

HPLC-DAD 法同时测定高脂肪食品中黄色 2G、 奶油黄、柑橘红 2 和苏丹红 ~

奚星林, 王 岚, 李 荀, 李 双, 何吉子, 邹志飞

(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: **目的** 建立同时测定高脂肪食品中黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 和苏丹红 ~ 的 HPLC-DAD 法。**方法** 样品经环己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v) 萃取, Bio-Beads SX3 凝胶层析柱净化去除油脂、天然色素等大分子干扰物质。采用 C₁₈ 色谱柱, 以甲醇和酸性水溶液(pH 4.0)为流动相梯度洗脱, 二极管阵列检测器多波长同时检测这七种色素。**结果** 在 1.0~10.0 mg/L 范围内, 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 线性相关系数大于 0.999, 回收率在 81.0%~98.2%, 相对标准偏差在 0.89%~5.21%。黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 的检出限均达到 1.0 mg/kg, 苏丹红 ~ 色素的检出限均达到 2.0 mg/kg。**结论** 该方法简便、快捷、灵敏、准确、重现性好, 能满足相关色素同时检测的需要。

关键词: 凝胶渗透色谱净化; 高压液相色谱法; 黄色 2G; 奶油黄; 柑橘红 2; 苏丹红; 高脂肪食品

HPLC-DAD simultaneous determination of yellow 2G, butter yellow, citrus red 2 and sudan red I-IV in high fat foods

XI Xing-Lin, WANG Lan, LI Xun, LI Shuang, HE Ji-Zi, ZOU Zhi-Fei

(Technology Centre of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish an HPLC-DAD method for simultaneous determination of yellow 2G, butter yellow, citrus red 2 and sudan red I-IV. **Methods** Samples were extracted directly with a mixture of cyclohexane-ethylacetate (1:1, v/v) and purified by a Bio-beads SX3 gel column, to remove interfering high molecular fatty substances and natural pigments in food samples. HPLC was carried out on a C₁₈ column with MeOH+H₂O (pH 4.0) as mobile phase in the gradient elution. Multiwavelength diode array detection (DAD) was applied in the determination of the 7 kinds of pigments. **Results** Good linear relationships in the range of 1.0~10 mg/L of 7 compounds were obtained with correlation coefficients (*r*) all above 0.999. The RSDs were in the range of 0.89%~5.21%, and average recoveries were 81.0%~98.2%. The detection limits were 1.0 mg/kg for yellow 2G, butter yellow, citrus red 2 and 2.0 mg/kg for sudan red I-IV, respectively. **Conclusion** The established method is simple, rapid, sensitive, accurate and repeatable, and can be used for the simultaneous determination of relevant pigments.

基金项目: 中国检验检疫科学院基本科研业务费专项基金资助项目(2009JK011)、广东省科技基础条件建设项目(粤科财字[2008]658, [2010]185)、“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD23B05-4)、国家质检总局公益性行业科研专项(201110019)

Fund: Supported by The Basic Research Funds of Chinese Academy of Inspection and Quarantine (2009JK011), Science and Technology Infrastructure Construction Project of Guangdong Provincial Science and Technology Department ([2008]658, [2010]185), The "Twelfth Five-Year" National Science and Technology Program in Rural Areas (2011BAD23B05-4) and Public Sector Specific Research General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (201110019)

*通讯作者: 奚星林, 高级工程师, 主要研究方向为食品添加剂检测和放射性检测。Email: ciqxxl@163.com

*Corresponding author: XI Xing-Lin, Senior Engineer, Technology Centre of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau. Room B1408, No. 66, Guangzhou Huacheng Avenue, Guangzhou 510623, China. Email: ciqxxl@163.com

KEY WORDS: gel permeation chromatography purification; high pressure liquid chromatography; yellow 2G; butter yellow; citrus red 2; sudan red; high fat food

合成色素主要指用人工合成的方法从煤焦油中制取或以苯、甲苯、萘等芳香烃化合物为原料合成的有机色素^[1]。合成色素性质稳定、着色力强、可任意调色、成本低廉、使用方便,因此被广泛使用。研究发现合成色素多具有致癌性,必须严格管理,WHO和我国对目前允许使用的合成色素均进行了严格的毒性试验,并分别制定出他们的 ADI 值^[2,3]。

2004 年广东和香港等地水果市场相继发现“染色橙”,含禁用及可能致癌的柑橘红 2 号色素。过去用于人造奶油着色的奶油黄,早已被证实可以导致人和动物患上肝癌,而其它种类的合成色素如橙黄能导致皮下肉瘤、肝癌、肠癌和恶性淋巴瘤等。各国对人工合成色素在食品中允许使用的品种、范围和

添加量作了严格的规定,我国 GB/T 2760-2011《食品添加剂使用卫生标准》明确规定食品中添加食用色素的范围和用量,在我国黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 和苏丹红 ~ 是不允许使用的。

色素的测定常用液相色谱法^[4-11],黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 和苏丹红 ~ 都是油溶性色素,检测柑橘红 2 有高压液相色谱法^[12],但目前未查到食品中黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 和苏丹红 ~ 同时检测的文献报道。本研究用环己烷-乙酸乙酯提取色素,用凝胶净化柱净化,反相高效液相色谱检测食品中上述 7 种色素。这七种色素的分子结构式如图 1 所示。

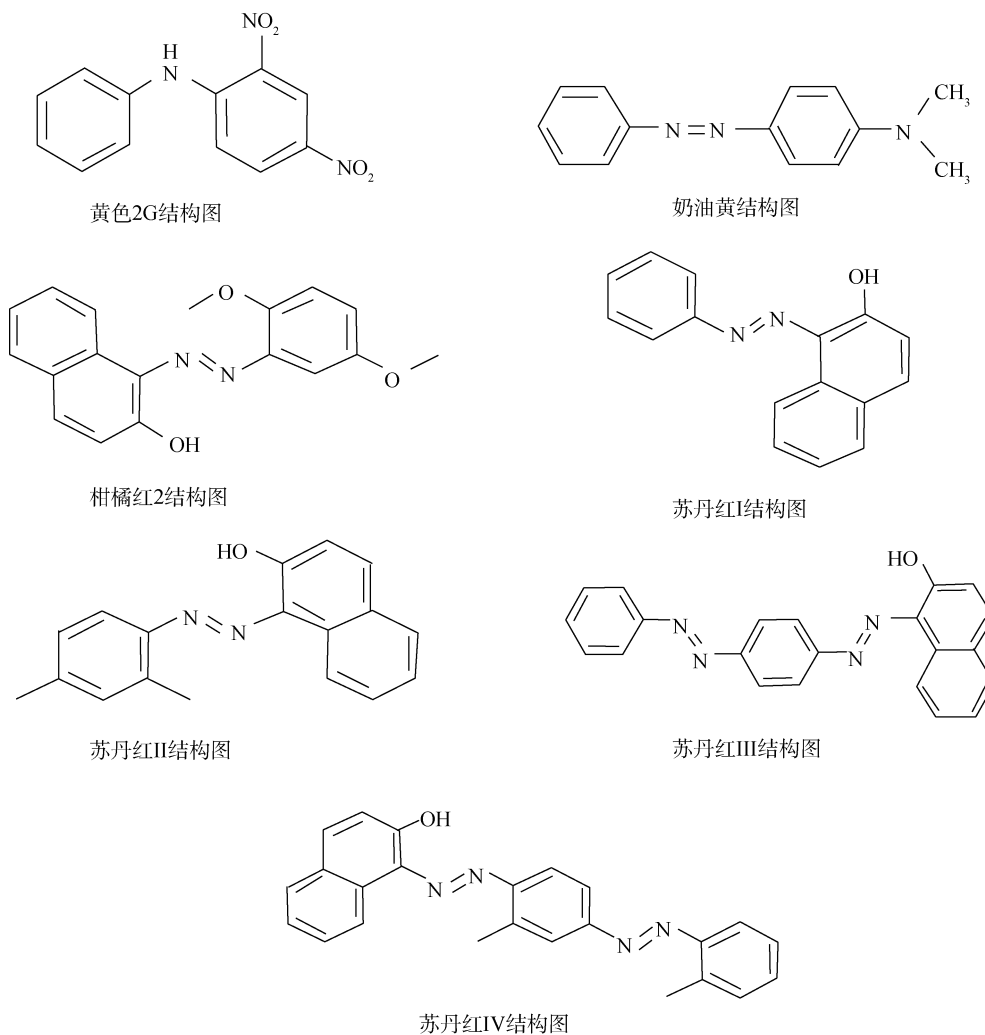


图 1 七种色素结构图

Fig. 1 Structures of 7 kinds of pigments

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

黄色 2G(纯度 98%)、奶油黄(纯度 98%)、柑橘红 2(纯度 90%)均购自美国 Sigma 公司; 苏丹红 (纯度 90.5%)、苏丹红 (纯度 88%)、苏丹红 (纯度 96.0%)、苏丹红 (纯度 92.0%)均购自德国 DE 公司; 甲醇、环己烷、乙酸乙酯为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

标准储备溶液: 按纯度折算后准确称取黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2、苏丹红、苏丹红、苏丹红、苏丹红 标准品 10 mg(精确至 0.1 mg), 移入 100 mL 容量瓶中, 用少量甲醇溶解, 并定容至刻度, 混匀, 该溶液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

标准工作溶液: 根据需要移取适量标准储备液, 用甲醇稀释配置 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mg/L 系列工作溶液。

1.2 仪器及条件

高压液相色谱仪(2695 型, 美国 Waters 公司), 配备二极管阵列检测器; 氮吹仪: TurboVap LV(美国 Zymark 公司)

色谱柱: Welch Ultimate C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 美国 Welch's 公司); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 350、480 和 510 nm; 进样量: 10 μL 。流动相: 甲醇+水(pH 4.0), 甲醇初始比例为 80%, 20 min 升至 100%, 2 min 后恢复到 80%。

凝胶色谱净化条件: 凝胶净化柱: Bio-Beads, S-X3(300 mm \times 25 mm, 38~75 μm , 美国 Bio-Rad 公司); 流动相: 环己烷-乙酸乙酯 (1:1, v/v); 流速: 4.7 mL/min; 进样量: 5 mL。

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取

辣椒油、香肠等样品粉碎混匀后, 称取样品 2.000 g 于 50 mL 离心管中, 加入环己烷-乙酸乙酯提取液 10 mL, 于旋涡混合器涡旋 1 min 后, 超声萃取 15 min, 再置于离心机中 4000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 残渣再加提取液 10 mL 提取, 超声、离心, 上清液与前次提取液合并, 旋转蒸发至 10 mL, 待净化。

1.3.2 样品净化

将凝胶柱床液面放至胶床表面后, 用环己烷-乙酸乙酯把 1.3.1 节中的提取液转移到凝胶柱上层, 待液面降至柱床表面后, 再加入淋洗液洗脱。弃去前洗脱液 50 mL, 再收集洗脱液 25 mL, 将所得洗脱液于氮吹仪上吹干, 残渣用 1.0 mL 乙腈溶解, 经 0.45 μm

有机滤膜过滤后待测。

1.4 测定

标准工作溶液和样液中待测物响应值均应在仪器检测线性范围内。再将标准工作溶液和样液等体积参插进样测定。以待测物色谱峰的峰面积为纵坐标, 与其对应的浓度为横坐标作图, 绘制标准工作曲线。同时以二极管阵列检测器的光谱图进行定性分析。

2 结果和讨论

2.1 凝胶层析柱洗脱规律的研究

凝胶渗透净化是利用空间排阻(分子尺寸大小)进行分离, 能够有效去除油脂、天然色素等高分子量的干扰物。取 10 mL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品溶液过凝胶渗透色谱, 分为四段收集, 每段 6 min, 分别收集第 2 (回收率 1)、第 3(回收率 2)和第 4(回收率 3)段的溶液, 旋转蒸发至干, 用甲醇定容为 1 mL, 上液相色谱检测, 结果如表 1。由于 3 种待测色素的低浓度溶液(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在己腈中会有析出, 因此定容应用甲醇, 以免影响结果。

逐步调整分段时间, 发现当每段时间分别为 11、10 和 3 min, 收集第 2 段溶液时回收率最理想, 黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2 号、苏丹红、苏丹红、苏丹红 和苏丹红 的回收率见表 1 中的回收率 4。

表 1 七种色素标准溶液回收率(%)

Table 1 The recoveries of 7 kinds of pigment standard solutions after GPC purification

	回收率 1(%)	回收率 2(%)	回收率 3(%)	回收率 4(%)
黄色 2G	极少	70~80	20~30	98.0
奶油黄	极少	70~80	20~30	99.5
柑橘红 2 号	极少	60~70	20~30	99.0
苏丹红	极少	65~75	25~35	98.6
苏丹红	极少	65~75	25~35	98.0
苏丹红	极少	65~75	25~35	97.4
苏丹红	极少	65~75	25~35	98.6

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 检测波长的选择

黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2、苏丹红、苏丹红、苏丹红 和苏丹红 色谱峰的最大吸收波长分别为 350、410、514、483、516、497 和 507 nm。选择 350 nm 为黄色 2G 检测波长, 410 nm 为奶油黄、苏丹红、苏丹红 检测波长, 514 nm 为柑橘红 2、苏丹红 和苏丹红 的检测波长。

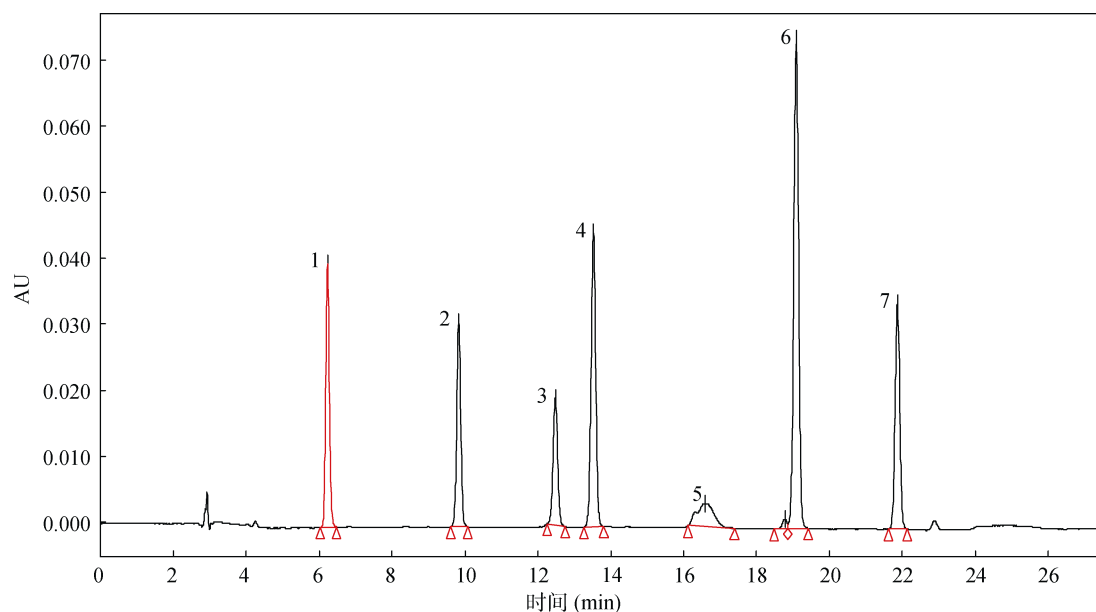


图2 待测七种色素色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of 7 kinds of pigments

(1. 黄色 2G, 2. 奶油黄, 3. 柑橘红 2, 4. 苏丹红, 5. 苏丹红, 6. 苏丹红 III, 7. 苏丹红 IV)

2.2.2 流动相的选择

固定检测波长, 分别考察甲醇-水、甲醇-水(pH 4.0)、乙腈-水、甲醇-乙酸铵溶液、乙腈-乙酸铵溶液等流动相系统对于待测物的色谱峰形的影响。

以水和 0.02 mol/L 乙酸铵溶液为流动相, 两者没有明显区别, 以甲醇-水(pH 4.0)为流动相时峰型最好。随着甲醇比例的增加, 洗脱能力逐渐增强, 兼顾到合适的保留时间和良好的色谱峰形, 最终选择甲醇初始比例为 80%, 20 min 升至 100%, 2 min 后恢复到 80%。

2.3 工作曲线及方法的定量限

根据以上研究所确定的实验条件, 取 1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mg/L 系列工作溶液注入色谱仪中, 色

谱图见图 2。以待测物色谱峰的峰面积为纵坐标对相应色素浓度(X 轴)作图, 结果表明, 待测物浓度在 1.0~10.0 mg/L 范围内, 待测物的线性方程和线性相关系数见表 2。浓度与其对应的峰面积值呈良好线性关系。当样品中的待测物超过此线性范围时, 可适当加大样品的稀释倍数。若以取样 2.0000 g 定容 1.0 mL 计, 则方法检出限按信噪比为 3 计算, 方法的定量限按信噪比为 10 计算, 结果见表 2。

2.4 试样回收实验

选用高脂肪基质的香肠和辣椒油样品做回收率试验, 设置 3 个添加浓度, 每个添加浓度进行 6 次试验。回收率结果见表 3 和表 4。

表 2 线性方程和线性相关系数

Table 2 Linear equations and correlation coefficients

名称	线性方程	线性相关系数 (r)	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
黄色 2G	$Y=6.02e+04X-1.52e+04$	0.9999	1.0	3.5
奶油黄	$Y=6.16e+04 X -1.39e+04$	0.9999	1.0	3.5
柑橘红 2	$Y=2.43e+04 X -7.872e+03$	0.9999	1.0	3.5
苏丹红	$Y=5.75e+03 X -2.522e+03$	0.9996	2.0	5.0
苏丹红	$Y=4.78e+03 X -5.39e+03$	0.9990	2.0	5.0
苏丹红	$Y=6.36e+03 X -2.02e+03$	0.9989	2.0	5.0
苏丹红	$Y=4.74e+03 X -2.20e+03$	0.9999	2.0	5.0

表 3 香肠中七种色素回收率和精密度试验结果($n=6$)
Table 3 Recoveries of 7 kinds of pigment fortified to sausage ($n=6$)

样品名称	试样本底 mg/kg	添加水平 mg/kg	平均测定值 mg/kg	平均回收率 %	RSD %
黄色 2G	未检出	2.0	1.74	87.0	4.28
		5.0	4.57	91.5	3.84
		10.0	9.24	92.4	3.48
奶油黄	未检出	2.0	1.79	89.5	3.79
		5.0	4.78	95.6	3.28
		10.0	9.48	94.8	1.85
柑橘红 2	未检出	2.0	1.84	92.0	4.08
		5.0	4.81	96.2	3.87
		10.0	9.70	97.0	2.84
苏丹红	未检出	2.0	1.70	85.0	3.94
		5.0	4.91	98.2	2.98
		10.0	9.59	95.9	2.08
苏丹红	未检出	2.0	1.69	84.5	5.21
		5.0	4.54	90.8	3.66
		10.0	9.45	94.5	3.54
苏丹红	未检出	2.0	1.80	90.0	3.87
		5.0	4.66	93.2	1.89
		10.0	9.60	96.0	3.09
苏丹红	未检出	2.0	1.69	84.5	4.18
		5.0	4.82	96.4	2.90
		10.0	9.58	95.8	2.46

表 4 辣椒油中 5 种色素回收率和精密度试验结果($n=6$)
Table 4 Recoveries of 7 kinds of pigment fortified to chili oil ($n=6$)

样品名称	试样本底 mg/kg	添加水平 mg/kg	平均测定值 mg/kg	平均回收率 %	RSD %
黄色 2G	未检出	2.0	1.70	85.0	3.58
		5.0	4.42	88.4	2.82
		10.0	9.08	90.8	2.58
奶油黄	未检出	2.0	1.68	84.0	2.98
		5.0	4.67	93.4	1.04
		10.0	9.54	95.4	0.89
柑橘红 2	未检出	2.0	1.79	89.5	3.55
		5.0	1.83	91.5	2.45
		10.0	9.24	92.4	1.70
苏丹红	未检出	2.0	1.62	81.0	4.22
		5.0	4.80	96.0	1.87
		10.0	9.48	94.8	2.59
苏丹红	未检出	2.0	1.65	82.5	3.75
		5.0	4.43	88.6	2.94
		10.0	9.46	94.6	2.18
苏丹红	未检出	2.0	1.68	88.4	3.25
		5.0	4.58	91.6	2.54
		10.0	9.46	94.6	1.89
苏丹红	未检出	2.0	1.73	86.5	3.62
		5.0	4.50	90.0	2.55
		10.0	9.38	93.8	2.41

3 结 论

本研究利用凝胶色谱法净化液相色谱法同时检测高脂肪食品中黄色 2G、奶油黄、柑橘红 2、苏丹红、苏丹红、苏丹红和苏丹红等色素,凝胶色谱法对除去样品中的脂肪、天然色素效果良好,该方法具有简便、快捷、灵敏、准确、重现性好等特点,能满足实际检测工作的需要。

参考文献

- [1] 吴坤. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
Wu K. Nutrition and food hygiene [M]. Beijing: The People's Medical Publishing House, 2006.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
Ministry of Health of the people's Republic of China. GB 2760-2011 National Food Safety Standard Hygienic standards for uses of food additives [S]. Beijing: Standards Press of China, 2011.
- [3] Codex Stan 192-1995 Codex General Standard For Food Additives (2012)[S]. 国际食品添加剂法典委员会, 2012.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.35-2003 食品中人工合成着色剂的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.35-2003 Determination of synthetic colour in foods [S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.
- [5] Fuh MR, Chia KJ. Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection [J]. *Talanta*, 2002, 56: 663-671.
- [6] Miniotti KS, Sakellariou CF, Thomaidis NS. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 583: 103-110.
- [7] Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. *Talanta*, 2008, 74: 1408-1413.
- [8] Ma M, Luo XB, Chen B, *et al.* Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1103: 170-176.
- [9] Chen QC, Mou SF, Hou XP, *et al.* Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 827: 73-81.
- [10] 徐业平, 郑屏, 汤峻松. 食品中偶氮染料丽春红 2R 的鉴定[J], 理化检验-化学分册, 2002, 38(9): 457-461.
Xu YP, Zheng P, Tang JS. Characterization of synthetic azo-colorant in foodstuffs [J]. *Phys Test Chem Anal Part B (Chem Anal)*, 2002, 38(9): 457-461.
- [11] 郑玲, 李丽华, 李湧, 等. 凝胶渗透-高效液相色谱法测定棕榈油中的对位红和苏丹色素[J], 中国油脂, 2009, 34(7): 74-76.
Zheng L, Li LH, Li Y, *et al.* Determination of para red and sudan colorants in palm oil by gel permeation chromatography and high performance liquid chromatography [J]. *China Oils and Fats*, 2009, 34(7): 74-76.
- [12] 陈毓芳, 林海丹, 李为鹏, 等. 高效液相色谱法测定果汁和果蔬中柑橘红 2 号染料[J], 理化检验-化学分册, 2011, 47(5): 536-538
Chen YF, Lin HD, Li WP, *et al.* HPLC Determination of Citrus Red 2 in Fruit Juices, Fruits and Vegetables [J]. *Phys Test Chem Anal Part B (Chem Anal)*, 2011, 47(5): 536-538.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



奚星林, 高级工程师, 主要研究方向为食品添加剂检测和放射性检测。
E-mail: ciqxxl@163.com