

高效液相色谱法同时检测肉制品中4种着色剂

李莹*, 付骋宇, 何强, 孔祥虹, 李建华

(陕西出入境检验检疫局, 西安 710068)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法检测肉制品中诱惑红、胭脂红、柠檬黄、日落黄的实验方法。**方法** 采用氨水-乙醇溶液提取, 用正己烷脱脂, 对氨水乙醇提取液采用定量浓缩仪浓缩。利用液相色谱作为检测手段, 紫外检测器分波段采集。**结果** 在0~50.0 μg/mL范围内线性良好, 4种色素的相关系数均大于0.999, 平均回收率为诱惑红78.6%, 胭脂红79.2%, 柠檬黄78.3%, 日落黄79.6%。检出限均为1.0 mg/kg。**结论** 该方法具有样品预处理简单、快速、灵敏度高等特点, 可用于肉制品中诱惑红、胭脂红、柠檬黄、日落黄的同时检测。**关键词:** 诱惑红; 胭脂红; 柠檬黄; 日落黄; 肉制品; 高效液相色谱法

Simultaneous determination of 4 colorants in meat products by high performance liquid chromatography

LI Ying*, FU Cheng-Yu, HE Qiang, KONG Xiang-Hong, LI Jian-Hua

(Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4 colorants (allure red AC, carmosine, tartrazine, sunset yellow FCF) in meat products by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was extracted by the solution which was made up by ammonium hydroxide and ethanol and degreased by n-hexane, then concentrated by sample concentrator. The sample was detected by HPLC with UV detector. **Results** This method showed a good linearity in the range of 0~50.0 μg/mL ($r^2 > 0.999$). The average recovery were 78.6%, 79.2%, 78.3%, and 79.6% for allure red AC, carmosine, tartrazine, and sunset yellow FCF, respectively. The detection limit was 1.0 mg/kg for all. **Conclusion** The method is simple, rapid and high sensitive, which can be used for the detection of allure red AC, carmosine, tartrazine, sunset yellow FCF in meat products.

KEY WORDS: allure red AC; carmosine; tartrazine; sunset yellow FCF; meat product; high performance liquid chromatography

1 引言

人工合成色素在食品加工过程中应用十分广泛^[1-3]。此类色素具有色泽鲜艳、着色力强、稳定性好、

价格低廉的特点, 因而被广泛使用。常用的合成色素多为偶氮类色素, 长期食用存在致畸、致癌性^[4-7]。为了避免其滥用给人们的身体健康带来危害, 国家标准对其适用范围及用量都做出了严格的规定。对于

基金项目: 陕西出入境检验检疫局项目(陕K-201202)

Fund: Supported by Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Project (K-201202)

*通讯作者: 李莹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: crystal.zero@163.com

*Corresponding author: LI Ying, Engineer, Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau. No.10 Hangang North Road, Beilin District, Xi'an 710068, China. E-mail: crystal.zero@163.com

肉类及其制品, GB 2760-2014 规定了诱惑红可用于西式火腿、肉灌肠及肉制品的可食用动物肠衣中, 胭脂红可用于肉制品的可食用动物肠衣中, 而柠檬黄和日落黄均不可添加。且对各类产品的添加限量均做出了明确的规定^[8-16]。

目前检测中, 可参考的标准为 GB/T 5009.35-2003, SN/T 1743-2006, GB/T 5009.141-2003。三个标准的前处理方法均采用聚酰胺吸附法。操作过程繁琐, 实际用量大, 检测耗时长。检测方法分别使用了液相色谱法和纸层析法。随着实验室定量检测水平的提高, 纸层析法已不能满足检测工作的需要。液相色谱法是较为常用的方法。因此, 本文根据国标的要求, 并结合现行有效的检测标准对样品前处理方法及检测方法进行改进。建立一种简便易行的检测方法以满足日常大批量样品检测的需要。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); XP204 分析天平(Mettler Toledo 公司); HCB602H 电子天平(艾德姆衡器(武汉)有限公司, 0.01 g); HS 501 digital IKA-WERK·E 机械振荡器(德国 IKA 公司); BuChi Syncore 步琦定量浓缩仪(瑞士步琦公司); Centrifuge 5810R 离心机(Eppendorf 公司)。

2.2 材料与试剂

香肠和腊肉购于西安市华润万家超市。

无水乙醇(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲醇(HPLC 级, 美国 TEDIA 公司); 氨水(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙酸铵(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙酸(优级醇, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

氨水-乙醇溶液(V:V=7:3): 量取 700 mL 无水乙醇, 向其中加入 300 mL 氨水混合均匀。

0.02%乙酸铵溶液: 称取 1.54 g 乙酸铵固体溶于 1000 mL 纯水中, 用乙酸调节 pH 值至 6.5, 混合均匀
定容液: 0.02 mol/L 乙酸铵溶液(乙酸调 PH 至 6.5)-甲醇(V:V=3:7)

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红标准溶液: 浓

度均为 0.5 mg/mL。均购自中国计量科学研究院。

柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红混合标准溶液: 将 0.5 mg/mL 的 4 种标准溶液用水稀释定容, 配制成 100 μg/mL 的混合标准溶液, -4 °C 冷藏保存, 使用时根据需要用水逐级稀释。

2.3.2 样品制备方法

称取 5.0 g 已粉碎的肉制品样品, 加入氨水-乙醇溶液(V:V=7:3)20 mL, 再加入 10 mL 正己烷。震荡混匀 15 min, 4500 r/min 离心 5 min。上层正己烷层弃去, 下层转移到定量浓缩仪的样品管中。重复上述步骤, 再提取一遍。合并提取液于定量浓缩样品管中。将样品管置于定量浓缩仪上, 温度设定 40 °C, 压强设置 80 psi, 冷凝温度-5 °C。浓缩至样品溶液小于 3 mL, 转移到 15 mL 离心管中, 用乙酸铵溶液洗涤样品管, 合并清洗液定容至 8 mL, 4500 r/min 离心 5 min。取上层清液过水系滤膜装瓶, 待进样。

2.3.3 HPLC 测定条件

色谱柱: Inertsil ODS-sp 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02%乙酸铵溶液(pH=6.5)梯度洗脱, 参见表 1, 梯度变化模式为线性递增或递减:

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Program of gradient elution

时间(min)	流速(mL/min)	甲醇(%)	0.02%乙酸铵溶液(pH=6.5)(%)
0	1.0	15	85
2	1.0	15	85
5	1.0	25	75
14	1.0	40	60
16	1.0	50	50
18	1.0	15	85
22	1.0	15	85

检测条件: 开启 vis 灯, 采用可见光 400 ~ 700 nm 分时段采集, 带宽 4 nm。0 ~ 6.5 min 采集波长 440 nm, 6.5~22 min, 采集波长 505 nm。

色谱柱温度: 40 °C, 进样量: 20 μL, 标准进样。

应用上述色谱条件, 标准溶液的 HPLC 色谱图见图 1

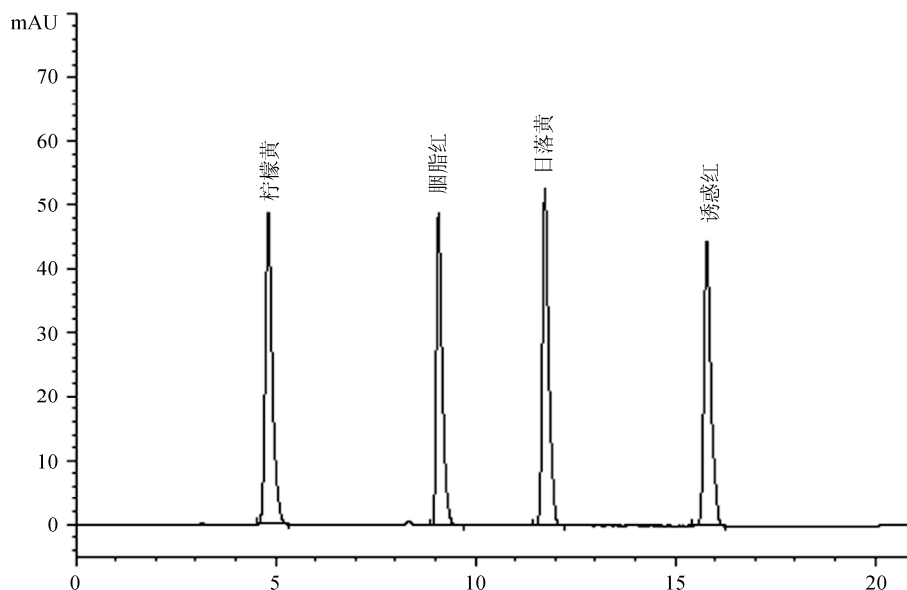


图1 4种混合标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 4 mixed standards solution

2.4 数据处理

样品谱图与标准品谱图对照, 采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理条件的选择

柠檬黄、日落黄、胭脂红、诱惑红均为人工合成的水溶性、酸性色素。因此考虑采用碱性溶液进行直接提取。参考国标 GB/T 5009.35-2003 方法中洗脱聚酰胺粉使用的洗脱液(乙醇:氨水:水=7:2:1)(V:V:V), 将提取液简化为乙醇:氨水=7:3(V:V), 并比较了提取效果, 回收率无明显差别。因此将样品提取溶液确定为乙醇:氨水=7:3(V:V)。

3.2 色谱柱和流动相的选择

合成色素均为酸性, 且具有较好的水溶性。考察了 ODS-3 和 ODS-SP 的色谱柱。大批样品进行检测过程中发现, ODS-3 柱效降低十分明显, 标准品逐渐出现拖尾和分差的现象。而 ODS-SP 柱效稳定。最终选择了具有高耐水性的 ODS-SP 的反相色谱柱。

流动相的选择参考国标 GB/T 5009.35-2003 方法采用甲醇和 0.02% 乙酸铵的混合体系。配制流动相的细微差别会影响目标物的保留时间。因而对流动相的 pH 值进行调节从而获得较好的峰型, 并使目标物的

出峰时间得以固定。

3.3 检测器参数的选择

DAD 检测器是对具有紫外吸收的化合物进行检测的通用检测器。在 254 nm 下检测时, 杂质的紫外吸收较强, 对目标物的色谱分离有较大的影响。4 种化合物紫外最大吸收波长分别为柠檬黄 426 nm、日落黄 481 nm、胭脂红 508 nm、诱惑红 510 nm, 均在紫外-可见光区域内。结合 4 种化合物的色谱保留时间, 并兼顾每种化合物的在相应波长下响应值大小, 最终将检测其参数设置为 0~6.5 min, 检测波长 440 nm, 6.5 min 之后检测波长 505 nm。大大减少了样品基质的干扰, 得到分离效果很好的色谱图, 满足定量的要求。

3.4 线性范围、相关系数与检出限

分别对 0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红 4 种色素的混合标准溶液进行测定。以峰面积 Y 为坐标轴, $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标, 得到 4 种标准品的回归方程和相关系数见表 2。以 10 倍信噪比($S/N=10$) 计算检出限, 4 种色素的检出限为 1.0 mg/kg。

3.5 回收率与精密度

在市售的腊肉、香肠的空白样品中添加 3.0、6.0、12.0 $\mu\text{g/kg}$ 三个水平, 按方法处理样品, 每种基质做 6 个平行实验, 计算回收率与精密度, 结果见表 3。

表 2 4 种色素回归方程、线性范围及检出限
Table 2 Regression equation, linear range and detection limit of the 4 colouring agents

标准品	回归方程	相关系数 r	线性范围 $\mu\text{g/mL}$	检出限 mg/kg
柠檬黄	$Y=59.62X+0.77$	0.9999	0-50	1.0
胭脂红	$Y=49.61X+1.72$	0.9997	0-50	1.0
日落黄	$Y=58.13X+0.84$	0.9998	0-50	1.0
诱惑红	$Y=54.77X+1.15$	0.9998	0-50	1.0

表 3 样品回收率实验($n=6$)
Table 3 Recovery experiments of samples ($n=6$)

化合物	样品名称	添加水平($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差 RSD(%)
柠檬黄	腊肉	3.0	75.4~80.6	78.3	4.8
		6.0	76.1~83.3	79.7	4.5
		12.0	76.4~83.5	80.0	4.6
	香肠	3.0	74.1~80.6	76.9	4.3
		6.0	75.3~81.5	77.1	3.9
		12.0	74.7~81.9	77.5	4.0
胭脂红	腊肉	3.0	77.2~80.4	78.9	3.2
		6.0	77.9~81.7	79.3	4.7
		12.0	77.6~81.2	79.1	4.1
	香肠	3.0	76.5~80.6	78.6	4.6
		6.0	76.9~81.1	79.3	3.6
		12.0	77.3~82.0	80.2	3.8
日落黄	腊肉	3.0	75.6~80.3	78.6	4.2
		6.0	76.4~81.6	79.3	4.6
		12.0	76.7~82.1	80.2	4.3
	香肠	3.0	77.3~81.7	79.4	3.7
		6.0	78.2~82.0	80.1	3.4
		12.0	77.9~82.7	80.6	3.9
诱惑红	腊肉	3.0	75.7~79.5	78.0	4.4
		6.0	76.2~79.9	78.4	4.6
		12.0	77.3~80.4	79.1	5.0
	香肠	3.0	75.9~80.0	78.2	5.1
		6.0	76.3~80.8	78.9	4.7
		12.0	76.8~81.5	79.4	5.3

3.6 方法的应用

利用本文建立的方法, 共检测腊肉及香肠类产品 133 批, 检出 1 批样品中有柠檬黄, 含量为 1.8 $\mu\text{g/kg}$, 检出 1 批样品中有胭脂红, 含量为 1.4 $\mu\text{g/kg}$,

检出 1 批样品有日落黄, 含量为 1.5 $\mu\text{g/kg}$, 检出 11 批诱惑红, 含量 13~3.4 $\mu\text{g/kg}$ 。对检测呈阳性的样品, 将目标峰的 DAD 紫外吸收光谱与标准品的紫外吸收光谱对比, 应具有相似的特征吸收, 以此来辅助定性。

4 结 论

本方法简便、快速、灵敏、准确,适用性良好,对肉制品中柠檬黄、胭脂红、日落黄、诱惑红的分离均良好,4种色素的回收率和重现性均符合测定要求,通过改进提取方法大大的缩短了样品处理时间,采用定量浓缩仪有效降低检出限。检测方法采用可见光波长区域检测,大大降低了基质的干扰,提高检测的准确性。可作为检测肉制品中人工合成色素的方法,同时可为其他产品及其他种类人工合成色素的检测提供参考。

参考文献

- [1] 曾玉梅,陈繁华,刘志辉,等.双波长 HPLC 测定非发酵豆制品中人工合成色素[J].应用化工,2014,43(6):1147-1149
Zeng YM, Chen FH, Liu ZH, *et al*. Determination of non-fermented bean products by double wave-length HPLC [J]. Appl Chem Ind, 2014, 43(6): 1147-1149.
- [2] 钱晓燕,刘海山,朱晓雨,等.固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中12种合成着色剂[J].分析测试学报,2014,33(5):527-532.
Qian XY, Liu HS, Zhu XY, *et al*. Simultaneous determination of 12 synthetic colorants in cosmetics by SPE/UPLC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(5): 527-532.
- [3] 胡立朝,张艳芳.高效液相色谱法同时测定烟用包装材料中的6种着色剂[J].烟草科技,2014,8:47-50
Hu LZ, Zhang YF. Simultaneous determination of six colorants in cigarette wrapping materials by high performance liquid chromatography [J]. Tob Sci Technol, 2014, 8: 47-50.
- [4] 张振冉.高效液相色谱法测定梅肉中的3种着色剂[J].现代科学仪器,2014,2:122-124.
Zhang ZR. Determination of 3 colorants in plum meat by HPLC [J]. Mod Sci Instrum, 2014, 2: 122-124.
- [5] 肖亮,于忠飞,薛芳,等.聚酰胺小柱净化-反相液相色谱同时测定海米中4种合成着色剂[J].中国食品添加剂,2014,6:167-171.
Xiao L, Yu ZF, Xue F, *et al*. Simultaneous determination of four synthetic colorants in dried shrimps by polyamide cartridge and HPLC [J]. China Food Addit, 2014, 6: 167-171.
- [6] 毛希琴,李春玲,任国杰,等.高效液相色谱法同时检测化妆品中38种禁用着色剂[J].色谱,2015,33(3):282-290.
Mao XQ, Li CL, Ren GJ, *et al*. Simultaneous determination of 38 limited colorants in cosmetics by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(3): 282-290.
- [7] 张大芬,朱敖兰,陶红霞,等.高效液相色谱法同时测定玉米粉和小米粉中的8种合成着色剂[J].现代预防医学,2015,42(7):1202-1204.
Zhang DF, Zhu AL, Tao HX, *et al*. Simultaneous determination of 8 kinds of synthetic colorants in maize flour and wheat flour by HPLC [J]. Mod Prev Med, 2015, 42(7): 1202-1204.
- [8] 赵延胜,杨敏莉,张峰,等.液相色谱/四级杆-飞行时间质谱法筛查奶酪中29种禁用和限用合成色素[J].色谱,2011,29(7):631-636.
Zhao YS, Yang ML, Zhang F, *et al*. Screening method for 29 forbidden or limited synthetic pigments in cheese by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(7): 631-636.
- [9] 赵延胜,董英,张峰,等.食品中46种禁用合成色素的分级提取净化体系研究[J].分析化学,2012,40(2):249-256.
Zhao YS, Dong Y, Zhang F, *et al*. A study on system of sequential extraction and cleaning of 46 forbidden and limited synthetic pigments in food stuff [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(2): 249-256.
- [10] 林春晓,付斌,李红华,等.高效液相色谱检测硬糖中诱惑红色素的研究[J].中国热带医学,2008,8(1):135-136.
Lin CX, Fu B, Li HH, *et al*. Detection of fancy red stearic sugar from candy with high performance liquid chromatography [J]. J Trop Med, 2008, 8(1): 135-136.
- [11] 林春晓,曾红慧,付斌,等.高效液相色谱法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*. Detection of artificial pigment from meat products by using high performance liquid chromatography [J]. J Trop Med, 2005, 5(3): 556-557.
- [12] 常洪.全自动固相萃取-HPLC法测定食品中合成色素的研究[J].安徽预防医学杂志,2015,2:95-98.
Chang H. Determination of synthetic pigments in foods by automatic solid-phase extraction-HPLC [J]. Anhui J Prev Med, 2015, 2: 95-98.
- [13] 刘成伦,李小庆,王晶,等.偶氮类非食用色素的快速测定方法研究进展[J].食品科学,2009,30(5):273-276.
Liu CL, Li XQ, Wang J, *et al*. Research progress on rapid detection of azo-compound inedible pigment [J]. Food Sci, 2009, 30(5): 273-276.
- [14] 周蓉,牟仁祥,许萍,等.高效液相色谱法同时测定食品中7种合成色素[J].粮食与食品工业,2014,21(6):78-81.
Zhou R, Mou RX, Xu P, *et al*. Determination of 7 synthetic pigments in food by HPLC [J]. Cereal Food Ind, 2014, 21(6): 78-81.

78-81.

(责任编辑: 白洪健)

- [15] GB/T 5009.35-2003 《食品中合成着色剂的测定》[S]
GB/T 5009.35-2003 Determination of synthetic colour in foods [S].
- [16] 王志园, 谭莹, 王天娇, 等. 高效液相色谱法同时检测肉制品中 9 种合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 23: 3383-3386.
Wang ZY, Tan Y, Wang TJ, *et al.* Determination of nine artificial pigments in meat products by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 23: 3383-3386.

作者简介



李 莹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全色谱检测的研究。
E-mail: crystal.zero@163.com