

高效液相色谱-二极管阵列检测器 联用检测食品中的偶氮玉红

喻凌寒 牟德海 苏流坤 李光宪 阎世平

(中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室 广州市先烈中路 100 号 510070)

摘 要 采用了高效液相色谱(HPLC)结合二极管阵列检测器(DAD),对食品中的偶氮玉红含量进行了定性、定量测定。结果表明,偶氮玉红的检出限为 0.1 mg/kg,加标回收率为 95.4%,色谱峰分离效果好,具有良好的稳定性和重现性,方法切实可行。

关键词 高效液相色谱法, 二极管阵列检测器, 偶氮玉红, 食品。

中图分类号: O 657. 7⁺ 2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2006)02-0246-04

1 前言

“民以食为天”,食品是人类生存的物质基础,在人类已进入 21 世纪的今天,食品安全问题的广泛存在和不断增加,已成为一个全球性的严重的公共卫生问题。

为了改善食品的感官性状,通常在食品中添加色素。合成色素因其色泽鲜艳,着色力强,价格便宜,容易大规模生产,而得到广泛的应用。然而合成色素常以苯、甲苯、萘等化工产品为原料经过诸如磺化、硝化、卤化、偶氮化等一系列有机反应,而制成合成色素。随着科学的发展,尤其是毒理学的发展,发现某些合成色素有慢性毒性或致癌性等,给人民的身体健康造成了不利影响。因此各国都严格控制合成色素使用范围和使用量。

偶氮玉红为红色粉末或颗粒,溶于水,是一种合成的水溶性红色色素。挪威、美国、日本、瑞典不准用于食品。HA CSG(欧共同体儿童保护集团)不准用于儿童食品。受利益的驱使,仍有不法商人将其用于食品的生产,以增加食品的颜色,促进销售。然而分析食品中偶氮玉红的含量未见报道,因此本文试探讨通过高效液相色谱与二极管阵列检测器联用检测食品中的偶氮玉红。其分子结构式如图 1。

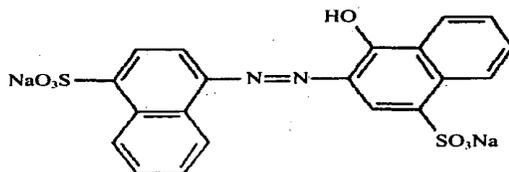


图 1 偶氮玉红的分子结构式

联系人,电话:(020)87771384(办);手机:(0)13580418417;E-mail:yulinhan@163.net

作者简介:喻凌寒(1976—),男,湖南省岳阳市人,工程师,从事食品中成分分析和色谱分析研究。

收稿日期:2005-03-12;接受日期:2005-04-27

2 实验仪器与方法

2.1 主要仪器设备

Hitachi D 7000 系列色谱仪(日本日立公司)与 D 7455 型二极管阵列检测器联用, Shimadzu UV 1601 紫外分光光度计(日本岛津公司), BP61 型电子天平(精确到 0.1mg)(德国 Sartorius 公司), R 201 型旋转蒸发仪(上海申科仪器厂)。

2.2 试剂及材料

偶氮玉红: 购于 Sigma Chemical Corp.; 甲醇: 山东禹王有限公司, 色谱纯; 实验用水为二次蒸馏水, 乙酸铵: 广州化学试剂厂, 分析纯。

2.3 标准溶液配制

准确称取标准品(偶氮玉红) 50.0mg 于 50mL 容量瓶中, 用二次蒸馏水溶解定容, 最终标准溶液储备液的浓度为 1.0mg/mL。

2.4 样品处理

取样品约 20g, 将样品用水反复漂洗色素, 合并洗液作为样品液; 若样品为肉制品, 先用绞碎机绞碎, 加入 90mL 无水石油醚分 3 次去除脂肪, 再用热水分 3 次萃取色素, 合并萃取液为样品液。样品液加入柠檬酸溶液(200g/L) 调 pH 值到 6, 加热至 60℃, 将 1g 聚酰胺粉加少许水调成粥状倒入样品溶液中, 搅拌片刻, 以 G3 垂融漏斗抽滤, 用 60℃ pH 为 4 的水洗 3—5 次, 然后用甲醇-甲酸(6+4)混合液洗涤 3—5 次, 再用水洗至中性, 用乙醇-氨水-水(7+2+1)混合溶液解吸 5 次, 每次 5mL, 收集解吸液, 加乙酸中和蒸发至近干, 加水溶解定容至 5mL, 经滤膜(0.45μm) 过滤, 取 5μL 进高效液相色谱仪。

2.5 色谱条件

色谱柱: Diamond C18 柱(5μm, 4.5mm × 250mm); 流动相: 甲醇-0.02mol/L 乙酸铵; 梯度: 甲醇 20%—35%, 5min; 35%—98%, 5min; 98%, 6min; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 25℃; 监测波长: 254nm、293nm、322nm、514nm; 分析波长: 514nm; 进样量: 20μL。

3 结果与分析

3.1 检测波长的选择与定性

将偶氮玉红的标准溶液用水配成 50.0μg/mL 的溶液, 以水为空白, 用 Shimadzu 的 UV-1601 型分光光度计扫描, 扫描波长范围为 200—800nm, 发现在 254nm、293nm、322nm、514nm 有吸收峰, 在 514nm 处有最大吸收(见图 2), 确定 254nm、293nm、322nm、514nm 为检测波长, 选取 514nm 作为分析波长有好的灵敏度。

高效液相色谱能将复杂的混合物分离成一个个纯组分, 但定性能力较差, 若将其与定性分析仪器联用, 就可以将色谱仪器的分离能力和定性分析仪器的定性分析能力结合起来, 实现对复杂混合物的分析。高效液相色谱与二极管阵列检测器联用, 可绘制出随时间(*t*) 的变化进入检测器液流的光谱吸收曲线-吸光度(*A*) 随波长(*λ*) 变化的曲线, 因而可由获得的信息绘制出具有三维空间的立体色谱图, 可用于被测组分的定性分析及纯度测定^[1,2]。

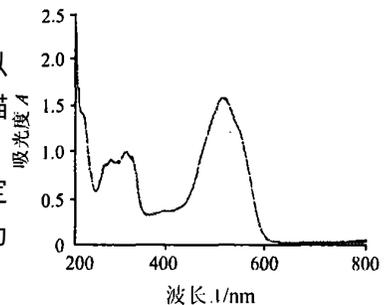


图 2 偶氮玉红的紫外光谱扫描图

采用点对点的比较计算,按顺序地将未知光谱与库中的参考光谱进行匹配。未知光谱和参考光谱被描述为在某一固定波长范围在多维空间的点群。用数据点的总分离度来评价两个光谱的相似程度。采用相关系数来评价光谱的匹配因子,数学表达如下所示:

$$D_{corr} = \frac{N \sum_{i=1}^N x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right) \left(\sum_{i=1}^N y_i \right)}{\sqrt{\left[N \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2 \right] \left[N \sum_{i=1}^N y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N y_i \right)^2 \right]}}$$

表达式中, x_i 和 y_i 分别表示参考光谱和未知光谱中某一特殊区域的一系列数据点。 N 表示着在压缩或未压缩光谱的数据点的总的数目。匹配值大于 0.990 就认为光谱相似,匹配值介于 0.900 到 0.990 之间表明有一定的相似性,但结果必须小心解释,所有低于 0.900 的值表明光谱是不同的。

虽然在不同环境下,物质的紫外光谱可能会发生改变,然而在色谱分离的基础上,每个时间点物质所处的环境因素基本上是相同的,也就是说对紫外光谱的影响作用相同,同一物质在同一时间具有相同的紫外光谱图。因此我们根据偶氮玉红组分的保留时间和吸收光谱与标准品的保留时间和吸收光谱的比较,可对组分偶氮玉红进行准确定性和定量分析。在加标回收和实际样品分析中,偶氮玉红的 UV 光谱库检索的匹配度都能达到 0.99 以上。

3.2 线性范围

用移液管取偶氮玉红的标准溶液适量,用流动相分别稀释成 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,吸取 20 μL 进样,按上述色谱条件进行分离、测定。如图 3 中之 a 所示,以偶氮玉红的吸收峰面积为纵坐标,进样浓度为横坐标,回归方程为: $y = 6051.30 + 14284.56x$, $r = 0.9996$ 可见偶氮玉红在 1.0—100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有良好线性;当信噪比 (S/N) 为 3 时,偶氮玉红的检出限为 0.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

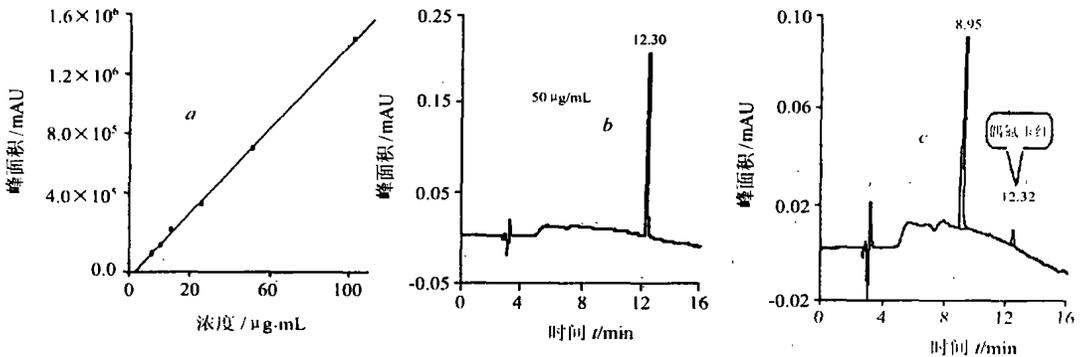


图 3 偶氮玉红的校准曲线 a 色谱图 b 及样品的色谱图 c

3.3 回收率和精密度试验

按上述方法,对样品进行加标回收试验,重复测量 6 次,计算样品的加标回收率。偶氮玉红的加入量为 50 μg ,扣除样品背景后,回收率分别为 96.2%、95.1%、97.2%、94.6%、93.7% 和 95.8%,加标平均回收率为 95.4%;RSD 为 1.30%。

4 讨论

食品使用的色素有合成化合物和天然化合物。食品分析的困难很多,包括样品基质背景复杂,

前处理过程繁琐, 在这个领域, HPLC 最能发挥威力。另外, 用光电二极管阵列检测器分析时, 不仅可同时采集多波长的数据, 而且还可以提供物质的紫外光谱, 从而使得物质的分析、鉴定更加准确可靠。

在实际样品的分析中, 从某公司送检的肉脯样品中检测到偶氮玉红含量为 $0.21 \mu\text{g}/\text{g}$, 对生产过程进行跟踪分析, 结果在生产所使用的日落黄色素中检测出偶氮玉红含量为 $25.7 \text{g}/\text{kg}$ 。这表明由于日落黄与偶氮玉红结构仅有微小差别, 日落黄与偶氮基相联的是苯基, 而偶氮玉红则是萘基, 因此如果在生产过程中质量不过关的话, 会生成少量的偶氮玉红, 从而污染了产品。

本文结合高效液相色谱与二极管阵列检测器联用技术的特点, 建立了有效的 HPLC-DAD 测定食品中所含的微量偶氮玉红的方法, 解决了偶氮玉红色素的提取及色谱条件的确定两大关键难题, 色谱峰分离效果好, 具有良好的稳定性和重现性, 方法切实可行。

参考文献

- [1] 汪正范. 色谱定性与定量[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
[2] 梁逸曾. 白灰黑复杂多组分分析体系及其化学计量学算法[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1996.

Determination of Azorubine Pigment in food by HPLC-DAD

YU Ling-Han MU De-Hai SU Liu-Kun LI Guang-Xian YAN Shi-Ping

(Guangdong Key Laboratory of Chemical Emergency Test, Chinese National Analytical Center,
Guangzhou, No. 100, Xianliezhonglu, Guangzhou 510070, P. R. China)

Abstract Azorubine pigment in food was determined by high-performance liquid chromatographic and UV-VIS spectrophotometer with diode array detector at 514nm. The detection limit is $0.1 \text{mg}/\text{kg}$, and the average recovery rate is 95.4% with a good stability and reproducibility.

Key words HPLC, DAD, Azorubine Pigment, Food

《光谱实验室》实际售价连续 3 年下降

由于投稿数量不断增加, 为了保证出版周期, 《光谱实验室》从 2006 年第 1 期开始, 在 2005 年的基础上, 每期正文增加页码 16 页, 而售价保持不变:

2003 年售价: 20 元/册, 页码为 160 页/册, 平均 0.125 元/页;

2004 年售价: 25 元/册, 页码为 208 页/册, 平均 0.120 元/页。

2005 年售价: 25 元/册, 页码为 224 页/册, 平均 0.112 元/页。

2006 年售价: 25 元/册, 页码为 240 页/册, 平均 0.104 元/页。

因此, 实际售价连续 3 年下降。

《光谱实验室》编辑部