

实验技术与方法

固相萃取-高效液相色谱法测定肉制品中合成着色剂的含量

陈彦凤,肖白曼,孙艳芳,丁笑莉,付宇,刘秀梅

(黑龙江省疾病预防控制中心,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:目的 建立测定肉制品中合成着色剂苋菜红、胭脂红和诱惑红含量的固相萃取-高效液相色谱法。方法 以氨水-90%乙醇(1+99,V/V)溶液为提取液,超声提取肉制品样品中的着色剂,经PLS固相萃取柱净化,色谱柱为Dikma Spursil C18(4.6 mm×150 mm,5 μm)。以乙腈-0.05 mol/L乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱色谱分离,流速1.0 ml/min,柱温30℃,进样量10 μl,检测波长200~700 nm。结果 在0.5~25.0 μg/ml,苋菜红、胭脂红和诱惑红的峰面积与其相应浓度呈良好相关性,相关系数 r 分别为0.999 6、0.999 7和0.999 3,方法加标回收率为94.2%~99.1%。结论 本方法准确度高,具有良好的重现性和精密度,能快速对肉制品中3种合成着色剂进行定量检测,满足国家限量标准的要求。

关键词:固相萃取;高效液相色谱;着色剂;肉制品;食品添加剂;食品安全

中图分类号:R155.5;TS202.3;O657.7 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0428-03

Determination of synthetic colorants in meat products by SPE-HPLC

CHEN Yan-feng, XIAO Bai-man, SUN Yan-fang, DING Xiao-li, FU Yu, LIU Xiu-mei

(Heilongjiang Center for Disease Control and Prevention, Heilongjiang Harbin 150030, China)

Abstract: Objective To develop a method for the determination of three kinds of synthetic colorants in meat products by solid phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** After extraction using ammonia-90% ethanol (1/99, V/V) solution, the extract of meat products was purified on PLS SPE column. The eluent was analyzed by HPLC with photo-diode array detector (PDA). The HPLC separation was performed on a Dikma Spursil C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) column and gradient eluted with acetonitrile-0.05 mol/L ammonium acetate solution, the flow rate was 1.0 ml/min, the injection volume was 10 μl, the detection wavelength were 200-700 nm, the column temperature was 30℃. **Results** The linear concentration range of Amaranth, Carmine and Allura Red was 0.5-25.0 μg/ml, and the correlation coefficients were 0.999 6, 0.999 7 and 0.999 3, respectively. The average recovery of spiked sample was in the range of 94.2% - 99.1%. **Conclusion** The method was sensitive and accurate with a good reproducibility and suitable for determination of synthetic colorants in meat products.

Key words: SPE; HPLC; synthetic colorant; meat product; food additive; food safety

随着食品工业的快速发展,食品添加剂得到广泛应用的同时,也带来了诸多食品安全问题,严重威胁到消费者的健康。按照国家标准要求,每种食品添加剂都有适用的范围,不得超剂量、超范围使用。合成食品色素常以苯、甲苯、萘等化工原料经过有机反应制备,具有一定的毒性。长期低剂量摄入合成色素的食品,可产生致癌、致畸^[1]等慢性毒性,影响儿童的生理和智力发育^[2]。苋菜红、胭脂红、诱惑红是3种人工合成偶氮类着色剂,GB 2760—2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[3]规定苋菜红、胭脂红禁用于肉制品,诱惑红限用于西式火腿类、肉灌肠类和可食用动物肠衣类食品。目前高效液相色谱法是人

工合成着色剂的主要检测手段之一^[4-6],尤其与质谱联用检测灵敏度进一步提高^[7-8],但目前在基层检测机构推广使用受限。因此本文针对肉制品高脂肪、高蛋白的特点,采用固相萃取-高效液相色谱法梯度洗脱色谱分离,同时检测苋菜红、胭脂红、诱惑红3种合成着色剂。该方法定性准确,灵敏度高,回收率和重现性良好,适用于基层检验机构批量检测熟肉制品中人工合成着色剂。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2695型高效液相色谱仪、Waters 2996型二极管阵列检测器、ProElut PLS固相萃取柱500 mg/6 ml、旋转蒸发仪、电子天平、超声振荡清洗仪。

苋菜红标准品[GWB(E)100002a,0.5 mg/ml]、

收稿日期:2013-05-13

作者简介:陈彦凤 女 副主任医师 研究方向为卫生检验与食品安全

E-mail:chenyanfengmbl@sina.com

胭脂红标准品 [GWB(E) 100004a, 0.5 mg/ml] (均购自中国计量科学研究院); 诱惑红标准品 (BCBC4108V, 38213, 纯度 $\geq 98\%$, 购自 Fluka 公司); 乙醇(色谱纯), 乙腈(HPLC 级)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱 Dikma Spursil C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.05 mol/L 乙酸铵溶液; 梯度洗脱, 0 ~ 16 min: A 5% \rightarrow 25%, 16 ~ 17 min: A 25% \rightarrow 5%, 17 ~ 20 min: A 5%, 流速 1.0 ml/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μl ; 检测波长 200 ~ 700 nm。

1.2.2 标准系列溶液

称取适量诱惑红标准对照品用超纯水溶解配制成 0.5 mg/ml 的标准储备液, 再与苋菜红、胭脂红的标准对照溶液稀释配制成浓度为 1.0、2.5、5.0、12.5 和 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 混合标准系列溶液, 进样 10 μl 进行检测, 根据标准系列浓度与相应峰面积计算标准曲线方程。

1.2.3 样品的测定

取 2.0 g 样品置于 50 ml 离心管中, 加入 20 ml 氨水-90% 乙醇(1 + 99, V/V) 溶液, 混匀, 超声提取 10 min, 6 000 r/min 离心 3 min, 收集上清液。再加入 10 ml 氨水-乙醇提取液, 提取 2 次, 合并上清液。将上清液旋转蒸发至约 2 ml, 加入 80 μl 甲酸, 混匀, 加入已用 5 ml 甲醇、5 ml 水活化的 PLS 固相萃取柱, 先加 4 ml 水洗, 弃流出液, 将 PLS 柱彻底抽干, 加入 6 ml 2% 氨水-甲醇溶液洗脱并收集流出液, 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至近干, 用水定容至 1.0 ml, 过 0.45 μm 滤膜, 进样 10 μl 进行检测, 将所测峰面积带入标准曲线方程, 并计算样品中着色剂的总含量。

2 结果与分析

2.1 流动相的确定

流动相组分直接影响色素的分离效果。分别以 0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的乙酸铵溶液为流动相 B, 按照上述梯度洗脱条件对苋菜红、胭脂红和诱惑红标准溶液进行检测, 比较不同浓度流动相 B 对着色剂混标的分离情况。结果显示 0.05 mol/L 乙酸铵溶液对 3 种着色剂的分离效果最好(见图 1)。

2.2 定性分析

利用色谱保留时间及光谱图进行定性分析。

2.2.1 保留时间的确定

按照上述检测条件, 分别向高效液相色谱仪中进单一标准品溶液 10 μl , 测定单一标准品的出峰时间作为该标准品的保留时间。再将 3 种着色剂的混

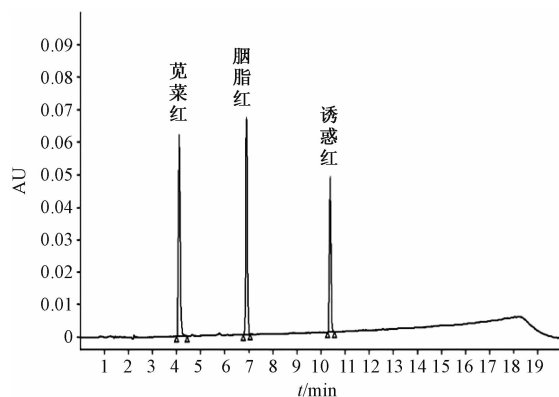


图 1 苋菜红、胭脂红、诱惑红的标准色谱图($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Figure 1 Standard chromatogram of amaranth, carmine and allura red

合标准品进样 10 μl , 色谱图(图 1)显示 3 种着色剂峰形良好, 分离完全, 利用色谱保留时间规律实现了对 3 种着色剂的定性检测。

2.2.2 光谱图和最大吸收波长的确定

鉴于肉制品中成分复杂, 杂峰较多, 仅通过保留时间对样品进行定性分析, 容易出现假阳性结果。对单一着色剂标准品溶液的 200 ~ 700 nm 的全波长扫描光谱图进行分析, 选择特异性吸收最大的波长作为分析波长, 苋菜红 511 nm, 胭脂红 510 nm, 诱惑红 521 nm, 并记录其对应的光谱特征吸收曲线。

2.3 线性范围

对不同浓度的着色剂混合标准品进行测定, 记录色谱图。分别以 3 种着色剂峰面积(y)对其相应浓度(x)进行线性回归计算, 获得 3 种着色剂的标准曲线回归方程(见表 1)。

表 1 线性范围实验结果

Table 1 The results of linearity

着色剂	线性方程	相关系数 r	线性范围 / ($\mu\text{g/ml}$)
苋菜红	$y = 27911x + 1805$	0.999 6	0.5 ~ 25.0
胭脂红	$y = 26289x + 4106$	0.999 7	0.5 ~ 25.0
诱惑红	$y = 18332x + 3097$	0.999 3	0.5 ~ 25.0

2.4 精密度试验

分别选取不同浓度的标准品进行重现性试验(见表 2), 选取浓度分别为 1.0、5.0 和 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的混合着色剂标准品平行测定 6 份, RSD 为 2.4% ~ 5.8%, 该方法精密度高, 重现性好, 试验结果可信。

表 2 精密度试验结果($n = 6, RSD, \%$)

Table 2 The results of precision test

着色剂	浓度 / ($\mu\text{g/ml}$)		
	1.0	5.0	10.0
苋菜红	2.8	3.3	3.7
胭脂红	3.6	2.5	3.9
诱惑红	2.4	4.7	5.8

2.5 准确度试验

精密称取不含合成着色剂的酱肉制品和肉灌肠制品 2.000 g, 加入 3 种着色剂检出限 2 倍和 4 倍的标准品溶液于均匀样品中, 混匀后 5 min 按上述检测条件处理样品并进样平行测定 3 次, 计算回收率, 结果见表 3。

表 3 回收率试验结果 ($n=3$)

Table 3 Results of recovery tests

着色剂	加标量/ μg	测定量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
苋菜红	1.000 0	0.981 2 ± 0.033 5	98.1	97.6	0.64
	1.000 0	0.972 3 ± 0.057 3	97.2		
	2.000 0	1.975 4 ± 0.063 5	98.8	99.1	0.42
	2.000 0	1.989 1 ± 0.084 2	99.4		
胭脂红	1.000 0	0.997 2 ± 0.025 7	99.7	97.8	2.76
	1.000 0	0.958 5 ± 0.046 6	95.8		
	2.000 0	1.952 9 ± 0.064 1	98.0	97.6	0.57
	2.000 0	1.932 4 ± 0.059 7	97.2		
诱惑红	0.980 0	0.933 4 ± 0.043 3	95.3	96.2	1.27
	0.980 0	0.951 2 ± 0.049 9	97.1		
	1.960 0	1.865 9 ± 0.093 2	95.4	94.2	1.70
	1.960 0	1.822 2 ± 0.054 4	93.0		

2.6 方法应用

应用本方法对 50 份市售肉制品中苋菜红、胭脂红和诱惑红的含量进行了检测。其中 1 份肉灌肠制品 (见图 2) 中诱惑红含量为 0.523 mg/kg, 其余肉制品中 3 种着色剂的检测结果均未检出, 即检测值均小于本方法的检出限 0.25 mg/kg。

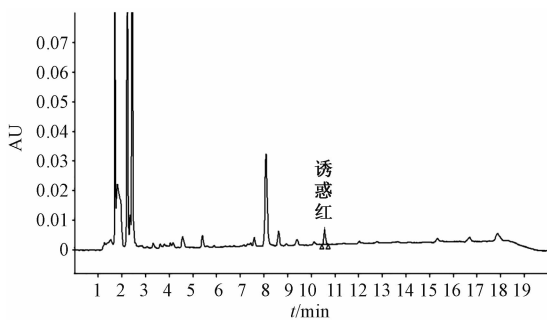


图 2 某肉灌肠制品样品色谱图

Figure 2 Chromatogram of meat enema sample

3 小结

本方法选择固相萃取-液相色谱法对肉制品中苋菜红、胭脂红和诱惑红 3 种人工合成着色剂进行检测, 检出限均为 0.25 mg/kg, 灵敏度高, 精密度和准确度良好, 能够满足肉制品中诱惑红常规检测的需要。在该方法中, 固相萃取柱的应用减少了由于基质复杂而对检测结果带来的影响及对色谱柱的污染。同时, 针对油脂含量高的样品可先通过石油醚、乙醚脱脂, 减少高脂堵塞固相萃取柱, 提高着色剂的提取效率^[9-10]。结果表明, 本文建立的固相萃取-高效液相色谱法检测肉制品中苋菜红、胭脂红和诱惑红的方法定性准确、线性范围广、灵敏度高、重现性好, 满足国家标准要求, 适用于批量检测使用。

参考文献

- [1] Collins T F, McLaughlin J. Teratology studies on food colourings. I. Embryotoxicity of amaranth (FD & C red No. 2) in rats[J]. Food Cosmet Toxicol, 1972, 10(5): 619-624.
- [2] McCann D, Barrett A, Cooper A, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2007, 370(9598): 1560-1567.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [4] 高洁, 宁尚勇, 许志强. 固相萃取-高效液相色谱法检测食品中的非食用色素[J]. 分析试验室, 2008, 27(8): 33-35.
- [5] 张常虎, 翟云会. 高效液相色谱法同时测定食品中的多种着色剂[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(11): 87-90.
- [6] 阮丽萍, 吉文亮, 刘华良, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 10 中合成着色剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 151-154.
- [7] 钱疆, 杨方, 陈弛, 等. 超高效液相色谱飞行时间质谱测定食品中 36 种合成色素[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 215-218.
- [8] 王登飞, 黄智辉, 郑俊超, 等. 液相色谱-串联质谱法测定食品中合成色素[J]. 理化检验: 化学分册, 2012, 48(4): 445-448.
- [9] 李静娜, 胡汉高, 朱其明, 等. 高效液相色谱法测定卤肉制品中诱惑红[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(20): 3229-3231.
- [10] 王红梅, 郭伟, 王继鹏, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中食用合成色素的含量[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(6): 106-108.

· 公告 ·

关于沙棘叶、天贝作为普通食品管理的公告

2013 年 第 7 号

根据《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》有关规定, 现公布沙棘叶、天贝 (以大豆为原料经米根霉发酵制成) 作为普通食品管理。

以可食用的动物或植物蛋白质为原料, 经《食品添加剂使用标准》(GB2760—2011) 规定允许使用的食品用酶制剂酶解制成的物质作为普通食品管理。自本公告发布之日起, 我委不再受理上述物质新资源食品的申请。生产经营上述食品应当符合有关法律、法规、标准规定。

特此公告。

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年五月十四日