

肉制品中非法添加色素的高效液相色谱快速检测方法

王菡^{1,2} 储晓刚^{2*} 曹远银^{1*}

(¹ 沈阳农业大学植物保护学院 辽宁沈阳 100161; ² 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所 北京 100123)

摘要 利用凝胶渗透色谱-高效液相色谱法, 开发一种新的快速、高效、高灵敏度的同时测定肉制品中油溶性非法添加色素的方法, 色素包括Sudan (I -IV), Sudan red B, Sudan red 7B, Sudan orange G and Para red. 前处理采用GPC净化方法以避免肉中复杂基质对定量造成的干扰以及对色谱柱的损伤。通过Kinetex C18色谱柱分离, 乙腈-20mmol/L 乙酸铵水溶液(pH=4.5) 为流动相, 方法控制时间在10min之内。该8种色素在0.05-50 mg/L 浓度范围内线性良好 R>0.999, 基于不同基质检出限和定量限分别在0.014 ~ 0.075 mg/kg 和 0.045-0.25 mg/kg 之间, 加标水平在0.2mg/kg 和 2mg/kg 时, 回收率在87.8-111.9% 之间。该方法应用于肉制品中苏丹类色素及对位红8种油溶性色素的测定, 效果良好, 检测效率大大提高。

关键词 非法添加色素; 凝胶渗透色谱; 高效液相色谱; 肉制品

中图分类号 O657

Fast Determination of Banned Dyes in Meat Products by High Performance Liquid Chromatography

Wang Han^{1,2}, Chu Xiaogang^{2*}, Cao Yuanyin^{1*}

(¹ School of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 100161, PR China; ² Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Jia 3, Gaobeidian North Road, Beijing 100123, PR China)

Abstract An accurate and sensitive method based on the use of GPC-HPLC-DAD was devised for the simultaneous determination of Sudan (I ~ IV), Sudan red B, Sudan red 7B, Sudan orange G and Para red in meat products. The GPC clean-up procedure was adopted to avoid some interference and damage of the column for quantification of 8 dyes in ham and sausage samples. For the separation, Kinetex C18 column was used and the mobile phase contained acetonitrile and 20mmol/L ammonium acetate solution at pH 4.5. The optimized subsection wavelength condition reduced the change of methods for determination of different dyes, these dyes were analyzed within 10 min. The 8 compounds behave linearly in the 0.05-50 mg/L concentration range, with correlation coefficient>0.999. LODs and LOQs for the investigated dyes were in the ranges of 0.014-0.075 mg/kg and 0.045-0.25 mg/kg depending on matrices, respectively. The recoveries of the 8 dyes in two matrices ranged from 87.8-111.9%. The illustrated method is suitable for routine qualitative and quantitative analyses of synthetic colorants in meat products.

Key words Banned dyes; GPC; HPLC-DAD; Meat products

食品添加剂是指为改善食品品质和色、香、味, 以及为防腐和加工工艺的需要而加入食品中的化学合成和天然物质。而食品的颜色是直接影响消费者购买欲望的决定性因素, 如今一些不法商贩为掩盖肉制品在加工、运输、储藏过程中造成的外观的改变, 而过度添加食用色素, 甚至添加苏丹类工业染料的事件层出不穷。Sudan I, II, III and IV 都属于偶氮染料, 主要用途是对颜料、蜡、鞋及地板染色的化学物质, 具有一定程度的致癌性。以Sudan I 为例, 是一种强效橙色染料用于塑料制品的染色及其他工业产品的上色, 但不能用于食品中。然而,

Sudan I 曾在很多食用商品中被查出, 包括红辣椒、番茄为主料的食品以及肉制品中, 而被消费者误食。由于Sudan I 和其他Sudan类色素能够被降解为有致癌性的芳香胺类物质(图1), 而且至今为止, 没有明确的数据报告能够显示Sudan类色素在人体内的安全摄入量, 因此欧共体在2004年1月明确禁止将Sudan类色素作为食品添加剂食用(2003/460/EC)。然而, Sudan类色素因其成本低而被一些不法商贩作为食品着色剂而使用, 因此, 开发一种快速、高效、高灵敏度的用来对非法添加Sudan类色素加以定性和定量的方法是亟待解决的问题。

收稿日期: 2010-11-08

基金资助: 北京市科委项目(食品中未知添加物质筛查确证技术研究), D08050200310803

作者简介: 王菡, 博士, 研究方向为有害生物与环境安全

通讯作者: 储晓刚, 研究员; 曹远银, 研究员

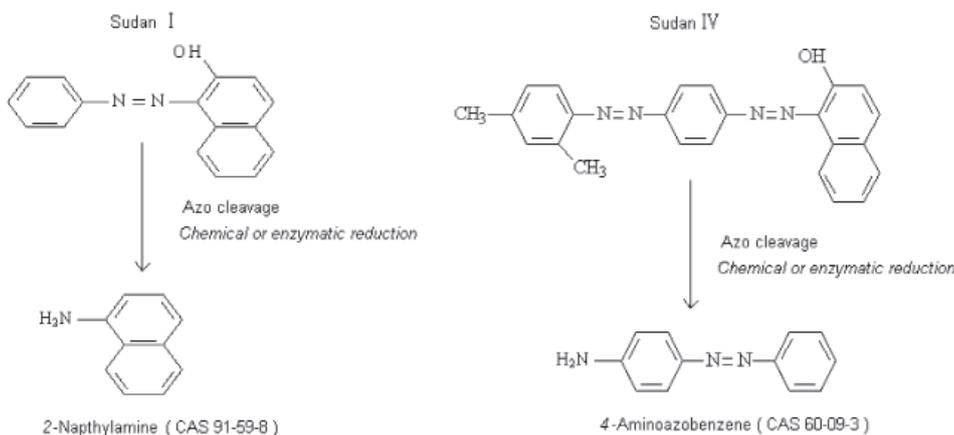


图 1.(a)Sudan I 裂解为致癌芳香胺 2-萘胺(2-Naphthylamine)的过程

(b) Sudan IV 裂解为致癌芳香胺 4-氨基偶氮苯(4-Aminoazobenzene)的过程

Figure 1. (a) Illustration of the reductive cleavage of Sudan I into the carcinogenic amine (2-Naphthylamine).

(b) Illustration of the reductive cleavage of Sudan IV into the carcinogenic amine (4-Aminoazobenzene).

目前针对苏丹染料的检测方法主要有毛细管液相色谱-电喷雾电离源-四级杆飞行时间质谱(TOF)法^[1], 反相液相色谱-电喷雾电离源-质谱(LC-ESI-MS/MS)^[2], 液相色谱-光电二极管阵列检测器法(HPLC-DAD)^[3]以及液相色谱-大气压化学源串联质谱法(LC-APCI-MS/MS)^[4]。然而,用质谱检测的好处是灵敏度高,但是,昂贵的价格不能满足各个地方实验室的日常检测,尤其是一些经济欠发达地区的检测。本方法介绍的就是一种快速,高灵敏度的液相色谱法同时对肉制品8种油溶性违禁色素进行定性和定量的方法,检出限在0.014-0.072 mg/kg 之间。

由于肉质品中含有大量的脂肪和蛋白,而且该8种色素都为亲脂性工业染料,所以很容易附着在脂肪中,而不容易和脂肪分离,因此对检测造成了干扰,目前还没有对此8种油溶性染料在肉制品中同时检测方法进行的报道。凝胶渗透色谱(GPC)是一种被广泛使用的用于去除大分子干扰物质从而净

化复杂基质的方法,根据目标检测物与干扰物分子量差异较大的特性,常用于脂类和蜡制品中添加物质的检测^[5]。本实验运用的GPC及HPLC法,在10min 完成对8种油溶性染料的检测工作。同时通过回收率,线性及精密度对该方法进行了验证,并应用于实际样品的测定,查出阳性样品后利用HPLC/TOF-MS进行定性。

1 实验部分

1.1 试剂与标准品

实验所用全部水为超纯水(Millipore direct-Q, Milford, MA, USA), 乙酸铵为分析级(sigma, USA)。乙腈、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯及环己烷均为色谱级(Fisher Scientific USA), HPLC所用试剂均通过0.45 μm 尼龙滤膜(Pall Corporation, USA)并用超声波仪排除气泡。

Sudan (I - IV), Sudan red B, Sudan red



图 2. 实验涉及色素的名称与结构式

Figure 2. Chemical structures, common names of dyes studied.

7B, Sudan orange G and Para red 8 种染料均购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH (Germany)。配置的储备液浓度均为 1mg/mL 使用色谱纯乙腈配制。工作液均由储备液稀释而成存放在 4℃ 避光。

1.2 仪器

HPLC 由一个二元泵、脱气机、自动进样器、柱温箱及二极管阵列检测器构成 (Agilent 1100 Series, USA), 整个系统由 Agilent ChemStation 控制, 色谱柱为 C18 柱 (Kinetex C18, 100mm × 4.6mm; 2.6 μm)。凝胶渗透色谱 GPC AccuPrep MPS 自动系统, 配有 J2 M3300 自动进样器及 24 瓶 (10 mL) 托盘 (Columbia, Missouri 65202, USA), Exprss 玻璃柱 (250 mm × 15 mm i.d.) 填充 22g 200-400 目 BioBreads S-X3 树脂填料; 用于确证阳性样品的 Q-TOF 为 6500 Series Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight(Q-TOF)LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。

1.3 提取

将火腿和腊肠样品打碎成肉泥状, 称取 5 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 正己烷均质提取 2 min, 以 10000 rpm, -4℃ 离心 30 min (high-speed refrigerated centrifuge, himac CR 21G, Hitachi, Japan)。提取上清液, 转移至鸡心瓶中, 剩余残渣按上述条件再次提取, 合并上清液, 40℃ 旋蒸尽干, 用 10 mL 乙酸乙酯-环己烷 (50:50, v/v), 定容转至 GPC 进样管中, 放入进样盘中待 GPC 净化。

1.4 净化

火腿和腊肉样品的提取液在凝胶渗透色谱中净化过程如下: 流动相为乙酸乙酯-环己烷 (50:50, v/v), 流速为 5 mL/min, 在 10-15min 之间的洗脱液收集到 50 mL 鸡心瓶中。将此洗脱液在 40℃ 旋蒸尽干, 用 1.0 mL 乙腈定容, 混合涡旋, 0.45 μm 尼龙滤膜过滤, 待 HPLC 测定。

1.5 液相色谱分离条件

实验采用 C18 液相色谱柱, 流动相 A: ACN; B: 乙酸铵 (20 mmol/L, pH=4.5), 95%A 等度洗脱 10min, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30 ℃。进样体积为 10 μL。流动相 A 和 B 在使用前均经过超声仪排除气泡以及 0.45 μm 尼龙滤膜过滤。

2 结果和讨论

2.1 提取

为了准确的对肉制品中添加染料进行检测, 本实验尝试了多种方法, 包括对四种提取试剂的提取效果进行了比较 (正己烷、二氯甲烷、乙腈、乙酸乙酯)。尽管乙腈提取后提取液中干扰物较少, 但是对 orange G, Sudan red 7B, Sudan 4, Sudan red B 及 Para red 的提取效率很低, 如图 3 所示的那样, 正己烷是这四种溶剂中提取效率最高的。因此, 我们采用 15 mL 正己烷反复提取两次的方法来提取肉制品中的工业染料, 提取效率高。

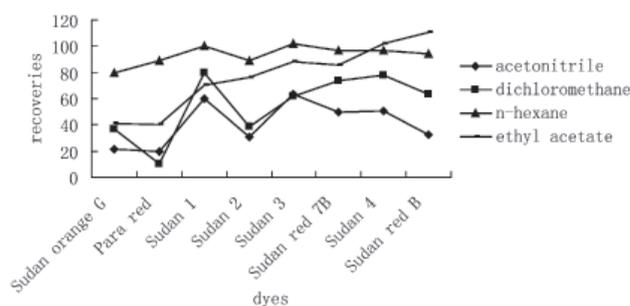


图 3. 不同提取液对 8 种色素回收率的影响

Fig.3 The recoveries of different extractants in extraction of eight dyes.

2.2 净化

肉制品的基质中大量的脂类和蛋白成为检测的干扰成分, 油溶性色素分散在脂肪中, 这样在提取的时候只有将脂肪部分全部提出, 才能保证染料的全部提出。接下来就是要在净化部分将脂肪和目标分析物分离开来。GPC 根据干扰物大分子和目标分析物小分子分子量的不同, 而把二者分离开来, 本文即利用此点, 成功的将火腿和腊肉中的油脂去除。从样品中提取出来的大分子 (脂肪和蛋白) 由于不能被树脂填料所吸附而较早的随流动相流出, 而 8 种油溶性染料分子量小, 均在 10min 之后流出, 从而得到净化, 也避免了后期的 HPLC 分析是对液相色谱柱造成污染及损害。

2.3 目标物的分离

为了得到 8 种色素更好的分离效果, 实验最初将标准品和样品的提取液分别通过 C18 柱在等度的条件下进行检测。分离条件在流动相方面进行了优化, 包括甲醇-20 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈-20 mmol/L 乙酸铵水溶液, 以及它们之间不同的比例均进行了实验与优化, 结果表明乙腈-20

mmol/L 乙酸铵水溶液得到的峰型及峰面积都要比甲醇 -20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相而得到的色谱图好,因此采用乙腈 -20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为 HPLC 系统的流动相。

如图 4 所示,本实验中对检测器的条件也进行了优化,由于 Sudan orange G 的最大吸收波长和其它染料的波长差别很大,当 507nm 作为检测波长时,Sudan (I - IV), Sudan red B, Sudan red 7B 和 Para red 均能得到很好的吸收峰。由于 Sudan orange G 在 410 nm 有很好的吸收,而且出峰早,在 2.3 min 之前就可出峰,因此本实验采取分时间段检测的方法,如图 4 中所示,在前 2.3 min 分钟采用 410 nm 检测,然后转换到 507 nm 进行检测。应用以上条件,8 种色素能够很好的被分离,混合标准品的色谱图如图 5 所示,相应的各个峰出峰时间见表 1。

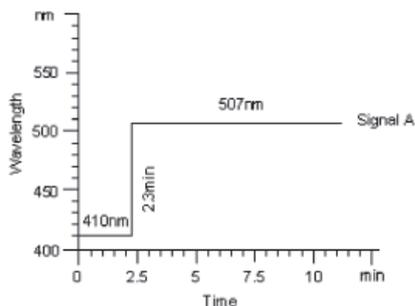


图 4 DAD 检测器分段检测条件的优化
Fig.4 The detection condition optimized of DAD

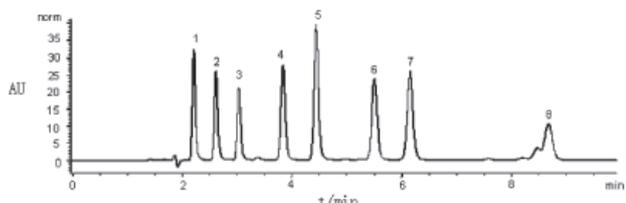


图 5. 8 种色素混标色谱图浓度为 2mg/L
Figure 5. Chromatogram of mixed standard solutions. The concentrations of all colorants were 2mg/L.

表 1. 8 种色素的检测波长及保留时间

Tab.1 The detection wavelength and retention time of eight dyes

Peak	Dye	Detection wavelength /nm	Retention time /min
1	Sudan orange G	410	2.222
2	Para red	507	2.621
3	Sudan I	507	3.043
4	Sudan II	507	3.845
5	Sudan III	507	4.447
6	Sudan red 7B	507	5.499
7	Sudan IV	507	6.139
8	Sudan red B	507	8.657

2.4 标准曲线, 检出限及定量限

8 种色素在 0.05 ~ 50mg/L 的质量浓度范围内线性关系良好,线性方程及相关系数见表 2。以 3 倍信噪比时的进样浓度计算 8 种色素的检出限,以 10 倍信噪比时的进样浓度计算 8 种色素的定量限,平行测定 6 份样品,计算峰面积的标准偏差,结果见表 2。其中一些染料的 LOD 值低于文献^[6-7]中的报道,一些染料 LOQ 值与文献^[6]中的相近。

2.5 回收率

使用火腿和香肠空白加工肉制品进行回收率的测定。按 2.3-2.5 的方法,分别加入质量浓度为 0.2mg/kg 和 2mg/kg 混合标准物质,每个加标水平样品测定 3 份,回收率结果见表 2。添加水平为 0.2mg/kg 时的样品色谱图见图 6,可见基质干扰很弱,说明该方法可以很好的减少由基质效应对检测带来的干扰,变异系数小于 6.9%。HPLC 法对香肠样品检测的色谱图如图 6 所示,其中添加标准品浓度为 0.2mg/kg。LODs 和 LOQs 在实际样品中的表现取决于样品基质的不同,如表 2 所示。

表 2. 8 种色素的标准曲线, 相关系数及检出限和定量限

Table 2 Lineare equations, correlation coefficients(r), limits of detection(LOD) and limits of quantification(LOQ) of eight dyes.

Dye	Linear equation	LOD (mg/kg)		LOQ (mg/kg)		R
		ham	sausage	ham	sausage	
Sudan orange G	y = 39.324x + 0.7548	0.018	0.014	0.058	0.045	0.9999
Para red	y = 57.4x - 0.513	0.017	0.016	0.057	0.056	1
Sudan I	y = 50.224x - 0.4826	0.022	0.019	0.074	0.064	1
Sudan II	y = 73.116x + 0.2028	0.034	0.025	0.114	0.084	0.9999
Sudan III	y = 115.51x - 0.4019	0.036	0.025	0.121	0.083	1
Sudan red 7B	y = 70.154x - 3.5087	0.065	0.047	0.217	0.158	0.999
Sudan IV	y = 99.714x - 1.3746	0.054	0.046	0.181	0.154	1
Sudan red B	y = 64.391x - 0.5224	0.075	0.072	0.25	0.238	0.9998

x: mass concentration of dyes, mg/L; y: peak area. Linear ranges: 0.05-50 mg/L

表 3. 8 种色素的添加回收率 (n=3)
Table 3. Spiked recoveries of eight dyes.

Dyes	Added/ (mg/kg)	Ham		Sausage	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Sudan orange G	0.2	102.4	1.3	110.2	2.9
	2	97.9	0.79	99.3	0.87
Para red	0.2	95.1	6.9	108.3	2.5
	2	99.3	0.77	100.7	0.48
Sudan I	0.2	99.4	0.56	111.9	2.92
	2	88.1	0.82	88.7	0.61
Sudan II	0.2	102.0	2.9	108.1	0.52
	2	98.0	0.54	98.9	0.44
Sudan III	0.2	100.2	2.03	100.3	1.02
	2	99.3	0.48	91.0	0.45
Sudan red 7B	0.2	100.6	2.8	109.8	0.74
	2	97.8	1.08	99.9	0.40
Sudan IV	0.2	101.0	1.18	105.7	0.89
	2	98.1	0.36	97.2	0.33
Sudan red B	0.2	102.2	2.08	108.5	2
	2	88.6	0.48	87.8	0.44

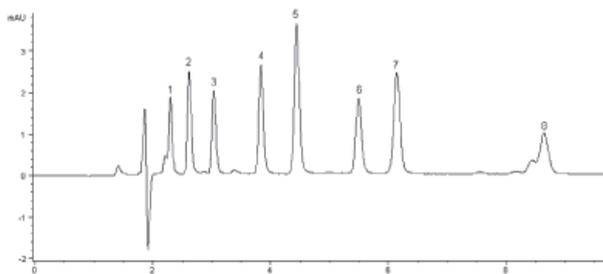


图 6. 香肠样品中添加 0.2mg/kg 混标的色谱图

Figure 6. Typical HPLC chromatogram of sausage fortified with dyes at 0.2mg/kg.

2.6 应用

为了评价该方法的实用性,通过对 20 个肉类样品(够自超市及个体商贩)的测定,得出了结论。总体来说,大多数样品中没有查出苏丹染料,但是仍有少部分样品中有少量 Sudan I and Sudan IV 的存在,记做样品 A 和 B,如图 7 中所示。阳性样品均经过 Agilent MSD TOF 的鉴定(图 7)。说明该试验方法得到的结果准确可靠。

3 结论

本文针对肉类食品,提出了一种快速、高效、高灵敏度的检测 8 中油溶性色素的方法,能够满足常规检测的使用。在该方法中,GPC 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伤害。对检测器方法的时间分段优化,使该方法能够更高效的对多种染料进行同时检测,缩短了试验次数和程序时间。该方法能够满足日常对于禁用的苏丹类染料的检测工作,应用于肉制品中,效果良好,检测效率大大提高。

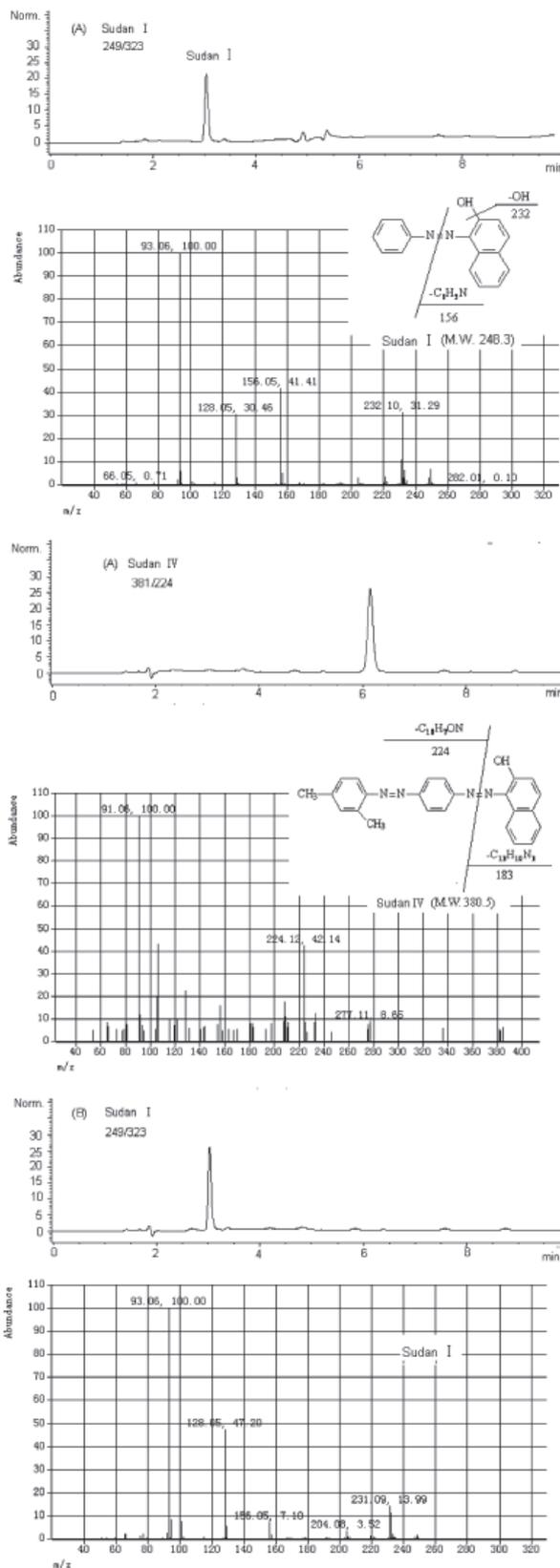


图 7. Q-TOF-MS 对阳性样品的定性分析

Figure 7. Q-TOF-MS analysis of a positive sausage sample A (containing Sudan I at $2.23 \pm 0.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ and Sudan IV at $2.03 \pm 0.9 \mu\text{g kg}^{-1}$) and sausage sample B (containing Sudan I at $3.06 \pm 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$).

参考文献

- [1] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 127
- [2] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistara, I. Zagnoni, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 123
- [3] V. Cornet, Y. Govaert, G. Moens, J. Van Looco, J.M. Degroodt, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 639
- [4] L. Di Donna, L. Maiuolo, F. Mazzotti, D. De Luca, G. Sindona, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5104
- [5] V. J. Barwick, L. R. Ellison, S. J. Laey, C. R. Mussell, C. L. Lucking, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1190.
- [6] Luciana Bolzoni, Mirella Bandini, *Industria conserve.* 79 (2004)-319
- [7] Yan Zhang, Hai-Long Wu, A-Lin Xia, Qing-Juan Han, Hui Cui, Ru-Qin Yu, *Talanta* 72 (2007) 926

(上接第 87 页)

子的加标浓度为 0.01、0.04、0.10mg/L, 所得加标回收率为 92.46%、89.08%、98.27。图 2 为牛奶样品色谱图。

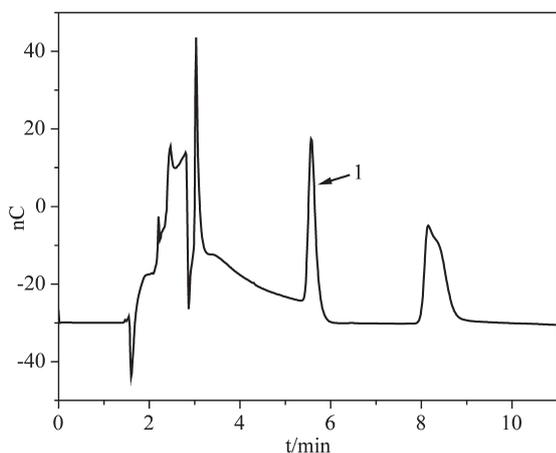


图 2 实际样品色谱图(1-碘离子)

3 结论

经上述实验证明, 离子色谱脉冲安培检测法测

定牛奶中痕量碘离子的检出限、线性范围、精密性、准确性、回收率均符合要求, 可以用于检测工作。

参考文献

- [1] 李秋香. 中国热带医学, 2005, 5(2): 390-391
- [2] 吕明玉, 刘绍璞. 分析测试学报, 2001, 20(3): 35
- [3] 游新奎. 深圳大学学报(理工版), 1998, 15(4): 69
- [4] 韩鹤友, 何治柯. 分析科学学报, 1999, 15(4): 318
- [5] 方宾, 方惠群. 分析化学, 1997, 25(1): 59
- [6] 冯素玲, 陈红. 理化检验-化学分册, 1997, 33(8): 358
- [7] 袁兆岭. 临沂师范学院学报, 2001, 23(6): 34
- [8] 李吉学. 化学传感器, 1996, 16(2): 142
- [9] Tommaso R. I. Cataldi, Alessandra Rubino Rosanna Ciriello, *Anal Bioanal Chem* (2005) 382: 134-141
- [10] Trésor Kimbeni Malongo, Stéphanie Patris, Pascale Macours, *Talanta* 76 (2008) 540-547
- [11] 范哲峰. 分析科学学报, 1999, 15(4): 309
- [12] 王光明, 陈斌. 理化检验-化学分册, 1994, 30(5): 270
- [13] 朱镗, 迟锡增. 光谱学与光谱分析, 1994, 14(6): 105
- [14] 崔仙舟, 王中柱. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 673
- [15] 张晓彤, 云自厚. 色谱, 1997, 15(1): 57
- [16] 梁立娜, 蔡亚岐, 牟世芬. 分析试验室, 2005, (11)
- [17] K. Ito, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 211