

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90101

# 超高效液相色谱法快速测定饮料中赤藓红含量

## Rapid determination of erythrosine in beverages by UPLC

谢 赛

XIE Sai

(北京市东城区疾病预防控制中心, 北京 100009)

(Beijing Dongcheng District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100009, China)

**摘要:**目的:建立一种简便处理样品并准确快速检测赤藓红含量的超高效液相色谱法(UPLC)。方法:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 采用二极管阵列检测器,检测波长 530 nm;柱温 40 °C;流动相为乙腈—0.02 mol/L 乙酸铵溶液(乙酸调节 pH 至 6.25);梯度洗脱:乙腈 0 min—5%, 2 min—25%, 3 min—45%, 6 min—70%, 6.5 min—5%, 8 min—5%;流速 0.3 mL/min;进样量 5 μL。待测样品加氨水调节 pH 至 7.00,用 5% 乙腈水溶液溶解,超声提取 30 min,过 0.20 μm 滤膜后直接上机测定。结果:赤藓红标准曲线相关系数  $R^2 > 0.999$ ,加标回收率为 92%~109%,相对标准偏差(RSD) < 3.2%,检出限(LOD)为 0.01 mg/L,定量限(LOQ)为 0.03 mg/L。结论:该方法适用于大批饮料中赤藓红含量的准确快速测定。

**关键词:**赤藓红;饮料;超高效液相色谱法;快速检测

**Abstract: Objective:** In order to develop a method, an easy handling of samples and accurate and rapid detection of erythrosine by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was established. **Methods:** The analysis was as follows: chromatographic column of ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), diode array detector with detection wavelength at 530 nm, column temperature at 40 °C, mobile phase with acetonitrile and 0.02 mol/L ammonium acetate solution (acetic acid to adjust pH 6.25), gradient elution including acetonitrile 0 min—5%, 2 min—25%, 3 min—45%, 6 min—70%, 6.5 min—5% and 8 min—5%, flow rate at 0.3 ml/min, and with injection volume of 5 μL. The pH of samples was adjusted to 7.00 by ammonia. Then 5% acetonitrile aqueous solution was used to extract with ultrasonic for 30 min. After filtration by 0.20 μm filter membrane, it was directly measured by UPLC. **Results:** The correlation coefficient of erythrosine standard curve was greater than 0.999. The spiked recovery

eries ranged from 92% to 109%. The relative standard deviation (RSD) was lower than 3.2%. The limit of detection (LOD) was 0.01 mg/L and the limit of quantification (LOQ) was 0.03 mg/L.

**Conclusion:** The method was suitable for accurate and rapid determination of erythrosine in a large number of beverages.

**Keywords:** erythrosine; beverages; UPLC; rapid detection

为使食品保持或增加色泽,增进食欲,吸引消费者目光,生产厂家往往向食品中添加一些天然色素或合成色素。合成色素是以苯、甲苯、萘等化工产品为原料,经过磺化、硝化、卤化、偶氮化等有机反应制成<sup>[1]</sup>。合成色素具有价格低廉、稳定性好、不易褪色等优点,被广泛应用于食品加工行业中,但合成色素有一定毒性,过多食用会危害人体健康,甚至产生致癌性和致突变性等危害<sup>[2]</sup>。

赤藓红(Erythrosine, E127)呈红色或红褐色,为非偶氮类人工合成着色剂,相较于大多数偶氮类合成色素,其具有化学结构和性质上的差异<sup>[3]</sup>。国际食品法典委员会(CAC)、欧盟、美国、中国、日本和韩国等都允许在饮料中使用赤藓红<sup>[4]</sup>。其检测方法有液相色谱法<sup>[5]</sup>、表面增强拉曼光谱法<sup>[6]</sup>、免疫 PCR 法<sup>[7]</sup>、示波极谱法<sup>[8]</sup>等,其中有关高效液相色谱法(HPLC)测定赤藓红的研究较多<sup>[9-12]</sup>,但是样品的检测时间较长,除去前处理时间,每件样品上机测定时间约需 30 min,且有机试剂消耗量较大。表面增强拉曼光谱法适用于现场快速检测但检出限较高,免疫 PCR 法的回收率范围较宽,示波极谱法为早期研究方法但目前研究较少。超高效液相色谱(UPLC)是传统高效液相色谱技术的升级和提高,与传统的高效液相色谱相比具有分离度好、检测速度快和灵敏度高等优点,可以有效缩减检测时间与节省试剂用量,高效和环保优势明显<sup>[13]</sup>。

在色素前处理方法中,目前有关含赤藓红样品的前处理方法有液—液萃取法<sup>[14]</sup>和固相萃取法<sup>[15-16]</sup>。GB 5009.35—2016 对含赤藓红样品单独标明了液—液萃取法的前处理方法,其提取步骤多、试剂多,操作繁琐,且加

**作者简介:**谢赛(1992—),女,北京市东城区疾病预防控制中心初级检验师,硕士。E-mail: 13552761962@163.com

**收稿日期:**2021-09-28

标回收也有较大损失,不适合大批量样品的处理<sup>[11]</sup>。研究拟探求饮料样品中赤藓红色素的简便前处理方法,并采用超高效液相色谱法(UPLC)缩短仪器检测时间,提高分离度、灵敏度,建立快速测定饮料中赤藓红色素的方法,旨在为饮料中赤藓红色素的大批量准确检测提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 仪 器

超高效液相色谱仪:H-Class 型,美国 Waters 公司;  
超纯水处理仪:Milli-Q 型,法国 Millipore 公司;  
电子天平:MCE225S 型,德国 Sartorius 公司;  
pH 计:PH211 型,意大利 Hanna 公司。

#### 1.1.2 试 剂

甲醇、乙腈:色谱级,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;  
乙酸铵:分析级,国药集团化学试剂有限公司;  
乙酸、氨水:色谱级,美国 Sigma-Aldrich 公司;  
赤藓红标准溶液:GBW(E)100191-19002,

103  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,中国计量科学研究院。

### 1.2 方 法

1.2.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 0.3 mL/min,进样量 5  $\mu\text{L}$ ,二极管阵列检测器,检测波长 530 nm,流动相为乙腈—乙酸铵(0.02 mol/L, pH 6.25),以保留时间和光谱图定性,以峰面积定量。

1.2.2 标准系列配制 分别准确吸取质量浓度为 103  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的赤藓红标准溶液 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 mL,至 5 个 10 mL 洁净容量瓶中,用超纯水定容得到赤藓红标准溶液,质量浓度分别为 1.03, 2.06, 3.09, 4.12, 5.15 mg/L 系列标准工作溶液。

1.2.3 样品前处理 移取适量饮料样品,加入氨水调节 pH 值至 7.00,以 5% 乙腈溶液定容,超声提取 30 min,经 0.20  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,供超高效液相色谱仪测定。

1.2.4 检测波长的选择 将 2.06 mg/L 赤藓红标准溶液通过二极管阵列检测器在 210~800 nm 范围内进行全波长扫描。

1.2.5 流动相的选择 调整流动相极性,有助于促进化合物在色谱柱中的吸附洗脱能力强弱,同时改善峰形。原先使用甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵溶液作为流动相,但是赤藓红色谱峰响应较低,峰形较宽,出峰时间较晚。采用乙腈和 0.02 mol/L 乙酸铵溶液作为流动相,以冰乙酸调节乙酸铵溶液 pH 为 6.25。

1.2.6 洗脱梯度 梯度条件见表 1。

1.2.7 标准曲线绘制 取标准曲线工作溶液进行测定,进样量为 5  $\mu\text{L}$ 。赤藓红标准溶液质量浓度分别为 1.03, 2.06, 3.09, 4.12, 5.15 mg/L,以色谱峰的峰面积( $y$ )为纵坐标,以赤藓红含量( $x$ )为横坐标,绘制赤藓红的标准曲线图。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Mobile phase gradient elution conditions

时间/min	乙腈/%	0.02 mol/L 乙酸铵溶液/%
0.0	5	95
2.0	25	75
3.0	45	55
6.0	70	30
6.5	5	95
8.0	5	95

1.2.8 数据处理 使用 Excel 录入检测结果,绘制统计图表;应用配对  $t$  检验(双尾)比较方法差异,以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

由图 1 可知,当检测波长为 530 nm 时,响应值出现最大值为 0.07 AU,因此选择 530 nm 作为赤藓红的检测波长,与刘亚梅等<sup>[17]</sup>的结果一致。

### 2.2 流动相的选择

由图 2 可知,赤藓红标准溶液的一针进样检测时间为 8 min,赤藓红出峰时间适宜,保留时间为 4.371 min,色谱峰形对称,基线平稳,适用于检测分析。

### 2.3 标准曲线与检出限

由图 3 可知,赤藓红标准曲线一阶线性回归方程为  $y = 69.072 \times 10^3 x + 12.61 \times 10^3$ ,相关回归系数  $R^2 =$

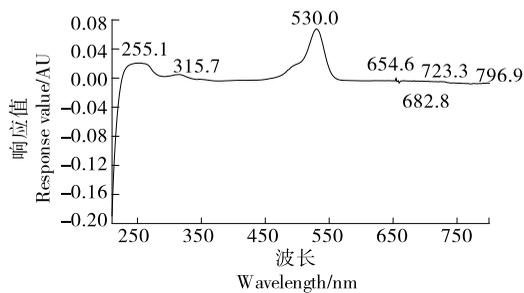


图 1 赤藓红光谱图

Figure 1 Spectrogram of erythrosine

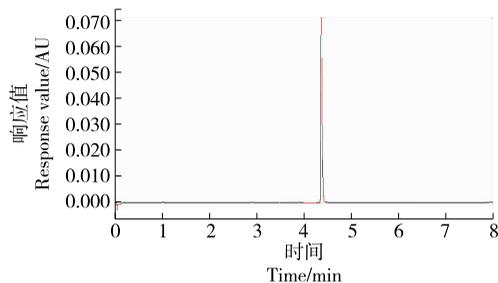


图 2 赤藓红标准溶液色谱图

Figure 2 Chromatograms of standard solutions of erythrosine

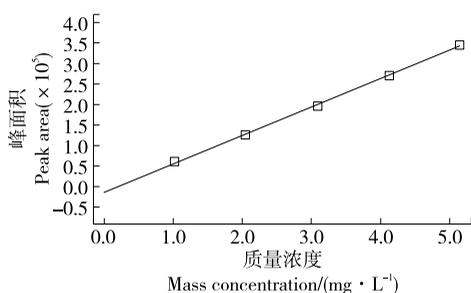


图3 赤藓红标准曲线

Figure 3 Standard curve of erythrosine

0.999 5,结果表明在 1.03~5.15 mg/L 范围内二者线性关系良好。方法定性检出限(LOD)为 0.010 3 mg/L,定量检出限(LOQ)为 0.030 9 mg/L。

#### 2.4 样品超声提取时间的选择

取市售无赤藓红的饮料样品(经 FAPAS 检测认证的阴性样品),加入赤藓红标准物质,用纯水溶解定容检测,样品中加标赤藓红不能检出。这是因为用纯水溶解时,赤藓红色素易吸附于管壁,加入一定比例的有机相乙腈后很容易将赤藓红溶解下来,且乙腈也是流动相的一部分,适宜作溶剂。而且上机前采用的注射式过滤器避免使用尼龙滤膜,因为其化学成分为聚酰胺,会吸附赤藓红而造成损失。

试验发现,加标样品中加入微量氨水(pH 值 5.56),5%乙腈水溶液溶解,可检测到赤藓红的加标回收,但回收率较低。由图 4 可知,随着超声时间的延长,赤藓红加标回收率先上升后缓慢下降再急速下降,当超声提取时间为 30 min 时,回收率达到最大值 62%。因此,确定样品超声提取的最适时间为 30 min。

#### 2.5 样品 pH 值的选择

由图 5 可知,随着样液 pH 值的增加,赤藓红加标回收率显著增大;当样品 pH 值为 7.00 时,加标回收率达到 100.7%,之后加标回收率趋于平缓;当氨水调节样品 pH 至碱性(8.00,9.00)时,加标回收率略增,然而由于饮料由酸性变碱性,样品颜色发生较大改变(由绿色变为蓝色),可能是由于 pH 值的变化造成了饮料中其他成分或色素色调的变化。最终确定样品 pH 值以氨水调至 7.00 为宜。

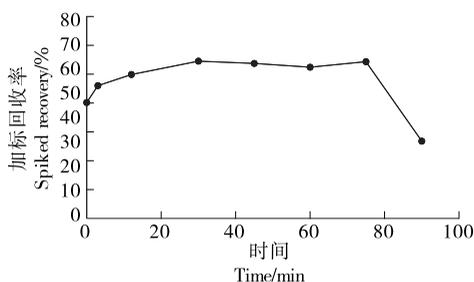


图4 超声提取时间对赤藓红加标回收率的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic extraction time on the spiked recovery of erythrosine

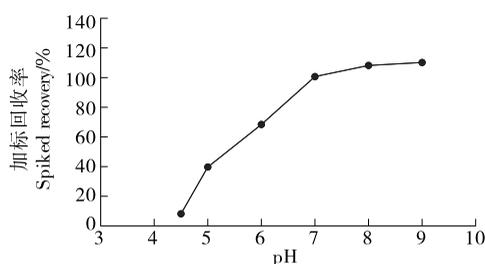


图5 样品 pH 值对加标回收率的影响

Figure 5 Effect of pH of sample on the spike recovery

#### 2.6 回收率和精密度

由表 2 可知,试验精密度的为 0.4%~3.2%,回收率为 92%~109%。

表 2 精密度和回收率测定结果

Table 2 Results of precision and recovery

本底值/ (mg · L <sup>-1</sup> )	加标量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	日内精 密度/%	日间精 密度/%	回收率 范围/%
0	1.03	0.4	2.5	92~107
0	2.06	0.9	2.8	96~104
0	4.12	1.1	3.2	95~109

#### 2.7 样品分析

应用试验建立的赤藓红含量测定方法对市售的 6 份饮料进行测定发现,网购的 1 份饮料样品中含有赤藓红(图 6),含量为 0.034 6 g/kg,未超过 GB 2760—2014 规定的限量值(0.05 g/kg),其他饮料未检出。同时采用 GB 5009.35—2016 进行检测,以配对 *t* 检验(双尾)法比较,结果表明两种方法无统计学差异。

### 3 结论

优化了饮料中合成着色剂赤藓红色素的前处理方法,建立了快速测定赤藓红含量的超高效液相色谱法。结果表明,饮料样品经氨水调节 pH 至 7.00,以 5%乙腈水溶液定容,再超声提取 30 min 后,过 0.2 μm 滤膜,可直接经 UPLC 进行测定,赤藓红标准曲线相关系数 > 0.999,加标回收率为 92%~109%,RSD<3.2%,定性检

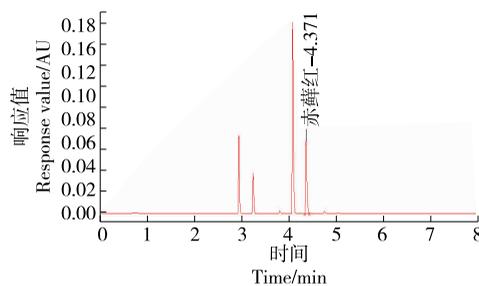


图6 市售饮料中赤藓红实测色谱图

Figure 6 Chromatogram of erythrosine in a commercially available beverage

出限为 0.01 mg/L, 定量检出限为 0.03 mg/L。该方法准确性高、灵敏度高、重现性好。解决了国家标准中赤藓红色素需要经过液-液萃取前处理方法复杂的问题, 并且不使用固相萃取柱, 最大程度地简化了样品提取步骤, 省时省力, 提高了加标回收率, 便于大批量饮料样品中赤藓红的处理检测, 适用于食品安全法用于日常市场监督检测。后续将使用超高效液相色谱法研究饮料中多种食品合成着色剂同时测定的检测方法, 以及对于复杂样品基质中赤藓红色素前处理方法的适用性研究。

### 参考文献

- [1] 郭美娟, 刘晓光, 史国华, 等. 食品中人工食用色素安全性[J]. 食品工业, 2020, 41(3): 332-336.  
GUO Mei-juan, LIU Xiao-guang, SHI Guo-hua, et al. The safety of artificial colors for food [J]. The Food Industry, 2020, 41(3): 332-336.
- [2] 汪文秀. 人工合成色素对人体的危害及天然色素的应用前景[J]. 食品安全导刊, 2019(25): 72-73.  
WANG Wen-xiu. Harm of artificial pigments to human body and application prospect of natural pigments [J]. China Food Safety Magazine, 2019(25): 72-73.
- [3] 史爱敏. 常用食品合成色素胭脂红和苋菜红的荧光光谱特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 9-17.  
SHI Ai-min. Study on the fluorescent spectra of ponceau 4R and amaranth two pigments used frequently in food[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008: 9-17.
- [4] 宋丹萍, 张宏, 李琪. 国内外食用色素标准的比较及检测方法的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 295-300.  
SONG Dan-ping, ZHANG Hong, LI Qi. Comparison of national standards for edible pigments between China and foreign countries and progress on analytical techniques [J]. Food Science, 2014, 35(3): 295-300.
- [5] 陆雅丽, 万程, 许斌, 等. 食品中赤藓红 HPLC 检测方法优化[J]. 农产品加工, 2020(20): 77-79.  
LU Ya-li, WAN Cheng, XU Bin, et al. Optimization of HPLC method for detection of erythrosine in food [J]. Farm Products Processing, 2020(20): 77-79.
- [6] 陈宏炬, 郭平, 林惠真, 等. 饮料中合成色素赤藓红的快速检测[J]. 生物加工过程, 2020, 18(4): 457-461.  
CHEN Hong-ju, GUO Ping, LIN Hui-zhen, et al. Rapid detection of synthetic pigment erythrosine in beverages [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(4): 457-461.
- [7] 龚强, 丁利, 肖家勇, 等. 免疫 PCR 方法快速检测饮料中的赤藓红[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 75-77, 81.  
GONG Qiang, DING Li, XIAO Jia-yong, et al. Rapid detection of erythrosine in drinks by immuno-PCR [J]. Food & Machinery, 2014, 30(1): 75-77, 81.
- [8] 文君, 缪红, 范柯. 示波极谱法测定食品中人工合成色素赤藓红[J]. 食品研究与开发, 2001(3): 63-64.  
WEN Jun, MIU Hong, FAN Ke. Determination of synthetic pigment erythritol in food by oscillopolarography [J]. Food Research and Development, 2001(3): 63-64.
- [9] 许彬, 林金海, 张少虹, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定蜜饯中 7 种合成着色剂的含量[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(3): 70-75.  
XU Bin, LIN Jin-hai, ZHANG Shao-hong, et al. Determination of seven synthetic colorants in preserved fruit by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. China Food Additives, 2021, 32(3): 70-75.
- [10] 丁晓燕, 韩东海, 马亚文. 预调鸡尾酒中 11 种食品添加剂的高效液相色谱同时测定法[J]. 职业与健康, 2021, 37(2): 163-166.  
DING Xiao-yan, HAN Dong-hai, MA Ya-wen. Simultaneous determination of eleven food additives in premixed cocktails by high performance liquid chromatography [J]. Occupation and Health, 2021, 37(2): 163-166.
- [11] 张敏. 固相萃取-高效液相色谱法测定碳酸饮料中 7 种合成着色剂[J]. 工业微生物, 2020, 50(4): 40-44.  
ZHANG Min. Determination of seven synthetic colorants in carbonated beverages by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(4): 40-44.
- [12] 邹沫君, 陈诚. 一种测定果汁饮料中 7 种合成色素的 HPLC 方法[J]. 饮料工业, 2020, 23(3): 42-46.  
ZOU Mo-jun, CHEN Cheng. Simultaneous determination of seven synthetic colorants in fruit juice drinks by high performance liquid chromatography [J]. Beverage Industry, 2020, 23(3): 42-46.
- [13] 李涛. 超高效液相色谱在美罗培南分析中的应用[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020: 10-16.  
LI Tao. UPLC application in analysis of meropenem [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2020: 10-16.
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中合成着色剂的测定: GB 5009.35—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 5.  
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard for determination of synthetic colorants in foods: GB 5009.35—2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 5.
- [15] 吕小丽, 朱春燕, 陈林, 等. HPLC 法测定果汁和葡萄酒中的三种红色合成色素[J]. 食品工业, 2020, 41(6): 299-302.  
LU Xiao-li, ZHU Chun-yan, CHEN Lin, et al. Determination of three red synthetic pigments in juice and wine by HPLC [J]. The Food Industry, 2020, 41(6): 299-302.
- [16] 李清伟, 梁桂娟, 周祖亮. 高效液相色谱法测定饮料中的新红、诱惑红及赤藓红[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 175-177.  
LI Qing-wei, LIANG Gui-juan, ZHOU Zu-liang. Determination of new red, fancy red and erythrosine in drinks by HPLC [J]. China Brewing, 2017, 36(3): 175-177.
- [17] 刘亚梅, 庄晓洪. 高效液相色谱法测定饮料、泡菜中的赤藓红[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(4): 98-101.  
LIU Ya-mei, ZHUANG Xiao-hong. HPLC determination of erythrosine in drinks and pickles [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2016, 52(4): 98-101.