

HPLC 方法开发系统在有机合成色素分析 方法开发上的应用

摘要：本文中使用了岛津 HPLC 方法开发系统，建立了 29 种有机合成色素高效液相色谱快速分析方法，并采用方法转化软件转化为常规液相方法，实验验证分离效果良好。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

色素一般包括天然色素和人工合成色素。人工合成色素价格低廉、颜色丰富、性质稳定、易量产的特点，应用范围和使用率远超天然食用色素。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。

目前中药染色掺假现象时有发生，一些不法分子通过将一种物质染色冒充中药材，或将质量较差的中药材通过染色改善外观，以次充好，提高售价，来获取更大的经济利益。为了应对中药材或中药饮片中的色素滥用的做法，开发能够同时检测多种色素的 HPLC 方法迫在眉睫。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 29 种有机合成色素 HPLC 快速分析方法，并通过方法转换软件转化为常规液相方法，为有机合成色素的检测提供参考。

1 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-20A_{5R}×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）。

1.2 分析条件

色 谱 柱： Shimpack 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℃
 检测波长： Max Plot: 400-650 nm

2 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(0-1.5min)-60%B(17.5min)-90%B(17.51-22.5min)-5%B(22.51-25min)

柱 温： 40℃

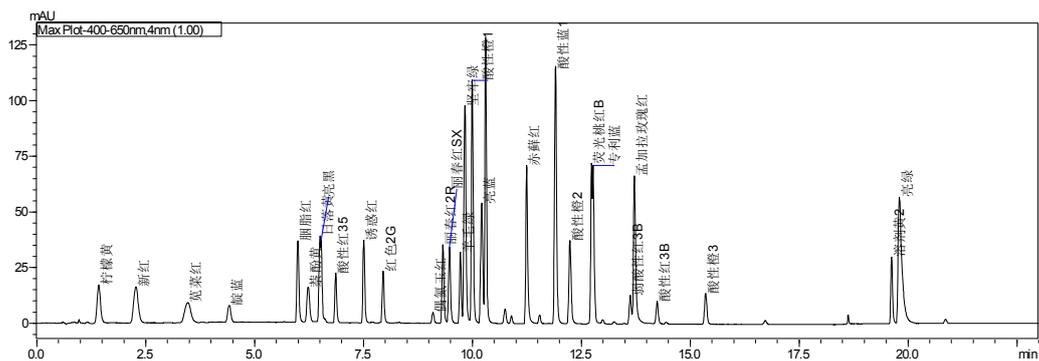


图 1. 29 种色素 UHPLC 分离结果 (400-650nm 最大绘图方式)

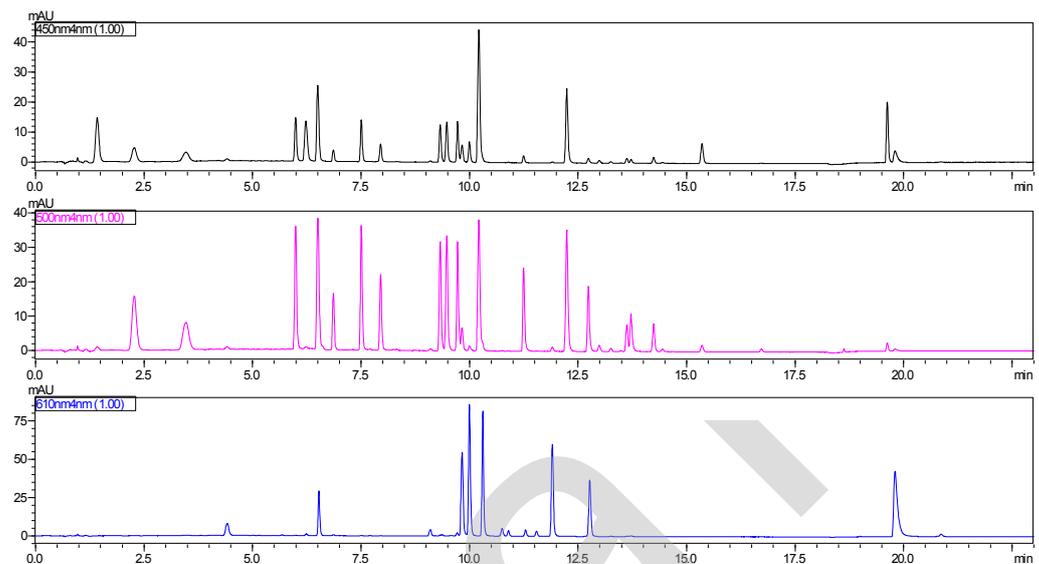


图 2. 29 种色素在三波长下 UHPLC 分离结果 (450、500、610 nm)

2.3 经过方法转化软件后的分析结果

对经过筛选后确定的分析条件进行方法转换软件 Shimadzu Method Transfer V1.00 转换，按下列转换后分析条件所得结果如图 2 所示。

分析仪器：LC-20A

色谱柱：GL Science Inertsil ODS-4 2.1 mmID.×200 mmL., 5 μm

流动相：A-20 mM 醋酸铵水溶液 B-乙腈

流速：0.2 mL/min

梯度程序：5%B(0-4.4min)-55%B(52.4min)-90%B(52.41-67.4min)-5%B(67.42min)

柱温：40℃

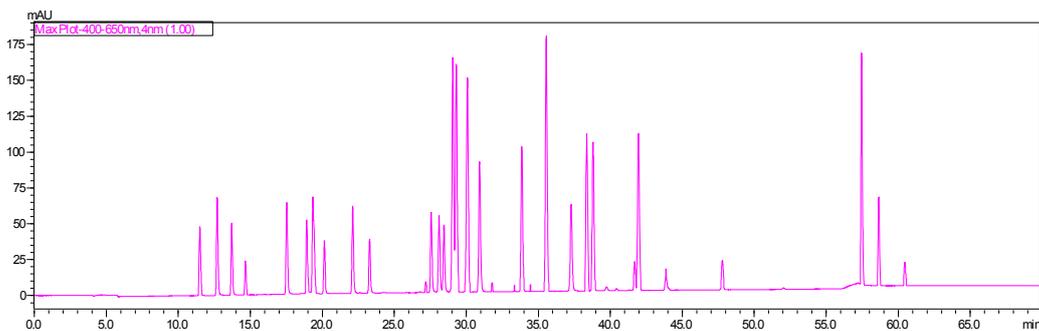


图 2. 29 种色素 HPLC 分离结果 (400-650nm 最大绘图方式)

3 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 种合成色素的分析, 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

No.	中文名	英文名	CAS No.	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