

食品添加剂/非法添加检测



HPTLC 同时测定食品中的 13 种非法添加色素的含量



从左至右: Matthias Bleisch 和 Dr. Helmut Kandler

苏黎世国家实验室是瑞士苏黎世州的官方食品控制机构。为了保证食品安全，该实验室积极采纳各种新的及改进的分析方法，但前提是方法必须可靠。几年来食品分析实验室主任 Helmut Kandler 博士和他的团队一直致力于将 HPTLC 方法作为其它技术的有益补充。在和位于瑞士 Muttensz 的 CAMAG 实验室的 Eike Reich 博士和 Valeria Widmer 的协作下，一种用来检测调味品中非法添加色素的快速和可靠的分析方法被发展并通过了方法学验证。

简介

近年来多个欧洲国家都在市场上的红辣椒粉中发现了偶氮类染料苏丹红 I-IV。这些红色和橙色的染料都属于致癌物，因此被禁止应用于食品当中。为了冒充高质量的产品，这些掺伪物被人为加入以改善调味品的天然色泽。

该经过验证的反向 HPTLC 方法自 2007 年起被成功地用于苏黎世州实验室的日常检验之中。特别是对辣椒粉，咖喱粉和香料混合物进行苏丹 I、II、III、IV、苏丹红 7B、苏丹红 G、苏丹红 G、苏丹红 7B、对位红、FD&C

橙色 2 号、甲基黄、橘红 2 号、甲苯胺红和分散橙 11 号等非法色素在可见光下目测评价。然后通过光密度扫描和加样回收率实验对阳性样本进行进一步的确认和定量。典型的掺伪品所受到的污染通常高于 100 mg/kg。

对照品溶液的制备

将各 20 mg 的苏丹 I、II、III、IV、苏丹红 7B、苏丹红 G、苏丹红 G、苏丹红 7B、对位红、FD&C 橙色 2 号、甲基黄、橘红 2 号、甲苯胺红和分散橙 11 号分别溶于丙酮和乙腈中，并定容至 100 mL (200 µg/mL 储备液)。将待检测的 5 mL 各储备液混合并蒸干 (50°C, 120 hPa)，将残渣用乙腈 10 mL 溶解 (色素的浓度: 各 100 µg/mL 在对照品混合液 MIX 1 和 MIX 2 中)。

供试品的制备

5 g 均质后的样品加 50 mL 乙腈搅拌提取 10 min，继而过滤。在 10 mL 中的滤液中逐滴加入 FeCl₃ (5 mg/mL 的乙腈溶液)，直至溶液颜色由红色转为绿色 (大约需要 0.3-0.8 mL)。将溶液蒸干，残渣加 1 mL 碱性二氯甲烷 (250 mL 二氯甲烷中加入 10 mL 25% 氨水震荡分层) 溶解，并通过 SPE 硅胶小柱纯化。将洗脱液蒸干，残渣加 1 mL 乙腈溶解。

掺标样品

在 100 mL 锥形瓶中加入 5 g 未受污染的空白样品，再各加入 0.5、1.5、3、4.5 及 6 mL 的混合对照品 MIX 1 和 MIX 2。加乙腈定容至 50 mL，并按上法操作 (样品掺标的浓度在 10 - 120 mg/kg)。

薄层板

HPTLC RP₁₈ F₂₅₄ 高效预制薄层板, 10x10 cm 和 20 x 10 cm, 德国 Merck。

点样

采用 Linomat 5 进行条带状点样，条带宽 8 mm，原点距离底边 8 mm，距离侧边最小 15 mm，轨道间距最小 10 mm，点样量：样品 10 μL ，对照品 1 – 12 μL (1:10 稀释后点 3 – 15 μL)。

色谱条件

在全自动展开仪 ADC 2 中进行，以乙腈 – 25% 氨水为展开剂，展开距离 60 mm (从薄层板底边计)。

成像

采用 DigiStore 2 或 TLC Visualizer 薄层成像系统在白光下以反射模式进行拍照和存档。

薄层光密度扫描

采用 TLC Scanner 3 多波长扫描模式和 winCATS 工作站软件在各个染料的最大吸收波长下进行扫描测定。

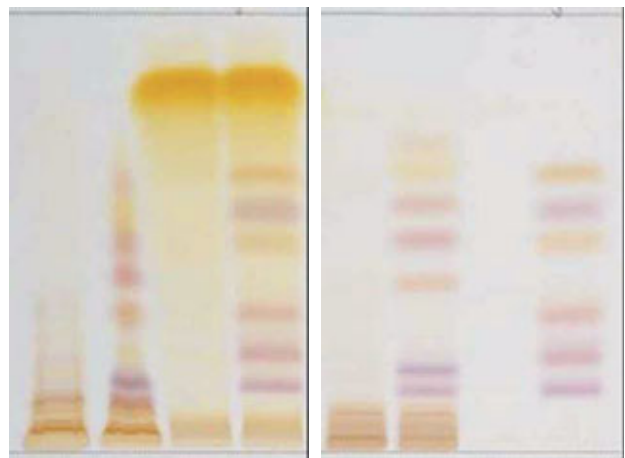
Mix 1	R_f	R_{ref}		R_{ref}	R_f	Mix 2
Para Red	0.60	1.22		1.38	0.66	Disp. Orange 11
Citrus Red 2	0.54	1.10		1.23	0.59	Butter Yellow
Sudan I*	0.49	1.00		1.10	0.53	Toluidine Red
Sudan II	0.33	0.67		1.00	0.48	Sudan Red G*
Sudan III	0.23	0.47		0.83	0.40	FD&C Orange 2
Sudan IV	0.16	0.33		0.44	0.21	Sudan Red 7B
-	-	-	0.31	0.15	Sudan Red B	

色素	λ_{max} (nm)	色素	λ_{max} (nm)
Sudan I	495	Sudan Reg G	514
Sudan II	508	Sudan Red B	533
Sudan III	523	FD&C Orange 2	502
Sudan IV	534	Butter Yellow	453
Para Red	498	Toluidine Red	522
Citrus Red 2	529	Disperse Orange 11	488
Sudan Red 7B	551		

结果和讨论

样品提取环节对于分析来讲非常关键。通过添加三价铁的盐酸盐溶液将调味品中的天然色素氧化为无色衍生物从而达到了选择性地提取合成色素的目的。随即的

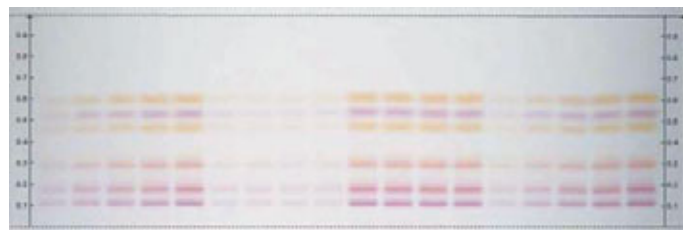
固相萃取纯化步骤将样品的基质干扰进一步降低。



氧化步骤对色谱图的影响

A: 不进行氧化; B: 采用 FeCl_3 进行氧化; 1,1': 红辣椒空白样品; 2,2': 红辣椒空白样品加入 50 mg/kg 量的混标 MIX 2; 3,3': 咖喱空白样品; 4,4': 咖喱空白样品加入 50 mg/kg 量的混标 MIX 1。

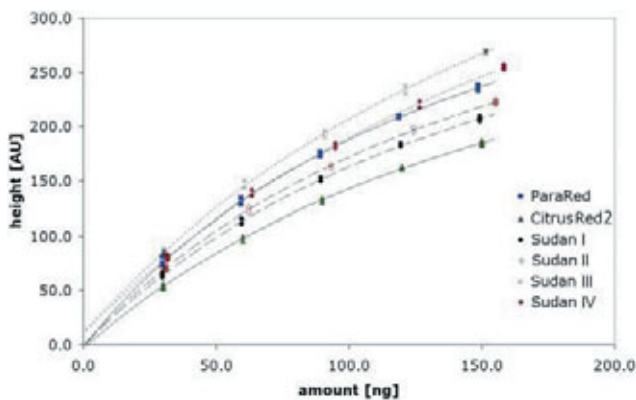
该方法作为日常检测手段经过了方法学验证，包括回归工作曲线、加样回收率、精密度、重现性和检测限。初始的低浓度 (30 – 50 ng/斑点) 和高浓度 (100 – 1200 ng/斑点) 工作曲线通过 Michaelis-Menten 2 回归函数加以建立。



混标 MIX 1 色谱图

最低和最高浓度被分别点样 5 遍 (板中央)，不同水平的工作曲线浓度被重复点样 2 次 (板左侧和右侧)

加样回收率测试在加入 10 – 120 mg/kg 量的混标的红辣椒和咖喱中进行。样品的回归曲线和标准品溶液的回归曲线具有可比性。降低的值和样品制备过程中成分的少量损失呈现相关。在少数情况下，由于部分基质的干扰 (如检测红辣椒中的苏丹 I) 导致二者的结果存在一定的偏差。

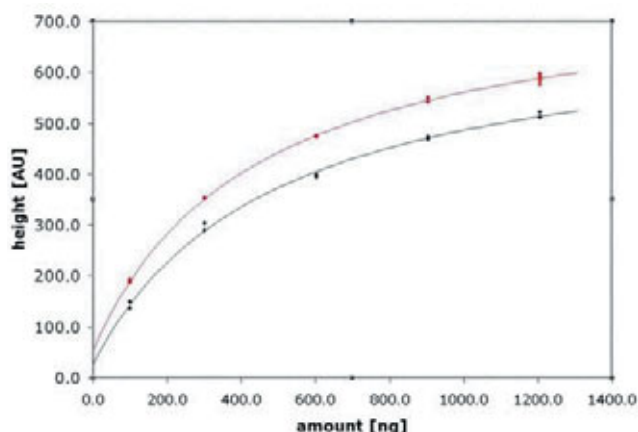


MIX1 所有成分在低浓度的工作曲线

13 种色素的工作曲线 (MIX 1, 2)	最低含量的 RSD%值	最高含量的 RSD%值	SDV (%)
低含量工作曲线	2.3-6.7	0.5-2.9	1.2-3.8
高含量工作曲线	0.7-6.4	0.3-4.3	0.5-4.8

对基质效应的观察结果显示可靠的加样回收率是难以达到的。因此不再进一步针对每个色素成分的加样回收率进行测定。

在进行方法精密度测定时，在 6 个红辣椒和咖喱的样品中分别掺入 50 mg/kg 的混标溶液 MIX 1 和 MIX 2。并且采用加样回收率对含量进行校正。



回归曲线的比较：标准品溶液苏丹红 B (红色曲线) 和咖喱粉中的苏丹红 B (蓝色曲线)

实际最低检测限 (LOD) 通过掺标样品的加样回收率进行校正 (范围 1 – 17 mg/kg)。与肉眼观察相比，光密度扫描的 LOD 值要降低 1 倍。

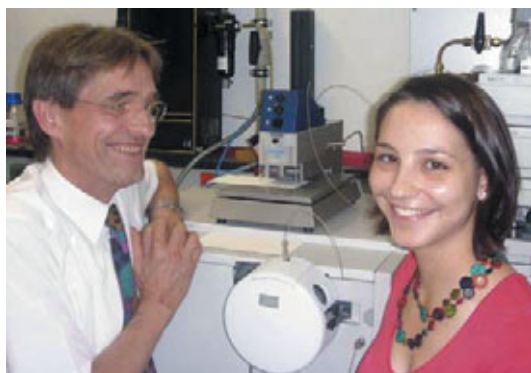
	LOD (可见光)	LOD (光密度法)
咖喱	约 3 mg/kg (例外: 5 mg/kg 苏丹 I, 7 mg/kg 甲基黄和 13 mg/kg 分散橙)	1 – 3 mg/kg (例外: 7 mg/kg 分散橙)
辣椒	约 3 mg/kg (例外: 5 mg/kg 苏丹 I 和甲基黄, 12 mg/kg 分散橙)	1 – 3 mg/kg

对市售商品的调查显示受过污染的调味品样品中所含非法添加色素的含量一般都高于 100 mg/kg。之所以没有低于这个剂量水平的受污染样品被发现是由于较低的染料浓度达不到为产品增加色泽的目的。综上所述，本文的 HPTLC 方法可用于对调味品中所含有的非法添加色素进行快速、灵敏和可靠的分析。

[1] H. Kandler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 32 (2009) 1273

Contact: Dr. Eike Reich, CAMAG Laboratory, Sonnenmattstr. 11, 4132 Muttenz, Switzerland. eike.reich@camag.com

Nano-HPTLC-MS 同时测定食品中 8 种常见非法添加的脂溶性偶氮色素的含量



Prof. Dr. Wolfgang Schwack 和 Elodie Pellissier

本文和本刊同期第 2-4 页瑞士苏黎世国家实验室的文章有着同样的分析目标，但采用的方法不同。然而，与当前的分析食物中偶氮染料的方法相比，两种新的 HPTLC 方法都显示出明显的优势。分析工作者可根据其任务选择最恰当的方法。

本文的内容基于 Elodie Pellissier (德国魏恩施蒂芬应用科技大学) 在德国斯图加特的霍恩海姆大学食品化学研究所完成的学士论文。

简介

法国在 2003 年从来自印度的辣椒中检测出苏丹 I。这是欧盟食品和饲料快速预警系统 (RASFF) 成立后首次对成员国发出警报。接下来，越来越多的产品被发现含有违禁的脂溶性偶氮色素如苏丹 I-IV 和苏丹红 7B (在国际癌症研究总署 (IARC) 被划为 3 类致癌物)，以及苏丹红 B、苏丹橙 G 和对位红。仅自 2008 年至 2009 年上半年，就有 60 多起案例被 RASFF 通报 [1]。

高效薄层色谱法在样品的快速和低基质干扰的高通量筛选方面是不二选择。对于对可见光有强吸收的偶氮类染料而言，检测效果非常突出。除了和数据库的紫外/可见光谱对比外，质谱联用提供了进一步确认阳性结

果的能力。采用 Cerno Bioscience 公司的 MassWorks 软件，分析者甚至能够从低分辨率质谱数据中计算得出精确分子量和元素组成。因此，一种快速可靠的对有关色素进行鉴别和定量分析的 HPTLC 方法被开发和用来检测单味调味品和混合调味品粉末 (红辣椒、咖喱和灯笼椒等)。该方法正在进行评价并延伸到酱类食品的检测中。

标准品溶液的制备

将苏丹 I (I)，苏丹 II (II)，苏丹红 B (B)，苏丹橙 G (OR) 和 4-二甲氨基偶氮苯 (内标, IS) 各 10 mg 溶解于 5 mL 丙酮中。将苏丹 III (III)，苏丹 IV (IV)，苏丹红 7B (7B) 和对位红 (PR) 各 5 mg 溶解于 15 mL 丙酮中。溶液加甲醇定容至 20 mL，制备为 0.5 mg/mL 的储备液。

精密移取各储备液 200 μ L，混合后加甲醇定容至 10 mL (含各染料 10 ng/ μ L)，即为混合对照品溶液。同样的 1:50 稀释的内标溶液被用来覆盖点样。

供试品溶液的制备

将均质后的调味料样品 1 g 加入 20 mL 具盖的离心管中。加入 1 mL 内标储备液和 4 mL 丙酮，震荡 1 min，再加入 5 mL 甲醇。将样品管手工震荡 1 min，4000 rpm 离心。无需进一步前处理，上清液直接用于 HPTLC。

薄层板

HPTLC 高效薄层板 NANO-SIL-PAH, 20 x 10 cm, 德国 Macherey-Nagel (咖啡因浸渍)。

说明: 强烈推荐采用使用方便的商品预制板。如果需要, 可进行咖啡因改性, 方法为将硅胶 60 HPTLC 薄层板浸入咖啡因溶液 (1.7 g 咖啡因溶于 100 mL 乙腈中) 中 20 min, 继而在 120 $^{\circ}$ C 干燥 20 min。

点样

采用CAMAG ATS 4进行条带状点样，条带宽8 mm，原点距离底边8 mm，距离侧边24 mm，距左右两边最少15 mm，点样量：对照品1-20 μL ，并覆盖点样内标10 μL ；提取物样品4 μL 。

色谱条件

采用全自动展开仪ADC 2进行展开，在层析缸饱和10 min后，以异己烷-丁酮（5:1）进行展开，展开距离68 mm。薄层板活度通过碳酸钾饱和溶液（45 %相对湿度）控制4 min。

成像

在DigiStore 2中以白光照明方式（反射加投射）进行成像。

光密度扫描

采用CAMAG TLC Scanner 3和winCATS工作站软件在多个波长（390, 415, 500, 525和550 nm）下以吸收方式进行光密度扫描并记录光谱图(320-600 nm)。

质谱

质谱进样采用串联在Agilent 1100 LC/MSD系统中的配备椭圆形探头的TLC-MS接口装置，以ESI正离子模式进行。斑点提取溶剂为甲醇-0.1 %甲酸（95:5），流速0.2 mL/min。一根Chromolith RP-18(50 x 4.6 mm, Merck) 色谱柱串接在TLC-MS质谱接口和MSD之间。精确分子量通过MassWorks软件进行计算（Cerno Bioscience, Danbury, CT, USA）。

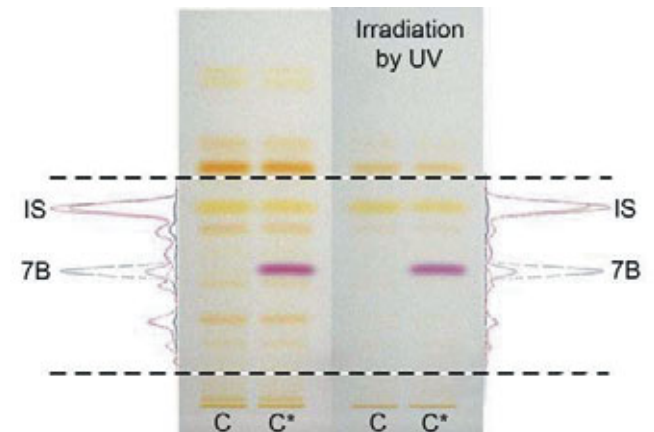
结果和讨论

8种近年来在调味品和植物油中最常见的非法添加色素[1]在咖啡因浸渍的硅胶板上的分离度最好。在方法开发阶段对不同的色谱系统进行了考察，然而在咖啡因改性的硅胶板上获得的谱图结果比在正向和反向硅胶板上都要好。苏丹IV和苏丹红B作为位置异构体在板上很难分开，即便对于LC/MS-MS系统来讲将区分二者也相当困难[2]。



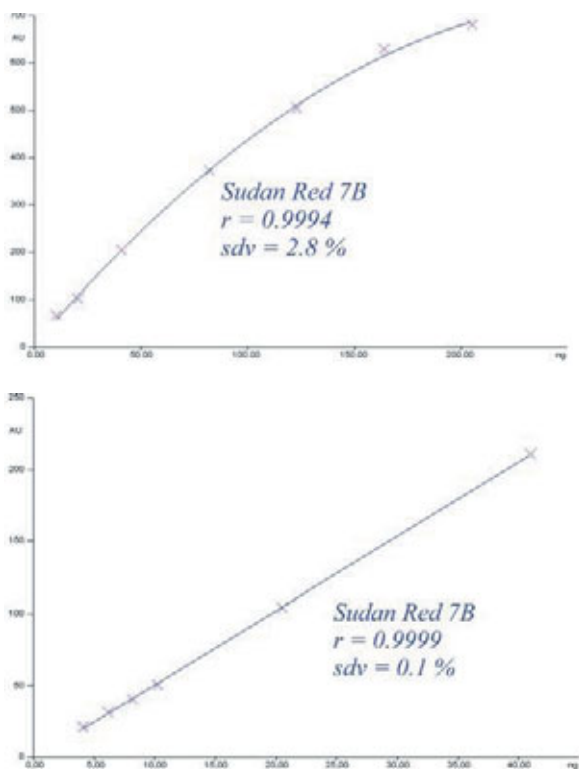
在咖啡因改性的NANO-SIL-PAH、HPTLC和RP18反向硅胶板上分离8种偶氮色素[3]

与文献报道不同，本方法未采用耗时的样品基质清除步骤，而是将样品直接点样于HPTLC薄层板上展开后通过照射强紫外线（600 W/m²）进行消除，最长5 min。结果显示基线上基本没有了基质成分的干扰。



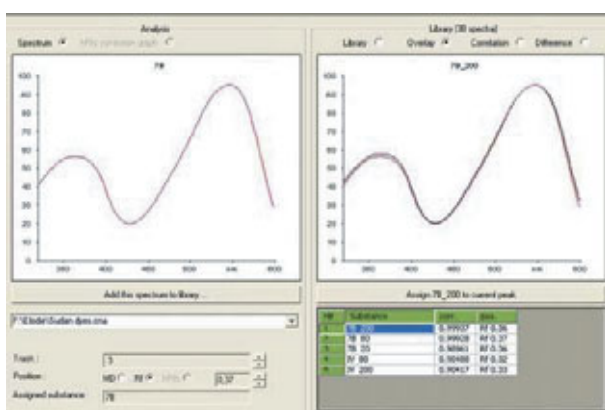
紫外辐射对于图谱混合物背景的影响（未加标C和加标C*的红辣椒样品，苏丹红7B, 500 mg/kg）

在扫描5个所选波长后，借助内标建立了一个多水平的工作曲线，主要用来校正样品制备时的损失量，用以进行含量测定。多元和线性回归方程分别用于高、低浓度的工作范围。该样品制备方法确立的检测限（LOD）大约为10 mg/Kg，该限度对于以增加调味品产品色泽为目的的非法添加而言已经足够。将点样量提高至4 μL 以上时LOD可进一步降低。



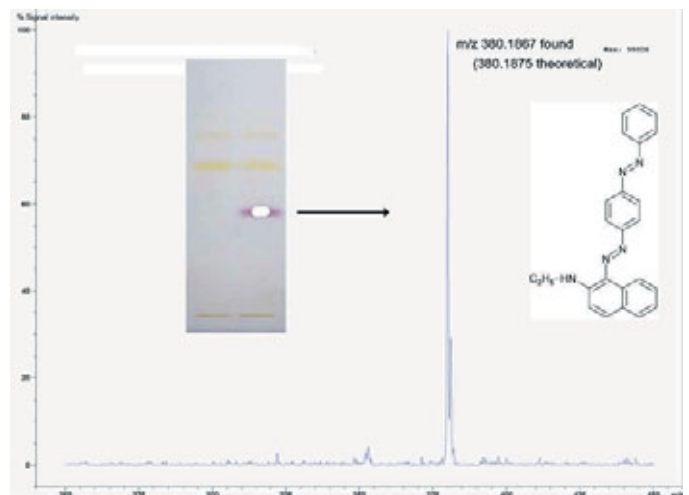
以苏丹红7B为范例的高(10-200 ng/斑点)、低(LOD起的4-40 ng/斑点)浓度样品的多元和线性工作曲线

为了确认样品中可疑成分的存在,其紫外/可见光谱可与光谱库中的每个色素的3个浓度水平的光谱进行相似度比较。



掺标样品中苏丹红7B的光谱(红色)和光谱数据库的命中记录(相关0.9994)

此外,可通过TLC-MS接口装置对可疑成分的斑点进行质谱测定来进行阳性结果的复核确认。通过采用MassWorks软件进行计算,即便单四级杆质谱仪也可获得经验分子式、精确分子量等辅助信息。



可疑成分斑点通过MassWorks软件进行精确分子量计算获得的HPTLC-MS光谱,作为苏丹红7B存在的第二证据

本文还首次采用了一种正交的在线HPTLC-HPLC-MS联用技术。除了用来分离随目标成分被一起萃取的薄层板改性用的咖啡因外,这个简单的连接方式实现了选择性的二维分离(C18色谱柱对硅胶薄层板)。因此,偶氮染料的结果可被方便地通过下列方式进行确认:1)紫外/可见光谱,2)质谱和3)不同选择性的第二维色谱装置。所有这些验证都可通过在一块HPTLC薄层板上平行分离大量样品后方便地得以进行。

[1] Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
 [2] H. San, F. Wang, L. Ai, J Chromatogr A 1164 (2007) 120
 [3] H. Kandler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich, J Liq Chromatogr Rel Technol 32 (2009) 1273

Further information is available from the authors on request.
 Contact: Prof. Dr. W. Schwack, University of Hohenheim, Institute of Food Chemistry, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, Germany, wschwack@uni-hohenheim.de

食品中25种水溶性色素的HPTLC同时含量测定



Claudia Oellig

在德国斯图加特的霍恩海姆大学食品化学研究所，平面色谱法基于其优势一直被用于食品分析。Claudia Oellig的毕业论文采用这项技术对水溶性食品色素进行了分析。

简介

为了提高食品安全，鉴于一些食品色素潜在的致癌性，近年来法定批准的可食用色素的种类显著降低。《欧洲国会和议会指导性法案94 / 36 / EG》对所许可的约40种食品色素的用法和许可用量都进行了详细规定。快速定量分析方法对于确保严格遵守上述法规至关重要。过去的TLC/HPTLC方法通常都局限于分离9至12种的食品色素。本文着眼于一项更艰巨的挑战，即开发出能够同时测定所有最常用的25种水溶性食品色素的HPTLC方法。

对比目前的食品色素分析方法，新的HPTLC方法是一种更可靠、快速和低成本的同时含量测定替代方法[1-3]。它允许在较低成本下进行1000个样品/

天的高通量筛选，平均每个样品的分析时间为1.5 min，溶剂消耗200 μL。由于分析目标比较明确，因此基本的结果阐述可以从薄层板的肉眼判别到吸收光谱的相似度计算直至HPTLC-ESI/MS质谱分析。目标物的分析步骤可根据需要循序渐进。

样品制备

市售食品样本采用甲醇-乙酸铵缓冲液(pH 6.8) 1:1进行稀释，必要时可进行脱气。

对照品溶液

将各色素对照品溶解于甲醇-乙酸铵缓冲液(pH 6.8) 1:1溶液中，配置成下表浓度：

MIX 1			MIX 2			MIX 3		
色素	浓度 (ng/μL)	hRf	色素	浓度 (ng/μL)	hRf	色素	浓度 (ng/μL)	hRf
E100	30	93	E103	50	86	E101	30	72
E101b	45	5	E104	100	55	E102	20	19
E110	20	57	E120	70	0	E105	25	53
E122	20	71	E121	125	93	E129	15	60
E124	15	27	E123	8	25	E133	8	26
E126	30	10	E125	60	72	E141Na	860	86
E127	10	93	E151	15	15	E141Cu	200	97
E131	10	40				E163	300	0
E132	200	0						
E142	8	23						

色素名称：E100:姜黄素、E101:核黄素、E101b:核黄素 b、E102:柠檬黄、E103:酸性橙、E104:喹啉黄、E105:坚牢黄 AB、E110:日落黄 FCF、E120:胭脂红酸、E121:橘红 2、E122:偶氮玉红、E123:苋菜红、E124:胭脂红 4R、E125:猩红 GN、E126:胭脂红 6R、E127:赤藓红、E129:诱惑红、E131:专利蓝 V、E132:靛蓝、E133:亮蓝、E141Cu:叶绿素铜盐、E141Na:叶绿素钠盐、E151:亮黑、E163:花青素。

薄层板

HPTLC硅胶60 F254高效薄层色谱板 (Merck), 20 x 10 cm, 采用甲醇-水 (4:1) 进行展开预洗。

点样

采用CAMAG ATS 4进行条带状点样, 18个轨道, 条带宽7.5 mm, 原点距离底边8 mm (对向展开时5 mm), 距离侧边24 mm, 轨道间距9 mm, 点样量: 样品2 μL , 混合标准品1-4 μL 。

色谱条件

在双槽层析缸中以乙酸乙酯-甲醇-水-醋酸 (65:23:11:1) 进行展开, 最大展开距离50 mm, 展开时间约12 min。也可采用全自动展开仪ADC 2进行展开, 或者在水平双向展开槽HDC中进行高通量样品展开。

成像

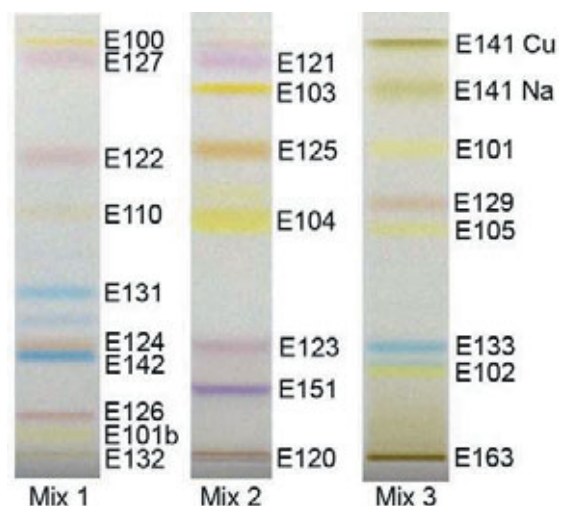
采用CAMAG TLC Visualizer在UV 254, UV 366 nm和白光下成像。

光密度扫描

- 采用VideoScan软件进行数字图像评估 (采用Savitsky Golay滤镜, 最低斜率作为基线校正) 或,
- 采用CAMAG TLC Scanner 3和winCATS软件在11个波长下吸收方式进行光密度扫描[1]。

光谱记录 (可见和MS)

- 采用TLC Scanner 3和winCATS软件记录可见光光谱图 (400 – 800 nm) 和计算光谱相似度 (样品和对照品) 或/和,
- 采用TLC-MS质谱接口装置取样 (甲醇洗脱, 流速0.2 mL/min), 测定HPTLC/ESI 质谱图。



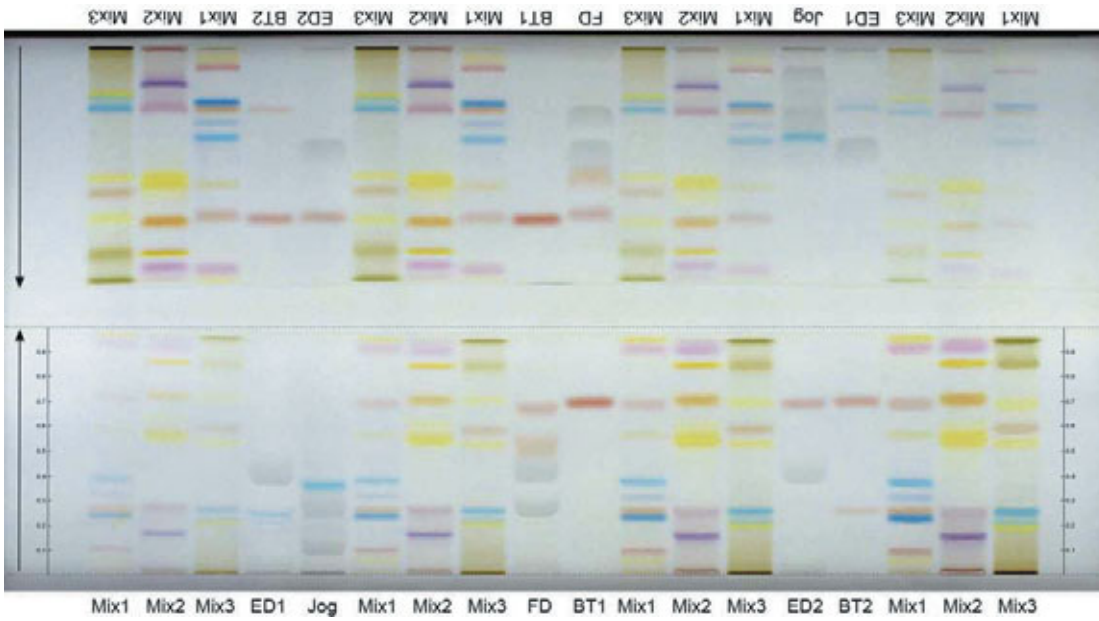
3组共25种水溶性食品色素混标的分离图谱 (部分色素纯度在50-85%之间)

结果和讨论

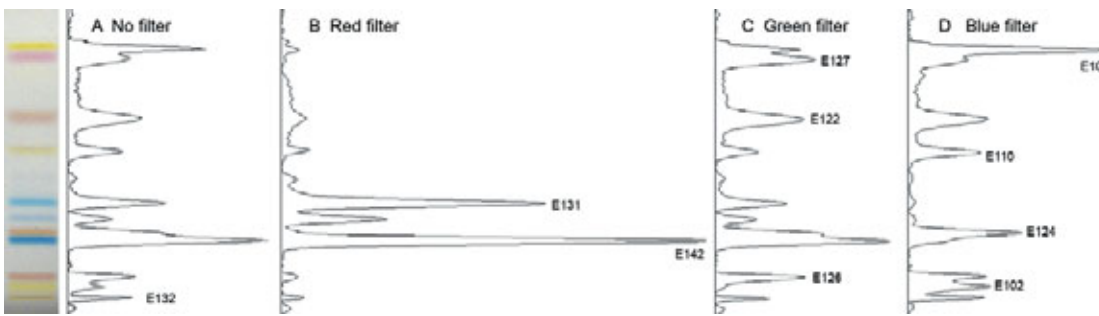
分离在硅胶板上以乙酸乙酯-甲醇-水-醋酸 (65:23:11:1) 为展开剂进行。1%的酸浓度对于获得尖锐的色谱峰至关重要。根据文件, 将食品色素分为不同的混合物组别以提高定量能力。

对于50 mm的展开距离, 分离时间为12 min。从双向展开时, 36个样品可得到同时展开。以单个样品计, 展开时间为20 s, 试剂消耗为200 μL , 耗材费用为0,01欧元/样品。包括样品制备, 点样和数字图像评估在内的样品总分析时间为1.5 min, 这一分析耗时即便与超高压液相色谱相比也毫不逊色。

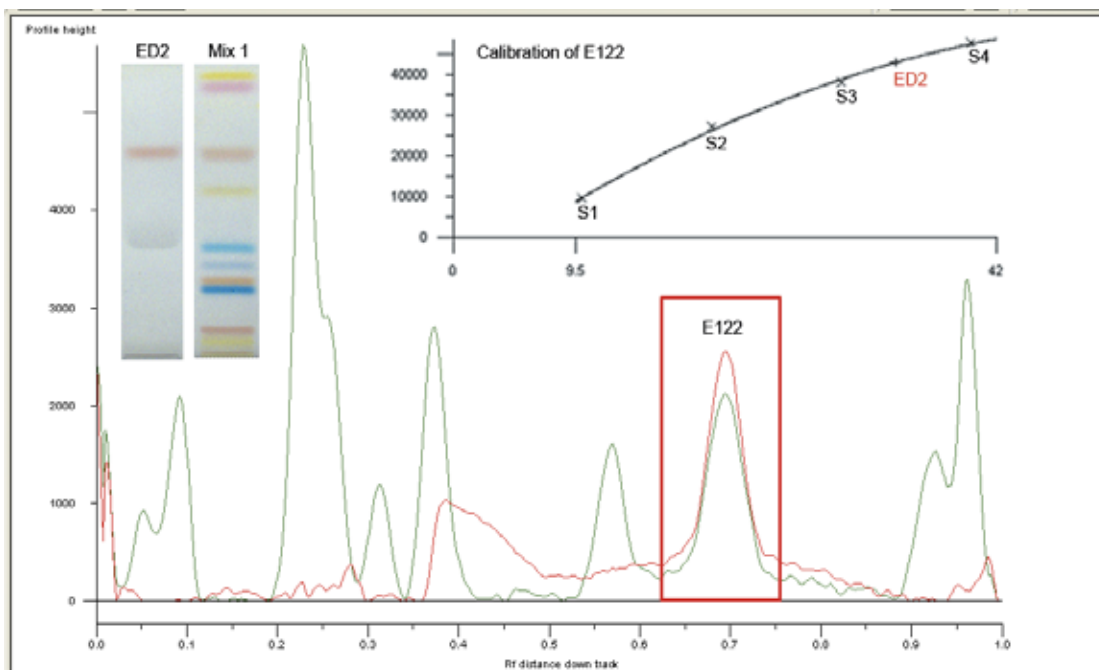
对于样品基质干扰较大的样品, 区域点样方式, 样品稀释以及强大的数字化图像评价被用来进行前处理工作。当个别样品中存在 R_f 值位于0的色素 (E120, E132, E163), 薄层板需要采用洗脱能力稍强的流动相进行展开, 例如采用45:35:18:2的比例进行2次展开 (1 cm展距, 6 s每次)。含量测定结果以UV/可见范围内的多波长扫描或数字图像方式进行定量。



12种食品样品中25种水溶性食品色素的12 min对向色谱展开结果(能量饮料ED, 酸奶JOG, 果汁FD, 面包上色浆BT)



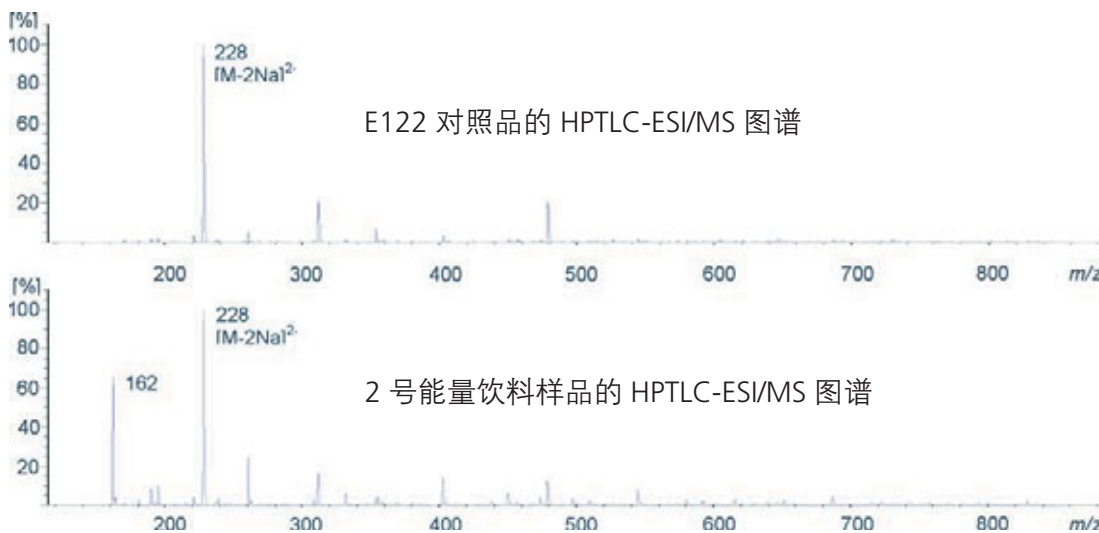
采用不同数字滤镜(B-D)的增强色谱分离度的数字图像评价(Mix 1)



稀释后的能量饮料样品2 (ED2) 的数字图像评价, 含有红色素E122 (Mix 1); 叠加样品图谱(红色)和Mix 1混标(绿色)图谱以及多项式回归曲线(基于峰面积)

样品	所含色素	含量	RSD (%)	样品和对照品光谱相关性 (400 – 800 nm)	质谱信号 (全扫描, M/Z 100-900)
面包上色浆	E122	66.4 g/L	0.0	≥ 0.99996	228 [M-2Na] ²⁻
	E124	13.3 g/L	2.1	≥ 0.99957	279 [M-2Na] ²⁻ 178 [M-3Na] ²⁻
能量饮料1	E133	9.1 mg/L	0.1	≥ 0.99964	373 [M-2Na] ²⁻
能量饮料2	E122	76.2 mg/L	3.6	≥ 0.99958	228 [M-2Na] ²⁻

基于任务需要，分析步骤可按要求选择从薄层板上样品的目测鉴别到判别吸收光谱图直至MS谱图测定。离线系统在此提供了一种低成本和灵活的高通量样品处理方式。



	HPLC [4]	HPTLC
流动相	0.58	0.003
固定相	0.64	0.11
耗材费用	0.04	0.0001
分析费用/样品 (€)	1.26	0.11
		(低11倍)
点样/进样		0.50
运行时间	43	0.20
检测时间		0.10
耗时/样品 (min)	43	0.80
		(快54倍)
实验耗时/40批样品	N/A	5 min

进一步资料可向作者索取：

- [1] G. Morlock, C. Oellig, J AOAC Int 92 (2009) 745
- [2] G. Morlock, W. Schwack, Die Aktuelle Wochenschau der GDCh (2009) week 21 and 26, www.aktuelle-wochenschau.de/index09.htm
- [3] G. Morlock, W. Schwack, GIT 9 (2009) 489–492
- [4] K. Miniotti et al., Anal Chim Acta 583 (2007) 103

Contact: Dr. G. Morlock, Institute of Food Chemistry, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, gmorlock@uni-hohenheim.de