

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

林 钦

(福建省中心检验所, 福建 福州 350002)

摘要 采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了豆制品中的碱性橙和碱性嫩黄 O 染料的含量,样品用乙腈提取后用正己烷脱脂净化,然后在碱性条件下用乙醚萃取,最后溶于甲醇中进行 HPLC 分离、检测。所使用的色谱柱为 Gemini C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm),紫外检测波长分别为 458 nm (碱性橙)和 436 nm (碱性嫩黄 O),流动相为 0.03% 磷酸溶液/甲醇,梯度洗脱。碱性橙的检出限为 0.01 mg/kg,碱性嫩黄 O 的检出限为 0.02 mg/kg。回收率为 71% ~ 80%,相对标准偏差(RSD)为 2.2% ~ 5.0% ($n=6$),两种染料在 0.2 ~ 4.0 μ g/mL 内呈良好的线性关系。

关键词 高效液相色谱法(HPLC) 豆制品(bean products) 碱性橙(chrysoidine) 碱性嫩黄 O(auramine O)

中图分类号 O658 **文献标识码** B **文章编号** 1000-8713(2007)05-0776-02 **栏目类别** 技术与应用

碱性橙和碱性嫩黄 O 均为芳香胺类碱性工业染料,用于染丝、麻、皮革、纸、草编织品等,这两种物质均为可以使人致癌的物质,根据 GB2760 食品添加剂使用卫生标准规定,这两种物质严禁作为食品添加剂使用。由于在中性及偏碱性条件下,碱性橙和碱性嫩黄 O 与蛋白质吸附较牢固,不易褪色,因此有些不法商人就将其用于豆制品的染色,使腐竹、豆皮的色泽光亮^[1],欺骗消费者,使消费者的身体健康受到严重影响。目前碱性橙的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)^[2,3]和液相色谱-质谱联用法^[4],碱性嫩黄 O 的检测方法有高效液相色谱法^[5],但未发现同时检测食品中碱性橙和碱性嫩黄 O 两种染料的方法。本文建立了通过乙腈提取、正己烷净化及在碱性条件下用乙醚萃取的前处理方法,利用反相 HPLC 同时检测碱性橙和碱性嫩黄 O 的含量,取得了满意的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Alliance®2695 HPLC 系统配 2996 二极管阵列检测器(美国沃特世公司);Avanti J-E 多用途高速冷冻离心机(美国贝克曼公司)。

水为超纯水;甲醇和乙腈为色谱纯;正己烷(分析纯,用乙腈饱和);无水硫酸钠(分析纯,650 $^{\circ}$ C 灼烧 4 h)碱性橙标准品(纯度 100%)和碱性嫩黄 O 标准品(纯度 98%)均购自 Acros Organics(美国)。

碱性橙、碱性嫩黄 O 混合标准溶液:准确称取 20.0 mg 碱性橙和碱性嫩黄 O 标准品,用甲醇溶解定容到 100 mL,制成混合标准贮备液。准确移取该

溶液适量,用甲醇稀释成 0.2 ~ 4.0 μ g/mL 系列标准溶液。

1.2 样品处理方法

取 200 g 豆制品破碎均匀,称取 10.0 g 样品,置于 125 mL 具塞锥形瓶中,加入 20.0 mL 乙腈和 5 g 无水硫酸钠,摇匀,超声提取 30 min。将上清液倒入 50 mL 离心管中,以 5 000 r/min 离心 5 min。取 10.0 mL 提取液于 25 mL 比色管中,用正己烷涡旋萃取 3 次,每次 2 mL,弃去正己烷层,置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中,用氮气吹至近干。加入 2 mL 2% 氨水和 0.5 g 氯化钠,用无水乙醚萃取 3 次,每次 2 mL,合并乙醚提取液,加入 0.5 mL 异丙醇,在 40 $^{\circ}$ C 下用氮气吹至近干,用甲醇溶解定容到 2.0 mL,用 0.45 μ m 尼龙滤膜过滤。

1.3 色谱分析条件

色谱柱:菲罗门 Gemini C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm);柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长:碱性橙 458 nm,碱性嫩黄 O 436 nm;进样量:10 μ L;流速:1.0 mL/min。流动相及梯度:A 为 0.03% 磷酸溶液,B 为甲醇;0 ~ 10 min,75% A $\rightarrow$ 55% A;10 ~ 11 min,55% A $\rightarrow$ 75% A;11 ~ 16 min,75% A。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

试验发现降低 pH 值有利于改善碱性橙和碱性嫩黄 O 的峰形,0.03% 磷酸溶液 pH 值约为 2.0,因此,采用菲罗门公司耐酸碱为 pH 1 ~ 10 的 Gemini C₁₈ 柱,在本方法梯度条件下,碱性橙和碱性嫩黄 O 分离良好且峰形对称尖锐(见图 1)。用二极管阵列

检测器扫描 300 ~ 600 nm,发现碱性橙的吸收峰为 458 nm,碱性嫩黄 O 的吸收峰为 436 nm。

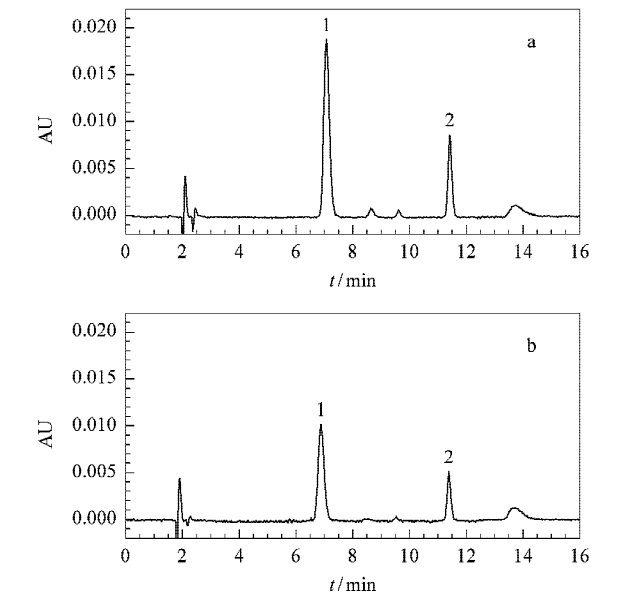


图 1 (a) 标准品和 (b) 加标腐竹样品的色谱图
1. 碱性橙 ; 2. 碱性嫩黄 O.

2.2 前处理条件的选择

本方法采用乙腈为提取溶液,乙腈具有很好的渗透性,提取完全且干扰杂质较少;可用正己烷萃取除去脂肪等杂质;在碱性水溶液中,碱性橙和碱性嫩黄 O 均易溶于乙醚,经乙醚提取后进一步去除杂质,减小了干扰。

2.3 标准曲线和检出限

配制 0.2 ~ 4.0 μg/mL 的标准溶液,进样测定,以峰面积(y)对质量浓度(x,μg/mL)作图,得到碱性橙和碱性嫩黄 O 的标准工作曲线。碱性橙的线

性方程为 $y = 67\,100x - 754$, $r = 0.999\,95$;碱性嫩黄 O 的线性方程为 $y = 23\,300x - 463$, $r = 0.999\,92$ 。以信噪比 S/N 为 3 时对应的目标物浓度确定检出限,得到本方法对豆制品中碱性橙和碱性嫩黄 O 的检出限分别为 0.01 mg/kg 和 0.02 mg/kg。

2.4 回收率和精密度试验

取一腐竹样品进行标准添加试验,每个添加量做 6 个平行试验,试验结果见表 1。

表 1 腐竹样品加标回收率试验结果 (n = 6)				
染料	添加浓度/ (mg/kg)	测得浓度/ (mg/kg)	回收率/ %	相对标准偏差/ %
碱性橙	0.21	0.15	71.4	4.6
	1.0	0.73	73.0	5.0
碱性嫩黄 O	0.20	0.16	80.0	2.5
	1.0	0.71	71.0	2.2

2.5 实际样品检测

采用本方法对市售的 22 个豆制品进行了检测,未发现样品中含有碱性橙和碱性嫩黄 O。

3 结论

本方法干扰小、灵敏度高,无须使用价格昂贵的固相萃取小柱,在实际工作中具有很强的应用价值。

参考文献：

[1] 冯济富,黄明. 中国卫生监督杂志,2003,10(6):351
[2] 铁晓威,黄百芬,任一平. 中国卫生检验杂志,2004,14(1):59
[3] 谷岩,崔松林,周宇,孙蕊,种婷. 分析测试技术与仪器,2006,12(4):202
[4] 任一平,黄百芬,铁小威,寿林飞. 第十五次全国色谱学术报告会,郑州,2005:741
[5] 罗美中,李碧芳,何小青. 食品工业科技,2005,26(8):166