

高效液相色谱法测定熟肉制品中罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G 方法的研究

刘瀚升

朝阳市疾病预防控制中心，辽宁 122000

摘要:目的 建立熟肉制品中罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G 十种工业染料的高效液相色谱同时测定的方法。方法采用高效液相色谱法,以乙腈-乙酸铵水溶液为流动相,采用梯度洗脱,以紫外检测器(UVD)定性定量测定熟肉制品中罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G。结果 在添加浓度 $2.0\mu\text{g/mL}$ ~ $8.0\mu\text{g/mL}$ 范围内,10 种工业染料的回收率在 82.7%~93.9%之间,相对标准偏差(RSD)为 0.79%~4.24%。结论 本方法经实际应用证明,具有良好的稳定性和重现性,步骤简单,可操作性强,便于推广。

关键词:高效液相色谱; 十种工业染料; ; 测定

Study on Determination of cooked meat products in Luo Danming B, I, II, III, tonyred, basic orange IV by high performance liquid chromatography in 2, 21, 22, acid orange II, red 2G method

LIU Han-Sheng

罗丹明B、苏丹红I、II、III、IV、碱性橙2、21、22、酸性橙II、红2G都是人工合成的工业染料,通常用于纺织品、皮革制品及木制品、棉、麻、羊毛、腈纶、皮革、纸浆、烟草、纸张、羽毛、草(或木、竹)制品的染色,增色以及上光等作用,也用于制色淀。这些人工合成的工业染料如果在食品加工中使用,人食用后可能会引起食物中毒,长期食用甚至会致癌。我国已在《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》及《中华人民共和国食品卫生法》中明确规定,以上染料为禁止用作食品添加剂的化学制剂,严禁在食品中使用。自我国食品安全风险监测工作开展以来,各地对食品添加剂和非食品添加剂在食品加工中的使用进行了广泛的监测^{[1][2]}。

对于检验食品中碱性橙染料、苏丹红染料、红2G染料国家先后出台了GB/T 23496-2009^[3]、GB/T 19681—2005^[4]、SN/T 2430-2010^[5]等标准检验方法。经过实验研究,应用高效液相色谱法,对熟肉制品中罗丹明B、苏丹红I、II、III、IV、碱性橙2、21、22、酸性橙II、红2G十种工业染料进行同时测定。

作者简介:刘瀚升(1981-12-31),男,辽宁朝阳人,汉族,学士,主管检验技师,主要要就方向为理化检验

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪（LC—2000 高效液相色谱仪，配有紫外可见光检测器，日本日立公司）；Milli-Q Academic 超纯水机(美国密理博)；分析天平（XS205DU 1/10 万电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司）；高速离心机（北京京立）；匀浆机。

1.2 试剂

丙酮、乙腈、三氯甲烷（均为色谱纯）；乙酸铵、乙酸（均为优级纯）；丙酮水溶液：吸取90.0mL 丙酮用纯水定容至100mL。

1.3标准曲线的制备

1.3.1 标准物质：红2G（纯度90.0%）、酸性橙Ⅱ（纯度97.4%）、罗丹明B（纯度99.0%）、碱性橙2（纯度99.6%）、碱性橙21（纯度99.7%）、碱性橙22（纯度100.0%）、苏丹红Ⅰ（纯度91.0%）、苏丹红Ⅱ（纯度87.0%）、苏丹红Ⅲ（纯度96.0%）、苏丹红Ⅳ（纯度87.0%）；（德国Dr.Ehrenstorfer公司）

1.3.2 标准贮备液：分别称取红 2G（0.0111g）、酸性橙Ⅱ(0.0103)、罗丹明 B(0.0101)、碱性橙 2（0.0100）、碱性橙 21（0.0100）、碱性橙 22（0.0100）、苏丹红Ⅰ（0.0110g）、苏丹红Ⅱ（0.0115g）、苏丹红Ⅲ（0.0104g）及苏丹红Ⅳ各（0.0115g）（按实际含量折算后为 10.0mg），罗丹明 B、碱性橙 2、21、22、酸性橙Ⅱ、红 2G 分别用纯水定容至 10mL 容量瓶中，苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 分别用三氯甲烷定容至 10mL 容量瓶中，配制成 $\rho=1.00\text{mg/mL}$ 的标准储备液单标。

1.3.3 标准使用液：于50mL容量瓶中加入20mL乙腈，分别准确吸取标准储备液各1.00 mL至容量瓶中，用乙腈定容，配制成20 $\mu\text{g/mL}$ 混标溶液。

1.3.4 标准曲线的制备：分别取混合标准使用液0.50、1.00、2.00、4.00、5.00 mL，用乙腈定容至10mL，配制浓度为1.0、2.0、4.0、8.0、10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列。

1.4 样品测定

样品提取：取 2.00g 样品匀浆至带刻度 50mL 离心管，加入丙酮水溶液（丙酮：水=90:10）10.0mL 浸泡放置过夜后超声提取 20min，10000r/min 离心 10min，取上清液用 0.45 μm PTFE 滤膜过滤后上机测定。

1.5 色谱条件

1.5.1 色谱柱：Apollo C18（5 μ m 4.6mm \times 250mm GRACE）。

1.5.2 流动相：

A：0.02mol/L 乙酸铵：每 1L0.02mol/L 乙酸铵溶液加入 1‰（V/V）乙酸水溶液 6mL； B：乙腈。

1.5.3 条件：见表 1

表 1 梯度洗脱参数表

流速 (mL/min)	时间 (min)	流动相		曲 线
		0.02mol/L 乙酸铵	乙腈	
1.0	0.0	90.0	10.0	线性
1.0	3.0	60.0	40.0	线性
1.0	18.0	30.0	70.0	线性
1.0	22.0	20.0	80.0	线性
1.0	33.0	10.0	90.0	线性
1.0	33.1	0.0	100.0	线性
1.0	45.0	0.0	100.0	线性
1.0	45.1	10.0	90.0	线性

1.5.4 检测波长

红 2G、酸性橙 II： λ =500nm；碱性橙 2： λ =445nm；罗丹明 B： λ =550nm 碱性橙 21： λ =485nm；苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 22： λ =500nm。

1.5.5 柱温：40℃；进样体积：10 μ L；采样时间：55min

1.6 样品测定：吸取 10 μ L 样品处理液，按标准曲线制备检测色谱条件对样品进行测定。与标样对照，根据峰保留时间定性以及相应峰面积定量。

2. 结果与讨论

2.1 标准曲线的线性回归方程、相关系数、检出限及最低检测浓度 测定结果见表 2.

表 2 十种工业染料标准回归方程、相关系数、检出限及最低检测浓度

组分名	回归方程	相关系数	检出限 (μ g/mL)	最低检出浓度 (mg/kg)
红 2G	Y=19995X-6061	r=0.9995	0.060	0.30
酸性橙 II	Y=33573X-1039	r=0.9999	0.036	0.18

碱性橙 2	$Y=39781X-522.7$	$r=0.9999$	0.030	0.15
罗丹明 B	$Y=120840X-1874$	$r=0.9999$	0.010	0.05
碱性橙 21	$Y=42986X+7368$	$r=0.9993$	0.028	0.14
苏丹红 I	$Y=49303X-853.4$	$r=0.9999$	0.024	0.12
碱性橙 22	$Y=29304X+166.6$	$r=0.9999$	0.041	0.20
苏丹红 II	$Y=27414X+12705$	$r=0.9996$	0.044	0.22
苏丹红III	$Y=45342X+446.38$	$r=0.9998$	0.026	0.13
苏丹红IV	$Y=44065X-503.9$	$r=0.9999$	0.027	0.14

2.2 十种工业染料最大吸收峰和梯度洗脱参数的选择

分别取十种工业染料浓度均为 $10\mu\text{g/mL}$ 的溶液，在比色计上进行最大吸收峰的检测，检测结果见图 1、图 2：

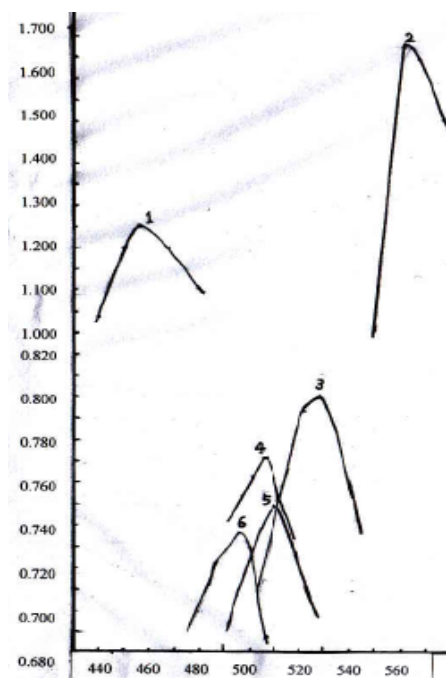


图 1 1 碱性橙、 2 罗丹明 B、 3 苏丹红 IV、4 碱性橙 22、5 苏丹红 III、6 碱性橙 21 最大吸收峰

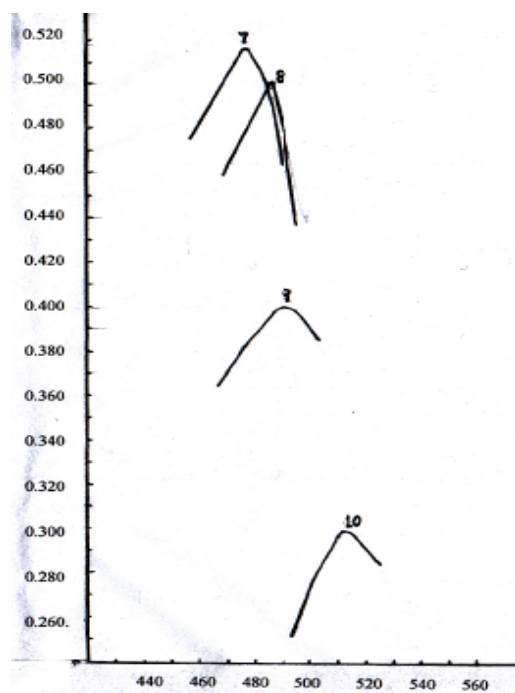


图2 7 苏丹红 I、8 酸性橙 II、9 苏丹红 II、10 红 2G 最大吸收峰

根据测定的最大吸收波长结果，红 2G 为 510nm、酸性橙 II 为 485 nm、碱性橙 2 为 445 nm、罗丹明 B 为 550 nm、碱性橙 21 为 485nm、苏丹红 I 为 475nm、碱性橙 22 为 495nm、苏丹红 II 为 495nm、苏丹红 III 为 500nm、苏丹红 IV 为 515nm。如果为了每种待测物都追求最大吸收峰而频繁变换检测波长，加上梯度洗脱的作用和待测物质的多样性，对试验的稳定性影响较大，对待测物的灵敏度没有太多提高，由于出峰时间比较接近，导致有些物质的峰不能完全分开。

经过实验条件的优化，把红 2G 和酸性橙 II 统一设定为 500nm，碱性橙 2 设定为 445 nm、罗丹明 B 设定为 550 nm、碱性橙 21 设定为 485nm，苏丹红 I、碱性橙 22、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 的最大吸收峰比较接近，可以统一设定为 500nm，得到了满意的实验结果（见图 3），试剂空白的色谱图（见图 4）。特别注意一下色谱峰 11 为每次梯度结束所产生的色谱峰，不要误判为是一种待测组分。

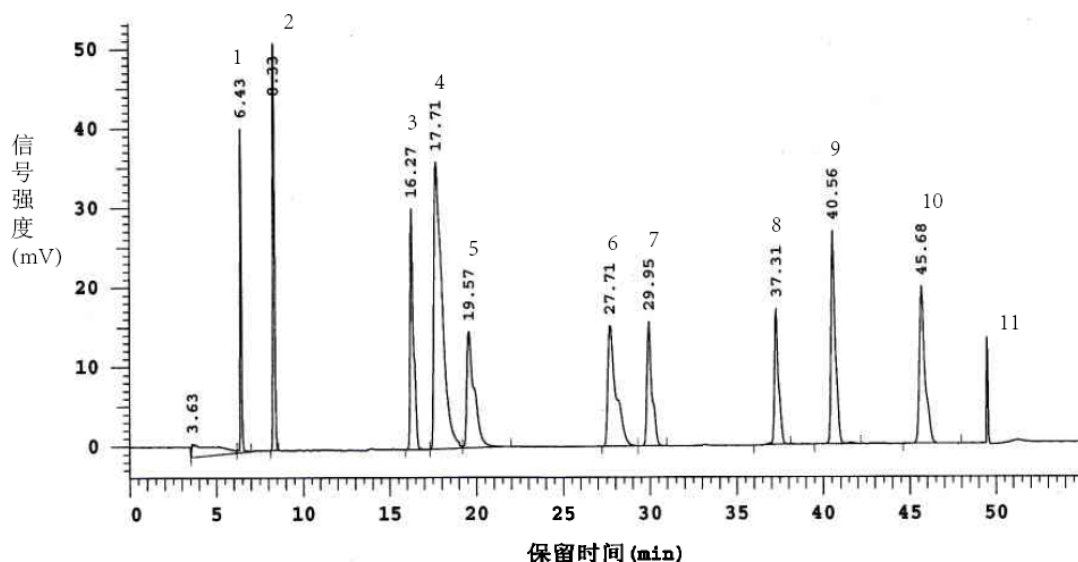


图3 十种工业染料标准物质色谱图

色谱峰 1—红 2G、2—酸性橙 II、3—碱性橙 2、4—罗丹明 B、5—碱性橙 21、6—苏丹红 I、7—碱性橙 22、8—苏丹红 II、9—苏丹红 III、10—苏丹红 IV

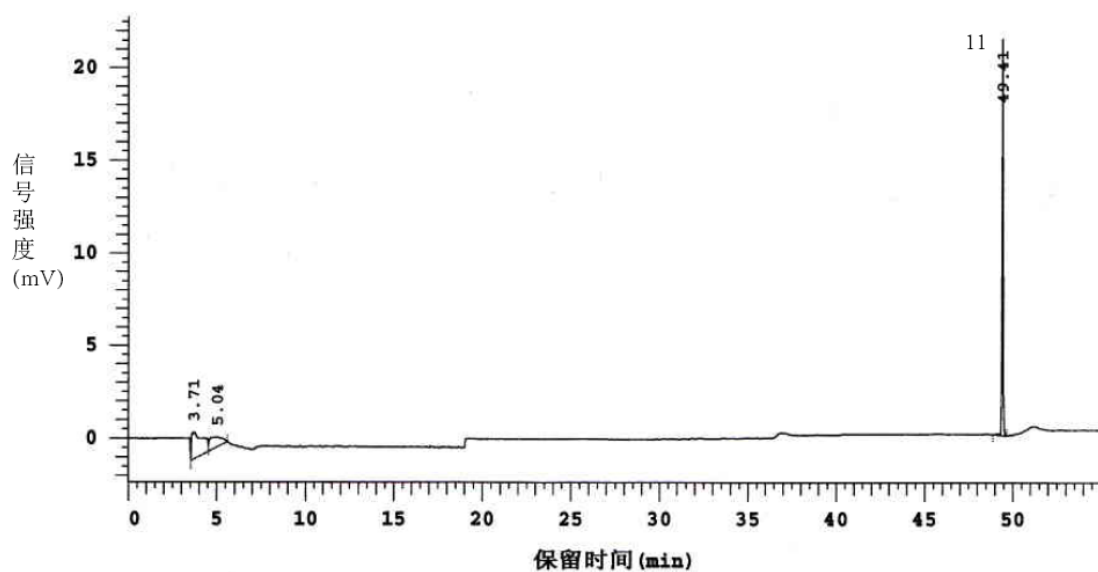


图4 试剂空白色谱图

2.3 精密度与准确度

按照本文方法检测熟肉制品中的十种工业染料，另随机向其中一种烤肠中加入加入 2.0 ($\mu\text{g/mL}$)、加入 5.0 ($\mu\text{g/mL}$)、加入 8.0 ($\mu\text{g/mL}$) 三种不同浓度的十种工业染料混合标液，每个浓度的水平样品平行测定 6 次。十种工业染料 3 个浓度水平的平均回收率在 82.7%~93.9%之间。相对标准偏差 (RSD) 0.79%~4.24% ($n=6$,表 3)。

表 3 烤肠中十种工业染料的加入回收率和相对标准偏差测定结果 (n=6)

组分名称	加入 2.0 (μg/mL)		加入 5.0 (μg/mL)		加入 8.0 (μg/mL)	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
红 2G	84.2	3.63	87.8	1.48	86.6	1.68
酸性橙 II	82.7	2.87	86.9	0.98	88.3	0.84
碱性橙 2	89.5	3.18	93.9	1.65	92.5	2.13
罗丹明 B	87.2	4.24	91.8	2.12	90.2	0.92
碱性橙 21	88.4	2.70	94.4	2.57	91.6	1.34
苏丹红 I	89.1	2.09	92.3	1.76	92.8	1.65
碱性橙 22	84.8	3.29	87.7	3.05	89.0	1.97
苏丹红 II	86.7	2.97	88.5	2.43	87.6	0.79
苏丹红 III	82.9	3.73	87.3	2.06	85.3	0.91
苏丹红 IV	85.3	4.12	86.6	2.65	85.9	1.73

3.结论

本方法通过高效液相色谱法,能够同时准确的定量分析出熟肉制品中含有的微量的罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G 共十种工业染料。不同待测组分的色谱峰分离效果很好,并具有良好的重现性、稳定性,操作简便,可操作性强。实际应用后证明本方法可以满足熟肉制品中罗丹明 B、苏丹红 I、II、III、IV、碱性橙 2、21、22、酸性橙 II、红 2G 十种工业染料的同时检测。

参考文献:

- [1] 许丹,郑创亮,余泳红,冯秀琼,戴冉,李敏. 萝岗区市售食品中添加剂使用情况调查[J]. 实用预防医学. 2012(09):1349-1350.
- [2] 张磊,李瑞,郑晓南,宋晓昀. 2012 年大连市食品中食品添加剂监测结果分析[J].实用预防医学.2013(07):832-834.
- [3] 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[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [4] GB/T 19681-2005 食品中苏丹红染料的检验方法 高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出

版社,2005.

[5] SN/T 2430-2010 进出口食品中罗丹明 B 的检验方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.