

番茄酱中 10 种工业染料的测定

Simultaneous determination of 10 industrial dyes in ketchup

关键词

液相色谱；二极管阵列检测器；Acclaim C18；番茄酱；工业染料

Key words: HPLC; DAD; Acclaim C18; Ketchup; Industrial dye

引言

食用着色剂是使食品着色和改善食品色泽的物质，通常有食用合成色素和食用天然色素两大类。在食品加工过程中，为求得食品色泽艳丽或保持原有色泽，增进人们食欲并提高食用价值，往往需要添加着色剂。而工业染料是用于纺织品、皮革制品以及木制品着色的物质，以偶氮型和蒽醌型结构为主，长期使用会产生致敏或致癌作用。随着科学技术的不断进步，有一些不法商贩为了降低番茄酱的生产成本，提高番茄酱的卖相，非法添加一些工业染料来获得利润，置民众的健康于不顾，产生了诸如“苏丹红”、“罗丹明 B”等重大食品安全事件。为此，我国卫生部于 2008 年公布的第一批《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名单》中已明确指出工业染料为非食用物质。

测试条件

仪器：Ultimate 3000 系统；包括带在线脱气单元的双三元梯度泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器；

分析柱：Acclaim™ 120 C18 (4.6 X 250 mm, 5 μm)；

柱温：35 °C；

检测波长：500 nm；

进样量：10 μL；

流动相组成、流速及梯度：见表 1；



表 1. 流动相组成、流速及梯度

时间 (min)	A (乙腈) %	B (20mM 乙酸铵/0.4%乙酸水溶液) %	流速 (mL/min)
0	10	90	1
5	10	90	1
7	30	70	1
20	100	0	1
33	100	0	1
35	10	90	1

样品前处理

称取 2.000 g 番茄酱样品，加提取溶剂乙腈 4 mL，涡旋混合 1 min，后 4000 r/min 冷冻离心 1 min，然后超声波萃取 20 min，中间振摇 2 次，再 15000 r/min 冷冻离心 5 min，取上清液氮吹至干，然后再用 2.5 mL 乙腈复溶，混匀，再加 2.5 mL 的水定容至 5 mL，经聚四氟乙烯滤膜过滤，待测。

结果和讨论

标准溶液分离谱图

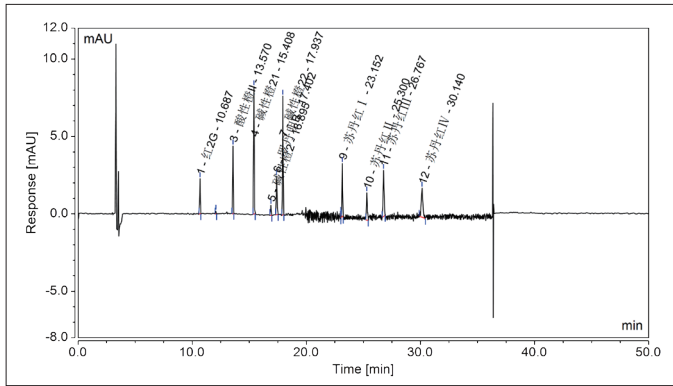


图 1. 10 种工业染料混标在 500 nm 检测波长时的色谱图 (浓度为 0.5 mg/L)

样品分离谱图

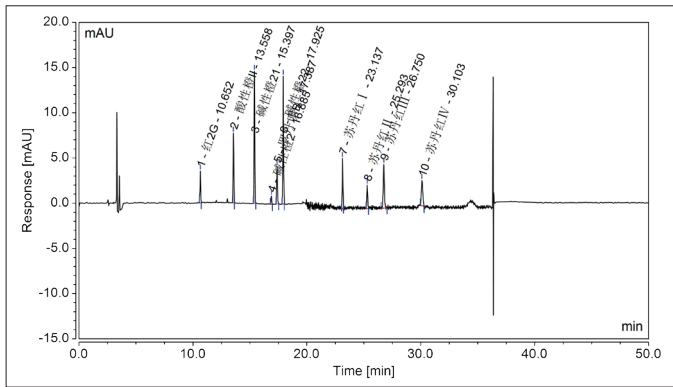


图 2. 番茄酱加标样品 (Sample+2.5 mg/kg) 在 500 nm 的紫外吸收谱图

前处理方法优化 - 不同溶剂提取效果比较

根据 10 种工业染料的物理性质, 对不同提取溶剂经对 10 种工业染料的提取效果进行测试, 测试指标为加标回收率。称取样品 (某品牌番茄酱) 2.00 g 左右, 加提取溶剂 4 mL, 涡旋混合、超声波萃取、高速冷冻离心, 取上清液定容至 5 mL, 混匀, 膜过滤。

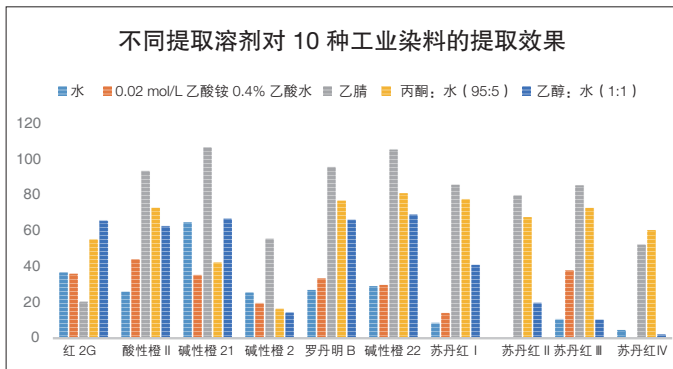


图 3. 不同溶剂提取对 10 种工业染料的提取效果比较

如图 1 所示, 乙腈提取效果最好, 不仅能兼顾 10 种工业染料, 而且每一种的回收率都比较高; 但是乙腈和丙酮: 水 (95:5) 比较发现, 红 2G 的结果差异比较大, 乙腈提取的回收率为 20%, 丙酮: 水 (95:5) 的回收率为 55%, 从兼顾检测种类和回收率高低来讲, 选择乙腈提取效果更好。

除了利用上述溶剂进行提取, 还测试了乙腈和水混合提取、乙腈和 0.02 mol/L 乙酸铵 0.4% 乙酸水混合提取, 提取之后乙腈和水相分层, 无法精确测定, 所以未选择乙腈和水相的混合提取。

前处理方法优化 - 提取次数对提取效果的影响

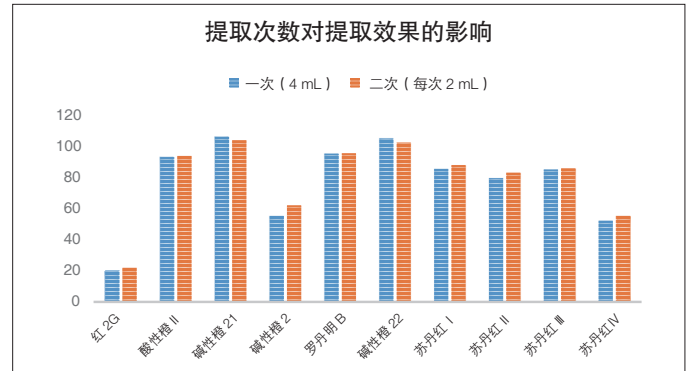


图 4. 提取次数对提取效果的影响

根据称样量和乙腈溶剂提取效果, 测试了 4 mL 单次提取和 2mL 分两次提取, 比较其测试结果。

如图 4 所示, 提取次数对提取效果没有太大影响, 可能是由于番茄酱的主要成分是碳水化合物, 样品成分比较简单, 所以采用一次 4mL 的提取方式, 可以满足要求。

前处理方法优化 - 滤膜对工业染料吸附的影响

工业染料作为服装的主要染色剂, 是一类表面活性剂, 有很强的附着力。所以考察尼龙膜和聚四氟乙烯膜对工业染料的吸附效能, 避免因为膜过滤带来的检测结果不准确。

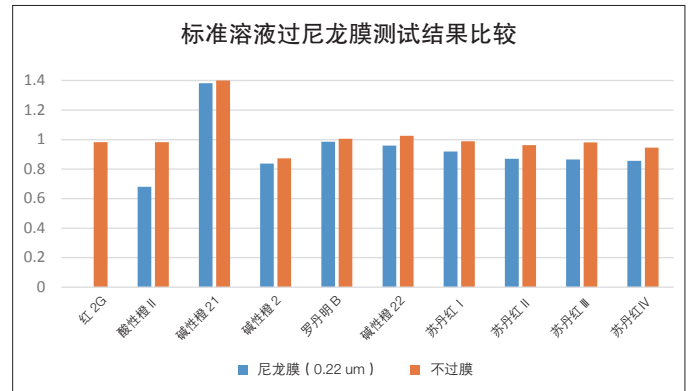


图 5. 尼龙膜过滤对测试结果的影响

如图 5 和图 6 所示，尼龙膜过滤对红 2G 有很强的吸附作用，1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的标准溶液经尼龙膜过滤之后未检出；而聚四氟乙烯膜对检测结果影响比较小，可以作为样品净化的一部分来使用，防止色谱柱的污染和堵塞。

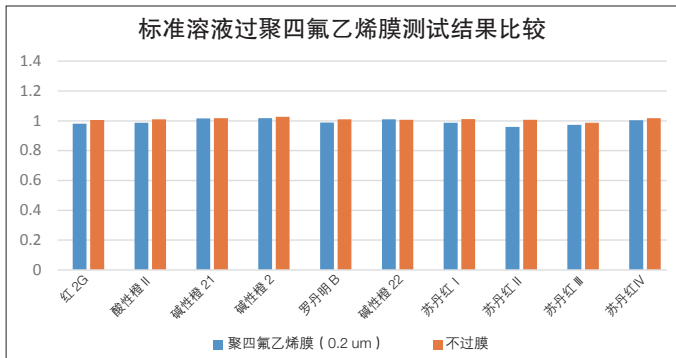


图 6. 过聚四氟乙烯膜对测试结果的影响

前处理方法优化 - 定容溶剂对红 2G 测定的影响

在测试过程中红 2G 在低浓度下的响应很低，无法满足国家风险监测计划对检出限的要求。经研究，发现定容溶剂（纯乙腈）带来的溶剂效应非常强。相对而言，红 2G 在 C18 色谱柱上的保留较弱，采用纯乙腈进行定容，红 2G 会在 C18 色谱柱发生扩散，导致色谱峰峰展宽变大，而固定浓度的测试液峰面积是不变的，峰宽变宽导致峰高变矮，灵敏度降低，检出限降低。

通过调整定容溶剂来改变红 2G 的峰展宽，提高测定灵敏度和检出限，保证测试结果的准确性；选择定容溶剂时还得兼顾脂溶性工业染料（苏丹类工业染料）的溶解性。结果如图 7 所示，相比较 10% 水乙腈的定容溶剂，1 $\mu\text{g/mL}$ 的红 2G 标准溶液在纯水和 50% 的乙腈水中的峰形更好，峰扩散更小，信噪比更高，有利于样品结果的准确测定；为了兼顾苏丹类工业染料的溶解性，选择 50% 的乙腈水作为定容溶剂。

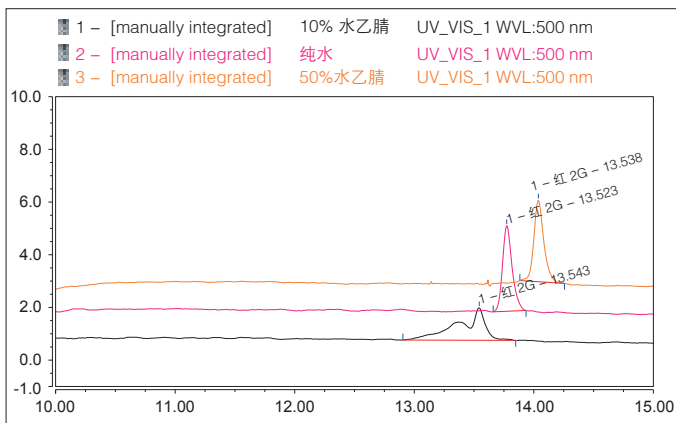


图 7. 不同定容溶剂对 1 $\mu\text{g/mL}$ 的红 2G 测试结果的影响

样品测定结果

表 3. 样品测定数据

样品	红 2G	酸性橙 II	碱性橙 21	碱性橙 22	碱性橙 2	罗丹明 B	苏丹红 I	苏丹红 II	苏丹红 III	苏丹红 IV
080	测定浓度 (mg/kg)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
299	测定浓度 (mg/kg)	---	---	2.35	---	0.60	4.85	5.55	---	---
某品牌番茄酱	测定浓度 (mg/kg)	---	---	---	---	---	---	---	---	---

加标回收实验

取浓度各为 5 mg/L 的混合标准溶液 0.8 mL，添加到 2 g 样品中，相当于原样加 0.8 mg/L，经前处理后，进行测定。测定加标回收率见表 4。

表 4. 加标回收率数据

样品	红 2G	酸性橙 II	碱性橙 21	碱性橙 22	碱性橙 2	罗丹明 B	苏丹红 I	苏丹红 II	苏丹红 III	苏丹红 IV
080	加标样品 (mg/L)	0.734	0.796	0.818	0.668	0.808	0.843	0.7895	0.740	0.795
	样品浓度 (mg/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	加标量 (mg/kg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	回收率 (%)	91.8	99.5	102.3	83.5	101.0	105.4	98.7	92.5	99.4
299	加标样品 (mg/L)	0.419	0.794	1.248	0.746	1.746	0.854	1.905	0.673	0.732
	样品浓度 (mg/L)	---	---	0.468	0.099	0.955	---	1.121	---	---
	加标量 (mg/kg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	回收率 (%)	52.4	99.3	97.5	80.9	98.9	106.8	98.0	84.1	91.5

检测限和定量限

以 1.25 mg/kg 的加标样品谱图为标准谱图，获得峰高和基线噪音，3 倍噪音峰高为检测限，10 倍噪音峰高为定量限，获得的检测方法最低检测限和定量限见表 5。

表 5. 方法检测限和定量限

组分	检测限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
红 2G	0.17	0.55
酸性橙 II	0.05	0.16
碱性橙 21	0.02	0.05
碱性橙 2	0.24	0.79
罗丹明 B	0.07	0.24
碱性橙 22	0.04	0.12
苏丹红 I	0.28	0.93
苏丹红 II	0.46	1.52
苏丹红 III	0.31	1.02
苏丹红 IV	0.59	1.96

标准工作曲线

选 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 mg/L 七个浓度混标做标准曲线, 结果如表 6。

表 6. 标准曲线数据

Peak Name	Cal. Type	Points	Coef. Det.	Offset	Slope
红 2G	Lin, WithOffset	7	0.99971	-0.0042	0.2743
酸性橙 II	Lin, WithOffset	7	0.99951	-0.0111	0.5202
碱性橙 21	Lin, WithOffset	7	0.99922	-0.0491	1.0650
碱性橙 22	Lin, WithOffset	7	0.99857	-0.0068	0.0993
碱性橙 2	Lin, WithOffset	7	0.99945	-0.0084	0.3776
罗丹明 B	Lin, WithOffset	7	0.99956	-0.0886	1.0974
苏丹红 I	Lin, WithOffset	7	0.99948	-0.0159	0.4752
苏丹红 II	Lin, WithOffset	7	0.99898	0.0003	0.2856
苏丹红 III	Lin, WithOffset	7	0.99936	-0.0108	0.6725
红 2G	Lin, WithOffset	7	0.99976	0.0210	0.5952

结论

本方法参照《2015 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》和《2015 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中有关工业染料的检测方法进行的相关测试。

本文对手册中的样品的前处理方法进行了研究, 对比发现乙腈的提取效果更好, 回收率更高; 滤膜材质对红 2G 的测试结果的影响很大, 聚四氟乙烯材质的滤膜对工业染料的吸附较小, 能够提高测试结果的准确性; 定容溶剂对红 2G 峰展宽有较大影响, 提高定溶液水相的比例有助于降低红 2G 的峰扩散效应, 提高红 2G 的灵敏度和检出限。



赛默飞色谱及痕量元素分析

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

www.thermofisher.com

全国服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

thermo
scientific

A Thermo Fisher Scientific Brand