

食品中八种人工着色剂的测定

Determination of eight kinds of artificial colorants in food

前言

本应用文档为参考性资料文档；

本应用文档适用于采用《食品中合成着色剂的测定》(GB/T 5009.35-2003)用高效液相色谱法进行测定；

本应用文档包括内容有：

- 资源需求清单部分
- 分析操作步骤部分
- 分析方法验证部分

本应用文档所有权及解释权归艾德飞科技（北京）有限公司。

注意事项：

- 1、 请首先根据资源需求清单部分查看所需资源是否齐全。其中‘1/样’意味着每次实验处理 1 个样品所需 1 个相应的资源。
- 2、 使用前务必确认实验人员能够正常使用资源清单中的相关仪器、设备、耗材。
- 3、 分析方法验证部分的所有数据和图谱仅供参考。具体待测样品的保留时间会随着具体条件的变化而有所不同。

1 1、资源需求清单部分 (Requirements List)

	仪器设备	数量	选择	备注	价格
1.1 仪器类清单					
1	RIGOL L-3245 四元低压输液泵	1	需要		
2	RIGOL L-3500 紫外-可见双波长检测器	1	需要		
3	RIGOL C18色谱柱	1	需要		
4	RIGOL UltraChrom 色谱工作站软件	1	需要		
6	RIGOL L-3400 柱温箱	1	推荐		
7	RIGOL L-3320自动进样器	1	可选		
1.2 设备类清单					
1	电脑	1	需要		
2	打印机	1	需要		
3	流动相抽滤组件	1	需要		
4	便携式脱气泵	1	需要		
5	超声波清洗仪	1	需要	5L以上	
6	分析天平	1	需要	万分之一	
7	移液枪	1	需要	100uL~1mL	
8	超纯水机	1	推荐	电导率18.3MΩ ^{cm}	
1.3 试剂类清单					
1	甲醇	1	需要	色谱纯	
2	甲酸	1	需要		
3	无水乙醇	1	需要	色谱纯	
4	乙酸铵溶液	1	需要		
5	柠檬酸溶液	1	需要		
6	氨水溶液	1	需要		
11	水 (PH=6.0)	1	需要		
1.4 耗材类清单					

1	滤膜（有机系）	1盒	需要	50mm×0.45um 尼龙66	
2	针用过滤头（有机系）	1/样	需要	尼龙66	
3	一次性注射器	1/样	需要	5mL	
4	量筒	1套	需要	500mL	
5	容量瓶	2个	需要	50mL	
6	容量瓶	1个	需要	25mL	
7	容量瓶	6个	需要	10mL	
8	移液管	1套	需要	5mL	
9	洗瓶	1个	需要	500mL	

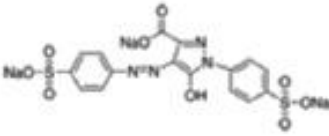
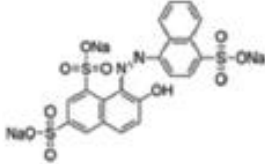
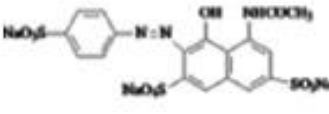
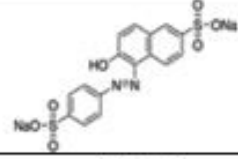
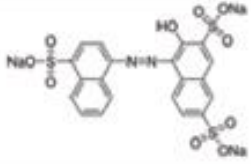
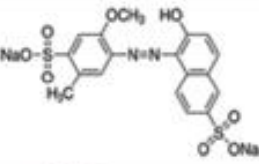
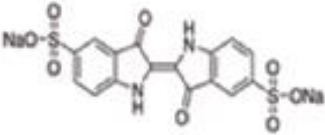
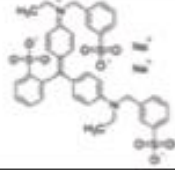
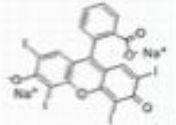
2 2、分析操作步骤部分（Step by Step）

测试原理：

人工合成着色剂又称人工合成色素，常以苯、甲苯等为原料，先制备色素中间体，再将一种或两种中间体进行磺化、偶合、缩合和偶氮化等化学反应而制成。《食品中合成着色剂的测定》(GB/T 5009.35-2003)，采用聚酰胺吸附食品中的人工合成着色剂，并用乙醇胺溶液进行洗脱。聚酰胺对合成色素的吸附能力会受到温度的影响，实验时需对样品和淋洗液做加热处理，而且乙醇胺浓缩所需时间过长，此方法不适合大批量样品同时处理，且不易做自动化方法移植。大多数人工合成着色剂均具有苯磺酸钠结构，本实验选用RIGOL L-3000液相色谱系统进行检测，符合国标要求，适用于大批量样品的同时检测。

操作步骤中包括：2.1、试剂溶剂配制；2.2、标准工作曲线配制；2.3、样品前处理；2.4、色谱分析；2.5、数据处理。

表 1 着色剂样品信息

样品组分	结构式	样品组分	结构式
柠檬黄		胭脂红	
新红		日落黄	
苋菜红		诱惑红	
靛蓝		亮蓝	
赤藓红			

实验室所需具备的要求:

实验室环境要求:

- 操作环境温度: 20~30℃
- 相对湿度: 20%~80%
- 防火: 拥有防火设备
- 通风: 有良好的通风环境
- 位置: 远离高电磁干扰 远离高振动设备
- 溶剂兼容性: 溶剂与结构材料相容
- 电器指标:**
- 电源电压: 100 VAC_{RMS} - 240 VAC_{RMS}
- 电压频率: 50 Hz - 60 Hz

样品溶液的配制

- a) 乙酸铵溶液(0.02mol/L): 称取1.54g乙酸铵,加水溶解并稀释至1000mL;
- b) 甲醇/甲酸(6+4)溶液: 量取甲醇60mL,甲酸40 mL,混匀;
- c) 柠檬酸溶液: 称取20g柠檬酸,加水至100mL溶解,混匀;
- d) 无水乙醇-氨水溶液-水: 量取无水乙醇70mL,氨水溶液20mL、水10mL,混匀;
- e) 水(PH=6.0): 水加柠檬酸溶液调节PH=6.0;

样品提取

- a) 饮料类样品: 称取10g样品放入100mL烧杯中,含二氧化碳的样品加热去除二氧化碳;
- b) 配制酒类: 称取10g样品放入100mL小烧杯中,加热去除乙醇;
- c) 液体调味料: 称取10g样品放入100mL小烧杯中,若试样pH值偏高,用柠檬酸水溶液调节pH至6左右;
- d) 固体调味料: 称取2g样品放入100mL小烧杯中,加入10mL 1%氨水溶液,涡旋提取1min,4000r/min离心5min,重复提取至提取液无色,合并上清液,用柠檬酸水溶液调节pH至6左右作为待净化液;
- e) 酱料类: 称取2g样品,加入20mL石油醚,涡旋混合1min,5000r/min离心5min,弃去石油醚上清液,残渣吹干,加入10mL 1%氨水溶液,涡旋提取1min,4000r/min离心5min,重复提取至提取液无色,合并上清液,用柠檬酸水溶液调节pH至6左右作为待净化液;
- f) 果冻、水果罐头: 称取已均质样品2g,装入50mL离心管中,加入5mL乙醇胺涡旋1min,4000r/min离心5min,重复提取至提取液无色,合并上清液置于80水浴中浓缩至2mL,水洗转移至10mL比色管中,用水定容(若试样pH偏高,用柠檬酸水溶液调节pH至6左右);
- g) 肉制品: 称取已均质样品2g,装入50mL离心管中,加入20mL石油醚,涡旋混合1min,4000r/min离心5min,弃去石油醚上清液。残渣吹干,加入5mL乙醇胺涡旋1min,4000r/min离心5min,重复提取至提取液无色,合并上清液置于80水浴中浓缩至2mL,水洗转移至10mL比色管中,用水定容(若试样pH偏高,用柠檬酸水溶液调节pH至6左右)转移至固相萃取仪上样管中,待净化。

实验条件

色谱柱: RIGOL C18 5 μ m 4.6 \times 250mm;

流 速: 1.0mL /min;

进样量: 20 μ L;

波 长: 254nm;

梯 度:

时间	A% (0.02mol/L乙酸铵)	B% (甲醇)
0	95	5
10	80	20
18	40	60
25	40	60
25.01	95	5
40	95	5

实验结果

5 μ g/g 红酒基质8 种着色剂加标回收率:

样品组分	标样过柱1 (%)	标样过柱2 (%)	红酒样品1 (%)	红酒样品2 (%)
柠檬黄	100.6	99	92.5	102
新红	100.6	97.8	102	100
苋菜红	101	98.5	104	105
靛蓝	89.8	88.8	86.9	87.5
胭脂红	100.3	98.8	92.5	90.2
日落黄	101	100	90	90.6
诱惑红	100	100	106	103
亮蓝	102	100	95	95

1 μ g/g 火锅蘸料基质3 种着色剂加标回收率:

样品组分	标样过柱 (%)	添加样1 (%)	添加样2 (%)	添加样3 (%)
胭脂红	99.93	100.8	112.01	100.89

日落黄	98.02	100.31	99.15	101.87
诱惑红	100	89.68	90.11	88.16

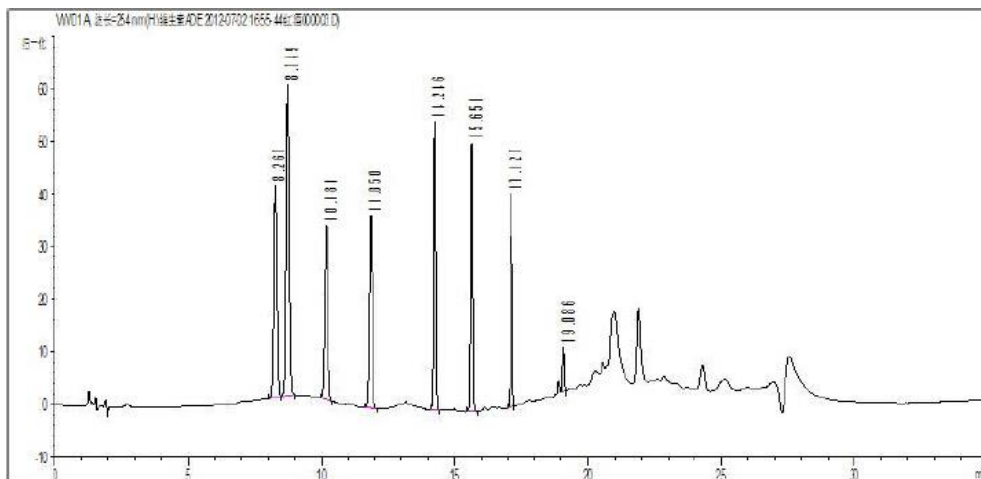
通过对不同基质样品的加标实验，对上述检测方法进行验证，结果见下表：

5 $\mu\text{g/g}$ 红酒基质8种着色剂加标回收率：

样品组分	标样过柱1(%)	标样过柱2(%)	红酒样品1(%)	红酒样品1(%)
柠檬黄	100.6	99	92.5	92.5
新红	100.6	97.8	102	102
苋菜红	101	98.5	104	104
靛蓝	89.8	88.8	86.9	86.9
胭脂红	100.3	98.8	92.5	92.5
日落黄	101	100	90	90
诱惑红	100	100	106	106
亮蓝	102	100	95	95

色谱图：

8种着色剂混标谱图(从左至右依次为柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝)：



实验结论：

实验结果表明，RIGOL L-3000完全满足《食品中合成着色剂的测定》(GB/T 5009.35-2003)中高效液相色谱法，可以快速、准确、高效的完成食品中合成着色剂的测定。

扩展方案

食品中人工合成着色剂的测定

Determination of synthetic colorants in food

关键字:

食品、人工合成着色剂、色素、糕点、果酱、乳饮料、糖果、红酒、冰淇淋、果冻、水果罐头、黑芝麻糊、C18、RIGOL L-3000

摘要:

本方案适用于糕点、果酱、水果罐头、黑芝麻糊、果冻、冰淇淋、乳饮料、糖果和红酒中人工合成着色剂的检测；检出限：亮蓝是1.0 mg/kg，其他的是0.2 mg/kg。

化合物:

柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、日落黄、诱惑红、亮兰、赤藓红

测定方法:

高效液相色谱法

测定设备:

RIGOL L-3000二元梯度系统

固定相:

C18

色谱柱:

RIGOL C18 5u 250 x 4.6mm

样品前处理:

A、糕点、果酱:

(1) 取1.0 g样品，加入20 mL提取液A*，振荡2 min，40℃水浴超声提取10

min, 6000 rpm下离心2 min, 收集上清液;

(2) 取下层残留物, 加入10 mL提取液A*, 振荡2 min, 40℃水浴超声提取15 min, 6000 rpm下离心2 min, 收集上清液;

(3) 将下层残留物用10mL提取液A* 按照步骤(2)重复提取一次, 合并三次上清液;

(4) 将上清液在40℃水浴条件下, 减压蒸至约15 mL, 再加入3 mL甲酸混匀, 待净化。

B、水果罐头、黑芝麻糊:

(1) 取1.0 g样品, 加入20 mL提取液A*, 振荡2 min, 40℃水浴超声提取10 min, 6000 rpm下离心2 min, 收集上清液;

(2) 取下层残留物, 加入10 mL提取液A*, 振荡2 min, 40℃水浴超声提取15 min, 6000 rpm下离心2 min, 合并两次上清液;

(3) 将上清液在40℃水浴条件下, 减压蒸至约15 mL, 再加入3 mL甲酸混匀, 待净化。

C、冰淇淋:

(1) 取1.0 g样品, 加入20 mL提取液A*, 振荡2 min, 40℃水浴超声提取10 min, 6000 rpm下离心2 min, 收集上清液;

(2) 将上清液在40℃水浴条件下, 减压蒸至约15 mL, 再加入3 mL甲酸混匀, 待净化。

D、果冻: 取1.0 g样品, 加入10 mL水, 40℃水浴超声提取15 min, 加入5 mL甲醇和3 mL甲酸混匀, 待净化。

E、乳饮料、糖果: 取1.0 g样品, 加入10 mL水、5 mL甲醇和3 mL甲酸混匀, 待净化。

F、红酒：取1.0 mL样品，加入0.5 mL甲醇和0.3 mL甲酸混匀，待净化。 *

提取液A：取100 mL乙醇和50 mL乙腈，混匀，取140 mL乙醇：乙腈（2：1）混合溶液，加入60 mL水和2 mL氨水，混匀。 净化 ProElut PWA-2 150 mg/6 mL

（Cat.#65815） a活 化： 依次用5 mL甲醇、5 mL10%甲酸水活化； b上 样：

加入待净化液，弃去流出液； c淋 洗： 加入5 mL甲醇，弃去流出液； d洗

脱： 加入5 mL15%氨水甲醇溶液，收集流出液； e重新溶解： 将洗脱液在

50 °C下氮吹至约300 μL，用流动相定容至1 mL，供HPLC分析。

色谱条件：

色谱柱：RIGOL C18，250 mm×4.6 mm，5 μm

流 速：1.0 mL/min

进样量：20 μL

柱 温：35 °C

检测器：UVD 254 nm

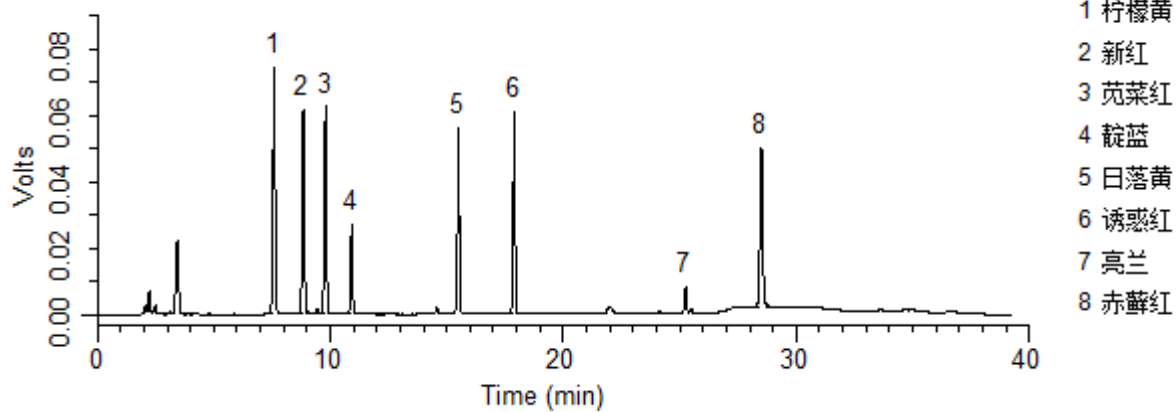
流动相：A：乙腈 B：0.02 mol/L 乙酸铵溶液

梯度设置

时间 (min)	0	20	30	31	40
A (%)	5	30	37	5	5
B (%)	95	70	63	95	95

色谱图：

人工合成着色剂标准(10 mg/L)液相色谱图



实验结论:

实验结果表明, RIGOL L-3000基于高效液相色谱法完全满足食品中人工合成着色剂的测定。