

中可能存在成分的检测方法和“地沟油”中极性成分的指纹图谱建立,以及 TLC 鉴别方法。结果表明,“地沟油”中抗生素和激素含量非常低,极性成分指纹图谱的共有特征峰难确定,TLC 鉴别灵敏度较低。DBS 存在于部分“地沟油”中,因此对“地沟油”中 DBS 的测定,能为“地沟油”的鉴别提供科学的依据,且 DBS 对照品易获取,易于测定,故选择 DBS 为检测成分。但是“地沟油”的鉴别仍然是一项难题,无法仅仅通过单一的指标对其进行判定,尚需进一步研究。

3.2 市售 DBS 为混合物,HPLC 法检测时,出现 4 组、共 8 个特征色谱峰。由于该组特征峰共同表征 DBS 的液相色谱行为和含量大小,故采用该组峰的总峰面积进行定量计算。DBS 中,平均碳数为 12,烷基碳链多在 11 ~ 14 之间。HPLC 色谱图呈现 8 个色谱峰中有 4 个响应值较高的色谱峰。该 4 个峰经 LC-IT-TOF 确证,按出峰顺序依次为十一烷基苯磺酸钠(分子量 298)、DBS(分子量 312)、十三烷基苯磺酸钠(分子量 322)和十四烷基苯磺酸钠(分子量 339),在 ESI⁻ 模式下质核比依次为 $m/z = 297.15, 311.17, 325.18$ 和 339.20 。该 4 个峰共同表征 DBS 的质谱行为和含量大小,故在进行样品验证时,以该 4 个峰为监测指标,对 HPLC 检测结果进

行验证。

3.3 “地沟油”的检测需要简便、快速、准确、重现性好。HPLC 为常用检测仪器,做为定量检测方法具有易获得,操作简便,快速、准确等优点,故本研究采用 HPLC 为定量检测方法。LC-IT-TOF 具有分析更快速、分辨率高,灵敏度高优点,但是该仪器的获得受到一定限制,故仅将其用于样品验证。

参考文献

- [1] 徐中海,柳一鸣,刘劭钢,等. 泔水油的 4 项理化指标分析[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(5): 613.
- [2] 全常春,尹平河,赵玲,等. 精炼餐饮业地沟油挥发性危害成分的 GC/MS 静态顶空分析[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 128-134.
- [3] 尹平河,潘剑宇,赵玲,等. 薄层色谱法快速鉴别泔水油和煎炸老油的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(4): 47-49.
- [4] 潘剑宇,尹平河,余汉豪,等. 泔水油、煎炸老油与合格食用植物油的鉴别研究[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 27-29.
- [5] 王耀,尹平河,梁芳慧,等. 紫外可见分光光度法鉴别掺兑泔水油的花生油[J]. 分析实验室, 2006, 25(3): 92-94.
- [6] VLACHOS N, SKOPELITIS Y. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 573: 459-465.
- [7] SIKORSKA E, GORECKI T, IGOR V, et al. Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2005, 89: 217-225.

实验技术与方法

高效液相色谱法测定肉制品中红色 2G 色素

李静娜¹, 肖永华¹, 张怡², 黄常刚¹, 王君³, 凌云⁴, 何振宇¹, 周敦金¹

(1. 武汉市疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430015; 2. 武汉市洪山区疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430070; 3. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 湖北 武汉 430030; 4. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要:目的 建立肉制品中红色 2G 色素的高效液相色谱法 (HPLC), 并用该方法对市售肉制品进行了测定。
方法 样品经沉淀蛋白质, 用乙醇氨水溶液提取色素, 去除脂肪, 聚酰胺粉净化, 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 检测。
结果 HPLC 法测定红色 2G 色素在 1.00 ~ 20.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内有较好的线性关系, $\gamma > 0.999$, 仪器最低检出量为 1 ng, 方法检出限为 0.1 mg/kg, 样品加标平均回收率范围: 79.9% ~ 84.4%, 相对标准偏差: 2.20% ~ 6.45% ($n=6$)。
结论 该方法适用于肉制品中红色 2G 色素分析, 具有较高的选择性和灵敏度, 回收率和重现性良好, 结果准确可靠。

关键词: 红色 2G 色素; 固相萃取; 肉制品; HPLC-PDA; 违法添加物; 食品污染物

中图分类号: R155.5; TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)01-0040-04

收稿日期: 2012-06-20

作者简介: 李静娜 女 副主任技师 研究方向为食品安全 E-mail: lijingna65@163.com

通信作者: 周敦金 男 主任医师 研究方向为公共卫生 E-mail: zdj@whcdc.org

Determination of Red 2G in meat product by high performance liquid chromatography

Li Jingna, Xiao Yonghua, Zhang Yi, Huang Changgang,

Wang Jun, Ling Yun, He Zhenyu, Zhou Dunjin

(Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, China)

Abstract: Objective Establish an analytical method of Red 2G in meat product by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Red 2G in meat product was extracted by ethylate-ammonia solution and purified by polyamide, then analyzed with HPLC-PDA. **Results** The standard curve showed good linearity in the range of 1.00 – 20.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$; the LOD was 0.1 mg/kg ; the average recovery was between 79.9% – 84.4%. The RSD was 2.20% – 6.45% ($n=6$). **Conclusion** This method is suitable for analysis of Red 2G in meat product with high selectivity and sensitivity.

Key words: Pigment red 2G; solid phase extraction; meat product; HPLC; illegal additives; food contaminants

红色 2G (Red 2G, E 128) 又名酸性红 2G、酸性红 1、食品红 10, 为偶氮类着色剂, 溶于水, 微溶于乙醇, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$, 相对分子质量 509。以苯胺和乙酰 H 酸为原料合成的色素, 着色力强, 性质稳定, 不易褪色, 常用在香肠、熟肉制品、含酒精饮料、果酱和奶制品中。但 2007 年欧盟食品委员会对红色 2G 进行了安全性评估, 发现该色素被人体摄入后可能会分解出致癌物苯胺, 借此推断红色 2G 对诱发癌症有很大的可能性, 欧盟委员会立即宣布在欧盟范围内禁止使用该色素^[1]。我国食品安全国家标准《食品添加剂使用标准》(GB 2760—2011) 没有批准使用红色 2G 色素^[2], 也就是禁止使用红色 2G 作为食品添加剂。目前, 关于红色 2G 的检测方法有分光光度计法^[3]、液相色谱法^[4]、液相色谱-质谱联用法^[5]等, 检测的样品主要集中在饮料、糖果等基质比较简单的食品中, 样品前处理较为简单。但对于检测基质复杂的肉制品中红色 2G 的含量, 我国目前尚无标准方法。由于大部分色素在紫外/可见光波长处有强烈的吸收, 所以常使用液相色谱-紫外/可见光检测。本实验采用 HPLC-PDA 测定了肉制品中红色 2G, 有效地解决了肉制品中红色 2G 的高效提取及液相色谱条件的优化两大关键问题, 定性准确, 灵敏度高, 回收率和重现性良好, 结果准确可靠, 可用于肉制品中红色 2G 的日常检测。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

仪器: 高效液相色谱仪 (Waters 600E 型)、二极管阵列检测器 (Waters 2996 型); AL204 电子天平; PT-310 电子天平; 超声波清洗器、高速冷冻离心机。试剂: 除另有说明外, 所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。红色 2G 标准品 (Acid Red 2G, E128, 纯度 60.0%, 德国 Dr.

Ehrenstorfer GmbH 公司), 甲醇 (色谱纯), 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L): 称取 1.54 g 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), 加水至 1L, 溶解, 经 0.45 μm 水系滤膜过滤。海沙 (化学纯), 亚铁氰化钾溶液: 称取 10.6g 亚铁氰化钾 [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] 加水至 100ml。乙酸锌溶液: 称取 22.0g 乙酸锌 [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] 溶于少量水中, 加入 3ml 冰乙酸, 加水稀释至 100ml。乙醇氨溶液 (7 + 2 + 1): 取 700 ml 乙醇加 200 ml 氨水加 100 ml 水混合均匀。石油醚: 沸程 30 ~ 60 $^\circ\text{C}$ 。柠檬酸溶液 (pH = 4): 称取 0.5 g 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 溶入 500 ml 水中, 混匀, 溶液 pH = 4 (pH 试纸测试)。聚酰胺粉 (200 ~ 400 目)。酸性甲醇溶液: 量取 80 ml 甲醇加入 20 ml 柠檬酸溶液混匀。

1.2 样本来源

在广州市全市范围内抽检了超市、集贸市场、餐饮店的肉制品 460 件。

1.3 测定方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱 Eclipse XDB-C₁₈ (5 μm \times 4.6 mm \times 250 mm, 美国 Agilent 公司), 流速 1.0 ml/min, 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 检测波长 530 nm, 进样量 10 μl 。

1.3.2 标准曲线

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 红色 2G 标准溶液 (4 $^\circ\text{C}$, 保存 3 个月); 红色 2G 标准系列: 1.00、2.00、5.00、10.0、15.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4 $^\circ\text{C}$, 保存 7 d)。将标准系列溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 以标准系列溶液浓度为横坐标 (X), 以相应的峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。

1.3.3 样品处理

①提取: 将样品捣碎, 均匀取样, 称取 10 g 样品 (精确至 0.01 g) 置入 50ml 离心管中, 加入 10 g 海砂, 混合均匀, 分别加入 2.5 ml 亚铁氰化钾溶液和乙酸锌溶液 (沉淀蛋白), 加入 25 ml 乙醇氨水溶液

(7 + 2 + 1), 振摇 10 min, 超声 30 min 以提取色素, 4 ℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 将溶液转入 100 ml 烧杯(不要用滤纸过滤), 残渣重复用 25 ml 乙醇氨水溶液提取 3 ~ 4 次, 至溶液无色, 合并溶液于 100 ml 烧杯中, 80 ℃ 水浴蒸发至溶液 10 ml 以下, 加入 20 ml 石油醚, 搅拌, 静置, 弃去醚层, 重复 1 ~ 2 次, 以脱去样品脂肪, 将溶液 80 ℃ 水浴蒸发至 5 ml 以下(不得挥干), 加入 5 ml 水, 加 5 ml 柠檬酸溶液调至酸性为样品提取液。②净化: 将 2 g 聚酰胺粉用水调成糊状(活化), 倒入加热至 80 ℃ 的样品提取液中, 混合均匀(如果吸附色素不完全可适量增加聚酰胺粉), 转移至 G3 垂融漏斗中, 抽干后用 20 ml 80 ℃ 柠檬酸溶液洗涤 3 ~ 4 次, 20 ml 酸性甲醇溶液洗涤 3 ~ 4 次, 80 ℃ 水洗至流出液中性, 20 ml 甲醇洗涤 2 次, 抽干, 用 10 ml 乙醇氨水溶液解吸色素, 重复 3 ~ 4 次至解吸液无色, 收集解吸液, 80 ℃ 水浴蒸发至 2 ml 左右(切勿蒸干)。溶液用柠檬酸溶液调至中性, 用水定容至 10 ml, 3 000 r/min, 离心 10 min, 上清液经 0.45 μm 水系滤膜过滤, 滤液用 HPLC-PDA 测定。

2 结果

2.1 色谱图及光谱图

在 1.3.1 色谱条件下红色 2G 的最大吸收波长为 506 ~ 536 nm、保留时间为 11.8 min, 与共存的其他物质分离良好, 柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红等 9 种合成色素不干扰测定, 其色谱图及光谱图如图 1 ~ 3 所示, 标准溶液和阳性样品以及加标保留时间、最大吸收波长重现性良好。

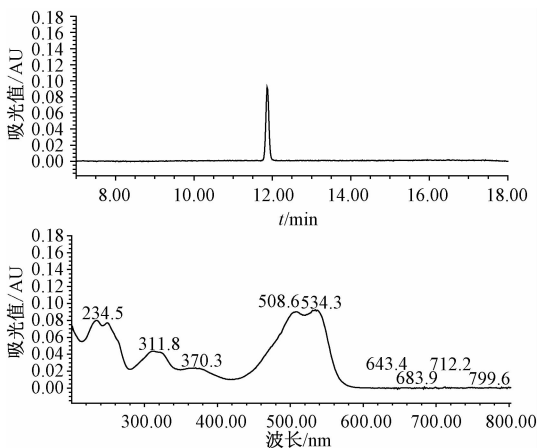


图 1 10.0 μg/ml 红色 2G 标准色谱及光谱图
Figure 1 Chromatogram and spectrogram of 10.0 μg/ml red 2G standard solution

2.2 工作曲线与检测限

回归方程为: $Y = 4.84 \times 10^4 x + 1.23 \times 10^4$, $\gamma =$

0.999, 红色 2G 在 1.00 ~ 20.0 μg/ml 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 将红色 2G 标准溶液逐级稀释至 0.1 μg/ml 进样量为 10 μl 时, 峰高 > 3 倍噪音信号, 即仪器最低检出量为 1 ng, 仪器最低检出浓度为 0.1 μg/ml; 样品取样 10 g 定容至 10 ml, 即该方法红色 2G 的检出限为 0.1 mg/kg。

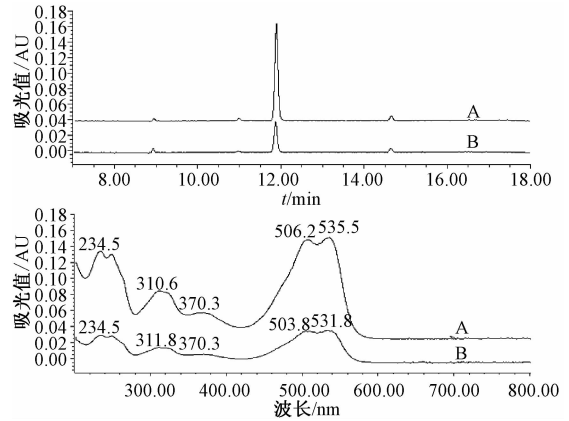


图 2 阳性样品及加标色谱及光谱图
(A 为阳性样品加标 12.0 μg/ml 红色 2G, B 为阳性样品)
Figure 2 Chromatogram and spectrogram of positive sample and its spiked sample (A: positive sample spiked with 12.0 μg/ml Red 2G, B: positive sample)

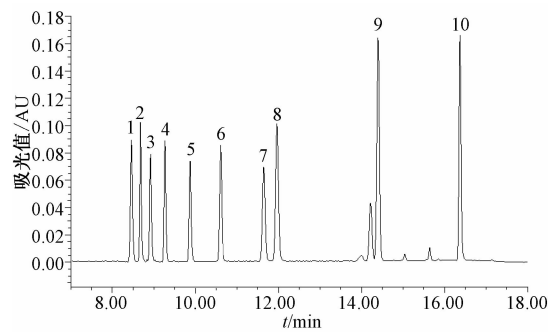


图 3 10.0 μg/ml 10 种合成色素混合标准溶液色谱图
(1 - 柠檬黄, 2 - 新红, 3 - 苋菜红, 4 - 靛蓝, 5 - 胭脂红, 6 - 日落黄, 7 - 诱惑红, 8 - 红色 2G, 9 - 亮蓝, 10 - 赤藓红)

Figure 3 Chromatogram of 10 artificial pigments mixed solution (10.0 μg/mL)

(1 - Tartrazine, 2 - New Red, 3 - Amaranth, 4 - Indigo Carmin, 5 - Carmine, 6 - Sunset Yellow, 7 - Allura Red, 8 - Red2G, 9 - Acid Blue 9, 10 - Erythrosine)

2.3 精密度及加标回收率

有目的的选择了 1 ~ 4 号肉制品样品, 其中 1 号样品无色素, 2 ~ 4 号样品分别含有诱惑红、红色 2G 和胭脂红等红色色素。分别将 1 ~ 4 号样品捣碎, 将 4 种不同标准加入量的红色 2G 标准溶液分别添加于 1 ~ 4 号样品中, 具体添加水平见表 1。每个添加水平及 3 号样品(阳性样品)本底均平行测定 6 次, 1、2、4 号样品本底平行测定 2 次。由表 1 可见, 诱

惑红和胭脂红不干扰测定,平均回收率分别为 79.9%、80.1%、80.2% 和 84.4%,相对标准偏差分别为 6.45%、2.97%、2.68%、2.20% (3 号样品本底为 1.80%)。红色 2G 标准系列平均保留时间为 11.8min,相对标准偏差 0.054% ($n=6$),用红色 2G 标准溶液作外标定量,结果准确可靠,重现性良好。

2.4 肉制品红色 2G 含量的检测结果

按照 1.3 的方法测定了 460 件肉制品中红色 2G,其中 15 件样品检出了红色 2G 色素,其他样品均未检出红色 2G,即 <0.1 mg/kg。检出红色 2G 色素的 15 件样品均为散装灌肠类样品,含量为 0.20 ~ 4.70 mg/kg,10 件来源于超市,5 件来源于集贸市场,检测的 460 件肉制品中灌肠类样品有 89 件。

表 1 肉制品红色 2G 测定结果和加标回收率 ($n=6$)

Table 1 Results and recoveries of Red 2G in meat products ($n=6$)

编号	标准加入量 (mg/kg)	样品本底值 (mg/kg)	平均测定值 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	2.00	0.00	1.60	79.9	6.45
2	5.00	0.00	4.01	80.1	2.97
3	12.0	5.21	14.8	80.2	2.68
4	20.0	0.00	16.9	84.4	2.20

3 讨论

3.1 样品处理条件的选择

在样品处理提取色素时,加入海砂能够提高色素的提取效率。由于肉制品含有较多的蛋白质和脂肪,选择分别加入 2.5 ml 亚铁氰化钾溶液和乙酸锌溶液以沉淀蛋白质,再用乙醇氨水溶液反复提取,可以将沉淀物中的色素提取出来,合并提取液;用石油醚去除提取液中的脂肪,弃去醚层,样品制备液澄清透明。如果沉淀蛋白和去脂肪同时进行,则水相和有机相之间分层不好,影响提取效率。如果不沉淀蛋白质,有些样品提取液则比较浑浊,用聚酰胺粉净化时 G3 垂融漏斗也易堵塞。提取色素时一般不选择用滤纸过滤,因为滤纸吸附色素,会造成损失,采用高速冷冻离心后上清液直接转移的办法较好。样品处理后的溶液要控制在 20ml 以下比较好,否则回收率下降。样品净化时,一定要将聚酰胺粉预先用水润湿调成糊状(活化聚酰胺粉),否则吸附色素效率下降。由于肉制品基质较复杂,采用聚酰胺粉固相萃取小柱净化时,有些样品提取液容易堵塞小柱,使实验无法进行,因此选择用 G3 垂融漏斗可以解决堵塞问题。色素经提取净化后,洗脱液用水浴锅挥发时,将洗脱液完全挥发干和将洗脱液挥发至 2ml 左右定容,前者定容后色素溶解不完全,严重影响回收率,而后者确保了良好的回收率且制备液澄清。

3.2 色谱条件的选择

经反复实验验证,流动相种类选择甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵,采用梯度洗脱(见表 2),红色 2G 与肉制品中其他共存物质均可良好分离,浓度分别为 0 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 的柠檬黄、新红、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、赤藓红等 9 种合成色素不干扰测定,红色 2G 峰形对称,具有较高的灵敏度,定量准确,红色 2G 的最大吸收波长为 506 ~ 536 nm,选择波长为 530 nm,采用 Eclipse XDB-C₁₈ (5 μm \times 4.6mm \times 250 mm) 色谱柱,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 ml/min,25 min 内可完成检测(见图 3)。

表 2 流动相(梯度)

Table 2 mobile phase (gradient)

时间 (min)	0.02mol/L 乙酸铵 (%)	甲醇 (%)
—	95	5
3.0	65	35
8.0	50	50
11.0	0	100
14.0	0	100
14.1	95	5
25.0	95	5

3.3 检测器的选择

采用 HPLC-PDA 紫外—可见检测器对组分进行光谱扫描,可提高定性准确率,比普通单一紫外—可见检测器靠保留时间定性具有更强的优越性,通过保留时间及 PDA 定性,可避免假阳性发生。肉制品中红色 2G 色素的测定没有国标方法,本文采用 HPLC-PDA 方法测定肉制品中红色 2G 色素,该方法具有较高的选择性和灵敏度,回收率和重现性良好。采用本方法检测市售肉制品共 460 件,其中阳性检出率 3.26%,检出率较高且结果准确可靠,可作为市场肉制品监督监测的重要手段。

参考文献

- [1] European Food Safety Authority [EB/OL]. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on the food colour Red 2G (E128) based on a request from the Commission related to the re-evaluation of all permitted food additives.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂使用卫生标准. GB 2760—2011 [S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [3] ZALACAIN A, ORDOUDI S A, BLAZQUEZ, et al. Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin [J]. Food Addit Contam, 2005, 22: 607-615.
- [4] MINIOTI K S, SAKALLARIOU C F, THOMAIDIS N S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 583: 103-110.
- [5] FENG F, ZHAO Y S, YONG W, et al. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879: 1813-1818.