

改良聚酰胺吸附-高效毛细管电泳内标法测定 饮料中的亮蓝和苋菜红

闫 正* , 李盈辰 , 张 玉

(河北大学化学与环境科学学院 , 河北 保定 071002)

摘要 :以日落黄为内标物 ,建立了碳酸饮料中亮蓝和苋菜红的高效毛细管电泳内标测定方法。毛细管有效长度 40 cm ,内径 75 μm ,分离电压 20 kV ,进样量 14 kPa \times 3 s ,室温下分离 ,缓冲溶液为 10 mmol/L 磷酸氢二钠(pH 8.56) ,检测波长 390 nm。亮蓝与苋菜红的相对校正因子分别为 0.832 9(相对标准偏差(RSD)为 3.3%)和 1.225 3(RSD 为 2.6%) ;定量限($S/N=10$)分别为 1.629 mg/L 和 4.160 mg/L ;回收率分别为 97.87% ~ 102.1% (RSD 为 1.8%)和 94.07% ~ 103.8% (RSD 为 4.1%) ;方法的精密度分别为 3.2% 和 2.0%。对样品预处理的优化使该法更适用于碳酸类饮料中亮蓝和苋菜红的高效毛细管电泳分析。以样品空白为基液进行内标法定量测定 ,基本上消除了背景带来的系统误差。将该方法应用于实际样品的测定 ,结果准确。

关键词 :高效毛细管电泳 ;内标法 ;亮蓝 ;苋菜红 ;饮料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)12-1185-04

Determination of Brilliant Blue and Amaranth in drinks by modification of polyamide adsorption-high performance capillary electrophoresis with internal standard method

YAN Zheng* , LI Yingchen , ZHANG Yu

(College of Chemistry and Environmental Science , Hebei University , Baoding 071002 , China)

Abstract : A high performance capillary electrophoresis (HPCE) method has been established for the separation of Brilliant Blue and Amaranth in carbonated beverages. Sunset Yellow was added into the sample as the internal standard. The separation was carried out on a fused-silica uncoated capillary column (40 cm \times 75 μm). The sample was injected by air pressure injection (14 kPa \times 3 s) at room temperature. The analysis was completed in 10 mmol/L Na_2HPO_4 buffer (pH 8.56) at 20 kV of separation voltage and 390 nm of detection wavelength. The relative correction factors of Brilliant Blue and Amaranth were 0.832 9 and 1.225 3 , and the relative standard deviations (RSDs) were 3.3% and 2.6% , respectively. The respective quantification limits ($S/N=10$) were 1.629 mg/L and 4.160 mg/L , the recoveries were in the ranges of 97.87% - 102.1% (RSD = 1.8%) and 94.07% - 103.8% (RSD = 4.1%) , and the method precisions were 3.2% and 2.0%. The optimization of the pretreatment made the method more suitable for the determination of Brilliant Blue and Amaranth in carbonated beverages by capillary electrophoresis. The systematic error brought by the background was eliminated basically by using the blank sample as the base solution. The relative factors of Brilliant Blue and Amaranth were reproducible in the ranges of 1.629 - 228.8 mg/L and 4.16 - 401.6 mg/L , respectively. So this method can be used to quantify the two synthetic pigments in carbonated beverages accurately.

Key words : high performance capillary electrophoresis (HPCE) ; internal standard method ; Brilliant Blue ; Amaranth ; drinks

* 通讯联系人 : 闫 正 , 副教授 , 主要从事色谱分析和应用的研究。E-mail : yanzh@hbu.edu.cn.

收稿日期 2010-09-06

人工合成着色剂因成本低、品种多、色泽鲜艳、易着色且稳定的特点而被广泛应用于各种工业生产中。但由于它是以化工产品为原料经有机反应合成的,其化学构成物与合成过程中产生的杂质对人体都有毒害。我国《食品添加剂使用卫生标准》^[1]严格规定食品中亮蓝和苋菜红最大使用限量为 0.025 g/kg 和 0.05 g/kg。因此需要建立快速而准确的方法来测定食品中的人工合成色素含量。

目前食品中人工合成色素含量的测定比较常用的方法有分光光度法^[2,3]、高效液相色谱法(HPLC)^[4-7]、高效液相色谱-质谱法^[8-10]、高效毛细管电泳法(HPCE)^[11,12]等。这些方法通常采用外标标准曲线法定量。本课题组也曾试验过高效毛细管电泳外标标准曲线法测定饮料中日落黄的含量,但稳定性欠佳,当标准溶液的质量浓度为 39.84 mg/L 时,测定值的相对标准偏差(RSD)为 7.0% ($n=11$)。本文以日落黄作内标物,采用内标法同时测定饮料中亮蓝和苋菜红含量。为了消除由样品背景造成的系统误差,本文以样品背景溶液为基液进行各项测定,所得结果的稳定性基本达到了 HPLC 水平。对于样品预处理,《食品中合成着色剂的测定》^[13]中规定了用于 HPLC、薄层色谱法和示波极谱法进行测定的样品处理方法,但没有适用于 HPCE 的处理方法。本文以文献[13]中用于 HPLC 测定的色素提取中的聚酰胺吸附法为基础,对样品预处理方法进行了改进和优化研究,使之更适合于毛细管电泳分析,实现了快速而有效的样品预处理。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

高效毛细管电泳仪(TH-3000 高效毛细管电泳仪,配紫外检测器(UVD),含定压定时冲洗进样系统(保定天惠分离科学研究所);弹性石英毛细管(河北永年锐洋色谱器件有限公司)。

无水乙醇、氨水、氢氧化钠、无水碳酸钠、磷酸氢二钠均为分析纯试剂(天津市天大化工实验厂);聚酰胺 100~200 目(色谱级,上海天莲精细化工有限公司);亮蓝、日落黄、苋菜红(食品级)。

磷酸氢二钠溶液(10 mmol/L),氢氧化钠溶液(0.5 mol/L),碳酸钠溶液(0.25 mol/L),酸洗液为乙酸-甲醇(1:9, v/v)溶液,碱洗液为无水乙醇-氨水-水(7:2:1, v/v)溶液。

质量浓度均为 0.500 g/L(用超纯水配制)的亮蓝、日落黄、苋菜红标准储备液。

样品为市售葡萄味碳酸饮料。

1.2 样品预处理

称取样品 40.00 g 于烧杯中,将 2 g 聚酰胺粉末用少许水调成粥状,倒入样品溶液中,搅拌片刻,用 G3 垂融漏斗抽滤,用超纯水冲洗 3~5 次,用乙酸-甲醇溶液搅拌洗涤 3 次(每次约 10 mL),超纯水冲洗 3~5 次,弃去滤液,用无水乙醇-氨水-水溶液搅拌解吸色素 5 次(每次约 10 mL)。收集解吸液于烧杯中,小火加热蒸发溶剂至近干,于 80 °C 左右烘干。冷却后,用超纯水溶解,定量转移至 25 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀。用 0.22 μm 水系滤头过滤后上机测试。

1.3 电泳条件

弹性未涂层石英毛细管(有效长度 40 cm,内径 75 μm);分离电压 20 kV,进样量 14 kPa×3 s;分离温度为室温;背景电解质为 10 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液;检测波长 390 nm。每次进样前依次用无水乙醇、0.5 mol/L NaOH、0.25 mol/L Na₂CO₃、超纯水和缓冲液各冲洗毛细管 2 min。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理条件的选择

参照《食品中合成着色剂的测定》的国家标准方法^[13]中用于 HPLC 测定的色素提取中的聚酰胺吸附法,针对紫色碳酸饮料所含的相关色素进行样品预处理方法的优化以适用于 HPCE 测定。该方法中指出样品需用柠檬酸调节 pH 到 6,并加热到 60 °C 再进行吸附。本文的研究结果显示,不调节 pH 也可完全吸附;样品在 8~60 °C 范围内的吸附效率无显著性差异,因此无需加热。采用酸洗样品可除去天然色素,若去掉该步骤,则两色素峰之间会出现一个未知峰。国家标准方法以甲酸-甲醇(4:6, v/v)冲洗聚酰胺吸附的样品色素,肉眼可见洗脱液呈蓝色,上机定性证明是亮蓝。本文以乙酸-甲醇(分别为 4:6、3:7、2:8、1:9, v/v)进行处理,可洗脱未知峰又不影响被测组分。经过优化,选用乙酸-甲醇(1:9, v/v)进行洗脱。解吸液中含有氨水和乙醇,国家标准方法中用乙酸中和后蒸干。本文采用直接蒸干方法即可除去。

本文样品预处理过程中,解吸液蒸干后样品中会有白色不溶物,取该不溶物加水搅拌后过滤,滤液进样测试无峰,因此对测定结果无影响。

2.2 电泳分离条件的优化

2.2.1 缓冲溶液的选择

考察了 3 种缓冲液对样品检测结果的影响:(1)分别以 10、20 和 40 mmol/L 硼砂缓冲液进行分

离,浓度高时焦耳热大,噪声大,背景值高;浓度低时苋菜红峰形很差;分离周期约 7 min,基本不随浓度变化而变化。(2)分别以 10、20 和 30 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液进行分离,所有浓度下的背景噪声均较小,但峰形较差,分离周期大于 60 min。(3)分别以 5、10、15 和 20 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液进行分离,所有浓度下的分离周期约 6 min,浓度高时峰形尖锐,但背景噪声大,浓度低时峰展宽。综合考虑上述因素,最终选择 10 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液作为背景电解质。

2.2.2 检测波长和分离电压的选择

由于实际样品中亮蓝的添加量很少,所以检测波长的选择以亮蓝的响应值最高为准。考察了不同光源、不同波长(氙灯 200 ~ 400 nm,钨灯 400 ~ 600 nm)下样品的响应值,最终选择在氙灯 390 nm 下测定。

分离电压的选择综合考虑了分辨率和分离周期,最终选定 20 kV。

2.3 线性范围

在空白样品中加入内标物日落黄 20 mg/L,亮蓝和苋菜红添加水平分别为 1.629 ~ 407.2 mg/L 和 4.16 ~ 502.0 mg/L。按 1.2 节方法每个添加水平平行处理 3 份,按 1.3 节电泳条件每个样品测定 5 次,结果以相对峰面积表示。亮蓝和苋菜红的线性范围分别为 1.629 ~ 228.8 mg/L 和 4.16 ~ 401.6 mg/L,线性相关系数分别为 0.999 2 和 0.997 7。

2.4 相对校正因子和样品测定

在空白样品中加入日落黄 20 mg/L,亮蓝和苋菜红的添加水平分别为 2.064 ~ 61.92 mg/L 和 4.16 ~ 124.8 mg/L;每个添加水平平行处理 3 份样品,每个样品测定 5 次,以峰面积计算亮蓝和苋菜红相对校正因子,结果见表 1。

表 1 亮蓝和苋菜红的相对校正因子
Table 1 Relative correction factors of Brilliant Blue and Amaranth

Pigment	Added/ (mg/L)	Relative correction factor	Average of relative correction factor	RSD/% ($n = 6$)
Brilliant Blue	2.064	0.7902	0.8329	3.3
	4.128	0.8192		
	10.32	0.8253		
	20.64	0.8502		
	30.96	0.8456		
	61.92	0.8669		
Amaranth	4.16	1.1963	1.2253	2.6
	10.4	1.1851		
	20.8	1.2352		
	31.2	1.2392		
	62.4	1.2540		
	124.8	1.2418		

在样品中加入日落黄 20 mg/L,按 1.2 节方法平行处理样品 5 份,按 1.3 节电泳条件每个样品测定 5 次,以峰面积计算亮蓝和苋菜红的含量分别为 2.097 mg/kg (RSD = 3.4%) 和 25.09 mg/kg (RSD = 2.8%)。样品及加入内标物后的谱图见图 1。

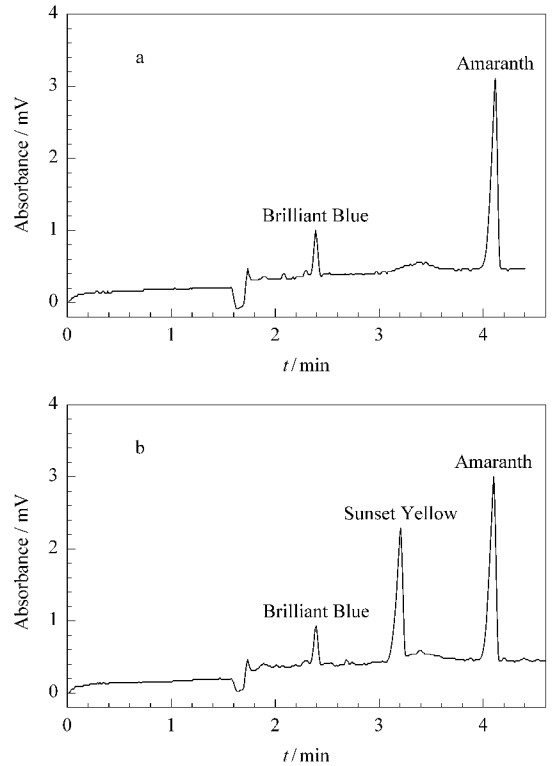


图 1 (a)实际样品和(b)加入内标物后样品的毛细管电泳谱图
Fig. 1 Electropherograms of (a) a real sample and (b) the sample added with internal standard

2.5 方法的检出限、定量限和回收率

以信噪比(S/N)为 3 计,亮蓝和苋菜红的检出限分别为 0.407 2 和 1.236 mg/L;以 S/N 为 10 计,两者的定量限分别为 1.629 和 4.160 mg/L。

在空白样品中添加内标物日落黄 20 mg/L,亮蓝和苋菜红添加水平分别为 1.629 ~ 9.772 mg/L 和 10.30 ~ 123.6 mg/L。按 1.2 节方法每个添加水平平行处理 3 份,按 1.3 节电泳条件每个样品测定 5 次,计算回收率和 RSD,亮蓝的回收率为 97.87% ~ 102.1%,RSD 为 1.8%;苋菜红的回收率为 94.07% ~ 103.8%,RSD 为 4.1%。

2.6 方法的精密度和样品的稳定性

以实际样品测定方法的精密度和样品稳定性。以相对峰面积计算,亮蓝和苋菜红日内 RSD($n = 11$)分别为 3.2% 和 2.0%,表明方法的精密度良好。

将样品保存在约 8 °C 的冰箱内,7 d 内隔日测定,亮蓝和苋菜红日间相对峰面积的 RSD 分别为 2.3% 和 2.0%,表明在低温下样品在 7 d 内稳定。

3 结论

建立了碳酸饮料中亮蓝和苋菜红的高效毛细管电泳内标测定方法。通过样品预处理的优化、背景干扰的扣除以及内标法定量,使得该方法定量的稳定性基本达到了 HPLC 水平,可满足实际样品测定。对于碳酸饮料中人工合成色素的内标测定法,应选择与被测组分性质相近的内标物质,即在样品预处理过程中,内标物与组分有相同的吸附特性,这样可避免由于吸附特性差异所带来的系统误差。碳酸类饮料由于组成简单,基质干扰较小,本文建立的方法适用于该类饮料的测定。果汁及乳类饮料组成相对复杂,本文建立的方法是否完全适用于这些类型饮料的测定还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] GB 2760-2007
 [2] Ni Y N, Wang Y, Kokot S. *Talanta*, 2009, 78(2): 432

- [3] Du J Z, Li Q M, Zhu Y Q, et al. *Food Science* (杜建中, 李青梅, 朱芝强, 等. 食品科学), 2010, 31(10): 259
 [4] Ding Y, Qiu P L, Huang Q T, et al. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (丁怡, 邱佩丽, 黄秋婷, 等. 中国卫生检验杂志), 2009, 19(6): 1262
 [5] Yoshioka N, Ichihashi K. *Talanta*, 2008, 74(5): 1408
 [6] Diao X X. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (刁晓霞. 中国卫生检验杂志), 2010, 20(4): 769
 [7] Wang H, Cao X Y, Li L, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (汪辉, 曹小彦, 李林, 等. 分析测试学报), 2009, 28(10): 1194
 [8] Murty M R V S, Chary N S, Prabhakar S, et al. *Food Chem*, 2009, 115(4): 1556
 [9] Sun H W, Wang F C, Ai L F. *J Chromatogr A*, 2007, 1164 : 120
 [10] Li B R, Feng J L, Pan Z Q, et al. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (李帮锐, 冯家力, 潘振球, 等. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(4): 579
 [11] Mejia E, Ding Y S, Mora M F, et al. *Food Chem*, 2007, 102(4): 1027
 [12] Pérez-Urquiza M, Beltrán J L. *J Chromatogr A*, 2000, 898 : 271
 [13] GB/T 5009. 35-2003