

- [2] ECONOMOU A ,FIELDEN P R. Applications ,potentialities and limitations of adsorptive stripping analysis on mercury film electrodes[J]. Trends Anal Chem ,1997 ,16(5) :286-292.
- [3] OLIVEIRA M F ,SACZK A A ,OKUMURA L L , et al. Simultaneous determination of zinc ,copper ,lead and cadmium in fuel ethanol by anodic stripping voltammetry using a glassy carbon-mercury-film electrode[J]. Anal Bioanal Chem 2004 ,380 (1) : 135-140.
- [4] BA BAEI A , SHAMS E , SAMADZADEH A. Simultaneous determination of copper ,bismuth and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of thymolphthalein[J]. Anal Sci , 2006 22:955-959.
- [5] 张海丽,叶永康,徐斌. 酸性铬蓝 K 固体石蜡碳糊修饰电极溶出伏安法测定痕量铅[J]. 分析化学 2000 28 (2) : 194-196.
- [6] 黄文胜,杨春海,张升辉. 双硫脲修饰玻碳电极阳极溶出伏安法测定痕量镉和铅[J]. 分析化学 2002 30 (11) : 1367-1370.
- [7] DU XIAOYAN ,GONG WEILEI ,ZHANG YUXUE ,et al. Bismuth film-modified gold electrodes for the determination of trace level of heavy metals in vegetables[J]. Sensor Lett 2007 5:572-577.
- [8] 公维磊,杜晓燕,王舒然,等. 预镀铋膜修饰铂电极差分脉冲溶出伏安法测定痕量铅、镉[J]. 分析化学,2008 ,36 (2) : 177-181.
- [9] BABKINA S S ,ULAKHOVICH N A. Complexing of heavy metals with DNA and new bioaffinity method of their determination based on amperometric DNA-based biosensor [J]. Anal Chem ,2005 , 77: 5678-5685.
- [10] HOCEVAR S B ,SVANCARA I ,OGOREVC B. Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis[J]. Anal Chem , 2007 ,79: 8639-8643.
- [11] 公维磊,王长芹,杨金玲,等. 铋膜电极方波溶出伏安法测定痕量 Pb Cd[J]. 济宁医学院学报 2011 ,34 (1) : 40-43.

实验技术与方法

HPLC 同时测定调味料中非法添加多组分工业染料的方法研究

赵海燕,赵榕,李兵,陈忠辉,吴国华

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 建立了同时测定调味料中 15 种工业染料含量的 HPLC 方法。方法 采用 CAPCELL PAK C₁₈ MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以硝基咪喃-乙腈-20 mmol/L 乙酸铵为流动相体系进行梯度洗脱,分别在波长为 450、530 和 600 nm 下检测。结果 方法的线性范围:2 ~ 50 μg/ml, $r \geq 0.99$ 。15 种工业染料的检出限为 0.05 ~ 0.53 mg/kg; 15 种组分的平均回收率 73.68% ~ 89.33%, 相对标准偏差 ($n = 6$) 0.8% ~ 8.1%。结论 本方法快速、准确、灵敏,可用于同时测定食品中 15 种非法添加的工业染料。

关键词:工业染料; 苏丹; 调味料; HPLC; 食品污染物; 食品安全

中图分类号: O657.72; X836 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2011)06-0527-05

Methodology of simultaneous determination of illegally added industrial dye in condiments by HPLC

Zhao Haiyan, Zhao Rong, Li Bing, Chen Zhonghui, Wu Guohua

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To determine 15 kinds of industrial dyes simultaneously in condiments with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were separated on a CAPCELL PAK C₁₈ MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column and gradient eluted with nitrofurane-acetonitrile-20 mmol/L ammonium acetate and detected at 450, 530 and 600 nm. **Results** The calibration curve showed good linearity in the range of 2 ~ 50 μg/ml, and the correlation coefficients were better than 0.99. The limits of detection were in the range of 0.05 ~ 0.53 mg/kg. The recoveries of standard addition at three levels was 73.68% ~ 89.33% and the RSD ($n = 6$) was 0.8% ~ 8.1%. **Conclusion** The method was sensitive and accurate, it could be used for the detection of the 15 kinds of industrial dyes in condiments simultaneously.

Key words: Industrial dye; Sudan; Condiment; HPLC; food contaminants; food safety

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 北京市卫生局青年科学基金课题(QN-2007-16)

作者简介: 赵海燕,女,工程师,研究方向为食品安全检验, E-mail: zhaohy_yan@hotmail.com

碱性橙 (Chrysoidine G)、碱性玫瑰精 (Rhodamine B)、酸性橙 II (Orange II) 及酸性金黄 (Metanil Yellow)、对位红 (Para Red)、苏丹黄 (Sudan Yellow)、苏丹橙 (Sudan Orange)、苏丹 I ~ IV (Sudan I ~ IV)、苏丹黑 B (Sudan Black B)、溶剂蓝 35 (Solvent Blue 35)、苏丹红 7B (Sudan Red 7B)、苏丹红 G (Sudan Red G) 等均属偶氮类染料,主要用于丝、毛织品、皮革等的染色,对人体健康具有严重的危害,在我国被严格禁止添加于食品中,但是,近几年我国和世界各国不断报道食品中检出了各种工业染料。因此,建立一种快速准确地测定食品中非法食用色素的方法,及时准确地判断食品中是否存在该非法食用色素,具有重要意义。

目前文献报道的方法主要有液相色谱法^[1-8]、液相色谱质谱联用法^[3,9]、气相色谱质谱联用法^[10]等。由于工业染料的种类比较多,不法经营者使用的染料也不尽相同,而目前国标方法和文献报道的检测方法,大多只能用于测定其中的一至三种化合物,为此,本文建立了一种采用反相高效液相色谱法梯度洗脱,能够同时测定酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙 II、碱性玫瑰精等 15 种化合物的方法,方法的灵敏度高,重现性好,方便快捷。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 配备有 Waters-Allains2695 泵控及自动进样系统,以及 Waters-2996 二极管阵列检测器、离心机、超声震荡器。

丙酮、乙腈、四氢呋喃、氯仿 (色谱纯,迪马公司);乙酸铵 (分析纯,北京化学试剂公司);试验用水均为超纯水。

标准储备液的配制:准确称取 0.010 0 g 酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、碱性玫瑰精标准品于 10 ml 棕色容量瓶中,用乙腈/水 (50/50) 溶解并定容至体积;苏丹橙、苏丹黄、对位红、苏丹红 G、苏丹 I 用氯仿溶解后用乙腈定容至体积;苏丹 II、III、IV、苏丹红 7B、苏丹黑、溶剂蓝 35 用氯仿溶解并定容。

标准使用液:分别吸取 1.0 ml 酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、碱性玫瑰精、苏丹橙、对位红标准储备液到 10 ml 容量瓶中用乙腈定容至刻度;苏丹黄、苏丹红 G、苏丹 I、苏丹 II、III、IV、苏丹红 7B、苏丹黑、溶剂蓝 35 用四氢呋喃/乙腈 (50/50) 定容至刻度为中间使用液,再分别取 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 ml 中间使用液到 10 ml 容量瓶中用四氢呋喃/乙腈 (50/50) 定容至刻度,15 种组分的标准系列为:2、5、10、20、40 μg/ml。

1.2 液相色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MG (4.6 mm ×

250 mm 5 μm);

流动相: A: 20 mmol/L 乙酸铵水溶液; B: 四氢呋喃; C: 乙腈;

梯度洗脱	A	B	C
0 min	70	5	25
18 min	5	20	75
27 min	5	20	75
28 min	70	5	25

检测波长: 酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、苏丹橙、苏丹黄、对位红、苏丹红 G、苏丹 I、苏丹 II 450 nm; 碱性玫瑰精、苏丹 III、苏丹 IV、苏丹红 7B 530 nm; 苏丹黑、溶剂蓝 35 600 nm;

流速 1.0 ml/min; 柱温 35 °C; 进样体积 10 μl。

1.3 样品处理

调味料的提取: 准确称取 2 ~ 5 g 样品于 50 ml 塑料离心管中,加入 5 ml 丙酮 + 水 (90 + 10), 超声提取 20 min 后,以 10 000 r/h 离心 10 min,取 10 μl 液相色谱测定。

1.4 定性及定量

分别取标准和样品各 10 μl 进样, HPLC 测定。以保留时间和扫描光度图定性,外标法定量。

$$C = \frac{c \times 10}{W}$$

C: 样品中待测组分的含量, μg/g;

c: 样品中待测组分的测定浓度, μg/ml;

W: 样品重量, g。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

2.1.1 流动相中盐的选择

流动相中的盐对酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、碱性玫瑰精的影响比较大。分别以水、10 mmol/L 乙酸铵水溶液、20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相进行比较,发现在纯水的时候,只有碱性橙和碱性玫瑰精出峰,酸性金黄和酸性橙 II 都没有出峰,而且碱性橙拖尾严重。乙酸铵的加入可以改善峰型,并且酸性金黄和酸性橙 II 出峰了,在 10 mmol/L 乙酸铵水溶液时酸性金黄和碱性玫瑰精仍无法完全分离,而在 20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相时酸性金黄和碱性玫瑰精也能够完全分离。

2.1.2 流动相中有机相的选择

在本文的梯度洗脱过程中,当只用乙腈作为流动相时苏丹黄和对位红重叠,苏丹橙和苏丹红 G 重叠;苏丹红 7B 和苏丹 IV 重叠。当只改变乙腈的比例时,三对组分同时前移或后移。而在洗脱时加入四氢呋喃,可以明显改善其分离,所以选择了乙腈/

20 mmol/L 乙酸铵水溶液/四氢呋喃为梯度洗脱条件。

2.2 检测波长的选择

根据 15 种工业染料的紫外光谱图,选择在 450 nm 下测定酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、苏丹橙、苏丹黄、对位红、苏丹红 G、苏丹 I、苏丹 II; 在 530 nm 下测定碱性玫瑰精、苏丹 III、苏丹 IV、苏丹红 7B; 在 600 nm 下测定苏丹黑、溶剂蓝 35, 并且建立了 15 种组分的紫外光谱的谱库,在测定样品时可以用于匹配。标准色谱图见图 1, 样品色谱图见图 2。由于样品中不含苏丹黑、溶剂蓝 35, 所以没有 $\lambda = 600$ nm 色谱图。

2.3 样品提取液的选择

酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、碱性玫瑰精易溶于水 and 乙醇, 微溶于丙酮, 文献报道常用乙醇或不同比例的乙醇/水来提取上述染料; 苏丹橙、苏丹 I~IV、溶剂蓝 35、苏丹红 7B、苏丹黄、对位红、苏丹黑 B、苏丹红 G 是脂溶性染料, 不溶于水, 易溶于有机溶剂, 文献报道常用于提取苏丹 I~IV、对位红的溶剂有甲醇、乙腈、正己烷和丙酮。由于苏丹 IV、苏丹红 7B、苏丹黑 B 等组分微溶于甲醇和乙腈, 而正己烷不能与水混合无法提取酸性金黄、酸性橙 II、碱性橙、碱性玫瑰精 4 个组分, 所以选择了不同比例的丙酮/水作为提取溶剂进行实验。结果表明, 丙酮/水 (90/10) 时能够同时提取样品中 15 种目标化合物。

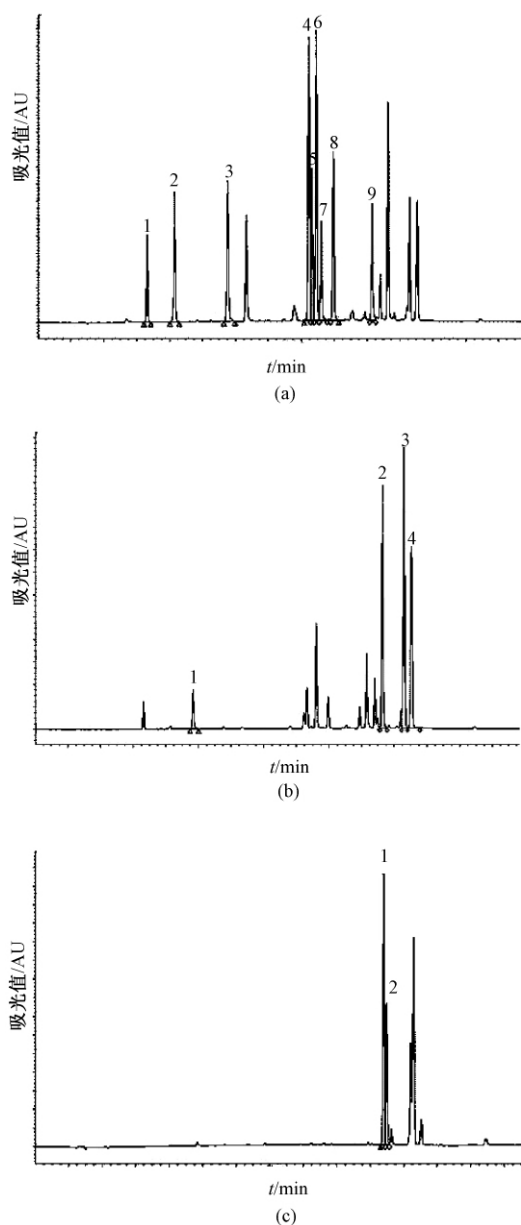
2.4 检出限、精密度、回收率及线性范围

4 种组分在浓度在 2 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与响应值成良好的线性关系, 回归方程和检出限见表 1。

表 1 15 种非法添加工业染料的回归方程和检出限

Table 1 Linear equations and detection limits of 15 kinds of illegally added industrial dyes

组分	标准曲线	R	检出限 (mg/kg)
酸性橙 II	$Y = 28400X - 292$	0.9999	0.48
酸性金黄	$Y = 51100X - 2920$	0.9999	0.24
碱性橙	$Y = 43400X - 2070$	0.9999	0.27
碱性玫瑰精	$Y = 203000X - 1920$	0.9999	0.05
苏丹黑	$Y = 55700X - 770$	0.9992	0.53
溶剂蓝 35	$Y = 8740X - 4890$	0.9993	0.49
苏丹红 7B	$Y = 56800X - 1110$	0.9999	0.17
苏丹四	$Y = 55300X - 13900$	0.9999	0.23
苏丹橙	$Y = 18700X - 7060$	0.9999	0.47
对位红	$Y = 30600X - 4390$	0.9999	0.26
苏丹黄	$Y = 50500X - 13000$	0.9999	0.14
苏丹红 G	$Y = 25800X - 18000$	0.9999	0.29
苏丹 1	$Y = 25300X - 6090$	0.9999	0.26
苏丹 2	$Y = 19500X - 3790$	0.9999	0.25
苏丹 3	$Y = 30700X - 10700$	0.9999	0.25



色谱图 (a): $\lambda = 450$ nm, 1 酸性橙 II, 2 酸性金黄, 3 碱性橙, 4 苏丹橙, 5 对位红, 6 苏丹黄, 7 苏丹红 G, 8 苏丹 I, 9 苏丹 II;

色谱图 (b): $\lambda = 530$ nm, 1 碱性玫瑰精, 2 苏丹 III, 3 苏丹 IV, 4 苏丹红 7B;

色谱图 (c): $\lambda = 600$ nm, 1 苏丹黑 B, 2 溶剂蓝 35

图 1 标准色素的色谱图

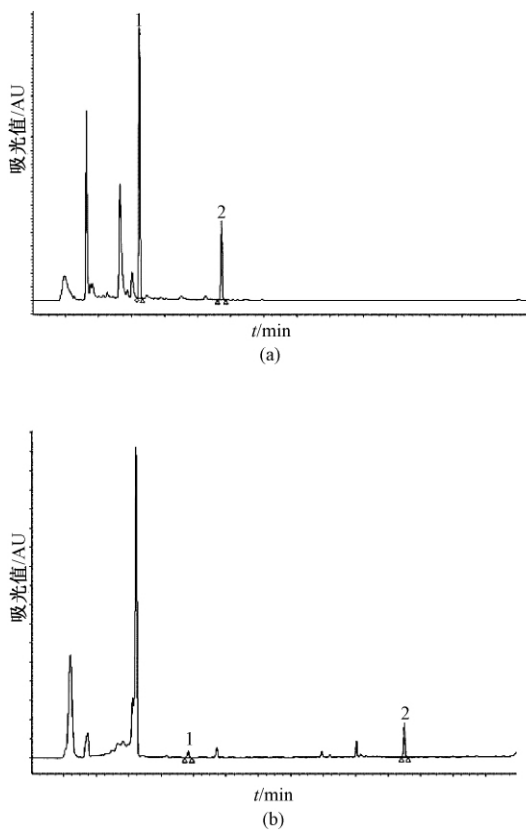
Figure 1 Chromatogram of standard industrial dyes

用花椒面作本底, 加标水平分别为 6、40 $\mu\text{g}/\text{g}$, 按上述方法进行测定, 方法的回收率和相对标准偏差见表 2。

2.5 实际样品的测定

运用本方法对 70 件调味料中 15 种工业染料进行了测定, 其中 20 件样品检出含有工业染料, 结果见表 3。

综上, 该方法可有效地应用于调味品中碱性橙、碱性玫瑰精、酸性橙 II 及酸性金黄等工业染料的同时测定, 且方法快速灵敏准确, 对于非法添加的工业染料的快速筛查具有重要意义。



色谱图 (a) : $\lambda = 450 \text{ nm}$,1 酸性橙 II 2 碱性橙;
色谱图 (b) : $\lambda = 530 \text{ nm}$,1 碱性玫瑰精 2 苏丹红 7B

图 2 样品色谱图

Figure 2 Chromatogram of samples

表 2 方法的精密度和回收率

Table 2 The recovery of standard addition and precision of the method ($n = 6$)

组分	加入量 ($\mu\text{g/g}$)	均值 ($\mu\text{g/g}$)	平均回收率 %	RSD %
酸性橙 II	6	5.13	85.57	8.1
	40	32.34	80.84	4.3
酸性金黄	6	5.26	87.73	6.7
	40	32.00	79.99	5.2
碱性橙	6	5.06	84.37	7.4
	40	30.95	77.37	5.6
碱性玫瑰精	6	5.36	89.33	3.4
	40	32.20	80.49	1.3
苏丹黑	6	4.81	80.22	6.7
	40	29.47	73.68	3.7
溶剂蓝 35	6	4.93	82.20	5.3
	40	31.08	77.69	2.9
苏丹红 7B	6	4.81	80.23	2.0
	40	30.36	75.91	1.3
苏丹 IV	6	4.97	82.80	1.0
	40	30.06	75.16	0.8
苏丹橙	6	5.03	83.88	2.1
	40	32.14	80.35	1.2
对位红	6	5.12	85.33	2.9
	40	31.25	78.12	1.6
苏丹黄	6	5.02	83.62	1.6
	40	31.28	78.19	0.9
苏丹红 G	6	4.99	83.18	1.4
	40	30.03	75.07	1.1
苏丹 I	6	5.02	83.65	2.0
	40	30.16	75.41	1.7
苏丹 II	6	4.99	83.20	1.3
	40	30.15	75.37	0.9
苏丹 III	6	5.11	85.23	1.9
	40	29.78	74.45	1.2

表 3 样品中非法添加工业染料含量的测定结果

Table 3 Contents of illegally added industrial dyes detected in samples (mg/kg)

编号	碱性橙	碱性玫瑰精	酸性橙 II	酸性金黄	苏丹橙	苏丹黄	苏丹 I	苏丹红 G	对位红	苏丹棕	苏丹 II	溶剂蓝 35	苏丹 III	苏丹红 7B	苏丹 IV	苏丹黑 B
1	6.7	6.5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	11.0	12.7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3	4.9	5.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4	/	1.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
5	7.8	3.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6	1.8	2.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7	9.5	11.8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
8	19.1	4.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
9	26.1	56.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10	15.5	1.2	1835.7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
11	68.9	16.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
12	69.6	16.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
13	64.5	10.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
14	100.0	22.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
15	571.8	46.2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
16	34.7	47.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
17	87.3	19.7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
18	72.3	1.1	522.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.4	/	/
19	46.3	15.0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
20	14.3	10.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

注: / 为未检出。

参考文献

- [1] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202.
- [2] 铁晓威, 黄百芬, 任一平. RP-HPLC 测定染色黄鱼中的碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59.
- [3] 任一平, 黄百芬, 铁晓威, 等. LC-MS/MS 测定染色海洋杂鱼中的碱性橙的含量[R]. 第十五次全国色谱学术报告会论文集, 2005: 741.
- [4] 赵丽佳, 饶伟文, 吴萌. 染色红花中酸性橙 II 测定法的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1794.
- [5] 张耀武, 顾慧莹, 路军辉. 高效液相色谱法测定食品中的酸性橙 II [J]. 化学分析计量, 2005, 14(1): 48.
- [6] 卢彩霞, 陈艳, 李永波. 高效液相色谱法测定豆制品中酸性橙 II 和酸性金黄[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(15): 2594.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 19681—2005 食品中苏丹红的检测方法-高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [8] 温忆敏, 汪国权, 张慧敏, 等. 食品中苏丹红系列和对位红的测定方法研究[J]. 环境与职业医学, 2006, 23(1): 27-30.
- [9] 喻凌寒, 杨运云, 闫世平, 等. LC-ESI/MS 分析食品中微量苏丹红 I ~ IV [J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 28-31.
- [10] 苏小川, 黄梅, 甘宾宾, 等. 调味品辣椒粉和腌料中苏丹 I 染料的 GC-MS 分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1073-1074.

实验技术与方法

HPLC 法测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的研究

甘宾宾, 刘展华, 黎少豪

(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530028)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的简便方法。方法 样品用水超声提取, 色谱柱: CAPCELL PAK CR(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 25 mmol/L 乙酸铵 + 乙腈(加 0.1% 甲酸)(25 + 75, V/V); 流量 1.0 ml/min, 检测波长 200 nm。结果 盐酸氨基葡萄糖在 0.2 ~ 26.0 μg 范围内呈良好线性, 相关系数为 1.000; 检出限为 0.02 μg; 回收率 99.5% ~ 101.0%; RSD 1.03%。结论 该方法操作简便快速, 结果准确可靠, 可作为保健食品中盐酸氨基葡萄糖的质量控制监测。

关键词: HPLC; 盐酸氨基葡萄糖; 保健食品

中图分类号: O657.72; TS207.3 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2011)06-0531-03

Determination of glucosamine hydrochloride in health food by HPLC

Gan Binbin, Liu Zhanhua, Li Shaohao

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of glucosamine hydrochloride in health food by HPLC. **Methods** Samples were extracted ultrasonically with water and separated on a CAPCELLPAKCR column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of 25 mmol ammonium acetate + acetonitrile (in 0.1% formic acid) (25 + 75, V/V). The flow rate was 1.0 mL/min; the detection wavelength was 200 nm. **Results** The standard curve of glucosamine hydrochloride was linear over the range in 0.2 ~ 26.0 μg ($r = 0.999\ 982$). The limit of detection was 0.02 μg. The recovery was 98.1% ~ 104%, RSD was 1.03%. **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable, which can be used for the quality control of glucosamine hydrochloride in health food.

Key words: HPLC; glucosamine hydrochloride; function food

盐酸氨基葡萄糖(GAH)又称氨基葡萄糖盐酸盐或葡胺糖盐酸盐,学名 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖盐酸盐,是氨基葡萄糖的一种稳定化合物,它可利用节肢动物外壳中提取的甲壳素在盐酸溶液中

充分水解而制得^[1],它具有消炎止痛,治疗与修复关节软骨组织,抗氧化,保护肝,抗肿瘤等功效^[2]。由于盐酸氨基葡萄糖具有多种重要的生理功能,它正成为人们研究的热点。现在,市场上已出现了多

收稿日期: 2011-01-18

作者简介: 甘宾宾 女 主任技师 研究方向为理化分析检验 E-mail: gan-bb@tom.com