

凝胶渗透色谱净化超高效液相色谱法测定 辣椒油和火锅底料中的 10 种工业染料

路 杨¹, 杨立新^{1,2}, 刘印平¹, 王丽英¹, 董 彬¹, 常凤启^{1*}

(1. 河北省疾病预防控制中心, 石家庄 050021; 2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: 目的 建立辣椒油和火锅底料中的 10 种工业染料的检测方法。方法 采用凝胶渗透色谱仪作为前处理设备, 采用超高效液相色谱仪作为检测设备, 对高脂肪含量的辣椒油及火锅底料等辣椒制品中的 10 种红黄类工业染料进行检测, 并对方法的有效性进行验证。结果 以空白的辣椒油和火锅底料为基质, 分别在高、中、低三个水平进行加标实验, 回收率分别在 56.0%~96.4% 之间和 70.0%~98.2% 之间, RSD ($n=6$) 分别为 1.9%~8.2% 之间和 1.8%~7.9% 之间, 各工业染料的检出限($S/N=3$)在 0.009~0.051 mg/kg 之间, 定量限($S/N=10$)在 0.030~0.153 mg/kg 之间。结论 该方法操作简单, 稳定性好, 适于在实际检测工作中推广应用。

关键词: 工业染料; 凝胶渗透色谱法; 超高效液相色谱法; 辣椒油; 火锅底料

Determination of 10 dyes in hotpot material and chili by ultra performance liquid chromatography with gel permeation chromatography cleanup

LU Yang¹, YANG Li-Xin^{1,2}, LIU Yin-Ping¹, WANG Li-Ying¹,
DONG Bin¹, CHANG Feng-Qi^{1*}

(1. Hebei Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 10 dyes in hot pot material and chili oil. **Methods** Ten dyes in chili oil, hotpot material and other foods with abundant fat were detected by gel permeation chromatography (GPC) with ultra performance liquid chromatography (UPLC). At the same time the effectiveness was verified. **Results** Spiking experiments were carried out in high, medium and low level, respectively. Recoveries of chili oil and hotpot material were between 56.0%~96.4% and 70.0% to 98%, the RSD ($n=6$) were between 1.9% to 8.2% and 1.8% to 7.9%, the limits of detection ($S/N=3$) were between 0.009~0.051 mg/kg, and the limits of quantification ($S/N=10$) were between 0.030~0.153 mg/kg. **Conclusion** This method is simple to operate with good stability and is suitable for the application in daily testing work.

KEY WORDS: dye; gel permeation chromatography; ultra performance liquid chromatography; chili oil; hotpot material

基金项目: 河北省科技厅平台建设项目(JB00119661123D)、廊坊市科技支撑计划项目(2014013126)

Fund: Supported by the Platform Construction Project of Hebei Science and Technology Department (JB00119661123D) and the Technology Support Project of Langfang City (2014013126)

*通讯作者: 常凤启, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与卫生检验。E-mail: yanglixin241@163.com

Corresponding author: CHANG Feng-Qi, Chief Technician, Hebei Center for Disease Control and Prevention, No.97, Huaiandonglu Road, Yuhua District, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: yanglixin241@163.com.

1 引言

工业染料是一类广泛用于纺织品、毛皮制品、木制品及陶瓷制品等工业产品的着色剂，由于该类染料种类繁多、色泽鲜艳、价格低廉、不易褪色，不法商贩常将其充当食用色素用于食品加工^[1]。已有文献报道了对位红、苏丹红、孔雀石绿等多种工业染料的毒理学研究。数据表明工业染料对人体多脏器器官具有广泛毒性及“三致”作用，国际癌症研究机构已将苏丹红 I~IV 列为三类致癌物^[2-4]。因此在食品中非法添加工业染料对人体健康产生的危害不言而喻。近年来“红心鸭蛋”、“化学火锅”、“孔雀石绿”等由工业染料引起的食品安全事件层出不穷，引起了社会舆论的广泛关注，我国各相关检测机构和世界各国一道，在探索非食用色素的检测方法方面做出了巨大努力^[5,6]。目前开发的检测方法包括酶联免疫法^[7-9]，气相色谱质谱法^[10]，液相色谱法^[11-13]，液相色谱质谱法^[14,15]等。由于脂肪含量高，基质复杂等原因，辣椒油及火锅底料等高脂肪含量样品中工业染料的检测技术是该领域的重点和难点。固相萃取法(solid phase extraction, SPE)^[16-17]、基质分散萃取法(matrix solid-phase dispersion, MSPD)^[18-20]等前处理技术在油脂样品的处理方面应用广泛，由于工业染料种类繁多，分子结构千差万别，化学性质各不相同，上述方法在工业染料的多残留检测前处理领域应用较为困难。并且对于高脂肪含量的样品，上述前处理方法，缺乏合适的有效性。凝胶渗透色谱^[21](gel permeation chromatography, GPC)是一种不基于化合物化学性质的有效的高脂肪含量样品前处理技术，本文通过前处理条件及液相色谱条件的优化，建立了 GPC 净化超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC) 同时检测辣椒油及火锅底料中 10 中红黄类颜色的检测技术。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪配 DAD 检测器(Acqut UPLC, 美国 Waters 公司)；全自动凝胶渗透色谱仪(AccuPrep MPSTM, 美国 JZ Scientific 公司)；配备内装 25 g Bio-Beads S-X3 填料的 300mm×20 mm 凝胶色谱柱。振荡器(MMS-310, 日本 EYELA 公司)；旋转蒸发器(N-1001, 日本 EYELA 公司)；涡旋式混合器(G560E, 美国 Scientific Industries 公司)；氮气浓缩仪(III, 美国 Associae 公司)；超声仪(KQ-600E, 昆山市超声仪有

限公司)；聚丙烯离心管，孔径为 0.22μm 的有机滤膜等。

环己烷，乙酸乙酯，乙腈，所有有机溶剂(色谱纯，Thermo fisher 公司，美国)；实验室用水为经 Mili-Q 纯水机处理过的超纯水。

标准物质：苏丹红 I~IV，苏丹红 7B，苏丹红 B，罗丹明 B，苏丹红 G，苏丹橙，苏丹黄，对位红均购自于 Dr. Ehrenstorfer GmbH，纯度均大于 99.5%。

2.2 溶液的配制

标准溶液的配制：分别准确称取适量标准品于 10 mL 容量瓶，用甲醇溶解，稀释定容，配成 1000 μg/mL。作为标准储备液，密封冷冻储存于-18 ℃冰箱中。

混合标准使用液的配制：分别取 100 μL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 10 μg/mL 标准使用液，密封冷藏保存于 4 ℃冰箱中。

混合标准系列：分别取适量标准品于棕色进样瓶中，用乙腈:水(90:10, v:v)分别稀释 10、20、40、80、100 倍，配制成梯度系列，每种化合物的 CAS 编号、中英文名称，使用液浓度、分子量见表 1。

2.3 仪器条件

液相色谱条件：采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)，流动相 A 为乙腈，B 为乙酸铵溶液(0.01 mol/L)含 0.1%乙酸。梯度洗脱程序为：0 min 时，A 为 30%，到 3.0 min，线性变化至 60%，3.3 min 线性变化至 95%，保持 95%至 8.9 min，到 9.0 min，再次线性变化 30%。进样量为 4 μL。流速为 0.3 mL/min，柱温为 35 ℃。

2.4 样品前处理

2.4.1 样品提取

称取 0.5 g 辣椒油或火锅底料于 15 mL 聚丙烯离心管中，用乙酸乙酯:环己烷(1:1, v:v)溶液定容至 10 mL，涡旋震荡 1 min，使溶液混合均匀。然后超声提取 30 min，过 0.22 μm 滤膜于具盖螺口玻璃试管，待净化。

2.4.2 样品净化

将上述提取液进行 GPC 净化，进样量为 5 mL，紫外检测波长为 254 nm，以环己烷-乙酸乙酯(1:1, v:v)为流动相，在 5 mL/min 的流速下淋洗，弃去前 13.5 min 的流出液，收集第 13.5~20 min 的流出液，再以流动相冲洗 GPC 系统 5 min。将收集的液体旋转蒸发浓缩至近干，用甲醇复溶后定容至 1 mL，转移至液相色谱进样瓶中，待 UPLC 分析。

表 1 目标化合物中英文名称、CAS 编号、分子量及使用液浓度
Table 1 The Chinese name, English name, CAS NO., MW and concentration of target compounds

CAS 编号	中文名称	英文名称	分子量	使用液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
2051-85-6	苏丹黄	Sudan Orange	248.3	10.00
6410-10-2	对位红	Para red 1	293.2	10.00
1229-55-6	苏丹红 G	Sudab red G	278.3	10.00
842-07-9	苏丹红 I	Sudan I	248.3	20.00
3118-97-6	苏丹红 II	Sudan II	276.3	20.00
85-86-9	苏丹红 III	SudanIII	352.4	40.00
85-83-6	苏丹红 IV	Sudan IV	380.5	20.00
6416-57-5	苏丹红 7B	Sudan red 7B	379.5	20.00
81-88-9	罗丹明 B	Rhodamine B	479.0	20.00
3176-79-2	苏丹红 B	Sudan red B	380.4	20.00

2.4.3 样品分析

采用 UPLC 为样品分析设备, 每种样品的检测波长见表 2。分别吸取混合标准液及样品净化液注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 以保留时间定性, 以样品和标准样品的峰面积比较定量。

3 结果与讨论

3.1 GPC 条件的优化

对 GPC 净化工业染料的收集时间进行了优化。将质量浓度均为 10 mg/L 的 10 种工业染料混合标准溶液注入全自动 GPC 仪, 以 5.0 mL/min 的流速, 洗脱 25 min。观察紫外色谱图。实验结果发现, 从第 13.5 min 开始有目标物组分流出, 至第 20 min 时所有目标物组分全部流出; 而脂肪等大分子组分的流出时间为 5~12 min, 因此选择第 13.5~20 min 作为违禁色素组分的收集时间。整个 GPC 净化时间为 25 min, 这样既实现了目标化合物与脂肪等大分子的分离, 又能够保证对 GPC 系统进行冲洗, 防止系统污染。GPC 紫外吸收色谱图见图 1。

3.2 加标回收率、检出限和定量限

分别采用空白辣椒油和空白火锅底料以低、中、高 3 个加标水平(见表 3)进行加标回收试验, 以加标回收率表示方法的准确度, 以相对标准偏差(RSD)表示方法的精密度。不同空白基质中的加标回收试验结果见表 3。辣椒油和火锅底料的加标回收率分别为 56.0%~96.4% 和 61.0%~98.2%, RSD($n=6$) 分别为

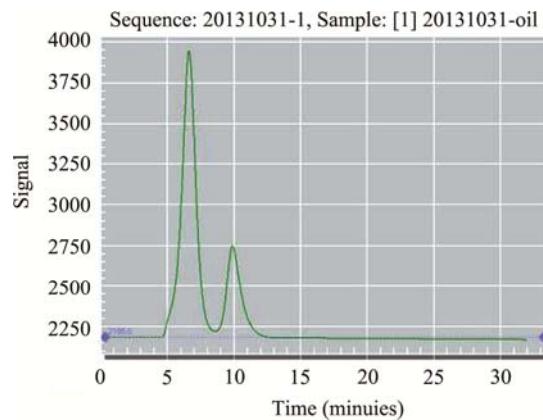


图 1 油脂流出的 GPC 色谱图

Fig. 1 GPC chromatogram of oil

1.9%~8.2% 和 1.8%~7.9%。从加标回收试验结果可以看出本方法的准确度和精密度良好。以空白辣椒油基质低水平加标的各工业染料的响应得到信噪比(S/N)为 3 时各工业染料的检出限和(S/N)为 10 时各工业染料的定量限, 各工业染料的检出限在 0.009~0.051 mg/kg 之间, 定量限在 0.030~0.153 mg/kg 之间(见表 2)。相当于标准使用液 20 倍的加标样品溶液的色谱图如图 2 所示。

3.3 样品测定

测定了从市场采集的辣椒油和火锅底料样品各 30 份。其中在辣椒油中检出 1 份样品存在工业染料的残留, 阳性检出率为 3.3%, 结果表明, 市场上工业染料在辣椒油及火锅底料中的违禁添加不太严重。阳性辣椒油样品

的色谱图如图3所示, UPLC 检出的辣椒油中罗丹明B的含量为0.068 mg/kg,此结果经液相色谱串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-

MS/MS)方法定性确证, LC-MS/MS 检出的罗丹明B的含量为0.065 mg/kg。数据表明, 两种检测方法得出的结果具有较好的符合性。

表2 目标化合物保留时间、检测波长、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 2 The retention time, detection wavelength, the linear range, correlation coefficient, detection limit (LOD) and quantitation limit (LOQ) of target compounds

名称	保留时间 (min)	检测波长 (nm)	线性范围 ($\mu\text{g/g}$)	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/g}$)	定量限 ($\mu\text{g/g}$)
苏丹黄	5.53	430	0.05~10	0.999956	0.013	0.045
对位红	5.47	490	0.05~10	0.999912	0.009	0.030
苏丹红 G	5.67	490	0.05~10	0.999942	0.017	0.045
苏丹红 I	5.78	490	0.10~20	0.999726	0.026	0.091
苏丹红 II	6.52	490	0.10~20	0.999916	0.031	0.093
苏丹红 III	7.02	520	0.20~40	0.999805	0.051	0.153
苏丹红 IV	8.27	520	0.10~20	0.999692	0.031	0.090
苏丹红 7B	8.02	520	0.10~20	0.998961	0.027	0.810
罗丹明 B	4.42	520	0.10~20	0.999950	0.031	0.090
苏丹红 B	8.20	520	0.10~20	0.999815	0.025	0.075

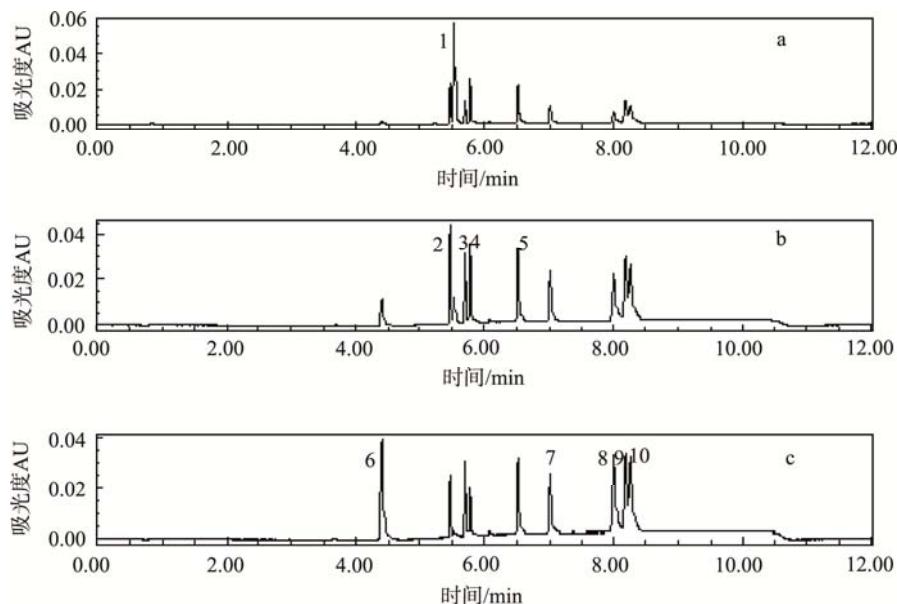


图2 标准溶液稀释20倍的色谱图

Fig. 2 The chromatogram of standard solution diluted 20 times

a: 检测波长为430nm时的标准色谱图; b: 检测波长为490nm时的标准色谱图; c: 检测波长为520nm时的标准色谱图

1. 苏丹黄; 2. 对位红; 3. 苏丹红 G; 4. 苏丹红 I; 5. 苏丹红 II; 6. 罗丹明 B; 7. 苏丹红 III; 8. 苏丹红 7B; 9. 苏丹红 B; 10. 苏丹红 IV

a: the detection wavelength was 430 nm; b: the detection wavelength was 490 nm; C: the detection wavelength was 520 nm

1. Sudan yellow; 2. para red; 3. Sudan red G; 4. Sudan red I, 5. Sudan red II; 6. Rhodamine B; 7. Sudan red III; 8. Sudan red 7B; 9. Sudan red B; 10. Sudan red IV

表3 辣椒油及火锅底料低、中、高水平加标回收实验结果
Table 3 The recovery tests results of chili oil and pot bottom material in low, medium and high levels

名称	辣椒油						火锅底料											
	低水平			中水平			高水平			低水平			中水平			高水平		
	加入量(μg/g)	回收率(%)	RSD(%)	加入量(μg/mL)	回收率(%)	RSD(%)												
苏丹黄	0.10	64.2	7.1	0.20	73.1	4.1	0.50	90.7	2.0	0.10	70.0	7.9	0.20	76.5	6.3	0.50	98.2	2.5
对位红	0.10	69.8	7.2	0.20	74.0	4.0	0.50	95.5	2.1	0.10	73.0	6.8	0.20	80.0	6.0	0.50	96.0	2.0
苏丹红G	0.10	66.7	5.9	0.20	70.8	4.8	0.50	93.4	1.7	0.10	72.0	5.9	0.20	81.0	5.3	0.50	97.2	2.1
苏丹红I	0.20	71.3	6.1	0.40	77.5	5.3	1.00	96.4	1.9	0.20	71.0	6.6	0.40	81.0	5.1	1.00	96.0	1.8
苏丹红II	0.20	56.0	5.0	0.40	71.9	3.9	1.00	93.5	2.2	0.20	61.0	6.3	0.40	77.0	5.5	1.00	95.4	2.4
苏丹红B	0.20	77.4	6.6	0.40	80.7	5.8	1.00	82.9	2.3	0.20	88.0	5.6	0.40	90.0	4.8	1.00	94.0	2.2
苏丹红IV	0.20	64.5	8.2	0.40	73.3	5.3	1.00	84.3	2.4	0.20	88.0	5.5	0.40	89.5	4.0	1.00	93.4	1.9
苏丹红7B	0.20	79.9	6.3	0.40	81.6	4.4	1.00	91.9	1.9	0.20	85.0	5.9	0.40	87.5	4.3	1.00	93.8	2.9
罗丹明B	0.20	79.6	6.6	0.40	84.5	4.1	1.00	92.2	2.0	0.20	74.0	6.6	0.40	77.5	5.2	1.00	81.8	3.3
苏丹红III	0.40	81.7	6.2	0.80	83.7	3.9	2.00	90.5	2.1	0.40	68.0	7.3	0.80	71.5	6.6	2.00	88.0	3.5

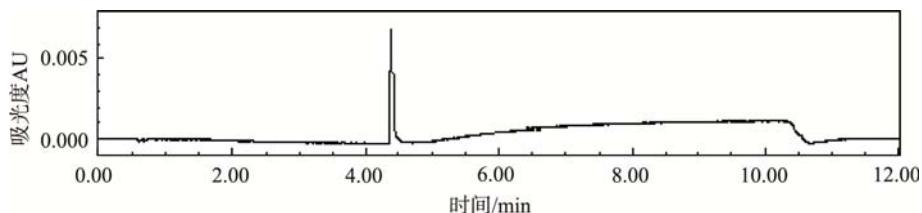


图3 阳性样品色谱图
Fig. 3 Chromatogram of positive sample

4 结论

建立了凝胶渗透色谱净化, 超高效液相色谱(具PDA检测器)检测辣椒油及火锅底料等高脂肪含量调味品中禁用工业染料的检测方法。对样品前处理条件和线性关系、检出限、精密度和准确度等方法学参数进行了优化和验证, 均得到了满意的结果。本方法的目标化合物涵盖了目前市场上较容易取得的红黄色食品中禁用工业染料, 并且选择火锅底料和辣椒油两种高脂肪含量的食品基质。方法稳定性好, 可操作性强, 很好地解决了高脂肪含量的食品中禁用工业染料检测问题, 适宜在实际检测工作中推广使用。

参考文献

[1] 宋雁. 食品中苏丹红的危险性评估[J]. 国外医学卫生学分册,

2005, 32(3): 129–132.

Song Y. Risk assessment of Sudan red in food [J]. Foreign Med Sci (Sec Hyg), 2005, 32(3): 129–132.

[2] 张佳艳, 伍金娥, 常超. 孔雀石绿的毒理学研究进展[J]. 粮食科技与经济, 2011, 36(3): 43–47.

Zhang JY, Wu JE, Chang C. Research progress of toxicology of malachite green [J]. Grain Sci Technol Econ, 2011, 36(3): 43–47.

[3] Johnaon GE, Quick EL, Parry EM, et al. Metabolic influences for mutation induction curves after exposure to Sudan-1 and Para red [J]. Mutagenesis, 2010, 25(4): 327–333.

[4] Rao KV. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice [J]. Chemico-Biol Inter, 2007, (122): 153–170.

[5] 郑月明, 国伟, 聂雪梅, 等. 食品中违禁添加的非食用色素检测技术综述[J]. 中国农学通报, 2012, 28(09): 222–228.

Zheng YM, Guo W, Nie XM, et al. Research on detection

- methods of inedible pigment illegally added to food [J]. Chin Agric Sci Bull, 2012, 28(09): 222–228.
- [6] Kucharska M, Grabka J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes [J]. Talanta, 2010, 80: 1045–1051.
- [7] 韩丹, 于梦, 吴梅, 等. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. 分析化学研究简报, 2007, 38(8): 1168–1170.
- Han D, Yu M, Wu M, et al. A Sensitive enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of sudan in food samples [J]. Chin J Anal Chem, 2007, 38(8): 1168–1170.
- [8] 张明洲, 方结红, 陈宗伦, 等. 苏丹红 I 直接竞争 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 341–348.
- Zhang MZ, Fang JH, Cheng ZL, et al. Development of direct competitive elisa kit for sudan [J]. J Nuclear Agric Sci, 2010, 24(2): 341–348.
- [9] Chang XC, Hu XZ, Li YQ, et al. Multi-determination of Para red and Sudan dyes in egg by a broad specific antibody based enzyme linked immunosorbent assay [J]. Food Control, 2011, 22(2): 1770–1775.
- [10] 苏小川, 黄梅, 甘宾宾, 等. 气相色谱-质谱联用法测定调味品中苏丹红 I II 色素[J]. 理化检验-化学分册, 2006, 42(12): 1003–1006.
- Su XC, Huang M, Gan BB, et al. GC-MS determination of the pigments Sudan and Sudan in some flavourings [J]. Phy Test Chem Anal Part B: Chem Anal, 2006, 42(12): 1003–1006.
- [11] Javorsek D, Kovac F, Gorensenek M. HPLC analysis of monofluoro-s-triazine dye during the dyeing process [J]. Am J Anal Chem, 2014, 5: 215–224.
- [12] Ertas E, Ozer H, Alasalvar C. A rapid HPLC method for determination of sudan dyes and para red in red chilli pepper [J]. Food Chem, 2007, 2(105): 756–760.
- [13] Khanavi M, Hajimahmoodi M, Ranjbar AM. Development of a green chromatographic method for simultaneous determination of food colorants[J]. Food Anal Method, 2012, 5: 408–415.
- [14] Cornet V, Govaert Y, Moens G, et al. Development of a fast analytical method for the determination of sudan dyes in chilli and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography photo-diode array detection [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 639–644.
- [15] Ma M, Luo X, Chen B, et al. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diodearraydetection-electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatography A, 2006, 1103: 170–176.
- [16] 路勇, 渠岩, 冯楠, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法快速筛查食品中 45 种工业染料[J]. 食品科学, 2012, 33(06): 176–180.
- Lu Y, Qu Y, Feng N, et al. Rapid Screening of 45 industrial dyes in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Food Sci, 2012, 33(06): 176–180.
- [17] 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, 11(39): 1670–1675.
- Cao P, Qiao XG, Lou XS, et al. Simultaneous determination of 6 industrial dyes in foods by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2011, 11(39): 1670–1675.
- [18] 侯晓林, 孙英健, 吴国娟, 等. 基质固相分散术-UPLC 法检测禽蛋中的对位红和苏丹红[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 285–288.
- Hou XL, Sun YJ, Wu GJ, et al. Use of solid-phase dispersive and ultra performance liquid chromatography for determination of para red and sudan - in egg yolk. [J]. Food Sci, 2010, 31(24): 285–288.
- [19] Calbiani F, Careri M, Elviri L, et al. Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sudan I, sudan II, sudan III and sudan IV in hot chilli products [J]. J Chromatogr A, 2004, 1042: 123–130.
- [20] Calbiani F, Careri M, Elviri L, 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.
- [21] Zhu Y, Zhao B, Xiao R, et al. Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure [J]. Food Chem, 2014, 145(15): 956–962.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



路杨, 主管技师, 主要研究方向为食品检测技术。

E-mail: lyxyx00357@163.com



常凤启, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与卫生检验。

E-mail: yanglinxin241@163.com