

# HPLC 方法开发系统在有机合成色素分析方法开发上的应用

LC-124

**摘要：**本文中使用了岛津 HPLC 方法开发系统，进行 29 种有机合成色素进行高效液相色谱快速分析方法建立。实验中在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. × 150 mm L., 2.2 μm 色谱柱上进行 4 种流动相和 7 种梯度条件的自动化方法探索，根据所得色谱图结果使用自动评测软件对各峰进行综合评价，以峰检出数和分离度综合评价最优者为该样品分析方法。

**关键词：**超高效液相色谱 方法开发系统 有机合成色素 方法转化

色素一般是日常生活中人们对食用色素的简称，食用色素包括天然色素和人工合成色素两种。人工合成色素大都由来源于煤焦油中分离出来的苯胺染料为原料制成，医学研究表明，该类物质除具有一般毒性、致泻性和生殖毒性外，还可以导致严重的致畸、致突变和致癌等严重危害。为此包括我国在内的世界各国均在食用色素的管理、合成色素的使用方面均有严格的规定，如我国的 GB2760-2007，欧盟的 94/36/EC 指令，美国联邦规定法 21CFR70 中都对多种合成色素要求禁止或严格限量使用。人工合成色素包括有机合成色素、无机合成色素、天然等同合成色素以及其他合成色素。其中有机合成色素从结构上分为偶氮色素类和非偶氮色素类，这些色素的分子量在 450-880 之间，最大吸收波长在 428-630nm 之间。为了应对不法份子食品中违规添加多种有机合成色素的做法，开发能够同时检测多种色素的 HPLC 方法在食品安全检测领域具有迫切需求。然而，常规的 HPLC 方法开发阶段耗时长，效率低，如果遇到同时检测的化合物数量较多则更为突出，所以该阶段往往成为整个 HPLC 分析过程的制约因素。

本实验使用方法开发系统建立了柠檬黄等 29 种有机合成色素 HPLC 分析方法，为食品中有机合成色素的检测提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。

具体配置为 LC-30AD × 2 (输液泵，配四元低压梯度比例阀)，DGU-20A5R × 2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含 FCV-34AH (高压流路切换阀)，SPD-M20A (二极管阵列检测器)，CBM-20A (系统控制器)，Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站)，LabSolutions Ver. 5.54SP1 (色谱工作站)。20A (系统控制器) 和 LabSolutions Ver.5.54 SP3 (色谱工作站)。

### 1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm ID × 150 mm L., 2.2 μm

流动相：A1 相 - 0.1% 甲酸水溶液

A2 相 - 20 mM 醋酸铵水溶液

B1 相 - 乙腈

B2 相 - 甲醇 - 乙腈 (1/1, V/V)

流速：0.45 mL/min

柱温：40°C

检测波长：Max Plot: 400-650 nm

## 结果与讨论

### 2.1 通用梯度时间程序分析

以 5%B(0-1.5min)-90%B(17.5-22.5min)-5%B(22.51-25min) 通用梯度时间程序对色谱柱和流动相体系进行测试。

表1 通用分析条件分析结果及评价

| # | 流动相组成 | 综合得分* |
|---|-------|-------|
| 1 | A1-B1 | 105   |
| 2 | A1-B2 | 55    |
| 3 | A2-B1 | 1819  |
| 4 | A2-B2 | 1760  |

\* 综合得分：以峰检出数乘以各峰分离度之和记，分离度值大于 3 者均已 3 记。

根据评价结果，确定流动相 A2-B1 类型为该样品分析用流动相体系，即为 A 相 -20 mM 醋酸铵水溶液，B 相 - 乙腈。

## 2.2 梯度条件筛选及结果

在上步确定的流动相体系下进行梯度条件的筛选。筛选方案和结果如表 2 所示。

表2 梯度筛选方案和结果

| # | 梯度初始%B | 梯度终止%B | 评价系统得分 |
|---|--------|--------|--------|
| 1 |        | 90     | 1819   |
| 2 |        | 85     | 1808   |
| 3 |        | 80     | 1785   |
| 4 |        | 75     | 1847   |
| 5 | 5      | 70     | 1765   |
| 6 |        | 65     | 2046   |
| 7 |        | 60     | 2085   |
| 8 |        | 55     | 1952   |
| 9 |        | 50     | 1947   |

以第 7 种梯度变化方式 5–60%B 综合评价得分最高，确定该样品的最佳分析条件为：

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. × 150 mm L., 2.2 μm

流动相：A-20 mM 醋酸铵水溶液 B- 乙腈

流速：0.45 mL/min

梯度程序：5%B(0–1.5 min)–60%B(17.5 min)–90%B(17.51–22.5 min)–5%B(22.51–25 min)

柱温：40℃

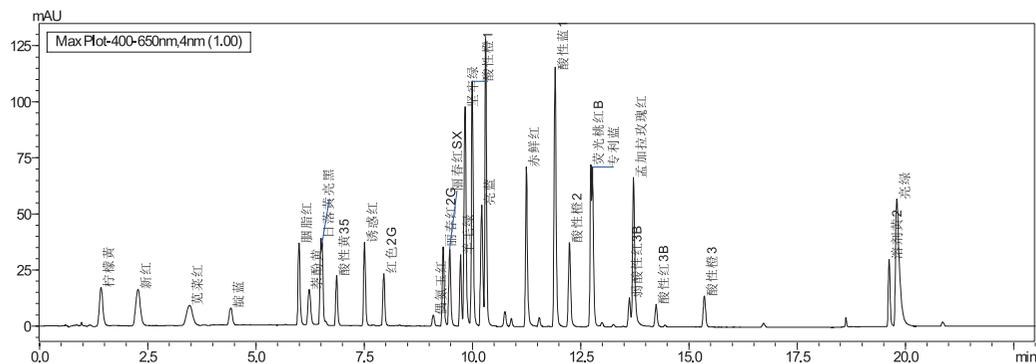


图1 29种色素UHPLC分离结果（400-650 nm 最大绘图方式）

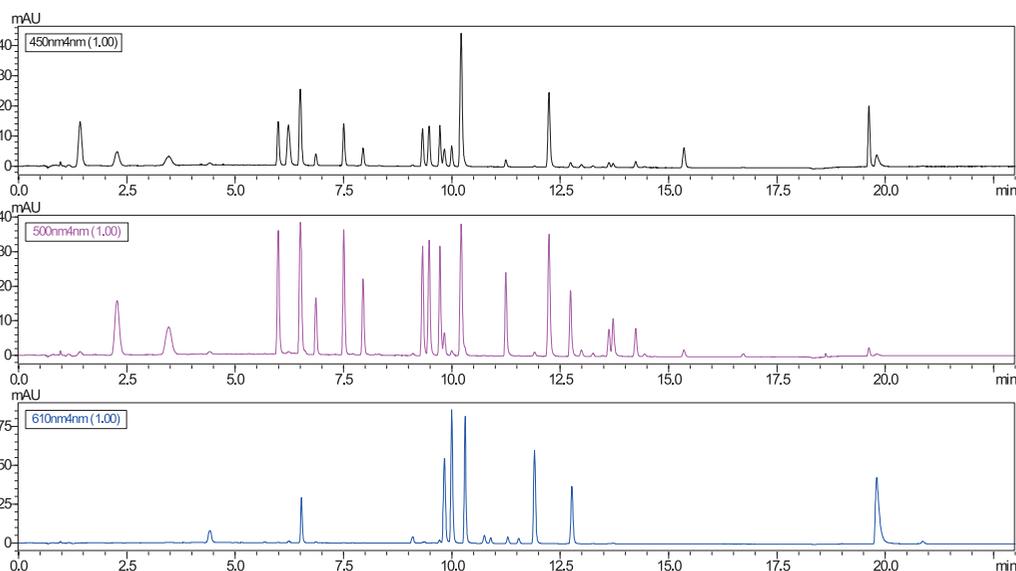


图2 29种色素在三波长下UHPLC分离结果（450、500、610 nm）

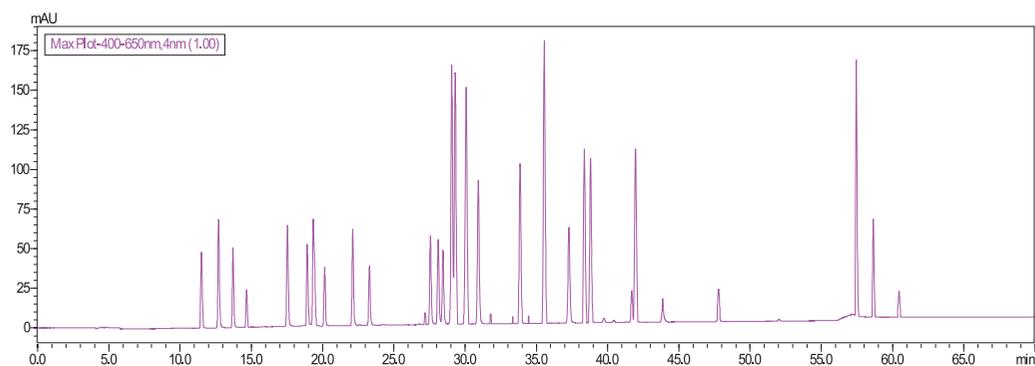


图2 29种色素HPLC分离结果（400-650 nm 最大绘图方式）

## 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统对 29 种合成色素的液相分析方法进行开发，经过通用条件分析和梯度条件筛选分析，对所得数据使用 Class-agent report 软件处理，根据峰检出数和分离度综合得分，获得评价最高的分析条件建立该样品的分析方法，该方法可在 30 min 内完成 29 种化合物的分析，为多组分样品分离条件的探索提供可行的方式。

附表 本实验中所涉及的29种色素类化合物

| ID# | 中文名     | 英文名                      | CAS#        | 保留时间 ( min ) |
|-----|---------|--------------------------|-------------|--------------|
| 1   | 柠檬黄     | Tartrazine               | 1934-21-0   | 1.422        |
| 2   | 新红      | New red                  | 220658-76-4 | 2.275        |
| 3   | 苋菜红     | Amaranth                 | 915-67-3    | 3.468        |
| 4   | 靛蓝      | Indigo blue              | 482-89-3    | 4.419        |
| 5   | 胭脂红     | Acid Red 18              | 2611-82-7   | 5.993        |
| 6   | 萘酚黄 S   | Naphthol Yellow S        | 846-70-8    | 6.229        |
| 7   | 日落黄     | Food Yellow 3            | 2783-94-0   | 6.502        |
| 8   | 亮黑      | Brillant Black BN        | 2519-30-4   | 6.529        |
| 9   | 酸性红 35  | Acid red 35              | 6441-93-6   | 6.863        |
| 10  | 诱惑红     | Allura acid AC           | 25956-17-6  | 7.507        |
| 11  | 红色 2G   | Acid scarlet G           | 3734-67-6   | 7.952        |
| 12  | 偶氮玉红    | Food Red 3               | 3567-69-9   | 9.096        |
| 13  | 丽春红 2R  | Ponceau 2R               | 3761-53-3   | 9.323        |
| 14  | 丽春红 SX  | PONCEAU SX               | 4548-53-2   | 9.475        |
| 15  | 羊毛绿     | Acid green BS            | 3087-16-9   | 9.725        |
| 16  | 坚牢绿     | Food green FCF           | 2353-45-9   | 9.829        |
| 17  | 酸性橙 1   | ORANGE I                 | 523-44-4    | 9.996        |
| 18  | 亮蓝      | Brilliant Blue           | 3844-45-9   | 10.214       |
| 19  | 赤藓红     | Erythrosine              | 16423-68-0  | 11.245       |
| 20  | 酸性蓝 1   | Acid blue 1              | 129-17-9    | 11.907       |
| 21  | 酸性橙 2   | Orange 2 sodium salt     | 633-96-5    | 12.240       |
| 22  | 荧光桃红 B  | Phloxine B               | 18472-87-2  | 12.737       |
| 23  | 专利蓝     | Acid blue 2 calcium salt | 3536-49-0   | 12.770       |
| 24  | 弱酸性红 3B | weak acid red 3B         | 6826-53-5   | 13.624       |
| 25  | 孟加拉玫瑰红  | Rose Bengal              | 632-69-9    | 13.719       |
| 26  | 酸性红 3B  | acid pink 3B             | 6459-69-4   | 14.241       |

|    |       |                  |           |        |
|----|-------|------------------|-----------|--------|
| 27 | 酸性橙 3 | acid orange 3    | 6373-74-6 | 15.355 |
| 28 | 溶剂黄 2 | Solvent Yellow 2 | 66-11-7   | 19.623 |
| 29 | 亮绿    | Brilliant green  | 633-03-4  | 19.802 |