

基于新型磁性固相萃取材料结合高效液相色谱法 检测食品中碱性橙 II 和柠檬黄

沈唐文¹, 张 毅¹, 严 恒^{2,3}, 谢卫红^{1*}

(1. 湖北工业大学生物工程与食品学院, 武汉 430068; 2. 湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 武汉 430075;
3. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 武汉 430075)

摘 要: **目的** 以 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}[\text{St-4-乙烯基吡啶}(4\text{-vinylpyridine}, 4\text{-VP})]$ 为磁性固相萃取材料, 建立高效液相色谱法测定腐竹中碱性橙 II 和苦荞茶中柠檬黄的分析方法。 **方法** 通过溶液 pH、吸附时间、吸附方式、吸附剂用量和材料组成配比 5 个因素, 优化了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对色素的最佳吸附条件。通过等温吸附实验探究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 的吸附模型。在优化的吸附条件下, 结合高效液相色谱法定量分析了腐竹中的碱性橙 II 和苦荞茶中的柠檬黄。 **结果** $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对色素的最佳吸附 pH: 碱性橙 II 为 pH 7.0, 柠檬黄为 pH 3.0; 最佳吸附时间、吸附方式、吸附剂用量和材料组成配比如分别为 5 min、振荡吸附、1.0 mg 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4-VP})=2:1 (m:m)$ 。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙 II 和柠檬黄的吸附过程均符合 Langmuir 等温吸附模型, 最大吸附载量分别为 116.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 183.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。将该材料应用于腐竹中碱性橙 II 和苦荞茶中柠檬黄的检测, 加标回收率为 94.26%~101.04%, 相对标准偏差为 1.12%~3.35% ($n=6$)。 **结论** $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙 II 和柠檬黄色素有较好的吸附性, 可快速将色素从样品中分离, 洗脱方便可回收, 可用于腐竹中碱性橙 II 和苦荞茶中柠檬黄的检测。

关键词: 磁性分散固相萃取; 4-乙烯基吡啶; 碱性橙 II; 柠檬黄; 腐竹; 苦荞茶; 高效液相色谱法

Determination of basic orange II and tartrazine in food based on a new magnetic solid phase extraction material combined with high performance liquid chromatography

SHEN Tang-Wen¹, ZHANG Yi¹, YAN Heng^{2,3}, XIE Wei-Hong^{1*}

(1. College of Biotechnology and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China; 3. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of basic orange II in bean curd stick and tartrazine in tartary buckwheat tea by using $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}[\text{St-4-vinylpyridine} (4\text{-VP})]$ as magnetic solid phase extraction

基金项目: 国家自然科学基金项目(20875024)、湖北省食品质量与安全监督检验研究院科技项目(ZZLX2015015)、湖北工业大学“产品质量工程”跨学科研究院开放课题项目(00021)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (20875024), the Science and Technology Project of Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test (ZZLX2015015), and the Open Project of the Interdisciplinary Research Institute of Product Quality Engineering of Hubei University of Technology (00021)

*通信作者: 谢卫红, 博士, 教授, 主要研究方向为食药质量分析与检测。E-mail: xiewh@hbut.edu.cn

*Corresponding author: XIE Wei-Hong, Ph.D, Professor, College of Biotechnology and Food, Hubei University of Technology, No.28 Nanli Road, Hongshan District, Wuhan 430068, China. E-mail: xiewh@hbut.edu.cn

material and high performance liquid chromatography. **Methods** The optimal adsorption conditions of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ for pigments were optimized through 5 factors: Solution pH, adsorption time, adsorption method, adsorbent dosage, and material composition ratio. The adsorption model of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ was investigated through isothermal adsorption experiments. Under the optimized adsorption conditions, the basic orange II in bean curd stick and the tartrazine in tartary buckwheat tea were quantified by high performance liquid chromatography. **Results** The optimal pH for adsorption of pigments by $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ were pH 7.0 for basic orange II, and pH 3.0 for tartrazine; the optimal adsorption time, adsorption method, adsorbent dosage, and material composition ratio were 5 min, oscillating adsorption, 1.0 mg, and $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4-VP})=2:1$ ($m:m$), respectively. The adsorption processes of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ on basic orange II and tartrazine conformed to Langmuir isothermal adsorption model, and the maximum adsorption load was 116.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 183.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The material was applied to the determination of basic orange II in bean curd stick and tartrazine in tartary buckwheat tea. The recoveries were 94.26%–101.04%, and the relative standard deviation was 1.12%–3.35% ($n=6$). **Conclusion** The $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ has good absorbability to basic orange II and tartrazine, which can quickly separate the pigments from the samples, elute easily and be recycled, and can be used for the detection of basic orange II in bean curd stick and tartrazine in tartary buckwheat tea.

KEY WORDS: magnetic dispersible solid phase extraction; 4-vinylpyridine; basic orange II; tartrazine; bean curd stick; tartary buckwheat tea; high performance liquid chromatography

0 引 言

人工合成色素是指以苯胺染料为原料通过化学合成的,用于增加或改变产品颜色的化学物质,用途包括工业染料和食用合成着色剂。近年来,国内外逐渐发现人工合成色素不仅具有一般毒性,其中某些种类会引起腹泻和引发癌症风险。GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂》规定了食用合成色素的种类、应用对象和限量标准。工业染料不属于食用合成色素,将其添加进食品中属于非法添加;此外,将食用合成色素超范围或超量添加于食品中同属非法添加。

碱性橙II是一种碱性工业染料,通常作为着色剂,应用于木制品、纺织品及皮革制品的染色^[1]。根据 GB 2760—2014,碱性橙II不属于食品添加剂,所以将碱性橙II用于腐竹等豆制品的染色是非法添加行为,严重危害消费者的身体健康。柠檬黄是一种可用于食品添加的偶氮类人工合成色素,因其着色力强,着色稳定而且成本低廉,在现代食品工业中广泛应用于饮料、糖果、面点、罐头等食品。但是,柠檬黄的长期低剂量摄入会引发致突变和致癌的风险。研究显示长期食用柠檬黄可出现副作用如头痛,以及潜在的遗传毒性、神经毒性和致癌作用^[2]。因此,GB 2760—2014 规定了柠檬黄在食品中的使用限量和范围;此外 GH/T 1091—2010《中华人民共和国供销行业标准 代用茶》中规定代用茶中不得添加任何色素,防止外观误导消费者。

碱性橙II和柠檬黄的主要检测方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[3-4]、高效液相色谱-质谱法^[5-8]、酶联免疫法^[9]、拉曼光谱法^[10]、电

化学法^[11-15]、荧光探针^[16]、薄层色谱法^[17-18]和分子印迹技术^[19]等。这些方法中 HPLC 最为常用,一般通过固相萃取法(solid phase extraction, SPE)分离富集样品中的分析物,而后再进行仪器检测。

传统的固相萃取柱受限于物料的扩散速率,往往平衡时间比较长。与传统的 SPE 不同,磁性固相萃取法(magnetic solid phase extraction, MSPE)使用的微米级或纳米级颗粒能快速分散至整个样品体系,能够与目标物充分接触,加快吸附过程和吸附效率,因此可节约吸附剂用量。在外加磁场作用下,磁性颗粒能迅速从体系中分离和收集,不需要复杂的过滤或离心过程,避免多次洗脱引起的吸附剂损耗,提高了样品的处理效率。目前,已开发出多种新型磁性吸附剂,在色素^[18]、抗生素^[20-21]、农药残留^[22]、重金属离子^[23-25]、激素^[26]的吸附和检测方面得到大量应用。

4-乙烯基吡啶(4-vinylpyridine, 4-VP)具有一个携带孤对电子的吡啶环,在酸性条件下能够质子化而使复合材料表面带正电,能与溶液中的阴离子色素产生静电作用而进行吸附^[27]。目前,根据 4-VP 开发出多种新型吸附剂,在色素^[27-28]和重金属离子的吸附和检测方面已得到应用^[29]。ZHANG 等^[27]以 4-VP 为功能单体制备的聚合物微球 $\text{P}(\text{St-co-EGDMA})@\text{P}(\text{4-VP-co-EGDMA})$ 对包含柠檬黄在内的 5 种偶氮类食用色素具有良好的吸附作用,结合 HPLC 可实现对饮料中 5 种色素的检测,加标回收率为 83.2%~111.5%;许彤等^[30]以 4-VP 为功能单体制备了聚苯乙烯@聚 4-乙烯吡啶($\text{PS}@\text{P4-VP}$)复合微球,作为分散固相萃取材料,结合 HPLC,可以实现方便面酱料中碱性橙II、碱性橙 21 和碱性橙 22 的检测,回收率为 78.7%~95.0%。前期

研究表明,以 4-VP 为功能单体制备的聚合物分散固相萃取材料既可用于食品合成色素(阴离子色素)的分离萃取,又可用于工业染料碱性橙类色素的分离萃取,是一种具有应用潜力的分散固相萃取材料。

本研究在前期研究基础上,进一步在以 4-VP 为功能单体制备的聚合物固相萃取材料中复合了 Fe_3O_4 , 使样品的分离更加方便,同时也减少了萃取材料的用量。本研究以新型 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 复合材料作为固相萃取吸附剂,对食品中碱性橙II和柠檬黄进行吸附,优化材料对两种色素的萃取条件,并采用 HPLC 检测腐竹和苦荞茶中两种非法添加色素,以期监测食品中色素的非法添加提供新的检测思路和方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); K5200G 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DELTA 320 精密 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); TS-8 转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Luna $\text{C}_{18}(2)$ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Phenomenex 公司); TGL-24M 高速冷冻离心机(湖南平科科学仪器有限公司); R-1001VN 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 材料与试剂

腐竹和苦荞茶为市场购买。

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 复合材料(本实验室合成); 碱性橙II(basic orange II, 纯度 95%)、柠檬黄(纯度 87%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 一水合柠檬酸、柠檬酸钠、乙酸铵、无水甲醇(分析纯)、甲醇(色谱纯)(国药集团化学试剂有限公司); 0.22 μm 亲水 PTFE 针式滤器(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 吸附条件的优化

环境和材料本身会对碱性橙II和柠檬黄的吸附载量产生影响。为达到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙II和柠檬黄的最佳吸附效果,本研究探究了溶液的 pH、吸附时间、吸附方式、吸附剂用量以及材料组成配比[$\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4-VP})$]对两种黄色色素吸附载量的影响。

(1) pH

溶液 pH 能改变分析物和吸附剂之间的相互作用,所以 pH 能明显影响吸附剂对色素的吸附效果。因此,有必要探究 pH 对碱性橙II和柠檬黄的吸附载量的影响。用 0.1 mol/L 的柠檬酸和柠檬酸钠溶液分别配制 pH 3.0、5.0、7.0、9.0 的缓冲液,再以缓冲液配制碱性橙II溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和柠檬黄溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。取 1.0 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$, 分散于

1 mL 柠檬黄和碱性橙II溶液中。振荡吸附 5 min 待体系平衡后,在外磁场作用下分离出上清液。取 200 μL 上清液置于酶标板,分别在 485 nm 和 447 nm 处测量碱性橙II和柠檬黄的吸光度值 A。测量结果分别与空白组 A_0 对照,通过差减法计算材料对两种色素的吸附载量,以 3 次平行实验结果计算吸附载量,计算公式如式(1)所示:

$$Q = \frac{A - A_0}{A} \times c \times V \times m^{-1} \quad (1)$$

式中, Q: 吸附载量, $\mu\text{g}/\text{mg}$; A: 空白对照组吸光度值; A_0 : 实验组吸光度值; c—色素浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V—溶液体积, mL; m—吸附剂质量, mg。

(2) 吸附时间

色素的吸附会随时间增加逐渐趋于平衡。取 1.0 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$, 分别分散于 1 mL 碱性橙II溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.0)和柠檬黄溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 3.0)中。振荡吸附 1、5、10、15 min 后,在外磁场作用下分离出上清液。测量对照组和实验组的吸光度值,按式(1)方法计算吸附载量。

(3) 吸附方式

不同的吸附方式会造成不同的吸附效果,本研究考察了超声吸附和振荡吸附两种方式对色素的回收率的影响。取 1 mL 碱性橙II溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.0)和柠檬黄溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 3.0), 分别加入 1.0 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$, 使用振荡和超声两种方式吸附,吸附时间 5 min。吸附平衡后,在外磁场作用下分离出上清液。测量对照组和实验组的吸光度值,按式(1)方法计算吸附载量。

(4) 吸附剂用量

为评价单位质量的吸附剂的色素吸附能力,本研究设计如下实验。取 0.5、0.7、1.0、1.5 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 置于离心管,再分别加入含 1 mL 的碱性橙II水溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.0)以及柠檬黄溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 3.0)。振荡吸附 5 min 待体系平衡后,在外磁场作用下分离出上清液。测量对照组和实验组的吸光度值,按式(1)方法计算吸附载量。

(5) 材料组成配比

在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 中 $\text{P}(\text{St-4-VP})$ 的占比越大,其对色素的吸附效果会越好。为探究 $\text{P}(\text{St-4-VP})$ 的不同占比对碱性橙II和柠檬黄的吸附载量影响,本研究设计如下实验。取 1.0 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4-VP})$ 为 5:1、3:1、2:1 (m:m) 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 置于离心管,再分别加入含 1 mL 的碱性橙II水溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.0)以及柠檬黄溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 3.0)。振荡吸附时间 5 min 待体系平衡后,在外磁场作用下分离出上清液。测量对照组和实验组的吸光度值,按式(1)方法计算吸附载量。

1.3.2 等温吸附曲线绘制

等温吸附曲线是探究吸附模型的一个重要工具。一般来说,吸附过程有 Langmuir 和 Freundlich 两种模型。分别向 2 mL 的 1、3、5、10、15、20、25、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

的碱性橙 II 溶液(pH 7.0)和柠檬黄溶液(pH 3.0)中加入 0.1 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 。振荡吸附 5 min 后,在外磁场作用下使吸附剂与上清液分离。取 200 μL 上清液置于酶标板中,分别在 485 nm(碱性橙 II)和 447 nm(柠檬黄)处测量吸光度值,根据吸光度值计算上清中色素的平衡浓度 C_e 。按照公式(2)计算材料对不同色素浓度溶液的吸附量,并根据计算结果绘制浓度-吸附载量曲线图:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (2)$$

其中: Q_e : 吸附剂吸附载量, $\mu\text{g}/\text{mg}$; C_0 : 对照组色素浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; C_e : 平衡浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V : 对照组溶液体积, mL ; m : 吸附剂质量, mg 。

1.3.3 标准曲线绘制

参考 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》的方法,配制浓度为 12 mmol/L 的乙酸铵溶液。检测碱性橙 II 的色谱条件为流动相比配为乙酸铵:甲醇(V:V)=35:65,流速 1 mL/min,进样体积 20 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,用 0.1 mmol/L 柠檬酸溶液调节至 pH 4.0,检测波长为 447 nm;检测柠檬黄的流动相为乙酸铵:甲醇(V:V)=65:35,检测波长为 424 nm,其他条件与碱性橙 II 相同。

配制质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碱性橙 II 和柠檬黄标准溶液,在优化的条件下绘制标准曲线。以 3 倍信噪比($S/N=3$)作为样品的检出限(limit of detection, LOD),以 10 倍信噪比($S/N=10$)作为样品的定量限(limit of quantitation, LOQ)。

1.3.4 回收率测定

腐竹:称取 1.00 g 粉碎腐竹于 50 mL 塑料离心管内,加入 2.5 mL 0.4%乙酸-20 mmol/L 乙酸铵溶液混匀,加入 10 mL 乙腈,涡旋混匀 15 s,超声萃取 30 min,静置分层,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 9000 r/min 离心 10 min,取上清液于 50 mL 离心管内。残渣再按上述步骤重复提取一次,合并上清液。将上清液于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空干燥,加入 10 mL pH 7.0 的水并完全转移至离心管,加入 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 并分散均匀,振荡吸附 30 min。吸附完成后,在外磁场作用下,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 磁分离,移除上清液。用 pH 3.0 的水将 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 淋洗两次,并移除淋洗液。加入 1 mL 甲醇,对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 进行洗脱,重复两次,收集洗脱液。60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴干燥洗脱液,加入 1 mL 流动相复溶,用 0.22 μm 亲水 PTFE 针式滤器过滤后进行 HPLC 分析。

苦荞茶:取 1.00 g 粉碎苦荞置于 50 mL 塑料离心管内,加入 30 mL 水,超声提取 30 min。取出置于离心机中,以 6000 r/min 离心 10 min,收集上层清液,重复提取两次。采用以上相同步骤对苦荞茶中的柠檬黄进行 MSPE,淋洗剂改为 pH 7.0 的水。

1.4 数据处理

采用 OriginPro 2018C 软件进行数据处理、分析和作图。

2 结果与分析

2.1 吸附条件的优化结果分析

2.1.1 pH

如图 1a 所示,在 pH 3.0~9.0 范围内, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对柠檬黄和碱性橙 II 呈现出不同的吸附特性。在溶液 pH 为 3.0 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对柠檬黄的吸附载量为最大值(59.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$),与之相反其对碱性橙 II 的吸附载量为最小值(0.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$)。随着 pH 逐渐增大, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙 II 的吸附载量逐渐增大,而对柠檬黄的吸附载量却逐渐降低。达到 pH 7.0 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙 II 的吸附载量达到 7.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$, pH 9.0 时略有降低,但与之基本持平;对柠檬黄的吸附载量在 pH 7.0 时大幅下降至 3.84 $\mu\text{g}/\text{mg}$, pH 9.0 时继续下降至 2.35 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

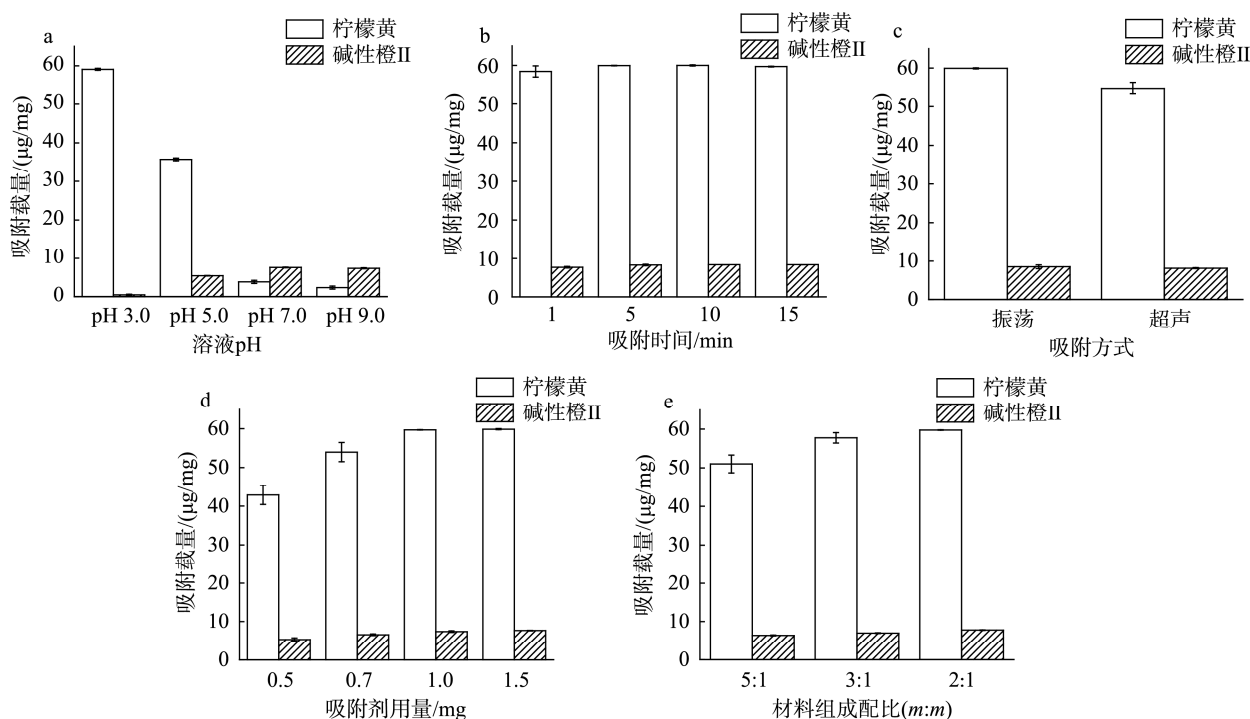
以上现象可能与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 的表面电荷的改变有关。GUO 等^[31]发现由于吡啶环上的氮原子电负性较大, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{4-VP-DVB})$ 微球表面的 P(4-VP)链在酸性环境下容易被质子化和拉伸。吡啶氮原子上的未共用电子对可接受质子而显碱性,它的共轭酸(N 原子上接受一个质子后的吡啶)的 pK_a 为 5.25。在较低的 pH 条件下($\text{pH}<5.25$), P(St-4-VP)的吡啶环氮原子俘获 H^+ 形成带正电的共轭酸,因此它与阴离子色素柠檬黄之间的静电引力增强了,从而增大了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对柠檬黄的吸附作用;相反地,碱性橙 II 的氨基在酸性条件也发生质子化而带正电,两者之间的静电斥力阻碍吸附剂对碱性橙 II 的吸附。当 $\text{pH}>5.25$ 时, P(St-4-VP)的吡啶共轭酸去质子化,对碱性橙 II 的静电斥力减弱,同时碱性橙 II 分子上的氨基与吡啶环形成氢键,增强了吸附材料对碱性橙 II 的吸附,而与柠檬黄之间的静电引力减弱,对柠檬黄的吸附减少。所以后续实验在 pH 3.0 条件下吸附柠檬黄样品,而在 pH 7.0 条件下吸附碱性橙 II 样品。

2.1.2 吸附时间

吸附剂对分析物的吸附需要一定时间才能达到平衡,所以要对吸附时间对色素的吸附载量影响进行考察。图 1b 中,在 1 min 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 对碱性橙 II 和柠檬黄的吸附载量分别达到 7.70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 58.45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。超过 1 min 后,二者的吸附载量继续上升,至 5 min 时达到 8.30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 59.96 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。持续振荡吸附超过 5 min 后, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4-VP})$ 的这两种色素的吸附载量不再上升,基本保持不变。因此后续处理样品的吸附时间为 5 min。

2.1.3 吸附方式

如图 1c 所示,吸附方式对柠檬黄和碱性橙 II 的吸附载量的影响不同。对碱性橙 II 而言,这两种吸附方式对它的吸附载量影响较小,振荡吸附载量略高于超声吸附载量,分别为 8.52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 8.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。但是,通过振荡吸附,柠檬黄吸附载量为 59.94 $\mu\text{g}/\text{mg}$,大于采取超声吸附的吸附载量(54.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$);为达到最大吸附载量,后续则一律采用振荡吸附的方式处理实际样品。

图1 吸附条件对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 吸附载量的影响Fig.1 Effects of adsorption conditions on adsorption capacity of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$

2.1.4 吸附剂用量

如图1d所示,随着吸附剂用量增加,对碱性橙II的吸附则表现出缓慢上升趋势,吸附剂用量至1.5 mg时,吸附载量上升至7.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。吸附剂用量在0.5~1.0 mg范围内, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 对柠檬黄的吸附载量呈上升趋势,吸附剂用量到达1.0 mg时,对柠檬黄的吸附载量已达到59.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$;超过1.0 mg后柠檬黄的吸附载量不再上升。根据实验结果,对于1 mL提取液,吸附剂用量为1.0 mg。

2.1.5 材料组成配比

图1e展现了材料组成对比对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 吸附载量的影响。随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4VP})$ 的减小, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 对柠檬黄和碱性橙II两种色素的吸附载量逐渐上升,这是因为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 中发挥吸附作用的 $\text{P}(\text{St-4VP})$ 的占比增加的缘故。当 $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4VP})$ 的比值达到2:1 ($m:m$)时, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 则对柠檬黄和碱性橙II的吸附载量为59.76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和7.76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。为节约材料用量, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 的配比采用 $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{P}(\text{St-4VP})=2:1$ ($m:m$)。

2.2 等温吸附曲线

平衡吸附等温线模型描述了当被吸附物在液-固相中达到平衡时,被吸附物与吸附剂在一定温度下的相互作用行为^[32]。对等温线数据的分析可以为吸附剂的吸附能力和吸附机制提供重要的信息。

Langmuir 和 Freundlich 的一般形式如式(3)、(4)所示。

$$\text{Langmuir: } Q_e = \frac{Q_m b C_e}{1 + b C_e} \quad (3)$$

$$\text{Freundlich: } Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4)$$

对 Langmuir 和 Freundlich 吸附模型进行数学变换,得到式(5)、(6):

$$\text{Langmuir: } \frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{C_e}{Q_m} \quad (5)$$

式中, Q_e , 平衡时的吸附载量, $\mu\text{g}/\text{mg}$;

C_e , 平衡时溶液浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

Q_m , 饱和吸附量, $\mu\text{g}/\text{mg}$;

b , Langmuir 吸附平衡常数, $\text{mL}/\mu\text{g}$ 。

$$\text{Freundlich: } \lg Q_e = \lg K_f + \frac{1}{n} \lg C_e \quad (6)$$

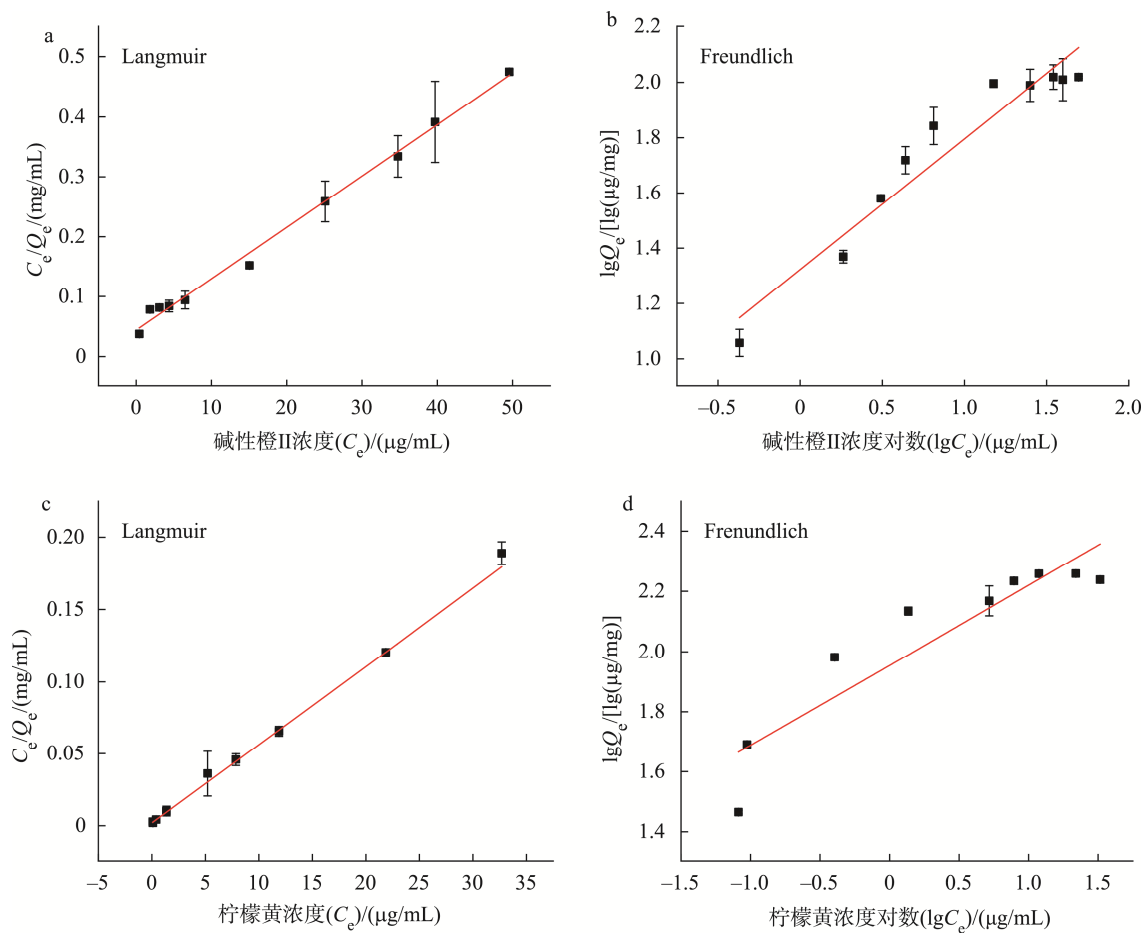
式中, Q_e , 平衡时的吸附载量, $\mu\text{g}/\text{mg}$;

C_e , 平衡浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

K_f , Freundlich 吸附平衡常数, $[(\mu\text{g}/\text{mg})(\text{mL}/\mu\text{g})^{1/n}]$;

$1/n$, Freundlich 常数。

图2分别为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 对碱性橙II和柠檬黄的等温吸附曲线。拟合结果如表1所示。 Q_m 和 b 的值是根据 $C_e/Q_e - C_e$ 的拟合曲线的斜率和截距计算而得。 $1/n$ 和 K_f 的值根据 $\lg Q_e - \lg C_e$ 的拟合曲线的斜率和截距计算而得。碱性橙II和柠檬黄的 Langmuir 方程式相关系数分别为0.9938和0.9979, 大于 Freundlich 模型的0.9177和0.8409。因此, Langmuir 方程更能代表实验数据,说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 对碱性橙II和柠檬黄的吸附过程均符合 Langmuir 等温吸附模型,为吸附剂表面均质的单层吸附。基于拟合参数的值,从 Langmuir 方程计算出的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-4VP})$ 对碱性橙II和柠檬黄最大吸附载量为116.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和183.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。



注: a、b 为碱性橙II的 Langmuir 和 Freundlich 的拟合曲线; c、d 为柠檬黄的 Langmuir 和 Freundlich 的拟合曲线。

图 2 碱性橙 II (a、b)和柠檬黄(c、d)的等温吸附曲线

Fig.2 Isothermal adsorption curves of basic orange II (a, b) and tartrazine (c, d)

表 1 碱性橙II和柠檬黄对吸附的回归系数及拟合参数

Table 1 Regression coefficients and fitting parameters of basic orange II and tartrazine for adsorption

分析物	Langmuir 方程			Freundlich 方程		
	$Q_m/(\mu g/mg)$	$b/(mL/\mu g)$	R^2	$K_F/[(\mu g/mg)(mL/\mu g)^{1/n}]$	n	R^2
碱性橙II	116.5	0.195	0.9938	21.03	2.12	0.9177
柠檬黄	183.8	3.04	0.9979	0.0141	1.56	0.8409

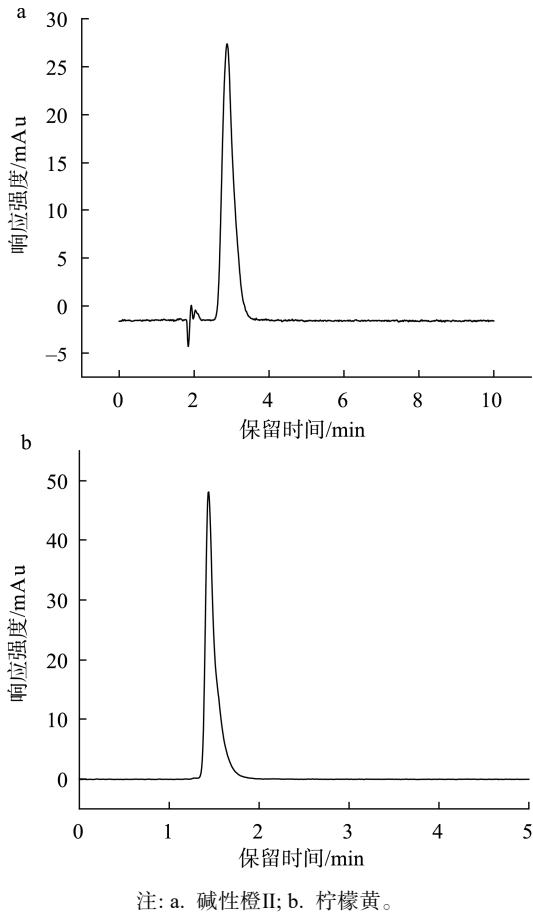
2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系

图 3 是碱性橙II和柠檬黄的 HPLC 图谱, 质量浓度均为 5 μg/mL。以色素浓度为横坐标(X, μg/mL), 峰面积为纵坐标(Y)作图, 得到线性关系曲线。结果如表 2 所示, 两种色素在 0.5~20.0 μg/mL 范围内线性关系良好。分别以 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)计算色素的 LOD 和 LOQ, 两种色素的 LOD 和 LOQ 分别为 0.05 mg/kg 和 0.16 mg/kg, 符合检测的要求。

2.3.2 回收率

以空白基质为样品, 分别在腐竹和苦荞茶中添加碱性橙II和柠檬黄, 加标量为 1.0、5.0、10.0 mg/kg。两种色素的加标回收率与相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)见表 3, 由表 3 可知, Fe₃O₄/P(St-4-VP)作为固相萃取材料, 在实际样品的加标回收中对碱性橙II和柠檬黄两种色素的回收率良好, 平均回收率达 94.26%~101.04%, RSDs 为 1.12%~3.35% (n=6), 表明该方法精密度高, 可以满足检测需要。



注: a. 碱性橙II; b. 柠檬黄。
图 3 碱性橙II和柠檬黄的 HPLC 图谱
Fig.3 HPLC spectrums of basic orange II and tartrazine

表 2 碱性橙II和柠檬黄的标准曲线方程和相关系数
Table 2 Standard curve equation and correlation coefficient of basic orange II and tartrazine

色素	线性范围/(μg/mL)	线性方程	r ²
碱性橙II	0.5~20.0	Y=1.374X-0.0267	0.9996
柠檬黄	0.5~20.0	Y=0.601X-0.0619	0.9994

表 3 腐竹中碱性橙II和苦荞茶中柠檬黄的回收率及 RSDs (n=6)
Table 3 Recoveries and RSDs of basic orange II in bean curd stick and tartrazine in buckwheat tea (n=6)

样品	加标量/(mg/kg)	回收率/%	RSDs/%
腐竹	1.0	101.04	3.35
	5.0	97.50	1.12
	10.0	98.46	1.84
苦荞茶	1.0	96.15	2.31
	5.0	97.51	3.24
	10.0	94.26	2.44

3 结 论

以 Fe₃O₄/P(St-4-VP)作为固相萃取材料,建立了 MSPE-HPLC, 实现了对腐竹中碱性橙II和苦荞茶中柠檬黄

的检测。根据不同 pH 条件下 Fe₃O₄/P(St-4-VP)中 4-VP 不同的带电特征,可实现一种固相萃取材料选择性吸附阴离子色素和阳离子色素的目的,扩大实际应用的范围。实验结果表明,Fe₃O₄/P(St-4-VP)对碱性橙II和柠檬黄的吸附过程均符合 Langmuir 等温吸附模型,即吸附剂表面均质的单层吸附。检测过程中吸附剂用量少,又能快速分离回收,节省了操作时间;且洗脱方便,节省成本,提高检测结果准确性和稳定性;回收率较好,可以满足检测需求。后续可在 Fe₃O₄/P(St-4-VP)的吸附动力学和应用于其他样品中非法添加色素的检测方面做进一步研究。

参考文献

[1] 蔡燕斌, 丁萍, 刘月红. 固相萃取-高效液相色谱法快速测定饮料中 3 种碱性橙含量[J]. 现代食品, 2020, (6): 176-178.
CAI YB, DING P, LIU YH. Rapid determination of three basic orange dyes in drink by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Mod Food, 2020, (6): 176-178.

[2] YAMJALA K, NAINAR MS, RAMISETTI NR. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry-A review [J]. Food Chem, 2016, 192: 813-824.

[3] AGBOKPONTO JE, KPAIBE A, YEMOA LA, et al. Simultaneous determination by HPLC-UV vis of tartrazine and sunset yellow in soft drinks sold in Benin [J]. Am J Anal Chem, 2022, (8): 277-288.

[4] 王婷, 程国栋, 李娜, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 9 种合成着色剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 483-491.
WANG T, CHENG GD, LI N, et al. Simultaneous determination of 9 kinds of synthetic colorants in foods by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(2): 483-491.

[5] 朱慧敏, 蒲云月, 庞榕琳. 液相色谱-串联质谱法检测水果罐头中的 7 种合成着色剂[J]. 粮食流通技术, 2020, (2): 205-208.
ZHU HM, PU YY, PANG RL. Determination of 7 synthetic colorants in canned fruits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Grain Distrib Technol, 2020, (2): 205-208.

[6] 陈悦铭, 钟玉心, 黄景初, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测豆制品中的碱性橙 2[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5222-5228.
CHEN MY, ZHONG YX, HUANG JC, et al. Determination of chrysoidine G in soy products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(13): 5222-5228.

[7] 刘瑜, 张柏瑞, 毕孝瑞, 等. 超高效液相色谱-四极杆串联离子阱复合质谱法测定肉制品中非法添加的碱性工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6343-6348.
LIU Y, ZHANG BY, BI XR, et al. Determination of illegally added basic industrial dyes in meat products by ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem ion trap combined mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(16): 6343-6348.

[8] 范赛, 张楠, 刘平, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测熟肉制品中 10 种工业染料残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4177-4184.
FAN S, ZHANG N, LIU P, et al. Determination of 10 industrial dyes in cooked meat products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4177-4184.

[9] 贡东军, 赵志磊, 王庭欣, 等. 碱性橙II的酶联免疫检测方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, (10): 80-82.
GONG DJ, ZHAO ZL, WANG TX, et al. Study on the ELISA determination of chrysoidin II [J]. Food Res Dev, 2013, (10): 80-82.

[10] 闫正, 张丽冰, 任孟伟, 等. 表面增强激光拉曼光谱测定豆制品中的碱性嫩黄II、碱性橙II、皂黄[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(6): 1761-

1764.
YAN Z, ZHANG LB, REN MW, *et al.* Fast determination of auramine II, basic orange II and metanil yellow in bean products on surface enhanced Raman spectroscopy and use high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to verify [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2016, 36(6): 1761–1764.
- [11] DARABI R, SHABANINOOSHABADI M. NiFe₂O₄-rGO/ionic liquid modified carbon paste electrode: An amplified electrochemical sensitive sensor for determination of sunset yellow in the presence of tartrazine and allura red [J]. *Food Chem*, 2021, 339(1): 1–9.
- [12] ANDRII D, SOFILA T, LILIYA D. Rapid and straightforward electrochemical approach for the determination of the toxic food azo dye tartrazine using sensors based on silver solid amalgam [J]. *J Electroanal Chem*, 2023, 932(15): 1–9.
- [13] GEORGESCU SR, VAN SJAKF, NICOLAE SR, *et al.* Rapid and sensitive electrochemical determination of tartrazine in commercial food samples using IL/AuTiO₂/GO composite modified carbon paste electrode [J]. *Food Chem*, 2022, 385(15): 1–9.
- [14] GARKANI NF, IRAN S, HADI B. Simultaneous detection of carmoisine and tartrazine in food samples using GO-Fe₃O₄-PAMAM and ionic liquid based electrochemical sensor [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 169(1): 36–45.
- [15] KAYA SI, CETINKAYA A, OZKAN SA. Latest advances on the nanomaterials-based electrochemical analysis of azo toxic dyes sunset yellow and tartrazine in food samples [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 156: 15–28.
- [16] LIU L, SUN H, XIAO L, *et al.* Development of a highly sensitive fluorescence method for tartrazine determination in food matrices based on carbon dots [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(5): 1485–1492.
- [17] DILRUKSHI PGT, MUNASINGHE H, SILVA ABG, *et al.* Identification of synthetic food colours in selected confectioneries and beverages in Jaffna district, Sri Lanka [J]. *J Food Qual*, 2019, 2019: 1–8.
- [18] 戚平, 周庆琼, 林子豪, 等. 磁性固相萃取-液相色谱法测定环境水样中多种碱性染料[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 2(47): 58–66.
QI P, ZHOU QQ, LIN ZH, *et al.* Determination of basic dyes in environmental water by magnetic solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J South Chin Norm University (Nat Sci Ed)*, 2015, 2(47): 58–66.
- [19] ASHLAY G, ANILA RC, BIJU J, *et al.* Design optimisation and fabrication of amino acid based molecularly imprinted sensor for the selective determination of food additive tartrazine [J]. *Food Chem*, 2023, 404: 1–10.
- [20] 魏丹, 张菊, 国明. 基于混合吸附剂磁性固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定水中磺胺和喹诺酮类抗生素残留[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(2): 187–195.
WEI D, ZHANG J, GUO M. Determination of sulfonamides and quinolones antibiotics residues in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with mixed adsorbents based magnetic solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(2): 187–195.
- [21] WANG H, ZHAO X, XU J, *et al.* Determination of quinolones in environmental water and fish by magnetic metal organic frameworks based magnetic solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1651: 1–8.
- [22] DONG DZ, YI WC, MIN C, *et al.* Determination of azole fungicide residues in fruits and vegetables by magnetic solid phase extraction based on magnetic MOF sorbent in combination with high performance liquid chromatography [J]. *Microchem J*, 2023, 187: 1–9.
- [23] HASSAN AHE, OZGUR O, MUSTAFA S. Magnetic solid phase extraction of lead (II) from food and water samples on magnetic MWCNTS/MgAl₂O₄/TiO₂ [J]. *J Food Comp Anal*, 2023, 118: 1–10.
- [24] DI Z, XIN AN Y, CHENG ZJ, *et al.* Ultrasonic assisted magnetic solid phase extraction of ultra-trace mercury with ionic liquid functionalized materials [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1245: 1–12.
- [25] FRANCISCO S, FRANCISCO L, DAVINO N, *et al.* Magnetic solid phase extraction as a nonchromatographic method for the quantification of ultratrace inorganic arsenic in rice by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP OES) [J]. *Food Chem*, 2023, 412: 1–9.
- [26] ZHANG XH, XU HY, FENG GS, *et al.* Sensitive HPLC-DMS/MS/MS method coupled with dispersive magnetic solid phase extraction followed by in situ derivatization for the simultaneous determination of multiplexing androgens and 17-hydroxyprogesterone in human serum and its application to patients with polycystic ovarian syndrome [J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 538: 221–230.
- [27] ZHANG MX, XU T, TIAN T, *et al.* A composite polymer of polystyrene coated with poly(4-vinylpyridine) as a sorbent for the extraction of synthetic dyes from foodstuffs [J]. *Anal Method*, 2020, 12(24): 3156–3163.
- [28] 许彤, 张毅, 严恒, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱法测定饮料和糖果中 3 种人工合成色素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(14): 4590–4597.
XU T, ZHANG Y, YAN H, *et al.* Determination of 3 kinds of synthetic pigments in beverages and candies by dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(14): 4590–4597.
- [29] WANG P, ZU J, WEI Y. Synthesis and characterization of porous 4vp-based adsorbent for read sorption as analogue to ⁹⁹Tc [J]. *Nucl Sci Technol*, 2017, 28(3): 1–7.
- [30] 许彤, 张毅, 严恒, 等. 聚苯乙烯-聚 4-乙烯基吡啶复合微球的制备及其用于检测碱性橙类食品违禁色素[J]. *分析试验室*, 2022, 42(4): 507–513.
XU T, ZHANG Y, YAN H, *et al.* Preparation and application of PS@P4-VP composite for detection of basic orange pigments in foods [J]. *Chin J Anal Lab*, 2022, 42(4): 507–513.
- [31] GUO W, WANG Q, WANG G, *et al.* Facile hydrogen-bond-assisted polymerization and immobilization method to synthesize hierarchical Fe₃O₄@poly(4-vinylpyridine-co-divinylbenzene)/Au nanostructures and their catalytic applications [J]. *Chem Asia J*, 2013, 8(6): 1160.
- [32] HU MH, HUANG PC, HUANG WH, *et al.* Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with sodium dodecyl sulfate for removal of basic orange 21 and basic orange 22 from complex food samples with high-performance liquid chromatographic analysis [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(9): 3119–3127.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



沈唐文, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全监督与管理。

E-mail: shen_tangwen@163.com



谢卫红, 博士, 教授, 主要研究方向为食药质量分析与检测。

E-mail: xiewh@hbut.edu.cn