

高效液相色谱法测定熟肉制品中 8 种合成着色剂

李 聪*, 廖文彬, 罗美芬, 邱启东

(广东产品质量监督检验研究院, 顺德 528300)

摘 要: 目的 建立高效液相色谱法同时快速测定熟肉制品中 8 种合成着色剂的检测方法。**方法** 称取粉碎后的样品于离心管中, 加入碱性乙醇溶液提取合成着色剂, 用硫酸溶液和钨酸钠溶液去除蛋白, 滤液经浓缩后定容。样液过滤后经 Agilent C₁₈(5 μm, 250 mm×4.6 mm)色谱柱分离, 流动相为 0.02 mol/L NH₄Ac(pH 6.86) 和甲醇, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 40 °C。采用二极管阵列检测器在 254 nm 波长处进行检测, 外标法定量。**结果** 该方法在 0.5~10.0 mg/kg 线性范围内(靛蓝为 1.0~20.0 mg/kg)线性良好, 相关系数均大于 0.990, 检出限为 0.1~1.0 μg/kg, 平均回收率为 80.8%~104.7%, 相对标准偏差为 4.29%~4.87%。**结论** 该方法操作简单、灵敏度高、重复性好, 满足同时检测熟肉制品中 8 种合成着色剂的要求。

关键词: 合成着色剂; 高效液相色谱法; 熟肉制品

Simultaneous determination of 8 synthetic colorants in cooked meat by high performance liquid chromatography

LI Cong*, LIAO Wen-Bing, LUO Mei-Fen, QIU Qi-Dong

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Shunde 528300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 8 kinds of synthetic colorants in cooked meat by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was weighed after grinding and put into a centrifuge tube, the basic ethanol solution was added to extract and synthesize the colorant. The protein was removed by sulfuric acid solution and sodium tungstate solution. The filtrate was concentrated and constant volume. The sample solution was filtered and separated by Agilent C₁₈ column (5 μm, 250 mm×4.6 mm) with 0.02 mol/L NH₄Ac(pH 6.86) and methyl alcohol as mobile phase at 1.0 mL/min flow rate at 40 °C. The sample solution was detected by diode array detector at 254 nm wavelength and quantified by external standard method. **Results** The method had a good linearity in the range of 0.5–10.0 mg/kg(indigo was 1.0–20.0 mg/kg) with correlation coefficients (r^2) more than 0.990. The detection limits ranged from 0.1–1.0 μg/kg. The average recoveries were in the range of 80.8%–104.7% with relative standard deviations(RSDs) 4.29%–4.87%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and reproducible, which can meet the requirements of simultaneous detection of 8 synthetic colorants in cooked meat products.

KEY WORDS: synthetic colorants; high performance liquid chromatography; cooked meat

基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目(2018PZ02)

Fund: Supported by Quality and Technology Supervision of Guangdong Province (2018PZ02)

*通讯作者: 李聪, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验与风险监测。E-mail: 511182821@qq.com

*Corresponding author: LI Cong, Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Shunde 528300, China. E-mail: 511182821@qq.com

1 引言

熟肉制品是以禽产品、鲜(冻)畜产品为主要原料加工制成的产品,包括发酵肉制品类、熏肉类、油炸肉类、烤肉类、烧肉类、肉灌肠类、西式火腿类、酱卤肉制品类、熟肉干制品和其他熟肉制品^[1,2]。熟肉制品在成分、品类和口味相差不大的情况下,感官和嗅觉成为吸引消费者的利器^[3]。在熟肉制品中添加着色剂,既普遍存在,又有较长历史^[4]。但一味追求色泽,向熟肉制品中超范围、超量地添加合成着色剂,对人体有显著的毒性或致癌作用,所以有必要建立一种准确、省时、高效的检测方法,提高社会效益和经济效益^[5,6]。

GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[7]中对苋菜红、胭脂红、柠檬黄、日落黄、诱惑红、亮蓝、新红和赤藓红 8 种添加剂在食品中使用进行了限量,同时,我国也针对部分合成着色剂制定了相应的检测标准^[8-11]。国内外针对此类合成着色剂的检测方法主要有高效液相色谱法^[12-16]、高效液相色谱-质谱法^[17,18]、分光光度法^[19],但前处理复杂,耗费时间较长,缺少对肉制品中多种合成着色剂快速且简单的提取检测方法,另外肉制品中合成着色剂检测标准只有 GB/T 9695.6-2008《肉制品胭脂红着色剂测定》^[10],该标准中的方法只针对单种着色剂进行检测,前处理复杂,分析重复,浪费时间长。本研究建立高效液相色谱法同时快速测定熟肉制品中柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、靛蓝、赤藓红 8 种合成着色剂,前处理采用碱性乙醇溶液提取合成着色剂,并用用硫酸溶液和钨酸钠溶液除蛋白,易于操作,以期对熟肉制品的安全保障提供参考,具有重要的社会效益和经济效益。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验试剂

无水乙醇、98%氨水(分析纯、天津永大化学试剂有限公司);三氟乙酸、磷酸盐、乙酸铵(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);甲醇、乙腈、甲酸、石油醚(色谱纯,德国 CNW Technologies GmbH 公司);标准品:柠檬黄、日落黄、胭脂红、亮蓝、苋菜红、诱惑红、赤藓红、焦糖色素、红曲红、高粱红、亚硝基血红蛋白质色素、番茄红素(0.50 g/L)、靛蓝(1.00 g/L)(中国计量科学研究院)

2.1.2 实验样品

随机抽取佛山市 10 个农贸市场的熟肉制品进行实验。

2.1.3 实验仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪,配备 SPD-M20A 检测器,LC Solution 色谱工作站(日本岛津公司);JP-C7200 超声波清洗机(广州吉普超声波电子设备有限公司);Sigma

3k15 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);DT-502A 电子天平(常熟市金羊砝码仪器有限公司);Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

准确移取 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 mL 的柠檬黄、日落黄、胭脂红、亮蓝、苋菜红、诱惑红、靛蓝、准品母液置于 10 mL 容量瓶中,加水到刻度,逐级稀释柠檬黄、日落黄、胭脂红、亮蓝、苋菜红、诱惑红、赤藓红标准溶液浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L,靛蓝标准溶液浓度为 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 mg/kg。

2.2.2 样品前处理

称取粉碎后试样 5.0~10.0 g,置于离心管中,加入乙醇+氨水+水溶液提取,加入 1.0 mL 硫酸溶液和 1.0 mL 钨酸钠溶液沉淀蛋白质。用滤纸过滤,用少量水洗滤纸,滤液收集与 100 mL 鸡心瓶中。旋转蒸发至近干,加水溶解,定容至 5 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进液相色谱仪分析。

2.2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent C₁₈(5 μm, 250 mm×4.6 mm)柱;流动相:甲醇-乙酸铵溶液(0.02 mol/L);检测器:二极管阵列检测器;柱温:40 °C;进样体积:10 μL;检测波长:254 nm。梯度洗脱表见表 1。

表 1 流动相的梯度变化
Table 1 Gradient change of the mobile phase

时间/min	甲醇/%	乙酸铵溶液/%
0.0	22	78
5.0	35	65
20.0	85	15
21.0	22	78
25.0	22	78

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

3.1.1 缓冲溶液的选择

根据被测物质的性质,水和甲醇被选为流动相对熟肉制品中 8 种合成着色剂进行分离。但纯水出峰较慢且峰形较差,因此为降低 8 种合成着色剂的保留时间,改善峰形,本研究对不同种类缓冲盐进行了筛选。在甲醇浓度为 22%情况下,水相采用相同浓度的三氟乙酸、磷酸盐、乙酸铵,通过比较分离效果和出峰时间,发现乙酸铵出峰时间较快且分离效果相对较好,因此本实验选择 0.02 mol/L 的乙酸铵缓冲溶液作为流动相。

合成着色剂的峰形和出峰时间受乙酸铵溶液的 pH 值影响, 本实验对不同 pH 值(4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、6.86、7.5)的乙酸铵缓冲溶液进行了选择, 针对熟肉制品中 8 种合成着色剂进行分离。通过实验发现保留时间随乙酸铵缓冲溶液 pH 的增大而减小, 但当 pH 值大于 6.5 时, 保留时间变化细微, 但 8 种合成着色剂分离度下降, 综合考虑实验选择 pH6.86 乙酸铵缓冲溶液作为流动相。

3.1.2 流动相梯度初始比例的选择

梯度洗脱可大大降低保留时间, 改善峰型, 但初始流动相比例、流动相的梯度变化、结束流动相比例均会影响样品的分离, 因此本实验对乙酸铵缓冲液与甲醇的初始浓度进行了选择, 实验选择了(3%、5%、10%、15%、22%)5 个不同甲醇初始浓度对熟肉制品中 8 种合成着色剂进行分离。通过实验发现甲醇初始比例为 5%和 3%时, 8 种合成着色剂出峰较晚且其中日落黄、亮蓝、诱惑红、赤藓红 4 种物质未达到基线分离, 随着甲醇初始比例的升高, 8 种合成着色剂的保留时间逐渐缩短, 但甲醇初始比例为 10%和 15%时, 诱惑红与亮蓝均未完全分离, 当甲醇初始比例为 22%时, 8 种合成着色剂达到基线分离, 因此实验流动相选择甲醇的初始比例为 22%。

3.1.3 柱温的确定

柱温箱温度影响分离效果, 因此本实验针对不同柱温对分离效果的影响进行了实验。随着柱温升高, 8 种合成着色剂出峰时间缩短, 但在 40~45 °C 柱温时, 8 种合成着色剂出峰时间变化不大, 因此实验选择柱温为 40 °C。在选定

的最佳色谱条件下得到 8 种合成着色剂的标准样品图如图 1, 可见各物质色谱峰区分度良好。

3.2 干扰实验

熟肉制品中基质相对复杂, 加入焦糖色素、红曲红、高粱红、亚硝基血红蛋白色素、番茄红素等多种肉制品中常用的天然着色剂, 在选定的最佳色谱条件下进行了天然着色剂的干扰实验, 结果表明上述 5 种天然色素对熟肉制品中合成着色剂的测定无影响, 不干扰测定。

3.3 方法线性关系与检出限

在最优的色谱条件和分离条件下, 对 8 种合成着色剂的混合标准溶液进行分析, 以峰面积 Y 对标样的质量浓度 $X(\text{mg/kg})$ 进行线性回归, 得到各合成着色剂的线性回归方程^[16]。以 3 倍信噪比计算方法检出限, 结果见表 2。

由表 2 可以看出, 7 种合成着色剂在 0.5~10.0 mg/kg、靛蓝在 1.0~20.0 mg/kg 线性范围内呈良好的线性关系, 相关系数均大于 0.99, 检出限为 0.1~1.0 $\mu\text{g/kg}$, 灵敏度较高。

3.4 方法精密度与准确度

选取市售的熟肉制品多组, 加入 3 个水平的标准溶液(0.5、2.0、5.0 mg/kg), 同时做空白实验, 扣除空白试样浓度后, 计算加标回收率和相对标准偏差。熟肉制品中 8 种合成着色剂的平均回收率为 80.8%~104.7%, 相对标准偏差为 4.29%~4.87%, 表明该方法可作为熟肉制品中 8 种合成着色剂的可靠检测方法。

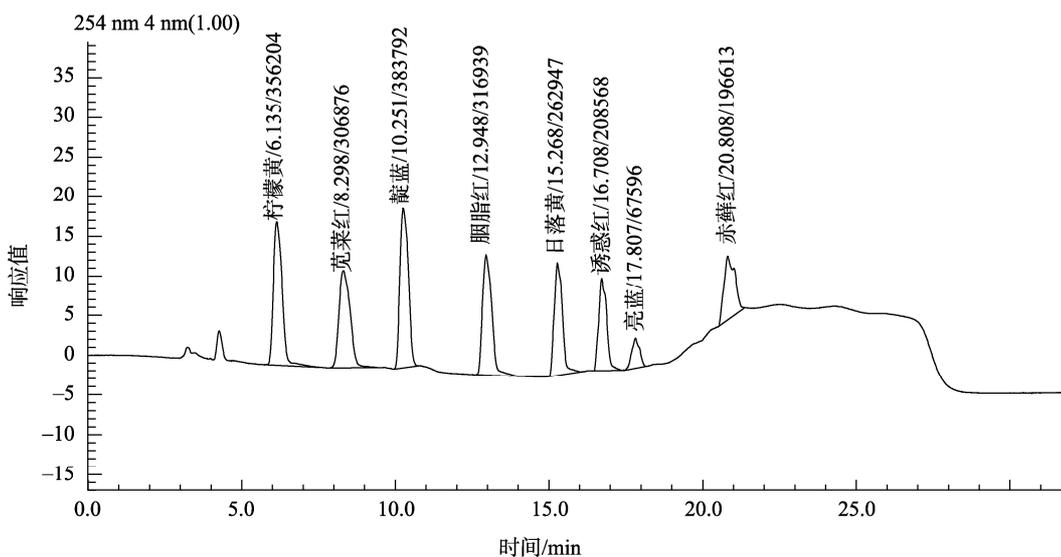


图 1 8 种标准样品图

Fig.1 Chromatogram of 8 standard products

表 2 实验方法的线性范围、回归方程、工作曲线、检出限

Table 2 Linear range, regression equation, working curve and detection limit of the method

线性范围/(mg/kg)	线性方程	r^2	检出限/(mg/kg)	
柠檬黄	0.5~10.0	$Y=3.3976X+3.7438$	0.9991	1.00×10^{-4}
苋菜红	0.5~10.0	$Y=3.8679X+3.6146$	0.9946	2.00×10^{-4}
胭脂红	0.5~10.0	$Y=3.7766X+3.4328$	0.9996	1.00×10^{-4}
日落黄	0.5~10.0	$Y=3.4272X+4.7439$	0.9985	1.00×10^{-4}
诱惑红	0.5~10.0	$Y=4.1606X+3.6353$	0.9989	1.00×10^{-4}
亮蓝	0.5~10.0	$Y=3.5863X+3.6053$	0.9970	4.00×10^{-4}
靛蓝	1.0~20.0	$Y=3.6462X+2.7852$	0.9901	1.00×10^{-3}
赤藓红	0.5~10.0	$Y=2.3983X+2.9878$	0.9994	3.00×10^{-4}

3.5 试剂样品检测

选择本方法对随机选取的市场出售的 35 个批次的熟肉制品进行检测, 结果在 35 个批次熟肉制品中有 1 个批次检出日落黄 0.009 mg/kg、1 个批次检出胭脂红 0.012 mg/kg, 根据 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[7], 日落黄为违法添加, 超范围使用, 胭脂红为熟肉制品中允许限量使用的添加剂, 未发现超量使用的情况。

4 结论

本研究建立了熟肉制品中 8 种合成着色剂同时检测的高效液相色谱-二极管阵列检测法, 以 pH 值为 6.86 乙酸铵溶液(0.02 mol/L)和甲醇为流动相进行梯度洗脱, 30 min 实现 8 种合成着色剂的测定。该方法简单快捷、结果准确, 操作简单, 是实现熟肉制品中 8 种人工合成着色剂同时检测的理想方法。

参考文献

- [1] GB 2726-2016 食品安全国家标准 熟肉制品[S].
GB 2726-2016 National food safety standard-Cooked meat [S].
- [2] GB 2730-2015 食品安全国家标准 腌腊肉制品[S].
GB 2730-2015 National food safety standard-Cured meat products [S].
- [3] 段敏, 李强, 戴岳, 等. 肉制品质量安全风险因子检测与控制研究进展[J]. 肉类工业, 2017, (1): 44-46.
Duan M, Li Q, Dai Y, *et al.* Research progress on detection and control of quality and safety risk factors of meat products [J]. Meat Ind, 2017, (1): 44-46.
- [4] 冷喜芳. 肉制品生产加工中的质量安全问题[J]. 现代食品, 2018, (21): 79-80.
Leng XF. Quality and safety problems in meat products processing [J]. Mod Food, 2018, (21): 79-80.
- [5] 伍雅婷, 李静娜, 郭燕, 等. 武汉市市售熟肉制品合成色素添加情况调查[J]. 中国食品卫生杂志 2015, (6): 672-677.
Wu YT, Li JN, Guo Y, *et al.* Investigation on synthetic pigment addition of cooked meat products in Wuhan [J]. Chin J Food Hyg, 2015, (6): 672-677.
- [6] 宋月, 陈颖, 白欣, 等. 大连市熟肉制品中红色色素含量调查[J]. 中国卫生工程学, 2016, (1): 48-50.
Song Y, Chen Y, Bai X, *et al.* Investigation on the content of red pigment in cooked meat products in Dalian [J]. Chin J Publ Health Eng, 2016, (1): 48-50.
- [7] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for use of food additives [S].
- [8] 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 colorants in food [S].
- [9] SN/T 3638-2013 出口食品中脂溶性着色剂的测定[S].
SN/T 3638-2013 Determination of fat soluble colorants in food for export [S].
- [10] GB/T 9695.6-2008 肉制品 胭脂红着色剂测定[S].
GB/T 9695.6-2008 Meat products-Method for determination of artificial colour ponceau-4R [S].
- [11] GB 5009.141-2016 食品安全国家标准 食品中诱惑红的测定[S].
GB 5009.141-2016 National food safety standard-Determination of temptation red in food [S].
- [12] 黄永辉, 余清, 林钦, 等. 超高效液相色谱法同时测定碳酸饮料中的 22 种合成着色剂[J]. 分析测试学报, 2011, (8): 877-882.
Huang YH, Yu Q, Lin Q, *et al.* Simultaneous determination of 22 synthetic colour in carbonated beverages by ultra high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2011, (8): 877-882.
- [13] 马康, 蒋孝雄, 赵敏, 等. 高效液相色谱法同时测定软饮料中 20 种合成着色剂[J]. 分析化学研究报告, 2012, 10(11): 1661-1667.
Ma K, Jiang XX, Zhao M, *et al.* Simultaneous determination of 20 synthetic colour in drinks by high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array detector [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 10(11): 1661-1667.
- [14] 汪辉, 曹小彦, 陈利国, 等. 高效液相色谱法同时测定蜜饯中五种常见合成着色剂[J]. 分析实验室, 2007, 26(11): 119-121.
Wang H, Cao XY, Chen LG, *et al.* Simultaneous determination of five familiar synthetic colour in succade by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2007, 26(11): 119-121.

- [15] 高慧, 汪洋, 王敏, 等. 高效液相色谱法测定熟肉制品中 5 种合成色素 [J]. 食品研究与开发, 2016, (13): 138–140.
Gao H, Wang Y, Wang M, *et al.* Determination of five synthetic pigments in cooked meat products by HPLC [J]. Food Res Dev, 2016, (13): 138–140.
- [16] 刘仲义, 李聪, 武尚森, 等. 高效液相色谱法测定运动饮料中 13 种食品添加剂 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(3): 506–511.
Liu ZY, Li C, Wu SS, *et al.* Determination of 13 food additives in sports drinks by HPLC [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(3): 506–511.
- [17] 林维宣, 孙兴权, 赵雪蓉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测化妆品中 6 种禁用着色剂 [J]. 色谱, 2012, 30(5): 527–532.
Lin WX, Sun XQ, Zhao XR, *et al.* Simultaneous determination of 6 forbidden colorants in cosmetics by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(5): 527–532.
- [18] 冯月超, 贾丽, 何亚荟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定粮食及肉制品中的 24 种工业染料 [J]. 色谱, 2013, (10): 1021–1027.
Feng YC, Jia L, He YH, *et al.* Simultaneous determination of 24 industrial dyes in grain and meat products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2013, (10): 1021–1027.
- [19] 欧云付, 尹平河, 赵玲, 等. 两种方法测定口红糖中诱惑红色素含量的比较 [J]. 食品科学, 2006, 27(8): 214–216.
Ou YF, Yin PH, Zhao L, *et al.* Comparison of two methods for determination of alluring red pigment in brown sugar [J]. Food Sci, 2006, 27(8): 214–216.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介

李 聪, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验与风险监测。

E-mail: 511182821@qq.com