

# 高效液相色谱法测定食品中的碱性橙染料

戚美静<sup>1\*</sup>, 杨冀艳<sup>1</sup>, 朱昌磊<sup>2</sup>, 姚凌峰<sup>1</sup>, 洪春苗<sup>1</sup>

(1. 通标标准技术服务(天津)有限公司, 天津 300457; 2. 通标标准技术服务青岛分公司, 青岛 266101)

**摘要:** **目的** 采用高效液相色谱法测定食品中非法色素添加剂的碱性橙染料即碱性橙 2(chrysoidine G, CDG)、碱性橙 21(orange G, AOG)及碱性橙 22(astrazon orange R, AOR)。**方法** 样品经乙腈:水:氨水(60:40:0.5, V:V:V)在 25 °C 下超声提取 30 min, 以 0.02 mol/L 的乙酸铵溶液(pH 为 5)和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用 Agilent XDB C<sub>18</sub> 色谱柱进行分离, 用二极管阵列检测器在 449 nm 波长处检测 CDG, 在 485 nm 波长处检测 AOG 及 AOR, 以外标峰面积法定量。**结果** 3 种碱性橙染料在 0.01~0.2 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 方法回收率为 80.0%~94.0%, 相对标准偏差均小于 2%(n=6), 方法的检出限为 0.1 mg/kg。**结论** 本方法操作简便准确, 可适用于腐竹、干辣椒和辣椒油等不同基质样品中碱性橙的检测。

**关键词:** 高效液相色谱法; 碱性橙染料; 食品; 色素

## Determination of basic orange dyes in food by high performance liquid chromatography

QI Mei-Jing<sup>1\*</sup>, YANG Ji-Yan<sup>1</sup>, ZHU Chang-Lei<sup>2</sup>, YAO Ling-Feng<sup>1</sup>, HONG Chun-Miao<sup>1</sup>

(1. SGS-CSTC Standards Technical Services (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 2. SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd., Qingdao Branch, Qingdao 266101, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 3 kinds of basic orange dyes by high performance liquid chromatography(HPLC), including chrysoidine G (CDG), astrazon orange G (AOG) and astrazon orange R (AOR). **Methods** Samples were extracted with ultrasonic for 30 min by acetonitrile: water: ammonium hydroxide (60:40:0.5, V:V:V) at 25 °C. Ammonium acetate (0.02 mol/L, pH=5) and acetonitrile were used as mobile phase for gradient elution, an Agilent XDB C<sub>18</sub> column was used for separation, and diode array detector was used for the determination of CDG at 449 nm and AOG and AOR at 485 nm with external standard method for quantification. **Results** Three kinds of basic orange dyes had good linear relationships in the range of 0.01~0.2 mg/L. The average recoveries were 80%~94% and the relative standard deviations were less than 2% (n=6). The detection limits of the method were 0.1 mg/kg. **Conclusion** The method is simple and accurate, which is suitable for the determination of basic orange dyes in yuba, dry chili and chili oil.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography; basic orange dyes; food; dyes

## 1 引言

碱性橙是一类偶氮类碱性工业染料, 主要添加于木

制品、纺织品和皮革等制品中进行染色<sup>[1]</sup>, 已经被认定为是一类具有致癌性的物质<sup>[2]</sup>, 因此严禁加入到与人体直接接触的纺织品和服装产品中<sup>[3]</sup>。一些不法商贩发现碱性橙

\*通讯作者: 戚美静, 助理工程师, 主要研究方向为化学分析。E-mail: qmj07huayi@126.com

\*Corresponding author: QI Mei-Jing, Assistant Engineer, SGS-CSTC Standards Technical Services (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China. E-mail: qmj07huayi@126.com

与其他水溶性染料如柠檬黄、日落黄等相比,更易于在食品中上色且不易褪去,因此,碱性橙常被用于黄鱼、辣椒和豆制品的染色,染色后的商品颜色鲜亮更易于销售,但这严重侵害了消费者的权益和身体健康。目前碱性橙已被列为非法食品添加剂的禁止用于食品有害物质。

非法添加到食品中的碱性橙染料主要有3种,包括碱性橙2(chrysoidine G, CDG)、碱性橙21(orange G, AOG)及碱性橙22(astrazon orange R, AOR)。目前主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和超高效液相色谱-串联质谱法<sup>[4-14]</sup>等检测方法,因高效液相色谱法相对于液质联用法在仪器价格上有较大优势,所以被普遍推广使用。在食品检测领域,国家标准主要是GB/T 23496-2009《食品中禁用物质的检测 碱性橙染料 高效液相色谱法》<sup>[15]</sup>,该方法操作时间长、过程易损失,对于某些食品如辣椒、辣椒油检测回收率不好。本研究主要针对腐竹、干辣椒和辣椒油3种基质进行实验,应用高效液相色谱法进行检测,建立简易、准确、快速的测定食品中碱性橙含量的方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

辣椒油、腐竹和干辣椒等固体样品均购自本地超市和市场,用料理机粉碎,混匀后备用。

### 2.2 仪器与试剂

乙腈、乙酸铵(色谱纯,迪马公司);氨水(分析纯,北方天农公司);标准品碱性橙2、碱性橙21、碱性橙22(纯度>99%,美国Sigma公司)。

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);冷冻高速离心机(Eppendorf 公司);涡旋混合器(上海青浦浦西仪器厂);超声波萃取仪(CREST 公司);涡旋振荡器(上海精宏公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 标准溶液的配制

1.0 g/L 标准储备液:准确称取碱性橙2、碱性橙21和碱性橙各10 mg,用甲醇溶解并定容至10 mL;

10 mg/L 标准中间溶液:取储备液100  $\mu$ L,用流动相定容至10 mL;

标准工作溶液:将标准中间溶液用流动相逐级稀释,配制成浓度为0.01、0.02、0.05、0.1和0.2 mg/L的标准工作液,现用现配。

提取液:乙腈:水:氨水=60:40:0.5(V:V:V),超声混匀。

#### 2.3.2 样品前处理

##### (1)腐竹和干辣椒

称2.5 g混匀的样品,加25 mL提取液,超声30 min,以4000 r/min离心10 min,过0.45  $\mu$ m滤膜,待测。

##### (2)辣椒油

称2.5 g混匀的样品,加10 mL正己烷涡旋混匀,再加25 mL提取液,振荡提取30 min,以4000 r/min离心10 min,过0.45  $\mu$ m滤膜,取下层清液测试。

#### 2.3.3 仪器条件

Agilent XDB C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m);流动相:A:0.02 mol/L乙酸铵溶液(以甲酸调节pH值至5.0);B:乙腈;流速:1.0 mL/min;柱温:30  $^{\circ}$ C;检测波长:碱性橙2:449 nm;碱性橙21、碱性橙22:485 nm。进样量:100  $\mu$ L。检测器:二极管阵列检测器;流动相梯度洗脱程序见表1。

## 3 结果与分析

### 3.1 流动相 pH 的选择

若不调节流动相A的pH,直接用C<sub>18</sub>的柱子测定,碱性橙21、碱性橙2的保留时间比较接近,会互相干扰(见图1~2)。通过降低流动相的pH值大大改变了碱性橙21的保留时间,使碱性橙21和碱性橙2色谱峰完全分开(见图3~4),而对于碱性橙22几乎无太大影响;同时降低流动相的pH值还有利于改善碱性橙的峰形。进样时碱性的提取液进入色谱柱会降低C<sub>18</sub>柱的使用寿命,故采用酸性的流动相,但pH太低也会影响色谱柱的使用寿命。本研究将乙酸铵的pH调至5,可满足实验要求。

### 3.2 提取试剂的选择

碱性橙易溶于极性强的醇溶剂,微溶于丙酮,不易溶于苯等极性较弱的试剂。经实验,采用GB/T 23496-2009《食品中禁用物质的检测 碱性橙染料 高效液相色谱法》<sup>[15]</sup>中乙醇提取3种碱性橙的回收率均在65%以下;此方法操作时间长,待测物易损失,故考虑用其他提取试剂代替。

碱性橙2的回收率比其他2种碱性橙相对偏低,故选择含有具有代表性的碱性橙2的腐竹、干辣椒和辣椒油3种基质的样品,分别采用2.3.2方法提取碱性橙,结果见表2。

从表2可以看出,选用不同的提取试剂提取腐竹、干辣椒、辣椒油中碱性橙染料,结果差异很大,选用0.5%氨水-60%乙腈水溶液提取腐竹和干辣椒中碱性橙的效果最好,选用0.5%氨水-正己烷饱和的60%乙腈水溶液提取辣椒油效果最好。

### 3.3 提取温度和时间的选择

分别选用25  $^{\circ}$ C和50  $^{\circ}$ C对样品中碱性橙提取效率进行分析(见图5),采用超声30 min。结果表明,采用同一超声时间,温度的变化对于碱性橙的回收率基本无影响;之后又选定超声温度25  $^{\circ}$ C,分别选用10、30和60 min分别测定(见图6),提取效率随时间的延长明显提高,但时间为30 min和60 min时,提取效率无明显变化,故选用25  $^{\circ}$ C、30 min作为常用提取条件。但当有固体油状物等样品基质时,可以考虑选用50  $^{\circ}$ C先将其溶解,再进行后续测定。

表 1 流动相梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient program of mobile phase

时间/min	0	3	16	18	18.1	20
A/%	60	60	5	5	60	60
B/%	40	40	95	95	40	40

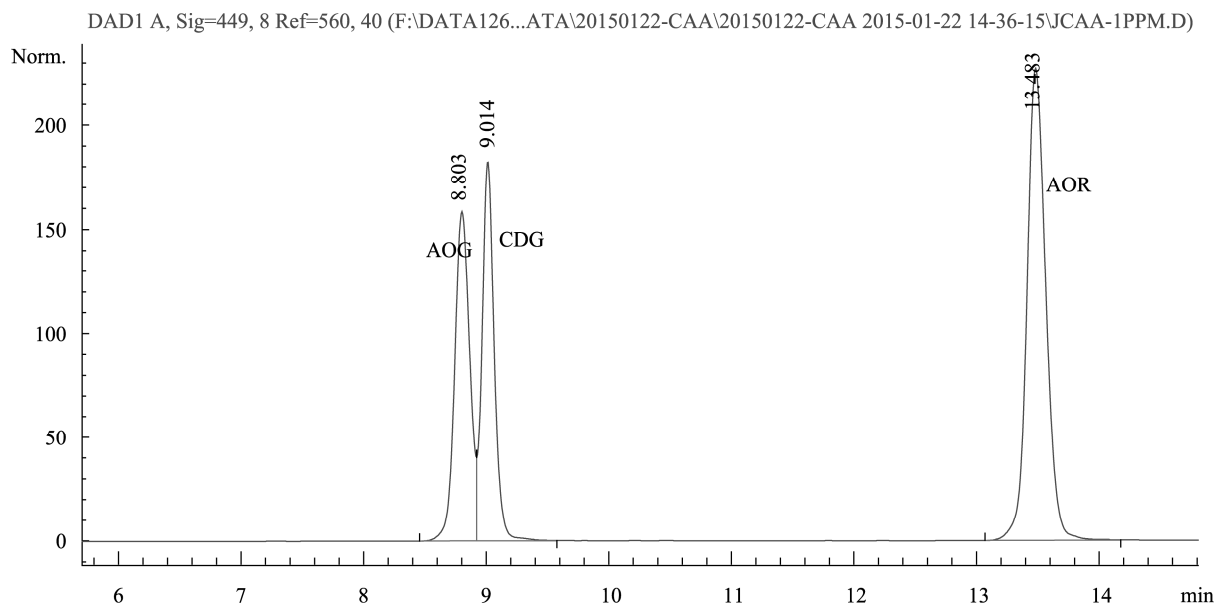


图 1 碱性橙 2 标准物质的色谱图(波长 449 nm)  
Fig. 1 Chromatogram of standard CDG (wavelength of 449 nm)

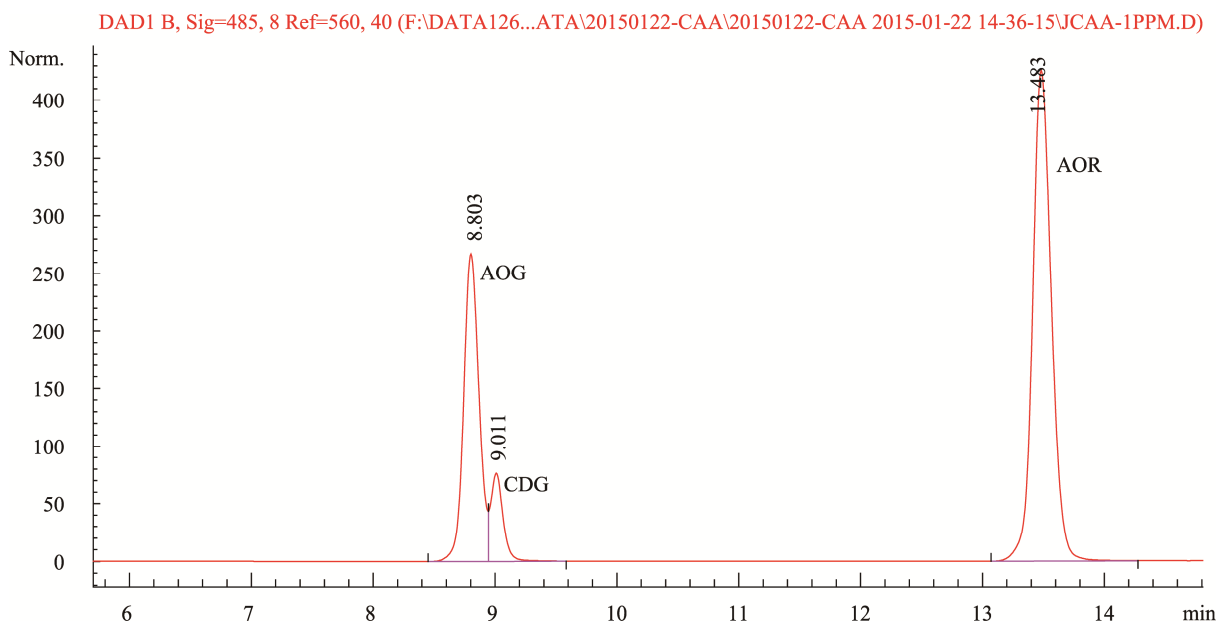


图 2 碱性橙 21 和碱性橙 22 标准物质的色谱图(波长 485nm)  
Fig. 2 Chromatogram of standard AOG and AOR (wavelength of 485 nm)

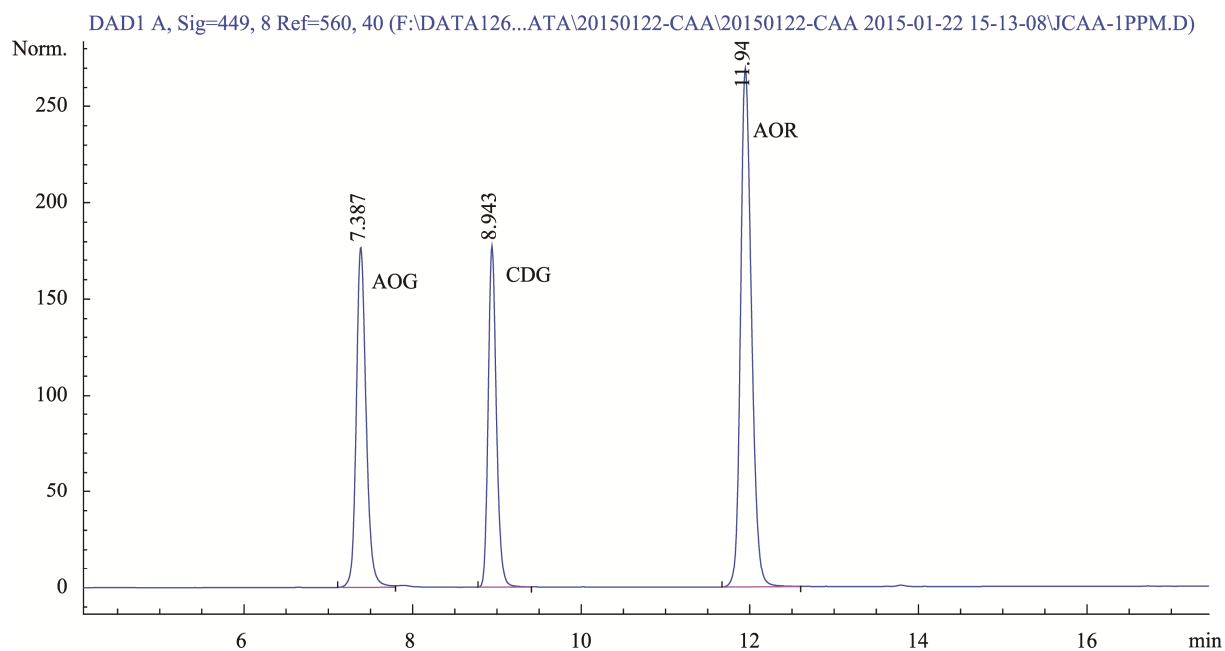


图3 碱性橙2标准物质的色谱图(波长449 nm, pH=5)  
Fig. 3 Chromatogram of standard CDG (wavelength of 449 nm, pH=5)

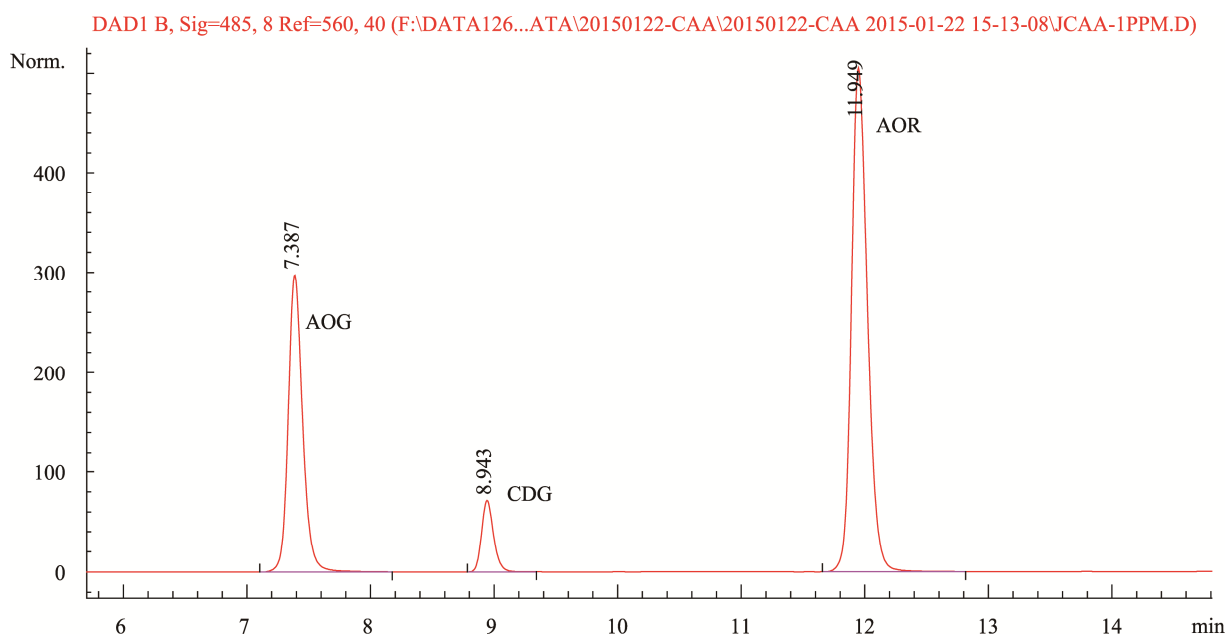


图4 碱性橙21和碱性橙22标准物质的色谱图(波长485 nm, pH=5)  
Fig.4 Chromatogram of standard AOG and AOR (wavelength of 485 nm, pH=5)

表2 不同提取剂提取3种基质中碱性橙2的含量结果(n=3)

Table 2 Results of CDG in 3 kinds of matrix extracted by different extracting agents (n=3) 单位: mg/kg

样品类型 \ 提取液	乙醇	60%乙腈水溶液	0.5%甲酸-60%乙腈水溶液	0.5%氨水-60%乙腈水溶液	0.5%氨水-60%乙腈水溶液+正己烷
腐竹	8.2	60.5	10.5	76.5	/
干辣椒	4.3	40.6	0	45.8	/
辣椒油	11.5	5.2	0	63.6	94.8

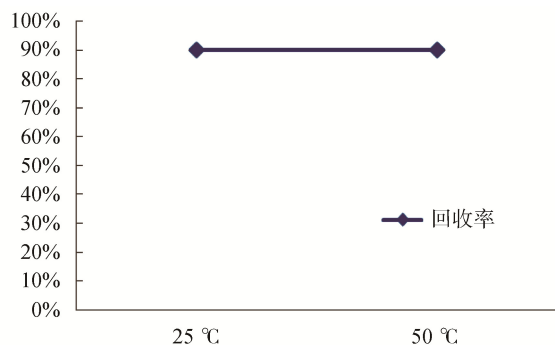


图 5 提取温度对回收率的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on recovery rate

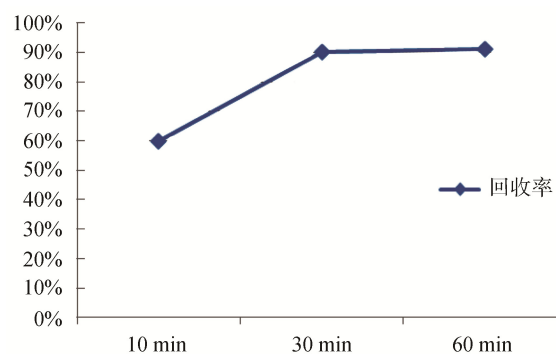


图 6 超声时间对回收率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic time on recovery rate

表 3 线性回归方程、相关系数及检出限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients and limits of detection

碱性橙	线性回归方程	相关系数	检出限(mg/kg)
碱性橙 21	$Y=2339.245X-1.8824$	0.99994	0.1
碱性橙 2	$Y=1228.436X-0.4789$	0.99993	0.1
碱性橙 22	$Y=4549.030X-1.2589$	0.99990	0.1

表 4 回收率结果(n=6)

Table 4 Results of recoveries (n=6)

样品基质	碱性橙	添加浓度(0.01 mg/L)	测定浓度(0.01 mg/L)	回收率(%)	RSD/%
腐竹	碱性橙 21	0.01	0.0090	90.0	1.5
	碱性橙 2	0.01	0.0094	94.0	1.8
	碱性橙 22	0.01	0.0086	86.0	0.9
干辣椒	碱性橙 21	0.01	0.0090	90.0	1.6
	碱性橙 2	0.01	0.0080	80.0	1.2
	碱性橙 22	0.01	0.0082	82.0	0.89
辣椒油	碱性橙 21	0.01	0.0085	85.0	1.4
	碱性橙 2	0.01	0.0081	81.0	1.2
	碱性橙 22	0.01	0.0081	81.0	0.87

### 3.4 线性关系及检出限

对碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22 等 3 种碱性橙混合溶液系列进行测定, 在 0.01~0.2 mg/L 浓度范围内峰面积与溶液浓度之间呈一定的线性关系; 以信噪比为 3(S/N=3) 计算检出限, 结果见表 3。

### 3.5 回收率实验

按照试验方法对基底浓度分别为 0 的腐竹、干辣椒及辣椒油分别进行测定, 同时做加标回收实验, 结果见表 4。

## 4 结 论

本研究采用高效液相色谱法对腐竹、干辣椒和辣椒油

3 类样品测定违禁添加色素碱性橙的含量, 3 种碱性橙染料在 0.01~0.2 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 方法回收率为 80%~94%。该方法可适用于腐竹、干辣椒和辣椒油等基质样品中碱性橙染料的检测, 同时具有操作过程简单、快速等优点。

### 参考文献

- [1] 何海兰. 精细化工产品手册: 染料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. He HL. Fine chemical product manuals: dye [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [2] 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所. 车间空气监测检验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990. Chinese academy of sciences institute of labor hygiene and occupational

- disease preventive medicine. Workshop air monitoring inspection method [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1990.
- [3] 杨琳,陈青俊,丁献荣,等. 高效液相色谱法测定食品中3种碱性橙含量[J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47: 768-770.  
Yang L, Chen QJ, Ding XR, *et al.* High performance liquid chromatography determination of three kinds of basic orange in the food [J]. Phys Testing Chem Anal Part B: Chem Anal, 2011, 47: 768-770.
- [4] 铁晓威, 黄百芬, 任一平. RP-HPLC 法测定染色黄鱼中的碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59-60.  
Tie XW, Huang BF, Ren YP. RP - HPLC method for determination of alkali content of orange in dyed yellow croaker [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, 14(1): 59-60.
- [5] 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. High performance liquid chromatography and determination of alkaline orange in soy products and basic flavine O dye [J]. Chin J Chromatogr, 2007, 25(5): 776-777.
- [6] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙、玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202-204.  
Gu Y, Cui SL, Zhou Y, *et al.* High-performance liquid chromatography (HPLC) determination of alkali content of orange, rose essence in chili powder [J]. Anal Tech Instrum, 2006, 12(4): 202-204.
- [7] 罗美中, 李碧芳, 何小青. 高效液相色谱-二极阵列法测定豆制品中碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品工业科技, 2005, (8):166-170.  
Luo MZ, Li BF, He XQ. High performance liquid chromatography with diode array method for determining the content of basic flavine O in soy products [J]. Food Ind Sci Technol, 2005, (8): 166-170.
- [8] 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, (5): 230-232.  
Gao J, Yin F, He GL, *et al.* High performance liquid chromatography determination of the basic flavine O soy products [J]. Chin J Anal Lab, 2008, (5): 230-232.
- [9] 夏立娅, 匡林鹤, 吴广臣. 改进的高效液相色谱梯度洗脱测定食品中碱性橙含量[J]. 食品工业科技, 2009, (1): 304-306.  
Xia LY, Kuang LH, Wu GC. The improved HPLC gradient elution of alkali content of orange in the food [J]. Food Ind Sci Technol, 2009, (1): 304-306.
- [10] 郑小严. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 409-413.  
Zheng XY. Ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry determination of alkaline orange in food at the same time, basic flavine O and alkaline pink T [J]. J Anal Sci, 2009, 25(4): 409-413.
- [11] DB33/T 703-2008 食品和农产品多种碱性工业染料的测定 液相色谱-串联质谱法[S].  
DB33/T 703-2008 A variety of food and agricultural products, the determination of alkaline industrial dye Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [12] DB34/T 1107-2009 豆制品中碱性橙的测定 高效液相色谱法 [S].  
DB34/T 1107-2009 The determination of alkaline orange soya products High-performance liquid chromatography (HPLC) [S].
- [13] 曾宪远, 宁焕焱, 黄飞, 等. 超高效液相色谱质谱法同时测定麻辣豆制品中4种工业染料[J]. 中外食品工业月刊, 2014, (3): 39-40.  
Zeng XY, Ning HY, Huang F, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry determination of 4 kinds of industrial dye in spicy soy products at the same time [J]. Chin Foreign Food Ind Monthly, 2014, (3): 39-40.
- [14] 李娟, 丁晓明, 刘丹丹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测辣椒制品中4种工业染料[J]. 河南农业科学, 2014, 43(5): 130-133.  
Li J, Ding XM, Liu DD, *et al.* High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and detect 4 kinds of industrial dye in chilli products [J]. J Henan Agric Sci, 2014, 43(5): 130-133.
- [15] GB/T 23496-2009 食品安全国家标准 食品中禁用物质的检测碱性橙染料 高效液相色谱法[S].  
GB/T 23496-2009 National food safety standards-Banned substances in food detection of alkaline orange dye High performance liquid chromatography [S].

(责任编辑: 姚菲)

## 作者简介



戚美静, 助理工程师, 主要研究方向为化学分析。

E-mail: qmj07huayi@126.com