

实验技术与方法

固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄干中5种工业染料

杨毅华, 徐明敏, 陈波, 杨笑

(宁波市北仑区疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315800)

摘要:目的 建立快速、准确、灵敏的固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄干中酸性红 2G、酸性红 14、酸性黄 73、酸性橙 2 和酸性蓝 62 等 5 种工业染料残留的检测方法。方法 样品以氨水-甲醇-水(2:80:18, V/V) 作为提取液, 利用 HLB 固相萃取柱进行净化, 采用 0.1% 甲酸水溶液淋洗, 含 2% 氨水的甲醇溶液洗脱, 氮吹挥干后用初始流动相定容, 在 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱上, 以乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵溶液(10:90, V/V) 为流动相, 采用梯度洗脱分离, 紫外检测器变波长检测, 外标法定量。结果 酸性红 2G、酸性红 14、酸性黄 73、酸性橙 2、酸性蓝 62 等 5 种工业染料在 0.50 ~ 50 mg/L 范围内均具有良好的线性, 5 种待测物的回收率在 86.0% ~ 110.2%, RSD 均小于 6%, 最低定量检出限为 0.5 mg/kg。结论 本方法简便、灵敏、重现性好, 能满足葡萄干中工业染料残留的实际检测工作需要。

关键词: 高效液相色谱法; 固相萃取; 工业染料; 违法添加; 食品污染物; 葡萄干

中图分类号: R155.5; TS255.42 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0052-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.012

Simultaneous determination of five industrial dyes in raisins

by solid phase extraction and high performance liquid chromatography

YANG Yi-hua, XU Ming-min, CHEN Bo, YANG Xiao

(Beilun Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315800, China)

Abstract: Objective To develop a rapid, accurate and sensitive method for the simultaneous determination of five industrial dyes (acid red 2G, acid red 14, acid yellow 73, orange 2 and acid blue 62) by solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were extracted by ammonia-methanol-water (2 : 80 : 18, V/V), and cleaned up by the HLB solid phase extraction column. The analytes were washed with 0.1% formic acid, eluted with 5% ammonia-methanol and dried by nitrogen. The residue was dissolved with the initial mobile phase, and the solution was separated on a ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column by using acetonitrile-ammonium acetate solution as the mobile phase in gradient program. Detection was performed with UV detector of variable wave-length. Quantitative analysis was carried out by measuring peak area and comparing it with external standard. **Results** There was good linearity in the range of 0.50-50 mg/L for the five dyes. Recoveries were in the range of 86.0% -110.2%, and the relative standard deviation (RSDs) were lower than 6%. The limits of quantification (LOQs) were in the range of 0.5 mg/kg. **Conclusion** This method is simple, sensitive and reproducible, which could be applied to the routine analysis.

Key words: High performance liquid chromatography; solid phase extraction; industrial dyes; illegal to add; food contaminant; raisin

2008 年底起, 国家卫生部(现国家卫生和计划生育委员会)陆续公布了食品中可能违法添加的非食用物质名单, 其中也包括工业色素。这些俗称工

业染料的物质普遍用于纺织、印染、化工等行业, 与食用色素有着本质的区别, 是禁止在食品中使用的。因为他们的合成多以芳烃类化工产品为原料, 经过一系列有机反应化合而成, 在机体内经生物转化, 可形成致癌物质^[1-2]。

目前已实施的国家标准检测方法^[3-4]中关于工业染料的检测方法有限, 并且大多只能检测其中的一种或者几种, 不能同时检测。为提高工作效率、减少试验成本, 可建立同时检测多组分工业染料的方法。尽管针对工业染料的检测可以用各种方法,

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 浙江省微量有毒化学品与健康风险评估技术研究重点实验室开放基金项目(2014003); 浙江省医药卫生科研项目(2013KYA187)

作者简介: 杨毅华 女 高级工程师 研究方向为食品安全理化检测
E-mail: yangyihua@vip.sina.com

如液相色谱法^[5-7],液相色谱-质谱联用法^[8-10]等。但由于质谱仪器较为昂贵,不易普及,目前还未广泛推广。目前,液相色谱在基层单位已得到广泛的推广,并已在卫生检验中得到广泛的应用^[5-6,11-12]。本文使用高效液相色谱-紫外检测器,选取较为常见、价格低廉的5种工业染料作为检测目标物,建立了同时测定葡萄干中这5种工业染料的方法。该方法具有省时省力,精密度、准确度高等优点,用于常规的测定,可取得理想的效果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

采集市售20份葡萄干产品,超市11份、干果批发市场9份。

1.1.2 主要仪器与试剂

安捷伦1260型高效液相色谱仪[包括紫外检测器、四元泵(带真空脱气机)、柱温箱、自动进样器和Agilent色谱工作站,美国安捷伦]、岛津UV2550型分光光度计(日本岛津)、Oasis HLB固相萃取小柱(120 mg×6 ml,美国沃特世)、纯水仪、聚四氟乙烯滤膜(0.45 μm)。

酸性红2G(CAS:3734-67-6,纯度>98.0%)、酸性红14(CAS:3567-69-9,纯度>95.0%)、酸性黄73(CAS:518-47-8,纯度>97.5%)、酸性橙2(CAS:633-96-5,纯度>96.5%)、酸性蓝62(CAS:4368-56-3,纯度>98.5%)标准物质均购自德国Dr Ehrenstorfer,乙腈、甲醇为色谱级,醋酸铵、氨水为化学纯,分析过程中试验用水均满足试验用水一级水标准,所有溶剂使用前均用0.45 μm滤膜过滤。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液配制

混合标准溶液配制:精密称量0.025 0 g酸性红2G、酸性红14、酸性黄73、酸性橙2、酸性蓝62标准物质后用乙腈稀释至25 ml,配制成1.0 mg/ml的混合标准中间溶液,使用前逐级稀释。

1.2.2 样品前处理

取粉碎混匀后的样品5.0 g,用20、20、10 ml混合提取溶剂(氨水:甲醇:水=2:80:18,V/V)分次超声提取,10 000 r/min离心10 min,收集全部提取液于80℃水浴挥至近干,过HLB固相萃取小柱:用5 ml甲醇、5 ml 0.1%甲酸水溶液活化;样品用约5 ml纯水淋洗后入小柱上样;分次加入2、2、1 ml 0.1%甲酸水溶液淋洗;分次加入2、2、1 ml 2%氨水-甲醇溶液洗脱。收集洗脱液于5 ml具塞比色管,氮吹至近干,用乙腈-0.02 mol/L醋酸铵(10:90,V/V)

定容至5 ml。过0.45 μm滤膜,进样测定。

1.2.3 仪器条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速1.0 ml/min,柱温35℃,进样体积10 μl;流动相A为乙腈,B为0.02 mol/L醋酸铵;梯度淋洗程序:流动相A:0~5 min,由10%升至25%;5~9 min,由25%升至55%;9~15 min,由55%升至60%;15~18 min,由60%降至10%;保持7 min。检测波长:0~8 min,500 nm;8~11 min,480 nm;11~15 min,600 nm;15 min,500 nm;平衡10 min。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 混合提取溶剂的选择

这5种待测工业染料均为酸性偶氮类染料,水溶性强,但在食品中的附着能力也强,仅用水很难将其完全提取出来,需要使用含有有机相的溶液提取,并且偶氮类染料在碱性溶液中的溶解性更好。考虑到以上因素,先测试甲醇、乙醇、乙腈等有机溶剂,再选取氨水、氢氧化钠等不同的碱性物质,以及选取不同的水的比例,根据排列组合以及试验效果等,最终选取氨水-甲醇-水(2:80:18,V/V)溶液作为提取溶剂,有利于化合物的提取。试验证明,甲醇体系相较其他有机体系(乙醇、乙腈)更有利于化合物通过固相萃取小柱。

2.1.2 固相萃取方法的选择和优化

本文通过对不同填充料的固相萃取小柱进行比较,结果如下:中性氧化铝小柱:酸性橙2无保留;阴离子交换小柱:目标化合物吸附太强,很难洗脱;弱阴离子交换小柱:对所有的目标化合物均有强度中等的吸附,通过优化洗脱溶剂可达到净化的目的。在弱阴离子交换小柱中选择Oasis HLB固相萃取小柱,柱子的填充料是一种全能型亲水亲脂平衡水的可浸润型反相吸附剂,可保持高保留性能和重现性,在该固相萃取柱上,各组分的吸附、洗脱、回收效果均较为理想。

以HLB固相萃取小柱进行样品净化时,当上样溶液碱性过高时(pH>10.0),不利于目标化合物吸附,酸性蓝62从上样开始流失,其他目标化合物的保留也有所下降,因此,在对提取液在水浴上挥干时要尽量做到充分,以去除提取液中氨水带来的影响。可用敞口小烧杯操作,便于氨水挥发。

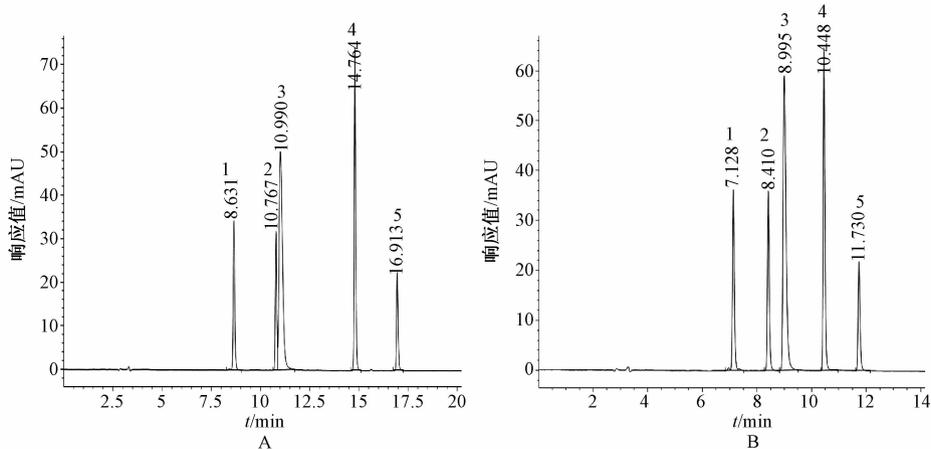
2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动相中离子抑制剂的选择

在日常应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)进行检测工作时,常采用酸、碱或者缓冲液来调节流动相pH值以抑制被测物质解离,从而保证待测

物在色谱柱中有足够的保留,改善色谱峰型、提高分离度^[11]。本方法采用 0.02 mol/L 醋酸铵作为离子抑制剂,可实现 5 种被测化合物在流动相中的基线分离。从图 1 可以看出,醋酸铵缓冲液的作用可

使待测化合物保留时间延长,最明显的效果是使酸性红 14 和酸性黄 73 的分离度变大,不再叠加。该缓冲盐-有机体系的 pH = 6,因此样品 pH 值也调节为 6,进样分析。



注:A 为未加离子抑制剂图谱(流动相:乙腈-水);B 为加入离子抑制剂图谱(流动相:乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵);

1:酸性红 2G;2:酸性红 14;3:酸性黄 73;4:酸性橙 2;5:酸性蓝 62

图 1 标准物质图谱(10 mg/L)

Figure 1 Standard material spectrogram

2.2.2 流动相流速以及比例的选择

分别选择流速为 0.5、1.0 和 1.5 ml/min 进行分析。流速为 0.5 ml/min 时,5 种待测物虽然能完全分开,但是分析时间较长,峰形过宽,灵敏度下降;流速为 1.5 ml/min 时,虽然峰形尖锐,但出峰时间过短,且可能与样品干扰物质出峰叠加。本方法选择流速为 1.0 ml/min,5 种待测物能完全分开,分析时间适宜、峰形好、灵敏度高,符合试验的要求。

由于这 5 种工业染料的极性相差较大,用等度洗脱程序不能满足对所有被测物的检出。如果使用一个条件同时达到 5 种被测物完全分离,则需要采用梯度洗脱程序。随着乙腈体积分数的变化,待测物质根据极性强弱顺序出峰,能很好的实现基线分离,分离度 $R > 1.5$,并且峰型良好,整个分析过程耗时 25 min。

2.2.3 检测波长的选择

利用 UV2550 型分光光度计分别对 5 种待测物于 190~700 nm 波长范围内进行全波段扫描,结果表明,除了酸性蓝 62 在 600 nm 处吸收值最为明显,其他 4 种化合物在 420~500 nm 处均有吸收。按照扫描结果,理论上需要选择至少 4 个波长进行测定。但由于频繁改变波长会造成基线不稳,从而延长检测时间,经试验后选择 480、500、600 nm 3 个波长进行检测。480 nm 时酸性红 14、酸性黄 73 和酸性橙 2 响应值高;500 nm 时酸性红 2G 响应值高;600 nm 已接近 VWD 紫外检测器波长临界点,但由于酸性蓝 62 只在此波长下有吸收,因此保留。试验结果表

明,在这 3 个波长内,可兼顾 5 种目标化合物的分析灵敏度且尽可能的减少杂质干扰,达到试验要求。

2.3 线性范围、回归方程与检出限

准确吸取混合标准中间液(1.0 mg/ml)0.05、0.10、0.5、1.0、2.5 和 5.0 ml 于 6 个 100 ml 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配成质量浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、25.0 和 50.0 mg/L 的标准系列溶液。在所建立的色谱条件下进样测定,获得不同浓度下的色谱峰面积,以质量浓度(C , mg/L)对峰面积(A)进行线性拟合,得到回归方程见表 1。结果表明,5 种待测物在 0.50~50 mg/L 范围均具有良好的线性,其相关系数均 $> 0.999 5$ 。当取样量为 5.0 g,按信噪比(S/N)为 10 计算,5 种待测物的定量限和检出限均为 0.5 mg/kg,见表 1。

2.4 回收率与精密度

取一定量粉碎混匀后的样品,在低、中、高 3 个添加标准水平下考察其方法的准确度(以回收率表示)和精密度(以相对标准偏差表示),按照 1.2 方法处理分析,平行测定 6 次,计算其回收率以及 RSD ,结果见表 2。由测得数据可知,5 种待测物的回收率在 86.0%~110.2%, $RSD < 6.0%$,表明本方法具有较好的回收率和精密度。

2.5 样品检测结果

采用该方法对市售 20 份葡萄干产品进行检测,未检出阳性样品。图 2 为其中一份样品的色谱图和该样品的加标色谱图。

表 1 5 种工业染料的标准曲线、相关系数和定量检测限
Table 1 Standard curve, correlation coefficient and detection limit

待测物	保留时间 /min	回归方程	线性范围 /(mg/L)	相关系数	定量限 /(mg/kg)	检出限 /(mg/kg)
酸性红 2G	7.147	$A = 18.438C - 0.091$	0.50 ~ 50	0.999 9	0.5	0.5
酸性红 14	8.421	$A = 18.930C - 0.898$	0.50 ~ 50	0.999 8	0.5	0.5
酸性黄 73	9.341	$A = 46.540C - 4.126$	0.50 ~ 50	0.999 7	0.5	0.5
酸性橙 2	10.447	$A = 28.345C - 0.206$	0.50 ~ 50	0.999 9	0.5	0.5
酸性蓝 62	11.711	$A = 10.758C - 2.168$	0.50 ~ 50	0.999 8	0.5	0.5

表 2 5 种工业染料的回收率和精密度 ($n = 6$)

Table 2 Recovery rate and precision

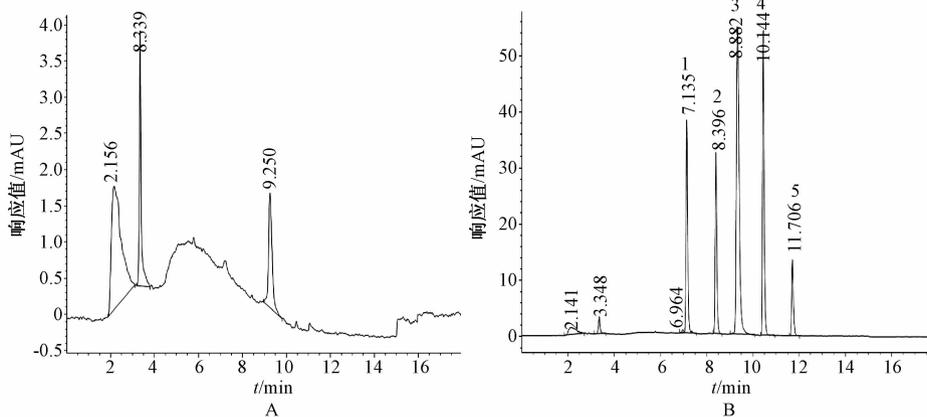
待测物名称	样品本底值 /(mg/L)	加标量 /(mg/L)	测定值 /(mg/L)	回收率 /%	RSD /%
酸性红 2G	0	0.50	0.43	86.0	5.97
	0	10	9.66	96.6	4.22
	0	20	18.95	94.8	3.56
酸性红 14	0	0.50	0.47	94.0	4.92
	0	10	9.42	94.2	2.54
	0	20	19.14	95.7	3.65
酸性黄 73	0	0.50	0.49	98.0	5.01
	0	10	110.2	110.2	4.45
	0	20	20.04	100.2	3.98
酸性橙 2	0	0.50	0.43	86.0	4.57
	0	10	95.9	95.9	4.54
	0	20	19.68	98.4	2.45
酸性蓝 62	0	0.50	0.45	90.0	5.22
	0	10	9.59	95.9	4.45
	0	20	20.98	104.9	2.44

3 小结

本文建立的固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄干中 5 种工业染料残留的检测方法用于葡萄干中酸性红 2G、酸性红 14、酸性黄 73、酸性橙 2、酸性蓝 62 的检测,其灵敏度、精密度、准确度都可达到要求,可作为常规分析的检测方法。

参考文献

- [1] 卢士英,邹明强. 食品中常见的非食用色素的危害与检测[J]. 中国仪器仪表,2009(8):45-49.
- [2] 王连伟. 化学添加剂对食品安全的危害及检测方法研究概况[J]. 科学技术与工程,2011,6(11):3735-3745.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 19681—2005 食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2005.



注:A 为样品图谱;B 为样品加标图谱(加标 10 mg/L);1:酸性红 2G;2:酸性红 14;3:酸性黄 73;4:酸性橙 2;5:酸性蓝 62

图 2 样品及样品加标图谱

Figure 2 Sample and with respect to the sample spectrogram

- [4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.35—2003 食品中合成着色剂的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [5] 朱浩,李小平,陈晓红,等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定豆制品中的碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和碱性橙 II[J]. 分析实验室,2013,32(9):63-67.
- [6] 李小平,潘胜东,赵永纲. 固相萃取-高效液相色谱荧光法同时测定辣椒面中罗丹明 B 和罗丹明 123[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(8):1766-1769.
- [7] 王艳春,李博,刘晓峰. 超高效液相色谱法同时测定调味品中非法添加 20 种工业染料[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(5):451-455.
- [8] 曹鹏,乔旭光,楼喜山,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,2011,39(11):1670-1675.
- [9] 曾泳艇,黎永乐,张协光. 固相萃取-超高效液相串联质谱法同时测定食品中红色 2G、酸性大红、酸性橙 2 和酸性金黄 G[J]. 广东化工,2012,39(3):151-160.
- [10] 朱浩,黄坤玉,付建飞,等. 固相萃取-超快速液相色谱-串联质谱法同时测定血液中的 4 种苏丹染料[J]. 色谱,2014,32(3):224-229.
- [11] 李小平,赵永纲,陈晓红,等. 固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄酒中 7 种合成色素[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(12):2566-2569.

- [12] 赵永纲,陈晓红,李小平,等. 离子抑制剂对苯甲酸等9种食品添加剂的反相液相色谱行为的影响[J]. 色谱, 2011, 29(10): 988-994.

实验技术与方法

固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中4种丁香酚类化合物

高平¹, 黄和², 刘文侠^{1,3}, 黄国方¹, 李志清^{1,3}, 杨嘉丽^{1,3}, 陈焕²

(1. 国家海产品质量监督检验中心(湛江), 广东 湛江 524094; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 3. 广东省湛江市质量计量监督检测所, 广东 湛江 524094)

摘要:目的 建立固相萃取-高效液相色谱荧光法测定水产品中4种丁香酚类化合物(丁香酚、异丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚)残留的方法。方法 样品用乙腈提取, 中性氧化铝和 C₁₈ 固相萃取柱净化, Inertsil ODS-SP C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)分离, 以甲醇-乙腈(1:1, V/V)和1%冰乙酸水溶液为流动相, 荧光检测激发波长为280 nm, 发射波长为320 nm, 外标法定量。结果 4种丁香酚类化合物在各自范围内线性关系良好, 相关系数均 > 0.999, 方法检出限为3.0~6.0 μg/kg, 方法定量限为10.0~20.0 μg/kg, 平均加标回收率为74.7%~103.0%, 相对标准偏差(RSD)为2.6%~8.1%。结论 本方法操作简便、灵敏度高、实用性强, 适用于水产品中丁香酚、异丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚的残留分析检测。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱荧光法; 丁香酚; 水产品; 违法添加; 食品污染物; 渔用麻醉剂; 可疑致癌物质; 兽药残留

中图分类号: R155.5; TQ457.2⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0056-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.013

Determination of four eugenol derivatives in aquatic products by SPE-HPLC-FLD

GAO Ping, HUANG He, LIU Wen-xia, HUANG Guo-fang, LI Zhi-qing, YANG Jia-li, CHEN Huan
(National Marine Products Quality Supervision and Inspection Center (Zhanjiang),
Guangdong Zhanjiang 524094, China)

Abstract: Objective A method was developed for the simultaneous determination of four eugenol derivatives residues (eugenol, isoeugenol, methyl eugenol, methyl isoeugenol) in aquatic products by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile. The extracted solutions were cleaned up by neutral alumina coupled with C₁₈ solid-phase extraction column. The target compounds were separated on a reversed phase C₁₈ column using methanol-acetonitrile and 1% acetic acid as mobile phase, detected by the fluorescence detector at an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 320 nm. External standard method was applied for quantitative analysis. **Results** The calibration curves of four eugenol derivatives showed good linearity within their respective linear ranges and high correlation coefficients ($r > 0.999$). The limits of detection and the limits of qualification were 3.0-6.0 and 10.0-20.0 μg/kg, respectively. The average recoveries were in the range of 74.7% -103.0% with the relative standard deviations (RSDs) of 2.6% -8.1%. **Conclusion** The method was simple, highly sensitive and practical. It was suitable for the determination of eugenol, isoeugenol, methyl eugenol and methyl isoeugenol residues in aquatic products.

Key words: Solid phase extraction; high performance liquid chromatography-fluorescence method; eugenol; aquatic products; illegal additives; food contaminant; fish anesthetic; suspected carcinogen; residue of veterinary drug

收稿日期: 2015-10-13

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013QK272); 广东省科技计划项目(2014A020208121)

作者简介: 高平 男 高级工程师 研究方向为食品检测技术 E-mail: gaoyang2008694@126.com

通信作者: 黄和 男 教授 研究方向为食品质量与安全 E-mail: zjhah@163.com