厂),乙酸铵(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司),甲酸(LC-MS 级,上海安谱实验科技股份有限公司),氨水、柠檬酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),无水乙醇、乙酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克)。

1.2 试剂配制

乙酸铵溶液(0.02 mol/L):称取 1.54 g 乙酸铵,加水定容至 1 000 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。氨水溶液:量取氨水 2 mL,加水定容至 100 mL,混匀备用。30%氨水溶液:量取氨水 30 mL,加水定容至 100 mL,混匀备用。甲醇-甲酸溶液:量取甲醇 60 mL、甲酸 40 mL,混匀备用。柠檬酸溶液:称取柠檬酸 20 g,加水定容至 100 mL,混匀备用。无水乙醇-氨水-水溶液:量取无水乙醇 70 mL、上述配制好的氨水溶液 20 mL、水 10 mL,混匀备用。pH 6 的水:水加柠檬酸溶液调 pH 值到 6。pH 4 的水:水加柠檬酸溶液调 pH 值到 4。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C18(5 μm, 250 mm×4.6 mm),流动相:甲醇/0.02 mol/L 乙酸铵溶液,梯度洗脱,洗脱设置如表 1 所列。检测波长为 254 nm,流速

为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件
Table 1 Conditions of HPLC gradient elution

时间/min	甲醇/%	0.02 mol/L 乙酸铵/%
0.00	5	95
3.00	5	95
12.00	50	50
18.00	5	95
20.00	5	95

1.4 标准曲线绘制

准确移取质量浓度为 1 000 μg/mL 的柠檬黄、胭脂红、日落黄标准溶液适量,加水稀释配制质量浓度分别为 0.02、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg/mL 的系列标准溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,在上述色谱条件下进样测定,根据保留时间和峰面积绘制标准曲线。

1.5 样品前处理

1.5.1 聚酰胺吸附法

按照 GB 5009.35-2016《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》的测定方法处理美年达橙味饮料,进行液相色谱分析。

聚酰胺吸附法:称取饮料实际样品 5 g 于 15 mL 样品管中,超声驱除二氧化碳。样品溶液加柠檬酸溶液调 pH 值至 6,加热至 60 ℃,将 1 g 聚酰胺粉加少许水调成粥状,在 60 ℃ 条件下倒入样品溶液中,搅拌片刻,倾入玻璃层析柱(30 cm×1.5 cm),用 60 ℃ pH 为 4 的水洗涤 5 次,然后用甲醇-甲酸混合溶液洗涤 5 次,再用水洗至中性,用乙醇-氨水-水混合溶液解吸 5 次,直至色素完全解吸,收集解吸液,加乙酸中和,蒸发至近干,加水溶解,定容至 5 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进高效液相色谱分析。

1.5.2 超声提取法

按照 SN/T 4457-2016《出口饮料、冰淇淋等食品中 11 种合成着色剂的检测 液相色谱法》的测定方法处理美年达橙味饮料,进行液相色谱分析。

超声提取法:称取饮料实际样品 10 g 于 50 mL 样品管中,用 30%氨水溶液调节 pH 值至 6,加 5%乙腈水溶液定容至 50 mL,摇匀,超声提取 30 min,取 20 mL 混合溶液置入高速离心管中,10 000 r/min,离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,进高效

液相色谱分析.

2 结果与讨论

2.1 标准曲线与检出限

在上述色谱条件下,对配制的不同浓度标准系列溶液进行分析,以各分析物浓度为横坐标,以其相应的色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,进行线性

回归分析,各组分的线性范围、线性方程、相关系数和检出限如表 2 所列. 试验结果表明,柠檬黄、胭脂红和日落黄 3 种着色剂在 0.1~50.0 μg/mL 浓度范围内具有良好的线性关系,各组分相关系数均在 0.999 9 以上,根据仪器的 3 倍信噪比所对应的浓度值确定最低检出限为 0.05 μg/mL,该方法具有低的检出限.

表 2 各组分的保留时间、线性范围、回归方程、相关系数及检出限
Table 2 Retention time, linear range, regression equation, correlation coefficient and detection limits of synthetic colorants

分析项目	保留时间 /min	线性范围 /(μg/mL)	回归方程 /(μg/mL)	相关系数 R^2	检出限 /(μg/mL)
柠檬黄	9.434	0.1~50.0	$y=162.64+60\ 201.64x$	0.999 93	0.05
胭脂红	12.034	0.1~50.0	$y=890.87+55\ 606.09x$	0.999 92	0.05
日落黄	13.175	0.1~50.0	$y=131.11+47\ 784.00x$	0.999 95	0.05

2.2 两种样品前处理方法对着色剂含量分析比较

按照 GB 5009.35-2016 和 SN/T 4457-2016 的 2 种样品前处理方法,对实际样品(美年达橙味饮料,市售)进行前处理,高效液相色谱分析,结果如图 1 所示. 从图 1 中可以看出,样品通过上述 2 种不同方法进行前处理后分析,都检测到了柠檬黄、胭脂红和日落黄,具体数据如表 3 所列. 由表 3 可见,2 种前处理方法的试验结果无显著差异,且均具有较好的重现性.

聚酰胺吸附法利用聚酰胺在弱酸性条件下与色素吸附而在碱性条件与色素解吸的原理对色素进行富集. 样品在加入聚酰胺之前,用柠檬酸调节 pH 值至 6,样品溶液加热后,加入聚酰胺搅拌吸附色素,并经过多次水洗、酸洗除去杂质后,进而水洗至中性,用氨碱性乙醇解吸色素,整个过程尤其是水洗至中性过程耗时长. 此外,经过多次水洗、酸洗过程杂质干扰少,体现在色谱图中基线干净(图 1c). 相比较,超声提取法调节 pH 值至 6 后,只需加入 5%乙腈水溶液定容,超声、离心后直接进样分析,整个过程相比聚酰胺吸附法明显的缩短了分析时间,但是从色谱图(图 1b)可以看出杂质峰干扰较多.

2.3 两种前处理方法回收率

在美年达橙味饮料样品中,分别加入 0.5、5、20 mg/kg 的柠檬黄、胭脂红、日落黄的混合标准溶液,分别按照以上 2 种前处理方法进行样品前处理,液

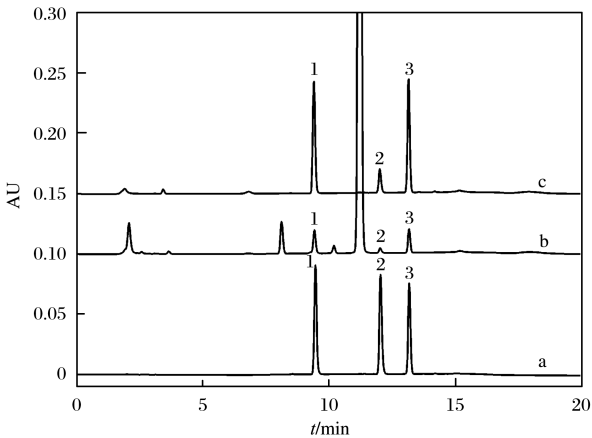


图 1 柠檬黄、胭脂红、日落黄液相色谱图
(a) 标准样品(10 μg/mL), (b) 超声提取法, (c) 聚酰胺吸附法
(1) 柠檬黄, (2) 胭脂红, (3) 日落黄

Fig.1 Eluent chromatograms of citrine, carmine and sunset yellow

(a) chromatogram of standard sample (10 μg/mL),
(b) ultrasonic extraction method, (c) polyamide
adsorption method
(1) Citrine, (2) Carmine, (3) Sunset yellow

相色谱测定,计算回收率,结果如表 4 所列. 聚酰胺吸附法测定的被测样品加标回收率在 83.8%~105.5%之间,超声提取法测定的被测样品加标回收率在 90.2%~107.2%之间,试验结果表明 2 种前处理方法的回收率结果令人满意.

表 3 饮料中着色剂测定结果的比较

Table 3 Determination results of synthetic colorants in beverages

分析项目	聚酰胺吸附法		超声提取法	
	平均值/(mg/kg)	RSD/% (n = 3)	平均值/(mg/kg)	RSD/% (n = 3)
柠檬黄	10.03	0.40	10.30	0.40
胭脂红	2.26	1.25	2.21	0.56
日落黄	12.33	0.82	13.04	0.01

表 4 两种前处理方法的各组分回收率 (n = 3)

Table 4 Recovery rate of each component of two pretreatment methods

组分	标准添加 质量分数 /(mg/kg)	聚酰胺吸附法			超声提取法		
		本底质量 分数	测定质量 分数	平均回 收率	本底质量 分数	测定质量 分数	平均回 收率
		/(mg/kg)	/(mg/kg)	/ %	/(mg/kg)	/(mg/kg)	/ %
柠檬黄	0.5	10.03	10.50	93.7	10.30	10.77	107.2
	5		14.41	87.5		15.22	98.3
	20		28.97	94.2		30.00	98.5
胭脂红	0.5	2.26	2.79	105.5	2.21	2.69	96.0
	5		6.97	94.0		6.95	94.7
	20		21.68	97.1		22.02	99.0
日落黄	0.5	12.33	12.81	95.7	13.04	13.49	90.2
	5		16.52	83.8		17.68	92.8
	20		30.04	88.5		32.62	97.9

3 结论

分别采用聚酰胺吸附法和超声提取法对饮料中的着色剂进行提取,结合高效液相色谱分析,测定美年达饮料中柠檬黄、胭脂红、日落黄的含量. 试验结果表明,2 种样品前处理方法对美年达橙味饮料中着色剂的测定结果无显著差异,且均具有较好的重现性和回收率. 通过聚酰胺吸附法处理的样品,杂质干扰峰少,色谱峰基质干净,但是操作较为复杂,适用于小批量样品的定量检测. 超声提取法操作简单、成本低廉,大大缩短了分析时间,适用于大批量样品的定量检测,但也存在其他杂质峰的干扰. 因此,对于饮料中着色剂检测可根据需求选择合适的样品前处理方法.

参考文献:

[1] 李传欣, 张华, 李景琳.食用天然色素的应用及发展

趋势[J]. 辽宁农业科学,2001,1:29-32. [LI Chuan-xin, ZHANG Hua, LI Jing-lin. The application and development trend of edible natural pigments [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2001, 1:29-32.]

[2] DE ARAUJO SIQUEIRA BENTO W, LIMA B P, PAIM A P. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC [J]. Food Chemistry, 2015, 183: 154-160.

[3] DE ANDRADE F I, FLORINDO GUEDES M I, PINTO VIEIRA I G, et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 193-198.

[4] BENVIDI A, ABBASI S, GHARAGHANI S, et al. Spectrophotometric determination of synthetic colorants using PSO-GA-ANN [J]. Food Chemistry, 2017, 220: 377-384.

[5] BONAN S, FEDRIZZI G, MENOTTA S, et al. Simultaneous determination of synthetic dyes in

- foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector[J]. *Dyes and Pigments*, 2013, 99(1):36-40.
- [6] CHAI W, WANG H, ZHANG Y, et al. Preparation of polydopamine-coated magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction of water-soluble synthetic colorants in beverage samples with HPLC analysis[J]. *Talanta*, 2016, 149:13-20.
- [7] 林峰, 奚星林, 陈捷, 等. 食品安全分析检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 1-290. [LIN Feng, XI Xing-lin, CHEN Jie, et al. Analysis and detection technology in food safety [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015:1-290.]
- [8] SOPONAR F, Moț A C, Sârbu C. Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1188(2):295-300.
- [9] MA M, LUO X, CHEN B, et al. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103(1):170-176.
- [10] 刘慧, 胡仰栋, 孙小云. 连续波长紫外分光光度法对合成食用色素混合体系的同时定量测定[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(9):164-166. [LIU Hui, HU Yang-dong, SUN Xiao-yun. Simultaneous quantitative determination of synthetic food colorants by continuous wavelength ultraviolet spectrophotometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(9):164-166.]
- [11] JAGER A V, TONIN F G, TAVARES M F M. Optimizing the separation of food dyes by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(9-10):957-965.
-

请速订阅 2018 年《分析测试技术与仪器》

如果您想

了解当代分析测试领域的新进展与新动向

交流分析测试研究的新理论与新成果

开发分析测试研究工作的新技术与新方法

扩展分析测试仪器的新用途与新功能

研制分析测试的新仪器与新组件

.....

请您订阅向国内外公开发行的《分析测试技术与仪器》杂志, 刊号 $\text{ISSN } 1006-3757$, 邮发代号: 54-90, 定

价: 15 元/册, 全年定价 60 元. 投稿请与《分析测试技术与仪器》编辑部联系, 联系电话: 0931-4968280, E-mail: fxcsc@licp.cas.cn, 网址: <http://www.fxcjsyyq.net>, 联系人: 张晓鸿, 地址: 甘肃省兰州市天水中路 18 号, 中国科学院兰州化学物理研究所.