

- microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer[J]. *Anal Chim Acta*,2011,702:56-61.
- [5] CHAO Y Y, WEI Y T, LEE C T, et al. Membrane sampling with microdialysis coupled to HPLC/UV for on-line simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy coffee creamer[J]. *Anal Sci*,2011,27(10):1025-1030.
- [6] SUN H, QIN X, GE X, et al. Effective separation and sensitive determination of cyanuric acid, melamine and cyromazine in environmental water by reversed phase high-performance liquid chromatography[J]. *Environ Technol*,2011,32(3-4):317-323.
- [7] SUN P, WANG J Q, SHEN J S, et al. Residues of melamine and cyanuric acid in milk and tissues of dairy cows fed different doses of melamine[J]. *J Dairy Sci*, 2011,94(7):3575-3582.
- [8] TZING S H, DING W H. Determination of melamine and cyanuric acid in powdered milk using injection-port derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry with furan chemical ionization[J]. *J Chromatogr A*,2010,1217(40):6267-6273.
- [9] ZHANG M, LI S, YU C, et al. Determination of melamine and cyanuric acid in human urine by a liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2010,878(9-10):758-762.
- [10] TZING S H, DING W H. Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009,1216(44):7595-7601.
- [11] YANG F, MAO Y, ZHANG X, et al. LC-MS/MS method for the determination of melamine in rat plasma: Toxicokinetic study in Sprague-Dawley rats[J]. *J Dairy Sci*,2009,32(17):2974-2978.

实验技术与方法

超高效液相色谱同时测定食品中4种工业染料

谢维平, 欧阳燕玲, 黄盈煜, 陈春祝

(泉州市疾病预防控制中心理化检验科, 福建 泉州 362000)

摘要:目的 建立同时测定食品中酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明 B 工业染料的方法。方法 样品用水-5% 氨水乙腈-正己烷混合溶剂提取净化, 采用 ZORBAX Extend C₁₈ (2.1 mm i. d. × 50 mm, 1.8 μm) 分离, 以乙腈—乙酸铵缓冲液梯度洗脱, 流速为 0.5 ml/min, 二极管阵列检测器检测酸性橙 (λ = 485 nm)、碱性橙及碱性嫩黄 (λ = 435 nm)、罗丹明 B (λ = 548 nm)。结果 4 种组分在 0.1 ~ 10.0 mg/L 范围内有良好的线性关系 (r > 0.999), 检测限为 0.006 4 ~ 0.019 mg/kg。在番茄沙司、腊肠、辣椒油 3 种不同食品基质中平均加标回收率为 70.0% ~ 102.7%, 相对标准偏差为 0.5% ~ 3.1%。结论 方法快速, 简单, 可应用于食品中酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明 B 4 种工业染料的同时检测。

关键词:超高效液相色谱; 酸性橙; 碱性橙; 碱性嫩黄; 罗丹明 B; 食品

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)04-0329-04

Simultaneous determination of four industrial dyes in foods by ultra high performance liquid chromatography

Xie Weiping, Ouyang Yanling, Huang Yingyu, Chen Chunzhu

(Department of physical and chemical analysis, Quanzhou center for disease control
and prevention, Fujian Quanzhou, 362000, China)

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of Orange 2, Aurine O, Chrysoidine G and Rhodamine B in foods by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). **Methods** Samples were extracted and cleaned up with water - 5% ammonia acetonitrile-n-Hexane mixture solvents. UHPLC separation was achieved by using ZORBAX Extend C₁₈ (2.1 mm i. d. × 50 mm, 1.8 μm) with an mobile phase consisting of acetonitrile and acetate buffer, and gradient program was used at a flow rate of 0.5 ml/min. The detection wavelength was set at 485 nm for Orange 2, 435 nm for aurine O and chrysoidine G, while 548 nm for rhodamine B. **Results** There was a good linear relationship (r > 0.999) in the range of 0.1-10 mg/L for these four dyes. The limits of detection (LOD) were from 0.006 4 to 0.019 mg/kg respectively. The average recoveries for all four dyes in tomato sauce, sausage and chili powder

收稿日期: 2012-03-05

作者简介: 谢维平 男 副主任检验师 研究方向为理化检验 E-mail: xweiping2000@163.com

were ranged 70.0% -102.7% , the relative standard deviations (RSDs) were 0.5% -3.1%. **Conclusion** The method is rapid, simple and could be applied for the simultaneous determination of Orange 2, Aurine O, Chrysoidine G and Rhodamine B in different kinds of foods.

Key words: Ultra high performance liquid chromatography; orange 2; aurine O; chrysoidine G; rhodamine B; food

酸性橙 II (Orange 2, CAS: 633-96-5)、碱性橙 (Chrysoidine G, CAS: 532-82-1)、碱性嫩黄 (Aurine O, CAS: 2465-27-2)、罗丹明 B (Rhodamine B, CAS: 81-88-9)均属于工业染料,主要用于家具、纸张、纺织品等的染色,这些染料都有致癌、致畸、致突变性,严重危害人体健康^[1]。工业染料被严格禁止添加于食品中,但不法商人在利益驱使下将工业染料违法加入食品中用于染色。因此,建立快速准确地测定食品中非法使用工业染料的方法,对于加强食品监管、保障食品安全具有重要意义。

关于这些食品中禁用染料的检测,目前有较多的文献报道,主要是采用液相色谱^[1-3]或液质联用方法^[4-8],样品前处理方法有采用丙酮^[1]、乙醇^[2]、甲醇^[8-9]等有机溶剂提取或提取后经固相萃取净化后^[4,6,8]测定。这些方法有的仅适用于某一类食品样品,有的未阐明不同食品样品的适用性。由于食品种类繁多,并且很多品种均有可能添加这些禁用染料,例如辣椒油、火锅底料可能添加罗丹明 B;腐竹、豆制品、黄鱼、腌制肉制品可能添加碱性橙,这些食品基质各异,既有高油脂又有高水含量,食品基质的差异导致其与染料结合力不同,从而引起提取率不同。本研究以番茄沙司、腊肠、辣椒油 3 种不同基质的食品样品作为试验对象,探讨合适的样品提取净化方法。通过试验,建立了采用水氨化乙腈正己烷混合溶剂提取方法,盐析后取乙腈层直接采用 UHPLC 同时测定这 4 种工业染料。同目前报道的方法相比,本方法提取净化一步完成,避免了较为繁琐的前处理方法,同时适用于含水及含油等不同基质的食品样品,取得了较好的结果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪, GL-20G-II 离心机, Milli-Q 超纯水系统, IKA HS260 basic 振荡器, 超声波清洗器, 样品匀质器。

甲醇、乙腈、乙酸铵 (HPLC 级); 正己烷、氨水、氯化钠, 均为分析纯; 碱性橙、罗丹明 B、碱性嫩黄标准品 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 酸性橙。

1.2 标准溶液

精密称取酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明 B 标准品 10 mg (按其标称含量折算), 用乙腈溶解并定容至 10 ml、配制成浓度为 1.00 mg/ml 的标准贮

备液。然后用乙腈逐级配制成浓度分别为 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L 的 4 种染料混合标准系列。

1.3 样品提取

1.3.1 辣椒酱、番茄沙司等含水量较大的样品

称取 10 g (准确至 0.01 g) 均匀化后的样品于 50 ml 塑料离心管中, 加入 10 ml 5% 氨水乙腈, 10 ml 正己烷, 用力振摇, 使样品分散, 在振荡器上以 240 次/min 振摇 15 min, 加入 6 g 氯化钠, 立即混匀, 以 7 000 r/min 离心 10 min。取 1 ml 乙腈层 (相当于 1.0 g 样品) 经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后采用 UHPLC 测定。

1.3.2 腊肠、黄鱼等肉制品

称取 5.0 g 均匀化后的样品于 50 ml 塑料离心管中, 加入 5 ml 水。然后同 1.3.1 中“加入 10 ml 5% 氨水乙腈……过滤后采用 UHPLC 测定”操作。

1.3.3 红辣椒粉等粉状样品、辣椒油、火锅料、奶油等油状样品

称取 2.5 g 均匀化后的样品于 50 ml 塑料离心管中, 加入 7.5 ml 水。然后同 1.3.1 中“加入 10 ml 5% 氨水乙腈……过滤后采用 UHPLC 测定”操作。

1.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend C₁₈ (50mm × 2.1 mm i. d., 1.8 μm, 美国 Agilent 公司)。流动相 20 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液和乙腈, 梯度洗脱方式: 0~4.5 min 乙腈从 20% 线性增加至 65%, 4.8 min 变回 20%, 在下次进样前平衡 3 min。流速 0.5 ml/min; 柱温 40 °C; 进样量 4 μl; DAD 检测波长: 酸性橙 485 nm, 碱性橙和碱性嫩黄 435 nm; 罗丹明 B 548 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

与传统 HPLC 相比, UHPLC 由于其柱效高, 分离度与灵敏度更好。经试验, 在醋酸铵缓冲液乙腈体系中, 4 种染料可以获得良好的峰形, 本方法处理后的样品溶液基质为纯乙腈, 如果直接进样分析, 由于溶剂效应的影响, 会造成色谱峰变宽甚至分裂, 为避免这种情况发生, 可将乙腈吹干后再用液相色谱初始流动相进行定容, 但增加了样品前处理步骤, 经试验, 利用自动进样器的程序进样功能, 标准溶液及样品溶液进样时各取 4 μl 再加入 16 μl

水,这样4种染料均可以获得良好的色谱峰。图1为4种工业染料混合标准溶液UHPLC色谱图。

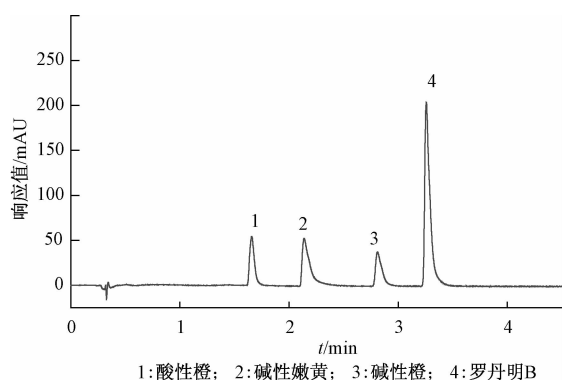


图1 4种工业染料混合标准溶液(5.0 mg/L)色谱图
Figure 1 Chromatogram of the mixture of 4 dye standards(5.0 mg/L)

用DAD采集210~600 nm的光谱图,4种染料的最大吸收波长分别为:酸性橙485 nm,碱性橙和碱性嫩黄435 nm,罗丹明B 548 nm。因此通过设定不同时间不同的检测波长,使4种组分在其最大吸收波长检测。

2.2 样品提取溶剂的选择

酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明B均能溶解在甲醇、乙醇、乙腈等极性溶剂,当采用乙腈作为提取溶剂时,可以通过盐析作用使乙腈和水分离,从而除去强极性干扰物,同时加入正己烷可以除去油脂、脂溶性色素,使方法适用于富含油脂的样品测定。因此选择水-乙腈-正己烷混合溶剂作为提取液,该提取液同时具有提取、净化作用,避免了繁琐的净化方法,达到快速检测目的。

由于这4种染料均为离子性化合物,提取溶液的酸、碱性会影响化合物离解状态及与食品基质的结合力,从而影响提取效率。因此,采用番茄沙司及腊肠作为基质(加标浓度:0.5 mg/kg),分别试验了乙腈,乙腈+1%乙酸,乙腈+1%氨水3种不同提取溶剂对4种染料的回收率影响,结果如表1所示。从表1可以看到,3种提取溶剂对番茄沙司中4种染料均可获得较好的回收(回收率大于80%),然而,在腊肠加标样品中,碱性橙回收率不高,采用乙腈+1%乙酸提取时碱性橙的回收率只有24%,而采用乙腈+1%氨水时提取时碱性橙的回收率上升到48%。在不同食品基质中碱性橙的回收率差别较大的原因可能在于:腊肠富含蛋白质,碱性橙染料与蛋白结合力较高,从而造成提取率降低。并且从实验结果看,在碱性条件下,更有利于碱性橙的提取。

2.3 提取液氨水比例的确定

为了确定提取液中氨水合适的比例,采用腊肠

表1 4种染料在不同提取液的回收率比较

Table 1 The recovery of 4 dyes in different extraction solvents (%)

化合物	乙腈		乙腈,1%乙酸		乙腈,1%氨水	
	沙司	腊肠	沙司	腊肠	沙司	腊肠
酸性橙	84	66	86	68	92	72
碱性嫩黄	102	92	104	96	104	92
碱性橙	84	40	80	24	94	48
罗丹明B	102	86	102	98	108	86

加标样品作为试验对象(加标浓度:0.5 mg/kg),进一步试验了2%、4%、6%、8%、10%、12%不同氨水比例的乙腈溶液对4种染料回收率的影响。图1为碱性橙在不同比例氨水下的回收率。结果表明:随着氨水比例的升高,碱性橙回收率也上升,当氨水比例达到4%回收率达最大值,继续增加氨水比例回收率变化不大,但当氨水比例达到10%时,回收率开始下降,同时,其他3种染料的回收率也降低。因此,最后确定水-5%氨水乙腈-正己烷作为4种染料同时测定的提取液。

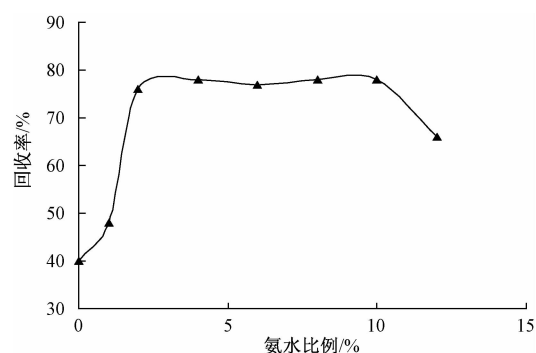


图2 不同氨水比例提取腊肠中碱性橙回收率
Figure 2 Recovery of chrysoidine G in sausage with different percentage of ammonia water in extraction solvent

2.4 标准曲线与检测限

配制0.1~10 mg/L酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明B标准溶液,按选定的色谱条件测定,以峰面积 y 对浓度 x (mg/L)进行线性回归,4种组分的线性关系良好,相关系数大于0.999。以空白番茄沙司样品的色谱图,分别测定4种染料保留时间上色谱图相对应的噪声,根据信噪比 $S/N=3$ 计算检测限(LOD), $S/N=10$ 计算定量限(LOQ)。4种染料的回归方程、相关系数、LOD、LOQ见表2。

表2 酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明B线性回归方程及检测限

化合物	回归方程	相关系数	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
酸性橙	$y = 34.2x - 1.4$	0.9999	0.0180	0.058
碱性嫩黄	$y = 54.4x - 3.1$	0.9999	0.0110	0.037
碱性橙	$y = 31.9x - 0.79$	0.9999	0.0190	0.063
罗丹明B	$y = 140.1x - 4.1$	0.9999	0.0064	0.021

2.5 方法的回收率与精密度

在番茄沙司、腊肠、辣椒油 3 种不同类型样品中分别添加含 0.25、2.5 mg/kg 的标准溶液,摇匀,静置 60 min 使标准溶液被样品充分吸收。然后按本方法进行测定,每个浓度测定 6 次,计算其平均加标回收率和相对标准偏差(RSD)。4 种染料在不同食品均获得较好回收(70.0% ~ 102.7%),RSD 为 0.5% ~ 3.1%,如表 3 所示。同时,加标样品的色谱图上未见到明显的干扰峰,表明采用混合溶剂提取净化一步完成,可以得到较为干净的色谱图。图 3 为番茄加标样品色谱图。

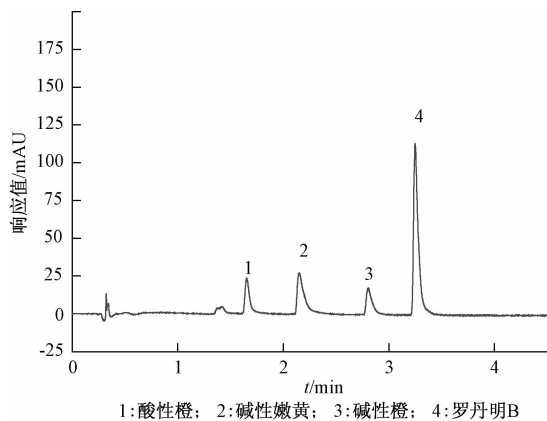


图 3 番茄加标样品色谱图(加标浓度 2.5 mg/kg)
Figure 3 Chromatogram of tomato sauce sample spiked at 2.5 mg/kg

2.6 实际样品测定

采用本文建立的方法对市售辣椒面、辣椒酱、腊肠等 20 份样品进行检测,其中有 2 份辣椒面同时检出碱性橙和罗丹明 B,其中 1 份样品碱性橙和罗丹明 B 含量为 1.2 及 5.4 mg/kg,另 1 份样品碱性橙和罗丹明 B 含量为 2.3 及 3.0 mg/kg,图 4 为一辣椒

面实际样品色谱图。表明目前食品中违禁使用工业染料现象仍然存在,应加大执法监督力度。

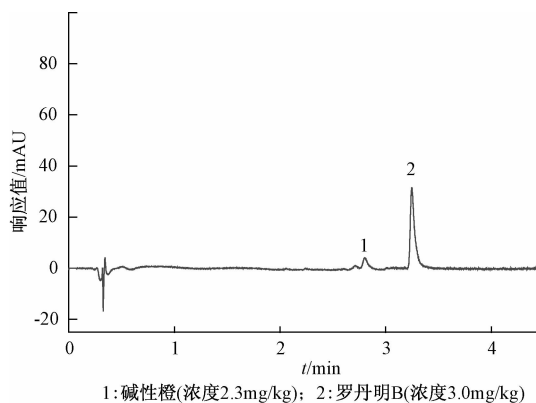


图 4 辣椒面实际样品色谱图
Figure 4 Chromatogram of real chili powder sample

3 结论

建立了采用水-5% 氨水乙腈-正己烷混合溶剂提取净化,超高效液相色谱同时测定不同类型的食品样品中 4 种工业染料的方法,方法快速简单,提取净化一步完成,避免了较为繁琐的前处理方法,适用于不同基质的食品样品 4 种工业染料的的同时测定。

参考文献

[1] 赵海燕,赵榕,李兵,等. 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[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(6):527-531.

[2] 杨琳,陈青俊,丁献荣,等. 高效液相色谱法测定食品中 3 种碱性橙含量[J]. 理化检验(化学分册),2011,23(7):768-770.

[3] 谭莹,吴平谷,张晶,等. HPLC 法测定辣椒中碱性橙的含量[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(3):522-524.

[4] 赵榕,李兵,赵海燕,等. 固相萃取-超高效液相色谱串联四级杆质谱同时测定调味品中 12 种工业染料[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(4):305-312.

[5] 赵榕,赵海燕,李兵,等. 建立同时测定调味品中非法添加的 4 种工业染料的 SPE-UPLC-MS/MS 法研究[J]. 中国食品卫生杂志,2009,21(5):410-414.

[6] 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,2010,31(4):356-362.

[7] 林赛君,屠海云,孙岚,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中五种黄色化工染料[J]. 色谱,2011,32(1):79-82.

[8] 曹鹏,乔旭光,娄喜山,等. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J]. 分析化学,2011,25(11):1670-1675.

表 3 4 种染料在不同食品基质加标回收率与精密度

Table 3 Recovery and RSD of four dyes in different foods (n = 6)

化合物	添加水平 (mg/kg)	番茄沙司		腊肠		辣椒油	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
酸性橙	0.25	96.8	3.0	100.0	0.7	102.4	2.7
	2.5	88.3	2.5	80.8	0.5	92.9	1.4
碱性嫩黄	0.25	96.9	1.7	95.3	0.9	101.3	2.8
	2.5	99.2	3.0	84.7	0.7	91.3	0.5
碱性橙	0.25	82.9	3.1	78.3	7.3	97.1	2.5
	2.5	88.5	2.6	70.0	2.9	93.7	1.7
罗丹明 B	0.25	102.7	1.2	94.7	1.4	95.7	1.9
	2.5	101.7	2.8	83.9	0.7	97.3	0.6