

# 基质固相分散术-UPLC法检测禽蛋中对位红和苏丹红

侯晓林<sup>1</sup>, 孙英健<sup>1</sup>, 吴国娟<sup>1</sup>, 苗虹<sup>2</sup>, 吴永宁<sup>2</sup>

(1.北京农学院动物科技系, 北京 102206; 2.中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050)

**摘 要:** 建立禽蛋中对位红和苏丹红 I~IV 号 5 种色素的液相色谱检测方法。采用基质固相分散术, 以氧化铝作基质分散基体, 混合均匀的样品用正己烷-丙酮(99.5:0.5, V/V)直接洗脱, 吹干后定容测定, 外标法定量。5 种色素的平均回收率为 63.8%~96.2%, 平均变异系数为 0.52%~10.07%, 检测限为 0.01~0.02 mg/kg。在检测的 100 个样品中, 1 例检出苏丹红 IV 号。

**关键词:** 禽蛋; 对位红; 苏丹红; 高效液相色谱; 基质固相分散

## Use of Matrix Solid-Phase Dispersion and Ultra Performance Liquid Chromatography for Determination of Para Red and Sudan I—IV in Egg Yolk

HOU Xiao-lin<sup>1</sup>, SUN Ying-jian<sup>1</sup>, WU Guo-juan<sup>1</sup>, MIAO Hong<sup>2</sup>, WU Yong-ning<sup>2</sup>

(1. Department of Animal Science, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract:** An ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method combined with matrix solid-phase dispersion (MSPD) was established for determination of para red and sudan I, II, III and IV in egg yolk. A total of 0.5 g egg yolk was mixed with 2 g of neutral alumina, then rinsed with 35 mL of hexane-acetone (0.5:99.5, V/V) through a 5 mL syringe. The eluent was heated to about 45°C with nitrogen blowing to dryness and redissolved for UPLC analysis. Mean recovery for the five dyes ranged from 63.8% to 96.2%, with coefficient variation at 0.52%—10.07%. One sample was found containing sudan IV among the 100 samples.

**Key words:** egg yolk; para red; sudan I—IV; ltra-performance liquid chromatography; maxtrix solid-phase dispersion  
中图分类号: O657.31 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2010)24-0285-04

苏丹红(sudan dyes)是一类人工合成的偶氮类、油溶性的化工染料, 广泛用于溶剂、油、蜡和汽油的增色以及鞋、地板的增光, 苏丹红 I、II、III、IV 已被国际癌症研究机构列为三类致癌物之一<sup>[1-2]</sup>, 禁止作为色素添加剂在食品和饲料中使用, 而其残留在动物体内对食用者的健康和生命安全都存在潜在危害。对位红化学结构与苏丹红相似, 具有相似毒性。对于该类化合物的检测, 主要检测方法有液相色谱法和液相色谱-质谱法<sup>[3-22]</sup>和气相色谱法<sup>[5]</sup>。提取净化方法集中于液相萃取和固相萃取。禽蛋及其制品黏性大, 不易分散, 利用国标<sup>[3]</sup>或传统有机溶剂萃取<sup>[4-22]</sup>, 提取效率较低, 往往需要耗费大量溶剂来提高回收率。

基质固相分散基本操作是将样品(固态或液态)直接与固相萃取材料一起混合研磨, 使样品均匀分散于固定相

颗粒的表面, 形成一个独特的色谱固定相, 将其装柱后依靠所选定的溶剂洗脱样品。它集合了传统样品的均质、组织细胞裂解、提取、过滤、净化等过程, 使样品的预处理变得简便, 同时也避免了目标物的损失。由于该方法具有简便、样品和溶剂用量少等优点而受到关注。本实验采用基质固相分散术提取和净化禽蛋中的苏丹红, UPLC 对其进行测定, 旨在为其鉴定方法的建立提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

对位红及苏丹红 I、II、III、IV 标准品 Sigma-Aldrich 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为新制的双蒸水; 中性氧化铝(100~200 目) 上海化学试剂公司, 使

收稿日期: 2010-01-07

基金项目: 北京市属高等学校人才强教计划项目(PXM2009\_014207\_077729); 国家“863”计划项目(2007AA06Z404)

作者简介: 侯晓林(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为兽医药理与毒理学。E-mail: hxlsx@163.com

用前 120℃ 烘干 3h, 然后置于干燥器内待用。

## 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱 UPLC-AQUITY 系统(配备自动进样器, 二元泵和二极阵列检测器) Waters 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 标准储备溶液配制

分别称取对位红、苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III 及苏丹红 IV 各 10.0mg(按实际含量折算), 用氯仿溶解并定容至 10mL。

### 1.3.2 色谱条件

色谱仪: Waters ACQUITY UPLC 配备 Photodiode Array(PDA)检测器。色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (50mm × 2.1mm, 1.7μm)。流动相: 乙腈 - 水(80:20, V/V)。流速 0.4mL/min、柱温 35℃、检测波长 500nm、进样体积 5μL。

### 1.3.3 样品处理

称取 2g 氧化铝置研钵中, 称取 0.5g 蛋黄置于氧化铝上, 将氧化铝和蛋黄充分研磨混合成均匀的粉状。后装入 5mL 空注射器中, 然后用 35mL 丙酮 - 正己烷(0.5:99.5, V/V)混合溶剂洗脱, 收集洗脱液, 并于 45℃ 条件氮吹浓缩至近干。用乙酸 - 乙腈(1:1000, V/V)将残渣重新溶解并定容至 1mL, 过 0.25μm 微孔滤膜, 滤液供色谱分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品处理条件的选择

#### 2.1.1 萃取条件的选择

由于禽蛋中蛋白质的含量较多, 用直接的液液萃取方法提取时不能有效地分散样品, 表面的一层蛋白质先变性后会将样品中心的色素包裹起来, 即使通过振荡等手段也很难将包被层破坏, 因此不能充分地提取样品。采用乙腈、正己烷和氯仿萃取的回收率均较低, 有的甚至低于 60%。因此, 本实验针对蛋类食品的特点, 选用了基质固相分散技术, 用氧化铝与样品一起研磨, 达到均匀后再装柱、洗脱。这样能使样品与氧化铝, 以及洗脱溶剂充分接触, 从而达到很好的提取效率。

#### 2.1.2 洗脱剂种类的选择

称取 10 份空白样品, 添加 100μg/kg 的苏丹红混合标准工作液, 分别用乙腈、三氯甲烷、丙酮正己烷作洗脱剂进行洗脱。实验结果表明: 氧化铝对上述 5 种色素的结合不紧密, 即使用正己烷淋洗, 各色素均有洗脱。因此, 本实验条件下, 省略了淋洗净化步骤, 采用洗脱剂对各色素直接洗脱。

实验发现完全用正己烷洗脱, 对位红的回收率较低, 即使将洗脱体积增加至 40mL, 回收率一般在 40%~

50% 左右。因此, 采用丙酮 - 正己烷(0.5:99.5, V/V)混合液进行洗脱, 5 种色素的回收率均比较满意。因此本研究初步确定用正己烷和丙酮的混合溶剂作为洗脱液。

### 2.1.3 洗脱剂体积的优化

为了确保 5 种苏丹红类染料能全部洗脱下来, 提高禽蛋中苏丹红染料的添加水平(200μg/kg), 采用丙酮 - 正己烷(0.5:99.5, V/V)洗脱, 收集洗脱液, 每 5mL 洗脱液收集, 累计到 35mL。结果表明, 收集的洗脱液总量在 35mL 以后, 洗脱液中不再检出待测物。故洗脱剂用量确定为 35mL。

### 2.2 校正曲线和线性范围

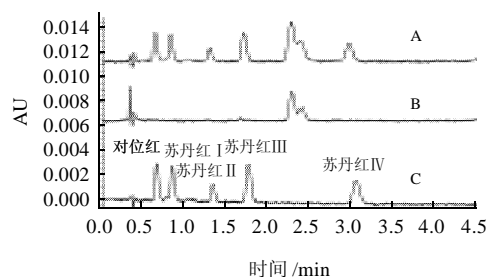
取 1.3.1 节配制的标准储备液分别用乙腈稀释, 配制成质量浓度为 0.025、0.05、0.10、0.20、0.40μg/mL 的混合标准溶液, 进液相色谱仪, 测定标准曲线及相关系数, 如表 2 所示。所有相关系数均大于 0.995, 表明在 0.025~0.40μg/mL 质量浓度范围, 5 种色素的响应具有很好的线性相关性(表 1)。5 种色素的浓度与色谱峰面积呈良好线性关系, 以 3 倍信噪比为检出限(LOD), 计算得出对位红、苏丹红 I、II、III、IV 的检出限分别为 0.01~0.02mg/kg。以 10 倍信噪比为定量下限(LOQ), 计算出对位红、苏丹红 I、II、III、IV 定量限分别为 0.03~0.06mg/kg。

表 1 5 种色素的标准曲线、检测限(LOD)和定量限(LOQ)

Table 1 Standard curves, limit of detection, and limit of quantification for the five colorants

样品	标准曲线	<i>r</i>	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
对位红	$y=49550x+715.49$	0.998	0.01	0.03
苏丹红 I	$y=38178x+2922.1$	0.998	0.01	0.03
苏丹红 II	$y=26585x+517.29$	0.998	0.02	0.06
苏丹红 III	$y=66369x+1725.1$	0.995	0.01	0.03
苏丹红 IV	$y=52795x+1304.5$	0.997	0.016	0.05

### 2.3 回收率与变异系数



A. 添加量为 0.2mg/kg; B. 空白样品; C. 0.1μg/mL 标准溶液。

图 1 UPLC-PDA 的典型色谱图

Fig.1 UPLC chromatogram of blank sample, sudan I—IV and para red standard, and blank sample spiked with the 5 compounds

表2 UPLC-PDA 检测方法的回收率、日内变异系数( $n=6$ )及日间变异系数  
Table 2 Recoveries, coefficients of variation for the UPLC-PDA method ( $n=6$ )

样品	添加量/(mg/kg)	第1日		第2日		第3日		平均值	
		回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
对位红	0.06	90.4	7.31	74.2	4.51	89.7	8.62	84.7	9.05
	0.2	80.0	5.00	94.3	4.51	93.3	5.77	89.2	8.95
	0.4	92.7	2.51	90.7	8.02	92.3	7.09	91.9	1.15
	0.6	98.7	1.52	94.3	3.06	95.6	3.51	96.2	2.35
苏丹红 I	0.06	74.4	4.59	88.6	6.75	89.4	4.97	84.1	6.26
	0.2	80.3	5.03	97.6	3.21	94.0	6.92	90.6	10.07
	0.4	96.3	3.05	96.7	4.93	95.7	5.13	96.2	0.52
	0.6	91.3	1.53	92.3	5.85	90.7	6.03	91.4	0.88
苏丹红 II	0.06	90.0	4.28	91.4	5.47	89.6	6.17	90.3	7.64
	0.2	89.7	4.26	92.3	6.81	91.0	7.55	91.0	1.43
	0.4	91.2	4.31	92.4	6.81	91.0	7.54	91.5	0.83
	0.6	96.3	3.06	96.7	4.93	95.7	5.13	96.2	0.52
苏丹红 III	0.06	85.2	6.45	91.6	6.62	90.8	5.48	89.2	7.20
	0.2	82.0	8.19	93.7	5.51	91.0	7.55	88.9	6.89
	0.4	82.7	6.81	89.3	7.09	91.3	5.51	87.8	5.13
	0.6	92.3	5.85	90.3	3.05	88.0	2.64	90.2	2.39
苏丹红 IV	0.06	65.5	6.21	66.4	4.52	69.8	5.62	67.2	7.64
	0.2	61.7	5.03	62.3	4.73	67.3	6.43	63.8	4.82
	0.4	63.0	2.65	65.7	1.53	66.3	5.50	65.0	2.70
	0.6	66.0	4.58	62.7	2.88	66.3	3.21	65.0	3.07

采用外标法定量,以阴性样品为测试样品,添加不同质量浓度水平的苏丹红,每个水平做6个平行样,计算回收率和变异系数(CV),结果见表2。5种色素的日内回收率范围为61.7%~98.7%,变异系数为1.53%~7.55%。日间平均回收率为63.8%~96.2%,变异系数为0.52%~10.07%。其中苏丹红IV的回收率略低。典型色谱图见图1。

#### 2.4 实测样本

应用所建立的方法,在北京市超市随机抽检100个样品,其中有一例样品检出苏丹红IV,其含量为0.3mg/kg。色谱图见图2。

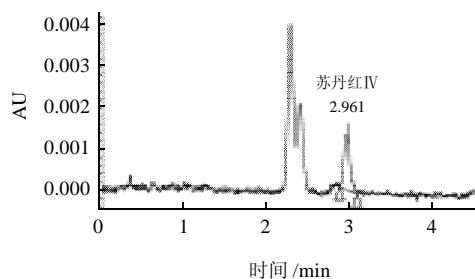


图2 UPLC-PDA 方法测定的苏丹红IV阳性样品  
Fig.2 UPLC chromatogram one sample containing sudan IV

### 3 结论

采用氧化铝为固相载体,利用固相基质分散技术

术,建立禽蛋中对位红、苏丹红 I、II、III、IV号5种色素的液相色谱测定方法。该方法较为简单、方便,节省时间和溶剂。回收率和稳定性满足该类色素测定的要求,建议推广使用。

#### 参考文献:

- [1] STIBOROVÁ M, MARTINEK V, RÝDLOVÁ H, et al. Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 and liver microsomes[J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5678-5684.
- [2] American Spice Trade Association (ASTA). Sudan red and related dyes -white paper[EB/OL]. <http://www.astaspice.org/files/public/SudanWhitePaper.pdf>.
- [3] GB/T19681—2005 食品中苏丹红染料的检测方法高效液相色谱法[S].
- [4] 湛社霞. SPE-HPLC法测定食品中苏丹红方法改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2349-2350.
- [5] HE Limin, SU Yijuan, FANG Binghu. Determination of sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2007, 594: 139-146.
- [6] MA Ming, LUO Xubiao, CHEN Bo, et al. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006, 1103: 170-176.
- [7] 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 Agri Food Chem, 2006, 54: 639-644.
- [8] DONNA L, MAIUOLO L, MAZZOTTI F, et al. Assay of sudan I contamination of foodstuff by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and isotope dilution[J]. Anal Chem, 2004,

- 76: 5104-5108.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] MAZZETTI M, FASCIOLI R, MAZZONCINI I, et al. Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC cleanup and HPLC with LC/MS confirmation[J]. *Food Addit Cont*, 2004, 21(10): 935-941.
- [12] ZHANG Yuping, ZHANG Yijun, GONG Wenjun, et al. Rapid separation of sudan dyes by reverse-phase high performance liquid chromatography through statistically designed experiments[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1098(1/2): 183-187.
- [13] ZHANG Yan, WU Hailong, XIA Alin, et al. Interference-free determination of sudan dyes in chilli foods using second-order calibration algorithms coupled with HPLC-DAD[J]. *Talanta*, 2007, 72(3): 926-993.
- [14] TATEO F, BONONI M. Fast determination of sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chilli, spices, and oven-baked foods[J]. *J Agri Food Chem*, 2004, 52: 655-658.
- [15] ERTAS E, OZER H, ALASALAR C. A rapid HPLC method for determination of sudan dyes and para red in red chilli pepper[J]. *Food Chem*, 2007, 105: 756-760.
- [16] HOU Xiaolin, LI Yonggang, WU Guojuan, et al. Determination of para red, sudan dyes, canthaxanthin and astaxanthin in animal feeds using UPLC[J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(1): 22-25.
- [17] NAGASE M, OSAKI Y, MATSUEDA T. Determination of methyl yellow, sudan I and sudan II in water by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1989, 465(2): 434-437.
- [18] DAOOD H G, BIACS M A. Simultaneous determination of sudan dyes and carotenoids in red pepper and tomato products by HPLC[J]. *J Chromatogr Sci*, 2005, 43(9): 461-465.
- [19] ZHANG Yantu, ZHANG Zhujun, SUN Yonghua. Development and optimization of an analytical method for the determination of sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated  $\text{BrO}^-$ -luminol chemiluminescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1129: 34-40.
- [20] SUN Hanwen, WANG Fengchi, AI Lianfeng. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1164(1/2): 120-128.
- [21] BOTEK P, POUSTKA J, HAJŠLOVA J. Determination of banned dyes in spices by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Czech J Food Sci*, 2007, 25: 17-24.
- [22] HOU Xiaolin, LI Yonggang, CAO Shujun, et al. Analysis of para red and sudan dyes in egg yolk by UPLC-MS-MS[J]. *Chromatographia*, 2010, 71: 135-138.