

液相色谱法快速检测染色梅鱼中日落黄、 柠檬黄的含量

严卓彦*, 吴 侃

(舟山市普陀区公共检验检测创新服务中心, 舟山 316000)

摘 要: **目的** 建立一种快速、低成本检测染色梅鱼中日落黄、柠檬黄的方法。**方法** 将染色梅鱼剥皮, 鱼皮经 70% 甲醇氨水提取液提取, 经 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇和乙酸铵水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 利用紫外检测器检测日落黄、柠檬黄的含量。**结果** 日落黄、柠檬黄在 1.25、2.5、12.5、25 mg/kg 添加水平的加标回收率为 80%~90%, 相对标准偏差小于 10%(n=6), 柠檬黄检出限为 0.05 mg/kg, 日落黄检出限为 0.025 mg/kg。**结论** 该方法快速、准确、成本低, 适合染色梅鱼中日落黄、柠檬黄的快速检测。

关键词: 日落黄; 柠檬黄; 梅鱼; 液相色谱法

Rapid detection of sunset yellow and lemon yellow in *Collichthys niveatus* by liquid chromatography

YAN Zhuo-Yan*, WU Yu

(The Public Detection and Innovation Service Center of Putuo District, Zhoushan 316000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for determination the sunset yellow and lemon yellow in *Collichthys niveatus* by liquid chromatography. **Methods** The dyed *Collichthys niveatus* was peeled, and the fish skin was extracted with 70% methanol ammonia water extract. The samples were separated with a Eclipse XDB-C₁₈ column at the flow rate of 1.0 mL/min by gradient elution using methanol and ammonium acetate in aqueous solution as the mobile phase, the temperature of column was 35 °C, and the content of sunset yellow and lemon yellow was detected by ultraviolet detector. **Results** The standard recoveries of sunset yellow and lemon yellow at 1.25, 2.5, 12.5, 25 mg/kg were 80%~90%, and the relative standard deviations were less than 10%(n=6). The detection limit of lemon yellow was 0.05mg/kg, and the detection limit of sunset yellow was 0.025mg/kg. **Conclusion** This method is rapid, accurate and low cost, which is suitable for the rapid detection of sunset yellow and lemon yellow in the dyed *Collichthys niveatus*.

KEY WORDS: sunset yellow; lemon yellow; *Collichthys niveatus*; liquid chromatography

1 引 言

近年来, 时有举报投诉称不法商贩在梅鱼、黄鱼等海

水鱼类中添加色素。按照《中华人民共和国消费者权益保护法》^[1]第 7 章第 56 条规定, 经营者在新鲜梅鱼、黄鱼中加入色素, 主要目的是让鱼类看上去鲜度更佳, 以次充好,

*通讯作者: 严卓彦, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: lane.yan789@163.com

*Corresponding author: YAN Zhuo-Yan, Master, The Public Detection and Innovation Service Center of Putuo District, Zhoushan 316000, China. E-mail: lane.yan789@163.com

欺诈消费者。而根据《中华人民共和国食品安全法》^[2]规定,此类行为属在禁止添加的食品中使用添加剂,属滥用添加剂行为。因此在执法过程中,凡是检出人工色素的黄鱼、梅鱼一律以不合格食品论处。

由于养殖大黄鱼鱼体的颜色没有野生鲜艳,不法商贩使用着色力强、色泽鲜明、不易褪色、稳定性好的合成着色剂柠檬黄或日落黄给大黄鱼染色^[3]。日落黄又名晚霞黄、夕阳黄、橘黄、食用黄色3号,为偶氮类色素;柠檬黄又称酒石黄、酸性淡黄、胨黄,是一种偶氮型酸性染料。如果长期或一次性大量食用柠檬黄、日落黄等色素含量超标的食品,可能会引起过敏、腹泻等症状,当摄入量过大,超过肝脏负荷时,会在体内蓄积,对肾脏、肝脏产生一定的伤害^[3]。并且偶氮类化合物在体内分解,可形成两种芳香胺化合物,芳香胺在体内经过代谢活动后与靶细胞作用而可能引起癌肿形成^[4]。Visw等^[5]通过柠檬黄对大鼠睾丸的氧化应激实验,得出柠檬黄在体内产生出自由基损害大鼠的睾丸细胞。动物实验已经确定柠檬黄对DNA有一定的诱变性^[6]。目前,国内对黄鱼、梅鱼染色的鉴别和分析检测尚无统一标准。GB 5009.35-2016^[7]、SN/T 1743-2006^[8]均不适用于鱼产品的检测。

本研究采用液相色谱法检测染色梅鱼中日落黄、柠檬黄的含量,该方法快速、准确,为一线监管工作提供有效参考。

2 材料和方法

2.1 仪器、试剂与材料

Ultimate 3000液相色谱仪带紫外检测器(赛默飞中国科技有限公司);CSTHZ-82超声波水浴恒温振荡器(金坛市朗博仪器制造有限公司);TG16-WS台式高速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司);HHS-21-4水浴锅(上海博讯实业医疗设备厂);Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司)。

日落黄标准溶液、柠檬黄标准溶液(0.500 mg/mL, 中国计量科学院);甲醇(色谱纯,德国CNW公司);氨水、乙酸铵(分析纯,国药集团);0.45 μm水系滤膜(美国NAVIGATOR公司);实验室用水为一级水。

小梅鱼,购自舟山市临城老码头农贸市场。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

日落黄、柠檬黄标准混合溶液:取适量的日落黄、柠檬黄标准溶液原液用水稀释成终浓度为0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL的标准系列溶液。

甲醇氨水提取液:70%甲醇水溶液与氨水以99:1(V:V)比例混合。

流动相:甲醇、0.02 mol/L乙酸铵水溶液。

2.2.2 样品前处理

(1) 采样和提取

将梅鱼体表的大部分鱼皮剥下,搅碎混匀,然后称取约2 g放入100 mL离心管内,加入10 mL 70%甲醇氨水(99:1, V:V)提取液,在35 °C水浴中振荡提取20 min,然后10000 r/min离心10 min取上清液。重复提取一次。

(2) 浓缩和离心

将2次提取的上清液合并,在沸水浴上浓缩,然后转移到10 mL离心管并定容至5 mL,4000 r/min离心15 min。取上清液过0.45 μm滤膜。

2.2.3 液相色谱条件

Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:甲醇(A)-0.02 mol/L乙酸铵水溶液(B),流速:1.0 mL/min,进样体积:20 μL,柱温:35 °C,检测波长:420 nm(前10 min);480 nm(10 min后)。液相色谱梯度洗脱程序:0~7.0 min, 95%B~75%B; 7.0~15.0 min, 75%B~0%B; 15.0~19.0 min, 0%B; 19.0~19.1 min, 0%B~95%B; 19.1~30 min, 95%B。

3 结果与分析

3.1 方法的线性范围及检出限

柠檬黄和日落黄的浓度在0.05~10 μg/mL之间存在良好的线性关系,相关系数为1.0000。10 min前在420 nm检测波长下柠檬黄的出峰时间在5.8 min附近,10 min后在480 nm检测波长下日落黄的出峰时间在11.2 min附近,2个化合物分离度高,峰型较好。如图1。

称取3份空白样品,加标使柠檬黄、日落黄终浓度分别为0.025、0.05和0.1 mg/kg。通过对加标样品进行测定,以信噪比约等于3(S/N=3)的测量值为检出限(limit of detection, LOD)。由此测定本方法的柠檬黄检出限为0.05 mg/kg,日落黄检出限为0.025 mg/kg。

3.2 回收率及精密度实验

以空白梅鱼为样品,在加标量为1.25、2.5、12.5和25 mg/kg 4个水平下进行加标回收实验,每个水平重复加标6次,计算平均加标回收率。平均加标回收率在80%~90%之间,相对标准偏差在10%以内,回收率和精密度较好,如表1。

3.3 取样和前处理方法研究

目前,国内对染色黄鱼的鉴别和分析检测还未制定相应的标准,绝大多数研究报道都采取体表取样,用剪刀剪下黄鱼中颜色较黄的部位^[9],因为着色大黄鱼一般为体表着色,引入大量鱼肉不利于样品处理和结果的有效分析^[3]。沙鸥等^[10]直接向染色黄鱼中加入蒸馏水进行超声提取,提取结束后提取液过0.45 μm滤膜后上机。考虑到采样的代表性和可行性,我们采用了体表取样,在每批样品中随机抽取10条梅鱼,将鱼皮剥下,搅碎混匀后取样。

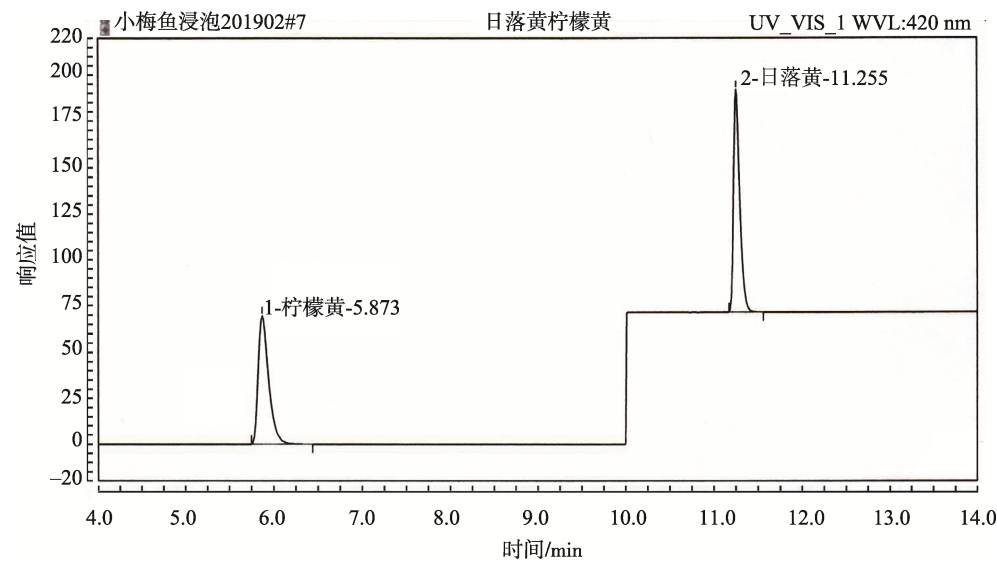


图 1 日落黄、柠檬黄标准溶液液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of sunset yellow and lemon yellow standard solution

表 1 空白样品加标回收率和精密度(n=6)

Table 1 Recoveries and precision of blank samples spiked standard (n=6)

化合物	加标量/(mg/kg)	加标回收率/%	平均加标回收率/%	RSD/%
柠檬黄	1.25	77.8、84.7、92.5、88.0、88.4、92.3	87.3	6
	2.5	73.9、84.7、77.5、88.4、88.4、77.6	81.8	8
	12.5	80.6、91.3、85.9、83.9、83.9、85.9	85.2	4
	25	75.5、85.4、85.6、87.9、87.9、85.9	84.7	5
日落黄	1.25	79.2、83.8、87.5、82.7、80.9、87.6	83.6	4
	2.5	72.4、86.7、76.7、84.2、84.0、76.9	80.2	7
	12.5	80.4、92.0、87.8、81.4、81.4、87.8	85.1	6
	25	74.7、88.2、85.7、84.5、84.6、86.0	84.0	6

对样品浸提液的选择,大多使用蒸馏水、超纯水或 70%乙醇氨水溶液^[3,9-12]。简单基质如糖果、汽水等使用蒸馏水提取是非常有效的,但对于脂肪、蛋白、果胶及其他固形物含量较高的样品,其水溶性差,固形物对合成着色剂有较大吸附,影响回收率^[11]。乙醇的存在可降低水溶性蛋白的溶解;合成着色剂多数为酸性染料,提取液中加入氨水,可提高色素的提取效率^[11]。如果浸提溶液偏酸性,则有可能产生色素酸沉淀,影响检测结果^[12],且乙醇峰会干扰柠檬黄的检测^[13]。因此我们采用 70%甲醇-氨水溶液(99:1,V:V)作为提取液。

在浸提过程中,大部分研究都采取超声提取的方法^[3,10,11]。但是鱼皮中带有大量蛋白和脂肪,超声后碎裂成小片段更加难以去除,影响色素的提取效率。我们采用水浴振荡(转速 130 r/min)提取法,取得了较好的效果。由于提取液中含有氨,在 35℃以上会蒸发产生压力,冲击离心管盖弹出,因此选择水浴温度为 35℃。比较了提取时间为 10、20、40、60 min 的提取效果,发现提取 20 min 的检测值比提取 10 min 的检测值有明显增高,而

20 min 以后的检测值增长较平缓,如图 2,因此我们选择 20 min 作为提取时间。

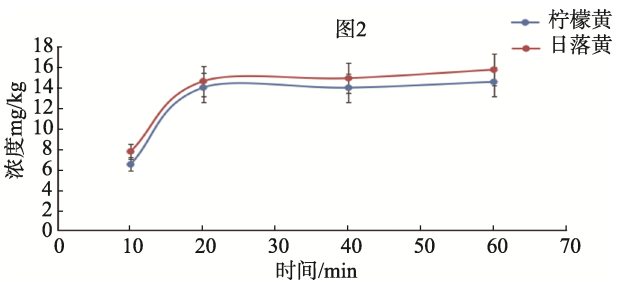


图 2 提取时间的优化结果(n=3)

Fig.2 Optimization results of extraction time (n=3)

国标方法中的聚酰胺吸附法,依据水溶性酸性色素在酸性条件下被聚酰胺吸附,在碱性条件下解吸附。但该方法处理步骤繁琐,需要多次调节 pH 值,且抽滤耗费大量时间,容易引起色素损失。通过比较 GB 5009.35-2016^[7]食品中合成着色剂专用 SPE 小柱法和本方法对日落黄、柠檬

黄提取的加标回收率,发现 SPE 小柱法的加标回收率在 75%~95%,与该方法相差不大,但是固相萃取柱成本高且容易堵柱,往往需要多次离心去除蛋白,不适合处理大批量样品。

由于日落黄、柠檬黄为水溶性色素,且其溶解度随温度升高而增大,二者耐热性较强^[12],我们将提取液离心后取上清液经沸水浴浓缩至不到 5 mL,定容后再离心取上清液过 0.45 μm 滤膜上机。离心可以使大颗粒蛋白等杂质沉淀,尽可能达到去除此类物质的目的。离心后,油脂会漂浮于液面上层,这一小部分油脂对于检测没有太大影响,但对色谱柱污染较大,如果使用吸附剂或层析填料则会造成着色剂提取损失,所以使用一次性带针注射器穿过油脂吸取中间水层,减少油脂的残留^[12]。

3.4 色谱条件

柠檬黄和日落黄的最佳吸收波长分别在 428 nm 和 484 nm^[14]。我们分别在 420 nm 和 480 nm 下对柠檬黄日落黄的混合标准溶液及梅鱼中的日落黄、柠檬黄进行检测,发现 480 nm 时柠檬黄标准溶液的峰面积较 420 nm 时大幅度减少,影响检出限;而在 420 nm 时日落黄标准溶液的峰面积虽然较 480 nm 时小一半,但是检出限和加标回收率几乎不变。然而 420 nm 下检测梅鱼中的日落黄时会在目标峰附近出现较多杂峰,严重干扰目标峰的检测,而在 480 nm 下检测时无此现象。因此我们选择分段检测,在前 10 min(柠檬黄的出峰时间)用 420 nm 作为检测波长,而在 10 min 后(日落黄的出峰时间)改用 480 nm 作为检测波长,取得了较好的效果。

柱温是调节出峰时间及改善分离度、缩短分析过程的重要因素。从柱温对检测结果的影响可知,2 种着色剂的检测峰面积随着柱温的升高呈先增大后减小的趋势。当柱温低于 35 ℃时,随着柱温的升高,待测组分保留时间缩短且色谱峰峰高信号增强,信噪比得到改善。为使分离效果更加明显,综合考虑分析时间及二者的分离度,最终确定最佳柱温为 35 ℃^[15]。

3.5 梅鱼染色模拟试验

为了模拟梅鱼在低浓度日落黄和柠檬黄染色下的检测环境,我们用 0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL 4 种浓度的日落黄、柠檬黄混合溶液浸泡空白梅鱼 2、4、6、24、27 h 后取出梅鱼按照我们的采样方法进行检测。所有样品在不同浓度不同时间段都有检出,且检测值与浓度的大小呈正相关,重复条件下 3 次独立测定结果的相对标准偏差在 20% 以内。如表 2~5 结果也显示:在同一浓度浸泡 2、4、6、24、27 h 后,柠檬黄的检测值随染色时间的延长先略有升高,在 4~6 h 达到峰值,然后缓慢下降,趋势较为平缓;而日落黄的检测值随染色时间的延长也先略有升高,但在 6 h 后下降较多。说明该法对染色梅鱼中的柠檬黄检测效果较

好,受染色时间的影响较小。而日落黄的检测值受到染色时间的影响较大,需要尽快进行检测。

表 2 柠檬黄日落黄混合溶液的检测结果(0.5 μg/mL)
Table 2 Detection results of lemon yellow and sunset yellow mixed solution (0.5 μg/mL)

化合物	染色时间	测定量/(mg/kg)			平均值/(mg/kg)	RSD/%
柠檬黄	2	0.477	0.444	0.492	0.471	5
	4	1.224	1.012	1.151	1.129	10
	6	0.914	1.033	0.771	0.906	14
	24	0.722	0.721	0.650	0.698	6
	27	0.739	0.628	0.615	0.661	10
日落黄	2	0.877	0.748	0.815	0.813	8
	4	1.217	1.24	0.906	1.121	17
	6	0.637	0.663	0.77	0.169	10
	24	0.129	0.131	0.14	0.133	4
	27	0.124	0.13	0.118	0.124	5

表 3 柠檬黄日落黄混合溶液的检测结果(1.0 μg/mL)
Table 3 Detection results of lemon yellow and sunset yellow mixed solution (1.0 μg/mL)

化合物	染色时间	测定量/(mg/kg)			平均值/(mg/kg)	RSD/%
柠檬黄	2	0.886	0.821	0.72	0.809	10
	4	1.229	1.019	1.212	1.153	10
	6	2.153	2.08	2.25	2.161	4
	24	1.216	0.85	0.995	1.02	18
	27	1.005	0.824	0.931	0.914	14
日落黄	2	2.085	1.986	1.857	1.976	6
	4	1.145	1.375	1.345	1.288	10
	6	1.856	2.179	1.987	2.007	8
	24	0.372	0.254	0.281	0.302	20
	27	0.096	0.075	0.088	0.086	12

表 4 柠檬黄日落黄混合溶液的检测结果(5.0 μg/mL)
Table 4 Detection results of lemon yellow and sunset yellow mixed solution (5.0 μg/mL)

化合物	染色时间	测定量/(mg/kg)			平均值/(mg/kg)	RSD/%
柠檬黄	2	5.678	6.892	6.534	6.368	10
	4	4.59	5.305	5.636	5.177	10
	6	7.341	5.86	5.183	6.128	18
	24	7.046	7.801	6.250	7.032	11
	27	7.098	6.152	7.238	6.829	9
日落黄	2	5.315	6.497	7.297	6.370	16
	4	9.098	7.272	8.886	8.419	12
	6	7.535	6.325	5.530	6.463	16
	24	1.544	1.220	1.095	1.286	18
	27	0.373	0.409	0.455	0.412	10

表 5 柠檬黄日落黄混合溶液的检测结果(10.0 µg/mL)
Table 5 Detection results of lemon yellow and sunset yellow mixed solution (10.0 µg/mL)

化合物	染色时间	测定量/(mg/kg)			平均值/(mg/kg)	RSD/%
柠檬黄	2	12.33	11.06	9.286	10.89	14
	4	16.23	13.81	12.94	14.33	12
	6	16.04	17.77	13.87	15.89	12
	24	11.12	13.83	13.06	12.67	11
	27	10.75	9.241	11.48	10.49	11
日落黄	2	12.50	16.90	16.82	15.41	16
	4	21.61	26.24	18.97	22.27	17
	6	18.93	20.73	14.14	17.93	19
	24	0.790	1.142	0.985	0.972	18
	27	0.697	0.690	0.547	0.645	13

4 结 论

对于经过日落黄、柠檬黄染色的梅鱼我们采取剥下鱼皮,用浸提液水浴振荡浸提,离心取上清液浓缩,浓缩液离心后直接过膜上机检测。该方法具有快速、成本低等优点,从采样到出具结果不超过 6 h,而且操作简单,试剂损耗小,可同时处理大批量样品。加标回收率和精密度实验满足检测要求,且对柠檬黄的检测值受染色时间的影响较小,对日落黄的检测结果受染色时间的影响较大,在实际检测中需要注意。

参考文献

[1] 中华人民共和国消费者权益保护法[Z]. Consumer protection law of the People's Republic of China [Z].

[2] 中华人民共和国食品安全法[Z]. Food safety law of the People's Republic of China [Z].

[3] 王晓华. 高效液相色谱法快速测定染色大黄鱼的案例分析[J]. 中国科技信息, 2013, (17): 68.

Wang XH. Analysis of a case for detecting dying yellow croaker fish by HPLC [J]. Chin Technol Inf, 2013, (17): 68.

[4] 张朝武, 周宜开. 现代卫生检验学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

Zhang ZW, Zhou YK. Modern sanitary inspection [M]. Beijing: People's Health Publisher, 2005.

[5] Visweswaran B, Krishnamoorthy G. Oxidative stress by tartrazine in the testis of Wistar rats [J]. IJPBS, 2012, 2(3): 44–49.

[6] Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, et al. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives [J]. Mutation Res, 2002, 519: 103–109.

[7] GB 5009.35-2016 食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定[S]. GB 5009.35-2016 National food safety standard-Determination of synthetic colorant in foods [S].

[8] SN/T 1743-2006 食品中的诱惑红、酸性红、亮蓝、日落黄的含量检测 高效液相色谱法[S]. SN/T 1743-2006 Determination of allura red AC, carmosine, brilliant blue FCF, sunset yellow FCF in food-High performance liquid chromatographic method [S].

[9] 陈建军. 黄鱼中掺有柠檬黄色素事件的调查[J]. 职业与健康, 2002, 18(5): 43–44.

Chen JJ. Investigation of yellow croaker fish dying with lemon yellow [J]. Career Health, 2002, 18(5): 43–44.

[10] 沙鸥, 陈丽, 马卫兴, 等. 高效液相色谱法测定黄鱼中非法添加色素柠檬黄含量[J]. 中国食品添加剂, 2013, (6): 195–198.

Sha O, Chen L, Ma WX, et al. Determination of lemon yellow content in yellow croaker by high performance liquid chromatography [J]. China Food Addit, 2013, (6): 195–198.

[11] 李强, 韩国善. 食品检测中合成着色剂测定方法的探讨[J]. 中外食品工业月刊, 2014, (2): 30.

Li Q, Han GS. Discussion of the inspection methods for detecting artificial color in food[J]. Global Food Ind, 2014, (2): 30.

[12] 刘芳. 高效液相色谱法测定糕点中的柠檬黄、日落黄[J]. 化学分析计量, 2014, 23(5): 78–80.

Liu F. Determination of lemon yellow and sunset yellow in pastry by high performance liquid chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2014, 23(5): 78–80.

[13] 管敏娅, 张立义. 食品中 5 种合成食用色素高效液相色谱检测方法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1105–1111.

Guan MY, Zhang LY. HPLC determination for 5 synthetic food colors in edibles [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(6): 1105–1111.

[14] 冯慧, 梅利华, 谢继安. 高效液相色谱检测蜜饯中合成色素的最佳测定波长研究[J]. 中国食物与营养, 2007, (9): 39–41.

Feng H, Mei LH, Xie JA. Investigation of the best detecting wavelength in HPLC to detect artificial color in glazed fruit [J]. Chin Food Nutr, 2007, (9): 39–41.

[15] 初红涛, 张晖, 王军, 等. 谷物中柠檬黄和日落黄高效液相色谱检测方法的优化[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5363–5365, 5630.

Chu HT, Zhang H, Wang J, et al. Optimization of the test of tartrazine and sunset yellow in cereals by means of HPLC [J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40(9): 5363–5365, 5630.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



严卓彦, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: lane.yan789@163.com