

## 工夫红茶中三种合成色素的测定

### The determination of three kinds of synthetic pigment in red tea

许祯毅<sup>1,2</sup>

XU Zhen-yi<sup>1,2</sup>

(1. 武夷山市质量计量检测所, 福建 武夷山 354300; 2. 武夷山市茶叶产品质量检验所, 福建 武夷山 354300)

(1. *Quality and Measurement Research Institution of Wuyishan, Wuyishan, Fujian 354300, China*;

2. *The Tea Product Quality Inspection of Wuyishan, Wuyishan, Fujian 354300, China*)

**摘要:**建立高效液相色谱法测定工夫红茶中柠檬黄、胭脂红、日落黄 3 种合成色素的检测新方法。样品经蒸馏水浸泡后,用聚酰胺粉进行吸附,过滤,水洗至中性后用乙醇—氨水—水(体积比 7:2:1)的混合溶剂解吸,解吸液定容后经甲醇和乙酸铵溶液梯度淋洗,用紫外检测器检测,检测波长为 254 nm,测得柠檬黄、胭脂红、日落黄的保留时间分别为 2.37, 5.48, 6.88 min,线性相关系数分别为 0.999, 0.994, 0.999,回收率测试表明回收率基本在 86.9%~100.4%,RSD 为 2.7%~3.9%,该方法快速、简单方便。

**关键词:**高效液相色谱;合成色素;工夫红茶

**Abstract:** A new analytical method was developed for determination synthetic pigment in red tea with rouge yellow, lemon yellow and sunset yellow by high performance liquid chromatography (HPLC). Polyamide power was used as absorbent after the samples were soaked by distilled water, filtered, washed to neutral, and then desorbed using ethanol/ammonia/water (volume ratio 7:2:1) mixed solvent. After metering volume, the stripping liquid with gradient elution of methanol and ammonium acetate solution were determined by UV detector at 254 nm. The results showed that the retention time of lemon yellow, rouge yellow and sunset yellow was 2.37, 5.48 and 6.88 min respectively, and the linear correlation coefficient was 0.999, 0.994 and 0.999 accordingly. Furthermore, the overy test showed that the recovery rate ranged from 86.9% to 100.4%, and RSD from 2.7 to 3.9. Resultingly, a quick and simple detection approach of the pigments in red tea was developed in the present study.

**Keywords:** HPLC; synthetic pigment; red tea

合成色素是指利用化学方法合成的一种可以改变其它物质

颜色的化合物,包括非食用色素和食用色素。其中食用合成色素色彩鲜艳、着色力强、易溶于多种溶剂且稳定性好,另外相比于天然色素其成本更低、供货量充足、纯度更高,因此普遍应用于食品生产中<sup>[1]</sup>。研究显示大部分的合成色素皆为偶氮类色素<sup>[2]</sup>,该类色素长期食用具有致癌和致畸的弊端<sup>[3-4]</sup>。

在加工过程中红茶发生了一系列的化学反应,例如以茶多酚的酶促氧化为中心的化学反应,产生了茶黄素、茶红素等新成分,所以茶叶的颜色经历了绿色、红色、棕色再到乌黑色的变化<sup>[5]</sup>。一些小作坊、生产企业为了增加红茶的“卖相”,茶汤的“橙红色”或“明亮度”,追求更好的“感官品质”<sup>[6]</sup>和更大的利润空间,会在工夫红茶中人为、非法地添加柠檬黄、胭脂红、日落黄等合成色素。这种违法现象的存在,不仅严重破坏红茶产业安全、健康、有序发展的良好环境,而且还严重威胁到饮用者的生命健康安全。因此,研究茶叶中合成色素的含量是非常有意义的。

目前,合成色素的检测方法有层析法、电分析法、分光光度法、高效液相色谱法等<sup>[7]</sup>,对于多组分合成色素混合物的分析,层析法操作复杂,且定量准确度较差;分光光度法需结合化学计量的方法,数据处理较为繁琐;电分析法则重现性较差;而高效液相色谱法操作简单、快速、重复性好、检出限低。因此,高效液相色谱法成为食品中合成色素检测的有效方法。该方法已经被广泛应用于肉类制品<sup>[8]</sup>、饮料<sup>[9]</sup>、蜜饯<sup>[10]</sup>、面食糕点<sup>[11-12]</sup>、葡萄酒<sup>[13]</sup>等食品中合成色素的检测,但尚未应用于茶叶中合成色素的检测。因为茶叶是一种特殊的食品,其成份复杂,所含天然色素种类多<sup>[14]</sup>,因此在分析茶叶中合成色素含量(痕量分析)时,若净化过程不完全,会对色素含量造成假阳性干扰,从而影响检测结果的检出限、定量限、灵敏度、准确度等。因此本试验拟以工夫红茶为例,研究茶叶产品中合成色素的检测方法,以聚酰胺粉作为吸附/解吸剂,采用高效液相色谱法分离和检测日落黄、胭脂红和柠檬黄 3 种合成色素的含量,通过对流动相、浸泡时间、聚酰胺粉使用量、溶液 pH 值等条件的优化,确定最佳试验

**基金项目:**国家质检总局科技计划项目(编号:2013QK311);南平市科技项目(编号:N2014Z15)

**作者简介:**许祯毅(1986—),男,武夷山市质量计量检测所助理工程师。E-mail: xuzhenyi059@163.com

**收稿日期:**2016-03-01

条件,旨在为茶叶产品中合成色素含量的检测提供可靠、准确的分析方法。

## 1 材料与与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

#### 1.1.1 材料与试剂

柠檬黄、日落黄和胭脂红标准物质:1 mg/mL,国家标准物质研究中心;

乙腈、甲醇:色谱纯,美国默克集团;

乙酸氨、氨水、柠檬酸、甲酸、乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

聚酰胺粉:粒径 100~200 目,国药集团化学试剂有限公司;

超纯水:自制;

工夫红茶样品:采购于武夷山度假区茶叶店。

#### 1.1.2 仪器设备

高效液相色谱仪:1200 型(带 DAD 检测器),美国安捷伦科技公司;

恒温水浴锅:HH-4 型,常州国华电器有限公司;

垂融漏斗:G2,天津市天玻玻璃仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipses XDB-C<sub>18</sub> 4.6 mm×100 mm,5 μm;柱温:室温;进样量:10 μL;检测波长:254 nm;流动相:B 为甲醇,D 为 0.02 mol/L 的乙酸铵溶液,采用梯度洗脱方式,具体见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient for mobile phase

时间/ min	流动相 B/%	流动相 D/%	流速/ (mL·min <sup>-1</sup> )
0	20	80	1.0
3	35	65	1.0
9	98	2	1.0
15	98	2	1.0

1.2.2 样品处理 取 2.00 g 磨碎的茶粉置于 250 mL 的锥形瓶中,加入蒸馏水 30 mL 浸泡 120 min,过滤,取滤液调 pH 至 4 待用。取 1.5 g 聚酰胺粉加少许水调成糊状,倒入滤液中,搅拌 10 min 后,用 G2 垂融漏斗抽滤,用 pH 为 4 的水洗涤 3~5 次,每次 5 mL,然后用甲醇—甲酸(体积比 6:4)混合溶液洗涤 3 次,每次 10 mL,再用蒸馏水冲洗至中性。最后用乙醇—氨水—水(体积比 7:2:1)混合溶液解吸 3 次,每次 10 mL,解吸 5 min,收集解吸液,蒸发近干,再用蒸馏水溶解,定容至 5 mL。经 0.2 μm 滤膜过滤,进样。

1.2.3 标准曲线和检出限 将 3 种色素的标准母液(1 mg/mL)分别在 10 mL 的容量瓶中用超纯水配成 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 μg/mL 的混合标准使用液,在已经优化好的色谱条件下进样,得到混合标准使用液的液相色谱图,见图 1。

然后以标准物质浓度为 X 轴,峰面积为 Y 轴,得到 3 种合成色素的标准物质回归方程和相关系数,见表 2。

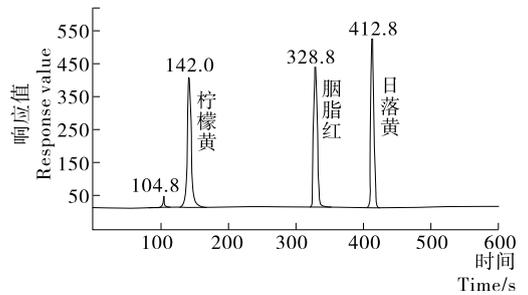


图 1 浓度为 50.0 μg/mL 的柠檬黄、胭脂红、日落黄混合标准物质色谱图

Figure 1 Chromatogram of lemon yellow, rouge red and sunset yellow standard (50.0 μg/mL)

表 2 3 种色素的标准曲线回归方程、相关系数

Table 2 The curvilinear equation and correlation coefficient of three pigment

标准物质	回归方程	相关系数(R <sup>2</sup> )
柠檬黄	Y=30.025X+29.612	0.999
胭脂红	Y=25.471X+14.780	0.994
日落黄	Y=23.786X+3.763	0.999

按 3 倍信噪比计算检出限,得到柠檬黄的检出限为 0.2 mg/kg、胭脂红的检出限为 0.4 mg/kg、日落黄的检出限为 0.3 mg/kg。

## 2 结果与讨论

### 2.1 茶粉浸泡时间

本试验采用蒸馏水浸泡茶叶粉末,因为茶叶中含有丰富的色素,因此随着浸泡时间的增加,茶汤中水浸出物的含量也在不断增加,并将一定时间后达到溶出平衡。为了考察浸泡时间对合成色素检测的影响,试验往茶粉中加入 25 mg/kg 的混合标准工作液,分别将茶粉用水浸泡 10, 30, 60, 120, 360 min 后,按 1.2.2 的方法进行处理后,检测合成色素的含量,并计算加标回收率。

茶叶所含的色素包括脂溶性色素和水溶性色素<sup>[15]</sup>,其中水溶性色素随着浸泡时间的延长均可溶出达到溶解平衡,使得聚酰胺粉能一次吸附完全,若浸泡时间不足,茶叶中的水溶性色素浸出不完全,会在后续的清洗、净化中不断溶出,干扰试验结果。由图 2 可知,随着浸泡时间的增加,合成色素的回收率也随之增加,但 120 min 后,回收率基本不变,表明此时茶叶中水溶性色素已达到溶出平衡,因此本试验确定茶粉的浸泡时间为 120 min。

### 2.2 聚酰胺粉添加量

聚酰胺粉作为吸附剂,在酸性条件下可吸附合成色素<sup>[16]</sup>,因此为了考察不同聚酰胺粉添加量对色素的吸附影响,取 2.0 g 茶粉置于锥形瓶中,加入 50.0 μg/mL 的混合标准工作液 1 mL,相当于加标水平为 50.0 mg/kg,用水浸泡 120 min 后,分别往茶汤中加入 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g 聚酰胺粉,按 1.2.2 的方法进行试验,测定合成色素的回收率。

由图 3 可知,聚酰胺的添加量对合成色素的回收率影响

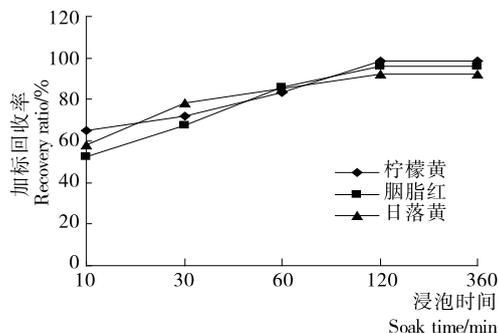


图 2 茶粉浸泡时间与合成色素回收率关系图

Figure 2 The diagram of synthetic colorants recovery and soak time for Red tea

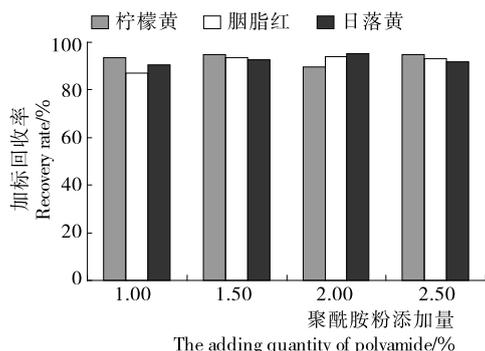


图 3 聚酰胺粉添加量对合成色素回收率的影响

Figure 3 The diagram of synthetic colorants recovery and the quantity of polyamide for red tea

不大,回收率均可达到 86.9% 以上,故不同聚酰胺的添加量都能满足试验要求。另外考虑到聚酰胺粉添加量增多会增加试验过滤时间,因此本试验采用聚酰胺粉的添加量为 1.5 g。

### 2.3 溶液 pH 值的影响

聚酰胺粉吸附原理是通过酰胺键与合成色素分子中电负性大的元素形成氢键而产生吸附,在酸性条件下吸附能力最强<sup>[17]</sup>,因此反应溶液的 pH 值会对吸附结果产生较大影响。为了考察不同 pH 条件下聚酰胺对合成色素的吸附影响,用柠檬酸溶液调节茶汤的 pH 值,在 pH 为 1,3,4,5,6 的条件下,按 1.2.2 的方法进行 3 种合成色素的加标回收率试验,并计算加标回收率。

由图 4 可知,当茶汤的 pH 为 1 时,茶粉中合成色素的回收率只有 10%~30%,这是由于在酸性介质中酰胺键能以氢键形式结合质子,从而使聚酰胺表面带大量正电荷,以吸附偶氮类合成色素在水溶液中解离出来的带负电荷的大阴离子,形成稳定的化合物,但酸性太高时,有机酸的解离受阻,吸附率反而下降;当茶汤的 pH 为 4 时,合成色素的加标回收率最高,达到 90% 左右;随着 pH 值继续增加,聚酰胺表面上的正电荷数量减少,使得吸附率降低<sup>[16]</sup>。因此试验选择在 pH 为 4 的体系中进行聚酰胺粉吸附合成色素的反应。

### 2.4 加标回收率和精密度试验

按照 1.2.2 的试验方法,向工夫红茶的茶粉中分别加入

含量为 10.0,50.0,100.0 mg/kg 的 3 种合成色素的混合标准工作液,进行平行试验,验证此方法的加标回收率。同时以 50 mg/kg 的添加水平重复测试 6 次,计算相对标准偏差 (RSD),考察方法精密度,试验结果(表 3)表明,该方法的加标回收率为 86.9%~100.4%,相对标准偏差 2.7%~3.9%,符合试验要求。

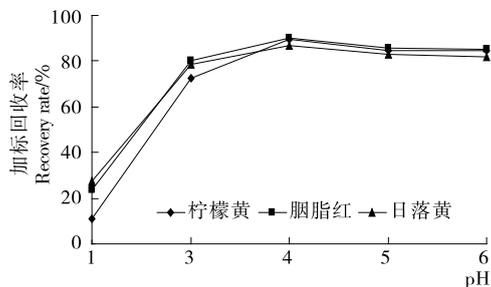


图 4 茶汤溶液的 pH 值与回收率的关系图

Figure 4 The diagram of synthetic colorants recovery and the pH value of tea liquor

表 3 加标回收率和精密度试验结果

Table 3 The test result of recovery and precision ( $n=6$ )

色素名称	添加水平/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	试验回收 率/%	RSD/%
柠檬黄	10	96.7	3.4
	50	98.3	
	100	100.4	
胭脂红	10	91.2	2.7
	50	99.1	
	100	89.6	
日落黄	10	86.9	3.9
	50	96.8	
	100	96.7	

## 3 结论

(1) 本试验建立了高效液相色谱检测工夫红茶中合成色素的方法,茶粉浸泡后用聚酰胺粉进行吸附,过滤,水洗至中性后用乙醇—氨水—水(体积比 7:2:1)的混合溶剂解吸,用纯水定容后用高效液相色谱进行检测。结果表明,柠檬黄、胭脂红、日落黄 3 种合成色素在 5~100 μg/mL 时,其质量浓度与峰面积线性关系良好,方法检出限为 0.2~0.4 mg/kg。在 3 个添加水平下,回收率在 86.9%~100.4%,相对标准偏差小于 5%,该方法回收和稳定性良好,填补中国茶叶产品中合成色素检测的空白。

(2) 该方法不仅操作简单,而且成本较低,可满足基层检验机构对茶叶中合成色素的检测需要,但因试验时间较长而不适合大批量样品检测。增配聚酰胺固相萃取小柱可有效解决该问题,但检验成本大幅增加,不适合在业务量较少的实验室使用。

(下转第 131 页)

- monocytogenes*, and *Salmonella enteric*[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(10): 1 545-1 560.
- [2] 张鹰, 曾新安, 温其标. 生物防腐剂及其在食品中的应用[J]. *食品与机械*, 2006, 22(1): 77-79.
- [3] 夏秀芳, 孔保华, 于长青. 几种天然香辛料提取物延长冷却肉货架期的研究[J]. *食品与机械*, 2008, 24(3): 55-59.
- [4] DEVI K P, NISHA S A, SAKTHIVEL R, et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130(1): 107-115.
- [5] 王金宇, 李淑芬, 关文强. 酵母细胞微胶囊化丁香油的研究[J]. *食品科学*, 2006, 04(27): 154-157.
- [6] 郝喜海, 孙森, 邓靖, 等. 丁香精油- $\beta$ -环糊精包合物的缓释抗菌性能[J]. *食品科学*, 2012, 11(33): 86-88.
- [7] 蔡茜彤, 段小明, 冯叙桥, 等. 微胶囊技术在食品添加剂中的应用与展望[J]. *食品与机械*, 2014, 30(4): 247-270.
- [8] RANASINGHE L, JAYAWARDENA B, ABEYWICKRAMA K. An integrated strategy to control post-harvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2005, 40(1): 97-103.
- [9] 谢晶, 金晨钟, 陈礼刚, 等. 复合植物精油乳液的制备研究[J]. *湖南农业科学*, 2011(3): 112-114.
- [10] 雍国平, 方力, 方望, 等. 丁香油的微乳液研究[J]. *食品科学*, 2001, 22(9): 26-27.
- [11] HOAR T P, SCHULMAN J H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle [J]. *Nature*, 1943, 152: 102-103.
- [12] 于梦, 钟芳, 麻建国, 等. 薄荷油微乳液的多孔淀粉固化及其在卷烟中应用[J]. *食品与机械*, 2008, 24(3): 29-33.
- [13] SPERNATH A, ASERIN A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, 128: 47-64.
- [14] FERNANDEZ P, ANDR V, RIEGER J, et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion[J]. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004, 251: 53-58.
- [15] MEHTA S K, BALA K. Tween-based microemulsions: a percolation view[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2000, 172(2): 197-209.
- [16] HAMMER K A, CARSON C F, RILEY T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86(6): 985-990.
- [17] 王浩. 丁香油乳化体系的制备及抗菌特性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [18] 徐文婷. 非离子表面活性剂形成微乳的规律性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [19] TROTTA M, CAVALLI R, UGAZIO E, et al. Phase behaviour of microemulsion systems containing lecithin and lysollecithin as surfactants[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 143(1): 67-73.
- [20] 付婷婷. 番茄红素微乳的制备及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 19.
- [21] FANG J, VENABLE R L. Conductivity study of the microemulsion system sodium dodecyl sulfate-hexylamine-heptane-water[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1987, 116(1): 269-277.
- [22] AI-ADHAM I, AI-NAWAJEH A, KHALIL E, et al. The Antimicrobial activity of oil-in-water microemulsions is predicted by their position within the microemulsion stability zone[J]. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 2(2): 2-8.
- [23] 周建新, 许华, 金浩. 丁香油抑菌效果与抑菌成分的研究[J]. *食品工业*, 2000(3): 24-25.

(上接第 68 页)

### 参考文献

- [1] 肖海龙, 屠海云, 王红青, 等. 反相高效液相色谱法快速测定食品中 18 种水溶性合成色素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(2): 264-266.
- [2] 陈国庆, 吴亚敏, 王俊, 等. 常用合成食品色素荧光光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(9): 2 518-2 522.
- [3] 刘成伦, 李小庆, 王晶, 等. 偶氮类非食用色素的快速测定方法研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(5): 273-276.
- [4] 邱会东. 食用合成色素分析方法的研究进展[J]. *食品与机械*, 2006, 22(2): 102-104.
- [5] 夏涛. 试析茶叶红变原理及红茶色泽形成的调控[J]. *福建茶叶*, 1996(4): 15-18.
- [6] 成洲, 廖茜, 姚逸. 几种工夫红茶的茶汤色泽与感官品质之间的相关性[J]. *天津农业科学*, 2014, 20(3): 71-75.
- [7] OZDEMIR OLGUN F A, DEMIRATE OZTURK B, APAK R. Determination of synthetic food colorants in powder beverage samples by on-line HPLC-cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) assay with post-column detection [J]. *Chromatographia*, 2016, 79(3): 199-208.
- [8] 范文锐, 吴青, 劳扬, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 7 种非食用色素[J]. *分析化学*, 2012, 40(2): 292-297.
- [9] 张婉, 王覃, 杜宁, 等. 超高效液相色谱法同时测定饮料中 5 种人工合成色素[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 177-180.
- [10] 林芳, 李涛, 王一欣, 等. 固相萃取—超高效液相色谱法同时测定蜜饯中 9 种合成色素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 567-573.
- [11] 符锋, 范会平, 秦学磊. 高效液相色谱法对挂面中食用合成色素的测定[J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 325-328.
- [12] 米迎春, 黄蔚, 刘国, 等. 高效液相色谱法同时测定糕点中 4 种食用合成色素[J]. *食品与机械*, 2011, 27(4): 78-81.
- [13] 张慧, 顾强, 乙小娟, 等. 变波长高效液相色谱法同时测定葡萄酒中 7 种人工合成色素及防腐剂[J]. *食品与发酵科技*, 2015, 51(6): 64-67.
- [14] 陈睿. 茶叶功能性成分的化学组成及应用[J]. *安徽农业科学*, 2004, 32(5): 1 031-1 033, 1 036.
- [15] 谭和平, 叶善蓉, 陈丽, 等. 茶叶中色素的测试方法概述[J]. *中国测试*, 2009, 35(2): 78-82.
- [16] 肖艳, 袁云霞, 王金林, 等. 高蛋白食品中多种人工合成色素的提取及检测[J]. *分析科学学报*, 2010, 26(5): 578-579.
- [17] 刘海玲, 姜艳玲. 聚酰胺对变色酸偶氮类化合物的吸附性能及应用[J]. *桂林工学院学报*, 2002, 20(2): 179-182.