

高效液相色谱法同时检测食品中的碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 染料含量

林 钦, 郑小严, 何树坤, 戴 明, 谢 勇
(福建省中心检验所, 福建 福州 350002)

摘 要: 建立了食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 染料含量的高效液相色谱检测方法。样品经碱化甲醇提取, 提取液在碱性条件下用二氯甲烷萃取, 浓缩后用酸化甲醇溶解并用甲醇饱和正己烷萃取净化后经高效液相色谱分离、检测。本方法检测限分别为碱性橙 0.02mg/kg、碱性嫩黄 O 0.03mg/kg、碱性桃红 T 0.004mg/kg。6 种食品样品加标回收率实验所得回收率为 72.3%~96.5%, 相对标准偏差(RSD)为 0.3%~8.8%($n=6$), 三种染料在 0.05~2.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内均呈良好的线性关系, 线性回归系数(r)均大于 0.9998。

关键词: 高效液相色谱法; 食品; 碱性橙; 碱性嫩黄 O; 碱性桃红 T

Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Determination of Chrysoidine, Auramine O and Safranin T in Food

LIN Qin, ZHENG Xiao-yan, HE Shu-kun, DAI Ming, XIE Yong
(Fujian Provincial Central Inspection Institute, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of chrysoidine, auramine O and safranin T in food was developed by high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were extracted using ammonia-methanol (1:50, V/V). Then the analytes were extracted from the extracts using CH_2Cl_2 , concentrated and redissolved in formic acid-methanol (1:50, V/V), and cleaned up using n -hexane solution saturated with methanol prior to HPLC determination. The linear ranges of this method for determining the three pigments were 0.05–2.5 $\mu\text{g/ml}$ and the correlation coefficients (r) all were higher than 0.9998. The recoveries for them in 6 kinds of foods spiked at two levels respectively ranged from 72.3% to 96.5%, and the RSDs were 0.3%–8.8% ($n=6$). The limits of detection were about 0.02 mg/kg for chrysoidine, 0.03 mg/kg for auramine O and 0.004 mg/kg for safranin T.

Key words: high performance liquid chromatography; food; chrysoidine; auramine O; safranin T

中图分类号: TS264.4; R155.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0194-03

碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 均为芳香胺类碱性工业染料, 用于腈纶、人造纤维、皮革、纸等的染色和棉织品、丝织品的印花, 具有致癌、致畸变性。GB2760—2007《食品添加剂卫生标准》规定, 严禁将其作为食品添加剂使用。由于在中性及偏碱条件下, 碱性橙和碱性嫩黄 O 与蛋白质吸附作用强。不易褪色, 不法商贩常将其用于豆制品及黄鱼的染色, 使腐竹、豆皮的色泽光亮、黄花鱼的色泽与野生黄花鱼完全相同^[1], 欺骗消费者, 使消费者健康受到严重伤害。碱性桃红 T 色泽红艳且不易褪色, 不法商贩将其用于花生、红菇、蜜饯等的染色, 此外, 桃红色素还能覆盖霉变花

生外表的霉斑, 而发芽霉变的花生米含有剧毒的黄曲霉毒素, 消费者食用这种花生米将会对人体健康造成严重的伤害。目前碱性橙的检测方法有高效液相色谱法^[2-4]和液质联用法^[5], 碱性嫩黄 O 的检测方法有高效液相色谱法^[4,6-7]。食品中碱性桃红 T 染料则尚无检测方法。本研究拟依次通过碱化甲醇提取、碱性条件下二氯甲烷萃取、酸性条件下甲醇饱和正己烷萃取净化, 以期建立高效液相色谱紫外串连荧光检测器同时检测食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 染料含量的方法。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-10-30

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局自筹经费项目(2007QK160; 2007QK161)

作者简介: 林钦(1973—), 男, 高级工程师, 本科, 研究方向为色谱分析检验。E-mail: phlqfcii@126.com

1.1 材料与试剂

蜜饯橄榄、黄花鱼、虾皮、花生米、腐竹、番茄调味粉均为市售商品。

碱性橙标准品(纯度大于99%)、碱性嫩黄O标准品(纯度98%)、碱性桃红T标准品(纯度大于99%) 美国Acros organics公司; 甲醇(色谱纯); 超纯水; 所用试剂除特别标注外均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Alliance 2695 HPLC 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器) 美国沃特世公司; F-2500 荧光检测器 日本日立公司; Avanti J-E 冷冻高速离心机 美国贝克曼公司; Milli-Q 超纯水纯化系统 美国Millipore公司; 分析天平 德国赛多利斯公司; 恒温水浴槽; 涡旋混合器; 旋转蒸发仪; 超声波振荡器; 氮吹仪。

1.3 标准溶液配制

准确称取碱性橙、碱性嫩黄O和碱性桃红T标准品各20.0mg, 用甲醇溶解定容到100ml, 准确移取适量混合标准储备液, 用酸化甲醇稀释成0.05~2.5 μ g/ml的标准系列。

酸化甲醇: 500ml 甲醇加入10ml 甲酸。

提取剂配制: 500ml 甲醇加入10ml 氨水。

1.4 样品处理

分别取200g 蜜饯橄榄、黄花鱼、虾皮、花生米、腐竹、番茄调味粉样品。将样品破碎均匀, 称取5.00g, 置于50ml 离心管中, 准确加入20.0ml 提取剂, 超声提取30min; 于4℃、15000r/min 离心5min, 移取5.0ml 提取液于50ml 离心管中, 再加入10ml 2% 氨水和2g NaCl 混匀, 用二氯甲烷涡旋萃取3次, 每次10ml; 于4℃、15000r/min 离心5min, 吸出下层提取液合并, 过无水硫酸钠并滤入250ml 浓缩瓶中, 于40℃真空旋转蒸发至约1ml, 转入10ml 试管中, 40℃氮气吹近干, 加入3ml 酸化甲醇溶解, 用甲醇饱和正己烷萃取净化3次, 每次2ml, 吸出正己烷层弃去, 40℃氮气吹至2ml 以下, 用酸化甲醇定容至2.0ml, 混匀, 用0.2 μ m PTFE 滤膜过滤后检测。

1.5 液相色谱分析条件

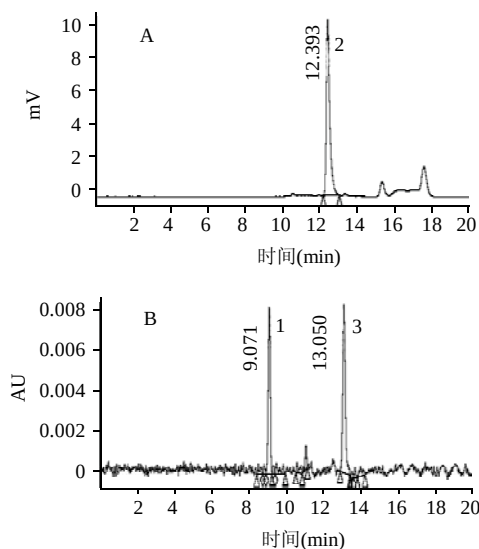
色谱柱: XB-C₁₈(4.6mm × 150mm, 5 μ m); 柱温: 35℃; 紫外检测波长: 436nm; 荧光检测波长: 激发波长271nm, 发射波长572nm; 进样量: 20 μ l; 流速: 1.0ml/min; 流动相及梯度: A 为0.05% 磷酸溶液, B 为甲醇; 0~8min 内流动相A 由75% 均匀变化到50%, 8~15min 内流动相A 50% 保持3min, 15~20min 内流动相A 75% 保持5min。

2 结果与分析

2.1 色谱条件选择

用二极管阵列检测器扫描波长范围200~600nm, 发现碱性橙吸收峰为458nm, 碱性嫩黄O 吸收峰为436nm, 碱性桃红T 吸收峰为278nm; 实验发现碱性桃

红T 具有荧光, 用荧光检测器扫描, 结果表明碱性桃红T 激发波长为271nm、发射波长为572nm, 其检测灵敏度比紫外检测器高10倍以上, 因此碱性桃红T 采用荧光检测器检测, 并用紫外检测器在波长436nm 处同时检测碱性橙和碱性嫩黄O。实验表明降低pH 值有利于改善碱性橙、碱性嫩黄O 和碱性桃红T 的峰形, 提高检测的灵敏度, 0.05% 磷酸溶液pH 值约为2.0, 因此, 采用耐酸碱适用范围pH1~12 的C₁₈ 柱, 在1.5 节梯度条件下, 碱性橙、碱性嫩黄O 和碱性桃红T 的保留时间分别为9.071、13.050、12.393min, 三种染料分离良好且峰形对称尖锐(图1)。



A. 采用荧光检测器; B. 采用紫外检测器;
1. 碱性橙; 2. 碱性桃红 T; 3. 碱性嫩黄 O。

图1 标准品液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed chrysoidine, safranin T and auramine O standards determined by a fluorescence detector (A) and UV detector (B) respectively

2.2 前处理条件选择

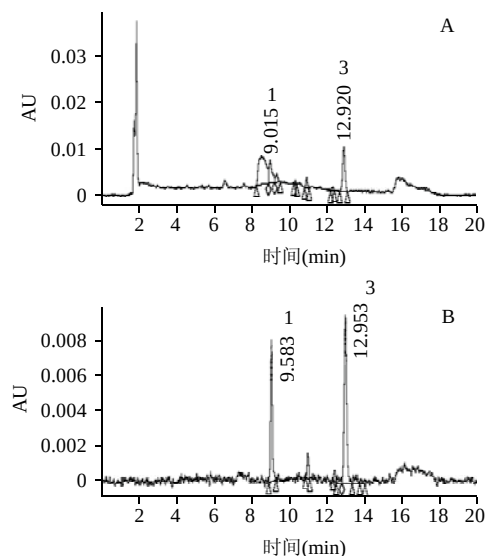
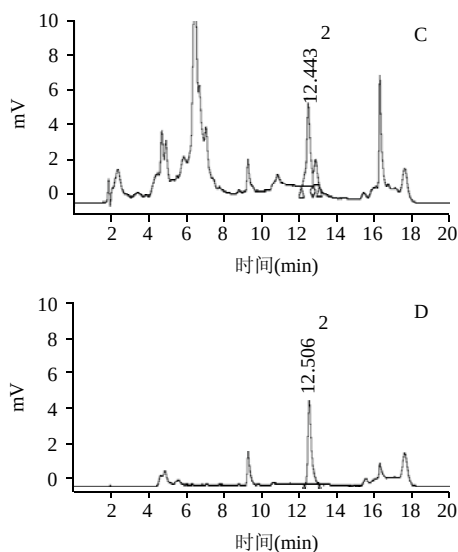


表1 不同食品中三种染料的加标回收率和精密度($n = 6$)Table 1 Recoveries for the three pigments in 6 kinds of foods spiked at two levels ($n = 6$)

染料	添加水平 ($\mu\text{g/ml}$)	蜜饯橄榄		黄花鱼		虾皮		花生米		腐竹		番茄调味粉	
		回收率(%)	相对标准偏差(%)	回收率(%)	相对标准偏差(%)	回收率(%)	相对标准偏差(%)	回收率(%)	相对标准偏差(%)	回收率(%)	相对标准偏差(%)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
碱性橙	0.261	74.7	8.8	74.7	7.9	76.4	5.8	80.7	2.4	80.6	4.9	77.4	6.3
	0.653	73.0	3.3	78.0	3.5	72.5	4.7	73.3	2.8	72.6	3.8	72.3	5.2
碱性嫩黄 O	0.266	79.9	1.5	74.2	7.5	75.1	5.1	88.5	3.2	78.4	8.4	90.2	4.6
	0.665	77.3	2.9	75.6	5.5	78.8	4.5	82.8	4.1	72.3	7.1	88.3	3.2
碱性桃红 T	0.262	84.8	0.8	87.1	3.5	92.7	7.6	92.0	1.0	76.6	0.9	96.5	1.6
	0.655	83.9	2.8	83.6	1.8	87.3	2.0	86.1	0.3	76.1	1.7	93.4	6.8

注：本底值未检出。



A.加标碱性橙、碱性嫩黄 O 样品净化前；B.加标碱性橙、碱性嫩黄 O 样品净化后；C.加标碱性桃红 T 样品净化前；D.加标碱性桃红 T 样品净化后；1.碱性橙；2.碱性桃红 T；3.碱性嫩黄 O。

图2 番茄调味粉加标样品净化处理前及净化处理后色谱图对比
Fig.2 HPLC chromatograms of tomato seasoning powder spiked with chrysoidine and auramine O before (A) and after (B) cleanup and tomato seasoning powder spiked with safranin T before (C) and after (D) cleanup

在对蜜饯橄榄、黄花鱼、虾皮、花生米、腐竹、番茄调味粉样品检测中发现，在水溶液中碱性染料极易被样品吸附。因此，本方法比较了酸化甲醇和碱化甲醇两种提取剂。由于有些样品(如虾皮)用酸化甲醇提取后，提取液加碱后会产生沉淀而影响后面的提取步骤，因此，本方法采用碱化甲醇为提取溶液。碱化甲醇对碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 均有良好的溶解性，并且由于对油脂、胶质和蛋白质的溶解度很小，因而能有效排除它们的干扰。实验还发现碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 在碱性水溶液中易被二氯甲烷萃取，因此，取 5ml 碱化甲醇提取液加入 10ml 2% 氨水，在碱性条件下用二氯甲烷萃取染料，而将极性较强的杂质留在水中，为防止萃取液乳化太严重，加入 2g 氯化钠破乳。此外，在 4℃ 条件下，15000r/min 离心 5min 能有效分离两相，得到澄清的二氯甲烷萃取液。将二氯甲烷层小心用吸管吸出，过无水硫酸钠滤入 250ml 浓缩瓶中，二氯甲烷萃取液于 40℃ 浓缩后转

入 10ml 刻度试管中，40℃ 用氮气吹近干后用酸化甲醇溶解，在酸性条件下再用甲醇饱和正己烷萃取去除非极性杂质。以番茄调味粉为例，经过该方法净化后，与只用碱化甲醇提取相比，大大减少了检测的干扰(图 2)，提高了检测的准确性，并能有效延长色谱柱的使用寿命。

2.3 标准曲线绘制

配制不同浓度的标准溶液，分别作出碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 的标准工作曲线，得到碱性橙的线性方程为 $y = 101000x - 252$, $r = 0.9999$ ；碱性嫩黄 O 的线性方程为 $y = 137000x - 507$, $r = 0.9999$ ；碱性桃红 T 的线性方程为 $y = 276000x - 81.2$, $r = 0.9999$ ，三种染料的线性范围为 0.05~2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.4 加标回收率和精密度实验结果

取蜜饯橄榄、黄花鱼、虾皮、花生米、腐竹、番茄调味粉 6 种样品进行标准添加实验，每个添加量做 6 个平行实验，实验结果(表 1)表明 6 种食品样品的加标回收率为 72.3%~96.5%，相对标准偏差(RSD)为 0.3%~8.8%，本方法具有良好的回收率和准确度。

2.5 检测限

按信噪比(S/N)为 3 计算，本方法对碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 的检测限分别为 0.02、0.03 和 0.004mg/kg。

3 结论

本方法可满足对食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 三种染料同时检测的需求，其准确度高、精密度好、检测限低。

参考文献：

- [1] 冯济富, 黄明. 一起使用碱性橙浸染小黄鱼案的评析[J]. 中国卫生监督杂志, 2003, 10(6): 351-352.
- [2] 铁小威, 黄百芬, 任一平. RP-HPLC 法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): 59-60.
- [3] 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): 202-204.
- [4] 林钦. 高效液相色谱法同时测定豆制品中的碱性橙和碱性嫩黄 O 染料[J]. 色谱, 2007, 25(5): 776-777.
- [5] 任一平, 黄百芬, 铁小威, 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文集. 郑州: 第十五次全国色谱学术报告会及仪器展览会, 2005: 741-743.
- [6] 罗美中, 李碧芳, 何小青. 高效液相色谱-二极管阵列法测定豆制品中碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品工业科技, 2005(8): 166-170.
- [7] 高洁, 尹峰, 何国亮, 等. 高效液相色谱法测定豆制品中的碱性嫩黄 O[J]. 分析实验室, 2008(5): 230-232.