

葡萄酒中柠檬黄、胭脂红、日落黄、苋菜红以及亮蓝五种合成色素的高效液相色谱分析

LC-075

摘要：本文使用岛津 UFLCXR 超快速液相色谱建立了葡萄酒中五种合成色素的检测方法。本方法采用 C18 色谱柱，二极管阵列检测器检测波长为：柠檬黄 430 nm，胭脂红、日落黄、苋菜红 520 nm，亮蓝 630 nm。在 0.50~10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内，柠檬黄、胭脂红、日落黄、苋菜红以及亮蓝的校准曲线的线性相关系数 $r = 0.9999$ 以上，线性关系良好。对 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的合成色素标准品进行六针重复性试验，得到柠檬黄、胭脂红、日落黄、苋菜红以及亮蓝的保留时间 RSD 在 1% 以内，峰面积 RSD 在 1% 以内，仪器精密度良好。对葡萄酒样品加标进行灵敏度考察，得到本方法具有较低的检出限。可以用于葡萄酒中的合成色素，包括柠檬黄、胭脂红、日落黄、苋菜红以及亮蓝的检测。

关键词：葡萄酒 柠檬黄 胭脂红 日落黄 苋菜红 亮蓝 合成色素 超快速液相色谱

合成色素即人工合成的色素，其优点不少，如色泽鲜艳，着色力强，色调多样，但合成色素具毒性（包括毒性、致泻性和致癌性）。生产企业违禁添加着色剂、甜味剂，长期食用此类产品将严重危害人体健康。

2008 年 1 月 1 日起，《葡萄酒强制性国家标准》正式实施。新标准除具备强制力外，还明确规定，葡萄酒的年份必须是指葡萄采摘年份，并且该年的葡萄汁含量必须达到 80% 以上，产品中均不得添加合成的着色剂、甜味剂、香精、增稠剂。根据《食品添加剂标准 GB2760-2007》规定，配制酒中柠檬黄的最大使用量为 0.1 g/kg、胭脂红的最大使用量为 0.05 g/kg、日落黄的最大使用量为 0.1 g/kg、苋菜红的最大使用量为 0.025 g/kg、亮蓝的最大使用量为 0.025 g/kg。

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

甲醇：HPLC 级

乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)：称取 1.54 g 乙酸铵，加去离子水定容至 1000 mL，经滤膜 (0.45 μm) 过滤。

合成色素五种标准储备液：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混标储备液。

1.1.2 仪器

LC-20A，包括 CBM-20A 系统控制器；LC-20ADXR 高精度溶液输送泵 $\times 2$ ；SIL-20ACXR 自动进样器；CTO-20AC 柱温箱；SPD-M20A 二极管阵列检测器。

1.2 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-SP (5 μm 4.6 \times 250 mm)

流动相：A - 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)，B - 甲醇

流速：1.0 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

柱温：40

二极管阵列检测器波长：430 nm，520 nm，630 nm

进样量：20 μL

梯度洗脱时间程序：

Time(min)	A%	B%
0	83	17
4	83	17
12	2	98
15	2	98
18	83	17
20	83	17

1.3 样品处理

1.3.1 合成色素混合标准系列浓度的配制

合成色素混合标准储备液浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。取不同体积，用甲醇稀释，配制成浓度为 0.50、1.00、2.00、5.00 及 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列，储存在棕色进样小瓶中，备用。

1.3.2 葡萄酒样品的制备

取葡萄酒样品 5.00 g，去离子水定容至 10 mL，经 0.45 μm 滤膜减压过滤，上机测试。

结果讨论

2.1 合成色素各组分校准曲线结果

图 1 是浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的柠檬黄标准品 430 nm 色谱图。图 2 是浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的胭脂红、日落黄、苋菜红标准品 520 nm 色谱图。图 3 是浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的亮蓝标准品 630 nm 色谱图。图 4~ 图 6 是五个不同浓度的标准溶液采集得到的色谱图。图 7~ 图 11 是各组分的校准曲线及方程。曲线的相关系数为 $r=0.9999$ 以上。

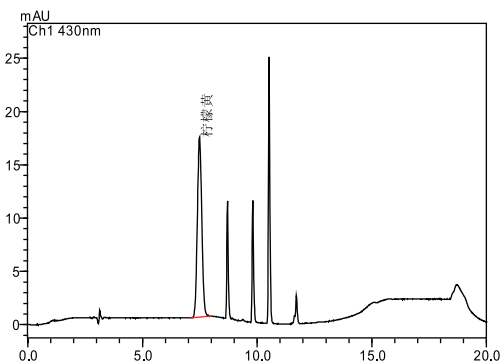


图 1 柠檬黄标准品 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 430 nm 色谱图

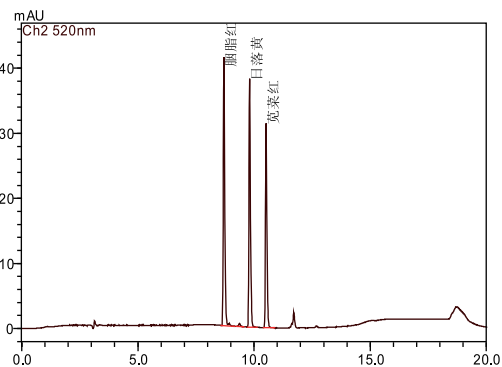


图 2 胭脂红、日落黄、苋菜红标准品 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 520 nm 色谱图

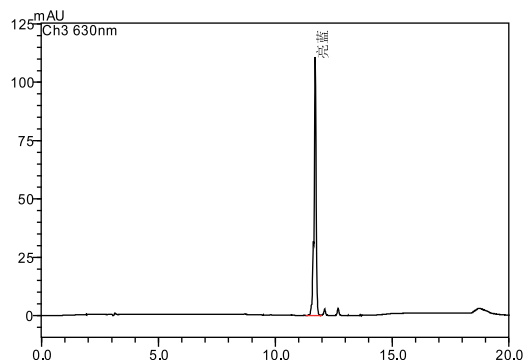


图 3 亮蓝标准品 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 630 nm 色谱图

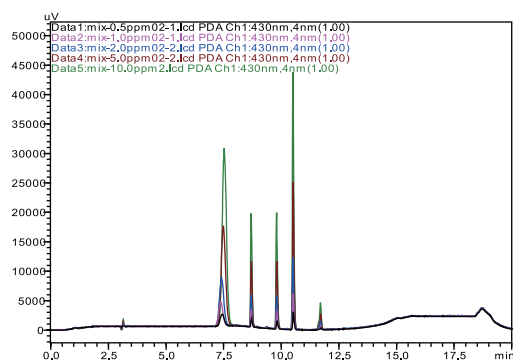


图 4 五个不同浓度的柠檬黄标准品色谱图

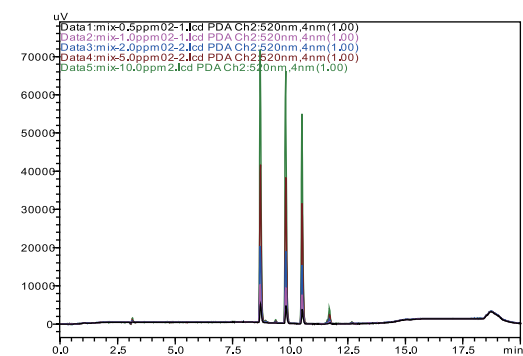


图 5 五个不同浓度的胭脂红、日落黄、苋菜红标准品色谱图

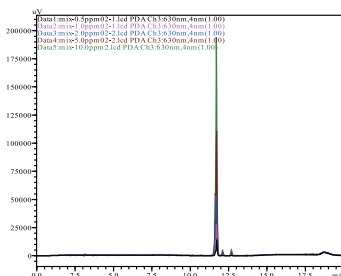


图6 五个不同浓度的亮蓝标准品色谱图

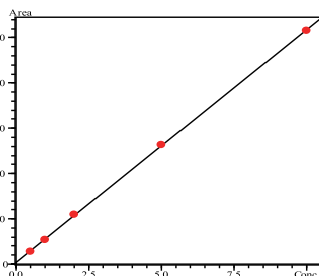


图7 柠檬黄校准曲线
 $Y=51345.4X+4522.5$ $r=0.9999$

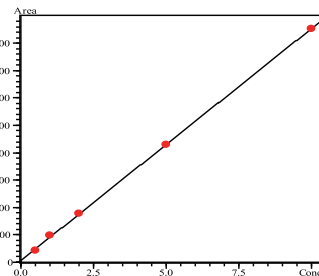


图8 胭脂红校准曲线
 $Y=42403.2X+3112.5$ $r=0.9999$

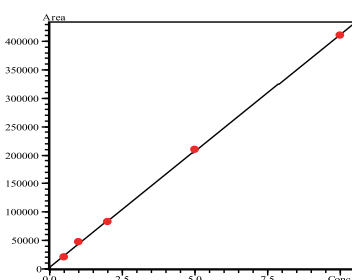


图9 日落黄校准曲线
 $Y=40878.6X+3180.1$ $r=0.9999$

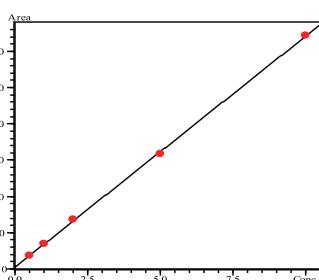


图10 亮蓝校准曲线
 $Y=31878.9X+2385.9$ $r=0.9999$

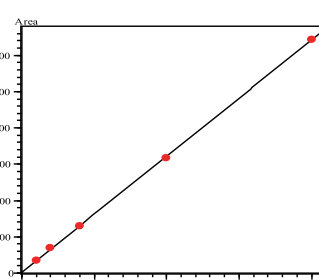


图11 亮蓝校准曲线
 $Y=159780X+6516.1$ $r=0.9999$

2.2 方法的重复性

为进一步考察该方法的重复性，本文对浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的合成色素标准品进行 6 次平行实验，重复性结果 (RSD% 表示) 汇总如表 1、表 2 所示。

表1 柠檬黄、胭脂红、日落黄 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果

No.	保留时间 (min)			峰面积		
	柠檬黄	胭脂红	日落黄	柠檬黄	胭脂红	日落黄
1	7.516	8.702	9.803	438803	380464	371117
2	7.584	8.719	9.812	430524	381837	374830
3	7.569	8.718	9.812	430865	381387	372538
4	7.552	8.707	9.800	430777	382227	376380
5	7.599	8.720	9.811	432246	387524	370968
6	7.568	8.714	9.809	429555	38151	372333
平均	7.565	8.713	9.808	432128	381931	373027
RSD%	0.38	0.08	0.05	0.78	0.81	0.58

表2 苋菜红、亮蓝10.00 μg/mL标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果

No. 化合物	保留时间 (min)		峰面积	
	苋菜红	亮蓝	苋菜红	亮蓝
1	10.513	11.704	292892	1364746
2	10.522	11.711	298392	1367624
3	10.523	11.712	298290	1339761
4	10.509	11.696	296239	1361642
5	10.521	11.709	298207	1365524
6	10.519	11.708	298768	1360890
平均	10.517	11.706	297131	1360031
RSD%	0.05	0.05	0.76	0.75

2.3 样品分析

按照 1.3.2 所述步骤处理葡萄酒样品，过滤上机检测葡萄酒中的合成色素。图 12~ 图 14 为葡萄酒样品在 430 nm、520 nm、630 nm 波长的色谱图，样品未检出合成色素。

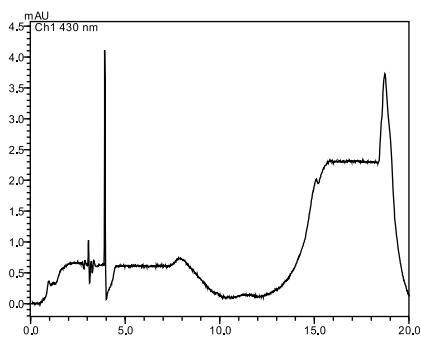


图12 葡萄酒样品430 nm色谱图

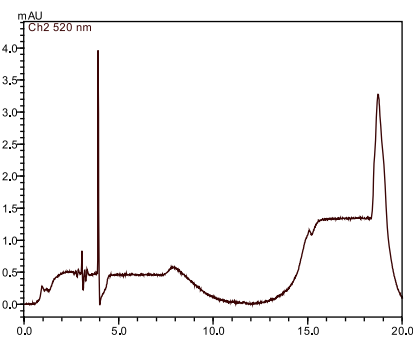


图13 葡萄酒样品520 nm色谱图

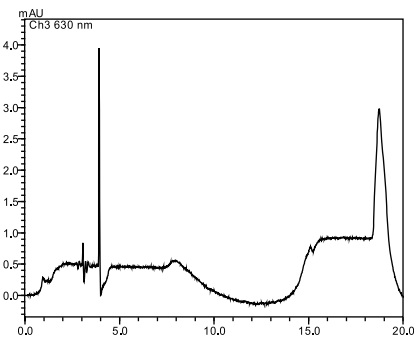


图14 葡萄酒样品630 nm色谱图

2.4 灵敏度考察

对葡萄酒样品加标浓度为 0.50 μg/mL 的合成色素标准品进行分析，得到色谱图如图 15~17 所示。根据公式：

$$\text{Colour Content (mg/ kg)} = (\text{Ccolour} \times \text{V} \times \text{DF}) / \text{W}$$

Ccolour 代表仪器读数 (μg/mL)

V 代表定容体积 (mL)

W 代表样品重量 (g)

DF 代表稀释倍数

得到检出限和定量限如下表所示：

化合物	柠檬黄	胭脂红	日落黄	苋菜红	亮蓝
信噪比 (S/N)	7.86	55.57	52.31	43.23	130.63
国标限值 (mg/kg)	100.00	50.00	100.00	25.00	25.00
检测限 LOD(mg/kg)	0.38	0.05	0.06	0.07	0.02
定量限 LOQ(mg/kg)	1.27	0.18	0.19	0.23	0.08

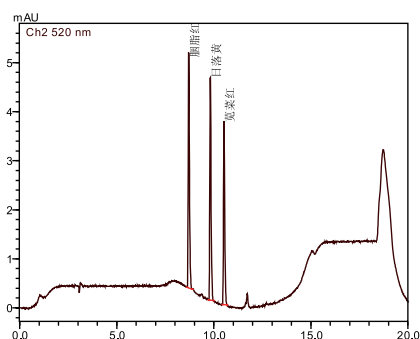


图16 葡萄酒样品加标0.50 μg/mL 520 nm色谱图

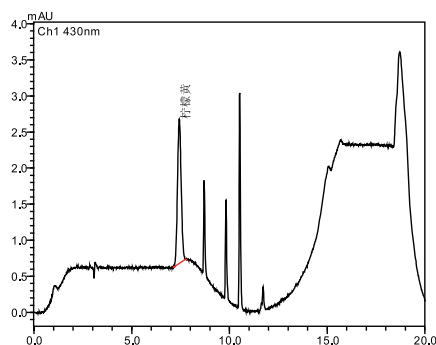


图15 葡萄酒样品加标0.50 μg/mL 430 nm色谱图

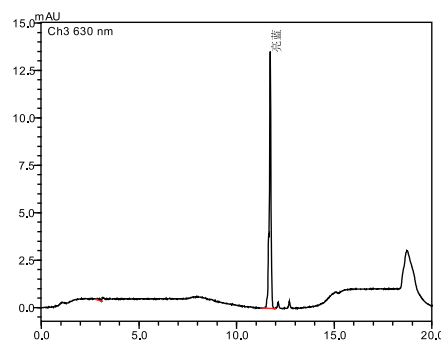


图17 葡萄酒样品加标0.50 μg/mL 630 nm色谱图

结论

本实验中使用 UFLCXR 液相色谱系统，开发了葡萄酒中合成色素，包括：柠檬黄、胭脂红、日落黄、苋菜红、亮蓝的检测方法。本法具有便捷、线性、重复性好和灵敏度高等优点，检出限低于葡萄酒标准测试要求，可以用于葡萄酒中合成色素的检测。