

固相萃取-超高效液相色谱法测定肉及肉制品中 8 种水溶性染料

陈东洋, 张昊, 冯家力, 王一红

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 建立固相萃取-超高效液相色谱法同时测定肉及肉制品中 8 种水溶性染料(喹啉黄、酸性橙 12、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性红 2G、偶氮玉红、亮黑、荧光桃红)。**方法** 样品经 20% 甲醇超声提取, 过 WAX 固相萃取小柱净化富集, C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-乙酸铵溶液为流动相梯度洗脱, 采用液相色谱二极管阵列检测器测定, 外标法定量。**结果** 在优化后的测定条件下, 8 种水溶性染料在 0.050~50.0 mg/L 质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r) ≥ 0.9990 。方法检出限为 0.008~0.06 mg/kg, 回收率为 81.1%~108.4%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.8%~6.1%。将建立的方法用于采集的 23 个肉及肉制品样品中, 1 个香肠样品检出酸性红 2G, 1 个鱼肉样品中检出碱性橙 21, 含量分别为 2.48 mg/kg 和 2.09 mg/kg。**结论** 建立的方法准确、灵敏, 适用于肉及肉制品中 8 种水溶性染料的同时测定。

关键词: 肉及肉制品; 染料; 固相萃取; 超高效液相色谱法

中图分类号: O656.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2023)04-0449-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.04.014

Determination of 8 water-soluble dyes in meat and meat products by solid phase extraction-ultrahigh performance liquid chromatography

CHEN Dong-yang, ZHANG Hao, FENG Jia-li, WANG Yi-hong

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: WANG Yi-hong, E-mail: goodlucklkh@163.com

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of 8 water-soluble dyes including quinoline yellow, acid orange 12, basic orange 21, basic orange 22, acid red 2G, azorubin, bright black, and fluorescent pink in meat and meat products by solid phase extraction combined with ultrahigh performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted with a simple ultrasonic extraction procedure with 20% methanol and cleaned up on a C18 cartridge. The analyte was separated by C18 column with the mobile phase consisting of methanol-ammonium acetate solution under gradient elution mode and detected by diode array detector. **Results** Under the optimized detection conditions, a good linear relationship was achieved as the mass concentrations of the 8 water-soluble dyes ranged from 0.050 mg/L to 50.0 mg/L, and the correlation coefficient (r) was ≥ 0.9990 . The method detection limits were between 0.008 mg/kg and 0.06 mg/kg. Satisfactory recoveries were obtained with the values of 81.1%~108.4%, and the relative standard deviations (RSDs) were 1.8%~6.1%. The method developed was applied to the determination of the 8 water-soluble dyes in 23 samples of meat and meat products. Acid red 2G was detected in one sample of sausage, and alkaline orange 21 was found in one sample of fish, with the values being 2.48 mg/kg and 2.09 mg/kg, respectively. **Conclusion** The method developed is sensitive and accurate, and it is suitable for simultaneous determination of the 8 water-soluble dyes in meat and meat products.

Keywords: meat and meat product; dye; solid phase extraction; ultrahigh performance liquid chromatography

为稳定食品色泽,赋予食品诱人的外观,人工合成着色剂常用于食品工业中,但其种类和用量均受到严格控制,如我国《食品安全国家标准食品添加剂使用

基金项目:湖南省自然科学基金(2021JJ70085),湖南省卫健委科研项目(B20140134、B20160073、C20190035)

作者简介:陈东洋(1983-),博士,副主任技师,主要从事理化检验技术研究工作。

通信作者:王一红, E-mail: goodlucklkh@163.com。

标准》(GB 2760-2014)明确限定了色素允许添加的范围和限量。但为躲避监管,减低成本及获得更好的着色效果,人工合成染料也常被非法应用于食品工业中,给消费者带来潜在的危害和巨大的风险^[1]。喹啉黄、酸性橙 12、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性红 2G、偶氮玉红、亮黑、荧光桃红主要用于纺织、印染工业中^[2-3],由于这些染料与蛋白质结合很牢,性质稳定,不易褪色,且价格低廉,常被非法使用于肉及肉制品生产和加工

中。其含有偶氮或氧杂蒽结构,有资料显示长期摄入此类化合物会致癌,对人体健康造成严重威胁^[4]。因此加强对此类可能非法使用合成染料的监测十分必要。

目前测定偶氮类或氧杂蒽类染料的方法主要有光谱法^[5]、液相色谱法^[6-7]、气相色谱质谱法^[8]、液相色谱串联质谱法^[9-10]等。其中超高效液相色谱法由于分离度好、速度快,测定成本低,在染料的测定获得广泛应用。此外,肉及肉制品基质复杂,直接提取上机,对后续测定带来很大干扰,尤其高油高脂类食品对色谱柱及色谱系统带来严重损害,因此必须对其进行净化预处理^[11]。当前主要前处理方法有固相萃取^[12]、固相微萃取、分子印迹固相萃取、基质固相分散法等,其中固相萃取法作为一种成熟的前处理方法得以广泛应用。闻威等^[13]以多孔芳香骨架作为固相萃取吸附剂测定辣椒粉中 4 种染料,检出限低至 1.5 μg/kg,加标回收率为 76.5%~89.8%。本课题组^[14]采用商品化 HLB 柱对 10 种偶氮类染料进行纯化和富集,获得了良好的回收率和较高的灵敏度。本研究针对目前研究较薄弱的 8 种水溶性染料建立了固相萃取-高效液相色谱法,系统考察固相萃取参数,优化测定条件,为该类食品中合成染料的监测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);超声波清洗仪(德国 elnma 公司);TGL16 高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);0.2 μm 有机滤膜(美国 Waters 公司)。喹啉黄、酸性红 2G、偶氮玉红、亮黑和荧光桃红购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;酸性橙 12、碱性橙 22 购自东京化成工业株式会社;碱性橙 21 购自上海安谱实验科技股份有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司);乙酸铵、氨水为优级纯,购自国药集团化学试剂有限公司;实验用水为经 Millipore 处理的一级水;其他试剂除特别说明,均为分析纯。WAX 固相萃取柱(60 mg,3 ml)、HLB 固相萃取柱(60 mg,3 ml)、MAX 固相萃取柱(60 mg,3 ml)和 C₁₈ 固相萃取柱(60 mg,3 ml)均购自美国 Waters 公司。

1.2 实验条件

1.2.1 样品前处理 取肉及肉制品可食部分,粉碎均匀。称取 5.0 g 样品于 50 ml 离心管中,加入 20% 甲醇水定容至 50 ml,超声提取 30 min,涡旋混匀,离心。固相萃取柱预先依次用 3.0 ml 甲醇、3.0 ml 水进行活化后,取上清液 10.0 ml 样液通过 WAX 固相萃取柱,用 5 ml 20% 甲醇淋洗,抽干,用 6.0 ml 10% 氨水甲醇洗脱,收集洗脱液,氮气将洗脱液吹至近干,1.0 ml 20%

甲醇复溶,经 0.2 μm 有机滤膜过滤后进行超高效液相色谱仪(ultrahigh performance liquid chromatography, UPLC)分析。

1.2.2 测定条件 色谱条件—色谱柱:Leapsil C₁₈ 柱(2.1 mm×150 mm,5 μm);柱温:30 ℃;流动相:B 为甲醇,D 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液,梯度程序见表 1;流速:0.50 ml/min;进样量:2.0 μl;检测波长:喹啉黄为 415 nm,酸性橙 12、碱性橙 21、碱性橙 22 为 490 nm,酸性红 2G 为 536 nm,偶氮玉红为 519 nm,亮黑为 577 nm,荧光桃红为 546 nm,见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱程序

时间(min)	B (%)	D (%)
0.0	10	90
1.0	10	90
2.0	50	50
10.0	80	20
12.0	80	20
12.1	10	90
14.0	10	90

1.2.3 标准溶液配制 分别准确称取 8 种染料标准品并按照其纯度折算,用甲醇溶解、定容至 10 ml 容量瓶中,制备成 1.0 mg/ml 标准储备液。分别取 0.50 ml 标准储备液到 10 ml 容量瓶中用甲醇稀释制备成 50 mg/L 的标准中间液;临用前,用初始流动相稀释成浓度为 0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg/L 混合标准系列。按 1.2.2 测定条件,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。

2 结果

2.1 方法线性范围及检出限 在确定最佳测定条件下,8 种染料在 0.050~50.0 mg/L 浓度范围线性关系良好,相关系数 $r \geq 0.9990$ 。以仪器信噪比(signal to noise, S/N)为 3 时所对应的标准溶液浓度为仪器检出限,根据前处理方法,方法的检出限为 0.008~0.06 mg/kg,见表 2。

表 2 8 种染料的线性关系及检出限

名称	线性范围 (mg/L)	回归方程	相关系数(r)	检出限(mg/kg)
喹啉黄 QYN2 I	0.20~50	$y = 4\,295.6x + 295.15$	0.9991	0.04
喹啉黄 QYN2 II	0.50~50	$y = 1\,836.9x - 171.88$	0.9996	0.06
喹啉黄 QYN1	0.20~50	$y = 4\,875.6x - 420.79$	0.9993	0.04
喹啉黄 QYN2	0.10~50	$y = 10\,874x + 445.51$	0.9990	0.02
酸性橙 12	0.10~50	$y = 12\,149x + 4\,259.5$	0.9995	0.02
碱性橙 21	0.10~50	$y = 26\,638x - 3\,340.9$	0.9992	0.01
碱性橙 22	0.10~50	$y = 31\,341x - 6\,617.6$	0.9990	0.01
酸性红 2G	0.10~50	$y = 12\,304x - 1\,257.2$	0.9991	0.02
偶氮玉红	0.10~50	$y = 11\,681x - 3\,550.5$	0.9993	0.02
亮黑	0.20~50	$y = 8\,723.6x - 3\,466$	0.9998	0.03
荧光桃红	0.050~20	$y = 39\,003x + 1\,138.9$	0.9994	0.008

2.2 方法回收率及精密度 以香肠和鱼肉为典型样品,在样品中添加 3 个水平的混合标准溶液,每个添加浓度平行测定 6 次。按 1.2.1 进行前处理并分析,计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation,

RSD)。8 种染料回收率为 81.1%~108.4%,RSD 为 1.8%~6.1%,结果表明建立的方法重复性好,回收率结果满意,见表 3。

表 3 方法回收率和相对标准偏差(n=6)

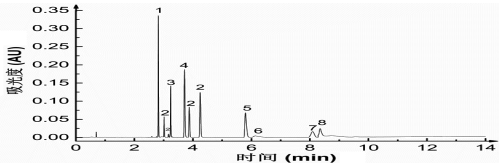
化合物	香肠				鱼肉			
	本底值(mg/kg)	加标水平(mg/kg)	回收率(%)	RSD(%)	本底值(mg/kg)	加标水平(mg/kg)	回收率(%)	RSD(%)
喹啉黄	-	2.5	105.4	2.1	-	2.5	98.2	4.9
		5.0	102.7	1.8		5.0	103.1	5.6
		10.0	104.5	2.0		10.0	97.8	3.6
酸性橙 12	-	0.20	101.1	2.5	-	0.20	88.8	3.2
		0.40	89.3	2.4		0.40	93.4	4.2
		0.80	103.4	1.9		0.80	98.6	3.1
碱性橙 21	-	0.20	81.4	3.9	2.09	1.0	87.8	4.1
		0.40	83.1	3.6		2.0	93.4	4.7
		0.80	81.7	3.4		4.0	92.3	5.1
碱性橙 22	-	0.20	81.1	3.6	-	0.20	85.8	2.4
		0.40	82.9	3.5		0.40	87.9	2.9
		0.80	81.8	3.2		0.80	90.6	3.6
酸性红 2G	2.48	1.2	108.4	2.5	-	0.20	97.8	5.8
		2.4	106.7	2.1		0.40	95.4	4.2
		4.8	107.5	2.2		0.80	101.6	3.2
偶氮玉红	-	0.20	101.3	2.6	-	0.20	99.8	1.9
		0.40	104.6	2.5		0.40	102.4	2.2
		0.80	104.2	2.2		0.80	92.6	2.1
亮黑	-	0.20	101.7	2.9	-	0.20	97.5	5.2
		0.40	99.8	2.7		0.40	103.4	4.7
		0.80	100.7	2.5		0.80	98.4	5.1
荧光桃红	-	0.10	82.8	3.2	-	0.10	87.8	3.8
		0.20	83.4	3.2		0.20	84.2	3.4
		0.40	82.6	3.1		0.40	96.6	6.1

2.3 实际样品检测 采用上述方法对猪肉、鱼肉及肉制品共 23 份样品进行检测,在一香肠样品检出酸性红 2G,含量为 2.48 mg/kg。在一鱼肉样品中检出碱性橙 21,含量为 2.09 mg/kg。因此仍需加强对肉类及肉制品中禁用染料的监测。

3 讨论

3.1 液相条件的优化 分别考察 T3、Leapsil C₁₈ 柱色谱柱和甲醇-5 mmol/L 乙酸铵、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(0.1%氨水)流动相体系对 8 种染料的分离效果。发现 T3 柱对极性物质保留效果好,但色谱峰分离困难,Leapsil C₁₈ 柱能实现较好的分离效果。流动相体系加酸或加碱后色谱峰出现拖尾现象,峰形较差。而乙腈洗脱能力强于甲醇,导致部分色谱峰重叠,分离较差,甲醇-5 mmol/L 乙酸铵体系能获得良好的分离度和峰形。进一步考察乙酸铵浓度(2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mmol/L)对分离度的影响,发现乙酸铵浓度为 5 mmol/L 即可获得较好的分离效果。值得注意的是 8 种色素出现了 11 个色谱峰,这是因为喹啉黄为 2-(2- 喹啉基)- 茛满基-1,3- 二酮单磺酸钠盐(QYNa)

和 2-(2- 喹啉基)- 茛满基 -1,3- 二酮二磺酸二钠盐(QYNa₂)的混合物,且 QYNa、QYNa₂ 各存在两个同分异构体,按时间前后分别为 QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II^[15]。用峰面积归一化法对喹啉黄各组分的质量分数进行计算,含量分别为 19.42%、7.66%、22.30%、46.58%,基本和文献报道的含量一致^[16],见图 1。



注:1-亮黑;2-喹啉黄(保留时间前后分别为 QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II);3-酸性红 2G;4-偶氮玉红;5-酸性橙 12;6-碱性橙 21;7-碱性橙 22;8-荧光桃红。

图 1 8 种水溶性染料标准色谱图

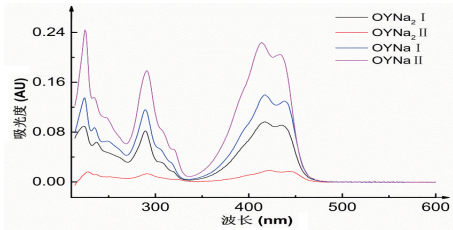


图 2 喹啉黄 4 种同分异构体的光谱图

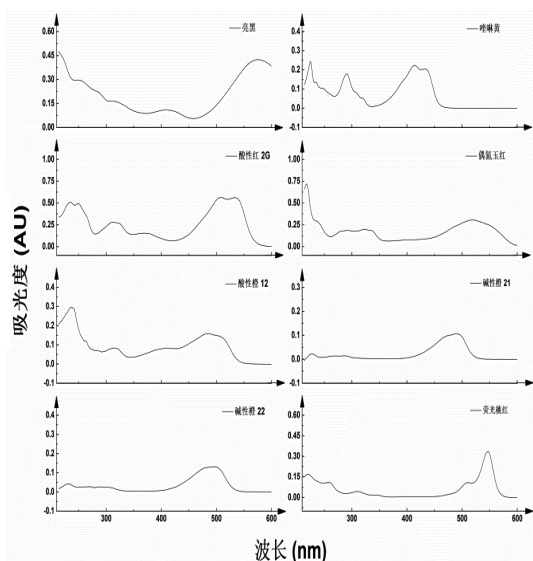


图 3 8 种水溶性染料的光谱图

在确定的最佳分离条件下,优化 8 种染料最大吸收波长以减少干扰并提高灵敏度。光谱表明亮黑在 577 nm,酸性橙 12 在 484 nm,酸性红 2G 在 536 nm,偶氮玉红在 519 nm,荧光桃红在 546 nm 有最大吸收;碱性橙 21 和碱性橙 22 光谱图类似,最大吸收波长为 493 nm;喹啉黄的 4 种组分最大吸收波长相同为 415 nm,见图 2。图 3 为 8 种染料的特征光谱图。

3.2 固相萃取条件的优化 考察 C_{18} 柱、HLB 柱、MAX 柱和 WAX 柱的净化富集效果,结果表明 WAX 柱回收效率最好,回收率为 81.2%~98.7%;其次为 HLB 柱, C_{18} 柱,回收率分别为 39.5%~85.5% 和 27.7%~80.7%;MAX 柱的回收率最差,回收率为 24.8%~36.7%。MAX 柱是强阴离子交换柱,对酸性色素的保留能力太强,难以洗脱下来,导致回收率偏低。

选择甲醇、10%氨水甲醇、乙腈、10%氨水乙腈各 10 ml 对吸附在 WAX 柱的染料进行洗脱,实验结果表明在甲醇中添加氨水以中和吸附剂电荷能提高洗脱能力,10%氨化甲醇回收率达到 80%以上;其次为 10%氨水乙腈,回收率为 73.4%~85.8%,甲醇和乙腈的洗脱能力较弱,因此选择 10% 氨化甲醇作为洗脱溶剂。

洗脱液体积也是固相萃取操作的重要参数,本实验考察了 5.0、6.0、8.0、10.0 ml 10%氨化甲醇对 8 种染料的洗脱效果。当洗脱体积达 6.0 ml 时,回收率趋向平衡,各个物质的回收率较好,因此选用 6.0 ml 10%氨化甲醇为洗脱液。

4 结 论

通过固相萃取纯化,高效液相色谱法测定,建立了能够同时测定肉及肉制品中含有的喹啉黄、酸性橙

12、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性红 2G、偶氮玉红、亮黑、荧光桃红禁用染料的超高效液相色谱法。待测组分的色谱峰分离效果好,8 种染料方法回收率在 81.1%~108.4%间, RSD 为 1.8%~6.1%,检出限为 0.008~0.06 mg/kg。方法灵敏,准确,并具有良好的重现性、稳定性,操作简便。可用于肉及肉制品中喹啉黄、酸性橙 12、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性红 2G、偶氮玉红、亮黑、荧光桃红 8 种水溶性染料的同时检测。

参考文献

- [1] Chien YS, Chang CW, Huang CC. Differential surface partitioning for an ultrasensitive solid-state SERS sensor and its application to food colorant analysis[J]. Food Chem, 2022, 383:132415.
- [2] Sun Y, Li W, Zhao L, et al. Simultaneous SERS detection of illegal food additives rhodamine B and basic orange II based on Au nanorod-incorporated melamine foam[J]. Food Chem, 2021, 357:129741.
- [3] Srinivasan S, Sadasivam SK. Biodegradation of textile azo dyes by textile effluent non-adapted and adapted *Aeromonas hydrophila*[J]. Environ Res, 2021, 194:110643.
- [4] Chandru M, Rani SK, Vasimalai N. Reductive degradation of toxic six dyes in industrial wastewater using diaminobenzoic acid capped silver nanoparticles[J]. J Environ Chem Eng, 2020, 8(5):104225.
- [5] 刘攀颜,陈碧清,袁珊珊,等. 近红外光谱法测定染色红花中常见染料含量[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8):1537-1544.
- [6] 刘瀚升. 高效液相色谱法测定熟肉制品中罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G 方法的研究[J]. 实用预防医学, 2016, 23(1):108-110.
- [7] Dong MY, Wu HL, Long WJ, et al. Simultaneous and rapid screening and determination of twelve azo dyes illegally added into food products by using chemometrics-assisted HPLC-DAD strategy[J]. Microchem J, 2021, 171:106775.
- [8] Balçık U, Chormey DS, Ayyidiz MF, et al. Liquid phase microextraction based sensitive analytical strategy for the determination of 22 hazardous aromatic amine products of azo dyes in wastewater and tap water samples by GC-MS system[J]. Microchem J, 2020, 155:104712.
- [9] 刘军,李道霞,唐昌云,等. 食品中 17 种工业染料的液质联用检测方法研究[J]. 食品科技, 2021, 53(10):298-305.
- [10] 刘瑜,张柏珉,毕孝瑞,等. 超高效液相色谱-四极杆串联离子阱复合质谱法测定肉制品中非法添加的碱性工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16):6343-6348.
- [11] Tikhomirova TI, Ramazanova GR, Apyri VV. Adsorption preconcentration of synthetic anionic food dyes[J]. J Anal Chem, 2017, 72(9):917-934.
- [12] Liu W, Fizar M, Hu F, et al. Mixed hemimicelle solid-phase extraction based on magnetic halloysite nanotubes and ionic liquids for the determination and extraction of azo dyes in environmental water samples[J]. J Chromatogr A, 2018, 1551:10-20.
- [13] 闻威,张文芬,张岩皓,等. 多孔芳香骨架吸附剂-固相萃取-高效液相色谱法同时测定辣椒粉中 4 种偶氮类染料[J]. 色谱, 2019, 37(5):491-498.
- [14] Chen DY, Zhang H, Feng JL, et al. Research on the determination of 10 industrial dyes in foodstuffs[J]. J Chromatogr Sci, 2017, 55(10):1021-1025.
- [15] 孙小杰,胡文彦,凌睿. 固相萃取-液质联用法测定酒、糖果、巧克力中的喹啉黄[J]. 中国食品添加剂, 2015, 26(12):154-157.
- [16] 孙小杰,宋佳,尹华涛. 喹啉黄中各组分的定性及定量研究[J]. 化学分析计量, 2015, 24(3):55-58.

收稿日期:2022-05-18