

高效液相色谱法测定软糖中的胭脂红酸

魏鲜娥, 蔡伟江, 杨祖伟*, 李 珍, 陈绮梦, 苏杜威

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法测定软糖中胭脂红酸含量的方法。**方法** 通过加热溶解软糖释放出其中的胭脂红酸, 再采取过聚酰胺粉层析柱, 进行除杂、洗脱、净化, 采取磷酸二氢钾溶液-乙腈作为流动相, 进行梯度洗脱, 经 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长: 494 nm; 样品分析时间 30 min。**结果** 胭脂红酸线性范围为 0.4~4.0 μg/mL, 方法相关性好($r^2=0.9999$), 方法检出限为 0.6 mg/kg, 定量限为 1.6 mg/kg, 相对标准系数(relative standard deviation, RSD)为 2.9%, 回收率范围是 99.70%~109.51%($n=9$)。**结论** 此法操作方便、准确、灵敏, 适合测定软糖中的胭脂红酸, 能有效地对软糖中添加胭脂红酸的量进行控制。

关键词: 软糖; 胭脂红酸; 高效液相色谱法

Determination of carminic acid in soft sweets by high performance liquid chromatography

WEI Xian-E, CAI Wei-Jiang, YANG Zu-Wei*, LI Zhen, CHEN Qi-Meng, SU Du-Wei

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of carminic acid in soft sweets. **Methods** The carminic acid in soft sweets was released by heating and dissolving the soft sugar, and then it was purified and condensed by polyamide powder chromatography column. Potassium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile was used as mobile phase for gradient elution by C₁₈ chromatography column (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), with flow rate 1.0 mL/min, column temperature 35 °C, sample volume 10 μL, detection wavelength 494 nm and analysis time 30 min. **Results** The linear relation of the method was good with $r^2=0.9999$ in linear range of carminic acid at 0.4-4.0 μg/mL. The detection limit was 0.6 mg/kg, the quantitative limit was 1.6 mg/kg, the RSD(relative standard deviation) was 2.9%, and the recovery rate was 99.70%-109.51%($n=9$). **Conclusion** This method is convenient, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of carminic acid in soft sweets and can effectively control the amount of carminic acid added in soft sweets.

KEY WORDS: soft sweets; carminic acid; high performance liquid chromatography

1 引 言

胭脂红酸, 分子式 C₂₂H₂₀O₁₃, 可溶于水、乙醇、浓硫酸, 微溶于乙醚, 几乎不溶于石油醚、苯、氯仿, 常用作着

色剂, 主要用于作酒、水果浆、冷饮、饮料、糖果、糕点、肉类以及香肠等食品方面^[1]。GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[2]规定, 胭脂红酸可用于乳类、果酱、糖果、方便米面制品、熟肉制品等 21 类食品, 且

*通讯作者: 杨祖伟, 工程师, 主要研究方向为保健食品功效评价。E-mail: yangzuwei@163.com

*Corresponding author: YANG Zu-Wei, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: yangzuwei@163.com

对各类食品中使用限量做了规定。因此为规范胭脂红酸的合理使用,有必要建立稳定可靠的检测方法^[3]。已报道的胭脂红酸的检测方法有分光光度法^[4,5]、薄层色谱法^[6]、电泳法^[7]、试剂盒方法^[8]和高效液相色谱法^[9-15],其中高效液相色谱法精确度高、重现性好,是胭脂红酸检测的首选方法。目前的高效液相色谱法检测胭脂红酸,对样品只是做简单的溶解、提取处理,只适合检测胭脂红酸含量比较高的样品,对低含量的胭脂红酸样品,无法有效检出胭脂红酸,难以起到控制的目的。同时,针对软糖样品,由于样品基质复杂,简单的处理无法去除大量杂质,影响胭脂红酸的分离效果,且容易堵塞色谱柱,导致色谱柱寿命大大降低。本文针对软糖样品,对胭脂红酸的净化、浓缩方法进行了研究,开发出了一种对胭脂红酸净化程度和浓缩程度非常高的方法。对测定软糖中的胭脂红酸,控制软糖胭脂红酸的添加具有一定的意义。

2 材料与方 法

2.1 试剂与仪器

胭脂红酸标准品(纯度:95.5%, Dr.Ehrenstorfer GmbH); 硫酸钠、柠檬酸、氨水、乙醇、磷酸二氢钾、磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);聚酰胺粉(柱层析用,100-200目,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,上海安普实验科技股份有限公司);含胭脂红酸的软糖(A公司);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

HH-6 水浴锅(常州普天仪器制造有限公司);1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);XA204 电子天平(感量 0.1 mg,瑞士梅特勒-托利多科学仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准溶液配制:精密称取胭脂红酸标准品 10 mg,加水溶解,转移至 50 mL 容量瓶中并定容至刻度线,得到 0.2 mg/mL 溶液,于 2~8 °C 避光保存,作为标准储备液;精密吸取胭脂红酸标准储备液 1.0 mL 至 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度线,得到 4.0 μg/mL 溶液,即得标准溶液。

饱和硫酸钠溶液:称取适量硫酸钠,加适量水溶解,得到饱和溶液。

1%(m:V)柠檬酸溶液:取 1 g 柠檬酸,加 100 mL 水使溶解。

洗涤液:取饱和硫酸钠溶液 4 mL 和 1%柠檬酸溶液 1 mL,加水至 25 mL,混匀。

解析液:取 1 mL 氨水和 10 mL 乙醇,加水至 50 mL,混匀。

磷酸溶液:取 1 mL 磷酸,加 30 mL 水溶解。

流动相 A:称取磷酸二氢钾 6.80 g,加 1000 mL 水溶解,用磷酸调节 pH 至 3.0。

2.2.2 标准曲线的绘制

对 2.2.1 标准工作溶液再进行稀释成 5 个梯度浓度稀释,制备分别含 0.4、0.8、1.6、2.4、4.0 μg/mL 胭脂红酸标准溶液,注入高效液相色谱仪,以胭脂红酸的浓度为横坐标,以相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

2.2.3 样品前处理

(1)试样提取

称取软糖样品 3 g,至 50 mL 离心管中,加水 20 mL,在 70 °C 水浴锅中加热使溶解,依次加 0~4 mL 饱和硫酸钠溶液和 2 mL 1%柠檬酸溶液,混匀,静置 5 min,于 8000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

(2)样品净化

称取聚酰胺粉 0.5 g,用少量 1%柠檬酸溶液分散,转移至层析柱中,将上清液经过漏斗,缓慢加入到层析柱里,残渣用 10 mL 洗涤液振摇分散,离心,再将上清液合并至层析柱里。用 10 mL 洗涤液洗柱,再用水洗柱至洗脱液呈中性,均弃去洗脱液。然后用 9 mL 解析液分多次洗脱柱子至 10 mL 容量瓶中(弃去最初的无色部分),加 0.5 mL 磷酸溶液,用水定容至刻度,混匀,得供试品溶液。

2.2.4 液相色谱条件

菲罗门 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流速:1.0 mL/min,进样体积:10 μL,柱温:35 °C,检测波长:494 nm。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流动相 A/%	流动相 B(乙腈)/%
0	95	5
25	75	25
26	95	5
30	95	5

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

胭脂红酸在 200~800 nm 进行光谱扫描,紫外光区最大吸收波长为 280 nm,可见光区最大吸收波长为 494 nm,考虑到软糖中含有的其它成分会对目标峰产生干扰,选择 494 nm 作为检测波长。胭脂红酸需要在酸性流动相中才能保证比较好的分离效果,试验中发现,以 pH 为 3.0 的磷酸二氢钾和乙腈为流动性,采用梯度洗脱,用 C₁₈ 色谱柱分离,胭脂红酸的色谱峰尖锐,分离度良好,如图 1 所示。

3.2 前处理条件优化

因软糖样品含有大量粘性大的基质,需要加以去除,否则会影响后续的检测。在试验过程中发现,胭脂红酸在

酸性环境下能被聚酰胺粉充分吸附,在碱性环境下可被洗脱出来。本方法对软糖样品溶解后,过聚酰胺粉进行层析柱,可去除大量杂质,同时聚酰胺粉还能对胭脂红酸有富集作用,非常适合胭脂红酸含量低的样品检测,样品色谱图见图2,由图可知胭脂红酸分离效果好,能更准确地对软糖样品中的胭脂红酸进行定量测量。

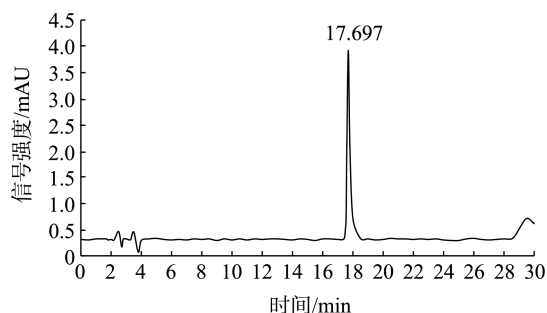


图1 胭脂红酸色谱峰图

Fig.1 Chromatogram of carmine acid

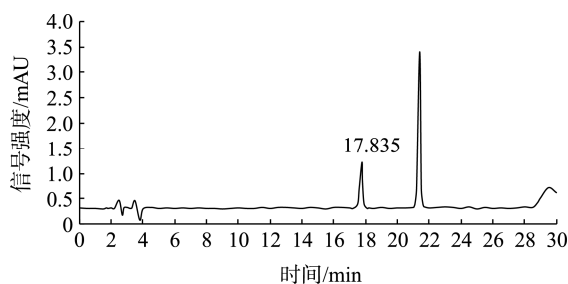


图2 样品色谱峰图

Fig.2 Chromatogram of sample

3.3 方法的线性范围及检出限

测定的胭脂红酸的标准方程为 $Y=9.7401X+0.1390$ ($r^2=0.9999$), 线性范围为 $0.40\sim 4.0\ \mu\text{g/mL}$, 表明方法的线性关系良好。将标准工作溶液逐级稀释后,以信噪比 $S/N=3$ 计算检出限,以 $S/N=10$ 计算定量限,当取样量为 $3.0\ \text{g}$, 定容体积为 $10\ \text{mL}$ 时,方法检出限为 $0.6\ \text{mg/kg}$, 定量限为 $1.6\ \text{mg/kg}$, 表明方法灵敏度高,同时曲线的最低点已经低于定量限浓度,再低有可能会影响线性关系,因样品中胭脂红酸的含量低, $0.4\sim 4.0\ \mu\text{g/mL}$ 的范围可满足实际样品检测的需求。

3.4 回收率及精密度实验

取9份软糖样品,测定了胭脂红酸加标水平为 3.912 、 7.824 和 $11.736\ \mu\text{g}$ 的回收率,3个水平,每组3个平行样,计算平均回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果见表2。胭脂红酸在不同加标浓度下的加标回收率范围是 $99.70\%\sim 109.51\%$, RSD为 2.9% ,表明采用聚酰

胺对胭脂红酸进行净化、浓缩的方法能够准确测量软糖中的胭脂红酸。

表2 回收率和精密度的实验结果($n=3$)Table 2 Experimental results of recovery and precision ($n=3$)

序号	测得对照 品量/ μg	加标量 μg	回收率 /%	平均 回收率/%	RSD/%
1	4.026	3.912	102.91		
2	4.284	3.912	109.51		
3	4.121	3.912	105.34		
4	8.148	7.824	104.14		
5	8.299	7.824	106.07	104.8	2.9
6	8.139	7.824	104.03		
7	12.746	11.736	108.61		
8	12.106	11.736	103.15		
9	11.701	11.736	99.70		

3.5 实际样品检测结果

取6份软糖样品,按方法检测样品中胭脂红酸的含量,见表3,6份样品的检测含量范围为 $2.506\sim 2.683\ \text{mg/kg}$, 平均含量 $2.60\ \text{mg/kg}$, 相对标准偏差(RSD)为 2.8% ,说明该方法检测过程的操作平行性很好,能满足实际软糖样品中低含量的胭脂红酸的检测。

表3 实际样品检测结果($n=6$)Table 3 The test results of the actual samples ($n=6$)

序号	称样量 /g	浓度 / $(\mu\text{g/mL})$	含量 /(mg/kg)	平均含量 /(mg/kg)	RSD /%
1	3.0220	0.806088	2.667		
2	3.0573	0.805873	2.635		
3	3.0218	0.810788	2.683	2.60	2.8
4	3.0640	0.789294	2.576		
5	3.0206	0.757133	2.506		
6	3.0283	0.768463	2.537		

4 结论与讨论

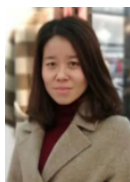
本文通过聚酰胺粉层析柱,对软糖样品中的胭脂红酸进行净化、浓缩,用磷酸二氢钾溶液-乙腈作为流动相,进行梯度洗脱,能很好分离出软糖中的胭脂红酸,并进行准确的定量,其中采用聚酰胺粉层析柱对胭脂红酸进行净化、浓缩的方法为国内首创,为解决低含量胭脂红酸的提取提供了一种新的参考方法,对控制软糖胭脂红酸的添加具有一定的意义。

参考文献

- [1] 王素芳, 俞超, 王忠华. 天然色素-胭脂虫红色素[J]. 药物生物技术, 2007, 14(2): 1532-1561.
Wang SF, Yu C, Wang ZH. Natural pigment-cochineal red pigment [J]. Pharm Biotechnol, 2007, 14(2): 1532-1561.
- [2] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard for the use of food additives [S].
- [3] 张亚勋, 袁琳, 杜瑞, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定食品中胭脂虫红酸含量[J]. 河南化工, 2019, (5): 59-60.
Zhang YX, Yuan L, Du R, *et al.* Determination of carminic acid in food by solid phase extraction high performance liquid chromatography [J]. Henan Chem Ind, 2019, (5): 59-60.
- [4] 李明元. 反相光密度扫描分析食品中虫胶色素和胭脂虫红色素的分析[J]. 口岸卫生控制, 2001, 6(2): 42-45.
Li MY. Analysis of shellac pigment and cochineal red pigment in food by reversed phase optical density scanning [J]. Port Health Control, 2001, 6(2): 42-45.
- [5] 张益峰, 朱鑫雁, 王素芳, 等. 分光光度法测定胭脂虫红酸的研究[J]. 中国酿造, 2009, (6): 152-154.
Zhang YF, Zhu XY, Wang SF, *et al.* Spectrophotometric determination of carminic acid [J]. Chin Brew, 2009, (6): 152-154.
- [6] 李志国, 赵杰军, 张建云, 等. 胭脂虫与胭脂虫色素的利用[J]. 食品工业技术, 2007, 28(7): 2252-2271.
Li ZG, Zhao JJ, Zhang JY, *et al.* Utilization of cochineal and cochineal pigment [J]. Food Ind Technol, 2007, 28(7): 2252-2271.
- [7] 许元红, 唐亚军, 吴明嘉. 毛细管电泳内标法测定糖果中胭脂虫红酸[J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 1362-1381.
Xu YH, Tang YJ, Wu MJ. Determination of carminic acid in candy by capillary electrophoresis with internal standard method [J]. J Instrum Anal, 2007, 26(1): 1362-1381.
- [8] 李佳楠, 杨帆帆, 何峰容. 胭脂虫红 ELISA 检测试剂盒的制备及应用[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2019, (5): 53-58.
Li JN, Yang FF, He FR. Preparation and application of carmine acid ELISA kit [J]. J Jiangnan Univ (Nat Sci Ed), 2019, (5): 53-58.
- [9] 董超先, 张晨曦, 邹幼成, 等. 高效液相色谱法测定多类食品中胭脂虫红的含量[J]. 中国食品添加剂, 2019, (10): 99-103.
Dong CX, Zhang CX, Zou YC, *et al.* Determination of carmine in various foods by HPLC [J]. Chin Food Addit, 2019, (10): 99-103.
- [10] 陈营寿, 刘唤明, 高平, 等. 高效液相色谱法测定食品中胭脂虫红酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 8(23): 157-164.
Chen YS, Liu HM, Gao P, *et al.* Determination of carminic acid in food by HPLC [J]. J Food Saf Qual, 2018, 8(23): 157-164.
- [11] 李晓莹. 充气糖果中胭脂虫红酸的高效液相色谱测定[J]. 中国食品添加剂, 2019, (10): 99-103.
Li XY. Determination of carminic acid in inflatable candy by HPLC [J]. Chin Food Addit, 2019, (10): 99-103.
- [12] 冯永巍. 蛋白饮料中胭脂虫红酸的高效液相色谱-荧光法检测技术研究[J]. 中国酿造, 2012, 10(31): 171-173.
Feng YW. Determination of carminic acid in protein drinks by high performance liquid chromatography fluorescence method [J]. Chin Brew, 2012, 10(31): 171-173.
- [13] 郭蒙京, 李莹, 赵丹莹. 食品中胭脂虫红的高效液相色谱测定法[J]. 职业与健康, 2016, 32(18): 2508-2510.
Guo MJ, Li K, Zhao DY. Determination of carmine in food by HPLC [J]. Occup Health, 2016, 32 (18): 2508-2510.
- [14] 顾正健, 黄雅佩, 沈阳, 等. 高效液相色谱法同时测定冷饮中禁用色素胭脂虫红酸、喹啉黄和碱性蓝[J]. 化学试剂, 2014, (4): 325-328.
Gu ZJ, Huang YP, Shen Y, *et al.* Simultaneous determination of carminic acid, quinoline yellow and basic blue in cold drinks by HPLC [J]. Chem Reagent, 2014, (4): 325-328.
- [15] 虞成华, 陆志芸, 朱伟, 等. 反相高效液相色谱法测定食品中胭脂虫红色素[J]. 理化检验: 化学分册, 2012, (8): 991-992.
Yu CH, Lu ZY, Zhu W, *et al.* Determination of cochineal red pigment in food by RP-HPLC [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2012, (8): 991-992.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品质量安全与检测。

E-mail: weixe@by-health.com

杨祖伟, 工程师, 主要研究方向为保健食品功效评价。

E-mail: yangzuwei@163.com