

血液中苏丹红染料的高效液相色谱分析

何 荣¹, 廖林川¹, 颜有仪¹, 杨 林¹,
陈礼莉¹, 金圣杰², 李雯佳¹, 黄璐瑶¹

(1. 四川大学 华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041;
2. 四川大学 华西医院 普外科, 四川 成都 610041)

摘 要: 采用高效液相色谱法检测血液中苏丹红系列染料(苏丹红 ~)。以镁试剂 为内标, 用乙腈直接沉淀蛋白, 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱为分析柱, 流动相为甲醇 - 水(体积比 94 : 6), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 480、520 nm。苏丹红 ~ 的线性范围为 0.02 ~ 4.0 mg/L, 相关性良好 ($r = 0.999\ 7$), 检出限达 0.004 mg/L, 4 种物质的回收率均不低于 82%。

关键词: 苏丹红染料; 苏丹红 ; 苏丹红 ; 苏丹红 ; 苏丹红 ; 血液; 高效液相色谱; 镁试剂

中图分类号: O657.72; TQ613.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)07 - 0751 - 04

Determination of Sudan Dyes in Blood by High Performance Liquid Chromatography

HE Rong¹, LAO Lin-chuan¹, YAN You-yi¹, YANG Lin¹, CHEN Li-li¹,
JIN Sheng-jie², LI Wen-jia¹, HUANG Lu-yao¹

(1. West China Preclinical and Forensic College, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Department of Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: A new HPLC method was developed by using Magneson as internal standard to determine Sudan dyes (Sudan , Sudan , Sudan and Sudan) in blood samples. The samples were extracted by acetonitrile, separated by a column of Diamonsil C₁₈ with methanol - water (94 : 6, by volume) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and detected at wavelengths of 480 nm and 520 nm. The linear ranges of Sudan , Sudan , Sudan and Sudan ranged from 0.02 mg/L to 4.0 mg/L with a correlation coefficient of 0.999 7. The limits of detection (LOD) were down to 0.004 mg/L and the recoveries of the four analytes were not less than 82%.

Key words: Sudan dyes; Sudan ; Sudan ; Sudan ; Sudan ; blood; HPLC; Magneson

苏丹红系列染料是一类人工合成的偶氮类化合物, 主要包括苏丹红 、苏丹红 、苏丹红 、苏丹红 、苏丹橙 B 和苏丹红 7B, 其染色效果具有颜色鲜艳、时间持久的特点, 在工业产品的染色上应用很广。苏丹红在生物体内的代谢产物具有致癌、致突变作用^[1-2], 因此许多国家都已禁止其作为食用色素使用, 但仍有许多不法商家将苏丹红染料用于食品的着色。目前苏丹红的检测方法主要有高效液相色谱法^[3-6]、液相色谱 - 质谱法^[7-9]、气相色谱 - 质谱法^[10-11]等, 但均用于食品的检测, 生物检材中苏丹红的检测方法还未见有报道, 且现有的食品中的检测方法是否适用于生物样品的分析也未见有考察。本文以镁试剂 作为内标, 采用乙腈直接沉淀蛋白处理血液样品, 运用高效液相色谱紫外检测法进行分析, 首次实现了对血液中苏丹红 ~ 的快速分析和准确定量, 为苏丹红在体内的代谢动力学以及分布情况研究提供了方法学基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国 Agilent 1100); 紫外可见分光光度计 (日本岛津 UV-260); 北京医用离心机 LD4-2 (北京医用离心机厂); 德国 Sartorius BS210S 万分之一电子分析天平。

苏丹红 ~ 标准品均购自 Sigma 公司, 纯度分别为 98%、97%、95% 和 91%; 甲醇、乙腈 (色谱

收稿日期: 2007 - 10 - 17; 修回日期: 2007 - 12 - 04

第一作者: 何 荣 (1981 -), 女, 安徽庐江人, 硕士研究生

通讯作者: 廖林川, Tel: 028 - 85501636, E-mail: lincuanliao@scu.edu.cn

纯，Fisher公司)；超纯水(电阻率不小于 18.2 M)；其它试剂均为分析纯。

1.2 标准品溶液的配制

准确称取苏丹红 ~ 标准品各 10.0 mg，分别用丙酮溶解定容至 10.0 mL，得质量浓度均为 1.0 g/L 的苏丹红 ~ 储备液。再等体积混合得到苏丹红 ~ 混合使用液。准确称取镁试剂 10.0 mg，用丙酮溶解定容至 100.0 mL，得质量浓度为 0.1 g/L 的镁试剂 丙酮液。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 准确吸取血样 0.5 mL，加入 30 μL 质量浓度为 0.1 g/L 的镁试剂 丙酮液(内标)，涡旋混匀 2 min 后加入 7 mL 乙腈，混合振摇 3 min，离心(3 000 r/min) 10 min 后取出上清液，于 60 ℃ 水浴上通空气流挥干，残渣用 200 μL 甲醇溶解，高速离心(1.2 ×10⁴ r/min) 10 min 后取上清液进样分析。

1.3.2 色谱条件 色谱柱：Diamonsil C₁₈ (150 mm ×4.6 mm，5 μm)，同样填料短柱为预柱；流动相：甲醇-水体积比为 94 ∶ 6，流速 1.0 mL/min；柱温：25 ℃；检测波长：480 nm (用于苏丹红 ~ 的检测)，520 nm (用于苏丹红 ~ 的检测)；进样量：20 μL。

2 结果与讨论

2.1 结 果

2.1.1 色谱图 在同一色谱条件下，苏丹红 ~ 以及内标均能达到完全分离，且内源性杂质不干扰测定。色谱图见图 1。

2.1.2 线性关系与检出限 取数份 0.5 mL 的空白血液，分别加入不同体积 25.0 mg/L 苏丹红 ~ 混合使用液，配制成苏丹红 ~ 质量浓度均分别为 0.02、0.1、0.2、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 的血液添加样品，每个浓度点平行添加 5 份，再于每份血液中添加 30 μL 质量浓度为 0.1 g/L 的镁试剂 丙酮液(内标)，按上述的前处理及色谱条件分析样品。

分别以苏丹红 ~ 的峰面积与内标峰面积比值 y 对苏丹红的质量浓度 x (mg/L) 作线性回归，各回归方程的相关系数 (r) 均为 0.999 7，相关性良好。4 种物质的检出限均达 0.004 mg/L (S/N = 3)。线性关系及检出限见表 1。

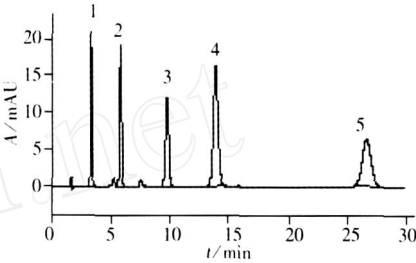


图 1 空白血液添加苏丹红染料的色谱图
Fig.1 Chromatogram of blank blood spiked with Sudan - standards
1. magnesium (internal standard), t_R = 3.33 min; 2. Sudan , t_R = 5.82 min; 3. Sudan , t_R = 9.76 min; 4. Sudan , t_R = 13.87 min; 5. Sudan , t_R = 26.64 min

表 1 血液中苏丹红 ~ 、 ~ 、 ~ 含量的线性关系及检出限 (n = 5)
Table 1 Linear regressions and limits of detection of Sudan - in blood samples (n = 5)

Compound	Linear range / (mg · L ⁻¹)	Linear regression equation *	Correlation coefficient r	Limit of detection / (mg · L ⁻¹)
Sudan	0.02 ~ 4.0	y = 0.269 4x + 0.001 2	0.999 7	0.002
Sudan	0.02 ~ 4.0	y = 0.174 8x + 0.001 7	0.999 7	0.004
Sudan	0.02 ~ 4.0	y = 2.493 9x + 0.060 4	0.999 7	0.002
Sudan	0.02 ~ 4.0	y = 1.954 x + 0.02	0.999 7	0.004

* x: the content of Sudan dyes; y: the peak area ratio of Sudan dyes to internal standard

2.1.3 回收率与精密度 取数份 0.5 mL 的空白血液，分别加入不同体积 25.0 mg/L 的苏丹红 ~ 的混合使用液，配制成苏丹红各组分的质量浓度均为 0.1、1.0 和 3.0 mg/L 的血液添加样品，每个浓度点平行添加 6 份，再于每份血液中加入 30 μL 质量浓度为 0.1 g/L 的镁试剂 丙酮液(内标)，按上述的前处理及色谱条件分析样品。测得回收率及精密度见表 2。4 种物质的平均回收率均不低于 82%，计算所得的日内 RSD 小于 7%，日间 RSD 小于 12%，满足生物检材的检测要求。

表 2 血液中苏丹红 ~ 的方法回收率及精密度 (n = 6)
Table 2 Recoveries and precisions of Sudan ~ in blood samples (n = 6)

Compound	Added <i>m</i> _A / μg	Found <i>m</i> _F / (μg, Mean ±SD)	Recovery <i>R</i> / %	Intra-day RSD <i>s_r</i> / %	Inter-day RSD <i>s_r</i> / %
Sudan	0.050	0.046 ±0.004	94	6.6	10
	0.50	0.41 ±0.037	82	5.8	8.4
	1.5	1.3 ±0.11	87	4.3	7.4
Sudan	0.050	0.042 ±0.002 8	84	2.9	12
	0.50	0.41 ±0.024	82	5.4	9.8
	1.5	1.3 ±0.054	87	4.4	9.6
Sudan	0.050	0.041 ±0.041	82	5.9	12
	0.50	0.47 ±0.28	94	5.4	7.7
	1.5	1.5 ±0.85	100	4.2	5.2
Sudan	0.050	0.046 ±0.037	92	5.8	12
	0.50	0.46 ±0.24	92	5.1	8.0
	1.5	1.4 ±0.67	93	4.1	5.3

2.2 讨 论

2.2.1 样品的处理 血液等生物样品与食品、工业品相比，具有内源性活性成分更多更复杂、物质的化学结构和存在状态易发生变化的特点。本实验根据血液样品及苏丹红本身的特性，采用乙腈直接沉淀蛋白法对样品进行处理，有效地去除了血液中的内源性杂质，且得到 4 种组分的回收率均不低于 82%，避免了国标法^[12]中过活性氧化铝柱回收率不稳定、操作复杂、耗时长以及多种有机溶剂提取污染较严重的缺陷，满足实际工作中的分析要求。

2.2.2 色谱条件的优化 用紫外可见分光光度计对苏丹红 ~ 丙酮溶液分别进行扫描，得到的光谱图显示，苏丹红 ~ 的最大吸收波长分别为 480、496、502 和 516 nm。综合 4 种物质以及内标镁试剂的紫外吸收情况，选择 480 nm 为苏丹红 和 的检测波长^[13]，520 nm 为苏丹红 和 的检测波长。

文献报道在流动相中加入 0.1% (体积分数，下同) 甲酸能将各待检物分开，本研究显示，当流动相为甲醇 - 水 (体积比 94 : 6) 和甲醇 - 0.1% 甲酸水溶液 (体积比 94 : 6) 时，各组分的分离情况没有明显差别，考虑到酸性物质对色谱柱的损害，本实验采用甲醇 - 水 (体积比 94 : 6) 作为流动相，4 种物质以及杂质分离较好。文献 [12 - 14] 大多选择乙腈和甲酸的混合溶液梯度洗脱分离苏丹红 ~ ，本实验采取等度洗脱，使 4 种物质均达到了基线分离，避免了梯度洗脱基线漂移以及耗时长的缺点。且本实验流动相中的有机溶剂采用甲醇，节约了成本。

本方法的检出限达 0.004 mg/L，灵敏度比欧盟法的 0.013 mg/L^[15]以及文献报道的 0.02 mg/L^[3]均高。

2.2.3 内标的选择 根据苏丹红系列染料的理化性质以及光谱吸收特性，实验曾考察用橙黄 G 以及甲基红作为内标。研究发现，橙黄 G 与苏丹红 在同一色谱条件下不能达到完全分离，重新调整流动相比例会使分析时间过长；甲基红与溶剂峰无法分开。镁试剂 与苏丹红均含有偶氮萘酚结构，结构比较相近，且理化性质相似，在本实验的色谱条件下，出峰时间适宜。结合提取效率及检测条件进行反复筛选，最后选择以镁试剂 作为内标，提高了方法的准确度和精密度。

2.2.4 适用性考察 将本方法应用于动物组织器官中苏丹红的检测，以 5.0 mg/kg 剂量的苏丹红 ~ 分别灌胃大鼠，处死后取大鼠的组织脏器，在大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、血液和尿液中均检出了苏丹红，且杂质不干扰测定。以苏丹红 灌胃后大鼠血液提取物的结果色谱图 (见图 2) 为例，计算得灌胃大鼠血液中苏丹红 ~ 的含量分别为 0.729、0.517、0.413、0.463 mg/L。

本实验对大鼠的灌胃剂量为 5.0 mg/kg，该剂量高于人体每天从食物中摄取的苏丹红含量。实验中曾考察过用更低剂量灌胃大鼠，但所采集的血样中苏丹红的含量极微，难于检测到，可能由于苏丹红在体内代谢的原因所致，为考察方法的适用性，用此高浓度剂量灌胃大

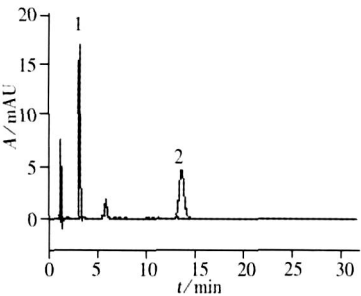


图 2 苏丹红 灌胃后大鼠血液提取物进样的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of rat blood extract after the intragastric administration of Sudan
1. Magneson (internal standard); 2. Sudan

鼠, 对本检测方法的可行性进行了初步的考察。鉴于各文献资料对苏丹红在体内的代谢动力学情况未见有报道, 在后续实验中, 本课题组将对苏丹红在体内的代谢和分布做进一步的详细考察。

参考文献:

- [1] ELL DTT B M, GRIFFITHS K, MACKAY J M, et al. CI solvent yellow 14 shows activity in the bone marrow micronucleus assay in both the rat and mouse[J]. *Mutagenesis*, 1997, 12: 255 - 258
- [2] STBOROVA M, ASFAW B, FREIE, et al. Benzenediazonium ion derived from Sudan forms an 8-(phenylazo) guanine adduct in DNA[J]. *Chem Res Toxicol*, 1995, 8: 489 - 498
- [3] 张玉黔, 栾燕, 王新丽, 等. 反相高效液相色谱法测定食品中苏丹红 1、2、3、4 的方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(7): 807 - 808
- [4] 吴敏, 林建忠, 邹伟, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中对位红和苏丹色素等 8 种脂溶性染料[J]. *分析测试学报*, 2006, 25(3): 74 - 76
- [5] ZHANG Yan, WU Hailong, XIA Ailin, et al. Interference-free determination of Sudan dyes in chilli foods using second-order calibration algorithms coupled with HPLC - DAD[J]. *Talanta*(2007), doi: 10.1016/j.talanta.2006.12.019
- [6] ZHANG Yuping, ZHANG Yijun, GONG Wenjun, et al. Rapid separation of Sudan dyes by reverse-phase high performance liquid chromatography through statistically designed experiments[J]. *J Chromatogr. A*, 2005, 1098: 183 - 187
- [7] CALBANI F, CARERI M, ELVIRIL, et al. Development and in-house validation of a liquid chromatography - electrospray - tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan, Sudan, Sudan and Sudan in hot chilli products[J]. *J Chromatogr. A*, 2004, 1042: 123 - 130
- [8] 喻凌寒, 杨运云, 闫世平, 等. LC - ESI/MS 分析食品中微量苏丹红 ~ [J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4): 28 - 31
- [9] CALBANI F, CARERI M, ELVIRIL, et al. Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo - dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography - electrospray tandem quadrupole orthogonal - acceleration time of flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr. A*, 2004, 1058: 127 - 135
- [10] 吴惠勤, 黄晓兰, 黄芳, 等. 食品中苏丹红 1 号的 GC - MS/SM 快速分析方法研究[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(3): 1 - 5
- [11] 黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 等. GC - MS/SM 法同时测定食品中的苏丹红 ~ [J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4): 1 - 5
- [12] 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].
- [13] 王艳春. 食品中苏丹红检测方法的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(11): 1313 - 1315
- [14] 张全美, 王守卿, 王循广. 两种检测方法的比较[J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 51 - 54
- [15] 黄曙海, 庞维群. 苏丹红染料毒性研究及食品中苏丹红检测方法简述[J]. *广西预防医学*, 2005, 11(6): 380 - 383

(上接第 750 页)

- [3] 周益奇, 许宜平, 马梅, 等. 柱前衍生 / 气相色谱 - 质谱法同时测定水中壬基酚和邻苯二甲酸酯[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(1): 49 - 52
- [4] SUSAN D R, THOMAS A T. Water analysis Emerging contaminants and current issues[J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 3807 - 3838
- [5] 王超英, 李碧芳, 李攻科. 固相微萃取 / 高效液相色谱联用分析水样中邻苯二甲酸酯[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(5): 35 - 38
- [6] HYÖTYLÄNEN T, RIEKKOLA M L. Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(8): 788 - 808
- [7] TOSHINARI S, KUMIKO Y, SUKEI S. Monitoring of phthalic acid monoesters in river water by solid-phase extraction and GC - MS determination[J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 3757 - 3763
- [8] 戴树桂, 张东梅, 张仁江, 等. 固相萃取技术预富集环境水样中邻苯二甲酸酯[J]. *环境科学*, 2000, 21(2): 66 - 69
- [9] 林兴桃, 王小逸, 陈明, 等. 固相萃取高效液相色谱法测定水中邻苯二甲酸酯类环境激素[J]. *环境科学研究*, 2004, 17(5): 71 - 74
- [10] ANTONI M C, RYAN S, MANORIJ S, et al. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites[J]. *J Chromatogr. B*, 2004, 805(1): 49 - 56
- [11] 梁逸曾, 俞汝勤. 化学计量学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 28 - 35
- [12] MARIA P, MARIA L, CARMEN G J, et al. Multivariate optimization of a solid-phase micro extraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters[J]. *J Chromatogr. A*, 2005, 1072: 63 - 72
- [13] 许禄, 邵学广. 化学计量学方法[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 114 - 129