

食品添加剂的测定

食品中着色剂含量的测定

项目任务：饮料中合成色素的测定

问题：

- 你一定喝过有色饮料，它都添加了哪些食品添加剂？
- 为改善食品感官特性常要加入色素，它对人体安全吗？
- 借助现代信息技术查询分析方法，测定它，你能做到吗？
- 色素无处不在，但安全更重要呦！

目标：

- 培养学生具有解毒国家标准的能力；
- 熟悉食品中常用色素；
- 能依据国家标准完成饮料中合成色素的测定。

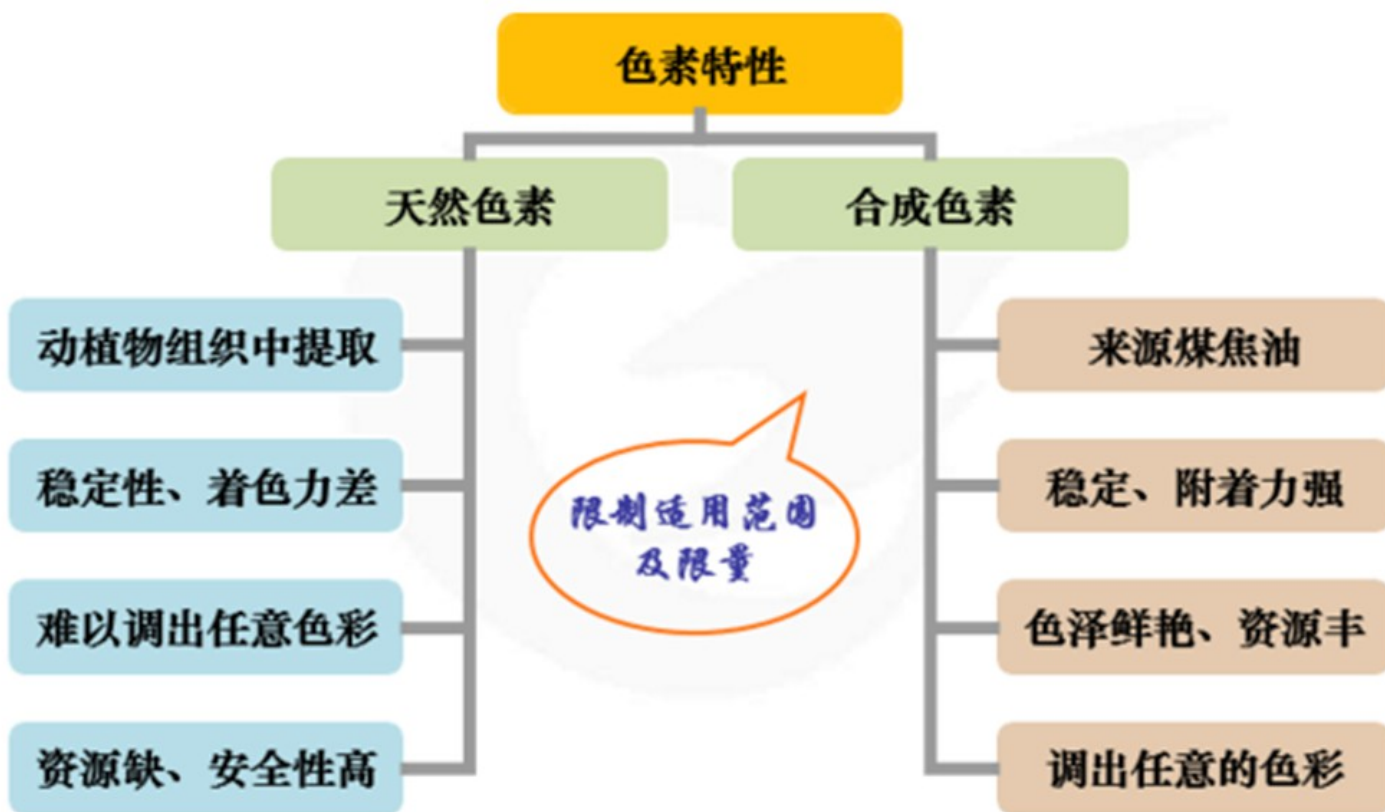
内容：

- 食品色素概述；
- 饮料中合成色素的测定 GB/T 5009.35-2003 。

一、食用色素概述

- 食用色素（着色剂）：以食品着色、改善食品的色泽为目的的食品添加剂。
- 分为天然色素和合成色素。
- 允许使用的合成色度：胭脂红、柠檬黄、日落黄、亮蓝、靛蓝、苋菜红、诱惑红、赤藓红等。

色素特性



二、饮料中合成色素的测定

~~GB/T 5009.35-2003~~

- 高效液相色谱法（第一法）
- 薄层色谱法（第二法）
- 示波极谱法（第三法）



美年达（橙味）配料表

水	二氧化碳	食用香精	柠檬黄
果葡糖浆	柠檬酸	柠檬酸钠	日落黄
白砂糖	六偏磷酸钠	维生素C	胭脂红
	山梨酸钾		



1、高效液相色谱法（第一法）

原理：

- 食品中人工合成色素（着色剂）用聚酰胺吸附法或液 - 液分配法提取，制成水溶液。
- 注入高效液相色谱仪，经反相色谱分离；
- 根据保留时间定性和峰面积比较定量。

分析流程



仪器和试剂

试剂	规格	试剂	规格
聚酰胺粉	过200目筛	乙醇-氨水-水溶液	7+2+1
乙酸铵溶液	0.02mol/L	色素标准溶液	1.00mg/mL
甲醇-甲酸溶液	6+4	甲醇	色谱纯
柠檬酸溶液	200g/L	G3垂融漏斗	
蒸馏水	pH6	高效液相色谱仪	紫外检测器

试样处理

- 称取 20.0-40.0g ，放入 100mL 烧杯中。
- 若含二氧化碳试样，加热驱除二氧化碳



色素提取（聚酰胺吸附法）

- **吸附：** 试样溶液加柠檬酸溶液调 pH 到 6，加热至 60℃；
- 将 1g 聚酰胺粉加少许水调成粥状，倒入试样溶液中，搅拌片刻，以 G3 垂融漏斗抽滤；
- **洗涤：** 用 60℃ pH=4 的水洗涤 3-5 次，用甲醇 - 甲酸混合溶液洗涤 3-5 次，再用乙醚洗涤 3-5 次（洗去干扰色素）；



-
- **解吸：**用乙醇 - 氨水 - 水混合溶液解吸 3-5 次，每次 5 mL，收集解吸液，加乙酸中和；
 - **蒸发浓缩：**蒸发至近干；
 - **定容：**加水溶解，定容至 5mL；
 - **过滤：**经 0.45um 滤膜过滤，取 10uL 进高效液相色谱仪。

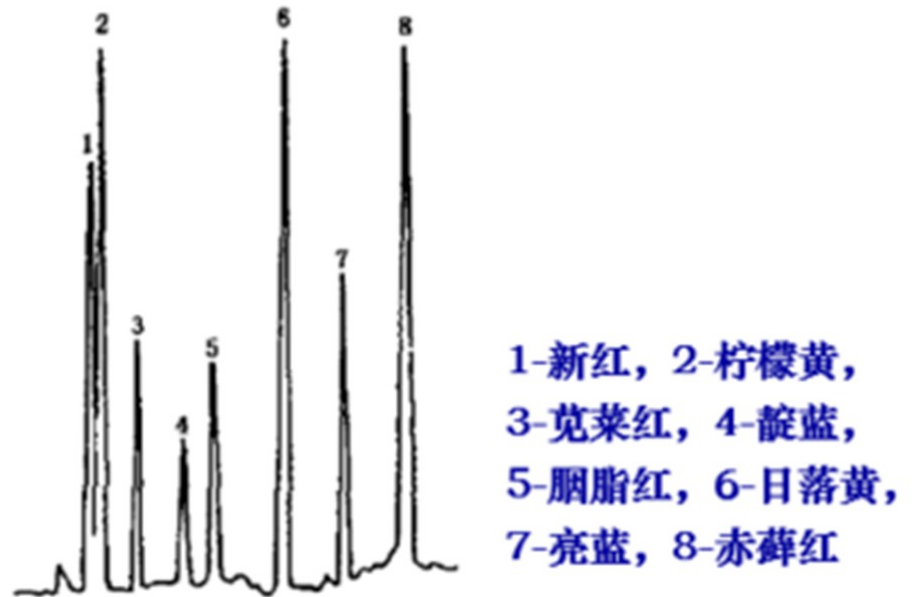
试样溶液 - 吸附色素 - 解吸色素 - 蒸发浓缩 -

高效液相色谱参考条件

项目	规格	项目	规格
色谱柱	YWG-C18 10 μ m不锈钢柱4.6mm (i.d) $\times$ 250mm		
流动相	甲醇：乙酸铵溶液 (pH=4, 0.02mol/L)		
梯度洗脱	甲醇: 20~35%, 3%/min; 35~98%, 9%/min; 98%继续6min		
流速	1mL/min	紫外检测器	254nm波长

测定

- 取相同体积样液和合成色素（着色剂）标准使用液分别注入高效液相色谱仪；
- 根据保留时间定性；
- 外标峰面积定量。



结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000 \times 1000}$$

式中：

X —试样中色素的含量，g/kg；

A —样液中色素的质量， μg ；

V_2 —进样体积，mL；

V_1 —试样稀释总体积，mL；

m —试样质量，g。

2、薄层色谱法（纸色谱法）

原理：

- 水溶性酸性合成色素在酸性条件下被聚酰胺吸附；
- 在碱性条件下解吸附；
- 再用纸色谱法或薄层色谱法进行分离；
- 与标准比较定性、定量。

仪器和试剂

试剂	规格	试剂	
聚酰胺粉	过200目筛	乙醇-氨水溶液	
乙酸铵溶液	0.02mol/L	色素标准溶液	1.00mg/mL
甲醇-甲酸溶液	6+4	正丁醇-无水乙醇-氨水 (1%)	6+2+3
柠檬酸溶液	200g/L	G3垂融漏斗	展开槽
蒸馏水	pH6	分光光度计	滤纸

试样处理

- 称取 50.0g 试样，放入 100mL 烧杯中。
- 若含二氧化碳试样，加热驱除二氧化碳。

吸附分离

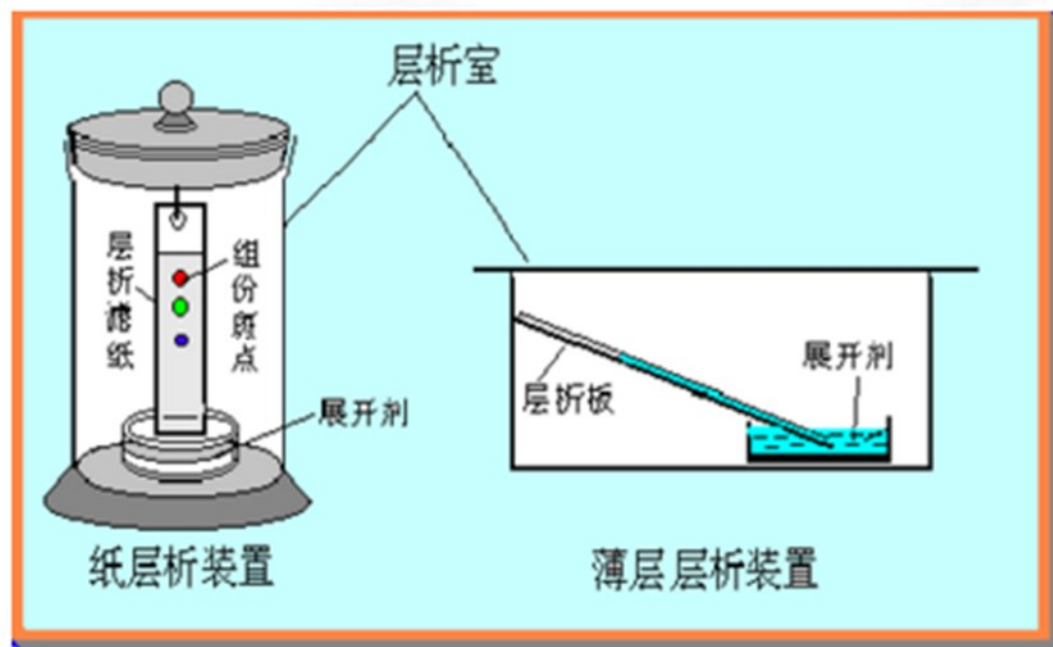
- ☆ 将试液加热至70℃→加入0.5g~1.0g聚酰胺粉→充分搅拌→用柠檬酸溶液（200g/L）调pH至4→使色素完全被吸附，如溶液还有颜色，可以再加一些聚酰胺粉→
- ☆ 将吸附色素的聚酰胺全部转入G3垂融漏斗中过滤（如用G3垂融漏斗过滤可以用水泵慢慢地抽滤）→
- ☆ 用pH4的70℃水反复洗涤→每次20mL→边洗边搅拌→
- ☆ 若含有天然着色剂→再用甲醇-甲酸溶液洗涤1~3次→每次20mL→至洗液无色为止。

吸附分离

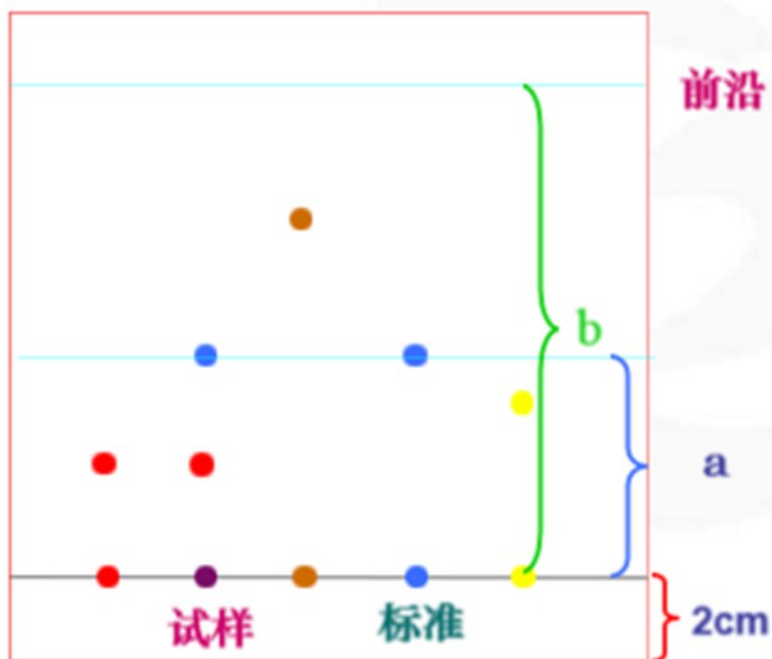
- ☆ 再用70℃水多次洗涤至流出的溶液为中性→洗涤过程中应充分搅拌→
- ☆ 用乙醇-氨溶液分次解吸全部着色剂→收集全部解吸液→于水浴上驱氨→
- ☆ 水浴上浓缩至2mL→移入5mL容量瓶中→用50%乙醇洗涤→定容。
- ☆ 如果为单色，则用水准确稀释至50mL，直接测定。

纸色谱定性与定量分析

- 取色谱纸，在距底边 2cm 的起始线上分别点 3-10 μ L 试样溶液、1-2 μ L 色素标准溶液；
- 挂于盛有展开剂的层析缸中，用上行法展开，待溶剂前沿展至 15cm 处，将滤纸取出于空气中晾干，与标准斑比较定性。
- 取 0.5mL 样液，在起始线上从左到右点成条状，纸的左边点色素标准溶液，依法展开，晾干后先定性再供定量用。



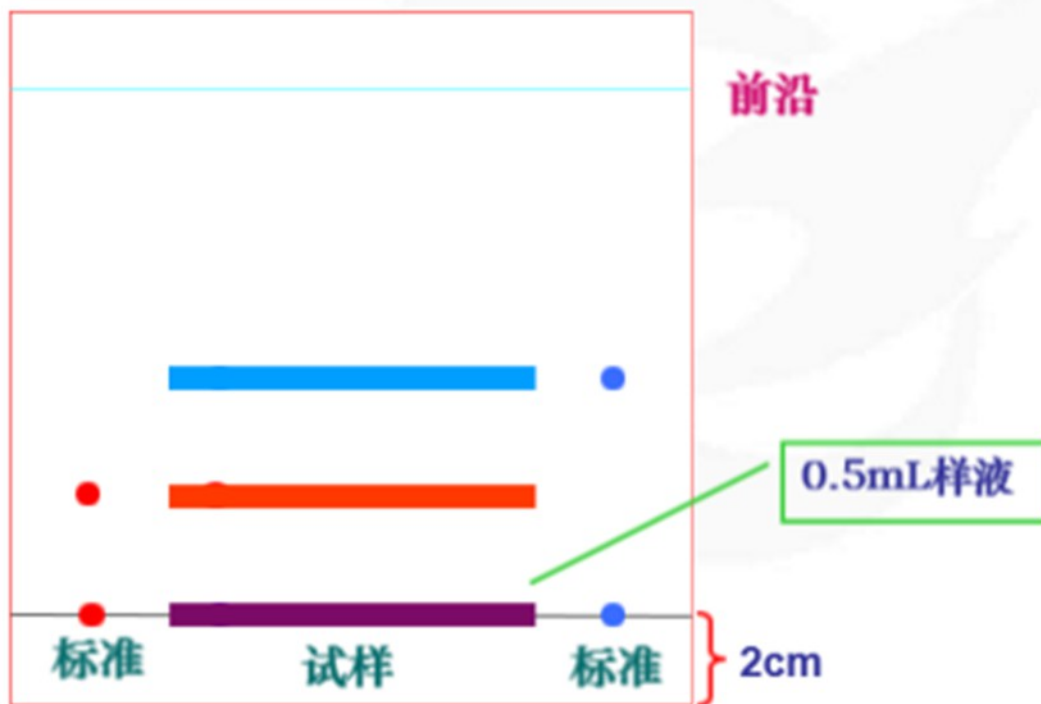
纸色谱定性分析



$$\text{比移值 } R_f = \frac{a}{b}$$

用比移值进行定性分析

纸色谱定量分析



定量分析 - 试样测定

- 将纸色谱的条状色斑剪下，用少量热水洗涤数次，洗涤移入 10mL 比色管中，并加水稀释至刻度；
- 用 1cm 比色杯，以零管调节零点，于一定波长下（胭脂红 510nm，苋菜红 520nm，柠檬黄 430nm，日落黄 482nm，亮蓝 627nm，靛蓝 620nm），测定吸光度；
- 用标准曲线定量。

定量分析 - 标准曲线制备

- 分别吸取 0 、 0.5 、 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0mL 胭脂红、苋菜红、柠檬黄、日落黄色素标准使用溶液，或 0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0mL 亮蓝、靛蓝色素标准使用溶液，分别置于 10mL 比色管中，各加水稀释至刻度。
- 用 1cm 比色杯，以零管调节零点，在一定能够波长下（胭脂红 510nm ， 苋菜红 520nm ， 柠檬黄 430nm ， 日落黄 482nm ， 亮蓝 627nm ， 靛蓝 620nm ），测定吸光度；
- 分别绘制标准曲线。

结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中：X—试样中着色剂的含量，单位为克每千克（g/kg）；

A—测定用样液中色素的质量，单位为毫克（mg）；

m—试样质量或体积，单位为克或毫升（g或mL）；

V_1 —试样解吸后总体积，单位为毫升（mL）；

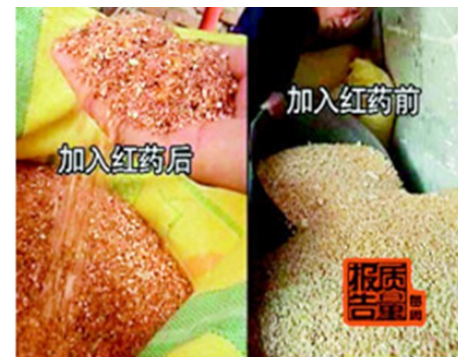
V_2 —样液点板（纸）体积，单位为毫升（mL）。

结果判断 GB2760-2011

添加剂名称	允许使用的食品	最大允许使用量g/kg
胭脂红及其铝色淀	风味饮料（包括果味饮料、乳味、茶味及其他味饮料）	0.05（以胭脂红计）
苋菜红及其铝色淀		0.05（以苋菜红计）
亮蓝及其铝色淀		0.025（以亮蓝计）
日落黄及其铝色淀		0.1（以日落黄计）
赤藓红及其铝色淀		0.05（以赤藓红计）
柠檬黄及其铝色淀		0.05（以柠檬黄计）

苏丹红的检测

苏丹红号



苏丹红的检测方法

- GB/T 19681-2005：样品经溶剂正己烷提取、固相萃取净化后，用反相高效液相色谱——紫外可见检测器进行色谱分析，采用外标法定量。
 - ✓ 色谱柱：Zorbax SB-C18 3.5 μ m 4.6mm $\times$ 150mm（或相当者）
 - ✓ 流动相：
 - 溶剂 A 0.1%甲酸的水溶液：乙腈 = 85: 15
 - 溶剂 B 0.1%甲酸的乙腈溶液：丙酮=80: 20
 - ✓ 梯度洗脱：流速:1mL/min
 - ✓ 柱温：30 $^{\circ}$ C
 - ✓ 检测波长：苏丹红 I 478nm；苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 520nm
 - ✓ 进样量10 μ L

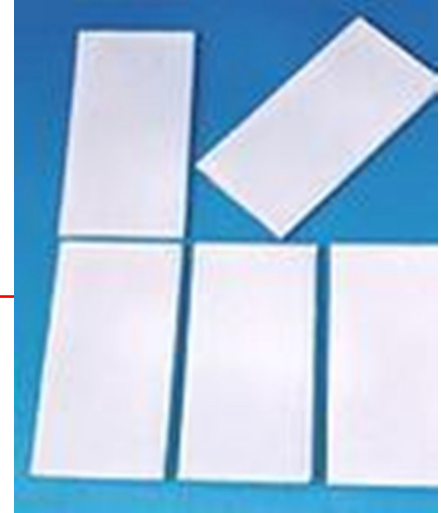
蜜饯中日落黄含量的测定



日落黄的特性

- 日落黄为橙红色粉末或颗粒，无臭。
- 易溶于水、甘油、丙二醇，微溶于乙醇，不溶于油脂
- 中性和酸性水溶液呈橙黄色，遇碱变为红褐色
- 吸湿性强，耐热性及耐光性强，还原时褪色，溶于浓硫酸得橙色液
- 易着色，坚牢度高

薄层色谱法



① 定义及分类

- 薄层色谱，或称薄层层析，薄层层析是把支持物均匀涂布于支持板（常用玻璃板，也可用涤纶布等）上形成薄层，然后用相应的溶剂进行展开。从而对混合样品进行分离、鉴定和定量的一种层析分离技术。
- 薄层层析可根据作为固定相的支持物不同，分为薄层吸附层析（吸附剂）、薄层分配层析（纤维素）
薄层离子交换层析（离子交换剂）、薄层凝胶层析（凝胶剂）

薄层色谱法



② 优缺点

- **优点：** 操作方便、设备简单、显色容易等特点，同时展开速率快，一般仅需 15 ~ 20 分钟；混合物易分离，分辨力一般比以往的纸层析高 10 ~ 100 倍，它既适用于只有 0.01 μg 的样品分离，又能分离大于 500mg 的样品作制备用，而且还可以使用如浓硫酸、浓盐酸之类的腐蚀性显色剂。
- **缺点：** 对生物高分子的分离效果不甚理想。

薄层色谱法

③ 操作步骤

步骤 1：薄层板制备

- 除另有规定外，将 1 份固定相和 3 份水在研钵中向一方向研磨混合，去除表面的气泡后，倒入涂布器中，在玻板上平稳地移动涂布器进行涂布（厚度为 $0.2 \sim 0.3\text{mm}$ ），取下涂好薄层的玻板，置水平台上于室温下晾干，后在 110°C 烘 30 分钟，即置有干燥剂的干燥箱中备用。使用前检查其均匀度（可通过透射光和反射光检视）。

薄层色谱法

步骤 2：点样

- 除另有规定外，用点样器点样于薄层板上，一般为圆点，点样基线距底边 2.0cm，样点直径及点间距离同纸色谱法，点间距离可视斑点扩散情况以不影响检出为宜。点样时必须注意勿损伤薄层表面。

薄层色谱法

步骤 3：展开

- 展开室如需预先用展开剂饱和，可在室中加入足够量的展开剂，并在壁上贴二条与室一样高、宽的滤纸条，一端浸入展开剂中，密封室顶的盖，使系统平衡或按正文规定操作。将点好样品的薄层板放入展开室的展开剂中，浸入展开剂的深度为距薄层板底边 0.5 ~ 1.0cm（切勿将样点浸入展开剂中），密封室盖，待展开至规定距离（一般为 10 ~ 15cm），取出薄层板，晾干，按各品种项下的规定检测。

薄层色谱法

步骤 4：显色

- 取出的薄层板，立即喷洒显色剂，使其显色，计算 R_f 值。或使之出现各种有色的斑点，与标准进行对照比较，可确定其成分。
- $R_f = \frac{\text{起始线到样品斑点中心距离}}{\text{起始线到溶剂前沿距离}}$

薄层色谱法

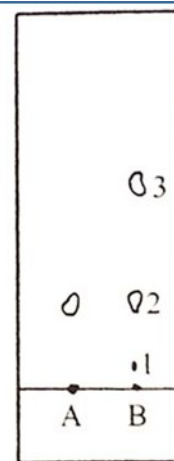
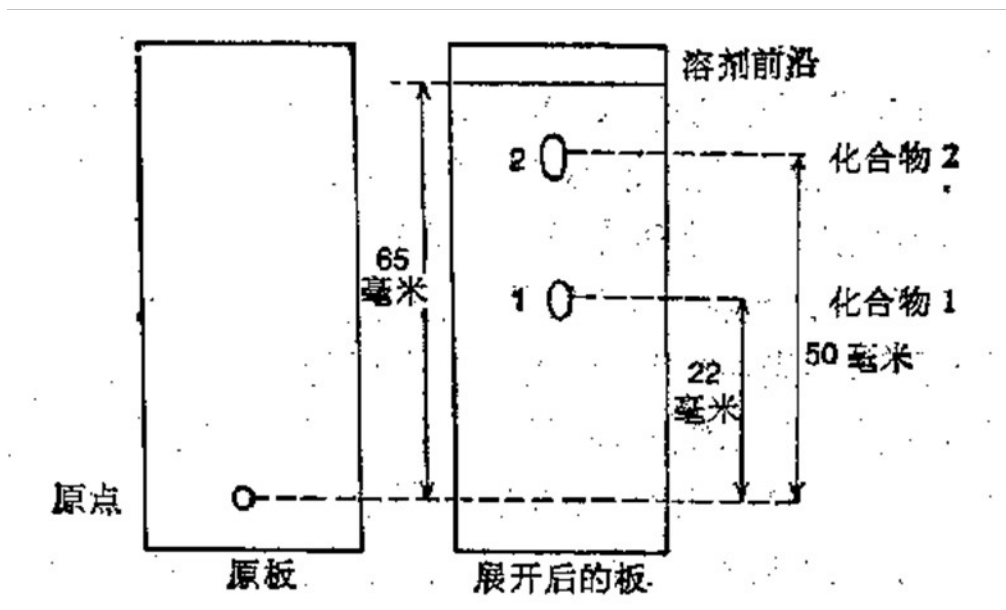


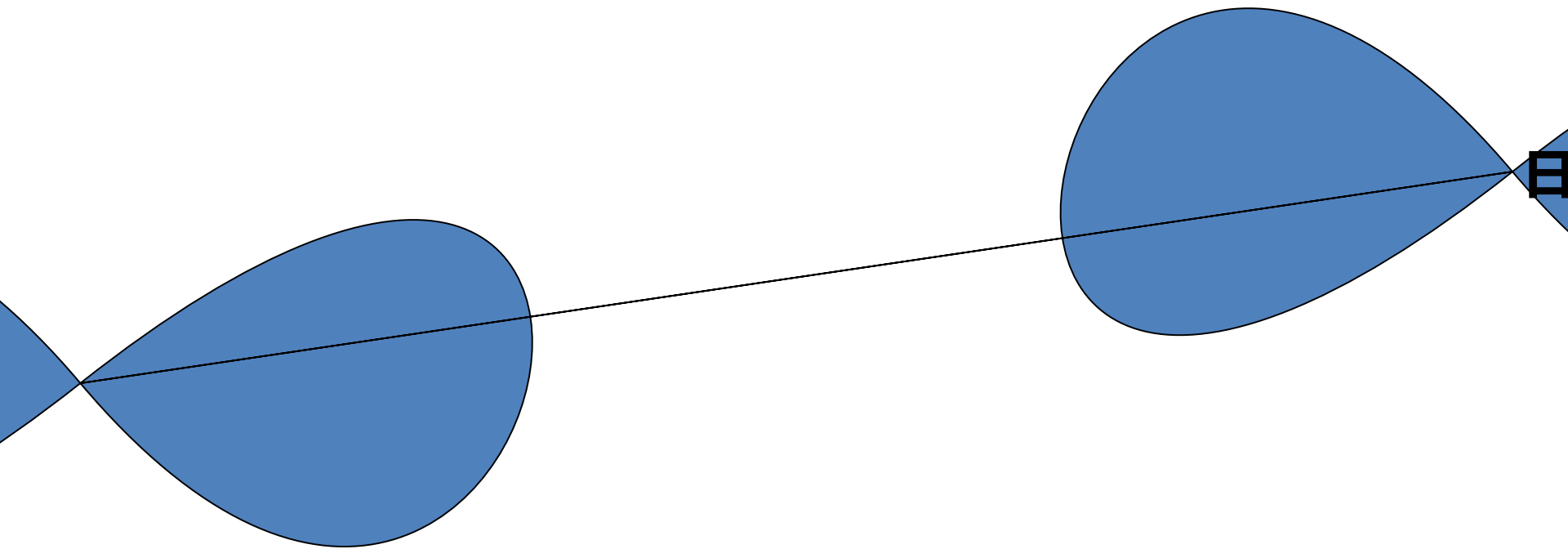
图 6-4 杀虫脒的薄层析分离

A. 标样 B. 试样

1. 中间体 2. 杀虫脒

3. 多氯化物

薄层色谱法测定原理



具体工作任务分解

仪器和试剂的准备

样品预处理

薄层板及附分离

定性鉴定、定量分析

数据记录与处理

任务一 仪器和试剂的准备

- **试剂：**

- 聚酰胺粉；硅胶 G；乙醇（50%）；可溶性淀粉；乙醇-氨溶液；P H4 的水；日落黄标准溶液；日落黄标准使用液。

展开剂：

- ① 正丁醇-无水乙醇-氨水（1%）（6+2+3）：供纸色谱用。
- ② 正丁醇-吡啶-氨水（1%）（6+3+4）：供纸色谱用。
- ③ 柠檬酸钠溶液（25g/L）-氨水-乙醇（8+1+2）：供薄层色谱用。

- **仪器：**

- G3 垂融漏斗；水浴锅；研钵；干燥箱；干燥器；薄层板：5cm×20cm；层析缸；展开槽，25cm×6 cm×4 cm；微量注射器或血色素吸管；滤纸：中速滤纸，纸色谱用；电吹风机；剪刀；刮刀（小刀）；漏斗；蒸发皿；可见分光光度计

任务二 样品预处理

- 称取 5.00g 粉碎的试样→加 30mL 水→温热溶解→PH 试纸测 PH 值→若高，用柠檬酸溶液（200g/L）调至 pH4 左右。

【注】

用柠檬酸调至 pH4 左右的目的是方便日落黄被聚酰胺吸附。



扩展知识

· 其他类型样品预处理方法

- ① 果味水、果子露、汽水：称取 50.0g 试样于 100mL 烧杯中，汽水需加热驱除 CO₂。
- ② 配制酒：称取 100.0g 试样于 100mL 烧杯中，加碎瓷片数块，加热驱除乙醇。
- ③ 硬糖、淀粉软糖：同本法。
- ④ 奶糖：称取 10.0g 粉碎均匀的试样，加 30mL 乙醇-氨溶液溶解，置水浴上浓缩至约 20mL，立即用硫酸溶液（1+10）调至微酸性，再加 1.0mL 硫酸（1+10），加 1mL 钨酸钠溶液（100g/L），使蛋白质沉淀，过滤，用少量水洗涤，收集滤液。

扩展知识

- **蛋糕类：**称取 10.0g 粉碎均匀的试样，加海砂少许，混匀，用热风吹干用品（用手摸已干燥即可），加入 30mL 石油醚搅拌。放置片刻，倾出石油醚，如此重复处理三次，以除去脂肪，吹干后研细，全部倒入 G 3 垂融漏斗或普通漏斗中，用乙醇－氨溶液提取日落黄，直至日落黄全部提完，置水浴上浓缩至约 20mL，立即用硫酸溶液（1+10）调至微酸性，再加 1.0mL 硫酸（1+10），加 1mL 钨酸钠溶液（100g/L），使蛋白质沉淀，过滤，用少量水洗涤，收集滤液。

任务三 薄层吸附分离

- 将任务二得到的溶液加热至 70°C → 加入 $0.5\text{g} \sim 1.0\text{g}$ 聚酰胺粉 → 充分搅拌 → 柠檬酸溶液 (200g/L) 调 PH 至 4 → 将吸附日落黄的聚酰胺全部转入 G3 垂融漏斗 → 过滤 → 用 $\text{PH}4$ 的 70°C 水反复洗涤, 每次 20mL → 边洗边搅拌 → 至洗液无色为止 → 用 70°C 水多次洗涤 (洗涤过程中应充分搅拌) → 至流出的溶液为中性 → 乙醇 - 氨溶液分次解吸日落黄着色剂 → 收集解吸液 → 水浴上驱氨

任务三 薄层吸附分离

【注解】

用柠檬酸调至 pH4 左右的目的是使日落黄完全被吸附，如溶液还有颜色，可以再加一些聚酰胺粉。

【注意】

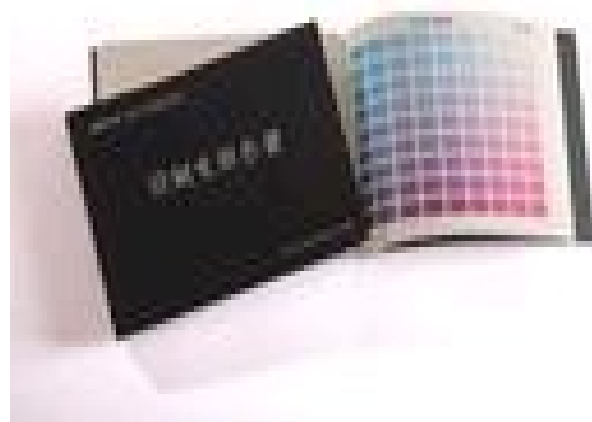
① 如果解吸液为单色，则用水准确稀释至 50mL，用分光光度法进行测定。

② 如果为多种着色剂混合液，则进行纸色谱或薄层色谱法分离后测定，即将上述溶液置水浴上浓缩至 2mL 后移入 5mL 容量瓶中，用 50% 乙醇洗涤容器，洗液并入容量瓶中并稀

任务四 定性测定

方法 1：纸色谱

- 色谱用纸→在距底边 2cm 的起始线上分别点 $3\mu\text{L}$ ~ $10\mu\text{L}$ 试样和 $1\mu\text{L}$ ~ $2\mu\text{L}$ 日落黄标准溶液→挂于分别盛有展开剂①、②的层析缸中→上行法展开→待溶剂前沿展至 15cm 处→将滤纸取出于空气中晾干→标准斑比较定性。



任务四 定性测定

方法 2：薄层色谱

- ① 薄层板的制备

称取 1.6g 聚酰胺粉、0.4g 可溶性淀粉及 2g 硅胶 G→研钵→15mL 水研匀→涂布器中铺成厚度为 0.3mm 的板→室温晾干→80℃ 干燥 1h→干燥器→备用。

- ② 点样

离板底边 2cm 处将 0.5mL 样液从左到右点成与底边平行的条状，板的左边点 2 μ L 日落黄标准溶液。

- ③ 展开

取适量展开剂③倒入展开槽中 将薄层板放入展开 待

任务五 定量分析

1、试样测定

- 将纸色谱的条状色斑剪下，用少量热水洗涤数次，洗液移入 10mL 比色管中，并加水稀释至刻度，作比色测定用。
- 将薄层色谱的条状色斑包括有扩散的部分，分别用刮刀刮下，移入漏斗中，用乙醇-氨溶液解吸着色剂，少量反复多次至解吸液于蒸发皿中，于水浴上挥去氨，移入 10mL 比色管中，加水至刻度，作比色用。

任务五 定量分析

2、标准曲线制备

- 分别吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL 日落黄色素标准使用溶液，分别置于 10mL 比色管中，各加水稀释至刻度。
- 上述试样与标准管分别用 1cm 比色杯，以零管调节零点，于一定波长下（482nm）测定吸光度，绘制标准曲线，样品 A 与与标准系列比较定量。

任务六 数据记录及处理

项目名称				检测日期		
样品名称				检验依据		
标准曲线						
浓度	0.00	0.50	1.0	2.0	3.0	4.0
吸光度 A						
样品值						
吸光度 A	1			2		
样品中含量						
平均值						
两次测定值之差						

任务六 数据记录及处理

1、比色皿的校正

测定波长：482 nm

比色皿厚度：1cm

比色皿编号	1	2	3	4
吸光度校正值				

任务六 数据记录及处理

2、标准曲线的绘制

测定波长：482 nm

比色皿厚度：1cm

容量瓶 编号	日落黄标准使用液 (0.1mg/mL)					
	1	2	3	4	5	6
取标样体积 mL	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
含色素的量 mg	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
色素浓度 mg/mL	0	0.005	0.01	0.02	0.03	0.04
吸光度 A						
校正后吸光度 A						

任务六 数据记录及处理

3、样品的测定

样品的质量 $m(g)$		
试样解吸后总体积 $V1$ (mL)		
测定次数	1	2
样液点样体积 $V2$ (mL)		
样液吸光度值 A		
校正后吸光度 A		
样液中色素的质量 $A1$ (mg)		
样品中色剂含量 $X(g/kg)$		
测定结果平均值 (mg/kg)		
标准规定分析结果的精密度	在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%	

任务六 数据记录及处理

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

X—— 样品中日落黄的含量， g/Kg

A—— 测定用样液中色素的质量， mg

m—— 样品质量， g

V1—— 样品解吸后的总体积， mL

V2—— 样液点板（纸）体积， mL

- 有效数字：计算结果保留二位有效数字。

任务七 结果判断

1、安全限量值

《食品添加剂使用标准》 GB2760-2007 规

日落黄及其铝色淀

sunset yellow, sunset yellow

aluminum lake

CNS 号 08.006

INS 号 110

功能 着色剂

食品分类号	食品名称/分类	最大使用量/(g/kg)	备 注
01.01.02	调制乳	0.05	以日落黄计
01.02.02	调味和果料发酵乳	0.05	以日落黄计
01.04.02	调制炼乳(包括甜炼乳、调味甜炼乳及其他使用了非乳原料的调制炼乳)	0.05	以日落黄计
03.0	冷冻饮品(03.04 食用冰除外)	0.09	以日落黄计
04.01.02.04	水果罐头(仅限西瓜酱罐头)	0.1	以日落黄计
04.01.02.05	果酱	0.5	以日落黄计
04.01.02.08	蜜饯凉果	0.1	以日落黄计
04.01.02.09	装饰性果蔬	0.2	以日落黄计
04.04.01.06	熟制豆类	0.1	以日落黄计
04.05.02	加工坚果与籽类	0.1	以日落黄计

2、检测报告

样品名称		检测目的			
规格型号		检测日期			
生产日期		报告日期			
生产单位		样品状态			
检测依据		样品来源			
检验结果					
序号	检测项目	单位	技术要求	检测结果	单项判定
1					
2					
3					
4					
5					
判定依据					

拓展知识

一、其他测定方法

1、高效液相色谱法

- 食品中人工合成着色剂用聚酰胺吸附法或液-液分配法提取，制成水溶液，注入高效液相色谱仪，经反相色谱分离，根据保留时间定性和与峰面积比较进行定量。

2、示波极谱法

- 食品中的合成着色剂，在特定的缓冲溶液中，在滴汞电极上可产生敏感的极谱波，波高与着色剂的浓度成正比，当食品中存在一种或两种以上互不影响测定的着色剂时，可用其进行定性定量分析。

拓展知识

二、天然色素使用安全性

安全性高，色泽较自然

- ① 动植物体生长环境污染，被喷洒农药或摄入了有害物质。
- ② 动植物体作为色素原料时因其本身腐败、变质产生了有害的毒素。
- ③ 在生产微生物色素时，由于培养、处理不当而污染其它微生物，从而产生毒素。
- ④ 在色素的提取加工中混入了有毒的物质如重金属、有机溶剂等