

低温离心净化-高效液相色谱法快速测定 腐竹中的碱性橙 II 和碱性嫩黄 O

杨爽, 俞子萱, 王永芳, 葛宝坤*

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 建立腐竹中碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的低温离心净化-高效液相色谱测定方法。**方法** 样品经 70% 的乙腈-氨水(0.5%)提取, 4 °C 低温、12000 r/min 离心净化, 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分离, 最后采用二极管阵列检测器(PDA)检测, 以保留时间(Rt)定性, 外标法定量。**结果** 在 0.00125~0.05 mg/mL 的浓度范围内, 标准曲线有良好的线性关系, 相关系数大于 0.9999; 样品在 0.05、2.0、10.0 mg/kg 三个加标水平内的回收率范围为 95.0%~103.0%(n=10), 相对标准偏差小于 5.0%。方法的检出限(LOD)为 0.02 mg/kg, 定量限(LOQ)为 0.05 mg/kg。**结论** 对实际样品测试结果与参考文献方法比较, 该方法具有简便、快速、灵敏、费用低, 便于推广应用。

关键词: 低温离心净化; 高效液相色谱; 二极管阵列检测器; 腐竹; 碱性橙 II; 碱性嫩黄 O

Rapid determination of chrysoidine II and auramine O in dried bean curd sticks by cryogenic centrifugal purification-high performance liquid chromatography

YANG Shuang, YU Zi-Xuan, WANG Yong-Fang, GE Bao-Kun*

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method to detect chrysoidine II and auramine O in dried bean curd sticks by cryogenic centrifugal purification-high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were diluted and extracted by 70% acetonitrile ammonia water, purified by centrifugation at 12000 r/min and 4 °C, separated by high performance liquid chromatography (HPLC), and detected by photodiode array detector (PDA). The method took the retention time (Rt) for qualitative and external standard method quantitative analysis. **Results** Within the limits of concentration 0.00125~0.05 mg/mL, the standard curve had a good linear relationship, and the correlation coefficient was more than 0.9999; in the level of 0.05, 2.0, and 10.0 mg/kg, the add mark recovery rate was from 95.0% to 103.0% (n=10), the relative standard deviation was less than 5.0%; limit of detection(LOD) was 0.02 mg/kg, limit of quantitation (LOQ) was 0.05 mg/kg. **Conclusion** Comparing the actual sample testing results with reference method, this method is simple, rapid, sensitive, with low cost, and is suitable for popularization and application.

KEY WORDS: cryogenic centrifugal purification; high performance liquid chromatography; photodiode array detector; dried bean curd sticks; chrysoidine II; auramine O

*通讯作者: 葛宝坤, 研究员, 主要研究方向为残留分析技术。E-mail: gebk@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: GE Bao-Kun, Professor, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.158 Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: gebk@tjciq.gov.cn

1 引言

近年来,食品安全事故频发,社会各界关注度极高,政府也加大了食品安全的监督力度,但仍有部分不法分子置法律及人民生命财产安全于不顾,顶风作案制造有毒有害食品,从茶叶的铅铬绿、调味料的苏丹红和罗丹明 B、水产品的孔雀石绿、乳制品的三聚氰胺,到使用违禁工业染料加工豆制品、鸡肉、咸菜及黄鱼的食品安全非法添加物事件,再到近期破获添加吊白块、硼砂、乌洛托品等工业原料有害腐竹案。碱性橙 II、碱性嫩黄 O(结构式见图 1)均为芳香胺类碱性工业染料,用于腈纶、人造纤维、皮革、纸张等的染色和棉织品、丝织品的印花,对人体具有致癌、致畸、致基因突变作用^[1,2],在 GB 2760《食品添加剂使用标准》中规定,严禁将此作为添加剂使用^[3];二者在 2011 年也被列入卫生部公布的非法添加物名单中^[4]。由于在中性或碱性条件下,碱性橙和碱性嫩黄与蛋白质吸附作用较强,不易褪色,不法商贩常将其用于腐竹等豆制品的染色,使腐竹染色后的色泽更加金黄光亮,感官较好,达到以次充好、以假乱真,欺骗消费者,使消费者的健康受到严重伤害。

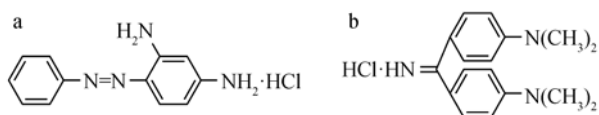


图 1 碱性橙 II(a)和碱性嫩黄 O(b)结构式

Fig. 1 The structures of chrysoidine II(a) and auramine O(b)

目前,食品中碱性橙和碱性嫩黄的分析方法主要有薄层色谱法^[5]、极谱法^[6]、液相色谱法^[7-10]、液相色谱质谱法^[11,12],卓婧等^[13]采用分光光度法研究了食品中合成色素的检测方法,可对多种色素快速测定。但上述方法需要固相萃取设备、需要昂贵的质谱仪、灵敏度不够、液液萃取污染严重、只能进行单一成分的测定等缺点^[14-16]。本研究采用 70%的乙腈-氨水(0.5%)为提取液,建立了样品直接提取、4℃低温、12000 r/min 离心净化、高效液相色谱(HPLC)分离、二极管阵列检测器检测(PDA)快速测定腐竹中的工染料碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的可靠方法,弥补国标方法中两种非法添加物成分不能同时检测的不足。

2 材料与方法

2.1 仪器

高效液相色谱仪(e2695, 美国 Waters 公司),配 PDA 二极管阵列检测器; MILLI-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司); HITACHI CR22G III 型高速离心机(日本 Hitachi 公司)。

2.2 试剂

乙腈(色谱纯,迪马科技有限公司);氨水(优级纯,天津市光复精细化工研究所);乙腈-稀氨水混合提取液:乙腈:稀氨水(100 mL 水+0.5 mL 氨水)=70:30(v:v);磷酸二氢钠(二水)(优级纯,天津市光复精细化工研究所);磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L):称取二水合磷酸二氢钠 3.16 g,加水至 1000 mL,用氨水和磷酸调 pH=4.5。

标准储备液的配制:准确称取碱性橙 II、碱性嫩黄 O 标准品(ALDRICH 公司,含量≥95%)各适量(精确到 0.1 mg),置于 50 mL 容量瓶,用适量的水溶解,乙腈定容,混匀,标准储备液浓度为 1.0 mg/mL(该溶液可在冰箱中 0~4℃避光保存 6 个月),再用乙腈-水(40:60, v:v)稀释至各种浓度的标准使用液。

2.3 色谱测定条件

色谱柱:中检维康 Cloversil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),或相当者;流动相:乙腈:0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=4.5)=55:45(v:v);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;进样量:10 μL;最大吸收波长:λ_{max} = 450 nm。

2.4 实验方法

称取 5 g(精确到 0.001 g)样品,置于 50 mL 离心管中,加入混合提取液 10 mL,充分混匀,振荡提取 30 min 或超声提取 30 min,混匀,经低温 4℃、12000 r/min 离心 10 min,过 0.45 μm 的滤膜,滤液进高效液相色谱分析测定。

3 结果与讨论

3.1 提取液配比与优化

研究了采用水、甲醇水、乙腈水、乙醇水、碱性乙腈水五种提取溶剂的提取效率对测定结果的影响,研究表明:碱性乙腈水不仅在碱性条件下提高了待测组分的溶解度,而且乙腈对水溶性蛋白质具有较

好的沉淀作用, 其提取效率均高于其他提取溶剂; 另对乙腈水的配比研究还发现, 采用 70% 的乙腈氨水提取样品可使提取样液澄清、基线噪音小、保留时间稳定、两种待测成分分离效果较好。因此, 本研究选用 70% 的乙腈氨水(0.5%)为样品提取液。

3.2 低温离心的温度与转速控制

研究了在 12000 r/min 条件下-4 °C、0 °C、4 °C、10 °C 四个温度下的离心效果, 发现在-4 °C 时一般普通离心管因冷冻会出现爆裂现象; 10 °C 时因脂肪、蛋白等杂质不能完全溶出, 使分离效果不好; 0 °C 和 4 °C 时样液和杂质均能很好地分离, 因此选择 4 °C 作为本方法的离心净化温度。此外, 研究结果表明离心机转速在 12000 r/min 和 15000 r/min 下, 提取效率没有明显的变化, 因此, 离心时的转速选择 12000 r/min。

3.3 方法的线性关系

取一定浓度混合标准溶液, 用流动相分别稀释成浓度分别为 0.00125、0.0025、0.0050、0.010、0.025、0.05 mg/mL 的标准工作溶液, 按照本方法色谱条件分析测定, 绘制工作曲线, 两种成分在 0.00125~0.05 mg/mL 浓度范围内有良好线性关系, 其相关系数均大于 0.9999, 结果见表 1。

3.4 方法的测定限

取系列腐竹样品各约 5.0 g, 加入适量的混合标准溶液, 按照本方法的操作条件进行提取和净化、色谱条件下测定样品加标回收结果, 根据信噪比 $S/N=10$ 为本方法定量限(LOQ)、 $S/N=3$ 为本方法的检

出限(LOD)计算出方法的最低检测限, 结果见表 1。

3.5 方法的回收率与精密度

取腐竹样品 5.0 g(精确至 0.01 g), 按照 0.05、2.0、10.0 mg/kg 三个加标水平, 按本方法进行加标回收实验, 并做 10 个平行样, 结果碱性橙和碱性嫩黄的平均回收率均在 95.0%~103.0%, 精密度小于 5.0%, 本方法的稳定性良好, 结果见表 1。

3.6 实际样品测试

从市场随机抽取 23 批次的腐竹样品, 按照上述测试方法进行检测, 共检出阳性样品 7 批次, 检测结果在 0.1~0.5 mg/kg 范围内, 上述检出的阳性样品经送权威检测机构确认, 均为阳性, 两实验室的检测结果比较显示, 二者差别无显著性, 因此, 该检测方法具有快速、准确、灵敏的特点。

在上述色谱条件下, 根据样液中目标化合物含量情况, 选定响应值相近的标准工作溶液, 对标准工作溶液和样液等体积参差进样测定。以保留时间定性, 峰面积外标法定量, 在“2.3”的色谱条件下, 标准品色谱图和保留时间见图 2a, 碱性嫩黄 O 阳性腐竹样品色谱见图 2b。

3.7 方法的适用性

为了确定方法的抗干扰能力及适用性, 分别选取常见的合成着色剂柠檬黄、日落黄、喹啉黄, 按照本方法条件进行测试, 结果显示待测组分的色谱峰分离度和重现性均较好, 样品中的合成着色剂成分均不干扰结果测定。

表 1 方法的加标回收率、变异系数与检测限($n=10$)
Table 1 Recoveries, correlation-coefficient and LOD ($n=10$)

测定组分	线性方程	相关系数	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	平均回收 率(%)	变异系数 (%)	检测限 (mg/kg)
碱性嫩黄 O	$Y=5.14 e+007X$ $-4.80 e+003$	0.999978	0.00	0.05	95.0	4.9	LOD=0.02
				2.00	98.3	4.1	LOQ=0.05
				10.0	102.0	3.6	
碱性橙 II	$Y=7.12 e+007X$ $-5.80 e+003$	0.999981	0.00	0.05	96.2	5.0	LOD=0.02
				2.00	99.0	4.0	LOQ=0.05
				10.0	103.0	3.5	

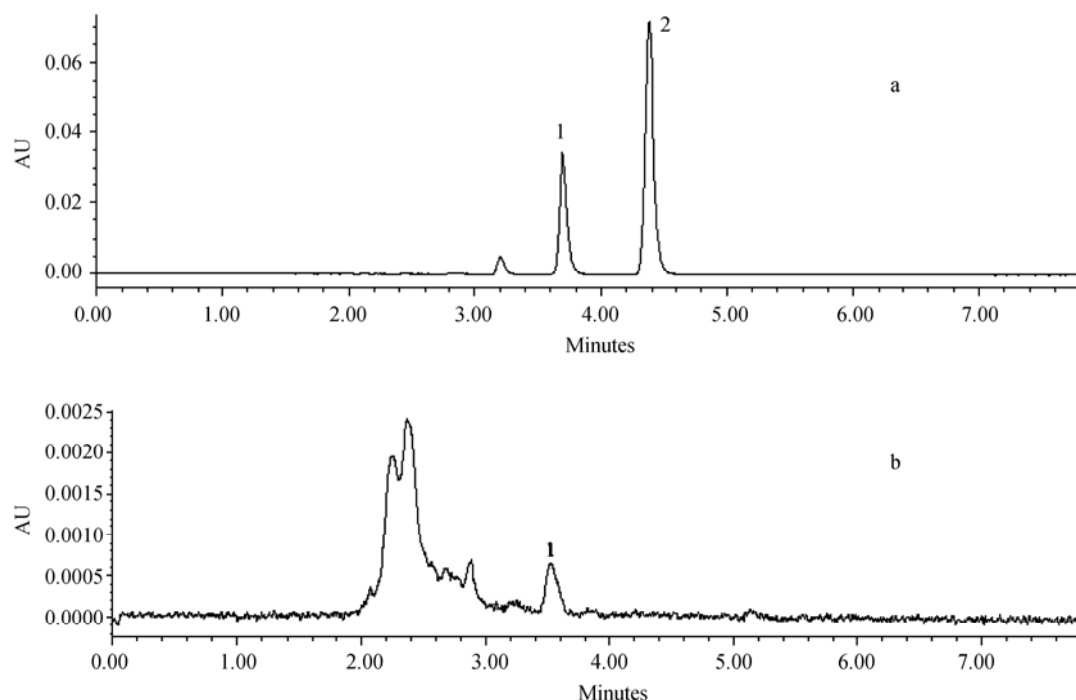


图2 色谱条件下标准溶液(0.0025 mg/mL)色谱图(a)和腐竹阳性样品色谱图(b)

Fig. 2 Chromatograms of standard solution (a) and sample (b)

1#: 碱性嫩黄 O(auramine O, 3.58 min) 2#: 碱性橙 II(chrysoidine II, 4.36 min)

4 结论

两种待测组分在 0.00125 ~ 0.05 mg/mL 浓度范围内,有良好的线性关系,相关系数大于 0.9999;样品在 0.05、2.0、10.0 mg/kg 三个加标水平内的回收率范围为 95.0%~103.0%, 10 次测定的相对标准偏差小于 5.0%;方法的定性检出限(LOD)为 0.02 mg/kg、定量检出限(LOQ)为 0.05 mg/kg,符合色谱分析的方法要求。本研究与其他检测方法比较,具有操作简单、快速、灵敏、不需要 SPE 净化柱、试剂消耗少、环境污染小、设备投入低等特点,便于推广与应用。

参考文献

- [1] 高洁, 宁尚勇, 许志强, 等. 固相萃取—高效液相色谱法检测食品中的非食用色素[J]. 分析试验室, 2008, 27(8): 33–35.
Gao J, Ning SY, Xu ZQ, *et al.* Determination of non-edible pigment in food by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Lab*, 2008, 27(8): 33–35.
- [2] 张海琪, 梁丽军, 何中央, 等. 水产品中碱性嫩黄 O 残留量的液相色谱—串联质谱测定[J]. 质谱学报, 2010, 31(1): 48–52.
Zhang HQ, Liang LJ, He ZY, *et al.* Determination of auramine O residues in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2010, 31(1): 48–52.
- [3] 林钦, 郑小严, 何树坤, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中的碱性橙、碱性嫩黄、和碱性桃红 T 染料含量[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 194–196.
Lin Q, Zheng XY, He SK, *et al.* Simultaneous determination of chrysoidine, auramine and safranin T dye content by ultra performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2009, 30(14): 194–196.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单[EB/OL].(2011-05-12)<http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s9164/201104/51441.html>
People's Republic of China Ministry of Health. The list about may be illegal to add of non-food substances and easy to abuse of food additives in foods [EB/OL].(2011-05-12) <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s9164/201104/51441.html>
- [5] 洪详奇, 张杨. 薄层色谱测定食品中苏丹红染料方法的探讨 II [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1330–1332.
Hong XQ, Zhang Y. Discussion on determination of sudan dyes

- in food by thin layer chromatography II [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2006, 16(11): 1330-1332.
- [6] 陈大义, 苟家蓉. 纸层析定性示波极谱法测定非食用色素酸性橙 II [J]. *中国卫生检验杂志*, 2001, 11(2): 170-171.
- Chen DY, Gou JR. Determination of non-edible pigment acid orange II by paper chromatography qualitative combined with polarographic [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2001, 11(2): 170-171.
- [7] 徐琴, 刘琳, 傅余强, 等. 高效液相色谱法测定食品中的酸性橙 II [J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 219-222.
- Xu Q, Liu L, Fu YQ, *et al.* Determination of acid orange II in food by ultra performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2010, 31(8): 219-222.
- [8] 林钦. 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[J]. *色谱*, 2007, 25(5): 776-777.
- Lin Q. Simultaneous determination of chrysoidine and auramine O in bean products by ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2007, 25(5): 776-777.
- [9] 刘宁, 肖白曼. HPLC 法测定食品中非食用色素酸性橙 II [J]. *中国民康医学*, 2006, 18(2): 104-105.
- Liu N, Xiao BM. Determination of non-edible pigment acid orange II in food by ultra performance liquid chromatography [J]. *Med J Chin People's Health*, 2006, 18(2): 104-105.
- [10] 范文锐, 吴青, 劳扬, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 7 种非食用色素[J]. *分析化学*, 2012, 40(2): 292-297.
- Fan WY, Wu Q, Lao Y, *et al.* Simultaneous determination of seven kinds of non-edible pigment in food by ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(2): 292-297.
- [11] 曹鹏, 乔旭光, 娄喜山, 等. 固相萃取结合超高效液相色谱—串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J]. *分析化学*, 2011, 39(11): 1670-1675.
- Cao P, Qiao XG, Lou XS, *et al.* Determination of six kinds of industrial dyes in food by solid phase extraction -ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(11): 1670-1675.
- [12] 赵榕, 李兵, 赵海燕, 等. 固相萃取—超高效液相色谱串接四极杆质谱同时测定调味品中 12 种工业染料[J]. *中国食品卫生杂志*, 2010, 22(4): 305-312.
- Zhao R, Li B, Zhao HY, *et al.* Simultaneous determination of 12 industrial dyes in condiments by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2010, 22(4): 305-312.
- [13] 卓倩, 王静, 陈小霞, 等. 食品中合成色素快速检测仪器的研制[J]. *分析化学*, 2011, 39(2): 283-287.
- Zhuo Q, Wang J, Chen XX, *et al.* Development of rapid detection equipment for synthetic pigment in food [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(2): 283-287.
- [14] Maria A, Dalibor S, Tereza S, *et al.* On-line SPE-UHPLC method using fused core columns for extraction and separation of nine illegal dyes in chilli-containing spices [J]. *Talanta*, 2014, 130.
- [15] 高洁, 尹峰, 何国亮, 等. 高效液相色谱法测定豆制品中的碱性嫩黄 O [J]. *分析实验室*, 2008, 27(4): 230-232.
- Gao J, Yin F, He GL, *et al.* Determination of auramine O in bean products by ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Lab*, 2008, 27(4): 230-232.
- [16] 罗美中, 李碧芳, 何小青. 高效液相色谱-二极管阵列法测定豆制品中的碱性嫩黄 O 的含量[J]. *分析实验室*, 2005, 26(8): 166-170.
- Luo MZ, Li BF, He XQ, *et al.* Determination of soy auramine O content by high performance liquid chromatography combined with diode array [J]. *Chin J Anal Lab*, 2005, 26(8): 166-170.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



杨 爽, 助理工程师, 主要研究方向为食品添加剂检测技术。
E-mail: yangs@tjciq.gov.cn



葛宝坤, 研究员, 主要研究方向为残留分析技术。
E-mail: gebk@tjciq.gov.cn