

毛细管电泳法直接分离测定果冻中的色素

杜建中, 谢薇薇, 蔡泉林, 金 蓓
(湛江师范学院化学科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要: 建立毛细管电泳法直接测定果冻中亮蓝、胭脂红、柠檬黄的方法, 研究缓冲溶液种类、浓度、pH 值、电压等对分离的影响, 并对分离条件进行优化。在波长 255nm、分离电压 18kV、pH8.5、5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液中, 亮蓝、胭脂红、柠檬黄在 6min 内得到了较好的分离。用于部分市售果冻样品的测定, 得到较满意结果, 回收率为 85%~110%。

关键词: 毛细管电泳; 色素; 果冻

Direct Separation and Determination of Synthetic Pigments in Jelly by Capillary Electrophoresis

DU Jian-zhong, XIE Wei-wei, CAI Quan-lin, JIN Bei
(School of Chemistry Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: A method was developed for the direct determination of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine in jelly by capillary electrophoresis. The effects of several factors, such as pH value, type and concentration of running buffer, separation voltage on the separation of the synthetic pigments were investigated to find optimum conditions. The best separation among brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine was achieved within 6 min under the following conditions: a mixture of 5 mmol/L Na_2HPO_4 and 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH=8.5) as running buffer, separation voltage 18 kV, and detection wavelength 255 nm. The method has been used to determine some commercial jellies with satisfying results and recovery rates between 85% and 110%.

Key words: capillary electrophoresis; pigment; jelly

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0173-05

色泽是食品重要的感官性状, 是评价食品质量的指标之一。食品生产中常添加着色剂来改善食品色泽, 激发人们的食欲和购买欲。食品着色剂可分为天然色素和人工合成色素, 人工合成色素具有成本低廉、色调多样、着色力强、耐细菌等优点, 在食品加工业中广泛使用。人工合成色素是由化学原料加工而成, 经毒理学研究发现, 某些合成色素有慢性毒性或致癌性, 各国都严格控制其使用范围和用量。我国 GB2760—1996《食用添加剂使用卫生标准》^[1]规定, 食品中亮蓝的最大使用量为 0.025g/kg, 胭脂红和柠檬黄为 0.05g/kg。

目前, 人工合成色素检测方法有薄层色谱扫描^[2]、示波极谱法^[3-5]、分光光度法^[6-10]、高效液相色谱法^[11-12]、高效液相色谱-质谱联用法^[13]、毛细管电泳法^[14]等, 但测定果冻中色素含量的报道相对较少^[15-16], 且测定前需对果冻中的色素进行分离提取^[16], 其操作较繁琐。本

实验拟建立毛细管电泳直接测定果冻中亮蓝、胭脂红、柠檬黄的方法, 为食品中色素的测定提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

果冻 上海金丝猴食品股份有限公司。

亮蓝、柠檬黄 天津市科密欧化学试剂有限公司;
胭脂红 东京化成工业株式会社; 硼砂、磷酸氢二钠、盐酸 汕头市光华化学厂; 氢氧化钠 汕头市西陇化学厂; 实验用水均为去离子水, 试剂均为分析纯。

GL2001 高效毛细管电泳仪 北京采陆科学仪器有限公司; 未涂层熔融石英毛细管(内径 100 μm , 有效长度 50cm) 河北永年光导纤维厂; PHS-3C 型精密酸度计 上海雷磁仪器厂; UV-2550 型紫外-可见分光光度计 日本岛津制作所。

1.2 方法

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 广东省优秀青年创新人才培养项目(LYM09110)

作者简介: 杜建中(1956—), 男, 教授, 本科, 主要从事分析化学及微量组分分析研究。E-mail: djz560119@126.com

1.2.1 电泳条件

测定波长 255nm、分离电压 18kV、采用阳极端手动压差进样、进样高度 10cm、进样时间 10s, 运行缓冲溶液为 pH 8.5、5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 硼砂混合溶液。

新毛细管先用 1mol/L HCl 溶液冲洗 10min, 去离子水冲洗 10min, 再用 1mol/L NaOH 溶液冲洗 10min, 去离子水冲洗 10min, 最后用运行缓冲溶液冲洗 5min, 每次进样前用去离子水、缓冲溶液冲洗毛细管各 2min。

1.2.2 样品测定

平行称量两份等质量的无色的金丝猴果冻 4.50g, 用 70℃ 水浴加热, 在其中一份中加入 1316mg/L 亮蓝、213mg/L 胭脂红和 204mg/L 柠檬黄溶液各 1.00mL, 冷却后加水定容至 10.0mL, 配制成标准混合溶液(A); 向另一份中加入 3.00mL 蒸馏水, 搅拌, 冷却后定容至 10.0mL, 作为标准溶液的稀释液(B)。

准确移取 A 溶液 1.00mL, 加入 B 溶液 1.00mL 混合均匀, 得到 A 溶液浓度 1/2 的标准混合溶液, 用 B 溶液为稀释液, 采用逐级稀释法配制浓度为 A 溶液质量浓度 1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 的标准混合溶液。在电泳条件下, 依次测定系列标准混合溶液中各种色素的峰面积, 以峰面积(A)对质量浓度(C)作图, 绘制工作曲线并计算线性方程。

称量 4.50g 果冻样品, 放入烧杯中, 70℃ 水浴加热, 加入 3mL 蒸馏水, 搅拌。冷却后加水定容至 10.0mL。在电泳条件下, 测定样品中各种色素的峰面积, 代入线性方程, 计算出样品中色素的含量。

2 结果与分析

2.1 分离条件的选择

2.1.1 测定波长的选择

利用 UV-2550 紫外-可见分光光度计, 测定亮蓝、胭脂红、柠檬黄在 200~600nm 吸收曲线, 见图 1。考虑 3 种色素综合吸收情况, 选择 255nm 作为测定波长。

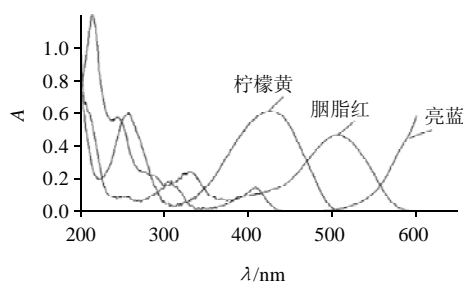
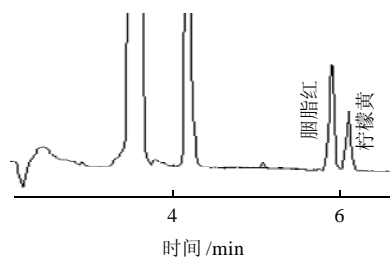


图1 吸收曲线

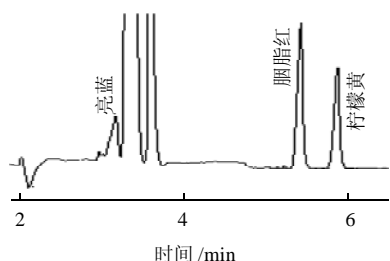
Fig.1 Absorption spectra of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine

2.1.2 缓冲体系及浓度对分离的影响

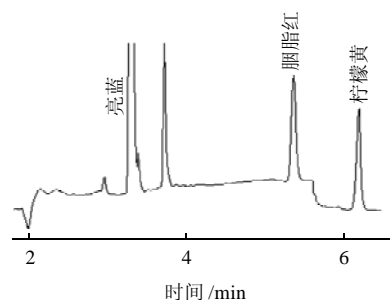
亮蓝、胭脂红、柠檬黄分子结构中均含有磺酸基团, 这些分子可以在一定条件下电离成带有一个或者多个负电荷的粒子, 产生电泳行为。在波长 255nm、电压 15kV、pH9.0 的电泳条件下, 分别考察 3 种色素在磷酸盐缓冲系、硼砂缓冲系、磷酸盐-硼砂缓冲系中的分离情况, 结果表明, 3 种色素在磷酸盐-硼砂体系中分离效果较好, 故实验选取磷酸盐-硼砂缓冲体系。进一步考察 3 种色素在不同浓度 Na_2HPO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 混合体系中的分离情况, 见图 2。结果表明, 选择 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液, 分离效果较好。



A. 3mmol/L Na_2HPO_4 -3mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液



B. 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液



C. 7mmol/L Na_2HPO_4 -7mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液

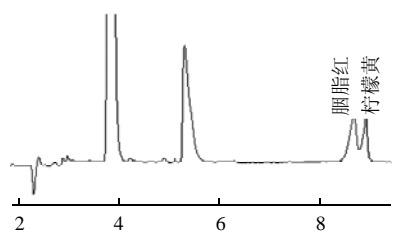
电泳条件: 波长 255nm, 分离电压 5kV, 以 pH9.0 Na_2HPO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液为缓冲体系。

图2 缓冲体系浓度对电泳分离的影响

Fig.2 Effect of running buffer concentration on the separation of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine

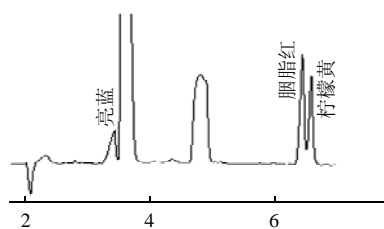
2.1.3 缓冲溶液的 pH 值对分离效果的影响

毛细管的电渗流对于 pH 值的改变很敏感, 且 pH 值变化, 对分离度以及峰形等参数有很大的影响^[17]。实验考察分离电压 15kV, 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 混合体系中, 不同 pH 值对分离效果的影响, 见图 3。结果表明, 当 pH8.5 时, 3 种色素可以实现基线分离。



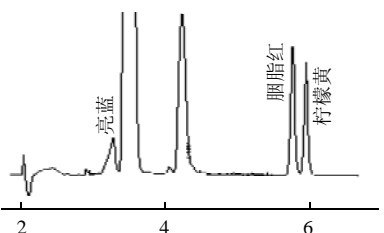
时间/min

A. pH6.0



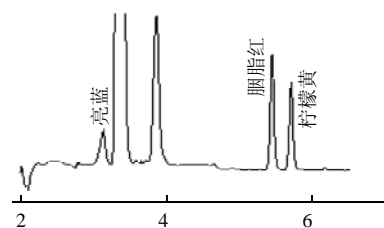
时间/min

B. pH7.0



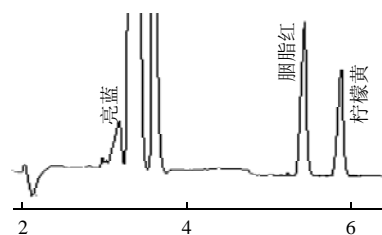
时间/min

C. pH8.0



时间/min

D. pH8.5



时间/min

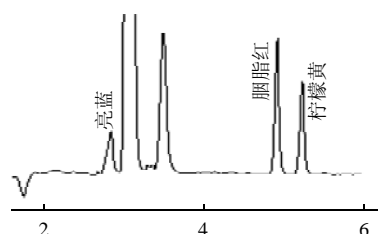
E. pH9.0

运行缓冲体系为 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液, 分离电压为 15kV。

图 3 pH 值的影响

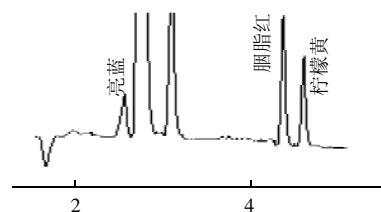
Fig.3 Effect of running buffer pH on the separation of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine

2.1.4 电压的选择



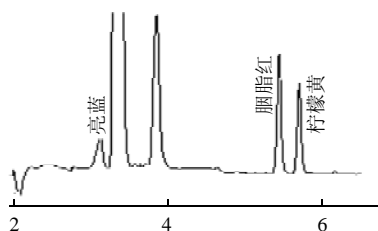
时间/min

A. 18kV



时间/min

B. 20kV



时间/min

C. 15kV

运行缓冲体系为 pH8.5 的 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液。

图 4 电压的影响

Fig.4 Effect of voltage on the separation of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine

电压作为分离的动力,在分离过程中起着重要作用,实验考察在 pH8.5 的 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 混合体系中,亮蓝、胭脂红、柠檬黄混合样品在分离电压为 15、18、20kV 时的分离情况,见图 4。结果表明,电压 18kV 时,亮蓝、胭脂红、柠檬黄 3 种色素得到了较好的基线分离,出峰时间合适,且重现性好。

通过条件实验,确定最佳电泳条件为:波长 255nm,分离电压 18kV,运行缓冲溶液为 pH8.5 的 5mmol/L Na_2HPO_4 -5mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 混合溶液。

2.2 标准曲线的绘制

在最佳电泳条件下测定 3 种色素系列标准溶液的峰面积。以质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标作图得到标准曲线,定量分析特征参数见表 1。

表 1 定量分析特征参数

Table 1 Characteristic parameters for quantitative analysis of brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine

色素	线性方程	相关系数	线性范围/(mg/L)	检出限/(mg/L)
亮蓝	$A = 117C - 420$	0.9969	8~132	5.0
胭脂红	$A = 1563C - 685$	0.9992	0.7~21	0.5
柠檬黄	$A = 1115C - 29$	0.9996	0.6~20	0.5

2.3 样品分析

2.3.1 确定色素峰

采用标准加入法确定香橙味果冻和葡萄味果冻中所含的色素,结果显示,香橙味果冻中含有胭脂红和柠檬黄两种色素,葡萄味果冻中含有胭脂红和亮蓝两种色素,见图 5。

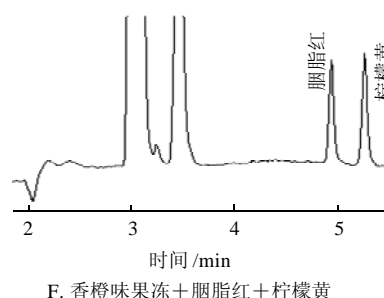
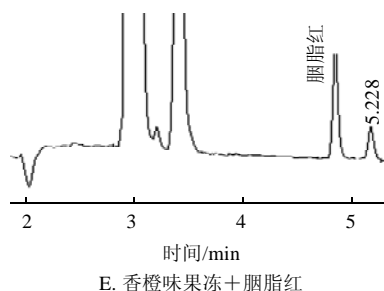
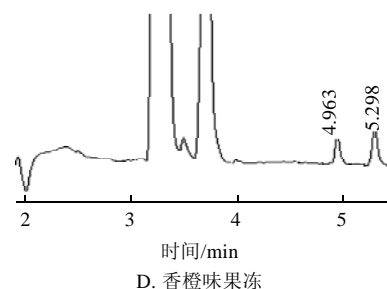
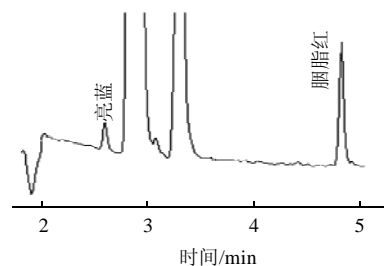
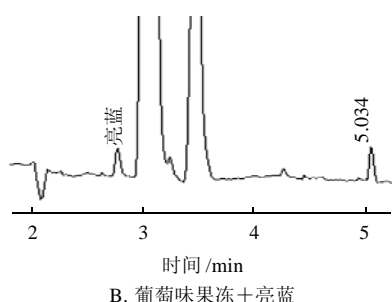
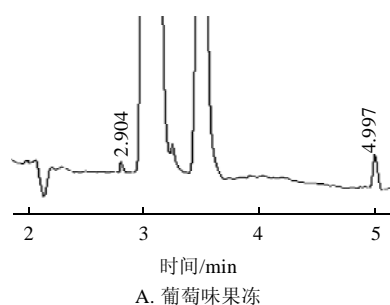


图 5 加标实验

Fig.5 Capillary electrophoretic patterns of blank and spiked samples of fruity jellies

同法,在杨桃味果冻中检测出亮蓝和柠檬黄,在菠萝味果冻中检测出柠檬黄,在草莓为果冻中检测出胭脂红。

2.3.2 精密度实验

按实验方法测定待测葡萄味果冻样品中亮蓝、胭脂红和菠萝味果冻中柠檬黄的峰面积,平行测定 7 份,其相对标准偏差分别为 4.9%、4.3%、3.5%,结果表明,方法具有较高的精密度。

表3 加标回收率实验结果($n=5$)Table 3 Average spike recovery rates for brilliant blue, ponceau 4R and tartrazine in commercial jellies of various fruit flavors ($n=5$)

果冻	色素	底物量/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	测得量/(mg/kg)					回收率/%					平均回收率/%
葡萄味	亮蓝	15.9	5.28	20.9	20.7	20.5	21.1	20.9	94.7	90.9	87.1	98.5	94.7	93.2
			10.5	25.5	25.8	25.6	26.0	26.5	91.4	94.3	92.4	96.2	101.0	95.1
葡萄味	胭脂红	4.00	1.33	5.45	5.25	5.27	5.20	5.39	109.0	94.0	95.5	90.2	104.5	98.6
			2.66	6.67	6.63	6.62	6.58	6.70	100.4	98.9	98.5	97.0	101.5	99.3
菠萝味	柠檬黄	3.77	1.20	4.96	5.05	4.89	4.93	5.08	99.2	106.7	93.3	96.7	109.2	101.0
			2.40	6.15	6.03	6.05	6.25	5.95	99.2	94.2	95.0	103.3	90.8	96.5

2.3.3 样品的测定

每种果冻平行称取5份,在电泳条件下测定样品中色素的峰面积,代入线性方程求出样品中各色素的含量,测定结果见表2。

表2 果冻中色素含量的测定($n=5$)Table 2 Pigment contents of commercial jellies of various fruit flavors ($n=5$)

果冻(生产批号)	亮蓝/(mg/kg)	胭脂红/(mg/kg)	柠檬黄/(mg/kg)
香橙味(20100116E6)	—	3.72	8.59
葡萄味(20100223E5)	15.9	4.00	—
杨桃味(20100110E)	15.8	—	6.08
菠萝味(20100201E6)	—	—	3.77
草莓味(20100201E6)	—	4.05	—

2.4 回收率实验

准确称取一定质量葡萄味和菠萝味金丝猴果满园吸果冻各5份,分别加入色素标准液,水浴加热、搅拌,定容至10.0mL。按照实验方法进行加标回收实验,见表3。结果表明测定方法具有较高的准确度。

3 结 论

在电泳条件下,亮蓝、胭脂红、柠檬黄在6min内可以得到较好的分离,并具有良好的线性关系。本次购买的市售果冻中检出亮蓝、胭脂红和柠檬黄3种色素,其含量均在GB2760—1996规定的范围内。

本法不需要对果冻中的色素进行分离,简化实验操作,用于部分市售果冻中色素含量的测定可取得较满意的结果。

参考文献:

- [1] GB2760—1996 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [2] 严浩英,张军,李淑华.五种人工合成食用色素的薄层色谱扫描分析[J].现代预防医学,1997,24(2):192-194.
- [3] 李德金,赵明哲,栾广杰.示波极谱法测定食品中人工合成色素的探讨[J].食品研究与开发,2004,25(6):107-108.
- [4] 钱桂平,余建中.微机极谱法同时测定食品中的苋菜红、日落黄、柠檬黄、胭脂红混合色素[J].中国卫生检验杂志,2002,12(5):569-582.
- [5] 辛若竹,王静,韩建秋,等.示波极谱法测定食品中合成着色剂的抗干扰性的研究[J].中国酿造,2007(1):65-66.
- [6] 冯江,周建民,黄鹏,等.稳定回归一分光光度法同时测定3组分食用色素[J].中国公共卫生,2002,18(4):494-495.
- [7] 许陆贵,唐波,蒋伟,等.多波长分光光度法测定食品中的合成色素[J].现代预防医学,2002,29(5):715-716.
- [8] 刘冷,李建晴,郭芬,等.紫外分光光度法同时测定柠檬黄和日落黄[J].谱实验室,2007,24(3):423-427.
- [9] 司圣柱,司娟.小波变换偏最小二乘法用于三种食用色素的可见分光光度法同时测定[J].分析仪器,2007(2):48-51.
- [10] 杜建中,庞惠丹,巫素琴,等.高聚物萃取双波长法测定胭脂红及苋菜红含量的研究[J].食品科学,2008,29(3):441-443.
- [11] 王春荣,张济.食品中多种合成色素的反相高效液相色谱法测定[J].中国公共卫生,2005,21(3):359-360.
- [12] 王红梅,郭伟,王继鹏,等.高效液相色谱法测定肉制品中食用合成色素的含量[J].食品研究与开发,2007,28(6):106-107.
- [13] 李帮锐,冯家力,潘振球,等.高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定饮料中的人工合成色素[J].中国卫生检验杂志,2007,17(4):579-585.
- [14] 吴素琴,文亚波,邹兰,等.毛细管电泳法分离测定饮料中色素含量的研究[J].湛江师范学院学报,2009,30(6):73-76.
- [15] 唐岩,张卫平,张延雨.高效液相色谱法测定果冻中人工合成色素[J].卫生研究,2003,44(4):185-187.
- [16] 陈艳,刘思洁,李皓.高效液相色谱法测定果冻中的合成色素[J].食品科学,2007,28(9):487-489.
- [17] 邓延俦,何金兰.高效毛细管电泳[M].北京:科学出版社,1996:67-69.