

食品中苏丹红的 HPLC/DAD/MS 分离分析方法研究

冯 雷, 孙文通, 李军明, 李 波
(云南省产品质量监督检验研究院, 云南 昆明 650223)

摘 要: 本实验研究了一种针对食品中非法添加苏丹红的分析方法, 采用固相萃取技术对样品进行前处理, 然后用 HPLC 对苏丹红样品进行分离, DAD 和 MS 进行串联检测。提高了分析检测的准确性、可靠性。本方法灵敏度高, 具有较高且稳定的回收率, 精密度较好。分析应用结果令人满意。

关键词: 苏丹红; HPLC/DAD/MS; 分析

Study on HPLC/DAD/MS for Detection of Illegal Sudan Residues in Food

FENG Lei, SUN Wen-tong, LI Jun-ming, LI Bo
(Yunnan Product Quality Supervision and Testing Academy, Kunming 650223, China)

Abstract: A new analytical approach was discussed for detecting Sudan in food. Sample was pretreated by solid phase extraction. After separated with high performance liquid chromatography (HPLC), diode array detector (DAD)- tandem MS was used for detection to enhance the reliability of analytical results. The results showed that the pretreatment is efficient, and the analysis has high sensitivity and precision. Therefore, this new analytical approach is valuable in application.

Key words: Sudan; HPLC/DAD/MS; analysis

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)02-0215-03

苏丹红 I ~ IV (Sudan I ~ IV) 是一类化学合成的偶氮苯染色剂, 作为工业染料常用于蜡、地板涂料等化工生产中, 但严禁用作食品添加剂^[1-2]。由于苏丹红溶液呈橙红色至深红色, 不法厂商常将其添加到含有辣椒成分的调味料中, 以增加食品的鲜艳程度。苏丹红在食用后, 能分解成胺类化合物, 据英国联邦危险品管理局(federal institute for risk assessment, BFR)测试, 长期低量摄入苏丹红, 具有潜在的致癌作用^[3]。自 2003 年 5 月 9 日, BFR 宣布在从印度进口的辣椒粉原料中检出苏丹红以来, 英、美、德各国已宣布有五百余种产品含有苏丹红染料并将这些产品强制下架^[4]。我国迄今为止, 检出含有苏丹红的食品共一百余种。由于苏丹红为非法食品添加剂, 检验结果为阳性即可判定为违禁, 因此, 研究开发权威、有效、可靠的苏丹红定性定量分析方法具有重要意义, 对食品安全问题具有积极的作用。

目前, 分析食品中非法添加剂苏丹红的主要方法为高效液相色谱法^[5], GB/T 19861—2005^[6]也采用液相色谱

法, 该法利用高效液相色谱对含苏丹红的样品进行分离, 然后用紫外检测器进行分析。但是只利用紫外检测器进行定性时容易出现假阳性结果, 直接影响质检部门对苏丹红样品的判断。本实验研究并建立一种针对苏丹红 I ~ IV 的高效液相色谱/二极管阵列紫外检测器/质谱(HPLC/DAD/MS)分离分析方法, 用 HPLC 对可能含有苏丹红的食品样品进行分离, 然后用 DAD 和 MS 两种检测器进行串联检测。本方法可以对食品中非法添加苏丹红进行准确的定性和定量分析。

1 材料与方法

1.1 试剂及层析柱

苏丹红 I ~ IV 号固体标准样品 沈阳市试剂厂; 乙腈(色谱纯) 德国 MERCK 公司; 丙酮(色谱纯)、正乙烷(色谱纯) 美国 TEDIA 公司; 冰醋酸(分析纯)。

氧化铝层析柱^[7]: 用 1cm(d) × 5cm(h) 的注射器管口塞入小片脱脂棉, 湿法装入 520℃ 下活化 4h 的中性氧化铝(100~200 目)约 1.5g, 再加入约 1cm 高的无水硫酸钠,

收稿日期: 2007-11-26

作者简介: 冯雷(1979-), 男, 工程师, 硕士研究生, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: fenglei16@hotmail.com

用10ml正乙烷洗净柱中杂质后备用。

1.2 仪器及工作条件

LCMS-2010A 液相色谱-质谱联用仪、SPD-M10Avp 二极管阵列检测器、Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(150×2.0mm)、LCMS Solution 色谱工作站 日本岛津公司。

色谱条件: 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 醋酸水溶液, 流动相梯度为: 0~10min, 流动相 B 由 20% 变为 5%, 保持 1.5min; 11.6min 流动相 B 变为 20%, 保持至 15min 结束。流动相流速为 0.5ml/min, 柱温 30℃, 进样量 10μl, DAD 扫描波长范围 370~800nm, 检测波长为 478nm。

质谱条件: LC/MS 接口为电喷雾接口(ESI)正离子模式, 离子监测模式为选择离子扫描模式(SIM), 选择监测各组分的准分子离子峰([M+H]⁺), 所选择的离子(m/z)分别为 249.10(Sudan I)、277.10(Sudan II)、353.20(Sudan III)、381.20(Sudan IV)。喷雾口电压 1.5kV, 喷雾气和干燥气为氮气, 喷雾气流速 1.50L/min, 干燥氮气(反吹)压力为 0.2MPa, CDL 电压-10.0kV, CDL 温度 250℃, 模块温度 200℃。

1.3 标准溶液的配制

准确称取苏丹红 I~IV 号标样各 50.0mg, 以乙腈溶解并定容至 100ml 后制成混合标准储备液, 浓度为 500μg/ml。取混合标准储备液 5ml, 以乙腈定容至 100ml, 成为浓度为 25μg/ml 的混合标准母液。分别取混合标准母液各 1、2、5、10、20ml 以乙腈稀释并定容至 50ml, 得到浓度为 0.5、1、2.5、5、10μg/ml 的苏丹红标准溶液。

1.4 样品前处理

称取适量样品(粉状调味品 0.5~5.0g, 油状调味品 0.5~5.0g, 含水量较大的食品 10.0g)于具塞三角瓶中, 加入 30ml 正己烷, 振荡 25min 后, 滤出上清液, 用正己烷洗涤残渣数次至残渣洗涤液无色, 合并洗液, 与滤液一同以无水硫酸钠干燥, 浓缩至 5ml 后进行固相萃取, 待样液完全过柱后, 以正己烷洗脱杂质与油性成分直至洗脱液无色, 换用干净收集容器, 再以正乙烷-丙酮(4:1, V/V)为洗脱液洗下苏丹红。至洗脱液无色时, 收集洗脱液, 水浴浓缩至干, 以 5ml 丙酮-乙腈(1:1, V/V)定容, 用 0.45 μm 有机相滤芯过滤后注入样品瓶。

2 结果与分析

2.1 标样和样品的 DAD 和 MS 检测信息

标样色谱图及 MS 选择离子检测图(MF)和质量色谱图(MIC)见图 1~3, 样品色谱图及 MS 质量色谱图(MIC)见图 4、5。

从图 1~5 中可以看出, 各组分完全分离, 目标物与干扰物质能被较好地分离。比较图 2、3 可以看出,

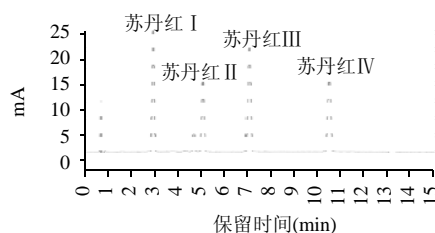


图 1 苏丹红标样色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of standard Sudan

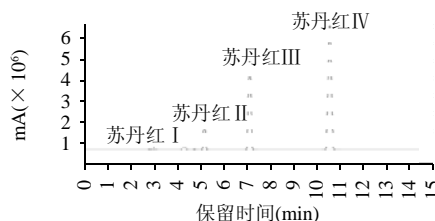


图 2 苏丹红标样选择离子检测图

Fig.2 Mass spectrometry of standard Sudan in selected ion monitoring (SIM) mode

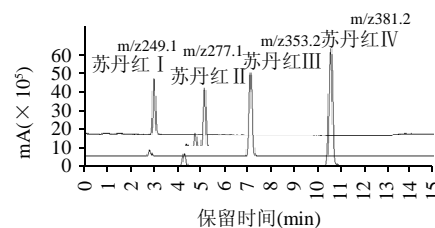


图 3 苏丹红标样质量色谱图

Fig.3 Mass spectrometry of standard Sudan

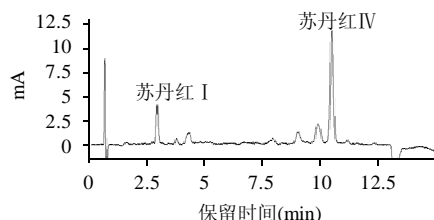


图 4 苏丹红样品色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of Sudan sample

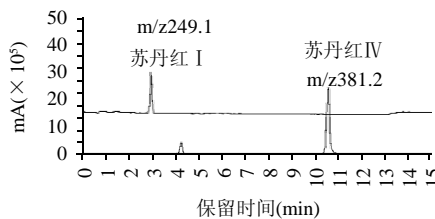


图 5 苏丹红样品质量色谱图

Fig.5 Mass spectrometry of Sudan sample

在 LC/MS 中, 单一离子的质量色谱图信噪比更高, 而且其他组分的干扰更小, 因此用 LC/MS 分析时, 一般用质量色谱图来进行定性和定量。在实验中发现, 若只以色谱保留时间作为定量依据, 容易出现假阳性结果, 若以二极管阵列检测信息(色谱保留时间、样品紫

外吸收光谱)和质谱检测信息(选择离子监测图、质量色谱图以及质谱图等)联合定性,则可排除假阳性检测结果,使定性结果准确、可靠。

2.2 定量标准曲线和相关系数

按1.3所述方法配制标准工作溶液并进样10 μl,用DAD和MS串联检测,以DAD所得到的色谱图和MS得到的质量色谱图作为定量依据,用外标标准曲线法进行线性回归得到标准曲线方程和相关系数。

表1 DAD定量得到的标准曲线方程和相关系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficients of Sudan detected with DAD

组分名称	保留时间(min)	线性回归方程	相关系数
苏丹红 I	2.949	$Y=33330X - 869.12$	0.9999
苏丹红 II	5.112	$Y=22959X - 703.32$	0.9999
苏丹红 III	7.082	$Y=35920X - 839.82$	1
苏丹红 IV	10.525	$Y=28285X - 1737.9$	0.9997

表2 SIM(+)-MIC方式定量得到的标准曲线方程和相关系数

Table 2 Regression equation and correlation coefficient of Sudan detected in SIM (+)-MIC mode

组分名称	特征离子(m/z)	保留时间(min)	线性回归方程	相关系数
苏丹红 I	249.10	2.978	$Y=157402X - 149479$	0.9820
苏丹红 II	277.10	5.142	$Y=1851605X - 1341841$	0.9957
苏丹红 III	253.2	7.108	$Y=2345813X - 897699$	0.9982
苏丹红 IV	381.2	10.551	$Y=4780035X - 1781136$	0.9996

从表1、2可以看出,DAD所得到的标准曲线方程的相关性优于质谱,说明在苏丹红的定量分析中,DAD的相关性比MS好(曲线方程中X为待测物浓度,Y为待测物峰面积)。

2.3 方法的最低检测限、回收率和精密度

检出限以信噪比(S/N)为3时的信号强度计算得到,两种检测方式的检测限见表3。在实际样品中以两个水平加入标准溶液,每个水平做5次平行试验,得到平均回收率及相对标准偏差见表4。从表3可以看出,质谱是一种灵敏度更高的检测方法,除苏丹红I号外,其他苏丹红在质谱中的检出限均比二极管阵列低一个数量级。而精密度方面,在检测苏丹红时,质谱的精密度低于二极管阵列,这可能是因为苏丹红样品在ESI接口中的雾化效率和离子化效率不稳定有关。

实验中发现,固相萃取小柱是影响回收率的主要因素。若碱性氧化铝未活化,则苏丹红会随正己烷洗脱液流出,回收率小于50%。当活化氧化铝的用量大于2g时,苏丹红I和III很难被洗脱,回收率低于30%,II和IV的回收率在90%~98%之间;当活化氧化铝的用量小于1.1g时,情况正好相反,苏丹红II和IV在正己烷洗脱时就流出固相萃取柱。因此实验中活化氧化铝的用量为1.5g。

2.4 实际样品检测结果

对含苏丹红实际样品进行分析,部分样品的MS定量结果见表5。

表3 方法的最低检测限(μg/ml)

Table 3 Limit of detection of method (μg/ml)

	苏丹红 I	苏丹红 II	苏丹红 III	苏丹红 IV
DAD	0.1	0.15	0.1	0.1
MS(SIM)+(-MIC)	0.1	0.06	0.02	0.01

表4 方法精密度和回收率(n=5)

Table 4 Recovery and precision of method (n=5)

组分名称	加标水平(μg/ml)	平均回收率(%)		精密度(%)	
		DAD	ESI-SIM(+)	DAD	ESI-SIM(+)
苏丹红 I	5	82.8	83.3	2.11	4.91
	10	87.5	86.0	1.93	5.63
苏丹红 II	5	81.7	80.9	1.46	3.67
	10	84.3	84.2	1.27	4.05
苏丹红 III	5	80.3	79.8	2.24	4.27
	10	85.3	86.2	1.57	6.96
苏丹红 IV	5	80.6	79.0	1.69	3.86
	10	84.2	86.5	1.20	4.27

表5 实际样品中苏丹红的含量

Table 5 Detection results of Sudan contents in samples

样品编号	含量(μg/kg)			
	苏丹红 I	苏丹红 II	苏丹红 III	苏丹红 IV
1	2.00	—	—	0.80
2	4.68	—	—	—
3	3.51	—	—	1.1
4	17.69	—	—	1.3

注:“—”表示未检出。1为调味油(产地:重庆);2为辣椒油(产地:广州);3为肉酱(产地:成都);4为调味料(产地:长沙)。

3 结 论

本方法采用固相萃取技术对苏丹红样品进行前处理预分离,用高效液相色谱进行分离,二极管阵列检测器和质谱检测器串连检测。由于本方法采用了DAD和MS串连检测,能够排除假阳性检测结果,能够对可能含有苏丹红的样品进行准确、可靠、权威的分析检测。目前此方法已经用于食品添加剂苏丹红的分析检测。

参考文献:

- [1] MATYSIK F M. Non-aqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. J Chromatography A, 1998, 802: 349-354.
- [2] ZANOCCHI A L. Color index, society of dyes and colorists[M]. 3rd ed. New York: Springer-Verlag Inc., 1971: 132-136.
- [3] MITROWSKA K, POSYNIAK A. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man[J]. IARC Lyon, 1975, 8: 125-129.
- [4] Food Standards Agency. Products known to be affected with Sudan dyes [EB/OL]. (2330-05-09)[2007-11-10]. http://www.food.gov.uk/search?p=Q&mainresults=mt_mainresults_yes&ts=v2&w=sudan&submit.x=12&submit.y=9.
- [5] 王春燕, 潘炜. 食品中苏丹红染料的检测方法 - 高效液相色谱法[J]. 分析测试学报, 2005(22): 36-39.
- [6] GB/T 19861—2005 食品中苏丹红染料的检测方法: 高效液相色谱法[S].
- [7] 卢大用, 曹静懿. 现代层析技术在食品分析中的应用[J]. 食品科技, 1997(11): 25-27.