

吃进去的“颜色”，正在悄悄伤害身体 | 11 种合成着色剂的测定

合成着色剂即人工合成的色素，优点是色泽鲜艳、着色力强，色调多样，但它可能对人体健康产生潜在危害，包括过敏反应、儿童多动症风险增加、肝肾负担加重等问题。GB 5009.35-2023《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》给出了 11 种合成着色剂的液相色谱测定方法，与 GB 5009.35-2016 相比，主要增加了靛蓝、诱惑红、酸性红和喹啉黄 4 种合成着色剂；增加了适用基质种类；修改了样品前处理方法和仪器条件；修改了检出限和定量限。本方案采用科诺美 Leaps 超高效液相色谱仪，基于 EyouLab 数据处理软件，采用化合物组模式对喹啉黄和亮蓝的多个异构体进行定量，快速完成数据处理，整个流程操作简单、准确、高效。

实验部分

1. 仪器

Leaps 高效液相色谱仪：四元低压梯度泵 P40，自动进样器 A10C，柱温箱 C10，二极管阵列检测器 D20

2. 溶液配制

乙醇氨水溶液：量取无水乙醇 700 mL，加入 4 mL 氨水，用水稀释至 1 L，混匀。

5%甲醇水溶液：移取甲醇 5 mL，用水稀释并定容至 100 mL，混匀。



2%氨水甲醇溶液：移取 2 mL 氨水，用甲醇稀释至 100 mL。

乙酸铵溶液（20 mmol/L）：称取 1.54 g 乙酸铵，加水溶解并稀释至 1000 mL。

乙酸铵缓冲溶液，pH 9.0：乙酸铵溶液加氨水调 pH 至 9.0。

2%甲酸水溶液：移取甲酸 2 mL，用水稀释至 100 mL。

靛蓝标准储备液（1 mg/mL）：准确称取靛蓝二磺酸钠（食品蓝 2），用水定容至刻度。

混合标准中间液（50 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取 10 种食品合成着色剂混标（1000mg/L）0.5 mL 和靛蓝标准储备液 0.5 mL 至 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。

标准工作溶液配制：分别吸取混合标准中间液 0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL 和 10.0 mL 于 50 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，分别得到浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。

3. 样品前处理：

样品提取：准确称取试样 2 g，置于 50 mL 具塞离心管中，先加入水 5 mL，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热混匀样品，加入 25 mL 乙醇氨水溶液，涡旋 1 min，50 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 20min，8000 r/min 离心 5 min，取上清液置于 50 mL 容量瓶中，每次加入约 10 mL 乙醇氨水溶液重复提取操作至上清液无明显颜色，离心后合并上清液，用乙醇氨水溶液定容至 50 mL，即得提取液。

准确吸取提取液 10 mL，50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气浓缩至 3 mL 左右，分 2~3 次共加入 10 mL 5% 甲醇水溶液溶解，作为待净化液。

样品净化：

a. 依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水活化 SPE 柱；



- b. 以 2s~3s 1 滴的流速加载净化液到 SPE 柱；
- c. 用 6 mL 2%甲酸水和 6 mL 甲醇淋洗 SPE 柱，弃去淋洗液，抽真空至近干
- d. 用 6 mL 2%氨化甲醇分两次加入，流速低于 2s~3s 1 滴。收集洗脱液在 50 °C 氮气浓缩至近干，准确加入 2 mL pH 为 9.0 的乙酸铵缓冲溶液，过滤，作为待测液。

4. 色谱条件

流动相：A：乙酸铵溶液、B：甲醇

色谱柱：Lotus C18 色谱柱，4.6mm*250mm，5 μ m

进样量：20 μ L

柱温：30 °C

检测波长：415nm（柠檬黄、喹啉黄）、520nm（新红、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红、酸性红、赤藓红）、610nm（靛蓝、亮蓝）

梯度洗脱表：

时间 (min)	流速 (mL/min)	A% (水)	B% (甲醇)
0.01	1.0	90	10
12	1.0	70	30
30	1.0	20	80
30.1	1.0	90	10
40	1.0	90	10

5. 实验结果

1. 标准谱图



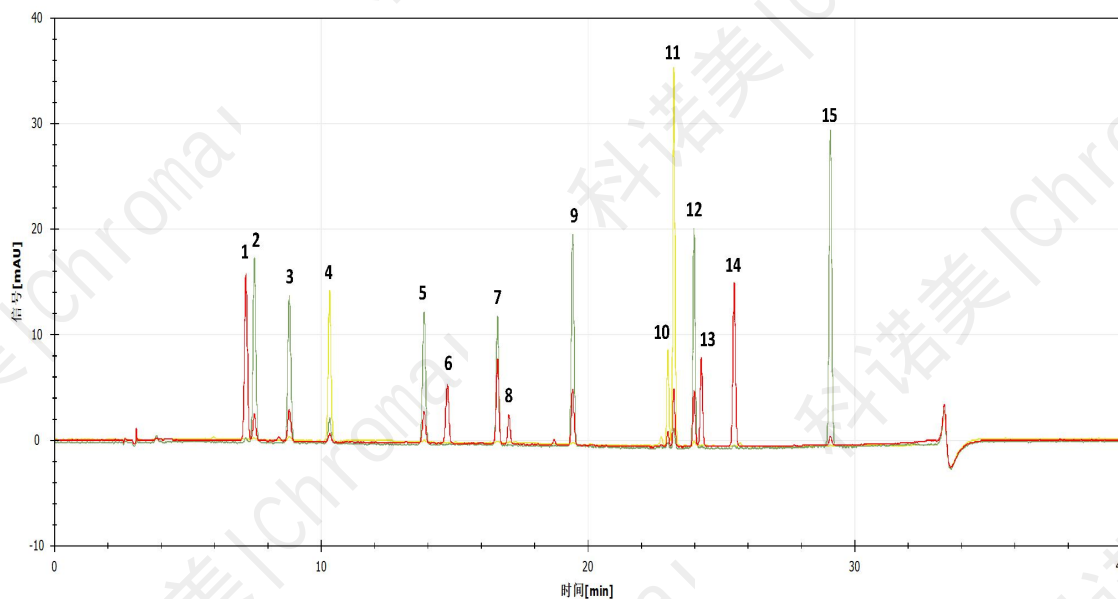


图 1 合成着色剂标准溶液色谱图

(红色--415nm: 1-柠檬黄、6-喹啉黄 1、8-喹啉黄 2、13-喹啉黄 3、14-喹啉黄 4)

(绿色--520nm: 2-新红、3-苋菜红、5-胭脂红、7-日落黄、9-诱惑红、12-酸性红、15-赤藓红) (黄色--610nm: 4-靛蓝、10-亮蓝 1、11-亮蓝 2)

2. 线性及检出限

依次将标准曲线溶液 0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、5.0 μ g/mL 和 10.0 μ g/mL 按浓度从低到高进样，以浓度-峰面积绘制标准曲线（其中喹啉黄呈现 4 个峰，亮蓝呈现 2 个峰，以各峰面积和进行计算）。各化合物在线性范围内相关性好，相关系数均大于 0.9999。

表 1 线性及检出限数据结果表

峰编号	化合物	线性范围 (μ g/mL)	线性方程	相关系数	检出限 (mg/kg)
1	柠檬黄	0.2~10	$Y=57.5772X+0.6467$	0.9999	0.05
2	新红	0.2~10	$Y=65.2254X+0.1828$	0.9999	0.12
3	苋菜红	0.2~10	$Y=53.9180X+0.1464$	0.9999	0.15
4	靛蓝	0.2~10	$Y=51.1992X+1.1756$	0.9999	0.06
5	胭脂红	0.2~10	$Y=50.3276X+0.7332$	0.9999	0.17
组 1	喹啉黄	0.2~10	$Y=107.1592X+0.8753$	0.9999	0.14



7	日落黄	0.2~10	$Y=42.5922X+0.5551$	0.9999	0.19
9	诱惑红	0.2~10	$Y=66.0447X+0.4958$	0.9999	0.11
组 2	亮蓝	0.2~10	$Y=115.7482X+0.8379$	0.9999	0.10
12	酸性红	0.2~10	$Y=62.8356X+1.0022$	0.9999	0.10
15	赤藓红	0.2~10	$Y=105.7470X+1.3154$	0.9999	0.08

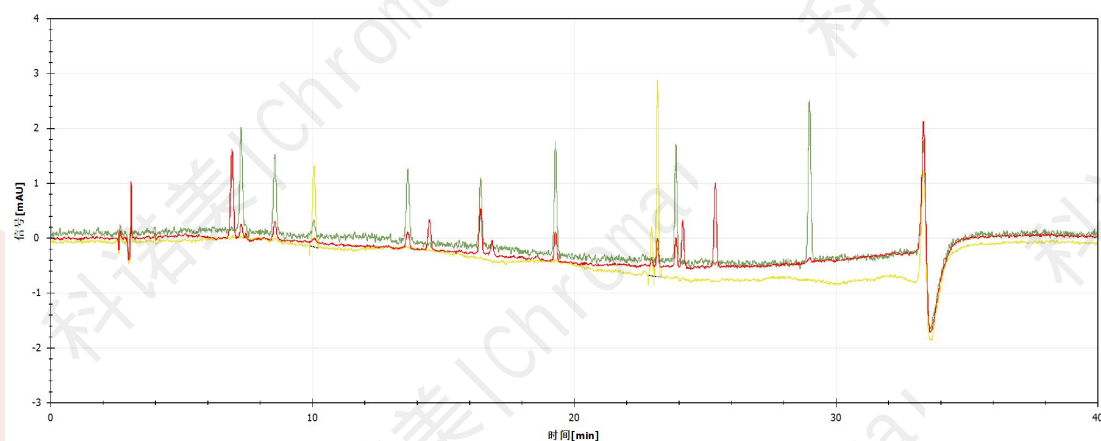
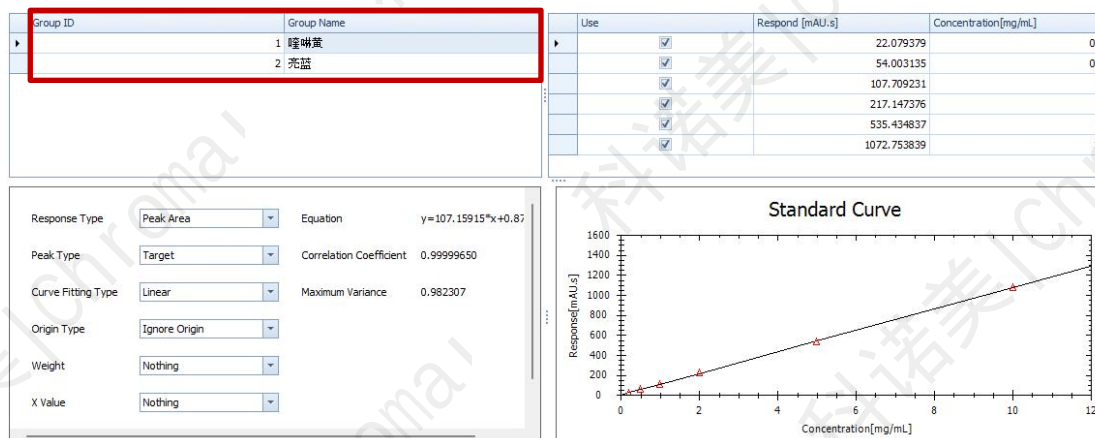


图2 0.2µg/mL 标准溶液色谱图

喹啉黄和亮蓝异构体采用化合物组方式进样定量

Use	Group ID	Channel No.	Compound Name	Retention Time[min]	Left Window	Right Window	Peak Match...	Response ...	LOD	LOQ	Curve Fitting Ty...	Peak T...	Weight	X Value
☒	0	1	柠檬黄	6.938	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	1	1	喹啉黄1	14.479	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	1	1	喹啉黄2	16.870	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	1	1	喹啉黄3	24.157	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	1	1	喹啉黄4	25.397	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	新红	7.292	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	苋菜红	8.580	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	胭脂红	13.659	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	日落黄	16.429	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	诱惑红	19.294	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	酸性红	23.890	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	2	赤藓红	28.999	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	0	3	靛蓝	10.074	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	2	3	亮蓝1	22.969	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing
☒	2	3	亮蓝2	23.189	0.200	0.200	Nearest Peak	Peak Area	0.000	0.000	Linear	Target	Nothing	Nothing





Tips: 关于化合物组定量，想要了解更多 EyouLab 操作细节，欢迎咨询科诺美应用团队

3. 重复性

将浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液重复进样 6 次，分别计算保留时间与峰面积的重复性。

表 2 重复性数据结果表

峰编号	化合物	定性重复性	定量重复性
1	柠檬黄	0.25%	0.24%
2	新红	0.18%	0.53%
3	苋菜红	0.20%	0.85%
4	靛蓝	0.17%	0.29%
5	胭脂红	0.12%	0.95%
组 1	喹啉黄	0.14%	0.66%
7	日落黄	0.10%	0.59%
9	诱惑红	0.07%	0.61%
组 2	亮蓝	0.02%	0.35%
12	酸性红	0.05%	0.28%
15	赤藓红	0.04%	0.24%



4. 样品测试

平行测定三份果脯样品，测试结果如表 3 所示。

表 3 果脯样品中合成着色剂含量测定结果表

峰编号	化合物	含量 (mg/kg)			
		样品 1	样品 2	样品 3	平均值
1	柠檬黄	未检出	未检出	未检出	未检出
2	新红	未检出	未检出	未检出	未检出
3	苋菜红	未检出	未检出	未检出	未检出
4	靛蓝	未检出	未检出	未检出	未检出
5	胭脂红	未检出	未检出	未检出	未检出
组 1	喹啉黄	未检出	未检出	未检出	未检出
7	日落黄	14.35	12.60	13.15	13.37
9	诱惑红	未检出	未检出	未检出	未检出
组 2	亮蓝	未检出	未检出	未检出	未检出
12	酸性红	未检出	未检出	未检出	未检出
15	赤藓红	未检出	未检出	未检出	未检出

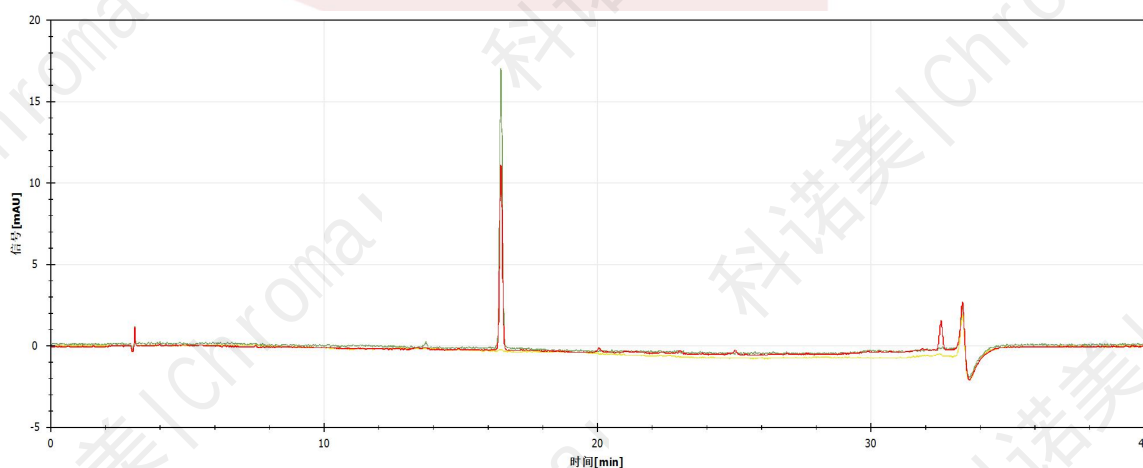


图 3 果脯样品中合成着色剂色谱图



5. 回收率

在样品中添加浓度为 2.5 µg/mL 的合成着色剂, 6 个样品平行测试, 得到的平均回收率结果如表 4 所示。

表 4 加标回收率结果数据表

峰编号	化合物	平均回收率%
1	柠檬黄	95%
2	新红	95%
3	苋菜红	95%
4	靛蓝	83%
5	胭脂红	97%
组 1	喹啉黄	94%
7	日落黄	96%
9	诱惑红	95%
组 2	亮蓝	95%
12	酸性红	94%
15	赤藓红	87%

结论

本应用方案采用科诺美 Leaps 超高效液相色谱仪, 参考《GB 5009.35-2023 食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》, 对 11 种合成着色剂的测定方法进行了方法学考察。各化合物在线性范围内, 线性良好, 相关系数均大于 0.9999; 保留时间重复性均小于 0.26%, 峰面积重复性均小于 1.00 %; 检出限符合国标要求; 并对某市售果脯进行了合成着色剂检测。本方法稳定性好, 灵敏度高, EyouLab 数据处理过程简便易操作, 适用于食品中合成着色剂的含量测定。

