DOI:10.13526/j.issn.1006-6144.2014.03.024

固相萃取-高效液相色谱化学发光法测定食品中微量苏丹红染料

田欣欣，朱智甲*，卢赛赛，郭 华
（东华大学化学化工与生物工程学院，上海 201620）

摘 要：以 C_{18} 固相萃取(SPE)小柱净化样品，富集苏丹红，并基于苏丹红Ⅰ～Ⅳ对鲁米诺-KIO_4 体系发光强度的增敏作用，建立了同时测定苏丹红染料的新方法。实验采用 Pursuit C_{18} 色谱柱(250×4.6 mm，i.d.，5 μm)，以乙腈-水体系为流动相进行梯度洗脱，在 0.001～0.50 μg/mL 范围内，苏丹红Ⅰ～Ⅳ的浓度与发光强度呈良好的线性关系，相关系数在 0.9981 以上，苏丹红Ⅰ～Ⅳ的检出限分别为 0.3、0.2、0.3、0.2 ng/mL，加标回收率在 90.0%～96.7%之间。该方法能有效地去除基质干扰，具有简单、快速、灵敏的特点，适用于苏丹红染料的分析检测。

关键词：固相萃取；高效液相色谱；化学发光；鲁米诺；苏丹红染料
中图分类号：O657.72 **文献标志码**：A **文章编号**：1006-6144(2014)03-401-04

苏丹红染料属于人工合成亲脂性偶氮化合物，包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ，主要应用于地板、油彩等工业品着色，可被还原降解为芳香胺类物质而具有致癌性[1-2]，化学结构式如图 1。由于苏丹红颜色鲜艳，价格低廉，常被非法添加于食品以提升外在色度。因此，建立准确、灵敏的食品中苏丹红检测方法尤为重要。国家标准(GB/T19681-2005)以氧化铝层析小柱提纯净化苏丹红样品，采用高效液相色谱-紫外法测定苏丹红，但灵敏度不高[3]。而文献报道的高效液相色谱法[4-6]、气相色谱-质谱联用法[7-8]和高效液相色谱-质谱联用法[9-10]等方法的回收率和重现性均不理想。

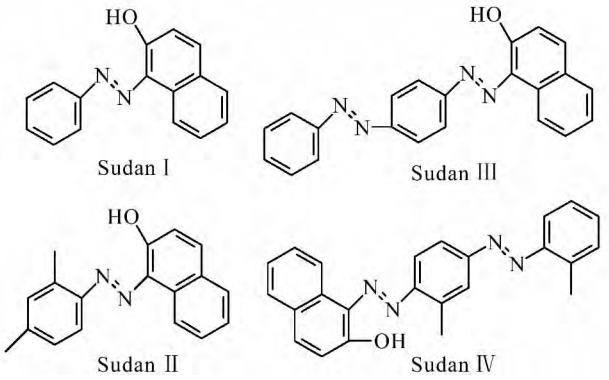

图 1 苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ的化学结构式
Fig. 1 Chemical structures of Sudan dyes Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ and Ⅳ

本研究基于苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ对鲁米诺-KIO_4 体系发光强度的增敏作用，运用 C_{18} 固相萃取(SPE)小柱净化样品，富集苏丹红染料，建立了苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ的高效液相色谱-化学发光检测法(HPLC-CL)。该法重现性好、灵敏度高、结果准确。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Prostar 高效液相色谱仪(美国，Varian 公司)，配备柱温箱、在线脱气、手动进样器以及二极管阵列检测器；IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司)；Millipore Q 超纯水器(美国，Millipore 公司)；KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；RE-52AA 旋转蒸发仪(上海越磁电子科技有限公司)；Bond Elut C_{18} SPE 小柱(500 mg，3 mL，含碳量 17.4%，美国瓦里安公司)。

收稿日期：2013-07-03 修回日期：2013-09-29
* 通讯作者：朱智甲，男，副研究员，从事药物、染料、食品分析研究.

苏丹红标准贮备液(0.10 mg/mL)：**分别称取苏丹红** Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ **和** Ⅳ **标准品**(Sigma **公司**)**适量，用乙腈溶解，转入** 100 mL **容量瓶中，定容，使用时稀释到所需浓度。鲁米诺储备液**(0.01 mol/L)：**准确称取鲁米诺** 0.8860 g，**溶于** 0.1 mol/L **氢氧化钠溶液，转入** 500 mL **棕色容量瓶中定容，使用时稀释到所需浓度。高碘酸钾储备液**(0.01 mol/L)：**准确称取高碘酸钾** 0.5750 g，**用水微热溶解，转入** 250 mL **容量瓶中定容，使用时稀释到所需浓度。乙腈和甲醇为色谱纯；正已烷和甲酸为分析纯。实验用水为去离子重蒸水；流动相经过滤脱气处理；样品溶液用** 0.45 μm **滤膜过滤备用。**

1.2　样品预处理[11-12]

1.2.1　辣椒粉样品的提取　**称取红辣椒粉样品约** 3.00 g，**置于** 150 mL **烧杯中，加入** 30 mL **乙腈，用分散乳化均质机匀浆**(16 000 r/min)，**超声萃取** 20 min **后，倾出上层乙腈溶液，再用** 30 mL **乙腈超声萃取** 2 **次，每次** 20 min。**合并乙腈萃取液，用旋转蒸发仪浓缩至近干，用少量乙腈溶解，并稀释至** 10 mL，**加入** 10 mL **水，混匀待过柱。**

1.2.2　辣椒油样品的提取　**准确称取** 2.00 g **辣椒油于带盖的聚四氟乙烯离心管中，加入** 10 mL **乙腈，加盖涡动提取** 2 min，3 000 r/min **离心** 5 min，**吸取上层乙腈溶液；同样步骤再提取两次，合并三次提取液。取** 10 mL **提取液于离心管中，加入** 10 mL **水，混匀待过柱。**

1.2.3　固相萃取柱净化富集　C_{18} SPE **小柱依次用** 5 mL **甲醇、**5 mL **水预洗，然后将上述待处理液上样，再用** 12 mL **正已烷洗脱，收集洗脱液，在** 40 ℃ **水浴中旋转浓缩至干，加入** 0.5 mL **乙腈溶解残渣，过** 0.45 μm **滤膜后测定。**

1.3　色谱条件

色谱柱：Pursuit C_{18} **色谱柱**(250×4.6 mm i.d.，5 μm)；**梯度淋洗条件(按体积分数)：乙腈：水**＝90∶10，0～4 min，**乙腈：水**＝100∶0，4～20 min，**乙腈：水**＝90∶10，20～25 min；**流速** 1.0 mL/min；**柱温**：35 ℃；**进样体积**：20 μL；**检测波长**：478 nm。

1.4　操作步骤

用蠕动泵分别将 KIO_4、NaOH **和** Luminol **溶液送入发光分析系统，同时打开高压泵，待基线稳定后，准确吸取** 20 μL **样品溶液进样，经色谱柱分离并经检测后，进入流通池发生反应产生发光，经光电倍增管检测得到发光强度** I，$\triangle I = I_S - I_0$（I_S **为样品发光强度，**I_0 **为空白发光强度，实验装置示意图见图** 2。

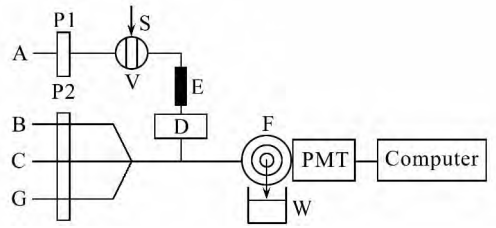

图 2　实验装置示意图

Fig. 2　Schematic diagram of experimental apparatus

A: mobile phase, B: Luminol, C: KIO_4, G: NaOH, P_1: HPLC pump, P_2: peristaltic pump, S: sample, V: 7725i valve, E: HPLC column, D: HPLC UV-vis detector, F: flow cell, W: waste, PMT: photomultiplier tube.

2　结果与讨论

2.1　色谱条件的优化

考察了甲醇-水、乙腈-水以及甲醇-水(含甲酸)和乙腈-水(含甲酸)体系对样品分离的影响，发现乙腈-水体系不仅溶解性好，而且柱压低，故选择乙腈-水体系作为流动相，并优选了梯度洗脱条件，结果如 1.3 **节。考虑分离效率以及与发光反应的匹配，本文选择的最佳流速和柱温分别为** 1.0 mL/min **和** 35 ℃。

2.2　化学发光检测条件的选择

2.2.1　鲁米诺溶液浓度的选择　**在** 1.0×10^{-7}～1.0×10^{-4} mol/L **范围内，考察了发光试剂鲁米诺溶液浓度对发光强度的影响，结果见图** 3。**从图** 3 **可知，当鲁米诺溶液浓度超过** 5.0×10^{-6} mol/L，**发光强度达到最大且趋于稳定，因此本文选择的鲁米诺溶液浓度为** 5.0×10^{-6} mol/L。

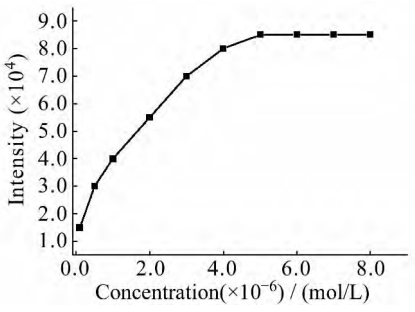

图 3　Luminol 浓度对发光强度的影响

Fig. 3　The influence of Luminol concentration

2.2.2　氢氧化钠溶液浓度的选择　**在** 0.01 mmol/L～0.1 mol/L **范围内考察了氢氧化钠溶液浓度对发光强度**

的影响，结果发现当氢氧化钠溶液浓度为 2 mmol/L 效果最佳。

2.2.3　蠕动泵流速的选择　在 0.1～3.0 mL/min 流速范围内，考察了蠕动泵流速对发光强度的影响。结果显示，当流速为 0.3 mL/min 时，发光强度最大，故本文选择 0.3 mL/min 作为蠕动泵流速。

2.3　标准曲线和检出限

用苏丹红Ⅰ～Ⅳ标准工作液配制 0.001～0.50 μg/mL 苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ标准系列溶液，各取 20 μL，按选定的色谱和发光反应条件测定发光强度△I(峰面积)，每个浓度重复测定 3 次，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，线性回归方程与相关系数见表 1。从表 1 可知，在 1.0 ng/mL～0.50 μg/mL 范围内，发光强度与浓度呈现良好的线性关系。以信噪比的 3 倍计算苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ的检出限，结果列于表 1。

表 1　方法的线性范围、回归方程、相关系数和检出限

Table 1　Linear range, regression equation, correlation coefficient and detection limit of the method

Compound	Linear range(μg/mL)	Regression equation	Correlation coefficient	Detection limit(ng/mL)
Sudan Ⅰ	0.001～0.50	$\triangle I=6.55\times10^6c+335.7$	0.9981	0.3
Sudan Ⅱ	0.001～0.50	$\triangle I=9.46\times10^6c+248.7$	0.9986	0.2
Sudan Ⅲ	0.001～0.50	$\triangle I=8.67\times10^6c+135.8$	0.9983	0.3
Sudan Ⅳ	0.001～0.50	$\triangle I=9.15\times10^6c+185.6$	0.9982	0.2

2.4　回收率和精密度试验

向阴性辣椒粉样品中，分别加入低、中、高 3 种质量浓度的苏丹红混合标准溶液，进行 5 次重复测定，计算标准相对偏差(RSD)和回收率，结果见表 2。

表 2　方法的回收率和精密度(n=5)

Table 2　Recoveries and precisions of the method(n=5)

Compound	Basic value(μg/kg)	Added(μg/kg)	Found(μg/kg)	Recovery(%)	RSD(%)
Sudan Ⅰ	0	0.02	0.018	90.0	3.14
	0	0.20	0.191	95.5	2.18
	0	2.00	1.822	91.1	3.61
Sudan Ⅱ	0	0.02	0.019	94.6	2.83
	0	0.20	0.193	96.7	3.05
	0	2.00	1.834	91.7	3.41
Sudan Ⅲ	0	0.02	0.018	90.0	3.07
	0	0.20	0.185	92.5	2.67
	0	2.00	1.876	93.8	2.89
Sudan Ⅳ	0	0.02	0.019	95.0	3.05
	0	0.20	0.189	94.5	2.81
	0	2.00	1.902	95.1	3.15

2.5　样品分析

准确移取已处理的红辣椒油样品(阴性)溶液 20 μL 进样分析三次，测定发光强度平均值，以回归曲线定量，测定结果见表 3。

表 3　辣椒油样品测定结果(n=3)

Table 3　Determination results of chili oil sample(n=3)

Compound	Basic value(μg/kg)	Added(μg/kg)	Found(μg/kg)	RSD(%)
Sudan Ⅰ	0	0.25	0.243	2.44
Sudan Ⅱ	0	0.25	0.251	2.03
Sudan Ⅲ	0	0.25	0.247	2.83
Sudan Ⅳ	0	0.25	0.241	2.51

3　结论

本文以 C_{18} SPE 小柱净化样品，富集苏丹红染料，并基于苏丹红Ⅰ～Ⅳ对鲁米诺-KIO_4 体系发光强度的

增敏作用,建立了同时测定苏丹红Ⅰ~Ⅳ的新方法。该方法能有效地去除基质干扰,具有简单、快速、灵敏的特点,适用于食品中苏丹红残留的快速筛查和分析检测。

参考文献:

[1] Matysik F M. J Chromatography A[J],1998,**802**:349.

[2] Zanocco A L. Color Index,Society of Dyes and Colorists 3rd Ed[M]. New York:Spring-Verlag Inc. 1971:132.

[3] GB/T19681-2005. National Standards of the People's Republic of China(**中华人民共和国国家标准**)[S].

[4] LI Ji-ping(**李吉平**),LIU Wen-sen(**刘文森**),GAO Hong-wei(**高宏伟**), CHEN Yue-ming(**陈悦明**), SONG Ri-zhe(**宋日哲**). Food Science(**食品科学**)[J],2007,**28**(8):332.

[5] Nagase M,Osaki Y,Matsueda T. J Chromatogr[J],1989,31,**465**(2):434.

[6] Uematsu Y,Ogimoto M,Kabashima J. J AOAC Int[J],2007,**90**(2):437.

[7] SU Xiao-chuan(**苏小川**),HUANG Mei(**黄　梅**),GAN Bin-bin(**甘宾宾**),CHENG Heng-yi(**程恒怡**). Chinese Journal of Health Lab Technology(**中国卫生检验杂志**)[J],2005,**15**(9):1073.

[8] HUANG Xiao-lan(**黄晓兰**),WU Hui-qin(**吴惠勤**),HUANG Fang(**黄　芳**),LIN Xiao-Shan(**林晓珊**),DENG Xin(**邓　欣**). Journal of Instrumental Analysis(**分析测试学报**)[J],2005,**24**(4):1.

[9] Calbiani F,Caeri M,Elviri L,et al. J Chromatogr A[J],2004,**1058**:127.

[10] YU Ling-han(**俞凌寒**),YANG Yun-yun(**杨运云**),YAN Shi-ping(**闫世平**),CHEN Jiang-han(**陈江韩**),LI Guang-xian(**李光宪**),MOU De-hai(**牟德海**),CAI Da-chuan(**蔡大川**). Journal of Instrumental Analysis(**分析测试学报**)[J],2005,**24**(4):28.

[11] YAO Jin-wen(**姚进文**),FENG Xin-chang(**冯新昌**). Chinese Journal of Health Lab Technology(**中国卫生检验杂志**)[J],2010,**20**(4):735.

[12] WU Yin-liang(**吴银良**),YANG Ting(**杨　挺**),ZHAO Jian(**赵　健**),HUANG FU Wei-guo(**皇甫伟国**),SHEN Jian-zhong(**沈建忠**). Food Science(**食品科学**)[J],2009,**30**(16):243.

Determination of Sudan Dyes in Food by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Chemiluminescence Method

TIAN Xin-xin, ZHU Zhi-jia*, LU Sai-sai, GUO Hua

(*College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai* 201620)

Abstract: In this paper, a new method for the determination of sudan dyes was estalished based on the sensitizing effect of Sudan dyes on luminal-KIO_4 chemilminescence system. The results showed that there was a good linear relationship between the CL intensities and the concentrations of Sudan dyes in the range of 1.0 ng/mL-0.50 μg/mL with the correlation coefficients more than 0.9981. The detection limits of Sudan Ⅰ-Ⅳ were 0.3, 0.2, 0.3 and 0.2 ng/mL respectively. The recoveries were in the range of 90.0%-96.7%. The method has been proved to be excellent for sample purification, and simple, sensitive and accurate in the analysis of Sudan dyes.

Keywords: Solid-phase extraction(SPE); High performance liquid chromatography(HPLC); Chemiluminescence(CL); Luminol; Sudan dyes