

食品中色素检测的研究进展

Progresses on the detection of the food colours

戚平 刘佳 毛新武 赵金利 黄松

QI Ping LIU Jia MAO Xin-wu ZHAO Jin-li HUANG Song

(广州市食品检验所, 广东 广州 510410)

(Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou, Guangdong 510410, China)

摘要:文章详细介绍了食用色素和违禁染料的定义、分类、特点,以及国内外对于色素类检测技术的研究现状,提出了未来色素类检测技术的重点、难点和发展趋势。

关键词:食用色素;违禁染料;检测技术

Abstract: Food colours are added to different types of commodities to increase their visual attractiveness or to compensate for the natural colour variations. There is a growing concern about the safety of some commonly used legal food colourants with the widely used of synthetic colours. Additionally, a number of dyes with known or suspected genotoxic or carcinogenic properties have been shown to be added illegally to foods. The aim of this review was to summarize the definitions, classifications, properties, together with the detection technologies of the food colours and illegal dyes in both domestics and abroad. Moreover, the key points, difficulties and the developments of the detection technologies in food colours were also presented.

Keywords: food colours; illegal dyes; detection technologies

色泽、味道和形状是构成食品感官质量的三大要素,而色泽又是其中最重要的指标,将直接影响消费者是否购买。在现代食品工业中,随着食品种类的多样化及加工技术的发展,商家普遍使用着色剂(食用色素)来改善食品色泽,消除加工中不同批次间的颜色差异,从而达到提高附加值,吸引消费者的目的。然而,在工业化飞速发展的今天,受利益驱动,不法商贩向食品中非法添加工业色素的现象时有发生,国内外已经报道了多起有关色素的食品安全事故:2003 年烟台发生的“桃红”染色五香花生米,浙江苍南县的“工业橙”染色“乡巴佬”等卤制品,杭州的“碱性品绿”染色“毒海带”;2005 年欧盟在辣椒、肉灌肠等制品中检出苏丹红;2006 年河

北发现含苏丹红的红心鸭蛋;2011 年上海华联超市被报道销售多年的“染色馒头”,经查多个批次违规使用柠檬黄;2012 年重庆又被报道花椒中非法添加罗丹明 B;2014 年台湾产的豆干检出违禁染料二甲基黄和二乙基黄。这些事件严重危害了人们的身体健康,无不引起社会舆论的关注和人民群众的恐慌。因此,食品中色素的监管一直是食品安全的重点关注领域。本文系统介绍了食品中常见色素的种类、性质和检测技术,以期为加强食品中违禁染料的监督提供参考。

1 食用色素

食用色素按其来源主要分为食用天然色素和食用合成色素。目前,中国 GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》中规定,可应用于食品中的色素有 67 种,其中合成色素为 11 种,天然色素为 56 种。

食用天然色素主要是指动、植物组织中提取的色素,其中绝大部分来自植物组织,特别是水果和蔬菜(如叶绿素、姜黄色素、茶黄色素、番茄红等),还包括微生物色素(如红曲色素等)、动物色素(如紫胶红、胭脂虫红等)和无机色素(二氧化钛、氧化铁红等)。食用天然色素的使用历史悠久,使用范围广,且多数是食品原料,安全性高。然而,天然色素成本较高,保质期短;着色易受金属离子、水质、pH 值、氧化、光照、温度的影响,一般较难分散,染着性、着色剂间的相容性较差,牢固度较差。这些缺点限制其广泛应用,因此食品化学家又发明了食用合成色素,满足食品工业的需求。

食用合成色素主要是通过化学合成制得的有机色素,通常可分为偶氮类色素和非偶氮类色素。按化学结构进一步细分,可大致分为 6 类:① 偶氮类(azo),分子结构含有偶氮基($R_1-N=N-R_2$)的一类色素,通常有单偶氮(mono-azo)、双偶氮(di-azo)和多偶氮(poly-azo)类,偶氮结构具有优良的发色性能,通过调整偶氮结构的种类和比例可达到所需的颜色,因此种类最为庞大,常见的就有柠檬黄、日落黄、偶氮玉红、苋菜红、胭脂红、诱惑红、亮黑、棕色 HT 等;② 三芳基甲烷类(triarylmethane),该类色素分子结构的特点是甲烷

基金项目:广州市产学研重大民生项目(编号:2014J4100196);国家自然科学基金(编号:21605028)

作者简介:戚平,男,广州市食品检验所高级工程师,博士。

通信作者:毛新武(1970—),男,广州市食品检验所教授级高级工程师。E-mail: 390838972@qq.com

收稿日期:2018-05-09

的4个氢中3个被苯取代,一般为绿色,通常有二芳甲烷和三芳甲烷类,常见的三芳甲烷色素主要有亮蓝、专利蓝V、绿色S、坚牢绿、孔雀石绿等;③氧杂蒽类(xanthene),又称二苯并吡喃类,代表色素是赤藓红;④荧光酮类(fluorone),如荧光桃红、孟加拉玫瑰红;⑤喹啉衍生物(quinoline),如喹啉黄;⑥靛系染料(indigoid),如靛蓝。

此外,按溶解性又可分为油溶性色素和水溶性色素。油溶性色素毒性较大,现在各国基本不再用于食品着色,世界各国允许在食品中使用的合成色素几乎都是水溶性色素。

食用合成色素着色能力强,色泽稳定,受环境影响小,生产成本低,是目前食品工业所用的主要色素添加剂。但是,食用合成色素通常以萘、苯、甲苯等为主要原料,经过一系列磺化、硝化、卤化、偶氮化等有机反应合成得到,产物中多含苯环、氧杂蒽等结构,部分色素含有硝基,在人体经代谢后可生成具有致癌作用的*R*-萘胺,长期摄入这类物质会对人体产生毒害作用^[1-4]。大量摄入合成色素可能引起过敏、哮喘、喉头水肿、鼻炎、荨麻疹、皮肤瘙痒以及神经性头痛等症状,尤其是儿童在成长期间,若长期过量摄入合成色素,对生长发育会造成极为不利的影响。因此,世界各国对合成色素的使用种类,使用范围和使用量都做了严格限制,尽管它们都经过风险评估,安全系数相对较高的,但是仍有一定风险,超量超范围使用都是违法行为。

2 违禁染料

受商业利益驱使,除了滥用食用合成色素外,个别食品加工企业甚至向食品中非法添加违禁染料。这些违禁染料都是有毒的工业染料,能使其他物质获得鲜明而坚实的颜色,是人工合成的有机物,但主要用于溶剂、油、蜡、汽油增色以及鞋、地板等的增光。

违禁染料共同的特点是颜色鲜亮,不易褪色,其光泽具有持久性与稳定性,违法添加的工业色素可替代食用色素,减少生产成本,保持食品感官色泽光鲜持久。迄今,食品中易非法添加的工业染料已达40余种,按照检验性质分类,通常可以分为三大类:①阴离子染料(anionic),包括直接染料、酸性染料等,主要有酸性橙II、酸性红26、酸性大红GR、橙黄G、间胺黄、酸性间胺黄、金黄粉、橙黄II等;②阳离子染料(cationic),即碱性染料,包括碱性橙II、碱性嫩黄O、孔雀石绿、结晶紫、罗丹明B、罗丹明6G等;③非离子染料(non-ionic),即中性染料,包括苏丹红I~IV、苏丹橙G、苏丹蓝II、甲苯胺红、分散蓝、二甲基黄和二乙基黄等。

工业染料大都具有复杂的芳香结构,这些芳香结构主要来自煤焦油中的碳氢化合物,这些碳氢化合物包括苯、萘、葱、甲苯和二甲苯等,复杂的芳香结构使得染料更加稳定和更难生物降解。按照官能团还可以进一步分为:①偶氮类中性染料,如苏丹红I~IV、苏丹红7B、苏丹红G、分散黄3、分散橙3、二甲基黄、二乙基黄等;②偶氮类酸性染料,如酸性橙II、酸性红一号、酸性红26、酸性大红GR、橙黄G、间胺黄、酸性间胺黄、金黄粉、橙黄II、对位红等;③偶氮类碱性染料,如碱性橙II、碱性橙2、碱性橙21等;④苯甲烷类碱性染

料,如碱性嫩黄O、孔雀石绿、结晶紫等;⑤氧杂蒽类碱性染料,如罗丹明B、罗丹明6G、乙基罗丹明B、丁基罗丹明B、罗丹明110等;⑥蒽二酮类中性染料,如苏丹黄、苏丹橙G、苏丹蓝II、甲苯胺红等;⑦蒽醌类中性染料,如分散蓝1、分散蓝106、散蓝124、分散橙37、分散橙11等。

这些工业染料多为可诱发人体癌变,引起人体皮肤、黏膜或呼吸道过敏的致癌和致敏染料,频频出现在食品中,对人类健康造成了极大危害。为保障消费者健康,2008年起,中国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治领导小组陆续发布了6批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单》,其中可能违法添加的非食用物质名单中有10种常见工业染料,分别是碱性嫩黄O、碱性橙II、酸性橙II、苏丹红I~IV、玫瑰红B、孔雀石绿。

3 合成色素与违禁染料检测技术

目前,合成色素及违禁染料的检测方法很多,主要有:分光光度法、拉曼光谱法、荧光光谱法、免疫学法、高效液相色谱法和液相色谱质谱法等。

3.1 分光光度法

分光光度法主要是指紫外—可见分光光度法,该方法所需仪器设备少,检测成本低,测定简单基质食品(如饮料、黄酒)中日落黄、胭脂红和柠檬黄等常见食用着色剂的研究已相当成熟^[5-7],但检验复杂基质的合成色素时,往往需要较繁琐的样品前处理才能取得较好结果,庞艳玲等^[8]采用薄层色谱分离与分光光度法,建立了食品中苏丹红的检测方法,方法经济实用,比较适合基层检测机构及小工厂的检测,但样品处理较繁琐。为克服上述缺点,常借助固相萃取、浊点萃取等新型样品前处理方法,简化操作,增强方法灵敏度。Soylak等^[9]用Sepabeads SP-70凝胶作为固相萃取填料,建立了饮料、环境废水中罗丹明B的可见分光光度检测方法,检出限为3.14 ng/mL;Pourreza等^[10]采用Triton X-100在78℃共混浊点萃取的方式,分离富集罗丹明B,并用紫外—可见分光光度计在556 nm处定量测定,检出限达1.3 μg/L;传统的分光光度法在进行多组分测定时,难免会有光谱重叠的现象,造成准确度下降。借助化学计量学,如多元线性回归、偏最小二乘法等,可较好地克服上述问题,并省去萃取分离、层析浓缩等复杂的样品处理步骤,实现多组分检测,为混合色素同时测定的问题提供了一种有效的解决方案。张永生等^[11]利用柠檬黄与日落黄的吸收光谱差异同时测定这2种色素含量,而采用支持向量机的方法建立数学模型来处理检测数据,操作简单且能方便快捷地应用于实际操作中。杨梅枝等^[12]在对日落黄、胭脂红和苋菜红3种色素检测研究中将光度法和人工神经网络相结合,用人工神经网络对数据进行了基于偏最小二乘法的主成分进行分析,回收率高,结果好,显示了主成分—人工神经网络算法的独特优势,为食品中多组分混合色素的检测提供了一种简捷、实用的分析方法,有效解决了多组分分析中光谱重叠问题。

3.2 拉曼光谱法

拉曼光谱(Raman spectra)是一种散射光谱,能够精确给

出分子振动、转动方面的信息,独特的指纹振动可反映分子结构,为物质鉴别、定性和定量分析提供了有力工具,在食品安全检测中有重要作用。Haughey 等^[13]运用拉曼光谱,结合化学计量学方法(主成分分析和偏最小二乘法),成功鉴别了掺有苏丹红 I 的辣椒粉,该方法可直接测定样品,无需样品前处理,检出限达到 0.88%。普通拉曼光谱法灵敏度较低,但采用银、金或铜等胶质金属颗粒处理样品溶液后,即表面增强拉曼光谱(Surface-Enhanced Raman Scattering)技术时,可大幅增加方法灵敏度和适用范围。Di 等^[14]研究比较了普通拉曼光谱、傅立叶变换拉曼光谱和表面增强拉曼光谱 3 种技术鉴别调味料中掺入苏丹红 I 的能力,结果显示表面增强拉曼光谱技术检测最准确,更适用于复杂基质样品。Cheung 等^[15]采用表面增强拉曼光谱技术,结合化学计量学方法,建立食品中苏丹红 I 的高灵敏度检测方法,线性范围达 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ mol/L。拉曼光谱方法具有检测时间短,前处理简单,适用范围广,平台移动强,能实时实地检测,适合现场快速测定,但在低浓度情况下,如测定 $0.2 \sim 2.4 \mu\text{mol/L}$ 苏丹红 I 时,灵敏度和选择性都不尽理想^[16],同时它也缺少多组分同时测定的能力,定量需要借助化学计量学构建模型,模式较复杂,易受荧光成分干扰,限制了其在试验中的进一步应用。

3.3 荧光光谱法

荧光光谱技术自发展以来,就有灵敏度高,选择性强,样品量少、快速简单、分辨率高、适合小分子样品的特点,应用十分广泛。但是,大多数的合成色素不具有荧光特性,不能直接检测,需要构建荧光体系或借助荧光探针的方法实现定性定量测定。周尚等^[17]基于苏丹红与硫酸高铈反应增强荧光信号的性质,采用荧光光谱法测定番茄酱和辣椒酱中苏丹红 I~IV 的含量,方法检出限分别为 4.0, 3.6, 4.2, 4.2 mg/L,回收率为 98.1%~104%,相对标准偏差为 3.0%~6.5%。刘周忆等^[18]运用荧光光谱技术检测酸性橙 II 水溶液,发现酸性橙 II 水溶液在波长短于 290 nm(最佳 250 nm)的紫外光激发下能发出荧光(荧光光谱 310~390 nm),荧光峰值波长为 350 nm,且表征了荧光偏振特性,求得荧光偏振度(0.783)和各向异性度(0.740),揭示了荧光光谱技术检测酸性橙 II 的可能性。

目前,荧光光谱法研究的热点就是荧光探针技术,Ling 等^[19]采用聚乙烯亚胺包裹的铜纳米簇作为荧光探针,实现了食品中苏丹红 I~IV 的高灵敏度检测,检出限分别为 65, 70, 45, 50 nmol/L,检测范围分别达 $0.1 \sim 30.0$, $0.1 \sim 30.0$, $0.1 \sim 25.0$, $0.1 \sim 25.0 \mu\text{mol/L}$ 。Ye 等^[20]采用自组装方法合成了偶联“聚 9,9-二辛基苻”或“聚[2,7-(9,9-二辛基苻-alt-4,4'-苯乙醚)]”高分子纳米微球,基于该纳米微球的选择性荧光猝灭现象,成功克服了辣椒粉中苏丹红 I 检测时天然色素——辣椒红素和胡萝卜素的干扰,构建了高灵敏度,高选择性的苏丹红 I 检测平台。

3.4 酶联免疫吸附法(ELISA)

酶联免疫吸附法作为一种快速筛查分析方法,在临床医学检验上已有几十年的历史,并已经扩展到农业、环境、食品

安全等检测领域。它不仅灵敏度高,操作简便,还具有抗干扰能力强,安全性高,污染少的优点。郗日沫等^[21]通过将酸性橙 II 与牛血清白蛋白或卵清蛋白偶合成抗原,人工免疫动物的方法获得酸性橙 II 抗体,开发制成试剂盒,用于食品和饮料中酸性橙 II 的检测,其最大检测范围为 $0.1 \sim 10.0 \text{ ng/mL}$ 。韩丹等^[22]首先将苏丹红 I 号进行修饰,再与载体蛋白偶合成抗原,经动物免疫制得抗体,以此建立了酶联免疫法测定辣椒酱和番茄酱中苏丹红 I 号的方法,检出限达 $0.74 \mu\text{g/L}$,回收率分别为 106% 和 110%。周坚等^[23]发明了一种酸性橙 II 的快速检测卡,其原理也是 ELISA 法,其中含抗酸性橙 II 抗体胶体金标记的玻璃纤维膜或含抗酸性橙 II 抗体乳胶颗粒标记的玻璃纤维膜,该检测卡可直接检测卤制熟食辣椒面和饮料等样品中的酸性橙 II 含量。付云洁等^[24]通过设计合成苏丹红 I 衍生物,用混合酸酐法与明胶合成了苏丹红 I—明胶免疫抗原,免疫新西兰白兔制备抗苏丹红 I 的多克隆抗体。与胶体金组装成了苏丹红 I—BSA 抗原—胶体金复合物检测试纸。试验结果表明,试纸条法的苏丹红 I 检出限为 $15 \mu\text{g/kg}$,与苏丹红 II、III、IV 均无交叉反应性,适用于食品中苏丹红 I 残留的快速检测。Oplatoewska 等^[25-26]基于多克隆抗体,建立了测定食品中甲基黄和罗丹明 B 的 ELISA 检测方法,在酱料和调味料中甲基黄的检出限分别为 15, 50 ng/g,罗丹明 B 的检出限为 10 ng/g。

Lei 等^[27]通过合成 2 种不同间隔臂的半抗原来制备抗体,建立了测定橘红的间接竞争 ELISA 方法,检出限为 0.04 ng/mL ,定量限为 $0.09 \sim 4.90 \text{ ng/mL}$ 。基于多克隆抗体,Xing 等^[28]建立了检测食品中日落黄 FCF 的间接 ELISA 方法,在食品、豆腐干、红烧肉 3 种食物中的检出限分别为 0.12, 0.04, 1.11 ng/mL。邱凯等^[29]基于单克隆抗体,建立了测定食品中柠檬黄的间接竞争 ELISA 分析方法,最低检出限达 26.34 ng/mL 。

目前,使用酶联免疫吸附法检测食品中合成色素的研究报道仍然较少,技术上还不太成熟,主要是制备高质量特异性强的抗体比较困难,限制了其在商业中的应用。但与仪器法相比,酶联免疫吸附法灵敏度和准确度相当,但操作却更简单,也无需贵重设备,检测成本低,非常适合基层一线实验室,因此有广泛用途。

3.5 高效液相色谱法

高效液相色谱法具有检测灵敏,定量重现性好,准确度高,的优点,主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和超高效液相色谱法(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC),是目前合成色素检测的主流分析方法。与 HPLC 法相比,UPLC 法的分析速度、灵敏度及分离能力均大大提高,但由于 UPLC 仪器价格较高,其应用没有 HPLC 广泛。HPLC 设备价格适中,较为普遍,对前处理要求更为宽松,更易于推广,目前中国颁布、实行的食品中合成色素的几个主要检测方法,如 GB/T 5009.35—2003《食品中合成着色剂的测定》、GB/T 19681—2005《食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法》等,均为高效液相色谱法(HPLC)。

实际检测中,高效液相色谱法应用很广,能满足大部分检测需求,但由于食品基质复杂,不可避免存在基质干扰,引起定量不准确,分析时间长等问题,因此很多研究集中在现有方法改进方面,优化样品提取、净化方式、分析条件,达到改善准确度,提高灵敏度,缩短分析时间的目的,如朱虹等^[30]建立一种同时测定调味料中8种合成着色剂的高效液相色谱分析方法,样品经30%甲醇水溶液提取后,以甲醇—乙酸铵为流动相, C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm)梯度洗脱分离,二极管阵列检测器检测,外标法定量,8种合成着色剂回收率为95.0%~101%;王红梅等^[31]优化了样品提取和色谱条件,采用 C_{18} 反相色谱柱分离,二极管阵列检测器检测,建立快速准确测定肉制品中食用合成色素的方法。在食品违禁染料检测中,尤其是应对违禁染料突发食品安全事故时,高效液相色谱法更是优选方法。例如:当苏丹红事件爆发后,Cornet等^[32]立刻利用液相色谱—二极管阵列检测器开发了测定辣椒、咖喱类制品中苏丹红I~IV的分析方法,使用基质匹配标准,光谱匹配的方法排除干扰,固体样品回收率为89%~100%,检出限为1.5~2.0 mg/kg,酱料类半固体样品回收率为51%~86%,检出限为0.2~0.5 mg/kg,方法具有良好的重现性和准确性。Ertas等^[33]则优化了液相色谱分析条件,采用乙腈/甲醇(80:20,体积比)为流动相,流速1 mL/min,色谱柱温40℃,506 nm为检测波长的方法,实现了9 min内苏丹红I~IV和对位红的基线分离,建立了辣椒粉中苏丹红I~IV和对位红的快速检测方法,回收率为89%~98%,检出限为1.2~5.4 μg/kg,1 d可以检测20个以上的样品。

目前,高效液相色谱法检测合成色素的主要研究热点集中在如何开发高效、快捷、选择性强的提取净化方式,建立多组分同时检测的分析方法方面。例如 Enriquez-Gabeiras等^[34]运用硫酸钠,弗罗里硅土和海砂进行基质固相萃取,建立了酱料中苏丹红I~IV的高效液相色谱检测方法,回收率为60%~99%,该方法将提取与净化结合在一起,样品处理简单快捷;Zhu等^[35]利用凝胶净化的样品处理方法,采用0.1%甲酸水溶液与甲醇—乙腈(1:1)溶液为流动相,梯度洗脱,建立了辣椒制品中苏丹类和大红粉等14种违禁染料的分析方法,回收率为73.4%~103.5%;Yan等^[36]使用1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIm][PF₆])为功能单体,二乙烯基苯为交联剂,合成了离子液体修饰的高分子微球(ILPM),以该高分子微球为固相萃取填料,对苏丹红I~IV的吸附净化效果,明显优于 C_{18} 和氧化铝,与HPLC结合,建立的ILPM-SPE-HPLC分析方法,回收率可达92.5%~103.5%;Wu等^[37]以1-辛基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([C8MIM][BF₄])为萃取剂,不需要其他化学试剂,也不借助超声或加热等辅助提取手段,只需简单的振摇,就提取富集了饮料中柠檬黄、苋菜红、诱惑红、日落黄、胭脂红、赤藓红6种色素,提取液再用HPLC测定,检出限达到了0.015~0.320 ng/mL,方法快捷、灵敏度高;Zhang等^[38]以苏丹红I为模板,采用种子溶胀聚合方法成功合成了单孔中空分子印记聚合物,可以有效地选择性吸附萃取苏丹红I,简化了净化

操作,降低了HPLC测定中的基质干扰,在酱料和调味料中应用,回收率达87.5%~103.4%,相对偏差1.94%~5.33%;肖海龙等^[39]优化了流动相组成和梯度洗脱条件,建立反相高效液相色谱法测定柠檬黄、苋菜红(E123)、靛蓝(E132)等18种水溶性合成着色剂的方法;Chen等^[40]使用液液分散微萃取—上浮溶剂固化这种样品前处理技术,有效提取净化了番茄酱和环境水样中的苏丹红I~IV,提取液经HPLC测定,无干扰峰,方法回收率为91.1%~108.6%,且使用的有机溶剂少,比较环保,操作也比较简单,容易推广,比起传统的固相萃取技术进步很大。

3.6 液相色谱—质谱联用法

尽管高效液相色谱法在分析检测合成色素方面有着很多优点,然而它同样存在前处理操作繁杂,检出限高,易受干扰,低含量时难以定性的缺点;同时还受制于分离模式和检测方法的限制,很难同时测定20种以上的合成色素。液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)结合了液相色谱和质谱的优点,比较常用的是三重四级杆,在多反应监测模式下,色谱分离的组分经过二级质谱选择,在第一重四级杆中目标物的母离子与干扰离子分离,在第二重四级杆中母离子与气体进行碰撞碎裂,生成1个或者多个子离子(多反应监测),由第三重四级杆选择其中的1个或2个子离子进行定性定量分析,可将色谱峰相互重叠的化合物进行定性定量分析,因此同时提供了目标化合物的保留时间和分子结构信息,通过二级质谱能对干扰化合物进行分离去除,具有灵敏度高、适合多组分同时分析等特点,是最有发展前景的分析方法,国内外对此已有较多的研究。

2004年,苏丹红事件突发,Tateo等^[41]立刻开发了基于大气压化学电离(APCI),LCMS检测苏丹红的分析方法。尽管是单级质谱,但相比液相色谱,LC-APCI/MS已经显示了优越的定性确认能力,采用选择性离子监测模式,样品不需要特殊的净化,也没有任何明显的干扰峰,在定量限(180 μg/kg)附近信噪比大大改善。不久,Calbiani等^[42]基于大气压电喷雾电离(ESI)和液相串联质谱,建立了适用于苏丹红I~IV的LC-ESI/MSMS检测方法。由于是串联质谱,定量限大大改善,达到7~48 μg/kg,回收率达72%~103%,但由于采用基质匹配标准和分散橙13为内标进行定量,操作步骤较为繁琐。Hou等^[43]采用中性氧化铝为基质分散相净化蛋黄中的苏丹红和对位红,再用UPLC-MS-MS测定,不仅简化了提取样品前处理步骤,操作简单,更减少了各过程的损失,取得了较好的净化效果,方法的加标回收率为63.2%~98.6%;Mazzotti等^[44]使用苏丹红同位素内标,一定程度上解决液质定量稳定性差,操作繁琐的缺点,但由于使用的是大气压化学电离(APCI),不太适合含水量大的样品,如番茄酱,苏丹红I~IV的回收率仅有50%。需要注意的是,由于在日常监管中,阳性样品苏丹红含量都比较低,检测结果往往都是 10^{-6} 级别,甚至是 10^{-9} ,因此必须建立高灵敏度的苏丹红HPLC-MS/MS分析方法。Schummer等^[45]基于大气压电喷雾电离(ESI)和同位素内标技术,采用液液萃取净化,建立了食品中苏丹红高灵敏度的HPLC-MS/MS

分析方法,最低定量限可达 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,苏丹红 I~IV 的回收率为 $81\% \sim 105\%$,较好地解决了液相串联质谱法稳定性和灵敏度的问题。

食品中合成色素种类繁多,性质多样,结构复杂,在实际检验中,如何快速、准确地了解添加了哪种色素,实现高通量检验,一直是研究的热点和难点。随着高精密度液相色谱串联质谱的快速发展,目前已经能够将化学结构同型、溶解度类别相近的合成色素一并测试分析,建立并报道了多篇分类别的高通量检验方法。赵珊等^[46]采用 50 mL 乙腈提取果汁和葡萄酒中的 27 种违禁染料的方法,建立了以超高效液相色谱—电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)检测果汁和葡萄酒中 27 种违禁染料的方法,在果汁中的回收率为 $57.9\% \sim 117.7\%$,在葡萄酒中的回收率为 $40.8\% \sim 109.4\%$;Feng 等^[47]采用 HLB 富集净化,液相色谱串联质谱测定的方法,实现了软饮料中 40 种水溶性色素的同时检测,回收率达到了 $91.1\% \sim 105\%$;赵珊等^[48]使用凝胶净化,液相色谱串联质谱测定的方法,同时测定了调味油中 11 种脂溶性偶氮类违禁染料(苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、苏丹红 7B、苏丹红 G、苏丹黄、苏丹橙 G、苏丹蓝 II、甲苯胺红、对位红)和罗丹明 B,回收率为 $54\% \sim 125\%$,相对标准偏差为 $2.5\% \sim 17.2\%$ 。采用正负离子切换扫描的方式,可以实现同时对化学性质完全相反的化合物进行检测。Guo 等^[49]就是采用正负离子切换扫描的方式,用 HPLC-MS/MS 对豆干、豆腐皮和卤蛋等样品中的酸性橙类和碱性橙类合成色素进行同时检测。通过优化仪器方法和试验过程,大大提高了方法的灵敏度。结果表明,7 种色素的线性范围超过 $5 \sim 500 \mu\text{g}/\text{L}$,线性相关性均优于 0.999 8,方法检出限(LODs)和定量限(LOQs)分别为 $0.5 \sim 3.0, 2.0 \sim 6.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。在豆类食品和卤蛋中的加标回收中,回收率能够达到 $74\% \sim 126\%$,RSD%为 $2.22\% \sim 25.4\%$ 。

虽然 LC-MS/MS 具有检测同类离子的能力,但是它仍具有无法区分目标物和同系干扰物的局限性。高分辨质谱的使用,可以很好地解决这个问题。钱疆等^[50]采用高分辨质谱的方式,测定食品中 19 种违禁染料,采用电喷雾离子源,在正离子模式下以飞行时间质谱检测,质量偏差 $< 1 \text{ mDa}$;19 种非法染料加标回收率为 $76\% \sim 108\%$,方法的检测限为 $0.34 \sim 14.00 \mu\text{g}/\text{kg}$,精密度 RSD 为 $0.3\% \sim 12.0\%$ 。Xiu 等^[51]用 HPLC-DAD 同时对 21 种包括软饮料、糖果、果脯、口香糖等食品中的 34 种水溶性合成染料进行定量,并在正、负离子切换的模式下,用离子阱—飞行时间高分辨质谱,对偶氮染料、三苯甲烷类染料、氧杂蒽类染料、靛蓝、喹啉类 5 种染料进行确证,34 种合成色素的加标回收率为 $76.1\% \sim 105.0\%$,方法的检出限为 $0.01 \sim 0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$,精密度 RSD 为 $1.4\% \sim 6.4\%$ 。Wei 等^[52]采用 QuEChERS 的前处理,用 UHPLC-ESI 结合 Q-Orbitrap 高分辨质谱的方式,同时对酒中 69 种物理化学性质不同的合成色素进行筛查和定量。通过优化前处理,69 种合成色素的回收率均能够达到 $87.2\% \sim 107.4\%$,变异系数 $< 6.4\%$,方法的检出限为 $1 \sim 1\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。与传统方法相比,此方法的灵敏度和准确度

均提高 5 倍以上,从而能够更加准确可靠地用于酒中合成色素的筛查测定。

高效液相色谱与高分辨质谱的联用,能够显著提高确证的准确度和灵敏度,可以同时进行不同物理化学性质的合成色素的筛查和定量。但高分辨质谱使用成本高,每次需要进行质量轴校正,无法满足日常高通量的需求。而且目前多应用于相对简单的基质检测,对含有复杂基质的其他类食品,仍需要进一步的研究和确证。

3.7 检测技术总结

食品中含有违禁染料或者超量超范围合成色素,都会极大损害消费者健康,因此开发灵敏度高,适用性广的高通量合成色素检测技术一直是食品安全的重点和难点。尽管已有很多检验方法发表,但仍然存在以下不足之处:① 研究多集中在苏丹类中性染料,其他酸性和碱性染料研究较少;② 同时测定的工业染料组分较少,且多是分组提取、分组检测,不能达到高通量检测的要求;③ 样品前处理过程大部分文献较简单,有的只是简单提取,缺少样品前处理过程,给后续的确证检测带来较大的基质干扰,影响准确度。

结合检测技术发展趋势和实际需求,工业染料的检测方法大体有 4 个发展趋势:① 结合基质分散萃取、固相/液液微萃取、纳米材料、分子印迹等前处理方法,缩短检测周期,降低基质效益,使整个过程更简单更准确;② 根据实际情况,利用液相色谱串联质谱技术或多维色谱技术开发,同时测定酸性、中性和碱性等多种不同性质工业染料的高通量检测方法,但如何在质谱上实现正负离子的交替检测,或在色谱上实现不同性质工业染料的有效分离是该高通量检测的开发难点;③ 利用 Q-TOF 和 Q-Trap 质谱,结合数据库检索技术,建立多种工业染料的筛查检测方法,满足市场筛查则需快速、准确,但检出限不要求很低的需求;④ 开发基于免疫学技术或电化学技术的工业染料快速检测方法,具备快速准确、成本低廉等特点,满足现场初筛、快速判定的要求。总体来说,对工业染料的检测应向前处理速度快、自动化程度高、试剂消耗少、环境污染小、方法准确、精密度高的方向发展。

4 展望

随着社会经济的发展,食品中合成色素的使用越来越广泛,然而食品中违法添加,超量超范围使用合成色素的现象时有发生,加之环境中工业染料对食品的交叉污染,使得合成色素的暴露水平较高,严重威胁人们身体健康。但是色素种类繁多、性质各异,目前食品中合成色素的分析方法存在着检测种类少,适用的食品范围窄,样品前处理复杂,有机溶剂消耗大,复杂基质样品难以准确定量,不适合大批量检验的缺点,也缺乏快速筛查,准确定量的检验能力。因此,食品中合成色素的高通量筛查和快速检测,将一直是食品安全技术领域的重点和难点。

参考文献

- [1] COLLIER S W, STORM J E, BRONAUGH R L. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption[J]. Toxicology

- and Applied Pharmacology, 1993, 118(1): 73-79.
- [2] 聂晶, 齐兴娟. 食用合成色素研究动态(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(1): 58-60.
- [3] 何松涛. 科学使用食品的“化妆品”——色素[J]. 中国检验检疫, 2005(6): 60-61.
- [4] 肖秀英. 食用色素和食品安全[J]. 食品安全, 2006(3): 32-33.
- [5] 王成, 程军喜, 张小军. 饮料中日落黄和胭脂红含量同时测定的分光光度法[J]. 职业与健康, 2008, 24(15): 1 516-1 518.
- [6] 董光华, 李建晴. 分光光度法同时测定柠檬黄和胭脂红[J]. 忻州师范学院学报, 2009, 25(2): 6-9.
- [7] 景顺杰, 李建晴. 分光光度法直接测定饮料中的柠檬黄和胭脂红[J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2008, 23(3): 22-24.
- [8] 庞艳玲, 王怀友. 薄层色谱-紫外可见分光光度法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. 分析试验室, 2008, 27(1): 60-62.
- [9] SOYLAK M, UNSAL Y E, YILMAZ E, et al. Determination of rhodamine B in soft drink, waste water and lipstick samples after solid phase extraction[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(8): 1 796-1 799.
- [10] POURREZA N, RASTEGARZADEH S, LARKI A. Micelle-mediated cloud point extraction and spectrophotometric determination of rhodamine B using Triton X-100 [J]. Talanta, 2008, 77(2): 733-736.
- [11] 张永生, 魏新军, 南海娟, 等. 支持向量回归分光光度法同时测定饮料中柠檬黄与日落黄[J]. 食品研究与开发, 2009(8): 138-141.
- [12] 杨梅枝, 彭丹. 主成分-人工神经网络光度法在混合食用合成色素定量分析中的应用[J]. 河南化工, 2009(8): 55-56.
- [13] HAUGHEY S A, GALVIN-KING P, HO Y C, et al. The feasibility of using near infrared and Raman spectroscopic techniques to detect fraudulent adulteration of chili powders with Sudan dye[J]. Food Control, 2015, 48(48): 75-83.
- [14] DI ANIBAL C V, MARSAL L F, CALLAO M P, et al. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012, 87(2): 135-141.
- [15] CHEUNG W, SHADI I T, XU Yun, et al. Quantitative analysis of the banned food dye sudan-1 using surface enhanced raman scattering with multivariate chemometrics[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2010, 114(16): 7 285-7 290.
- [16] WU Li-ping, LI Yuan-fang, HUANG Cheng-zhi, et al. Visual detection of Sudan dyes based on the plasmon resonance light scattering signals of silver nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(15): 5 570-5 577.
- [17] 周尚, 杨季冬, 贺雪娟, 等. 荧光光谱法测定食品中苏丹红含量[J]. 理化检验: 化学分册, 2013(2): 179-182.
- [18] 刘周忆, 朱拓, 顾恩东, 等. 荧光光谱检测的酸性橙 II 的研究[J]. 光学学报, 2008, 28(6): 1 106-1 110.
- [19] LING Yu, LI Jia-xing, QU Fei, et al. Rapid fluorescence assay for Sudan dyes using polyethyleneimine-coated copper nanoclusters[J]. Microchimica Acta, 2014, 181(9/10): 1 069-1 075.
- [20] YE Xin-liang, ZHANG Jie, CHEN Hui, et al. Fluorescent nanomicelles for selective detection of sudan dye in pluronic F127 aqueous media[J]. ACS applied materials & interfaces, 2014, 6(7): 5 113-5 121.
- [21] 郝日沫, 薛虎寅, 孟萌, 等. 一种酸性橙的酶联免疫检测试剂盒: 中国, 101915831A[P]. 2010-12-15.
- [22] 韩丹, 于梦, 吴梅, 等. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. 分析化学, 2007, 35(8): 1 168-1 170.
- [23] 周坚, 吴文晔, 熊晓芳. 一种酸性橙快速检测卡及其检测方法: 中国, 102162814A[P]. 2011-08-24.
- [24] 付云洁, 刘志国, 武玉香. 胶体金免疫层析法快速检测食品中苏丹红 I 残留[J]. 中国酿造, 2009, 28(9): 156-159.
- [25] OPLATOWSKA M, ELLIOTT C T. Development and validation of rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of Methyl Yellow and Rhodamine B dyes in foods[J]. Analyst, 2011, 136(11): 2 403-2 410.
- [26] OPLATOWSKA M, STEVENSON P J, SCHULZ C, et al. Development of a simple gel permeation clean-up procedure coupled to a rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Sudan I dye in spices and sauces[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(4): 1 411-1 422.
- [27] LEI Hong-tao, LIU Jin, SONG Yu-dong, et al. Development of a highly sensitive and specific immunoassay for determining chrysoidine, a banned dye, in soybean milk film [J]. Molecules, 2011, 16(8): 7 043-7 057.
- [28] XING Yue, MENG Meng, XUE Hu-yin, et al. Development of a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for detection of sunset yellow FCF in food samples[J]. Talanta, 2012, 99(15): 125-131.
- [29] 邱凯, 马国文, 柳增善, 等. 柠檬黄的 ELISA 检测方法的建立[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2008, 23(3): 315-320.
- [30] 朱虹, 余晓麒, 黄让明. 高效液相色谱法同时测定调味料中的 8 种合成着色剂[J]. 化学分析计量, 2012, 21(4): 47-49.
- [31] 王红梅, 郭伟等. 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.
- [32] CORNET V, GOVAERT Y, MOENS G, et al. Development of a fast analytical method for the determination of Sudan dyes in chili-and curry-containing food stuffs by high performance liquid chromatography-photodiode array detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 639-644.
- [33] ERTAS E, OZER H, ALASALVAR C. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chili pepper[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 756-760.
- [34] ENRÍQUEZ-GABEIRAS L, GALLEGO A, GARCINUÑO R M, et al. Interference-free determination of illegal dyes in sauces and condiments by matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid chromatography (HPLC-DAD)[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 193-198.
- [35] ZHU Yong-hong, ZHAO Bo, XIAO Rui-qi, et al. Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure [J]. Food Chemistry, 2014, 145(15): 956-962.

- [36] YAN Hong-yuan, GAO Meng-meng, QIAO Jin-dong. New ionic liquid modified polymeric microspheres for solid-phase extraction of four Sudan dyes in foodstuff samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(27): 6 907-6 912.
- [37] WU Hao, GUO Jing-bo, DU Li-ming, et al. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar-and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 182-186.
- [38] ZHANG Zhong, XU Shou-fang, LI Jin-hua, et al. Selective solid-phase extraction of Sudan I in chilli sauce by single-hole hollow molecularly imprinted polymers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 60(1): 180-187.
- [39] 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.
- [40] CHEN Bo, HUANG Yu-ming. Dispersive liquid-phase microextraction with solidification of floating organic droplet coupled with High-performance liquid chromatography for the determination of sudan dyes in foodstuffs and water samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5 818-5 826.
- [41] TATEO F, BONONI M. Fast determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chili, spices, and oven-baked foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(4): 655-658.
- [42] CALBIANI F, CARERI M, ELVIRI L, et al. Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chili products[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1 042(1): 123-130.
- [43] HOU Xiao-lin, LI Yong-gang, CAO Shou-jun, et al. Analysis of para red and Sudan dyes in egg yolk by UPLC-MS-MS[J]. Chromatographia, 2010, 71(1/2): 135-138.
- [44] MAZZOTTI F, DI DONNA L, MAIUOLO L, et al. Assay of the set of all sudan azodye (I, II, III, IV, and para-red) contaminating agents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution methodology[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 56(1): 63-67.
- [45] SCHUMMER C, SASSEL J, BONENBERGER P, et al. Low-level detections of sudan I, II, III and IV in spices and chili-containing foodstuffs using UPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2 284-2 289.
- [46] 赵珊, 张晶, 杨奕, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法检测果汁和葡萄酒中的 27 种工业染料[J]. 色谱, 2010, 28(4): 356-362.
- [47] FENG Feng, ZHAO Yan-sheng, YONG Wei, et al. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(20): 1 813-1 818.
- [48] 赵珊, 张晶, 丁晓静, 等. 凝胶净化/超高效液相色谱电喷雾质谱法检测调味油中 11 种禁用偶氮染料及罗丹明 B[J]. 分析测试学报, 2012, 31(4): 448-452.
- [49] FANG Guo-zhen, WU Yu, DONG Xiao-meng, et al. Simultaneous determination of banned acid orange dyes and basic orange dyes in foodstuffs by liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry via negative/positive ion switching mode [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 3 834-3 841.
- [50] 钱疆, 杨方, 陈弛, 等. 超高压液相色谱-飞行时间质谱法测定食品中 19 种非法染料[J]. 分析试验室, 2012, 33(6): 50-53.
- [51] LI Xiu-qin, ZHANG Qing-he, MA Kang, et al. Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array-detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2015, 182: 316-326.
- [52] JIA Wei, CHU Xiao-gang, LING Yun, et al. Simultaneous determination of dyes in wines by HPLC coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. Liquid Chromatography, 2014, 37: 782-791.

(上接第 134 页)

- [2] 范林林, 冯叙桥. 不同保鲜处理对鲜切苹果保鲜效果的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(1): 252-256.
- [3] 王修俊, 刘颖, 邱树毅, 等. 复合磷酸盐食品添加剂对鲜切青苹果保鲜效果的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 144-147.
- [4] 马青青, 曹锦轩, 周光宏. 功能性可食用膜在生鲜肉和肉制品保鲜中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 331-335.
- [5] 闫子娇, 张有林, 于月英. 魔芋葡甘聚糖涂膜对鲜切苹果保鲜的研究[J]. 农产品加工, 2009(10): 60-66.
- [6] 冯叙桥, 范林林, 韩鹏祥, 等. 溶菌酶涂膜对鲜切“寒富”苹果的贮藏保鲜作用研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(11): 125-131.
- [7] 李伟锋, 何玲, 冯金霞, 等. 生姜提取物对鲜切苹果保鲜研究[J]. 食品科学, 2013(4): 236-240.
- [8] 邓茜菲, 唐慧, 田沛霖, 等. 壳聚糖涂膜对鲜切苹果品质的影响[J]. 食品工业科技, 2010(4): 122-124.
- [9] 袁仲玉, 周会玲, 张晓晓, 等. 芦荟粗提液对红富士苹果常温贮藏保鲜的影响[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 104-110.
- [10] WANG Cheng, CHEN Yu-long, XUE Yu-juan, et al. Effect of dimethyl dicarbonate as disinfectant on the quality of fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2013, 37(5): 751-758.
- [11] SUPAPVANICH S, PIMSAGA J, SRISUJAN P. Physico-chemical changes in fresh-cut wax apple (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L. M. Perry) during storage[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 912-917.
- [12] 杨巍, 刘晶, 吕春晶, 等. 氯化钙和抗坏血酸处理对鲜切苹果品质和褐变的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3 402-3 410.
- [13] 丁晓雯. 食品分析实验[M]. 北京: 中国林业出版社, 2012: 44-46.