

固相萃取-超高效液相色谱法同时测定辣椒制品中 非法添加苏丹红染料

曹美萍, 朱 青, 徐 苗, 胡桂霞*

(上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

摘 要: 目的 建立固相萃取-超高效液相色谱法同时测定辣椒干、辣椒酱、辣椒油等辣椒制品中非法添加的 4 种苏丹红染料(苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV)的方法。**方法** 样品经正己烷超声提取, 提取液经 ProElut™SDH 苏丹红专用柱净化富集, 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm), 以 乙腈-水为流动相梯度洗脱分离, 二极管阵列检测器测定, 检测波长为 500 nm (苏丹红I、II、III)、520 nm (苏丹红IV), 利用保留时间和光谱图定性, 外标法定量。**结果** 苏丹红I~IV可在 6.5 min 内实现完全分离, 4 种目标物在 0.1~5.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(*r*)均大于 0.9999; 检出限为 8~15 μg/kg, 定量限为 26~48 μg/kg。在 0.05、0.3、1.5、4.0 mg/kg 的平均加标回收率为 84.4%~98.5%, 相对标准偏差为 0.3%~5.7% (*n*=6)。**结论** 该方法操作简便、准确、快速、灵敏、稳定, 易推广应用于常规实验室辣椒制品中非法添加苏丹红染料的检测。

关键词: 苏丹红; 固相萃取; 超高效液相色谱法; 辣椒制品; 非法添加

Simultaneous determination of Sudan dyes illegally added into chili products by solid-phase extraction-ultra performance liquid chromatography

CAO Mei-Ping, ZHU Qing, XU Miao, HU Gui-Xia*

(Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 4 kinds of Sudan red dyes (Sudan red I, Sudan red II, Sudan red III, Sudan red IV) illegally added into chili products by solid-phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted by ultrasound with n-hexane, purified and enriched with ProElut™SDH special extraction cartridge column. The chromatographic separation was performed on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm×100 mm, 3.5 μm) by gradient elution with water and acetonitrile as mobile phase. Sudan dyes were detected at the wavelength of 500 nm (Sudan I, II, III) and 520 nm (Sudan IV) by diode array detector. Retention time and spectra characterization were used for qualitative analysis, and external standard method was used for quantification. **Results** Sudan I-IV were separated completely in 6.5 min, the 4 kinds of targets had a good linear relationship in the range of 0.1–5.0 μg/mL, and the correlation coefficients (*r*) were all greater than 0.9999. The limits of detection were 8–15 μg/kg, and the limits of quantitation were 26–48 μg/kg. When the addition amount was 0.05, 0.3, 1.5 and 4.0 mg/kg, the average recovery rates were 84.4%–98.5%, with relative standard deviations of 0.3%–5.7% (*n*=6). **Conclusion** This method is

*通信作者: 胡桂霞, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品检测质量与安全。E-mail: xia19860302@163.com

*Corresponding author: HU Gui-Xia, Master, Technician, Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, No.1506, West of Ledu Road, Songjiang District, Shanghai 201600, China. E-mail: xia19860302@163.com

simple, accurate, rapid, sensitive and stable, and can be used for the analysis of Sudan dyes illegally added into chili products at routine laboratory.

KEY WORDS: Sudan dyes; solid-phase extraction; ultra performance liquid chromatography; chili products; illegally added

0 引 言

苏丹红是一类人工合成的亲脂性偶氮化合物, 包括苏丹红I、II、III和IV 4 种类型, 主要用于纺织品、皮革制品和木制品的染色。由于价格低廉、着色力强、稳定性好, 有时被非法用作食品着色剂^[1]。经毒理学研究表明, 苏丹红染料在人类肝细胞研究中显示可能致癌的特性, 国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将苏丹红归为三类致癌物, 其部分初级代谢物 4-氨基偶氮苯(4-aminoazobenzene)、邻-甲苯胺(ortho-toluidine)、邻-氨基偶氮甲苯(ortho-aminoazotoluole)等为二类致癌物, 1995 年欧盟各国已禁止其作为色素在食品中添加, 英国食品标准局(Food Standard Agency, FSA)就含有添加苏丹红色素的食品向消费者发出警告, 为此, 我国于 2005 年发布禁止将苏丹红作为食品添加剂使用的公告^[2]。2008 年, 卫生部等 9 部委集中开展了打击违法添加非食用物质食品专项整治活动, 并公布了可能被违法添加的非食用物质名单^[3], 其中就包括可能在辣椒粉、辣椒酱等辣椒制品中违法添加的苏丹红。因此, 建立准确、灵敏、快速和通用^[4]的辣椒制品中非法添加苏丹红染料检测方法对食品安全监管有着十分重要意义。

目前, 用于检测食品中苏丹红的方法包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[4-9]、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[10-12]、薄层色谱法^[13]、紫外分光光度法^[14]、极谱法^[15]、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[16-17]等。其中以液相色谱法应用最为广泛^[18-20], 中国和欧盟均颁布了相关检测方法^[21]。国标 GB/T 19681—2005《食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法》在实际应用中存在溶剂效应、层析柱填装烦琐、洗脱速度慢、分析时间长等问题^[7-8]。有文献报道称^[7,22-23], 在国标方法的基础上使用商品化氧化铝柱对苏丹红测定方法进行研究和优化, 由于氧化铝活度难以准确控制^[24-25], 活度低, 则吸附富集效果差; 活性太高, 则洗脱时间长, 消耗试剂多。不同厂家和不同批号氧化铝的活性也存在较大差异, 同一批次的氧化铝在储存过程中活度也会发生变化, 造成检测结果的稳定性和重复性较差。同时发现苏丹红I、II在氧化铝柱上保留较弱。优化后的方法仍存在前处理复杂、回收率不理想、杂质干扰、定性不准

确、分析时间长等不足, 无法满足大批量样品检测中准确、快速、稳定、易操作的需求。

鉴于此, 本研究使用 ProElut™SDH 苏丹红专用柱, 探索一种操作过程简单、溶剂消耗少、检测效率高, 可有效去除辣椒制品中天然色素干扰, 并有效去除脂类物质的前处理方法。通过前处理方法研究和色谱条件优化, 以期建立快速、灵敏、准确、稳定, 可应用推广于一般实验室的辣椒制品中苏丹红染料的检测方法, 为其他食品中苏丹红染料的检测和国标检测方法优化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司); Mettler Toledo MS 1003TS 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Turbo VapLV 浓缩氮吹仪(瑞典 Biotage 公司); WAT200609 真空固相萃取装置(美国 Waters 公司); Eppendorf Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); SK8200GT 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); KS501digital 摇床(德国 IKA 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm, 美国 Agilent 公司); CORTECS C₁₈ 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 2.7 μm, 美国 Waters 公司)。

苏丹红I(纯度>98%)、苏丹红III(纯度>94%)、苏丹红IV(纯度>99%)(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 苏丹红II(纯度≥90%, 北京坛墨质检科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 正己烷(HPLC 级)、MIP-SDR 苏丹红分子印迹柱、BOND Si 硅胶固相萃取柱(500 mg/6 mL)(上海安谱实验科技股份有限公司); 乙酸乙酯(HPLC 级, 美国 TEDIA 公司); 甲基叔丁基醚(色谱级, 上海 Aladdin 公司); 无水硫酸钠(分析纯, 使用前烘干, 上海凌峰化学试剂有限公司); ProElut SDH 6 mL 苏丹红检测专用柱(天津迪马科技有限公司); 超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

样品: 辣椒干、辣椒酱、辣椒油分别为本地超市、农贸市场和国内网络销售。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取苏丹红I~IV标准品 20 mg, 用少量二氯甲烷溶解后用乙腈定量转移至 100 mL 容量瓶, 混匀, 配制

成质量浓度为 0.2 mg/mL 的标准储备溶液, -20 °C 冰箱保存。

临用时, 分别精密吸取上述标准储备溶液 2.0 mL 置于 20 mL 容量瓶中, 用 40% 甲基叔丁基醚: 甲醇(V:V) 定量稀释至刻度, 配制成苏丹红 I~IV 质量浓度均为 20 μ g/mL 混合标准工作液, 分别精密吸取该混合标准工作液适量, 用 40% 甲基叔丁基醚: 甲醇(V:V) 稀释成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ g/mL 的系列待测物标准曲线溶液。

1.2.2 样品的提取

辣椒粉: 准确称取 2.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 精密加入 20.0 mL 正己烷, 振荡 10 min, 超声 10 min, 8000 r/min 离心 10 min, 待净化;

辣椒酱: 准确称取 2.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入 2 g 无水硫酸钠, 涡旋混匀 30 s, 精密加入 20.0 mL 正己烷, 振荡 10 min, 超声 10 min, 8000 r/min 离心 10 min, 待净化;

辣椒油: 准确称取 2.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入适量正己烷混匀后超声提取 10 min, 用正己烷定量转移至 20 mL 容量瓶, 混匀, 待净化。

1.2.3 样品的净化

①活化: 向 ProElut SDH 6 mL 苏丹红检测专用柱中加入 5 mL 正己烷, 浸润后缓慢过柱, 弃去流出液; ②上样: 精密吸取 5.00 mL 待净化液至已活化 ProElut SHD 专用柱中, 控制流速为 2~3 滴/s, 弃去流出液; ③淋洗: 依次加入 5 mL 正己烷, 5 mL 1% 乙酸乙酯: 正己烷(1:99, V:V) 淋洗小柱, 弃去淋洗液, 并负压抽干 5 min 以上; ④洗脱: 加入 5 mL 30% 乙酸乙酯: 正己烷(30:70, V:V), 浸润片刻后以 2~3 滴/s 流速过柱, 负压抽干 2 min 以上, 用 5 mL 30% 乙酸乙酯: 正己烷(30:70, V:V) 重复洗脱 1 次, 收集洗脱液于玻璃试管中; ⑤定容: 将洗脱液置于 40 °C 水浴中氮吹至干, 用 1.00 mL 40% 甲基叔丁基醚: 甲醇(40:60, V:V) 溶解残渣, 涡旋 30 s。此时溶液呈均相状态, 过 0.2 μ m 滤膜, 滤液待液相色谱测定。

1.3 仪器条件

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μ m); 流动相: A 为水, B 为乙腈, 梯度洗脱程序为 0~3 min, 85% B; 3~7 min, 85%~100% B; 7~13 min, 100% B; 13~13.01 min, 100%~85% B; 13.01~18 min, 85% B, 流速: 1.5 mL/min, 柱温: 40 °C, 样品室温度: 10 °C, 进样体积: 10 μ L, 检测波长: 500 nm (苏丹红 I、II、III)、520 nm (苏丹红 IV)。

2 结果与分析

2.1 检测条件的优化

2.1.1 色谱条件优化

国标方法流动相成分复杂, 配制烦琐且易引入误差, 结果稳定性和重复性不能充分保证, 且丙酮作为流动相长时间使用易导致柱效降低, 柱床塌陷^[26]。本研究分别考察

乙腈-水、乙腈-含 0.1% 乙酸的水溶液和甲醇-含 0.1% 甲酸的乙酸铵溶液 3 种流动相体系, 结果发现, 使用甲醇-含 0.1% 甲酸的乙酸铵溶液体系时灵敏度最优, 但在考察辣椒粉基质时存在较多杂质干扰, 分离洗脱时间长。使用乙腈-含 0.1% 乙酸的水溶液体系时分离度和灵敏度均接近于乙腈-水体系。综合考虑, 选用性能稳定、配制简单的乙腈-水作为流动相, 通过梯度洗脱方式, 苏丹红 I~IV 在 6.5 min 内洗脱完全, 同时达到杂质有效分离且峰型优异。

为达到快速检测目的, 考察了 CORTECS C₁₈ (50 mm×4.6 mm, 2.7 μ m) 和 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 3.5 μ m) 色谱柱对辣椒粉中 4 种苏丹红染料的分离效果, 发现使用 CORTECS C₁₈ (50 mm×4.6 mm, 2.7 μ m) 苏丹红 I、III、IV 不能与杂质有效分离, 而使用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 3.5 μ m) 能有效分离辣椒制品中辣椒红素等天然成分, 苏丹红 I~IV 峰形优异且灵敏度更高。因此选择 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 3.5 μ m) 色谱柱。

2.1.2 光谱特征和检测波长的选择

为考察检测波长对化合物的检测灵敏度和杂质干扰的影响, 取质量浓度均为 5 μ g/mL 苏丹红 I~IV 混合标准溶液按 1.3 条件进行色谱分离, 二极管阵列检测器采集 210~620 nm 波长紫外光谱图。从 4 种化合物的光谱图中发现, 苏丹红 I~IV 最大吸收波长分别为 480、500、500、520 nm。经对样品基质考察, 辣椒制品经 ProElut SHD 专用柱净化后, 480 nm 下苏丹红 I 保留时间处和 500 nm 下苏丹红 IV 保留时间处均有杂质干扰, 影响低浓度结果可靠性。结合苏丹红 I~IV 的紫外光谱图, 选择 500 nm 为苏丹红 I、II、III 的检测波长, 520 nm 为苏丹红 IV 的检测波长, 在优化条件下, 苏丹红 I~IV 混合标准溶液色谱图如图 1 所示, 可见各峰形区分度良好。

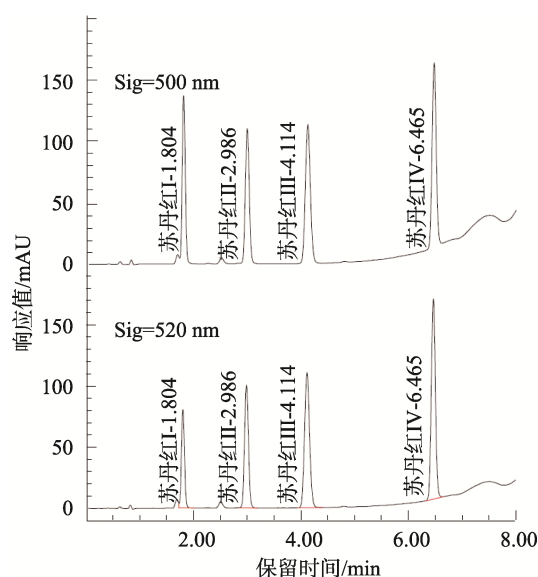


图1 苏丹红 I~IV 标准溶液色谱图(5 μ g/mL)

Fig.1 Chromatograms of standard solutions of Sudan I-IV (5 μ g/mL)

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取条件的考察

苏丹红为脂溶性染料, 有较强的疏水性, 根据其化学性质, 可用于提取的溶剂主要有乙腈、正己烷、丙酮和二氯甲烷等。本研究中, 正己烷是固相萃取净化上样溶剂, 采用正己烷提取有利于加快上样速率, 考察了正己烷提取辣椒制品中苏丹红的提取效率, 结果显示苏丹红I~IV的回收率均在 94%以上。由于乙腈对油脂的溶解度较小, 可有效降低油脂对苏丹红吸附活性的影响, 本研究考察了乙腈作为溶剂提取辣椒油中苏丹红的提取效果, 发现乙腈的提取效率明显低于正己烷, 为保证回收率需反复提取, 且乙腈沸点较高提取后溶剂置换耗时长、操作烦琐。对比正己烷、乙腈对辣椒油中苏丹红染料的提取效果, 结果如图 2 所示, 正己烷提取苏丹红的回收率明显高于乙腈。重复性实验考察结果也显示正己烷提取时稳定性更好。基于正己烷有较高的提取效率, 且有效简化操作步骤, 缩短分析时间, 因此本研究选择正己烷作为提取溶剂。

为进一步比较不同提取方式对结果影响, 本研究采用一次振荡超声提取, 反复多次超声提取和长时间浸泡后超声提取 3 种不同方式提取辣椒制品中苏丹红染料, 结果表明, 振荡 10 min 后超声 10 min, 苏丹红I~IV回收率均达到 91%以上, 随着提取次数增加和冷浸时间延长, 苏丹红I~IV回收率基本无提高, 且杂质干扰明显增加。

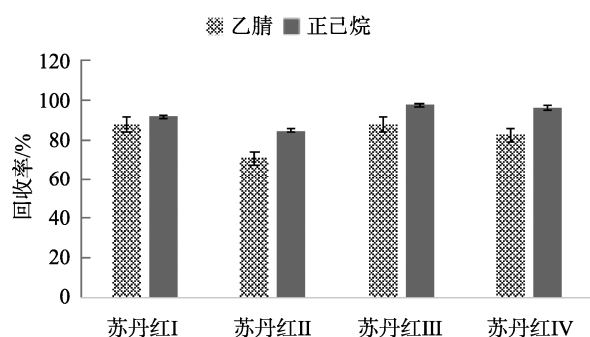


图 2 不同提取溶剂对辣椒油加标样品中苏丹红I~IV提取效率的影响($n=3$)

Fig.2 Influence of different extraction solvents on extraction efficiency of Sudan I-IV added into capsicol ($n=3$)

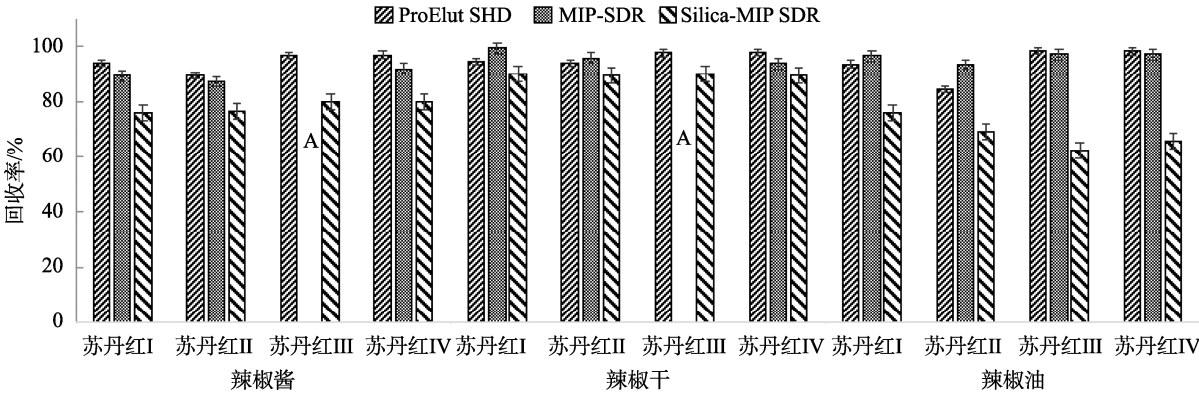
2.2.2 净化固相萃取柱的选择

辣椒制品中含有大量天然色素和脂肪, 且提取溶剂一定程度稀释了目标化合物, 为达到高灵敏度要求, 必须对提取液进行净化和富集, 目前用于检测苏丹红染料的净化方式主要有通用型固相萃取(solid-phase extraction, SPE)柱、凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)^[5,25,27]和苏丹红专用柱^[8,28-30]。GPC 可有效去除色素、油脂等大分子杂质, 但是操作复杂, 消耗试剂量大, 检测通量低耗时

长。此外, 使用通用型固相萃取柱净化苏丹红时回收率偏低^[24]。本研究采用几种商品化苏丹红专用柱, 考察了 MIP-SDR 苏丹红分子印迹柱、ProElut SHD 苏丹红专用柱、改良硅胶-分子印迹柱 3 种固相萃取净化方式对辣椒制品的净化效果, 并进一步优化了净化过程中的关键步骤。在辣椒制品中添加 4.0 mg/kg 苏丹红I~IV, 按照 1.2.2 提取后, 分别使用 3 种净化柱净化富集, 加标回收结果见图 3。辣椒酱空白样品使用 3 种不同净化柱的色谱图见图 4。实验结果表明, 使用 MIP-SDR 苏丹红专用柱净化辣椒油时, 苏丹红I~IV回收率最优, 其对高油脂样品回收率稳定, 但是针对辣椒干、辣椒酱等深色样品去杂不完全, 在苏丹红III保留时间有较大杂质干扰, 其适用于高脂淡色样品。采用改良分子印迹柱净化样品, 可以解决天然成分杂质干扰问题, 但是因硅胶柱同时吸附杂质、脂肪和苏丹红染料, 解析时苏丹红和脂肪共流出, 净化富集辣椒油及辣椒酱等含油样品时, 脱脂不完全, 回收率偏低, 故改良分子印迹柱适用于低脂深色样品如辣椒粉样品测定(回收率 $\geq 90\%$)。ProElut SHD 苏丹红专用柱在不同基质的辣椒制品中苏丹红I~IV均保持较好的回收率和重现性, 净化富集效果较理想。ProElut SDH 苏丹红专用柱利用混合填料吸附原理, 上层为混合模式阴离子交换填料, 通过非极性、极性及离子交换相互作用吸附油脂中脂肪酸酯、脂肪酸等杂质, 下层为弱阳离子交换填料, 通过极性、离子交换作用力吸附苏丹红化合物, 且在混合作用力下去除辣椒红素等天然成分干扰, 同时解决深色样品杂质干扰、高油脂样品影响吸附的技术难点, 因此适用于大部分食品的前处理。

2.2.3 净化富集关键点的考察

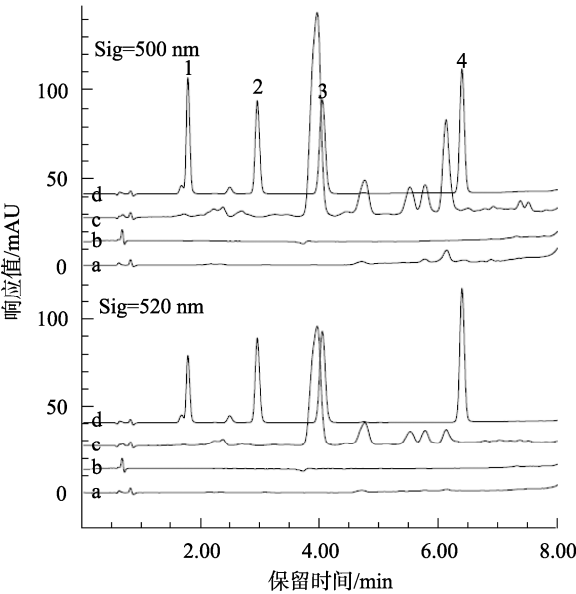
解吸液是影响苏丹红回收率的重要因素, 本研究采用乙酸乙酯和正己烷混合溶剂进行解吸, 通过改变乙酸乙酯的体积分数, 考察其对苏丹红回收率的影响, 结果如图 5 所示, 随着解析液中乙酸乙酯含量增加, 苏丹红I~IV的回收率均呈现先上升后稳定的变化趋势。乙酸乙酯体积分数较高($\geq 50\%$)时, 辣椒制品中天然色素共流出, 干扰苏丹红III色谱峰, 且在苏丹红IV保留时间处杂质更多, 使用含 30%乙酸乙酯的正己烷溶液解析时杂质干扰少, 苏丹红I~IV均有较好的回收率, 最终实验选择含 30%乙酸乙酯的正己烷溶液。实验还表明, 解析前淋洗溶液去除不完全, 苏丹红III、IV回收率明显降低($< 90\%$), 这是因为苏丹红III、IV含有 2 个-N=N-基团, 与弱阳离子交换柱上-COOH 基团离子交换作用力较强。整个固相萃取净化过程应控制上样和解吸流速, 解吸前需保证净化柱已完全抽干。此外开封后的固相萃取柱在储存过程中, 下层弱阳离子交换填料颜色变黄, 其活性降低, 影响净化效果, 若使用开封 60 d 后的 ProElut SHD 苏丹红专用柱净化辣椒粉样品, 对苏丹红III保留时间有较大杂质干扰。



注: A 有较大杂质干扰, 无法定量。

图 3 固相萃取柱对苏丹红I~IV平均回收率影响(n=3)

Fig.3 Effect of solid phase extraction columns on the average recoveries of Sudan I-IV (n=3)



注: 1. 苏丹红I; 2. 苏丹红II; 3. 苏丹红III; 4. 苏丹红IV。

a. ProElut SHD 苏丹红专用柱; b. Silica-MIP SDR 改进分子印迹柱; c. MIP-SDR 苏丹红分子印迹柱; d. 苏丹红I~IV标准溶液。

图 4 苏丹红I~IV标准溶液和 3 种固相萃取柱净化辣椒酱空白样品的色谱图

Fig.4 Chromatograms of Sudan I-IV and chilli paste samples after cleaning up by SPE columns

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系

在优化后的条件下, 采用保留时间和光谱图定性, 外标法定量对 1.2.1 配制的苏丹红I~IV系列标准曲线溶液 (0.1~5.0 $\mu\text{g/mL}$) 进行测定, 以各组分的质量浓度(X, $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积(Y, mAU)为纵坐标, 绘制标准曲线。由表 1 可知, 苏丹红I~IV在一定质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.9999。

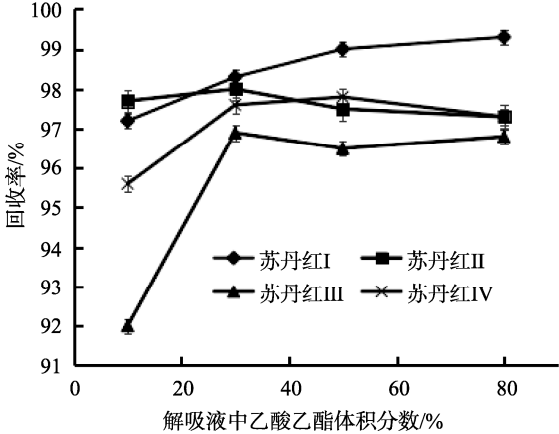


图 5 解吸液中 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 含量对回收率的影响(n=3)

Fig.5 Effect of percentage of $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ in eluent on extraction recoveries (n=3)

2.3.2 检出限和定量限

根据实际样品的基质干扰情况, 分别选取辣椒干、辣椒酱、辣椒油空白样品, 按 1.2.2 称取样品 2.0 g, 添加混合标准工作液适量, 按本方法进行前处理后, 上机测定, 以空白样品基质中 3 倍信噪比($S/N=3$)计算检出限(limit of detection, LOD), 10 倍信噪比($S/N=10$)计算定量限(limit of quantitation, LOQ)。结果显示, 辣椒干、辣椒酱、辣椒油中苏丹红I~IV的 LOD 为 0.008~0.015 mg/kg , LOQ 为 0.026~0.048 mg/kg (见表 1), 可知方法灵敏度较高。

2.3.3 准确度和精密度

选取辣椒干、辣椒酱、辣椒油空白样品作为加标回收实验基质, 按 1.2.2 称取样品 2.0 g, 分别在 0.05、0.3、1.5、4.0 mg/kg 的质量浓度水平进行加标回收实验($n=6$), 按照本方法进行前处理并测定, 方法的加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)如表 2 所示。对于辣椒粉样品, 苏丹红I~IV回收率为 91.1%~97.8%, RSD 为

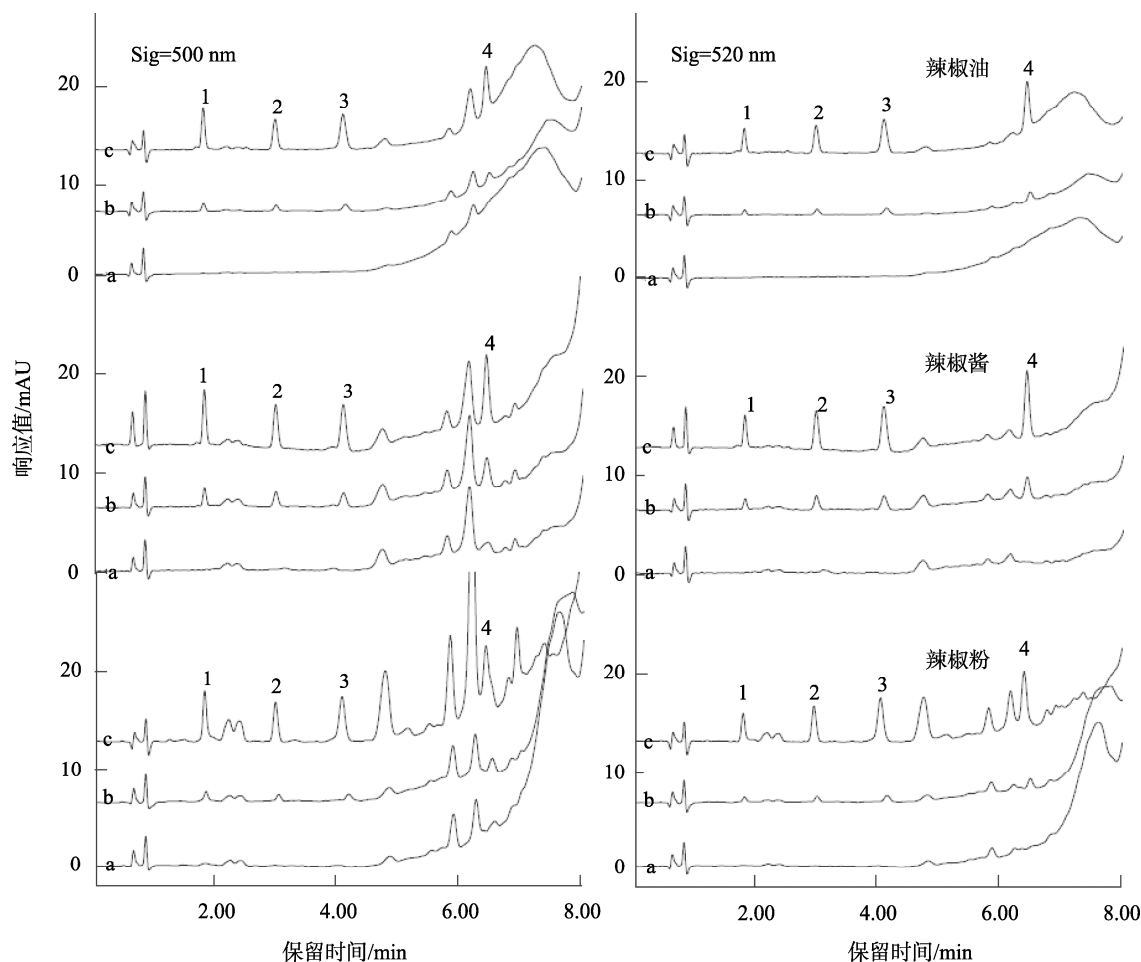
1.6%~4.0% ($n=6$), 对于辣椒酱样品, 回收率为 87.9%~97.1%, RSD 为 0.3%~3.4% ($n=6$), 对于辣椒油样品, 回收率为 84.4%~98.5%, RSD 为 1.0%~5.7% ($n=6$), 表明本方法具有较高的准确度和精密度。从表 2 结果发现, 基质中脂肪对苏丹红 I~IV 回收率有较大影响, 随着脂肪含量提高 4 种苏丹红染料回收率下降, 苏丹红 II 下降最明显, 采用本方法净化时应控制上样溶液中脂肪含量。辣椒制品的空白样品、定量限水平(0.05 mg/kg)加标样品及低浓度(0.30 mg/kg)加标样品的色谱图见图 6, 可看出在 3 种不同基质中苏丹红 I~IV 的峰形良好, 且在目标物保留时间处无杂峰干扰。

表 1 苏丹红 I~IV 的线性方程、相关系数、检出限及定量限
Table 1 Linear equations, correlation coefficients, detection limits and quantitation limits of Sudan I-IV

苏丹红染料	线性方程	相关系数(r)	LOD/(mg/kg)			LOQ/(mg/kg)		
			辣椒粉	辣椒酱	辣椒油	辣椒粉	辣椒酱	辣椒油
苏丹红 I	$Y=137.6X-0.2431$	0.99999	0.010	0.012	0.009	0.033	0.040	0.030
苏丹红 II	$Y=138.9X+0.4400$	0.99998	0.015	0.014	0.011	0.048	0.047	0.038
苏丹红 III	$Y=178.1X-0.9109$	0.99999	0.009	0.014	0.008	0.029	0.048	0.026
苏丹红 IV	$Y=214.5X-2.0315$	0.99998	0.013	0.009	0.010	0.043	0.030	0.031

表 2 辣椒制品中苏丹红 I~IV 的加标回收率与相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Recoveries and RSDs of Sudan I-IV in chilli products ($n=6$)

苏丹红染料	加标量/(mg/kg)	辣椒粉		辣椒酱		辣椒油	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
苏丹红 I	0.05	93.8	3.8	89.5	3.4	90.5	3.9
	0.3	97.3	1.6	92.6	3.1	91.1	3.6
	1.5	97.4	3.4	88.7	2.6	90.5	2.8
	4	94.7	2.7	93.9	0.6	93.7	2.4
苏丹红 II	0.05	92.1	3.5	88.7	1.8	84.8	5.4
	0.3	92.6	2.3	91.5	0.5	84.7	5.7
	1.5	92.3	3.3	87.9	2.4	84.9	3.9
	4	94.2	2.8	89.5	1.6	84.4	3.0
苏丹红 III	0.05	92.5	3.4	92.3	2.3	96.8	1.0
	0.3	91.4	1.8	90.4	1.9	97.6	1.2
	1.5	95.3	2.6	92.9	2.0	98.3	3.6
	4	97.7	2.5	96.8	1.2	98.5	1.4
苏丹红 IV	0.05	92.6	4.0	92.8	2.1	96.7	2.3
	0.3	91.1	3.4	95.9	0.3	94.5	2.7
	1.5	96.5	3.4	94.2	2.6	98.2	3.7
	4	97.8	2.1	97.1	1.0	98.3	1.6



注: 1. 苏丹红I; 2. 苏丹红II; 3. 苏丹红III; 4. 苏丹红IV。 a. 空白样品; b. 0.05 mg/kg 加标样品; c. 0.30 mg/kg 加标样品。

图6 辣椒制品空白样品和加标样品的色谱图

Fig.6 Chromatograms of blank sample and spiked samples of chilli products

2.4 实际样品测定

从本地超市、农贸市场和国内电商平台购得干辣椒、辣椒酱和辣椒油 10 件辣椒制品,按照本研究方法进行测定,结果均未检出苏丹红染料。同时,参加大连中食国实 CFAPA-609 辣椒酱中苏丹红测量审核,按照本研究方法测得结果为苏丹红I 0.0959 mg/kg、苏丹红II 0.189 mg/kg、苏丹红III 0.0105 mg/kg、苏丹红IV 0.0561 mg/kg,结果评价均满意。按照国标 GB/T 19681—2005 方法测定测量审核样品,杂质干扰明显,需调整色谱条件至 45 min 内完成洗脱,且苏丹红I、II的测得值明显低于测量审核公议值。

3 结论

针对基质复杂的深色高油脂辣椒制品,本研究采用复合填料的商品化专用固相萃取柱对辣椒制品中苏丹红 I~IV 进行富集净化,有效去除了辣椒制品中的大量天然色素和脂类物质,以乙腈-水为流动相的快速液相色谱法在

6.5 min 内有效分离 4 种化合物,采用二极管阵列检测器进行测定,利用光谱图和保留时间定性增加了方法的可靠性,建立了快速测定辣椒制品中 4 种苏丹红染料的分析方法。本方法简便、准确、快速、灵敏、稳定,可应用推广于常规实验室的辣椒制品非法添加苏丹红染料检测,为食品中违法添加禁用着色剂的监督检验提供了有力技术支撑。

参考文献

- [1] 王宏伟,刘素丽,赵梅,等.食品中非法添加工业染料危害的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,10(1):1-7.
WANG HW, LIU SL, ZHAO M, *et al.* Research progress on the harm of illegal addition of industrial dyes in food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 1-7.
- [2] 卫生部.关于禁止将苏丹红作为食品添加剂使用的公告.卫生部公告 2005 年第 5 号 [EB/OL]. [2005-04-04]. <http://www.nhc.gov.cn/bgt/pw10505/201212/cb79199f081c41d98917c58537092452.shtml> [2021-04-26].
Ministry of Health. Notice on banning the use of Sudan red as a food

- additive. No.5 Ministry of Health Announcement 2005 [EB/OL]. [2005-04-04]. <http://www.nhc.gov.cn/bgt/pw10505/201212/cb79199f081c41d98917c58537092452.shtml> [2021-04-26].
- [3] 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品种名单(第一批), 食品整治办(2008)3号 [EB/OL]. [2008-12-12]. http://www.gov.cn/gzdt/2008-12/15/content_1178408.htm [2021-02-03]. Ministry of Health. List of illegal addition of non-edible substances and abuse of food additives in food (Batch 1). Food Control Office (2008) No.3 [EB/OL]. [2008-12-12]. http://www.gov.cn/gzdt/2008-12/15/content_1178408.htm [2021-02-03].
- [4] KWEKU AJ, VIGIL A, KISSI BA, *et al.* Fast, easy, cheap, robust and safe method of analysis of Sudan dyes in chilli pepper powder [J]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05243.
- [5] 马育松, 李玮, 艾连峰, 等. 高效液相色谱/二极管阵列检测器同时测定辣椒及其制品中11种脂溶性着色剂[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(1): 93-97.
- MA YS, LI W, AI LF, *et al.* Simultaneous determination of 11 fat-soluble colorants in foodstuffs by HPLC/DAD [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(1): 93-97.
- [6] 张春玲, 蒲彦利, 王红波, 等. 高效液相色谱法测定薯片中9种工业染料[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(21): 3077-3079, 3101.
- ZHANG CL, PU YL, WANG HB, *et al.* Determination of 9 industrial dyes in chips by high performance liquid chromatography [J]. *J Chin Health Lab Technol*, 2017, 27(21): 3077-3079, 3101.
- [7] 詹克航, 时连. SPE-HPLC法测定辣椒及其制品中苏丹红色素含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(8): 1169-1171, 1174.
- ZHAN KH, SHI L. Detection of Sudan red colorants contents in chilli and pepper-based products by SPE-HPLC [J]. *J Chin Health Lab Technol*, 2015, 25(8): 1169-1171, 1174.
- [8] 于林, 孟冰冰, 杨桂玲. 辣椒制品中的苏丹红检测方法的优化[J]. *中国调味品*, 2014, 39(7): 123-125.
- YU L, MENG BB, YANG GL. Optimization of detection methods of sudan in chilli products [J]. *China Cond*, 2014, 39(7): 123-125.
- [9] 李吉平, 刘文森, 高宏伟, 等. HPLC紫外检测法测定辣椒制品中苏丹红I-IV号含量的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 332-336.
- LI JP, LIU WS, GAO HW, *et al.* Determination of Sudan I-IV in capsicum foods with UV detector and high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Food Sci*, 2007, 28(8): 332-336.
- [10] 刘正才, 杨方, 尹太坤, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中4种苏丹红染料残留量[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(2): 171-176.
- LIU ZC, YANG F, YIN TK, *et al.* Simultaneous determination of four Sudanred dyes residues in poultry eggs by solid-phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2015, 34(2): 171-176.
- [11] 刘畅, 迟秋池, 徐慧, 等. 凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱串联质谱法测定食品中9种偶氮类染料[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(6): 504-507.
- LIU C, CHI QC, XU H, *et al.* Determination of nine azo dye in food by HPLC-MS/MS after GPC clean-up [J]. *J Chin Health Lab Technol*, 2016, 26(6): 504-507.
- [12] 左晓磊, 韩爱云, 刘强, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中苏丹红的残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(2): 457-462.
- ZUO XL, HAN AY, LIU Q, *et al.* Determination of Sudan red residues in eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(2): 457-462.
- [13] 冯华, 王样培, 王世俊, 等. 辣椒粉中非法添加苏丹红色素快速检验分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(13): 3421-3426.
- FENG H, WANG XP, WANG SJ, *et al.* Rapid test and analysis of Sudan red illegally added into *Capsicum annuum* L. [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(13): 3421-3426.
- [14] 李锦城. 紫外可见分光光度法检测蛋黄中微量苏丹红IV[J]. *食品安全导刊*, 2019, (3): 60-61.
- LI JC. Simultaneous determination of Sudan IV in yolk by UV-Vis spectrophotometry [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2019, (3): 60-61.
- [15] 任乃林, 李红. 线性扫描极谱法测定辣椒粉中的苏丹红II[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 592-594.
- REN NL, LI H. Determination of SudanII in chilli powder with linear sweep polarography [J]. *Food Sci*, 2008, 29(12): 592-594.
- [16] 刘永波, 赵海峰, 张明霞. 超声波提取-气相色谱-质谱联用法测定苏丹红残留量[J]. *分析试验室*, 2006, 25(4): 86-88.
- LIU YB, ZHAO HF, ZHANG MX. Determination of Sudan I residue by ultrasonic extraction and GC-MS method [J]. *Chin J Anal Lab*, 2006, 25(4): 86-88.
- [17] 黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 等. GC-MS/SIM法同时测定食品中的苏丹红I-IV[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4): 1-5.
- HUANG XL, WU HQ, HUANG F, *et al.* Rapid determination of Sudan I-IV in food by GC-MS/SIM [J]. *J Instrum Anal*, 2005, 24(4): 1-5.
- [18] SRICHAROE N, LIMCHOO WONG N, TECHAWONGSTIEN S, *et al.* Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with salt-induced demulsification based on solidified floating organic drop prior to HPLC determination of Sudan dyes in chili products [J]. *Arab J Chem*, 2019, 12(8): 5223-5233.
- [19] SEBAEI AS, YOUSSEF MI, GHAZI AAM. Determination of seven illegal dyes in egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up [J]. *J Food Compos Anal*, 2019, 84: 103304.
- [20] IAMMARINO M, MENTANA A, CENTONZE D, *et al.* Simultaneous determination of twelve dyes in meat products: development and validation of an analytical method based on HPLC-UV-diode array detection [J]. *Food Chem*, 2019, 285: 1-9.
- [21] 曾婧. 欧盟法和国家标准对辣椒酱中苏丹红I号含量检测的比较[J]. *食品安全导刊*, 2017, (30): 77.
- ZENG J. The comparison of the method between EU standard and national standard in chilli paste of Sudan red I [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2017, (30): 77.
- [22] 朱永红, 李根容. 高效液相色谱法同时检测调味品中的苏丹红和对位红[J]. *中国调味品*, 2006, 12(12): 48-50, 56.
- ZHU YH, LI GR. Simultaneous determination of Sudan red and Para red dyes in condiments by high performance liquid chromatography [J]. *China Cond*, 2006, 12(12): 48-50, 56.
- [23] 杨春林, 李佳峻, 吴蔚, 等. 固相分散萃取-高效液相色谱法测定郫县豆瓣中四种苏丹红染料的研究[J]. *中国调味品*, 2012, 37(3): 95-100.
- YANG CL, LI JJ, WU W, *et al.* Determination of Sudan dyes in Pixian horsebean chilli paste by solid-phase dispersive extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. *J China Cond*, 2012, 37(3): 95-100.

- [24] 冯寅洁, 周小清, 乔勇升, 等. 三种专用固相萃取柱-高效液相色谱法检测食品中苏丹红含量[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 238–244.
FENG YJ, ZHOU XQ, QIAO YS, *et al.* Determination of Sudan dyes contents in foods by three special solid phase extraction cartridges coupled with high performance liquid chromatography [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(5): 238–244.
- [25] 倪炜华, 鲍晓瑾, 翁光灿, 等. GPC 净化高效液相色谱法测定辣椒粉中苏丹红[J]. 中国调味品, 2017, 42(3): 130–132.
NI WH, BAO XJ, WENG GC, *et al.* Determination of Sudan red in chilli powder after purification with GPC by HPLC [J]. China Cond, 2017, 42(3): 130–132.
- [26] 周金森, 龙军标, 刘赐敏, 等. SPE-HPLC 法测定辣椒粉中苏丹红 I–IV[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(10): 2411–2412, 2415.
ZHOU JS, LONG JB, LIU CM, *et al.* Determination of Sudan I–IV in spiked paprika by SPE-HPLC [J]. J Chin Health Lab Technol, 2011, 21(10): 2411–2412, 2415.
- [27] 宋欢, 连庚寅, 杜利君, 等. 凝胶渗透色谱-液相色谱法测定辣椒及其制品中对位红和苏丹红[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 611–613.
SONG H, LIAN GY, DU LJ, *et al.* Determination of Para red and Sudan red dyes in capsicum and capsicum products by high performance liquid chromatography with GPC [J]. Food Sci, 2006, 27(12): 611–613.
- [28] 程晓宏, 杨俊, 周楠, 等. 分子印迹固相萃取小柱-高效液相色谱法测定辣酱中 4 种苏丹红[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(11): 1336–1338.
CHENG XH, YANG J, ZHOU N, *et al.* Simultaneous determination of 4 kinds of Sudan red in chili sauce by molecular imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2017, 53(11): 1336–1338.
- [29] 胡思怡, 薛昆鹏, 周勇, 等. 改进分子印迹固相萃取-高效液相色谱法同时测定辣椒制品中 4 种苏丹红含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(2): 494–499.
HU SY, XUE KP, ZHOU Y, *et al.* Simultaneous determination of 4 kinds of Sudan red in chili products by improved molecular imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(2): 494–499.
- [30] 陈波. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定番茄酱中 4 种苏丹红染料[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(10): 152–154.
CHEN B. Simultaneous determination of four kinds of tonyred in ketchup by SPE-HPLC [J]. Chin J Biochem Pharm, 2016, 36(10): 152–154.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



曹美萍, 主管检验师, 主要研究方向为食品检验质量控制及管理。

E-mail: xiaomeicao@163.com



胡桂霞, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品检测质量与安全。

E-mail: xial9860302@163.com