

凝胶柱净化-高效液相色谱检测食品中的苏丹红

谢维平, 黄盈煜, 傅晖蓉, 胡桂莲

(福建省泉州市卫生防疫站, 福建 泉州 362000)

摘要:建立了凝胶柱净化-高效液相色谱同时检测食品中苏丹红 I, II, III 和 IV 的方法。样品用乙醇提取, 提取液经 Bio-Beads SX3 凝胶柱(200 mm × 10 mm i. d.) 净化, 用环己烷-乙酸乙酯(体积比为 1:1) 洗脱。采用 Symmetry Shield RP18 柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) 分离, 以 100% 甲醇为流动相, 流速 1.5 mL/min; 用二极管阵列检测器检测, 检测波长 478 nm。上述 4 种苏丹红组分在其质量浓度为 0.1 ~ 10.0 mg/L 时有良好的线性关系($r > 0.999$), 方法的检测限为 7 ~ 14 μg/kg; 平均加标回收率为 80.7% ~ 96.3% (添加水平为 0.25, 2.5 mg/kg), 相对标准偏差为 2.4% ~ 5.9%。方法灵敏可靠, 能满足食品中苏丹红检测的需要。

关键词:凝胶柱; 高效液相色谱; 苏丹红; 食品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0542-03

Simultaneous Determination of Sudan Red Dyes in Foods by High Performance Liquid Chromatography with a Clean-Up Procedure by Gel Column

XIE Weiping, HUANG Yingyu, FU Huirong, HU Guilian

(Quanzhou Sanitary and Anti-Epidemic Station, Quanzhou 362000, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of Sudan Red I, II, III and IV in foods by high performance liquid chromatography (HPLC) with a clean-up procedure by gel column. Sample was extracted from foods with ethanol. The extract was cleaned up with a Bio-Beads SX3 gel column (200 mm × 10 mm i. d.) and eluted with cyclohexane-ethyl acetate (1:1, v/v). The analysis was performed on a Symmetry Shield RP18 column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) with 100% methanol as the mobile phase at a flow rate of 1.5 mL/min, detection at 478 nm and confirmation by diode-array spectra. All of the four compounds demonstrated good linear relationship ($r > 0.999$) in the range of 0.1 - 10.0 mg/L. The limits of detection (LOD) were from 7 to 14 μg/kg. The average recoveries for all four dyes (spiked at the levels of 0.25 and 2.5 mg/kg) in chili sauce and sausage ranged from 80.7% to 96.3%, and the relative standard deviations were from 2.4% to 5.9%. The method is sensitive, reliable and can be applied for the analysis of four Sudan Red dyes in foods.

Key words: gel column; high performance liquid chromatography; Sudan Red dyes; food

苏丹红的颜色鲜艳, 是一种合成的油溶性红色染料, 常用于汽油、墨水和塑料等的染色, 但不允许用作食品的添加剂。2005年2月, 英国食品标准署公布了500多种含有苏丹红 I 号的食物, 并宣布紧急召回。在英国发出食品警告之后, 我国也宣布在全国范围内紧急清查苏丹红 I 号。

对于苏丹红的检测, 目前主要采用液相色谱^[1-3]、液-质联用确认^[2]。由于食品中的基质复杂, 存在着大量的干扰物质(如辣椒酱中有天然色素、植物油的干扰), 而且这些干扰物的含量远超过目标分析物的含量, 若未经净化而直接测定, 不但会

污染色谱柱, 而且会给高效液相色谱(HPLC)测定带来困难, 因此本文建立了凝胶柱净化-高效液相色谱检测食品中苏丹红的方法, 取得了较好的结果。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Beckman 125 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器(HPLC-DAD)(Beckman 公司, 美国)。甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 无水乙醇、乙酸乙酯、环己烷、无水硫酸钠(分析纯, 上海试剂厂), 苏丹红 I (97.52%)、苏丹红 II (90.0%)、苏丹红 III

(97.0%)、苏丹红Ⅳ(91.0%)标准品购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH(德国);Bio-Beads SX3 聚苯乙烯凝胶(200~300目,Bio-Rad公司)。

标准溶液 精密称取苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ标准品各10 mg(按其标称含量折算)。除苏丹红Ⅰ用甲醇溶解外,其他3种苏丹红均用1 mL乙酸乙酯溶解,再用甲醇定容至10 mL,分别配成1.00 g/L的标准储备液。取储备液各2.50 mL于50 mL容量瓶中,用甲醇定容,该溶液即为4种苏丹红的质量浓度均为50 mg/L的混合标准储备液。再用甲醇配制0.10,0.50,1.0,5.0,10.0 mg/L的标准系列溶液。

辣酱和香肠样品均购自泉州市市场。

1.2 凝胶柱

称取10 g Bio-Beads SX3 聚苯乙烯凝胶浸泡在50 mL环己烷-乙酸乙酯(体积比为1:1,下同)溶液中10 h左右,吸涨后的凝胶仍保持在液面下。将吸涨后的凝胶转移到玻璃柱(300 mm×10 mm i. d.)内,用环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗剂,流速约0.8 mL/min,在重力作用下流经凝胶柱,填充高度为200 mm,稳定后待用。

1.3 样品的提取与净化

准确称取4 g均匀化后的样品,加入8 g无水硫酸钠,振荡,使样品成疏松状;再加入30 mL无水乙醇,于70℃水浴中加热10 min,取出再置于超声波清洗器超声10 min,静置10 min,上清液经无水硫酸钠滤入50 mL烧杯中,残渣再用30 mL无水乙醇重复提取一次,合并提取液。提取液于70℃水浴中用氮气吹干,用1 mL环己烷-乙酸乙酯溶液溶解。

将上述溶液用吸管转移到凝胶柱的上层,注意不要搅动柱床,待液面降至凝胶柱顶端后加入环己烷-乙酸乙酯溶液作为洗脱液,弃去前15 mL洗脱液,收集第15~21 mL的洗脱液。将洗脱液置于吹氮浓缩仪中于70℃水浴下吹干,残渣用1 mL甲醇溶解,经0.45 μm油性滤膜过滤后待测。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters公司 Symmetry Shield RP18 反相柱(250 mm×4.6 mm i. d. 5 μm);**流动相**:100%甲醇;流速:1.5 mL/min;进样量:100 μL;光谱采集范围210~600 nm;检测波长:478 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

对于苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ和Ⅳ的同时检测,文献[2]采用乙腈-酸性水溶液为流动相进行梯度洗脱。本文试验了98%(体积分数,下同)甲醇水溶液和100%甲醇两种流动相体系,发现在前一个体系中苏

丹红Ⅳ的保留时间过长;最后以100%甲醇作流动相,流速1.5 mL/min,4种苏丹红组分均峰形良好,其混合标准溶液(5.0 mg/L)的色谱图见图1。

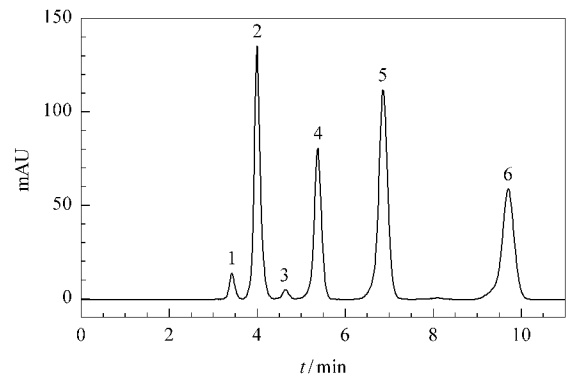


图1 苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ混合标准溶液(5.0 mg/L)的色谱图
Fig.1 Chromatogram of the standard solution of Sudan Red I, II, III and IV(5.0 mg/L)
1. 3. impurity; 2. Sudan Red I; 4. Sudan Red II; 5. Sudan Red III; 6. Sudan Red IV.

用二极管阵列检测器采集210~600 nm的光谱图,发现苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ和Ⅳ的最大吸收波长依次为478,498,510,518 nm。最终选定478 nm作为4种组分的检测波长。

2.2 提取溶剂的选择

苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ和Ⅳ的极性较小,难溶于水而较易溶于有机溶剂,因此开始时选用乙酸乙酯作提取溶剂,但回收率只达到60%左右(辣酱加标2.5 mg/kg),其原因可能是乙酸乙酯难溶于水,在提取时较难渗入样品内部,从而影响了回收率。最终采用无水乙醇作提取溶剂,回收率上升到85%左右。

2.3 苏丹红在凝胶柱上的流出规律

Bio-Beads SX3 凝胶已成功地应用于动物食品中有机磷、有机氯、氨基甲酸酯农药检测中的净化^[4]。为了观察其对苏丹红的分离净化,在自填的凝胶柱上,采用文献[4]所用的流动相环己烷-乙酸乙酯(体积比为1:1)进行试验:配制苏丹红Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ混合标准溶液(50 mg/L)过凝胶柱,用上述环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗液,弃去前10 mL洗脱液,从第11 mL开始将每1 mL洗脱液收集于单个试管中,吹干后分别用1 mL甲醇溶解,HPLC检测各段洗脱液中苏丹红的含量。结果表明,4种苏丹红组分均都在第15~21 mL洗脱液中流出,因此在净化操作时选择收集这一阶段流出液,其余部分弃去。

2.4 凝胶柱的净化效果

对于苏丹红的检测,国家标准^[3]采用氧化铝净化的方法,其原理是基于苏丹红的极性与天然色素、油脂的极性差异进行的。而本试验中采用凝胶柱净化是基于苏丹红与干扰物的相对分子质量的差异进

行的。苏丹红 I ,II ,III ,IV 的相对分子质量分别为 248 276 352 和 380 ,在凝胶色谱柱上可和色素、油脂等干扰物分离 ,从而达到较好的净化效果。

图 2-a 为一辣酱空白样品提取液经凝胶柱净化后的 HPLC 谱图 ,图 2-b 是样品加标(添加水平为

0.25 mg/kg)提取液经凝胶柱净化后的色谱图 ,而图 2-c 则是未经净化的加标样品色谱图。从图 2 中可以看出 ,即使目标组分仅有很低的浓度 ,经凝胶柱净化后仍能得到有较好信噪比的 HPLC 谱图 ,而未经净化的则难以从干扰峰中辨别出苏丹红。

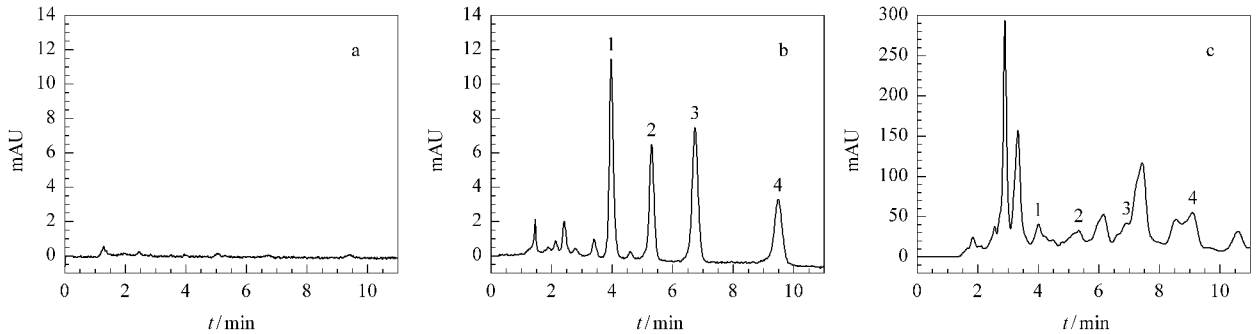


图 2 空白辣酱样品(a)和经凝胶柱净化的(b)及未经净化(c)的加标辣酱样品(添加水平为 0.25 mg/kg)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of extract from blank sample of chili sauce (a) , extract from chili sauce spiked at 0.25 mg/kg with gel column clean-up (b) and extract from chili sauce spiked at 0.25 mg/kg without any clean-up (c)

1. Sudan Red I ;2. Sudan Red II ;3. Sudan Red III ;4. Sudan Red IV .

2.5 光谱定性

HPLC-DAD 可对目标组分的光谱信息进行即时采集 ,得到其完整的紫外光谱图 ,利用光谱图可对色谱峰进行有效的定性 ,但当待测物浓度较低 ,特别是在有其他天然色素、合成色素存在时 ,会给光谱定性带来困难^[5]。由于采用了凝胶柱净化技术 ,可得到较纯的目标组分提取物 ,使得光谱分析结果不易受其他杂质干扰 ,同时还加大了进样量 ,增加了检测的响应值及光谱定性的可靠性。图 3 为一辣酱样品添加 0.25 mg/kg 的苏丹红 I 标准品时所采集的样品光谱图与标准品光谱图 ,结果表明即使目标组分含量为 0.25 mg/kg 时 ,仍能采集到较好的光谱图 ,光谱匹配度为 0.963 0。

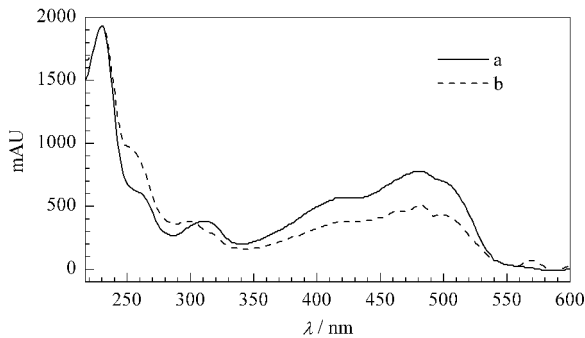


图 3 标准苏丹红 I (a)与加标(0.25 mg/kg)样品(b)的光谱图

Fig.3 Spectra of Sudan Red I standard (a) and chili sauce spiked at 0.25 mg/kg (b)

2.6 标准曲线与检测限

配制 0.1 ~ 10.0 mg/L 苏丹红 I ,II ,III ,IV 标准溶液 ,按选定的色谱条件测定 ,以峰面积 Y 对质

量浓度 X(mg/L)进行线性回归 ,其回归方程分别为 :苏丹红 I , $Y = 268\ 728X + 2\ 614$;苏丹红 II , $Y = 192\ 254 X - 223$;苏丹红 III , $Y = 338\ 161X - 16\ 570$;苏丹红 IV , $Y = 243\ 493X - 12\ 543$,相关系数为 0.999 3 ~ 0.999 9。以信噪比(S/N)为 3 计算 4 种苏丹红标准品的检测限(LOD)依次为 :0.007 ,0.012 0.009 0.014 mg/kg ;以 S/N 为 10 计算其定量限(LOQ)依次为 :0.02 0.04 0.03 0.05 mg/kg 。

2.7 方法的回收率与精密度

分别在辣酱、香肠样品中添加上述 4 种苏丹红标准品 0.25 和 2.5 mg/kg ,按本方法进行测定 ,每个浓度测定 3 次 ,计算其平均加标回收率为 80.7% ~ 96.3% ,相对标准偏差(RSD)为 2.4% ~ 5.9%。

2.8 样品中苏丹红的测定

用上述方法对市售辣酱和香肠样品中的苏丹红 I ~ IV 进行测定 ,结果未发现样品中含有目标组分。

参考文献 :

[1] Yu Linghan , Mou Dehai , Li Guangxian , Yan Shiping. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory (喻凌寒 , 牟德海 , 李光宪 , 阎世平 . 光谱实验室) , 2004 , 21(6) : 1 131

[2] Veretout O , Demesse L , Szymanski L. Analysis and Dosage of the Colorants Sudan and Bixin in Chilli Powder and Pepper-Based Products. <http://www.aqsiq.gov.cn/cms/data/25/13951.doc> , 2005-02-24

[3] GB/T 19681-2005. <http://www.sac.gov.cn/news/general/4296.pdf> , 2005-03-29

[4] GB/T 5009.161-2003. Determination of Organophosphorus Pesticide Multiresidues in Animal Foods. Beijing : Standard Press of China (动物性食品中有机磷农药多组分残留量的测定 . 北京 : 中国标准出版社) , 2003

[5] Tateo F , Bononi M. J Agric Food Chem , 2004 , 52(4) : 655