

黑芝麻糊中可疑色素的鉴定

丁 华¹, 董丽娜², 陈建彪², 杨 洁¹, 夏 虹¹, 彭茂民¹, 汪青青¹, 胡定金¹, 周有祥^{1,*}

(1.湖北省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 湖北 武汉 430064;

2.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 针对市场上黑芝麻糊中可疑色素, 对其溶解性、紫外-可见光谱图分析, 采用的高效液相色谱-质谱法进行定性分析, 最后通过高效液相色谱进行定量分析。结果表明, 该蓝色色素易溶于甲醇, 用 20mmol/L 醋酸铵-乙腈(70:30, V/V)作为流动相, 经 Inertsil ODS-3 色谱柱能够有效分离, 经离子阱质谱检测器分析, 定性为亮蓝, 经过高效液相色谱-二极管阵列定量分析, 该色素在此样品中的含量为 1.73mg/kg。

关键词: 鉴别; 芝麻糊; 亮蓝; 质谱分析

Identification of Unknown Pigment in Inferior Black Sesame Paste

DING Hua¹, DONG Li-na², CHEN Jian-biao², YANG Jie¹, XIA Hong¹, PENG Mao-min¹,

WANG Qing-qing¹, HU Ding-jin¹, ZHOU You-xiang^{1,*}

(1. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: An unknown blue pigment was extracted from an inferior black sesame paste on the market. The maximum absorption wavelength of the pigment was determined by UV-visible spectroscopy. It was analyzed qualitatively by HPLC-MS and analyzed quantitatively by HPLC. The pigment had a high solubility in methanol. It could be effectively separated on Inertsil ODS-3 column using a mobile phase composed of 20 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile (V/V = 70:30). It was identified as brilliant blue through ion-trap MS analysis. The results of quantitative analysis by HPLC with diode-array detection indicated that the content of brilliant blue in the inferior black sesame paste was 1.73 mg/kg.

Key words: food authenticity; sesame paste; brilliant blue; MS analysis

中图分类号: O656.22

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)12-0200-05

黑芝麻糊是我国传统美食中的纯天然黑色营养食品, 主要由黑芝麻、坚果仁、糖和淀粉等为原料加工而成。由于该食品营养丰富, 口感香稠细滑, 风味独特, 通常作为特殊人群(老人、儿童或病患人群)的营养辅助食品, 深受广大消费者的青睐^[1-2]。黑芝麻作为其重要的原料, 不仅提供了芝麻素、芝麻酚以及卵磷脂等活性营养成分, 同时也使得黑芝麻糊具有独特的外观和风味^[3-4]。我国 2009 年颁布的 GB/T 23781—2009《黑芝麻糊》中明确指出, 在黑芝麻糊中黑芝麻的添加量不得低于 10%^[5], 而且使用的食品添加剂必须符合 GB 2769—2007《食品添加剂使用卫生标准》的要求, 特别是在添加剂的使用量上, 不得超过国家的最大允许含量^[6]。近年来, 少数不法商贩, 为了降低芝麻糊的生产成本, 以次充好, 甚至是在普通米粉和面粉中, 掺

杂色素和香精, “人造”芝麻糊。这种不道德的行为不仅将极大地损害消费者的权益, 同时也威胁到相关产业链的生存。

对于食品中的未知成分鉴定, 一直是当前食品分析中的难点。由于色谱技术能够分离出目标物, 而光谱和波谱技术能够提供目标物的结构信息, 因此综合应用色谱、光谱以及波谱等技术, 可以鉴定出食品中的未知成分, 建立食品鉴别的技术系统^[7-10]。本实验针对市场上采集的某伪劣黑芝麻糊中的可疑色素, 综合应用了紫外-可见光光谱, 高效液相色谱以及质谱等进行结构鉴定和定量分析, 从提取溶剂的选择、紫外-可见吸收光谱扫描、质谱分析和反相高效液相色谱(reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)定量分析 4 个方面进行定性定量分析, 为后续开展相关的食

收稿日期: 2011-05-14

基金项目: 湖北省农业科技创新中心项目(2012-620-001-03)

作者简介: 丁华(1984—), 男, 研究实习员, 硕士, 研究方向为农产品品质分析。E-mail: dingh-15@163.com

* 通信作者: 周有祥(1979—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为食品安全分析。E-mail: zhouyouxiang@gmail.com

品鉴伪工作提供借鉴和参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

湖北某地市售黑芝麻糊样品(S 样品)和某品牌黑芝麻糊(C 样品)。

甲醇、乙腈、丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺、冰乙酸、石油醚、乙酸乙酯、异丙醇和正己烷等(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 亮蓝标准品 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 实验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

Beckman DU800 紫外-可见分光光度计 美国 Beckman 公司; 2695-2998 型高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; 1100 LC/MSD Trap 液质联用仪 美国 Agilent 公司; Inertsil ODS-3(4.6mm × 250mm, 5 μm)色谱柱 中国岛津技迹(上海)商贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取溶剂的选择

分别称取 1.00g S 样品于 10 只锥型试管中, 依次添加甲醇、水、乙腈、丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺、冰乙酸、石油醚、乙酸乙酯、异丙醇和正己烷, 涡旋混匀, 静置 10min 后观察溶液颜色。

1.3.2 可疑色素提取

称取 5.00g 样品于 100mL 锥形瓶中, 加入 50mL 甲醇超声提取 10min 后, 过滤, 收集滤液于 250mL 圆底烧瓶中, 40℃减压旋转蒸干, 然后加入 5mL 甲醇和 5mL 正己烷溶解残留物, 小心收集下层甲醇液并定容于 10mL 容量瓶中, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 待用。

1.3.3 紫外-可见吸收光谱鉴定

将收集的样品提取液置于紫外-可见分光光度计中, 扫描 200~700nm 的吸收光谱图。

1.3.4 液相色谱-质谱定性分析

将收集的样品提取液进行液相色谱-质谱系统进行分析。流动相: 20mmol/L 醋酸铵-乙腈(V:V = 70:30), 柱温: 25℃, 流速: 1.0mL/min, 检测波长: 629nm, 离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 扫描方式: 负离子扫描; 毛细管电压: 3.5kV; 源温: 100℃; N₂ 流量: 10mL/min, 扫描范围: 100~1000u。

1.3.5 RP-HPLC 定量分析

将收集的样品提取液进行液相色谱-质谱系统进行分析。流动相: 20mmol/L 醋酸铵-乙腈(70:30, V/V), 柱温: 25℃; 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 629nm; 标样质量浓度: 40 μg/mL; 进样量: 5 μL; 样品进样量: 20 μL, 外标法计算色素含量。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

为了最大程度地提取该样品中的可疑色素, 分别采用甲醇、水、乙腈、丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺、冰乙酸、石油醚、乙酸乙酯、异丙醇和正己烷 10 种常用试剂进行色素提取与分析。结果表明, 甲醇提取样品中蓝色色素效果最好, 其次为水、乙腈以及冰乙酸, 其他试剂无法提取。因此, 后续实验选取甲醇作为该色素的提取溶剂提取 C 样品和 S 样品。

2.2 甲醇提取液的紫外-可见吸收光谱

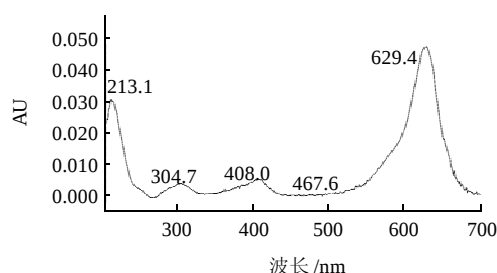


图 1 S 样品甲醇提取液的紫外-可见吸收光谱
Fig. 1 UV-visible spectrum of methanol extract from S sample

可疑色素经甲醇提取后, 进行紫外-可见光谱扫描测定, 结果如图 1 所示。该色素在 213.1、304.7、408.0nm 和 629.4nm 处有最大吸收, 其中 629.4nm 处吸收最强。据此确定 HPLC-MS 和 RP-HPLC 的检测波长为 629nm。

2.3 可疑色素的质谱分析

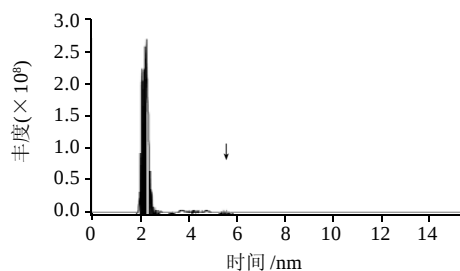
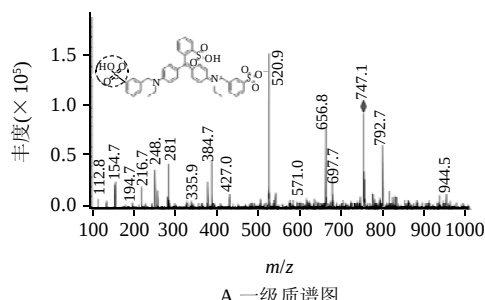
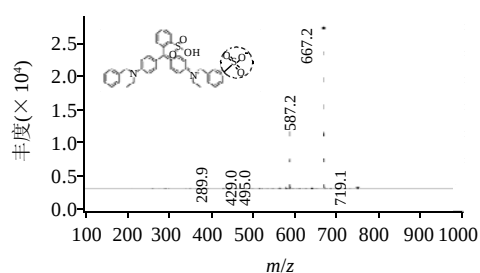


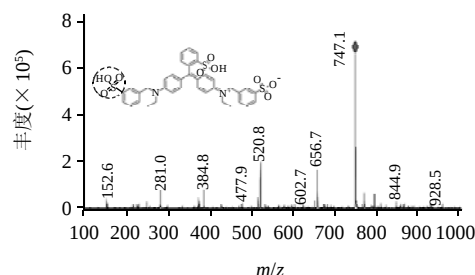
图 2 S 样品的总离子流图
Fig. 2 Total ion current chromatogram of methanol extract from S sample



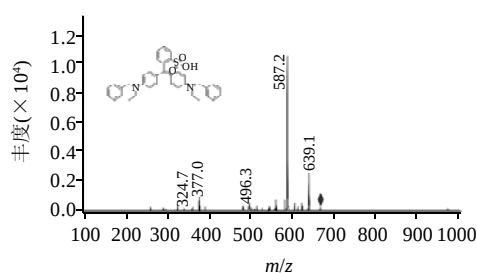
A. 一级质谱图



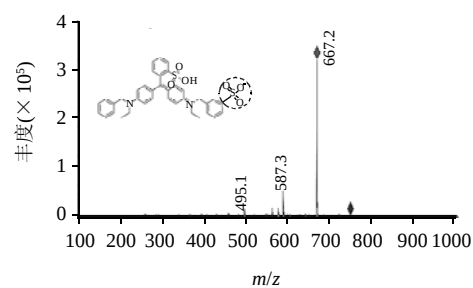
B.二级质谱图



A.一级质谱图



C.三级质谱图



B.二级质谱图

图3 S样品中未知色素质谱图

Fig.3 MS of methanol extract from S sample

将提取液注入高效液相色谱分离后,进行质谱分析。其S样品总离子流图和保留时间为5.5min处的质谱图分别见图2、3。

由图2可知,在该色谱条件下,样品的保留时间在5.5min左右。在负离子扫描模式下,其一级质谱离子峰 m/z 为747 $[M-H]^-$ (图3A),以 m/z 747离子为母离子,对其进行二级质谱分析,其二级离子峰 m/z 为667(图3B),是一级母离子去掉磺酸基后产物^[11],即 $[M-SO_4-H]^-$,三级质谱离子在二级离子 $[M-SO_4-H]^-$ 的基础上,又去掉一个磺酸基,其 m/z 为587 $[M-SO_4-SO_4-H]^-$ (图3C),据此,推断该色素可能为亮蓝。

将 $10\mu\text{g/mL}$ 的亮蓝标样溶液通过高效液相色谱分离后,同条件进行质谱分析,结果如图4、5所示。

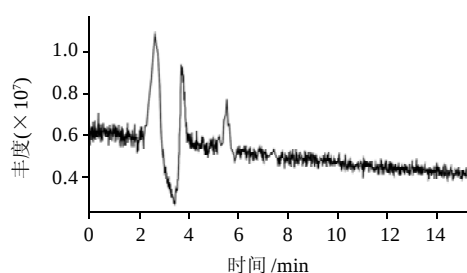
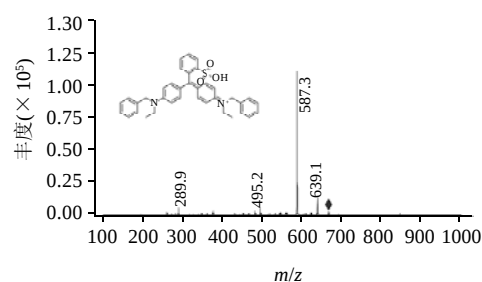


图4 亮蓝标样总离子流图

Fig.4 Total ion current chromatogram of brilliant blue standard



C.三级质谱图

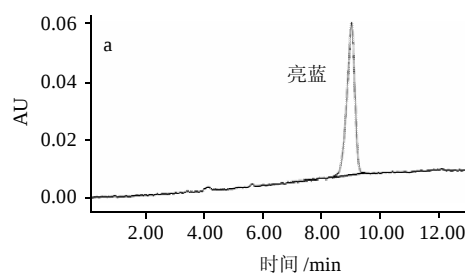
图5 亮蓝标样质谱图

Fig.5 Mass spectra of brilliant blue standard

通过图4、5可知,S样品中的色素质谱图与亮蓝标准品一致。因此S样品中的蓝色色素定性为亮蓝,而C样品中未检测出亮蓝。

2.4 S样品中的亮蓝定量分析

将亮蓝标准品、S样品的甲醇提取液以及对照样品的甲醇提取液进行反相高效液相色谱分析,色谱图和分析结果分别见图6和表1。



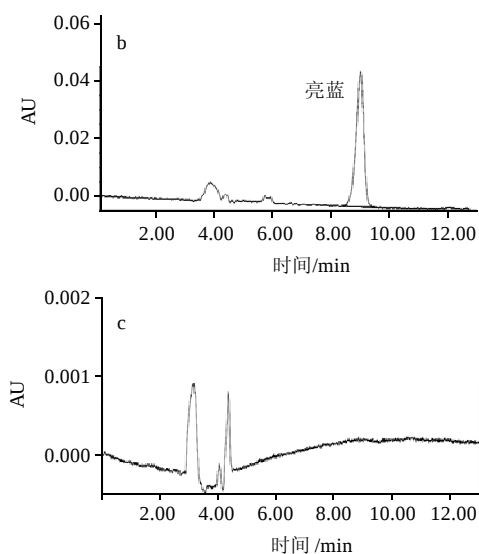


图6 亮蓝标准品(a)、S样品(b)以及C样品(c)的甲醇提取液的高效液相色谱图

Fig.6 RP-HPLC chromatograms of brilliant blue standard, sample S and sample C

表1 RP-HPLC 定量分析黑芝麻糊样品中的亮蓝含量
Table 1 Brilliant blue content in black sesame paste samples determined by RP-HPLC

样品名称	检测物	称样量/g	定容/mL	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	保留时间/min	面积/($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)	含量/(mg/kg)
亮蓝标准品	亮蓝	0.02	50	40	9.108	996626	—
S样品	亮蓝	5	10	—	9.153	860678	1.73
C样品	亮蓝	5	10	—	未检出	未检出	未检出

由图6和表1可知, S样品保留时间为9.153min, 亮蓝标样保留时间是9.108min, S样品中的亮蓝出峰时间与亮蓝标样一致, C样品在对应的时间段没出峰, 通过外标法测得S样品中亮蓝的含量1.73mg/kg, 对照样品没有检测出亮蓝。

3 讨论

3.1 亮蓝的使用

亮蓝为常见食品添加剂, 常见于果酱、巧克力、糕点、碳酸饮料和果冻等食品中^[4], 但是在芝麻糊中报道较少。本实验结果表明, 对照黑芝麻糊样品(C样品)中并未检测出亮蓝, 而且在传统黑芝麻糊的制作工艺中, 也未提到需要添加亮蓝。由于亮蓝粉末掺杂于米粉中的外观近似黑芝麻, 因此, 推测在黑芝麻糊中添加亮蓝的主要目的是为了降低生产成本, 属于“食品掺假”行为。需要指出的是, 在卫生部颁布的GB2760—2007中, 允许亮蓝作为着色剂用于高糖果汁(味)、果

汁(味)饮料、碳酸饮料、配制酒、糖果和糕点上彩装和染色樱桃罐头(系装饰用, 不宜食用)等, 其中糕点的最大使用量不得高于25mg/kg^[4]。另外, 虽然在GB/T 23781—2009中允许添加食品添加剂, 而且分析样品中的亮蓝含量低于GB 2760—2007中的最大限量标准, 但是, 在黑芝麻糊中添加亮蓝的行为并不符合GB 2760—2007中添加剂的使用原则和允许使用添加剂的条件。另外, 由于人工合成色素多为含有R—N=N—R键、苯环或氧杂蒽结构化合物, 而这些结构对于人体存在一定的不安全性或者产生有害作用^[12-15], 因此, 世界各国对人工合成食品色素的品种、使用范围和使用量都有严格的限制^[16]。

鉴于上述分析, 在黑芝麻糊中添加亮蓝的行为不仅有悖于我国现行的食品添加剂卫生标准, 而且还严重损害了消费者的权益。

3.2 鉴别方法的探讨

在食品鉴别方面, 目前主要还是针对特定目标物的定性分析, 而如何全面地辨别和剖析食品组成, 是目前食品安全领域面临的主要问题。本实验虽然针对蓝色素的光谱、色谱和质谱特征, 实现了定性定量分析, 但需要指出的是, 如果没有亮蓝标准品, 上述方法尚难以充分将该蓝色素定性为亮蓝。但如果能够综合利用色谱、光谱、波谱以及分子生物学等多种分析体系, 从不同层面剖析样品, 获得优质产品的各种指纹图谱(核酸、氨基酸、蛋白质和风味等), 然后再统计分析比较食品各项指纹特征, 建立特征指纹谱库, 并据此来分析食品品质, 不仅可达到食品鉴别目的, 还更能有效控制食品品质。

4 结论

本实验对某市售黑芝麻糊中的可疑蓝色素, 综合运用光谱、色谱和质谱技术, 鉴定出该蓝色素为亮蓝, 并建立了黑芝麻糊中亮蓝的检测方法, 该方法以甲醇为提取液, 以20mmol/L醋酸铵-乙腈(70:30, V/V)为流动相, 在25℃条件下, 流速0.8mL/min, 以629nm为检测波长, 外标定量分析黑芝麻糊中的亮蓝。

参考文献:

- [1] 黄敏, 魏旭晖. 黑芝麻糊工艺的研制[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 78-79.
- [2] 周翠英. 黑芝麻糊的加工技术及质量控制[J]. 西部粮油科技, 2003 (4): 34-35.
- [3] HU Qihui, XU Juan, CHEN Shubing, et al. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(4): 943-947.
- [4] KOBAYASHI S, WATANABE J, KAWABATA J, et al. A novel method

- for producing a foodstuff from defatted black sesame seed that inhibits allergen absorption[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(2): 300-305.
- [5] 天津市产品质量监督检验技术研究所. GB/T 23781—2009 黑芝麻糊[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [6] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. GB 2760—2007 食品添加剂食品卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] MURPHY T B, DEAN N, RAFTERY A E. Variable selection and updating in model-based discriminant analysis for high dimensional data with food authenticity applications[J]. *Ann Appl Stat*, 2010, 4(1): 396-421.
- [8] MOSANDL A. Authenticity assessment: a permanent challenge in food flavor and essential oil analysis[J]. *J Chromatogr Sci*, 2004, 42(8): 440-449.
- [9] 陈颖, 董文, 吴亚君, 等. 食品鉴别技术体系的研究与应用[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 216-218; 312.
- [10] 苏光明, 胡小松, 廖小军, 等. 果汁鉴别技术研究新进展[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(6): 151-156.
- [11] 西尔弗斯坦. 有机化合物的波谱解析[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2008.
- [12] 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.
- [13] AWAD D, SCHRADER I, BARTOK M, et al. Comparative toxicology of trypan blue, brilliant blue G, and their combination together with polyethylene glycol on human pigment epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 6310-6336.
- [14] MORALES M C, FREIRE V, ASUMENDI A, et al. Comparative effects of six intraocular vital dyes on retinal pigment epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(11): 6018-6029.
- [15] YUEN D, GONDER J, PROULX A, et al. Comparison of the *in vitro* safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green[J]. *Am J Ophthalmol*, 2009, 147(2): 251-259.
- [16] 刘国艳, 柴春彦, 葛宇, 等. 食品中对位红等禁用偶氮染料检测方法研究进展[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 604-607.