

串联固相萃取柱净化法提取辣椒酱中的苏丹红

宋晓婉, 钟亚安, 宋旭凤, 代真真, 梁先龙 (安徽中青检验检测有限公司, 安徽合肥 230088)

摘要 [目的]采用串联固相萃取柱净化法提取辣椒酱中的苏丹红。[方法]针对样品基质比较复杂的辣椒酱,采用以聚苯乙烯-二乙烯基苯(PSD)和N-乙烯基吡咯烷酮-二乙烯基苯(HLB)这2种聚合物基质为串联固相萃取柱的填料来萃取辣椒酱中的苏丹红I~IV。用安捷伦EP-C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)色谱柱,以乙腈(A)-水(B)(90:10, v/v)为流动相等度洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长500 nm,柱温30 ℃。[结果]在添加浓度分别为15.0、30.0和75.0 μg/kg时,4种苏丹红回收率在84%~95%,RSD(n=6)在1.5%~6.1%;苏丹红I~IV在0.01~0.20 μg/mL呈现良好的线性关系(R²>0.999),检出限为5.0 μg/kg。[结论]该方法相比于国标方法具有操作简单、灵敏度高、选择性好的特点,可满足实际样品分析的要求。

关键词 苏丹红;串联固相萃取柱;高效液相色谱法(HPLC);辣椒酱

中图分类号 TS264.2⁺4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)23-0184-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.23.046



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Extraction of Sudan Dyes from Chili Sauce by Tandem Solid Phase Extraction Column Purification

SONG Xiao-wan, ZHONG Ya-an, SONG Xu-feng et al (Anhui Zhongqing Inspection and Testing Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088)

Abstract [Objective] To extract sudan dyes from chili sauce by solid phase extraction column purification method. [Method] For chilli sauce with complex sample matrix, polymer matrix polystyrene-divinyl benzene (PSD) and N-vinyl pyrrolidone-divinyl benzene (HLB) were used as the filler of solid phase extraction column in series to extract Sudan I-IV from chilli sauce. HPLC with Agilent EP-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), and the mobile phase was acetonitrile (A)-water (B) (90:10, v/v) for isocratic elution at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 500 nm, and the column temperature was 30 ℃. [Result] The recoveries of four sudan dyes were 84%-95%, RSD (n=6) were 1.5%-6.1% when the added concentrations were 15.0, 30.0 and 75.0 μg/kg, respectively. Sudan I-IV showed a good linear relationship during 0.01-0.20 μg/mL (R²>0.999), and the detection limit was 5.0 μg/kg. [Conclusion] Compared to National Standards of China, the method has the characteristics of simple operation, high sensitivity and good selectivity, and can meet the requirements of actual sample analysis.

Key words Sudan dyes; Tandem solid phase extraction column; High performance liquid chromatography (HPLC); Chili sauce

苏丹红染料是一种人工合成的以苯基偶氮萘酚为主要基团的亲脂性偶氮化合物,苏丹红 I 化学名称为 1-苯基偶氮-2-萘酚,苏丹红 II 化学名称为 1-[(2,4-二甲基苯)偶氮]-2-萘酚,苏丹红 III 化学名称为 1-[4-(苯基偶氮)苯基]偶氮-2-萘酚,苏丹红 IV 化学名称为 1-2-甲基-4-[(2-甲基苯)偶氮]苯基偶氮-2-萘酚,因苏丹红类物质含有氮氮双键(偶氮基),即结构式中的一N=N-,与连接在其两端的苯环一起构成发色基团,偶氮基与芳香结构构成的偶氮苯大共轭体系能够吸收一定波长的可见光,故含有偶氮苯体系的物质能显现出一定的颜色使其外观为暗红色或深黄色片状体,主要用于石油、机油和其他的一些工业溶剂中,目的是使其增色,也用于鞋、地板等的增光。经研究表明,苏丹红具有致突变和致癌性^[1-2],我国和欧盟都禁止用于食品中,但仍有一些不法分子在利益驱使下,在饲料中加入苏丹红染料,家禽食入体内后得到好看的“红黄蛋”。

目前,食品中苏丹红的检测方法主要有气相色谱质谱法^[3-6]、液相色谱质谱法^[7-11]、液相色谱法^[12-13]、薄层色谱法^[14-15]等,而国内已熟知苏丹红的检测方法为 GB/T 19681—2005《食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法》^[16],国标法中用氧化铝小柱净化样品,采用液相色谱法检测食品中的苏丹红,该方法操作烦琐、结果重现性差,且针对基质复杂样品不能较好地去除样品中的杂质。张鑫等^[17]

解决了国标中的中性氧化铝固相萃取柱手工填装且不容易把握填装量的困难,通过对不同填料量的市售中性氧化铝固相萃取柱进行比较,选择了其中一款 500 mg/6 mL 的中性氧化铝固相萃取柱,但是对于基质复杂的样品,净化效果不好,基质干扰较多,回收率较低,且依然存在氧化铝活度难以掌控的问题。程晓宏等^[12]利用分子印迹固相萃取小柱能选择性地识别和富集苏丹红染料,正己烷淋洗样品中油性杂质,二氯甲烷洗脱苏丹红染料的原理提取样品中的苏丹红,但是对于油脂较多的辣椒酱来说,仍然存在富集液体颜色深、基质干扰大的困扰。根据苏丹红具有亲脂性的化学性质,笔者尝试采用以聚苯乙烯-二乙烯基苯(PSD)和N-乙烯基吡咯烷酮-二乙烯基苯(HLB)这2种聚合物基质为串联固相萃取柱填料代替氧化铝作为固相萃取材料来净化样品,选择合适的淋洗液和洗脱液,同时优化样品前处理条件,达到快速、高效、准确地测定样品中苏丹红含量。

1 材料与方法

1.1 仪器 液相色谱仪,美国 Thermo fisher 公司;JK-500 型超声波清洗器,TGL-16M 离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;G560E 涡旋混匀器,上海佳能电子科技有限公司;十万分之一、万分之一电子天平,德国赛多利斯公司。HSC-24B 氮气吹干仪,天津恒奥科技发展有限公司;苏丹红专用柱、PSD 固相萃取柱、HLB 固相萃取柱,上海安谱科学仪器有限公司。

1.2 试剂 苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 标准品来源为 Dr.Ehrenstorfer.,以上标准品纯度均为 99.0%;乙醚、

作者简介 宋晓婉(1990—),女,安徽宿州人,工程师,硕士,从事食品安全检测研究。

收稿日期 2021-12-30

乙腈、甲酸、正己烷、丙酮、乙酸乙酯均为色谱纯,德国 Merck 公司;一级水,由超纯水系统制备。

1.3 标准储备液的配制 准确称取苏丹红 I ~ IV 标准品,用乙醚溶解后,用色谱级丙酮配制成 0.1 mg/mL 的储备液,临用时再用丙酮稀释成不同浓度的混合标准溶液,4 °C 下避光保存。

1.4 液相色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm);流动相为乙腈 (A) : 水 (B) (90:10, v/v), 等度洗脱;流速 1.0 mL/min;柱温 40 °C;检测波长分别为苏丹红 I 478 nm、苏丹红 II 520 nm、苏丹红 III 520 nm、苏丹红 IV 520 nm;进样量 10 μL。

1.5 样品前处理 准确称取 2.000 g (精确至 0.001 g) 试样于离心管中,加入 10 mL 正己烷,涡旋混匀 1 min,超声提取 5 min,以 5 000 r/min 的速度离心 3 min,移出上清液,下层固体再用 5 mL 正己烷提取 2 次,合并提取液。将提取液用旋转蒸发仪浓缩至 5 mL 左右后加入用正己烷活化过的 PSD 柱和 HLB 柱的串联柱中,以 3 mL 正己烷淋洗 2 次,弃去淋洗液,去掉上面的 PSD 柱,并抽干下面的 HLB 柱,最后用 5 mL 乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液,用氮吹仪于 45 °C 下氮吹至近干。用 1 mL 乙腈溶解定容,涡旋 10 s 后过 0.22 μm 有机滤膜,供液相色谱测定。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法 国标方法中采用正己烷-丙酮提取,中性氧化铝为吸附剂进行净化,过程烦琐,试剂消耗量大,且对中性氧化铝活度难以控制。目前市面上出现多种苏丹红专用小柱,在进行多家比对试验后发现在处理辣椒酱、辣椒油等基质比较复杂的样品时,仍然出现洗脱液颜色较深、杂峰较多、基质效应依然存在等问题。该试验中对于高含量油脂的辣椒酱首先采用正己烷进行提取,涡旋超声增加提取效率,然后将提取液加入去油脂和苏丹红富集的串联柱中,样品通过去除油脂后被富集至下层小柱,再用洗脱液进行收集。

2.2 色谱条件及标准溶液稀释液的优化 国标方法中用 0.1% 甲酸水、乙腈、丙酮作为流动相,4 种苏丹红在色谱柱中均可以达到分离效果,但是比较烦琐,该试验采取乙腈和水作为流动相,在试验中尝试调整流动相乙腈和水的比例为

100:0、95:5 和 90:10 时,发现 4 种苏丹红在 90:10 时均能达到很好的分离效果。因为液相色谱方法是反向色谱法,流动相中含有水,在用国标方法正己烷作为标准溶液定容液体时,正己烷与水不互溶导致色谱峰形不理想,该试验尝试采用丙酮定容,峰形改善效果明显。

2.3 洗脱液的选择 购买基质比较复杂的辣椒酱阳性样品,采用串联柱净化的方法,研究丙酮-正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯 3 种不同洗脱溶剂对 4 种苏丹红的洗脱能力。由图 1 可见,不同洗脱溶剂对苏丹红 III 的效果无明显变化,但苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 IV 通过丙酮-正己烷的洗脱效果均为最差,而乙酸乙酯对 4 种苏丹红的洗脱效果均是最好的,且乙酸乙酯的毒性相对较小。

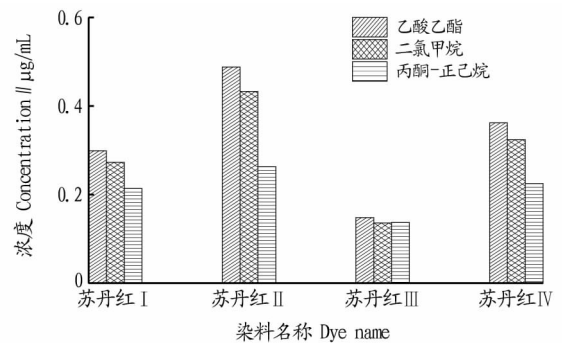
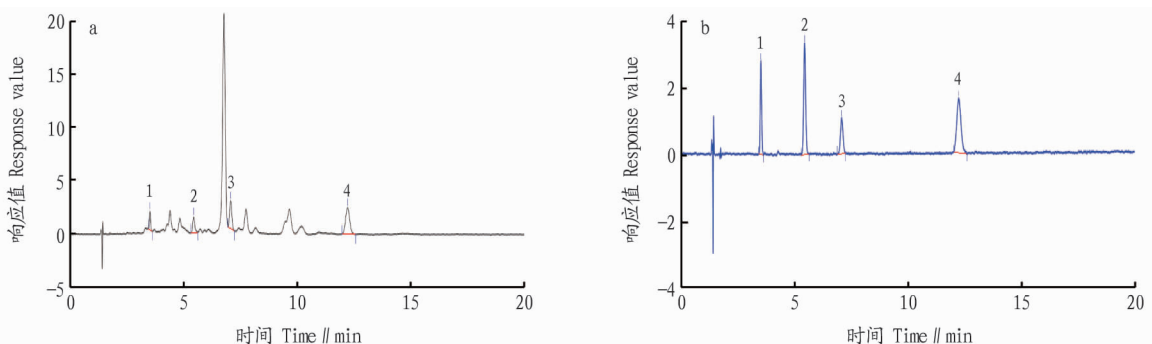


图 1 不同溶剂洗脱效率的比较

Fig.1 Comparison of elution efficiency of different solvents

2.4 净化方式的选择 因为正己烷的极性很低,对油脂类物质也有很好的溶解性,在使用正己烷作为提取剂提取样品中苏丹红时,不可避免地也会把样品中的一些油脂成分提取出来,因此在净化过程中提前除去样品中的油脂成分就显得非常必要。现行国标 GB/T 19681—2005 中规定的方法是使用中氧化铝柱来净化样品中的油脂,该方法的缺点是操作比较烦琐,针对基质复杂样品不能较好地去除样品中的杂质,且中性氧化铝柱的活度难以控制导致 4 种苏丹红染料的保留差异较大,回收率不稳定。因此该试验针对上述问题进行了研究,将苏丹红专用柱和 PSD 串联 HLB 柱的效果进行比较,结果显示,苏丹红专用柱不能有效去除油脂带来的干扰,大部分油脂依然会伴随苏丹红一起洗脱下来,如图 2a 所



注:1.苏丹红I;2.苏丹红II;3.苏丹红III;4.苏丹红IV

Note:1.Sudan dye I;2.Sudan dye II;3.Sudan dye III;4.Sudan dye IV

图 2 苏丹红专用柱 (a) 和串联柱 (b) 净化效果色谱图

Fig.2 Chromatogram of purification effect of Sudan dye special column (a) and tandem column (b)

示基质干扰峰较多,基质干扰强度较大,且与目标化合物保留时间接近,因此不能准确定量。而使用PSD串联HLB柱的基质干扰现象(图2b)明显低于使用苏丹红专用柱。这是因为PSD柱和HLB柱填料均可以有效地去除样品中的油脂成分,并且正己烷淋洗液可以将目标化合物富集至HLB柱中,再用乙酸乙酯对HLB柱进行洗脱,即可有效达到净化效果,此过程操作更为简单、溶剂消耗量更少、回收率较稳定且能达到国标要求。

2.5 标准曲线和检出限 以丙酮为溶剂,配制苏丹红I~IV混合标准溶液系列浓度为0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,进样10 μL ,HPLC分析测定,以峰面积(Y)对浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行回归分析。结果发现,回归方程分别为 $Y=0.502\ 8X-0.007\ 9$ (苏丹红I)、 $Y=0.582\ 5X-0.012\ 1$ (苏丹

红II)、 $Y=0.781\ 6X-0.008\ 2$ (苏丹红III)、 $Y=0.824\ 7X-0.017\ 4$ (苏丹红IV),决定系数(R^2)均大于0.999,表明苏丹红I~IV在0.01~0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 呈现良好的线性关系,该方法适用于辣椒酱中苏丹红染料的定量分析。取阴性辣椒酱样品,加入逐级稀释不同浓度的苏丹红I~IV混合标准溶液后进行样品处理并上机,测得信噪比为3时对应的苏丹红的检出限均为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 回收率与精密度 该试验选用市场上3种含油量和含水量不同的3种阴性辣椒酱样品,采用在空白样品中添加标准溶液的方法,添加浓度分别为15.0、30.0和75.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对4种苏丹红染料进行了添加回收率试验,取6次操作的平均值。从表1可以看出,4种苏丹红在3种不同加标浓度下的回收率为84%~95%,RSD为1.5%~6.1%。

表1 辣椒酱中苏丹红I~IV的加标回收率及RSD($n=6$)

Table 1 Recovery rates and RSD of sudan dye I-IV in chili sauce

染料名称 Dye name	添加量 Additive amount $\mu\text{g}/\text{kg}$	辣椒酱 1 Chili source 1		辣椒酱 2 Chili source 2		辣椒酱 3 Chili source 3	
		回收率 Recovery rate//%	RSD//%	回收率 Recovery rate//%	RSD//%	回收率 Recovery rate//%	RSD//%
苏丹红I Sudan dye I	15.0	90	1.9	88	3.0	95	3.3
	30.0	93	1.8	90	4.6	87	4.6
	75.0	94	3.1	86	2.5	92	6.1
苏丹红II Sudan dye II	15.0	92	2.5	91	5.8	88	2.5
	30.0	91	4.9	84	4.7	93	1.7
	75.0	93	4.2	90	5.7	88	3.6
苏丹红III Sudan dye III	15.0	93	5.1	86	5.5	90	4.4
	30.0	95	2.9	88	2.0	94	3.0
	75.0	94	1.5	87	1.8	85	4.2
苏丹红IV Sudan dye IV	15.0	91	3.4	92	2.1	88	5.1
	30.0	91	5.2	90	4.8	90	4.2
	75.0	92	2.1	89	4.3	85	3.7

3 结论

该研究讨论了对于基质复杂的辣椒酱,采用正己烷提取,以聚苯乙烯-二乙烯基苯(PSD)和N-乙基吡咯烷酮-二乙烯基苯(HLB)这2种聚合物基质的串联固相萃取柱填料进行有效净化,并结合高效液相色谱仪测定其中4种苏丹红染料的含量。结果发现,在添加浓度分别为15.0、30.0、75.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,4种苏丹红回收率在84%~95%,RSD在1.5%~6.1%;苏丹红I~IV在0.01~0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 呈现良好的线性关系($R^2>0.999$),检出限为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法操作简便、准确度和灵敏度较国标高,适用于辣椒酱中痕量苏丹红染料的残留检测。

参考文献

[1] STIBOROVÁ M, SCHMEISER H H, FREI E. Prostaglandin H synthase-mediated oxidation and binding to DNA of a detoxication metabolite of carcinogenic Sudan I, 1-(phenylazo)-2,6-dihydroxynaphthalene[J]. Cancer letters, 1999, 146(1): 53-60.

[2] STIBOROVÁ M, MARTÍNEK V, RÝDLOVÁ H, et al. Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers[J]. Cancer letters, 2005, 220(2): 145-154.

[3] 张胜帮, 韩超, 刘继东, 等. 食品中苏丹红I~IV及对位红的GC-MS/SIM法研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 187-193.

[4] 苏小川, 黄梅, 甘宾宾, 等. 气相色谱-质谱联用法测定调味品中苏丹红I、II色素[J]. 理化检验-化学分册, 2006, 42(12): 1003-1006.

[5] 吴惠勤, 黄晓兰, 黄芳, 等. 食品中苏丹红1号的GC-MS/SIM快速分析方法研究[J]. 分析测试学报, 2005, 24(3): 1-5.

[6] HE L M, SU Y J, FANG B H, et al. Determination of Sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytica chimica acta, 2007, 594(1): 139-146.

[7] 宁啸骏, 王丁林, 虞成华, 等. UPLC-MS/MS同素内标法测定食品中对位红、苏丹红I~IV的研究[J]. 质谱学报, 2009, 30(1): 41-46.

[8] 宋鑫, 杭学宇, 王露, 等. 全自动凝胶渗透色谱-固相萃取联合净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定肉类制品中8种工业染料[J]. 理化检验-化学分册, 2016, 52(6): 725-728.

[9] 毛江胜, 王剑, 孟静静, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法分析辣椒中苏丹红染料[J]. 分析试验室, 2009, 28(S2): 341-344.

[10] 杜振霞, 孙姝琦. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱联用分析鸭蛋黄中的苏丹红I~IV[J]. 色谱, 2007, 25(5): 705-710.

[11] REBANE R, LEITO I, YURCHENKO S, et al. A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrices[J]. Journal of chromatography A, 2010, 1217(17): 2747-2757.

[12] 程晓宏, 杨俊, 周楠, 等. 分子印迹固相萃取小柱-高效液相色谱法测定辣椒中4种苏丹红[J]. 理化检验-化学分册, 2017, 53(11): 1336-1338.

[13] 曹丽芬, 姚黎霞, 何良兴, 等. 高效液相色谱法快速检测食品中苏丹红的含量[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 1532-1533, 1545.

[14] 王鲜俊, 缪红, 文君. 薄层色谱法测定海椒面中苏丹红I[J]. 中国卫生检验检疫杂志, 2005, 15(12): 1475-1476.

[15] 庞抱玲, 王怀友. 薄层色谱-紫外可见分光光度法测定食品中的苏丹红I号[J]. 分析试验室, 2008, 27(1): 60-62.

[16] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法: GB/T 19681—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

[17] 张鑫, 李爱军, 周鑫, 等. 高效液相色谱法测定禽蛋中苏丹红染料的方法研究[J]. 中国动物保健, 2017, 19(2): 85-87.