2007 年 11 月
November 2007

色　　谱
Chinese Journal of Chromatography

Vol. 25 No. 6
864 ~ 866

反相高效液相色谱法同时测定咸鸭蛋黄中的斑蝥黄和苏丹红

王全林，　史萍萍，　张书芬，　沈　坚，　傅　晓

（宁波市产品质量监督检验所，浙江 宁波 315041）

摘要：采用反相高效液相色谱法同时测定了咸鸭蛋黄中的斑蝥黄和苏丹红。以乙腈-甲醇-氯仿（体积比为 1∶0.5∶0.5）混合溶液提取咸鸭蛋黄中的斑蝥黄和苏丹红。提取液经减压蒸馏至近干，用乙腈定容。以乙腈-水（体积比为 95∶5）为流动相，经 XDB-C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm）分离，采用 478 nm ~ 520 nm ~ 471 nm 三段变波长检测，获得了较好的分离效果和较低的检测限。将该法用于咸鸭蛋黄中斑蝥黄和苏丹红的测定，苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ和斑蝥黄的回收率分别为 97.34%，89.56%，90.98%，93.63% 和 95.15%；相对标准偏差分别为 2.7%，4.3%，5.1%，4.9% 和 3.1%。该法简便、快速、准确。

关键词：反相高效液相色谱；斑蝥黄；苏丹红

中图分类号：O658　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-8713(2007)06-0864-03　　**栏目类别**：研究论文

Simultaneous Determination of Canthaxanthin and Sudan Red in Salted Duck Egg Yolk by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Quanlin, SHI Pingping, ZHANG Shufen, SHEN Jian, FU Xiao

(*Supervision and Inspection Institute of Product Quality, Ningbo 315041, China*)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the simultaneous determination of canthaxanthin, Sudan Red Ⅰ, Sudan Red Ⅱ, Sudan Red Ⅲ and Sudan Red Ⅳ in salted duck egg yolk has been developed. These canthaxanthin and Sudan Red dyes were extracted with a mixture of acetonitrile, methanol, and chloroform (1∶0.5∶0.5, v/v). The extract was dried by a rotary evaporator. The residue was transferred to a graduated tube and diluted to 10 mL with acetonitrile. The canthaxanthin and Sudan Red dyes were separated on a XDB-C_{18} column (250 mm × 4.6 mm), with acetonitrile-water (95∶5, v/v) as mobile phase. They were then detected at 478 nm – 520 nm – 471 nm at different retention times by UV/Vis spectrophotometer. The recoveries of sudan Ⅰ, sudan Ⅱ, sudan Ⅲ, sudan Ⅳ, and canthaxanthin were 97.34%, 89.56%, 90.98%, 93.63% and 95.15% respectively. The relative standard deviations (RSDs) were 4.7%, 4.3%, 5.1%, 4.9% and 3.1%, respectively. The method is simple, rapid and accurate.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); canthaxanthin; Sudan Red

斑蝥黄是一种维生素 A 源类胡萝卜素，其学名斑蝥黄（canthaxathin），亦称角黄素，分子式为 $C_{40}H_{52}O_2$，化学名称为 β,β'-胡萝卜素-4,4′-二酮，其结构式参见文献[1]。天然的斑蝥黄具有抗氧化、消除自由基的作用，但其在生物体内的含量甚微。随着人工合成斑蝥黄的工业化，其在饲料、食品、化工、医药等行业得到了广泛的应用[2]。鸡、鸭等喂养斑蝥黄能使其蛋黄变成人们喜爱的橙红色。然而，近年来的研究结果显示，人体吸收斑蝥黄后会积累在视网膜上从而造成视力减退等眼疾。为此欧盟于 2003 年出台法规将饲料中的斑蝥黄最高含量从原来的 80 mg/kg 降低到了 25 mg/kg[3]。苏丹红是致癌性的偶氮类化工染料，2006 年的红心鸭蛋事件仍然使人们记忆犹新。为了保障人民的身体健康、利于政府食品安全的监管工作，有必要建立准确、可靠的快速测定食品中斑蝥黄和苏丹红残留量的方法。目前，苏丹红的测定方法很多[4-7]。国家标准 GB/T 18970-2003 规定的测定斑蝥黄的方法是分光光度法，但该法只适合于测定基质比较简单的斑蝥黄饲料添加剂。Tolasa 等[8] 利用薄层色谱法测定

收稿日期：2007-04-04

通讯联系人：王全林，男，博士，副教授，Tel：(0574)87871150，E-mail：quanlinwang@163.com.

了鲑鱼中的叶黄素和斑蝥黄,但测定过程较繁琐。王强等[9]利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了番茄中的 5 种类胡萝卜素。本文利用超声波辅助液相萃取,建立了利用 RP-HPLC 同时测定食品中斑蝥黄和苏丹红的方法。该法快速、准确,用于测定咸鸭蛋黄中的斑蝥黄和苏丹红,结果令人满意。

1　实验部分

1.1　试剂和仪器

乙腈(色谱纯,天津瑞特化学品有限公司);斑蝥黄(Sigma),用乙腈配成 0.4 mg/mL 的储备液,使用前配成适当质量浓度的工作液。苏丹红Ⅰ、Ⅳ(Sigma-Aldrich)和苏丹红Ⅱ、Ⅲ(Acros)用乙腈配成 0.4 mg/mL 的贮备液,使用前配成适当质量浓度的工作液。其余试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。紫外-可见分光光度计(Lambda 25,Perkin Elmer);2200 超声波清洗器;FZQ2 型分析振荡器。旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);液相色谱仪(配紫外检测器,Agilent 1100 系列,美国 Agilent 仪器公司)

1.2　实验方法

1.2.1　样品处理

取咸鸭蛋的蛋黄,冷冻干燥并粉碎、混合均匀后,称取 5 ~ 10 g 于 100 mL 锥形瓶中,加入 30 mL 乙腈-甲醇-氯仿(体积比为 1∶0.5∶0.5)混合萃取剂,在 40 ℃水浴中保温 5 min 后超声处理 10 min,静置分层后过滤。残渣用混合萃取剂 10 mL 按上述方法再提取两次,合并提取液,旋转蒸发至 3 mL 左右,用乙腈洗移定容至 10 mL。过 0.45 μm 滤膜后进样测定。

1.2.2　斑蝥黄萃取剂的选择试验

称取 5 ~ 10 g 样品于 100 mL 锥形瓶中,加入各种萃取剂 30 mL,于 40 ℃水浴中保温 5 min 后超声处理 10 min,用萃取剂 10 mL 提取两次,合并提取液,旋转蒸发近干,用乙腈定容至 10 mL,于 471 nm 处测定吸光度值。

1.2.3　色谱条件

色谱柱,XDB-C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm);流动相为乙腈-水(体积比为 95∶5),流速为 0.7 mL/min;变波长检测:0 ~ 9 min,478 nm;9 ~ 25 min,520 nm;25 ~ 35 min,471 nm。

2　结果与讨论

2.1　检测波长的选择

对苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和斑蝥黄标准品在 190 ~ 700 nm 波长范围内进行扫描,结果表明,苏丹红Ⅰ在 474 nm、苏丹红Ⅱ在 478 nm、苏丹红Ⅲ在 502 nm、苏丹红Ⅳ在 520 nm 波长处有最大吸收,斑蝥黄在 471 nm 波长处有最大吸收。考虑到在 474 ~ 502 nm 范围内苏丹红Ⅰ ~ Ⅲ的响应值变化不大,选用 478 nm 为第一时间段的检测波长;因苏丹红Ⅳ和斑蝥黄的最大吸收波长与苏丹红Ⅰ ~ Ⅲ有较大的波长差别,考虑到检测灵敏度的需要,我们选择在保留时间为 9 min 时检测波长变为 520 nm,保留时间在 25 min 时检测波长变为 471 nm。

2.2　萃取剂的选择

苏丹红及斑蝥黄均为油溶性的物质,对于苏丹红而言,许多研究报道、标准已经证实其能够被乙腈[10]、正己烷[11]等很好的萃取;为了高效地萃取其中的斑蝥黄,我们利用萃取剂选择试验方法,考察了甲醇、丙酮、乙腈、氯仿、石油醚、正己烷、环己烷等有机溶剂以及甲醇-氯仿(体积比为 1∶1)、石油醚-丙酮(体积比为 1∶1)、乙腈-甲醇(体积比为 1∶1)、乙腈-氯仿(体积比为 1∶1)、乙腈-甲醇-氯仿(体积比为 1∶0.5∶0.5)等混合溶剂对咸鸭蛋黄中斑蝥黄的萃取效果。结果显示,各种单独使用的有机溶剂有相似的萃取效率,之间的差别不大,充分说明斑蝥黄的油溶性特点;相比之下氯仿稍好一些,与文献[12]的报道基本一致。当使用混合有机溶剂时,萃取效率普遍有所提高,并且使用的有机溶剂种类越多,萃取效率越高。根据试验结果,考虑到乙腈是苏丹红的有效提取溶剂,本研究选择 1∶0.5∶0.5(体积比)的乙腈-甲醇-氯仿的混合溶剂作为鸭蛋黄中斑蝥黄和苏丹红的萃取溶剂。

2.3　流动相的选择和色谱分离效果

利用配制的标准溶液和标准添加样品进行色谱分离条件的选择,发现在 95% 乙腈和 5% 水做流动相时,苏丹红和斑蝥黄有较好的基线分离。流速为 0.7 ~ 1.2 mL/min 时,苏丹红、斑蝥黄等出峰时间合适,峰形较好。考虑到实际样品基体的复杂性和变波长对分离的影响,我们选择流速为 0.7 mL/min。在选择的色谱条件下斑蝥黄和苏丹红标准混合溶液的色谱图见图 1。同时研究了苏丹红、斑蝥黄在实际样品中的色谱分离情况。当向咸鸭蛋黄样品中添加苏丹红Ⅰ ~ Ⅳ的标准溶液后,按照实验选择的样品处理方法提取、制样、分析后,得到如图 2 所示的色谱图。从图中可以清楚地看到,苏丹红Ⅰ ~ Ⅳ、斑蝥黄均能够很好地分离。

2.4　校正曲线和最低检出限

将苏丹红Ⅰ ~ Ⅳ和斑蝥黄的标准贮备液用乙腈稀释配制成其系列标准溶液,获得 5 种色素(n = 5)校正曲线的回归方程(见表 1)。当信噪比(S/N)为

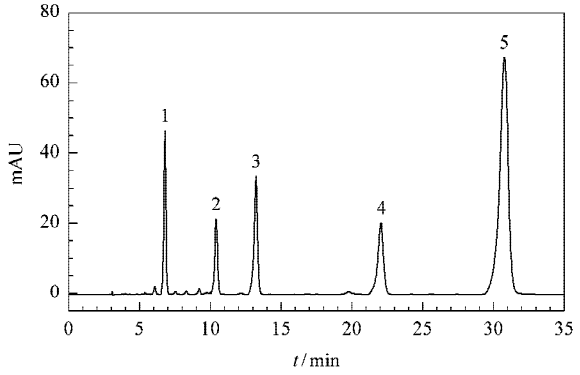

图 1 苏丹红 Ⅰ ~ Ⅳ和斑蝥黄标准样品的色谱图

Fig. 1 Typical chromatogram of Sudan Red Ⅰ - Ⅳ and canthaxanthin standards

1. Sudan Red Ⅰ; 2. Sudan Red Ⅱ; 3. Sudan Red Ⅲ; 4. Sudan Red Ⅳ; 5. canthaxanthin.

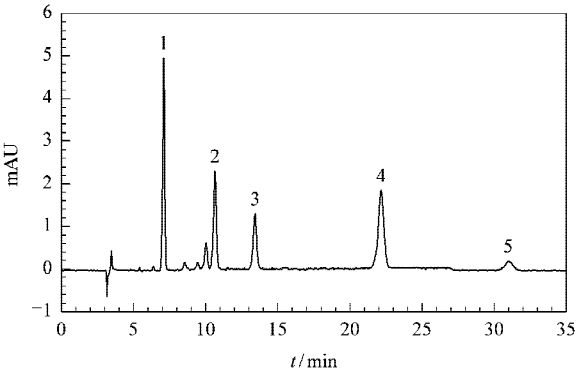

图 2 加标样品中苏丹红 Ⅰ ~ Ⅳ与斑蝥黄的色谱分离

Fig. 2 Typical chromatogram of a salted duck egg yolk sample spiked with Sudan Red Ⅰ - Ⅳ and canthaxanthin

For peak identifications, see Fig. 1.

2 时,苏丹红 Ⅰ ~ Ⅳ、斑蝥黄的检出限分别为 4,7,10,12,15 μg/kg(见表 1)。

表 1 苏丹红 Ⅰ ~ Ⅳ和斑蝥黄的线性回归方程和检出限

Table 1 Linear regression equations and detection limits for Sudan Red Ⅰ ~ Ⅳ and canthaxanthin

Compound	linear regression equation (n = 5)	r	Detection limit/ (μg/kg)
Sudan Ⅰ	H = 11.776C - 0.035	0.99991	4
Sudan Ⅱ	H = 4.999C + 0.004	0.99986	7
Sudan Ⅲ	H = 8.773C - 0.045	0.99992	10
Sudan Ⅳ	H = 4.918C - 0.006	0.99989	12
Canthaxanthin	H = 220.650C + 0.059	0.99994	15

H: peak height; C: concentration, mg/kg. Linear range: 0.1 - 4 mg/kg.

2.5 样品测定及回收率

准确称取 5 g 样品,按实验方法处理、测定,同时做加标回收试验,结果见表 2。从表中可以看出,苏丹红和斑蝥黄的回收率为89.56% ~ 97.34%,相对标准偏差(RSD)为 2.7% ~ 5.1%。说明本研究建立起来的苏丹红和斑蝥黄的多组分同时测定方法能够很好地满足实际样品的测定。

表 2 样品测试及加标回收试验结果(n = 5)

Table 2 Testing results and recoveries(n = 5)

Compound	Background/ (mg/kg)	Added/ (mg/kg)	Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
Sudan Ⅰ	0	0.4	0.389	97.34	2.7
Sudan Ⅱ	0	0.4	0.358	89.56	4.3
Sudan Ⅲ	0	0.4	0.360	90.98	5.1
Sudan Ⅳ	0	0.4	0.375	93.63	4.9
Canthaxanthin	0.34	0.4	0.721	95.15	3.1

3 结论

本文建立的多组分同时测定斑蝥黄和苏丹红的 RP-HPLC 方法提高了食品安全监督检测的效率,采用多波长分段检测获得较好的测定灵敏度;实际样品的测定及方法评价等结果显示该法简便、快速,能够满足食品安全检测分析的要求。

参考文献:

[1] Lu H M, Liang Y Z, Chinese Journal of Chromatography (卢红梅, 梁逸曾. 色谱), 2005, 23(1): 57

[2] Wang H T, Xu X M, Jin Z Y. Cereal & Feed Industry (汪洪涛, 徐学明, 金征宇. 粮食与饲料工业), 2003(6): 31

[3] Animal Feed——Brighter Eyesight or Brighter Salmon? Commission Decides New Rules on Colouring Feed Additive. Food Law News-EU-2003. Commission Press Release (IP/03/123), 2002-01-27. http://www.foodlaw.rdg.ac.uk/news/eu-03009.htm

[4] Zhang Y T, Zhang Z J, Sun Y H. J Chromatogr A, 2006, 1 129(1): 34

[5] Cornet V, Govaert Y, Moens G, van Loco J, Degroodt J M. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 639

[6] Yang Q, Li G, Peng T, Yong W, Li J Z, Chu X G. Chinese Journal of Food Hygiene (杨强, 李刚, 彭涛, 雍炜, 李建中, 储晓刚. 中国食品卫生杂志), 2005, 17(6): 511

[7] Xie W P, Huang Y Y, Fu H R, Hu G L. Chinese Journal of Chromatography (谢维平, 黄盈煜, 傅晖蓉, 胡桂莲. 色谱), 2005, 23(5): 542

[8] Tolasa S, Cakli S, Ostermeyer U. Eur Food Res Technol, 2005, 221(6): 787

[9] Wang Q, Han Y S, Dai Y Q, Saishi Hirota. Chinese Journal of Chromatography (王强, 韩雅珊, 戴蕴青, 廣田才之. 色谱), 1997, 15(6): 534

[10] Yu Y, Sun J G, Cao W Z. Food Science and Technology (俞晔, 孙建刚, 曹文忠. 食品科技), 2006, 31(12): 138

[11] Su X C, Huang M, Gan B B, Cheng H Y. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (苏小川, 黄梅, 甘宾宾, 程恒怡. 理化检验-化学分册), 2006, 42(12): 1 003

[12] Lu Y, Kuang B H, Zhang B. Fine Chemicals (陆豫, 匡滨海, 张彬. 精细化工), 2000, 17(2): 74