

# 高效液相色谱法同时测定熟肉制品中日落黄、胭脂红和诱惑红

郝鹏飞\*, 宫萍, 刘琳, 孟慧琴, 翟丽娜, 梁成珠

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品农产品检测中心, 青岛 266002)

**摘要:** **目的** 建立对熟肉制品中日落黄、胭脂红和诱惑红三种合成色素同时测定的方法。**方法** 样品采用无水乙醇-氨水-水(7: 2: 1)提取, 加正己烷去除脂肪, 氮吹后定容, 用高效液相色谱法测定。经 Symmetry Shield RP18 柱分离, 甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液梯度洗脱, 检测波长为 508 nm。**结果** 本方法的相对标准偏差( $n=6$ ) 在 0.92% ~ 3.2% 之间, 平均回收率在 86.4% ~ 99.1% 之间, 检出限在 0.005 ~ 0.008 mg/kg 之间。**结论** 本方法灵敏度高, 分离效果好, 结果稳定可靠, 适用于熟肉制品中日落黄、胭脂红和诱惑红的同时测定。

**关键词:** 熟肉制品; 合成色素; 高效液相色谱法; 测定

## Determination of sunset yellow, carmine and allura red in cooked meat products by high performance liquid chromatography

HAO Peng-Fei\*, GONG Ping, LIU Lin, MENG Hui-Qin, ZHAI Li-Na, LIANG Cheng-Zhu

(Food and Agriculture Inspection Center, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method of simultaneous determination of sunset yellow, carmine and allura red up to three synthetic pigments in cooked meat products. **Methods** The samples were extracted by the anhydrous ethanol-ammonia-water solution (7:2:1), the fat was eliminated by hexane, then blown by nitrogen, analyzed by high performance liquid chromatography. The samples were separated by SymmetryShield RP18 column, by gradient elution using a mobile phase made up of methanol and 0.02 mol/L amm-onium acetate, and detected at 508 nm. **Results** The relative standard derivations ( $n=6$ ) were between 0.92%~3.2%, the recoveries were between 86.4%~99.1%, the detection limits were between 0.005 ~ 0.008 mg/kg. **Conclusion** This method is sensitive, efficient, reliable and suitable for the determination of synthetic pigments in cooked meat products.

**KEY WORDS:** cooked meat products; synthetic pigments; high performance liquid chromatography; determination

## 1 引言

随着我国商品经济的发展, 为了提高产品的卖相, 有些厂商会在熟肉制品的生产过程中加入人工

合成色素, 如在烤鸭、牛肉干中加入日落黄, 火腿、烧鸡中加入胭脂红和诱惑红<sup>[1-8]</sup>。这几种合成色素都以苯、甲苯等化工产品为原料, 经有机合成反应而得到, 使用过量会对人体产生有害作用<sup>[9-12]</sup>。按照我国

\*通讯作者: 郝鹏飞, 工程师, 硕士研究生, 主要研究方向为食品添加剂与非法添加物的检测。E-mail: haofei0223@126.com

\*Corresponding author: HAO Peng-Fei, Engineer, Food and Agriculture Inspection Center, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qu Tangxia Road 70, Qingdao 266002, China. E-mail: haofei0223@126.com

强制性国家标准 GB 2760-2011 的规定:日落黄和胭脂红禁止用于肉类及其制品,而诱惑红在西式火腿中的使用限量为 0.025 g/kg,在肉灌肠中的使用限量为 0.015 g/kg<sup>[13]</sup>,但仍有不法商贩在熟肉制品中超范围使用日落黄和胭脂红,或是添加诱惑红超标。因此有必要对熟肉制品中的日落黄、胭脂红和诱惑红进行监测。由于国标 GB/T 5009.35-2003 中关于人工合成色素的检测方法中没有包括熟肉制品<sup>[14]</sup>,而国标 GB/T 9695.6-2008 仅检测肉制品中的胭脂红这一个项目<sup>[15]</sup>,且前处理方法繁琐。为了配合食品安全的监管,本文对熟肉制品中合成色素的前处理方法和仪器条件加以改进,建立了对熟肉制品中日落黄、胭脂红和诱惑红同时测定的方法,得到了满意的结果。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

液相色谱仪 Agilent 1200, 配备二极管阵列检测器(DAD), 美国安捷伦公司; 恒温水浴锅; 超声波提取仪; 涡旋振荡器; 水平振荡器; 冷冻高速离心机; 0.45 μm 滤膜。

乙酸铵: 优级纯; 甲醇: 色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 所用水为二级去离子水; 乙酸铵溶液(0.02 mol/L): 加乙酸调节 pH=4.5; 无水乙醇-氨水-水提取液: 量取无水乙醇、氨水、水以体积比为 7/2/1 配制, 现用现配; 胭脂红、日落黄、诱惑红标准物质: 国家标准物质研究中心; 混合标准储备溶液(1.0 mg/mL): 准确称取胭脂红、日落黄和诱惑红标准物质各 0.1000 g 于 100 mL 容量瓶中, 以水溶解并定容; 混合标准使用溶液(10.0 μg/mL): 取上述标准溶液 1.0 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。

### 2.2 样品处理

称取粉碎均匀的样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 无水乙醇-氨水-水(7: 2: 1), 再加入 10 mL 正己烷, 涡旋 1 min, 振荡提取 1 h, 10000 r/min(4 °C)离心 5 min, 弃去上层正己烷; 取下层液体 15 mL 于 60 °C 下氮气吹至 2 mL 左右, 加入 2 mL 无水乙醇, 再加水定容至 10 mL, 涡旋 1 min, 10000 r/min(4 °C)离心 5 min, 过 0.45 μm 滤膜, 上机测定。

### 2.3 提取方式的比较试验

准确称取 5.0 g 已添加三种合成色素的样品置于离心管中, 加入 30 mL 无水乙醇-氨水-水(7: 2: 1), 分

别采用热水浴(70 °C)、超声波和涡旋+振荡 3 种提取方式。热水浴提取条件为: 在 70 °C 的恒温水浴中浸提 1 h; 超声波提取条件为: 在超声波提取仪中提取 1 h; 涡旋+振荡的提取条件为: 先涡旋混合 1 min, 再振荡提取 1 h。通过比较色素提取率确定提取方式。每种提取方式进行 6 次平行实验, 取平均值进行比较。

### 2.4 色谱条件

色谱柱: SymmetryShield RP<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液梯度洗脱, 甲醇: 10%(0~2 min), 50%(5~10 min), 10%(12~15 min); 流速: 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长为 508 nm, 参比波长为 620 nm。以保留时间和光谱吸收双重定性, 峰面积定量。

### 2.5 色谱条件的选择试验

以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液体系作为流动相, 通过对标准溶液的进样, 考察当乙酸铵缓冲溶液的 pH 从 3.0 到 7.0 时, 各个色素的保留时间及峰形的情况; 乙酸铵缓冲溶液的 pH 确定后, 考察流动相不同配比下各个色素的分离情况; 通过 UV 扫描来获取胭脂红、日落黄和诱惑红的最大吸收波长; 上述条件均确定后, 再考察 25、30、35、40 °C 柱温条件下各个色素的分离效果。

## 3 结果与讨论

### 3.1 提取方式的确定

热水浴(70 °C)、超声波和涡旋+振荡 3 种提取方式的提取率结果见表 1, 从表 1 可以看出胭脂红、日落黄和诱惑红的提取率均为涡旋+振荡为最高, 热水浴提取率最低。因此, 本实验采用涡旋+振荡来提取色素。

### 3.2 色谱条件的确定

#### 3.2.1 流动相 pH 的确定

试验结果表明: 以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液体系作为流动相, 当乙酸铵缓冲溶液的 pH 分别为 3.0、5.0、6.0、7.0 时, 对各个色素的保留时间及峰形影响较大, 胭脂红、日落黄和诱惑红不能完全分开, 或者个别色素产生严重拖尾现象, 见图 1。而当乙酸铵缓冲溶液的 pH 在 3.5、4.0 和 4.5 时所有色素的保留时间及峰形几乎保持不变, 均可实现基线分离, 考虑到酸性强对色谱柱的寿命有影响, 最后确定乙酸铵缓冲溶液的 pH 为 4.5, 见图 2。

表 1 不同提取方式下各色素的提取率  
Table 1 Effect of different extraction methods for the pigments

色素	本底值/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	测得平均值/(mg/kg)	提取率/(%)	提取方式
胭脂红	0	5.0	3.045	60.9	热水浴(70 )
	0	5.0	4.410	88.2	超声波提取
	0	5.0	4.895	97.9	涡旋+振荡提取
日落黄	0	5.0	3.785	75.7	热水浴(70 )
	0	5.0	4.655	93.1	超声波提取
	0	5.0	4.770	95.4	涡旋+振荡提取
诱惑红	0	5.0	3.630	72.6	热水浴(70 )
	0	5.0	4.525	90.5	超声波提取
	0	5.0	4.915	98.3	涡旋+振荡提取

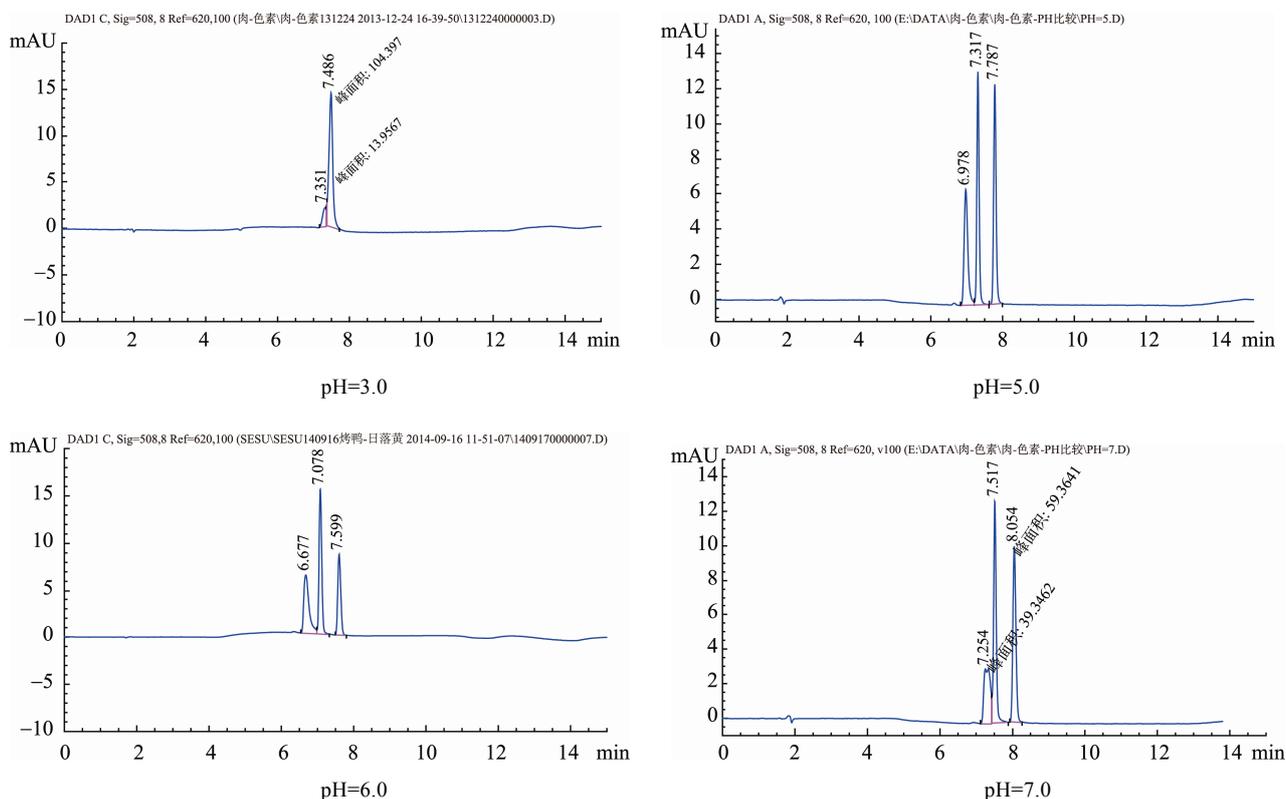


图 1 不同 pH 下的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of different pH

### 3.2.2 梯度洗脱条件的确定

流动相配比试验表明: 采用梯度洗脱(见 2.4 色谱条件)的方式, 胭脂红、日落黄和诱惑红分离效果好, 检测灵敏度高。其色谱图如图 2 所示。

### 3.2.3 检测波长的确定

通过 UV 扫描, 胭脂红、日落黄和诱惑红的最大吸收波长分别为 513 nm、484 nm 和 508 nm, 国标 GB/T 5009.35-2003 选用 254 nm 作为检测波长, 但在

该波长下胭脂红、日落黄和诱惑红的灵敏度均不高,难以满足实际检测的需要。经试验,本方法采用 508 nm 作为检测波长。在该检测波长下,3 种合成色素响应值高,背景干扰小。实际样品测试时,如果样品保留时间与标准品一致但光谱吸收不一致,判定为“否”;样品保留时间与标准品一致且光谱吸收也一致,判定为“是”。这样以保留时间和光谱吸收双重定性,可以避免误判。3 种合成色素的光谱吸收见图 3。

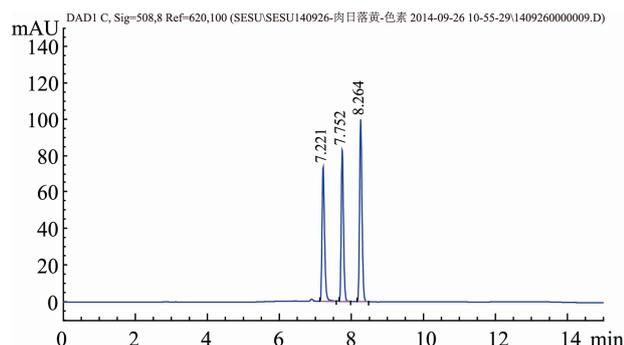


图 2 3 种合成色素的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 3 synthetic pigments

1. 胭脂红、2. 日落黄、3 诱惑红

### 3.2.4 柱温和流速的确定

以上述条件考察 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 柱温条件下胭脂红、日落黄和诱惑红的分离效果,结果表明:色谱柱温度的改变对各个色素的保留时间和灵敏度的影响不明显,但随着柱温的升高,柱压有所降低,因此柱温选择 30 °C,既接近常温,柱压又比较小。流速的选择试验表明:各组分峰的分离效果受流速影响不大,但流速慢的话分析时间延长,所以选定流速为 1.0 mL/min。

### 3.3 线性关系及检出限

分别准确吸取 3 种色素混合标准使用溶液(10.0 μg/mL) 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL 至 10 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,得到浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μg/mL 的标准工作曲线,按上述优化的色谱条件进行 HPLC 测定。设定仪器自动以质量浓度  $X$  为横

坐标,色谱峰面积  $Y$  为纵坐标来绘制标准曲线。3 种合成色素均与其各自对应的峰面积呈线性关系( $R^2 > 0.9995$ )。线性方程、相关系数和检出限( $R_{S/N}=3$ )见表 2,标准曲线见图 4。

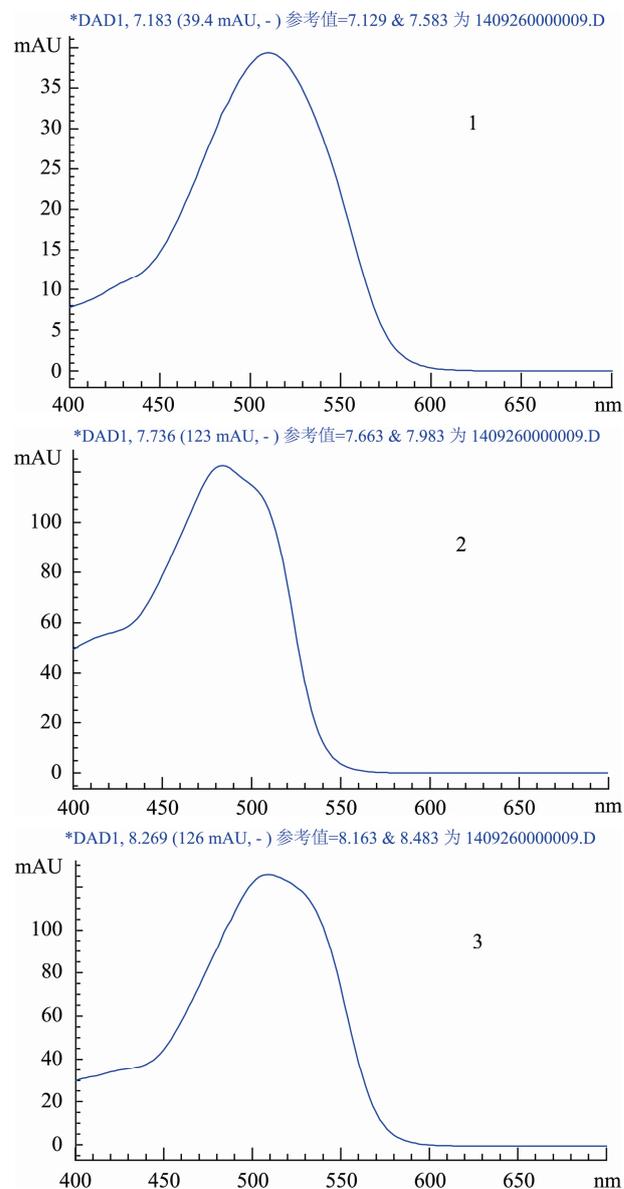


图 3 3 种合成色素的光谱吸收图

Fig. 3 Absorption spectrum chart of 3 synthetic pigments

1. 胭脂红(513 nm); 2. 日落黄(484 nm); 3. 诱惑红(508 nm)

表 2 合成色素的回归方程、相关系数和检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients( $R^2$ ) and detection limits of synthetic pigments

合成色素名称	回归方程	相关系数	检出限 (mg/kg)
胭脂红	$Y=36.0003382X + 0.1901215$	0.9998	0.008
日落黄	$Y=36.6933382X + 0.3912094$	0.9995	0.005
诱惑红	$Y=47.4106614X + 0.2218300$	0.9998	0.006

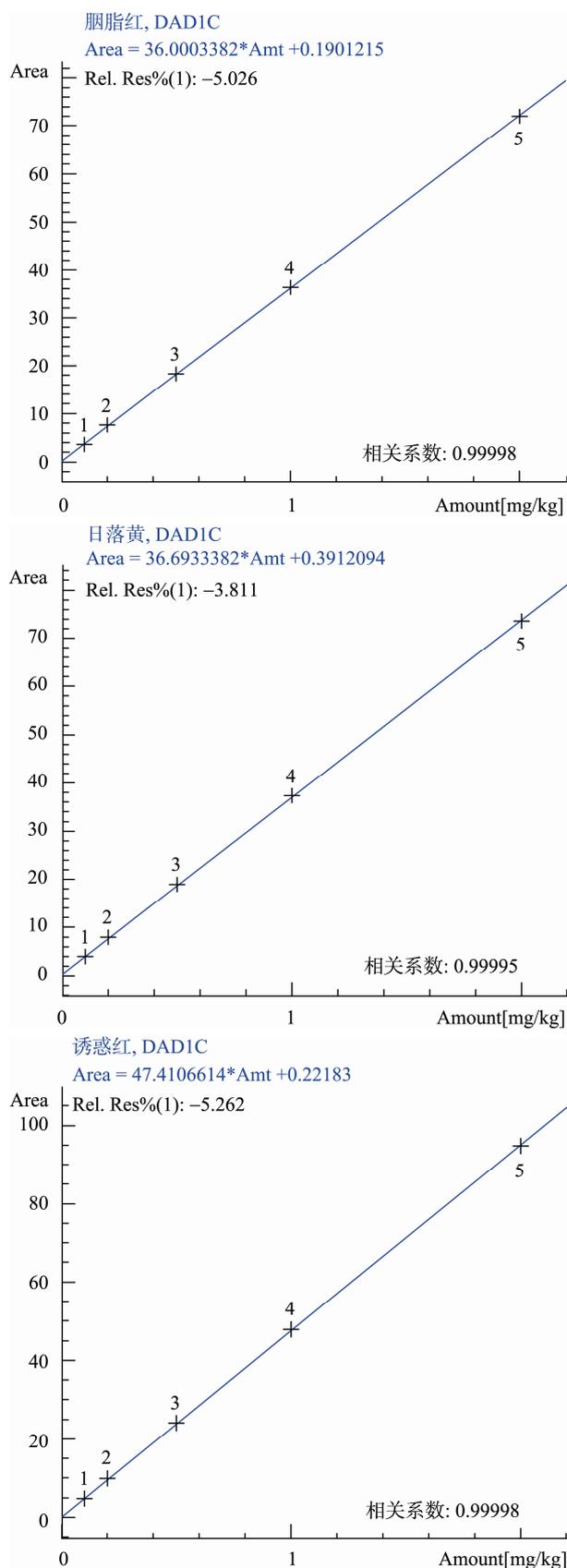


图 4 3 种合成色素的标准曲线

Fig. 4 Standard curves of 3 synthetic pigments

### 3.4 方法的加标回收率与精密度

在上述样品处理和仪器优化条件下,以本底未检出的烤鸭做基质,测定了 0.5、1.0、2.0 mg/kg 三个添加水平下各色素的回收率,每个水平重复测定 6 次,计算回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表 3。3 种合成色素的平均回收率在 86.4% ~ 99.1%之间,相对标准偏差在 0.92% ~ 3.2%之间,方法准确可靠。

表 3 烤鸭基质中 3 种合成色素的平均回收率与相对标准偏差(RSD)

Table 3 Recoveries and relative standard derivations of 3 synthetic pigments in roast duck

样品	色素	本底值 /(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	测得平均 值/(mg/kg)	平均回收 率/%	RSD/ %
烤鸭	胭脂红	0	0.5	0.432	86.4	3.2
		0	1.0	0.917	91.7	1.7
		0	2.0	1.958	97.9	1.1
烤鸭	日落黄	0	0.5	0.449	89.8	2.9
		0	1.0	0.964	96.4	1.8
		0	2.0	1.981	99.1	1.3
烤鸭	诱惑红	0	0.5	0.461	92.2	2.5
		0	1.0	0.957	95.7	1.5
		0	2.0	1.963	98.2	0.92

### 3.5 实际样品的测定

在商场购得红烧肉、烤鸭、烧鸡、熏鸡、火腿肠、西式火腿、牛肉干、酱驴肉、酱牛肉和酱猪蹄,采用本方法对上述市售的 10 种熟肉制品进行测定,根据保留时间和吸收光谱进行定性,峰面积外标法定量,结果某火腿中检出诱惑红,含量为 3.7 mg/kg。图 5 为该样品的色谱图和光谱吸收图。

## 4 结论

样品采用无水乙醇-氨水-水(7: 2: 1)提取,加正己烷去除脂肪,氮吹后定容的方法,可对熟肉制品中的胭脂红、日落黄和诱惑红进行富集和提纯,前处理方法简便易行。通过 SymmetryShield RP18 柱分离,甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液梯度洗脱,检测波长为

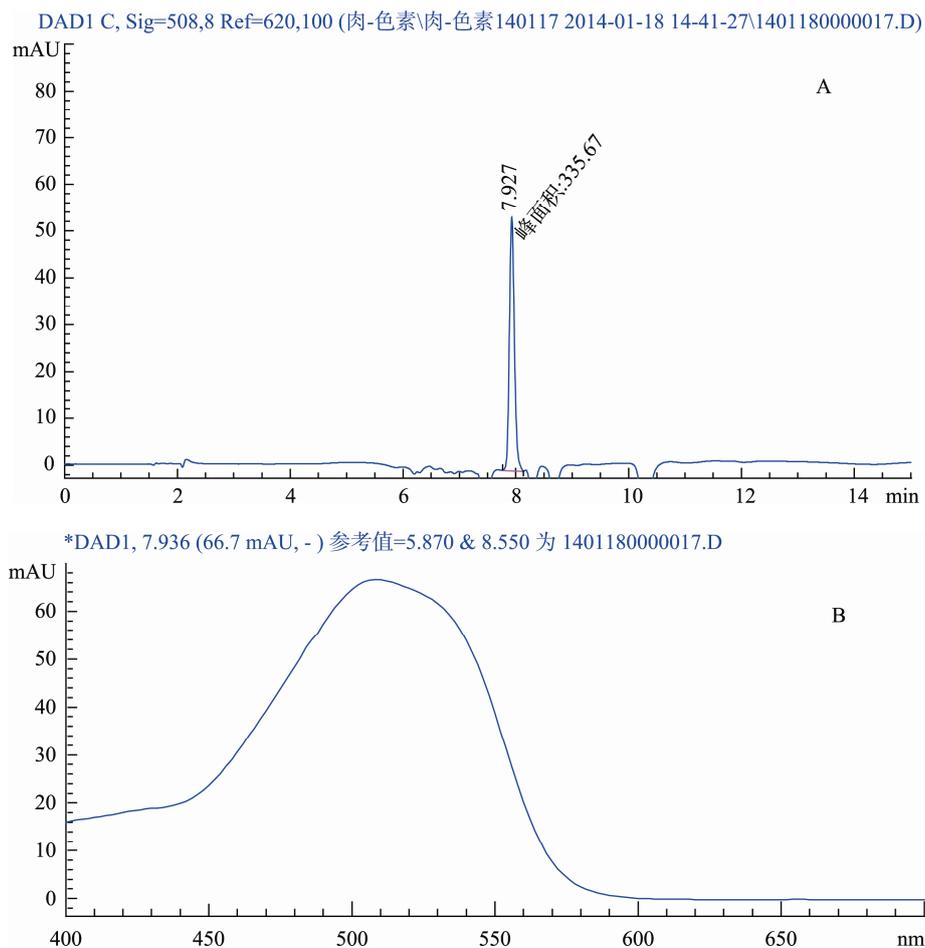


图 5 某火腿的色谱图(A)和光谱吸收图(B)

Fig. 5 Chromatogram (A) and absorption spectrum chart (B) of the ham

508 nm。方法的检出限在 0.005 ~ 0.008 mg/kg 之间, 检测灵敏度高, 满足了低含量样品的测定要求。方法学验证表明  $R^2 > 0.9995$ , 相对标准偏差 ( $n=6$ ) 在 0.92% ~ 3.2% 之间, 平均回收率在 86.4% ~ 99.1% 之间, 准确度和精密度均获得满意的结果。采用本方法对实际样品进行测定, 提取效率高, 损失少, 能满足分析要求, 很有实际应用价值。

#### 参考文献

- [1] 李晶, 聂晶, 孙晓红. 哈尔滨市肉制品中添加合成色素调查[J]. 哈尔滨医药, 2004, 21(2): 37-38.  
Li J, Nie J, Sun YH. Analysis of pigment in meat product sold in Harbin [J]. Harbin Med J, 2004, 21(2): 37-38.
- [2] 徐国卉, 吕炎. 唐山市肉制品中人工合成食用色素使用情况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 269-270.  
Xu GH, Lv Y. Investigation of application of artificial food colors in meat products in tangshan [J]. Chin J food Hyg, 2007, 19(3): 269-270.
- [3] 刘虹, 谢承恩, 郑绍珍. 广州市售糕点、熟肉制品中人工合成色素含量的现状分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 341, 358.  
Liu H, Xie CE, Zheng SZ. Analysis of existing circumstance of pigment content of pastry and cooked meat product sold in Guangzhou [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(2): 341, 358.
- [4] 李兰芳, 魏华江, 黄明元, 等. 海珠区市售糕点和熟肉制品中人工合成色素调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2007, 13(3): 66.  
Li LF, Wei HJ, Huang MY, et al. Analysis of existing circumstance of pigment content of pastry and cooked meat product sold in Haizhu district [J]. Strait J Preven Ned, 2007, 13(3): 66.
- [5] 林东明, 李尚益, 吴利楠. 番禺区熟肉制品中人工合成色素使用情况调查[J]. 医学动物防治, 2009, 25(8): 592-593.  
Lin DM, Li SY, Wu LN. Investigation on usage of synthetic pigments of cooked meat products in Panyu district [J]. Chin J Pest cont, 2009, 25(8): 592-593.
- [6] 张桂清, 张霜玉. 2007 年 9 个城市食品色素含量调查[J]. 中国

- 卫生工程学, 2010, 9(6): 492.
- Zhang GQ, Zhang SY. Investigation of food pigment content in 9 City in 2007 [J]. Chin J Pub Heal Eng, 2010, 9(6): 492.
- [7] 陈宇, 董鹤群, 仇雨干. 江苏省酱卤肉类熟食卫生状况调查[J]. 江苏卫生保健, 2010, 12(3): 16-17.
- Chen Y, Dong HQ, Qiu YG. Analysis of existing circumstance of hygienic conditions of cooked meat product sold in Jiangsu [J]. Jiangsu Hea Car, 2010, 12(3): 16-17.
- [8] 陈志敏, 贾恩厚, 林亮. 包头市市售熟肉类制品中复合磷酸盐和合成色素含量调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(10): 2538-2542.
- Chen ZM, Jia EH, Lin L. A survey of composite phosphate and synthetic food coloring content in cooked meat products in the market of Baotou [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(10): 2538-2542.
- [9] Collier SW, Storm JE, Bronaugh RL. Reduction of azodycs during in vitro percutaneous absorption [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1993, (118): 73-79.
- [10] Marmion DM. Handbook of US. Colorants for foods drugs, and cosmetics and medical devices [M]. Second edition, John Wiley & Sona, 1984: 232-235.
- [11] 林春晓, 曾红惠, 付斌, 等. 高效液相色谱检测熟食肉制品中人工合成色素的研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(3): 556-557.
- Lin CX, Zeng HH, Fu B, *et al.* Determination of artificial pigment from meat products by using high performance liquid chromatography [J]. Chin Tropic Med, 2005, 5(3): 556-557.
- [12] 邹志飞, 蒲民, 李建军, 等. 各国(地区)食用色素的使用现状与比对分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(2): 112-121.
- Zou ZF, Pu M, Li JJ, *et al.* Usage Status and Comparison Analysis of the Food Colour in Some Countries (Regions) [J]. Chin J food Hyg, 2010, 22(2): 112-121.
- [13] 中华人民共和国卫生部. GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
- Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 2760-2011. National Food safety Standards-Standards for uses of food additives [S].
- [14] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.35-2003 食品中合成着色剂的测定[S].
- Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.35-2003. Determination of synthetic colour in foods [S].
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 9695.6-2008 肉制品 胭脂红着色剂测定[S].
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 9695.6-2008 Meat products-Determination of artificial colour ponceau 4R [S].

(责任编辑: 白洪健)

#### 作者简介



郝鹏飞, 工程师, 硕士研究生, 主要研究方向为食品添加剂与非法添加物的检测。  
E-mail: haofei0223@126.com