

高效液相色谱法同时测定功能饮料中的7种禁用酸性染料

冯然军¹, 粟智², 刘俊^{3*}

(1. 新疆师范大学体育学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆师范大学化学化工学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 3. 新疆出入境检验检疫局技术中心, 新疆乌鲁木齐 830063)

摘要:采用高效液相色谱法(HPLC)建立同时测定功能性饮料中7种禁用染料的快速分析方法。样品经超声波辅助提取净化后进行测定,以10 mmol/L 乙酸铵-乙腈为流动相,流速为1.0 mL/min,各酸性质量浓度在5~100 mg/L范围内呈良好的线性关系($R=0.9906\sim0.9995$),平均回收率为80.5%~97.1%,相对标准偏差(RSD) $<1.57\%$ ($n=6$),7种禁用酸性染料的方法检出限为0.006~0.150 mg/kg。该方法简便、高效,适用于在饮料中对7种酸性工业染料的同时测定。

关键词:高效液相色谱;功能饮料;酸性染料

中图分类号:TQ16

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)12-0158-03

Simultaneous determination of seven industrial acid dyes in sports drink by high performance liquid chromatography

FENG Ran-jun¹, SU Zhi², LIU Jun^{3*}

(1. College of Physical Education, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

2. College of Chemistry and Chemical, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

3. Technical Center of Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063, China)

Abstract: An analytical method for simultaneous determination of 7 kinds of acid dyes in sports drink is established by high performance liquid chromatography (HPLC). The samples are purified by ultrasonic extraction before chromatographic separation. When 10 mmol/L of ammonium acetate/acetonitrile is used as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min, a linear range of acid dyes, the average recoveries, the relative standard deviations and the detection limit are ~80 mg/L ($r=0.9987\sim0.9996$), 89.4%~97.1%, 89.4%~97.1% ($n=6$) and 0.08~0.15 mg/kg, respectively. This method is simple, quick, reliable and very applicable to sports drink.

Key words: high performance liquid chromatography; edible packaging; acid red dyes

功能饮料由于自身赋予的功能特点,其市场发展迅速,产品销量剧增,产品种类繁多、色泽多样,其中酸性染料具有色泽鲜艳、着色稳定、易溶于水、价格低廉、易着色、操作简单等特点,很容易被不法商贩利用,用于饮料色素的添加。关于工业色素用于食品产业并不陌生,近几年来国际国内食品安全问题频出,使得广大消费者深受其害。但目前关于检测禁用染料的方法有高效液相色谱法^[1-5]、高效液相色谱-质谱联用技术(LC/MS)^[6-8]、电化学分析法^[9-10]、光度分析法^[10-11]、毛细管电泳法^[12]等,采用液相色谱法同时测定功能饮料里的禁用酸性染料的方法未见报道。为了有效监控工业染料在饮料中的添加,笔者采用液相色谱法建立了同时测定功能饮料中7种酸性染料的方法。该方法简便、快速、灵

敏、准确,在饮料中应用效果良好。

1 试验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪;配有 DAD 紫外检测器;AL204-IC 电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;Allegra X-22R 离心机,贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司生产;N-EVAP-112 氮气浓缩仪 Organomation Associate SIne;KQ-600B 超声波清洗器,昆山市超声仪器公司生产;隔膜真空泵,天津奥特塞恩斯仪器有限公司生产;0.22 μm 有机滤膜。

酸性橙 10、酸性红 1、酸性红 14、酸性黑 1、酸性橙黄 2、酸性紫 43、酸性蓝 62 (纯度 >98%,购于 Dr

收稿日期:2014-07-11

基金项目:国家质检总局科研制标项目(2013IK187)

作者简介:冯然军(1987-),男,硕士研究生,主要从事人体运动科学研究,240506311@qq.com;刘俊(1978-),男,硕士,工程师,主要从事食品、矿物质检验及食品包装材料的研究,通讯联系人,xjy1111@163.com。

Ehrenstorfer 公司);乙腈、甲醇:色谱纯,Fisher 公司生产;氨水,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司生产;乙酸铵,色谱纯,德国 Merck 公司生产;甲酸,分析纯,西安化学试剂厂生产;试验用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 标准储备液及工作液

标准储备液和标准工作液的配制:分别称取 100.0 mg 标准品,用甲醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中,配制质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,于 -20℃ 下保存。取各标准储备液适量,用甲醇配制所需浓度的混合标准工作液,密封,于 4℃ 下保存备用。

1.2.2 样品处理

(1)为选择提取效果最佳条件,取超生涡旋后的样品 10.0 g 加入 7 种酸性染料的标准溶液 10 μg/g,充分混匀,放置 24 h。

(2)称取 2.0 g 样品于 50 mL 的离心管中,加入 10 mL 的甲醇(含 1% 甲酸)-10 mmol/L 乙酸铵水溶液(体积比为 1:1)为提取液,超声 15 min,每个样品提取 2 次,合并 2 次提取液,定容至 25 mL,取 2.0 mL 上述样品提取液,氮气吹至近干,用乙腈-水(体积比为 2:8)溶液 1 mL 溶解,过 0.22 μm 滤膜,用 HPLC 测定。

1.3 色谱条件

色谱柱:symmtery shield RP18 柱 250 mm × 4.6 mm,5 μm;柱温:30℃;检测波长:500 nm。流动相:乙腈和 10 mmol/L 乙酸铵溶液;流速:1.0 mL/min;检测器:紫外检测器;进样体积:10 μL。HPLC 梯度洗脱条件详见表 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

时间/ min	w(20 mmol/L 乙酸铵溶液)/ %	w(甲醇)/ %	流速/ (mL·min ⁻¹)
0.00	95.0	5.0	1.0
20.00	75.0	25.0	1.0
50.00	50.0	50.0	1.0
52.00	95.0	5.0	1.0
60.00	95.0	5.0	1.0

2 结果与分析

2.1 样品处理条件优化

根据酸性染料易溶于水的性质,先考虑用水做提取溶剂,计算各种物质的回收率,酸性橙 10、

酸性红 1、酸性红 14、酸性黑 1 的回收率均高于 125%,其他 3 种目标物的回收率达 73.5%。这是由于添加的酸性染料与饮料中含有的其他酸性物结合,沉淀,干扰了酸性染料的提取,导致回收率偏高。考虑到甲醇比水溶液更易挥发、易污染,且流动相中的乙酸铵对紫外检测更有利,综合考虑后采用甲醇(1% 甲酸)-10 mmol/L 乙酸铵(体积比 1:1)作为提取液。重复测定 7 个样品。7 种物质提取液的提取率都在 69% ~ 98.4% 范围内。提取液加标回收率较高。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱选择

采用 RP18 柱 symmtery shield 250 mm × 4.6 mm,5 μm 色谱柱可获得更高的分离度、样品通量和灵敏度。分别考察了不同色谱柱对 7 种酸性染料的分离效果,C8(直链烷烃)、HILIC(硅胶基质)、HSST3(三键 C18 烷基键合),对比结果表明,symmtery shield RP18 柱分离效果最好。

2.2.2 流动相选择

分别选用超纯水、甲醇和乙腈等不同的流动相,试验结果表明,以乙腈-10 mmol/L 乙酸铵作为流动相时,分离度和色谱峰达到最佳效果。进一步对乙腈-10 mmol/L 乙酸铵和乙腈-5 mmol/L 乙酸铵作流动相的结果进行对比发现,10 mmol/L 乙酸铵为最佳添加剂量,通过优化流动相达到了 7 种酸性染料在饮料中的有效分离。

2.3 线性范围和检出限

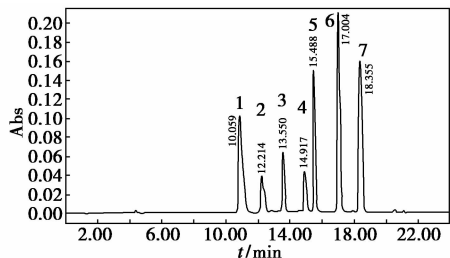
用甲醇稀释标准储备液来制备质量浓度分别为 5.0、10、100.0 mg/L 的混合标准溶液。以 7 种染料的质量浓度 X(mg/L)为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程、相关系数及检出限,结果如表 2 所示。

表 2 7 种染料的线性范围、线性回归方程、相关系数、检出限

染料	线性范围/ (mg·L ⁻¹)	线性方程	相关系数	检出限/ (mg·kg ⁻¹)
酸性橙 10	5 ~ 100	$y = 19.7786x - 3.6884$	0.99996	0.015
酸性红 1	5 ~ 100	$y = 14.3569x - 8.6272$	0.99986	0.015
酸性红 14	5 ~ 100	$y = 18.8845x - 12.1967$	0.99993	0.060
酸性黑 1	5 ~ 100	$y = 12.6796x - 21.9658$	0.99980	0.006
酸性橙黄 2	5 ~ 100	$y = 41.5097x - 9.8565$	0.99995	0.090
酸性紫 43	5 ~ 100	$y = 37.6628x - 6.6328$	0.99985	0.030
酸性蓝 62	5 ~ 100	$y = 38.5010x - 1.3469$	0.99985	0.150

2.4 色谱分析

按实验所述方法对空白饮料中的加标样品进行色谱分析,其色谱图如图 1 所示。



1—酸性橙 10;2—酸性红 1;3—酸性红 14;4—酸性黑 1;
5—酸性橙黄 2;6—酸性紫 43;7—酸性蓝 62

图 1 样品 UPLC 色谱图

2.5 方法的精密度和回收试验

分别将 0.05、0.1、0.2 mg/L 的酸性橙 10、酸性红 1、酸性红 14、酸性黑 1、酸性橙黄 2、酸性紫 43、酸性蓝 62 的混合标准溶液添加到饮料空白样品中,按试验所述方法平行测定 6 次,结果如表 3 所示。结果表明,平均回收率 >80.5%,相对标准偏差(RSD) <1.57%,说明本方法准确可靠。

表 3 方法的加标回收率精密度 (n=6)

组分	加标量/ (mg·L ⁻¹)	测得值/ (mg·L ⁻¹)	RSD/%	回收率/%
酸性橙 10	0.05	0.0418	0.32	83.5
	0.10	0.0805	1.57	80.5
	0.20	0.1731	0.27	86.5
酸性红 1	0.05	0.0406	0.46	81.2
	0.10	0.0828	0.26	82.8
	0.20	0.1762	0.98	88.0
酸性红 14	0.05	0.0413	0.30	82.5
	0.10	0.0916	0.57	91.6
	0.20	0.1967	0.39	98.4
酸性黑 1	0.05	0.0406	0.51	81.2
	0.10	0.0902	1.24	90.0
	0.20	0.1912	0.30	95.6
酸性橙黄 2	0.05	0.0415	1.02	83.2
	0.10	0.0902	0.42	90.2
	0.20	0.1924	0.31	96.2
酸性紫 43	0.05	0.0467	0.17	93.5
	0.10	0.0946	0.97	94.6
	0.20	0.1931	0.35	96.5
酸性蓝 62	0.05	0.0425	0.49	85.1
	0.10	0.0882	0.50	88.2
	0.20	0.1871	0.21	93.5

3 样品分析

依据笔者建立的测定方法,随机抽取市场上的功能性饮料进行分析测定,各样品中均未检出酸性橙 10、酸性红 1、酸性红 14、酸性黑 1、酸性橙黄 2、酸性紫 43、酸性蓝 62 工业酸性染料。

4 结论

在超声波辅助条件下,采用弱碱性溶剂提取样品中的 7 种酸性工业染料。通过快速简便的前处理后,回收率高。实验优化了高效液相色谱检测条件,建立了同时测定功能饮料中 7 种酸性工业染料的分析方法。该方法操作简便、快速,灵敏度高,其回收率和重复性能满足食品卫生质量检验部门对可食性包装材料中酸性橙 10、酸性红 1、酸性红 14、酸性黑 1、酸性橙黄 2、酸性紫 43、酸性蓝 62 工业染料的检测要求。

参考文献

- [1] 杨林飞. 反相高效液相色谱法测定豆制品中碱性橙[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(3): 545-547.
- [2] 王重洋, 王宁, 吴琼, 等. 基质固相分散-超快速液相色谱测定山楂片中的 4 种苏丹红染料[J]. 分析化学, 2014, 42(4): 597-601.
- [3] 王卉卉, 牛增元, 叶曦雯, 等. 染色纺织品与皮革制品中 23 种禁用偶氮染料的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 944-948.
- [4] 沈坚, 傅晓, 潘旭, 等. 高效液相色谱法测定动物性食品中合成色素[J]. 理化检验(化学分册), 2011, 47(2): 139-143.
- [5] 林黛琴, 万承波, 邱萍, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定食品中 4 种黄色工业染料[J]. 质谱学报, 2013, 34(3): 170-177.
- [6] 赵榕, 李兵, 赵海燕, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联四级杆质谱同时测定调味品中 12 种工业染料[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 22(4): 305-312.
- [7] 刘华良, 容维广, 王联红, 等. 液相色谱串联质谱法检测鲍鱼汁中的酸性橙 II[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 22(1): 16-18.
- [8] 陈晓红, 李小平, 姚浔平. 高效液相色谱-质谱联用法测定饮料中人工合成色素的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(8): 941-942.
- [9] 罗利军, 杨琳, 谭学才, 等. 导数伏安法同时测定 5 种混合人工合成色素[J]. 分析实验室, 2006, 25(6): 39-42.
- [10] 陈文, 王正猛, 吴晓蓉, 等. 单扫描极谱法连续测定食品中非食用色素酸性金和酸性大红[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 210-212.
- [11] 余孔捷, 钱鑫, 黄杰, 等. 分光光度法测定食品添加剂偶氮玉红中未磺化芳伯胺类[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 157-159.
- [12] 高文慧, 裴红, 杨桂君. 毛细管电泳在食品添加剂检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 326-330. ■