

- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准管理历委员会. GB/T 19650—2006 动物肌肉中 478 种农药及相关化学品残留量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [11] 中华人民共和国农业部. NY/T 761—2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] 董静, 潘玉香, 朱莉萍, 等. 果蔬中 54 种农药残留的 QuEChERS / GC-MS 快速分析[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 66-69.
- [13] 卢大胜, 熊丽蓓, 温忆敏, 等. QuEChERS 前处理方法联合 GPC-GC/MS 在测定蔬菜水果中农药残留中的应用[J]. 质谱学报, 2011, 32(4): 229-235.
- [14] 黄诚, 郭梅. 正交试验法优选黄瓜中拟除虫菊酯类农残检测的净化剂组合[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 438-440.

实验技术与方法

同时测定肉制品中酸性橙 II 等 11 种合成色素的方法研究

李静娜¹, 贺栋梁², 梁高道¹, 何振宇¹, 黄常刚¹, 陈曦¹, 周敦金¹

(1. 武汉市疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430015; 2. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 构建同步测定肉制品中柠檬黄、新红、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红、红色 2G、亮蓝、酸性红、赤藓红、酸性橙 II 等 11 种合成色素的高效液相色谱法(HPLC), 对市售肉制品中色素进行监测。方法 采用固相萃取技术, 用乙醇氨水水溶液提取样品中色素并经 WAX 小柱(150 mg, 30 μm)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 11 种色素在 1.00 ~ 20.0 μg/ml 范围内有较好的线性关系, r 均 > 0.999, 方法检出限为 0.02 ~ 0.06 mg/kg, 样品加标平均回收率为 81.1% ~ 100.8%, RSD 为 1.3% ~ 4.9% ($n=6$)。用本方法监测 259 份市售肉制品, 不同色素的检出率为 0% ~ 22.0%。结论 方法具有较高的选择性和灵敏度, 回收率和重现性良好, 适用于肉制品中 11 种色素分析, 具有推广应用价值。

关键词: 高效液相色谱; 合成色素; 固相萃取; 肉制品; 违法添加; 食品安全

中图分类号: R155; R155.55; TS202.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)04-0372-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.017

The method of simultaneous determination of 11 synthetic pigments including acid orange II in meat products

LI Jing-na, HE Dong-liang, LIANG Gao-dao, HE Zhen-yu, HUANG Chang-gang, CHEN Xi, ZHOU Dun-jin
(Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Hubei Wuhan 430015, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method of simultaneous detection of 11 kinds of artificial pigments including Tartrazine, New red, Amaranth, Carmine, Sunset yellow, Allura Red, Red 2G, Acid blue 9, Azorubine, Erythrosine and Acid orange II, et. al. **Methods** The target compounds in food samples were extracted by ethanol ammonia and purified by WAX cardge. The extracts were determined by a high performance liquid chromatography-diode array detector. **Results** The results showed that there were good linear relativities ($r > 0.999$) between artificial pigments and absorbance in the content ranging from 1.00 to 20.0 μg/ml. The limit of detection, recovery rate and standard deviation were 0.02-0.06 mg/kg, 81.1%-100.8% and 1.3% -4.9%, respectively ($n=6$). The detection rate of various pigments in 259 food samples ranged from 0% -22.0%. **Conclusion** The method was selective, sensitive and repeatable, and compatible for simultaneous detection of 11 kinds of artificial pigments.

Key words: High performance liquid chromatography; synthetic pigment; solid phase extraction; processed meat product; adulterant; food safety

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 武汉市卫生局资助课题(WG11B02)

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

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

合成色素通常是以苯、甲苯、萘等化工产品为原料,经过一系列有机反应合成的着色剂^[1],其因价格低廉,染色性能好及用量少而被广泛应用。我国现行 GB 2760—2011《食品添加剂使用卫生标准》^[2]规定,柠檬黄、新红、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝、酸性红等色素不允许添加于肉制品中,诱惑红、赤藓红只允许限量添加于西式火腿、灌肠类等肉制品中。红色2G和酸性橙Ⅱ非食品添加剂,不得在食品中使用。有监测报道^[3-4],已批准作为食品添加剂使用的食用色素在肉制品中超范围使用,酸性橙Ⅱ和红色2G等对人体有害的非食品添加剂违法添加于肉制品中^[5-6],因此构建同步检测肉制品中多种合成色素的方法,对于提高检测效率、有效实现食品安全监管具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

在武汉市随机抽检了超市、集贸市场、专卖店及餐饮店的肉制品259件(其中超市63件、集贸市场126件、专卖店51件、餐饮店19件)。

1.1.2 主要仪器与试剂

Waters e2695型高效液相色谱仪、Waters 2998型二极管阵列检测器、WAX 6CC固相萃取小柱(150 mg, 30 μm), BP211D、PT-310电子天平,超声波清洗器、高速冷冻离心机、氮吹仪、固相萃取装置。

标准品:柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝(浓度均为0.500 mg/ml,中国计量科学研究院),新红、诱惑红、红色2G、酸性红、赤藓红、酸性橙Ⅱ(纯度分别为92.0%、83.0%、60.0%、99.0%、91.7%、87.0%,德国Dr. Ehrenstorfer GmbH)。

1.00 mg/ml新红、诱惑红、红色2G、酸性红、赤藓红、酸性橙Ⅱ各标准储备溶液:分别准确称取新红、诱惑红、红色2G、酸性红、赤藓红、酸性橙Ⅱ标准品10.87、12.05、16.67、10.10、10.91、11.49 mg,分别置于6个10 ml容量瓶中用水定容至刻度,其中赤藓红和酸性橙Ⅱ在称取固体标准溶解时需要加入少量甲醇溶解后再加水定容(4℃避光,保存期6个月)。

50.0 μg/ml 11种色素混合标准溶液:分别准确吸取5.00 ml浓度均为0.500 mg/ml的柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝各标准溶液及2.50 ml浓度均为1.00 mg/ml的新红、诱惑红、红色2G、酸性红、赤藓红、酸性橙Ⅱ各标准溶液置于50 ml容量瓶中用水定容至刻度(4℃避光,保存期2个月)。

甲醇、乙腈(色谱纯),乙酸铵、石油醚:沸程

30~60℃、乙醇、氨水(28%~30%)、乙醇氨水水溶液(7:2:1, V/V)、冰乙酸、海沙(化学纯)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。

乙酸铵溶液(0.02 mol/L):称取1.54 g乙酸铵,加水至1 L,溶解,经0.45 μm水系滤膜过滤;乙醇氨水水溶液(7:2:1, V/V):取700 ml乙醇、200 ml氨水、100 ml水混合均匀;乙酸溶液(1:9, V/V):取100 ml冰乙酸、900 ml水混合均匀。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

提取:称取2 g样品(精确至0.01 g),捣碎后置50 ml离心管中,与2.0 g海砂混合均匀后,加入10 ml石油醚,振摇并超声10 min(注意放气),4℃,10 000 r/min离心10 min后弃去醚层,必要时重复上述过程以保证脱去样品脂肪完全。40℃下氮吹挥去多余石油醚后,加入15 ml乙醇氨水水溶液并振摇10 min,超声30 min以提取色素,10 000 r/min离心10 min后将溶液转入100 ml烧杯,残渣重复提取2次。分次收集的提取液合并后于80℃水浴蒸发至总体积10 ml,用乙酸溶液调至弱酸性(pH=5~6),加入5 ml乙腈、5 ml水为试样溶液。

净化:将试样溶液转移至经5 ml甲醇、5 ml水活化的WAX 6CC固相萃取小柱,依次用乙腈、甲醇和水洗涤2次(5 ml/次),抽滤至近干后,用12 ml乙醇氨水水溶液洗脱,全部过程流速低于1 ml/min。洗脱液于40℃下氮气吹至0.5~1 ml,用乙酸溶液调至中性,加入200 μl甲醇并用水定容至5 ml,经0.45 μm聚四氟乙烯(PTFE)有机滤膜过滤后进行高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-PDA)测定。

1.2.2 标准溶液系列

11种色素混合标准溶液系列:吸取200、400、1 000、2 000、3 000、4 000 μl的50.0 μg/ml 11种色素混合标准溶液分别置于10 ml容量瓶中,用水定容至刻度,为1.00、2.00、5.00、10.0、15.0、20.0 μg/ml标准溶液系列(4℃避光,保存期1周)。

1.2.3 色谱条件

Symmetry-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相梯度洗脱,洗脱程序见表1,流速1.0 ml/min,柱温35℃,检测波长400~800 nm,进样量10 μl。

2 结果与分析

2.1 色谱图

在1.2.3色谱条件下柠檬黄、新红、苋菜红、胭

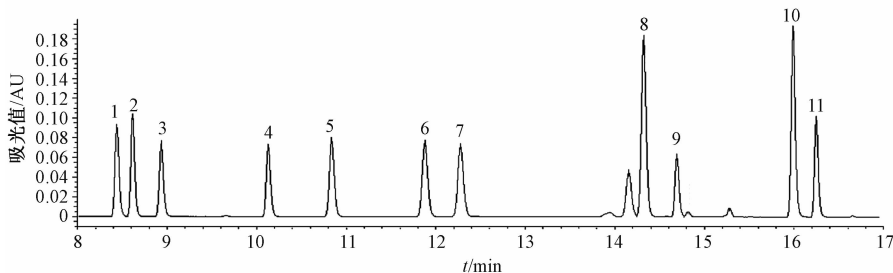
表1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient mobile phase

时间/min	0.02 mol/L 乙酸铵/%	甲醇/%
0.0	92.0	8.0
4.0	92.0	8.0
7.0	65.0	35.0
11.0	50.0	50.0
14.0	5.0	95.0
17.0	5.0	95.0
17.1	92.0	8.0
29.0	92.0	8.0

脂红、日落黄、诱惑红、红色 2G、亮蓝、酸性红、赤藓红、酸性橙 II 的色谱峰全部基线分离,标准溶液、阳性样品、加标样的色谱保留时间和最大吸收波长重现性良好,色谱图见图 1、2,光谱图见图 3,保留时间和最大吸收波长见表 2。

2.2 标准曲线与检出限

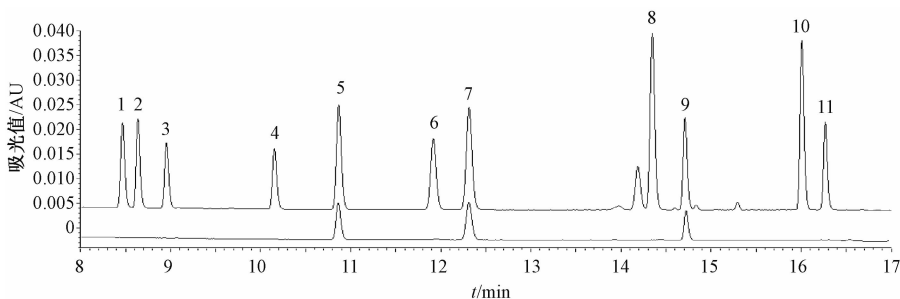
11 种色素标准曲线 r 均 > 0.999 , 在 $1.00 \sim 20.0 \mu\text{g/ml}$ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。以信噪比 $S/N = 3$ 计算检出限(样品取样 2 g 定容至 5 ml 计),回归方程、相关系数和方法检出限见表 2。



注:1. 柠檬黄、2. 新红、3. 苋菜红、4. 胭脂红、5. 日落黄、6. 诱惑红、7. 红色 2G、8. 亮蓝、9. 酸性红、10. 赤藓红、11. 酸性橙 II

图1 11种色素混标溶液色谱图(10.0 $\mu\text{g/ml}$)

Figure 1 Chromatogram of standards solution including 11 artificial pigments



注:1. 柠檬黄、2. 新红、3. 苋菜红、4. 胭脂红、5. 日落黄、6. 诱惑红、7. 红色 2G、8. 亮蓝、9. 酸性红、10. 赤藓红、11. 酸性橙 II

图2 阳性样品及加标色谱图(11种色素均加入 5.00 mg/kg)

Figure 2 Chromatogram of positive sample and its spiked sample

表2 11种色素保留时间、最大吸收波长、回归方程和方法检出限

Table 2 Retention time, wavelength of maximum absorption, regression equation and method detection limits of 11 selected pigments

合成色素	保留时间/min	最大吸收波长/nm	回归方程	r	方法检出限/(mg/kg)
柠檬黄	8.4	426	$y = 2.97 \times 10^4 x + 1.13 \times 10^3$	0.999 8	0.04
新红	8.6	507	$y = 3.13 \times 10^4 x + 1.91 \times 10^3$	0.999 8	0.04
苋菜红	8.9	522	$y = 2.42 \times 10^4 x + 1.02 \times 10^3$	0.999 9	0.05
胭脂红	10.1	510	$y = 2.42 \times 10^4 x + 1.35 \times 10^3$	0.999 8	0.05
日落黄	10.8	483	$y = 3.00 \times 10^4 x + 1.60 \times 10^3$	0.999 8	0.05
诱惑红	11.9	508	$y = 3.29 \times 10^4 x + 1.89 \times 10^3$	0.999 8	0.05
红色 2G	12.3	534	$y = 3.31 \times 10^4 x + 1.19 \times 10^3$	0.999 8	0.05
亮蓝	14.3	629	$y = 6.89 \times 10^4 x + 3.71 \times 10^3$	0.999 8	0.02
酸性红	14.7	519	$y = 1.98 \times 10^4 x + 9.61 \times 10^2$	0.999 9	0.06
赤藓红	16.0	530	$y = 6.20 \times 10^4 x + 3.29 \times 10^3$	0.999 8	0.02
酸性橙 II	16.2	486	$y = 2.99 \times 10^4 x + 1.36 \times 10^3$	0.999 8	0.03

2.3 精密度及加标回收率

对 11 种色素标准溶液中 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 浓度点连续测定 6 次, $RSD_{\text{平均保留时间}} < 0.1\%$, $RSD_{\text{峰面积}} <$

0.5% , 仪器重现性良好。选择含有色素的肉制品样品,经粉碎后称取 12 份(2.00 g/份)平行样,其中 6 份为本底,6 份分别加入 $200 \mu\text{l}$ $50.0 \mu\text{g/ml}$ 的 11 种

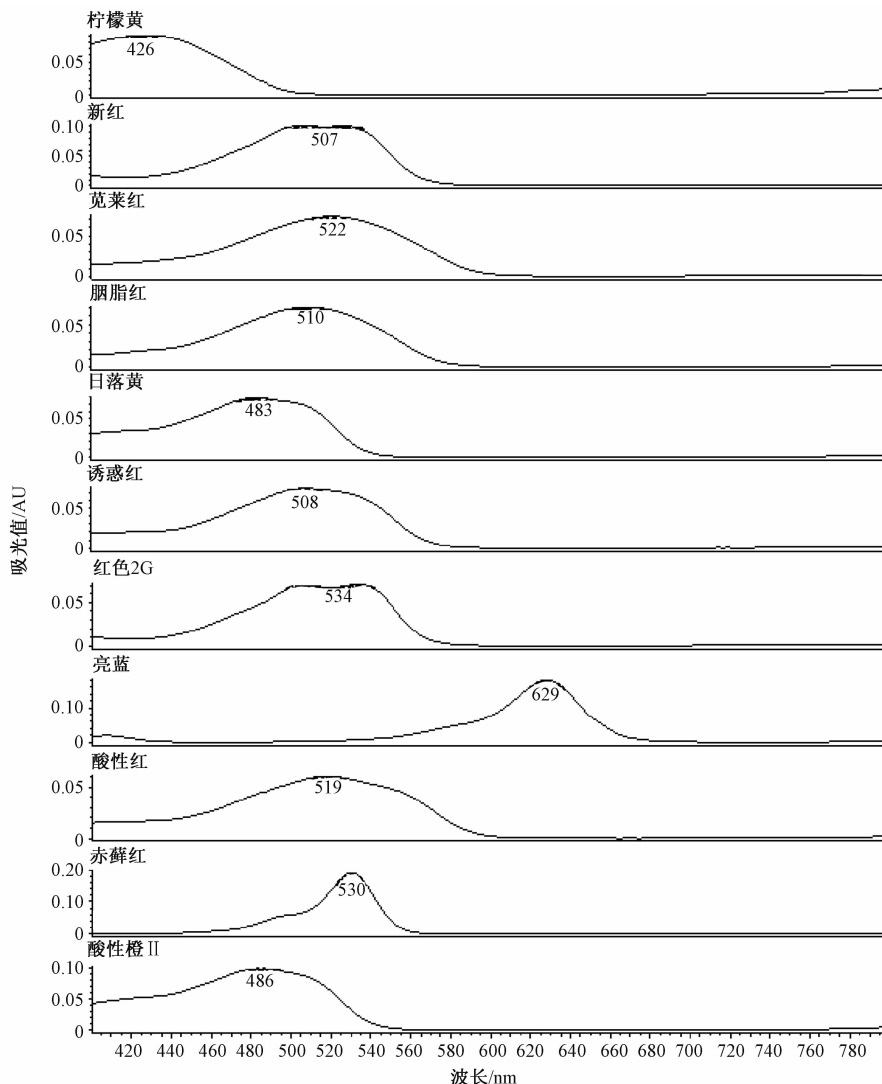
图3 11种色素混合标准溶液光谱图(10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Figure 3 Spectrograms of 11 pigments mixed standard solution

色素混标溶液为加标回收,加标量为 5.00 mg/kg,用 1.2 方法测定,准确度、精密度结果见表 3。用 11 种色素混合标准溶液作外标定量,该方法回收率和重现性良好,结果准确可靠。

表3 肉制品 11 种色素测定结果、加标回收率及精密度 ($n=6$)

Table 3 Detection, recovery rates and accuracies of 11 pigments in processed meat products

合成色素	样品本底值 /(mg/kg)	样品加标 测定值 /(mg/kg)	平均回 收率 /%	RSD /%
柠檬黄	ND	4.49	89.9	1.4
新红	ND	4.14	82.8	1.3
苋菜红	ND	4.23	84.6	1.3
胭脂红	ND	4.47	89.4	3.1
日落黄	2.12	6.67	90.9	2.1
诱惑红	ND	4.58	91.5	1.5
红色 2G	2.46	7.06	92.2	2.1
亮蓝	ND	4.58	91.6	1.3
酸性红	2.50	7.54	100.8	2.9
赤藓红	ND	4.06	81.1	4.9
酸性橙 II	ND	4.31	86.2	1.6

注:ND 为未检出

2.4 样品处理条件的选择

在样品处理提取色素时,加入海砂可有效防止样品粘结成团,增加样品的分散性,能够提高色素的提取效率。当提取液挥发至 10 ml 时有些样品溶液会有不溶物产生,加入乙腈可溶解,并且对目标物净化无影响。

经试验验证,样品前处理使用 WAX 固相萃取小柱比使用聚酰胺粉节约试剂和时间,赤藓红需要 12 ml 洗脱液才能保证较高的回收率。洗脱液浓缩后会使得赤藓红和酸性橙 II 等色素的溶解度降低,需要加入少量甲醇溶解,否则会使结果偏低。醋酸纤维滤膜和尼龙滤膜均可吸附部分色素,去除样品制备液中的颗粒物可选用 0.45 μm PTFE 滤膜过滤或经 10 000 r/min 离心 10 min。

2.5 色谱条件的选择

流动相种类选择甲醇和 0.02 mol/L 乙酸铵溶液,采用梯度洗脱(见表 1),11 种色素均基线分离,采

用 Symmetry-C₁₈ 色谱柱,柱温 35 ℃,流速 1.0 ml/min, 30 min 内可完成检测(见图 1)。Symmetry-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)与 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)比较,前者具有更低的检出限。

2.6 检测器及波长的选择

现行的国家标准方法采用单一紫外 254 nm 波长,紫外区背景吸收值高,干扰大,难以满足定性和定量的要求。本方法采用二极管阵列检测器,定性具有更强的优越性,可避免假阳性发生。同时采用 400~800 nm 波长进行扫描,所有色素在此波长范围内均有特征吸收峰,此波段处于可见区,背景吸收低干扰少,采用各自特征吸收波长进行定量灵敏度更高。

2.7 方法应用

按照 1.2 方法,2013 年测定了 259 件肉制品(其中猪肉制品 165 件、牛肉制品 46 件、家禽制品 44 件、混合肉制品 4 件)中 11 种色素,效果良好,结果见表 4。从图 2 可见,样品经本方法处理后,色谱图基线平滑,且没有明显干扰峰。

表 4 259 件肉制品 11 种色素检测结果

Table 4 Detection of 11 artificial pigments in 259 pieces of processed meat products

合成色素	检出数/份				含量范围 /(mg/kg)	检出率 /%
	猪肉	牛肉	家禽	混合肉		
柠檬黄	0	0	5	0	0.47~6.68	1.93
新红	0	0	0	0	ND	0.00
苋菜红	1	0	0	0	1.39	0.39
胭脂红	23	0	3	1	0.57~26.0	10.40
日落黄	41	3	12	1	0.31~144	22.00
诱惑红	24	0	0	0	1.30~35.0	9.27
红色 2G	14	0	0	0	0.12~4.44	5.41
亮蓝	0	0	0	0	ND	0.00
酸性红	15	0	0	0	0.77~7.98	5.79
赤藓红	0	0	0	0	ND	0.00
酸性橙 II	0	0	0	0	ND	0.00

注:ND 为未检出

3 小结

近年来,尽管类似的同步检测方法学研究也偶

见报道^[1,7-9],但多以基质相对简单的饮料类食品为检测对象,其是否适用于基质更为复杂、干扰物质更多且普遍食用的肉制品有待探讨。目前,我国尚未颁布同时检测肉制品中 11 种色素的国标方法,本方法以基质复杂的肉制品为检测对象,构建了同时测定肉制品中 11 种合成色素的 HPLC-PDA 分析方法,与 GB/T 5009.35—2003《食品中合成着色剂的测定》^[10]方法相比,增加了诱惑红、红色 2G、酸性红和酸性橙 II 等检测项目,且方法仍然具有较高的选择性和灵敏度,回收率和重现性良好,能够提高工作效率,可应用于肉制品色素检测。

参考文献

- [1] 李小平,赵永纲,陈晓,等.固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄酒中 7 种合成色素[J].中国卫生检验杂志,2013,23(12):2566-2569.
- [2] 中华人民共和国卫生部.GB 2760—2011 食品添加剂使用卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [3] 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].医学动物防制,2009,25(8):592-593.
- [4] 陈志敏,贾恩厚,林亮.包头市市售熟肉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.
- [5] 封卫娟.对一起生产经营含非食用物质酸性橙 II 食品案的思考[J].中国卫生监督杂志,2012,19(6):573-576.
- [6] 李静娜,贺栋梁,吴晓旻,等.武汉市市售灌肠类肉制品中红色 2G 色素非法使用现状及分析[J].中国食品卫生杂志,2013,25(4):348-350.
- [7] 奚星林,邵仕萍,徐娟,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中 12 种合成色素[J].中国食品卫生杂志,2012,24(3):217-221.
- [8] 宋宁宁.食品中合成色素的安全性及其检测方法研究现状[J].食品与药品,2013,15(6):440-442.
- [9] 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]. Journal of Chromatography, 2011(879):1813-1818.
- [10] 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].北京:中国标准出版社,2004.