

固相萃取-高效液相色谱法同时测定海米中10种合成色素

刘慧慧¹, 宫向红¹, 徐英江¹, 邹荣婕², 李佳蔚², 邓旭修², 张秀珍^{1,*}

(1.山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;

2.烟台山水海产有限公司, 山东 烟台 264006)

摘要: 建立固相萃取-高效液相色谱法同时测定海米中新红、柠檬黄、日落黄、胭脂红、偶氮玉红、苋菜红、诱惑红、亮蓝、赤藓红、罗丹明B 10种合成色素的方法。海米中的合成色素用氨化乙醇提取、固相萃取柱净化, ODS-3 C₁₈柱为分离柱, 甲醇和0.02 mol/L乙酸铵为流动相梯度洗脱, 采用二极管阵列检测器, 在360 nm波长处检测, 外标法定量。10种合成色素在0.2~50 mg/L质量浓度范围内与其峰面积成良好的线性关系; 10种合成色素的检出限为0.4~1.0 mg/kg。3个不同加标水平的回收率为74.3%~90.0%, 相对标准偏差小于4.3%。该方法能同时完成10种合成色素的测定, 可用于海米中合成色素的检测分析。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱; 海米; 合成色素

Simultaneous Determination of 10 Synthetic Pigments in Dried Shrimps Using Solid-Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

LIU Hui-hui¹, GONG Xiang-hong¹, XU Ying-jiang¹, ZOU Rong-jie², LI Jia-wei², DENG Xu-xiu², ZHANG Xiu-zhen^{1,*}

(1. Shandong Province Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. Yantai Shanshui Seafood Co. Ltd., Yantai 264006, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of 10 synthetic pigments (new red, lemon yellow, sunset yellow, carminum, azorubin, amaranth, allura red, light blue, erythrosine and rhodamine B) in dried shrimps. Samples were extracted using aminated ethanol and cleaned up on a solid phase extraction column. The chromatographic separation was achieved on an ODS-3 C₁₈ column using a mobile phase consisting of methanol and 0.02 mol/L ammonium acetate by gradient elution. Ten synthetic pigments were detected by a diode array detector at the wavelength of 360 nm and quantified by an external standard method. There was a good linear correlation between the concentrations of 10 synthetic pigments and their peak areas in the range of 0.2–50 mg/L. The detection limits of 10 synthetic pigments were 0.4–1.0 mg/kg. The recoveries were in the range from 74.3% to 90.0% and the RSDs were less than 4.3%.

Key words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; dried shrimps; synthetic pigments

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)04-0170-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201404035

海米又名虾米、干虾仁, 是著名的海味品, 有较高的营养价值, 蛋白质含量高达55%, 还含多种维生素。海米中最具营养价值的成分是呈红色的虾青素, 是迄今为止发现的最强的抗氧化剂。如果海米中的红色成分褪去, 说明虾青素已经被氧化。因此, 海米的红色成为海米新鲜程度的指示剂。

合成色素具有色泽鲜艳、着色力强、色调多样、成本低廉等特点。应用于食品着色的合成色素叫做食用合

成色素, 它们自身没有营养且具有毒性、致泻性和致癌性^[1]。2011年实施的GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》^[2]中对允许在食品中使用的几种合成食用色素的最大使用量及使用范围作了明确规定。海米中禁止添加任何合成色素, 但一些不法商贩常将劣质海米用合成色素进行染色, 以达到新鲜海米的颜色。以目前调查监测情况看, 海米中胭脂红和柠檬黄常有检出^[3]。

收稿日期: 2013-05-28

基金项目: 山东省“水生动物营养与饲料”泰山学者岗位项目; 山东省科学技术发展计划项目(2012GHY11517);

烟台市科技发展计划项目(2012134)

作者简介: 刘慧慧(1981—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为水产品质量安全。E-mail: liuhh615@163.com

*通信作者: 张秀珍(1964—), 女, 研究员, 学士, 研究方向为水产品质量安全与标准化。E-mail: zxz0535501@126.com

现行的食品中合成色素的检测方法以饮料、糖、果汁等基质比较简单的食品居多^[4-10], 缺乏海米等干海产品的检测方法。海米样品蛋白质含量高且基质复杂, 合成色素与蛋白质结合^[11-12], 基于简单基质食品的分析方法不能准确测定其中色素的含量。本研究以GB/T 5009.35—2003《食品中合成着色剂的测定》^[13]为基础, 增加了3种红色系合成色素, 以新红、柠檬黄、日落黄、胭脂红、偶氮玉红、苋菜红、诱惑红、亮蓝、赤藓红、罗丹明B 10种合成色素作为研究对象, 建立了高效液相色谱多组分检测方法, 旨在提高检测效率、填补海米中合成色素检测方法的空白。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

海米购自山东烟台农贸市场。

新红标准品(98.5%) 德国Fluka公司; 柠檬黄、日落黄、胭脂红对照品 国家标准物质研究中心; 偶氮玉红、苋菜红、诱惑红、亮蓝、赤藓红、罗丹明B标准品德国Dr. Ehrenstorfer公司; 甲醇(色谱纯)、甲酸、氨水、乙醇、乙酸铵(均为分析纯) 德国Merck公司、实验用水均为超纯水; 聚酰胺固相萃取柱(1 g, 6 mL)天津博纳艾杰尔公司。

1.2 仪器与设备

U3000型高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器)戴安(中国)有限公司; Milli Q Gradient型超纯水仪美国Millipore公司; Laborota 4001型旋转蒸发器 德国Heidolph公司; N-EVAP 112氮吹仪 美国Organomation公司; FA25匀质器 德国Fluko公司; TGL-10C离心机 上海安亭科学仪器厂; ASPEC XL4型全自动固相萃取仪 法国Gilson公司; Talboys旋涡混合器美国Troemner公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: ODS-3 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温30 °C; 流动相为甲醇(A)和0.02 mol/L乙酸铵(B); 梯度洗脱程序1、2^[13]见表1、2; 进样体积20 μL; 流速1.0 mL/min。采集10种合成色素在220~600 nm波长范围内的吸收光谱图, 以确定最佳吸收波长。

表1 流动相梯度1

时间/min	0	10	22	30	37	40	50
A/%	10	10	25	75	75	10	10
B/%	90	90	75	25	25	90	90

表2 流动相梯度2

Table 2 Gradient elution program 2 for the separation of the pigments by HPLC

时间/min	0	5	12	18	28	40
A/%	20	35	98	98	20	20
B/%	80	65	2	2	80	80

1.3.2 标准溶液的配制

准确称取适量的新红、柠檬黄、苋菜红、日落黄、胭脂红、偶氮玉红、诱惑红、亮蓝、赤藓红、罗丹明B标准品, 用水配成质量浓度为100 mg/L的标准储备溶液, 取各储备溶液适量, 配制混合标准中间液, 其中新红、柠檬黄、苋菜红、日落黄、胭脂红、诱惑红、亮蓝、罗丹明B的质量浓度为20 mg/L, 赤藓红的质量浓度为30 mg/L, 亮蓝的质量浓度为50 mg/L, 4 °C保存备用。

1.3.3 试剂的配制

提取液1(氨化乙醇): 将无水乙醇、氨水、水按7:2:1(V/V)比例混匀制得; 提取液2(氨化乙醇): 将无水乙醇、氨水、水按6:4:0(V/V)比例混匀制得; 提取液3: 将4 mol/L尿素溶液与甲醇等体积混匀制得。

1.3.4 样品处理

称取2.0 g粉碎后的干海米样品于50 mL离心管中, 加入15 mL石油醚, 涡动3 min, 4 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 肉糜中再加入15 mL石油醚, 重复1次。肉糜经上述处理后置于氮吹仪, 将残余的石油醚吹干。分别加入提取液1、2、3, 与样品充分混匀, 涡动提取3 min, 7 000 r/min离心10 min, 用脱脂棉过滤上清液, 将滤液转移入鸡心瓶。对提取液用量及提取次数进行测试。将数次提取的上清液合并入鸡心瓶, 于55 °C旋转蒸发至10 mL, 转入50 mL离心管, 用5 mL水洗鸡心瓶, 洗涤液一并转入离心管, 7 000 r/min离心10 min, 上清液转移入25 mL容量瓶中, 加入0.6 mL 200 g/L柠檬酸溶液, 用水定容至25 mL, 混匀, 备用。将固相萃取小柱安装在固相萃取装置上, 用10 mL水活化后, 加入25 mL提取液, 以10 mL 0.05%甲酸水溶液(V/V)淋洗小柱、10 mL 10%氨水甲醇溶液(V/V)洗脱, 接洗脱液于10 mL玻璃离心管中, 于55 °C氮吹至近干。用2 mL 20%甲醇水溶液(V/V)溶解残渣, 过0.45 μm针孔滤膜, 待测。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取溶剂

10种合成色素均为水溶性, 但由于海米中蛋白质含量较高, 无法实现用水提取与蛋白质结合的色素。因此分别采用不同比例的氨化乙醇溶液(提取液1、2)^[14-15]、尿素甲醇溶液(提取液3)^[16]对海米样品进行提取实验。

结果表明, 提取液1、2、3提取效率分别为95%、87%、84%, 提取液1的提取效率最高, 且可以省去后续去蛋白的步骤, 简化前处理过程。原因是70%~75%的乙醇可以夺取蛋白质的水分, 使蛋白质相对过量, 相互吸附、凝聚。对提取液使用量和提取次数进行比较研究, 结果见表3。因此本研究使用提取液1, 分别用20、20、10 mL对样品进行3次提取。

表3 提取液体积和提取次数对提取效果影响比较

Table 3 Effects of extraction solvent volume and number of extraction cycles on the recoveries 10 synthetic pigments

提取液用量/mL	15+15	30+20	15+15+15	20+20+10
回收率/%	78	82	85	95

2.1.2 固相萃取净化效果

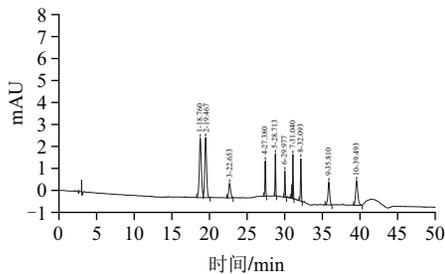
固相萃取净化是目前大多数研究者采用的样品净化方式, 与传统的液-液萃取法相比可以提高分析物的回收率, 更有效的将分析物与干扰组分分离, 广泛应用于食品安全检测^[17-23]。国标方法及相关参照文献多采用聚酰胺粉吸附法净化^[13,24], 该方法对上样及洗脱试剂的pH值要求严格, pH值的波动会影响部分合成色素的吸附及洗脱, 最终影响回收率; 在淋洗杂质时, 含有氧杂蒽结构的化合物(如赤藓红)会有很大损失^[25]。本研究使用聚酰胺固相萃取小柱净化, 上样时只需在提取液中加入少量200 g/L柠檬酸以保证酸性吸附环境, 10种化合物都能得到满意的回收率。以混合标准中间液过柱的方式测试固相萃取柱对各色素成分的回收率, 结果如表4所示。

表4 10种合成色素的回收率

Table 4 Recoveries of 10 synthetic pigments

色素	新红	柠檬黄	苋菜红	胭脂红	日落黄
回收率/%	93	87	98	95	95
色素	赤藓红	诱惑红	亮蓝	偶氮玉红	罗丹明B
回收率/%	95	93	92	88	84

2.1.3 色谱分离条件



1.新红; 2.柠檬黄; 3.苋菜红; 4.胭脂红; 5.日落黄;
6.诱惑红; 7.亮蓝; 8.偶氮玉红; 9.赤藓红; 10.罗丹明B。下同。

图1 10种合成色素标准混合溶液色谱图(2 mg/kg)

Fig.1 Chromatogram of a mixture of 10 synthetic pigment standards (2 mg/kg)

为实现多组分的同时检测, 采用250 mm色谱柱进行分离。该类物质分离常用甲醇(A相)和乙酸铵(B相)为流动相, 当两者初始体积比为2:8时, 新红和柠檬黄出峰时间过早, 且二者重合; 将甲醇和乙酸铵溶液初始体积比调整为1:9时, 新红和柠檬黄分离效果好, 且不受样品基质干扰。采用梯度洗脱方法1, 先使用低有机相使新红和柠檬黄分离, 22 min后迅速增大甲醇比例, 使10种合成色素在40 min内分离完全, 提高了分离效率。10种合成色素标准物质质谱图见图1。

2.1.4 检测波长

采集10种合成色素的吸收光谱图, 多个化合物具备2个主要吸收波段, 一个吸收峰在250 nm左右, 另一个吸收峰在450~600 nm波长之间, 最大吸收波长如表5所示。选择波254 nm为检测波长, 10种合成色素标准品在该波长处响应值较高, 但海米样品在该波长下杂峰很多, 干扰目标化合物的测定。由于10种化合物的最大吸收波长不能兼顾, 故适当牺牲部分化合物的响应值, 选择360 nm为检测波长, 在该检测波长下, 基线平稳, 且方法检出限能够满足检测要求。

表5 合成色素的最大吸收波长

Table 5 Maximum absorption wavelengths of the pigments

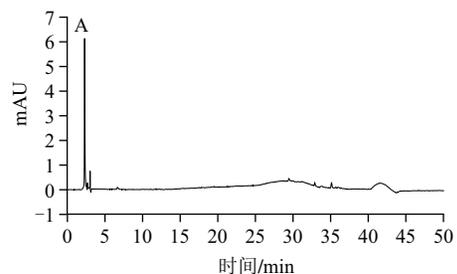
色素	新红	柠檬黄	苋菜红	胭脂红	日落黄
最大吸收波长/nm	250	430	520	510	480
色素	赤藓红	诱惑红	亮蓝	偶氮玉红	罗丹明B
最大吸收波长/nm	530	510	580	520	550

2.2 标准曲线和检出限

表6 色素各组分标准曲线方程、线性范围及检出限

Table 6 Calibration equations, linear ranges and detection limits of the pigments

色素	保留时间/min	标准曲线方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	相关系数	方法检出限/(mg/kg)
新红	18.77	$Y=0.2461X+0.014$	0.2~20	0.999	0.4
柠檬黄	19.51	$Y=0.1964X+0.0081$	0.2~20	0.999	0.4
苋菜红	22.65	$Y=0.1174X+0.0063$	0.2~20	0.998	0.4
胭脂红	27.39	$Y=0.1175X+0.0136$	0.2~20	0.999	0.4
日落黄	28.73	$Y=0.0908X+0.0294$	0.2~20	0.999	0.4
诱惑红	30.00	$Y=0.0274X+0.0053$	0.3~30	0.999	0.6
亮蓝	31.07	$Y=0.0162X+0.0032$	0.5~50	0.999	1.0
偶氮玉红	32.13	$Y=0.0561X+0.0019$	0.2~20	0.999	0.4
赤藓红	35.93	$Y=0.2610X+0.0376$	0.2~20	0.998	0.4
罗丹明B	39.54	$Y=0.1402X+0.0257$	0.2~20	0.999	0.4



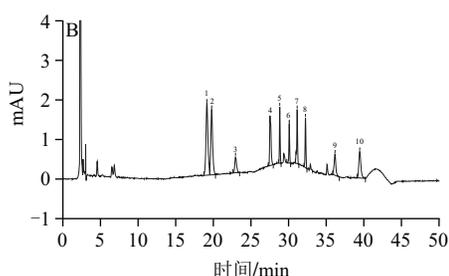


图2 海米样品(A)、加标海米样品(B, 2 mg/kg) 色谱图

Fig.2 Chromatograms of blank (A) and spiked samples (B, 2 mg/kg) of dried shrimp

在0.2~50 μg/mL范围内, 10种合成色素的质量浓度与其峰面积呈良好线性关系, 相关系数、线性方程如表6所示。在海米样品中添加适量混合标准中间溶液, 按1.3节方法处理, 10种合成色素检出限为0.4~1.0 mg/kg。海米样品、加标海米样品色谱图如图2所示。

2.3 回收率、精密度

表7 加标回收率和精密度

Table 7 Recoveries and precision (RSD) for spiked dried shrimp samples

色素	添加含量/ (mg/kg)	平均实测值/ (mg/kg)	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%
新红	1	0.82	82.0	2.35
	2	1.69	84.5	
	10	8.59	85.9	
柠檬黄	1	0.78	78.0	1.47
	2	1.59	79.5	
	10	8.03	80.3	
苋菜红	1	0.89	89.0	1.54
	2	1.80	90.0	
	10	8.73	87.3	
胭脂红	1	0.87	87.0	1.02
	2	1.77	88.5	
	10	8.69	86.9	
日落黄	1	0.90	90.0	2.00
	2	1.73	86.5	
	10	8.79	87.9	
诱惑红	3	2.67	89.0	1.34
	6	5.20	86.7	
	30	26.5	88.3	
亮蓝	5	4.47	89.4	4.27
	10	8.23	82.3	
	50	43.8	87.6	
偶氮玉红	1	0.89	89.0	4.30
	2	1.64	82.0	
	10	8.37	83.7	
赤藓红	1	0.78	78.0	1.47
	2	1.59	79.5	
	10	8.03	80.3	
罗丹明B	1	0.77	77.0	1.80
	2	1.52	76.0	
	10	7.43	74.3	

在空白海米样品中添加适量混合标准中间溶液, 制成3个水平的加标样品, 每个水平6个平行。按1.3节方法进行回收率实验。加标样品中10种合成色素含量、回收率及相对标准偏差见表7。

3 结论

本研究建立了海米中10种合成色素的高效液相色谱测定方法。干海米样品用氨化乙醇(无水乙醇:氨水:水为7:2:1, V/V)提取, 经聚酰胺固相萃取柱净化后浓缩测定。10种合成色素在0.2~50 mg/L范围内, 其质量浓度与峰面积线性关系良好, 方法检出限为0.4~1.0 mg/kg。在添加水平1~10 mg/kg范围内, 回收率在74.3%~90.0%, 相对标准偏差小于4.3%。实验表明, 本方法灵敏、准确, 能够满足海米中合成色素测定需要。

参考文献:

- [1] 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): 217-222.
- [2] 卫生部. GB 2760—2011食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 鲁莉, 刘晓颖. 测定海米中人工合成色素的方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(1): 65.
- [4] 岳伟民, 朱岩, 姜超雄, 等. 离子对高效液相色谱法对人工合成色素的分离和测定[J]. 分析化学, 1992, 20(7): 797-799.
- [5] 邹建宏, 陈卫东, 邵景东. 反相高效液相色谱法同时测定果汁中8种添加剂[J]. 分析化学, 2001, 29(10): 1192-1195.
- [6] GARCIA-FALCON M S, SIMAL-GANDARA J. Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up[J]. Food Control, 2005, 16(3): 293-297.
- [7] MINIOTI K S, SAKELLARIOU 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]. Analytical Chimica Acta, 2007, 583(1): 103-110.
- [8] YOSHIOKA N, ICHIHASHIK. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection[J]. Talanta, 2008, 74(5): 1408-1413.
- [9] 喻凌寒, 苏流坤, 牟德海. 糖类食品和肉制品中胭脂红色素的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 648-650.
- [10] 肖海龙, 屠海云, 王红青, 等. 反相高效液相色谱法快速测定食品中18种水溶性合成着色剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 264-266.
- [11] 沈坚, 傅晓, 潘旭, 等. 高效液相色谱法测定动物性食品中合成色素[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(2): 139-143.
- [12] 沈坚, 潘旭, 王全林, 等. 鱼子酱中的合成色素反相高效液相色谱法同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 584-588.
- [13] 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, 2011.
- [14] 宁尚勇, 高洁, 许志强, 等. 反相液相色谱法同时检测虾仁中合成色素的研究[J]. 分析实验室, 2008, 27(4): 72-75.
- [15] 陈夏芳, 胡浩军, 李韬. 高效液相色谱法测定肉制品中人工合成色素的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(2): 313-314.
- [16] 王全林, 姜海亮, 赵颖. 固相萃取-二极管阵列液相色谱法同时测定火腿中6种合成色素[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 256-260.
- [17] 程雷, 郑炎夏, 徐虹, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的丙烯酰胺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 231-234.
- [18] 陈彦凤, 肖白曼, 孙艳芳, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 428-430.
- [19] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中9种人工合成色素[J]. 粮油加工, 2010(12): 168-170.
- [20] 刘芳, 王彦, 王玉红, 等. 固相萃取-高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定食品中5种人工合成甜味剂[J]. 色谱, 2013, 33(3): 292-297.
- [21] 刘伟, 李兵, 赵榕, 等. 固相萃取-气相色谱质谱联用法测定酱油中3种氯丙醇类污染物[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(5): 425-428.
- [22] 黄亮. 固相萃取-液相色谱法测定食品中罗丹明B[J]. 食品工业, 2011, 33(9): 114-116.
- [23] 陈小华, 汪群杰. 固相萃取技术与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 278-346.
- [24] 肖艳, 袁云霞, 王全林, 等. 高蛋白食品中多种人工合成色素的提取及检测[J]. 分析科学学报, 2010, 26(5): 578-580.
- [25] 陈驰. 基于液相色谱-飞行时间质谱建立食品中着色剂筛查方法的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 12.