

高效液相色谱-柱后在线光化学衍生荧光检测法 测定辣椒油中4种苏丹红染料

刘 珺¹, 弓振斌^{1,2*}

(1. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了在线光化学衍生-荧光检测-高效液相色谱(HPLC)测定辣椒油中苏丹红 I、II、III 和 B 的方法。以乙腈-水为流动相,采用梯度洗脱方式在 SB-C18 色谱柱上分离。用实验室自制的程序控制时间/光强光化学反应器作为在线衍生装置,优化了光衍生反应的条件和荧光检测条件。3 种不同加标浓度下,辣椒油样品中 4 种苏丹红染料的加标回收率为 81.3%~100.4%。加标水平为 0.8 mg/kg 下荧光信号强度的相对标准偏差(RSD, $n=6$)为 2.6%~3.8%。苏丹红 I、II、III 和 B 的检出限(LOD)和定量限(LOQ)范围分别为 0.009~0.054 mg/kg 和 0.030~0.181 mg/kg,优于传统的 HPLC 分离、二极管阵列检测器检测方法。该方法具有简单、灵敏、选择性好的特点,适用于食品样品中苏丹红的常规分析。

关键词: 高效液相色谱法; 在线光化学衍生; 荧光检测; 苏丹红染料; 辣椒油

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)06-0624-06

Determination of four Sudan dyes in chili oil by high performance liquid chromatography with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection

LIU Jun¹, GONG Zhenbin^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Oceanography & Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A method for the measurement of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan B in chili oil using high performance liquid chromatography (HPLC) with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection has been developed. The Sudan dyes were separated on an SB-C18 column in a single run by the mixed mobile phase of acetonitrile-water with a gradient program. A laboratory-built time/energy programmed photochemical reactor (PCR) with an ultraviolet mercury lamp was installed between a photodiode array detector (PDA) and a fluorescence detector (FLD), and it was applied to convert the non-or weakly fluorescent Sudan dyes into fluorescence emission components. The photochemical derivatization conditions and fluorescence detection parameters have been investigated and optimized. The recoveries of the standards spiked in real chili oil samples for all the dyes were 81.3%–100.4%. The relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of the fluorescence signal intensity at the spiked level of 0.8 mg/kg were 2.6%–3.8%. The limits of detection (LODs) were in the range of 0.009–0.054 mg/kg and the limits of quantification (LOQs) were 0.030–0.181 mg/kg, which were better than those of the commonly used HPLC coupled with PDA. The developed method which is simple, sensitive, and selective can be applied to the routine analysis of Sudan dyes.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); on-line photochemical derivatization; fluorescence detection; Sudan dyes; chili oil

* 通讯联系人: 弓振斌, 博士, 教授, 主要研究方向为海洋分析化学、海洋地球化学. Tel: (0592) 2186222, E-mail: zhgong@xmu.edu.cn.

基金项目: 美国 Agilent 公司高等学校研究基金项目.

收稿日期: 2012-01-12

苏丹红是一类人工合成的以苯基偶氮萘酚为主要基团的偶氮染料,其外观为暗红色或深黄色片状体,是亲脂性化合物,常用于溶剂、油、蜡、汽油的增色及鞋、地板的增光^[1],也用于生化毒理学研究中的着色。由于苏丹红染料具有潜在的致癌性,我国和欧盟都禁止将其添加在食品中^[2,3]。

苏丹红的测定方法主要有分光光度法^[4-6]、薄层色谱法(TLC)^[7-10]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[11-13]、高效液相色谱法(HPLC)^[14-20]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[21-24]等。HPLC-紫外-可见光检测器(UVD)法是我国和欧盟制定的苏丹红检测的标准方法^[25,26];对阳性样品,欧盟则建议采用 LC-MS 进行确认。为了提高标准方法的可靠性,使用 MS 检测器是常用的选择,但由于设备昂贵、成本高,不利于大批量样品的快速测定。通过使用选择性比 UVD 好的荧光检测器(FLD),可改善方法的可靠性。同时由于 FLD 具有选择性好、灵敏度高、装置价格低廉等优点,为大批量样品中苏丹红的快速测定提供了新的技术手段。

为了实现采用 HPLC-FLD 测定苏丹红,需要对其进行衍生,使其转变为能产生荧光的化学结构。本文采用实验室自制的程序控制时间/光强光化学反应器(photochemical reactor, PCR)对苏丹红组分进行在线光化学衍生,建立了 LC 分离-在线光化学衍生-荧光检测法用于测定辣椒油中的苏丹红 I、II、III 和 B。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

乙腈(色谱纯, Tedia 公司), 甲酸(分析纯, 汕头市达濠精细化学品有限公司), 水为超纯水。

苏丹红标准品为 Sudan I (纯度 97%)、Sudan II (纯度 90%)、Sudan III (纯度 96%)、Sudan B (纯度 97%) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。上述标准品分别用乙腈配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液并保存于 4 °C 冰箱中,使用时将储备液用乙腈稀释至合适浓度。

辣椒油样品购于本地市场。

1.2 仪器与设备

岛津液相色谱仪,系统配置为 LC-20AB 二元泵、SPD-M20A 二极管阵列检测器(PDA)、RF-20A 荧光检测器、手动进样器(Models 7725i, Rheodyne, USA)及 20 μ L 定量环。超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司),红外快速干燥器(上海市川沙县

明星电子设备厂)。

自制的程序控制时间/光强光化学反应器^[27]由光源(低压汞灯, 15 W)、聚四氟乙烯(PTFE)反应管(6 m \times 0.3 mm, Zeus Corp, USA)、光反射壁、保温外壳及可编程控制器(PLC)组成。

1.3 样品前处理

称取 10.0 g 的辣椒油样品于锥形瓶中,加入 60 mL 乙腈后超声辅助萃取 30 min。冷却后,准确移取萃取液于容量瓶中,用乙腈定容至 100 mL,经 0.45 μ m 滤膜过滤后进样测定,以外标法定量。

1.4 分析测定条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C18 柱(150 mm \times 3.0 mm, 3.5 μ m),柱温为室温。流动相为乙腈(A)-水(B)溶液,流速为 0.4 mL/min。梯度洗脱程序:0~4 min, 90% A; 4~8 min, 90% A~100% A; 8~20 min, 100% A; 20.01~23 min, 90% A。进样量 20 μ L。实验时,待测组分从色谱柱流出后进入 PDA,然后进入 PCR 进行光化学衍生,最后进入 FLD 进行测定。FLD 检测的激发波长与发射波长及 PCR 紫外灯电压等参数见表 1。

表 1 光化学反应器和荧光检测器工作参数
Table 1 Operating parameters for PCR and FLD

Analyte	FLD			PCR	
	Time/ min	λ_{Ex} / nm	λ_{Em} / nm	UV lamp-on time/min	Lamp voltage/V
Sudan I	0.0-7.0	289	340	0.0-20.0	220
Sudan II	7.0-11.0	337	375		
Sudan III	11.0-15.0	314	369		
Sudan B	15.0-20.0	320	373		

λ_{Ex} : excitation wavelength; λ_{Em} : emission wavelength.

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

由于苏丹红染料的分子结构中含有羟基,具有弱酸性,因此调节流动相 pH 值至弱酸性,可抑制弱酸的解离,改善色谱峰的分度及峰形。实验中比较了水-乙腈,以及含 0.001% (体积分数,下同)、0.005%、0.01%、0.05%、0.1% 甲酸的水-乙腈作为流动相时 4 种苏丹红染料的分离效果。实验结果表明,使用添加甲酸的水-乙腈作流动相时,待测组分的色谱峰形及分离度与水-乙腈作流动相时基本一致,因此本实验采用水-乙腈作为流动相。图 1 为优化条件下的色谱图。

2.2 检测条件的确定

在优化的色谱分离条件下,对紫外光照前、光照后的 4 种苏丹红染料的标准溶液进行激发光谱和发射光谱比较。结果表明,苏丹红 I 和苏丹红 II 在紫

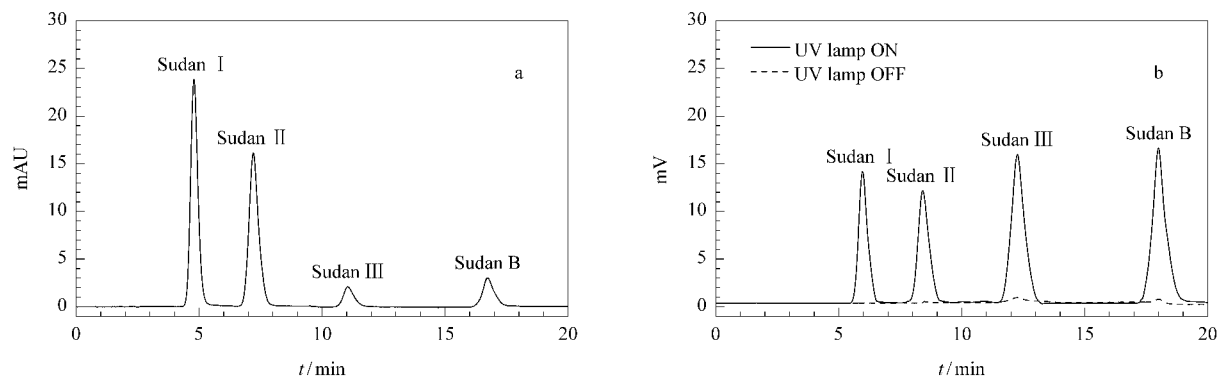


图 1 苏丹红 I、II、III 和 B 混合标准溶液的 (a) PDA 谱图和 (b) FLD 谱图

Fig. 1 (a) PDA chromatogram and (b) FLD chromatograms of the standard solution of Sudan I, II, III and B

Sudan I and Sudan II: 4 mg/L; Sudan III: 0.5 mg/L; Sudan B: 1 mg/L. PDA detection: 477 nm for Sudan I, 492 nm for Sudan II, 502 nm for Sudan III, 509 nm for Sudan B. For the conditions of FLD detection, see Table 1.

外光照前无荧光发射, 紫外光照后生成有较强荧光发射的产物; 苏丹红 III 和苏丹红 B 光照前有弱的荧光, 光照之后荧光大为增强。图 2 为苏丹红 I 和 II

光化学衍生产物的激发光谱、荧光光谱以及苏丹红 III 和 B 在光衍生前母体和光衍生产物的激发光谱、荧光光谱。

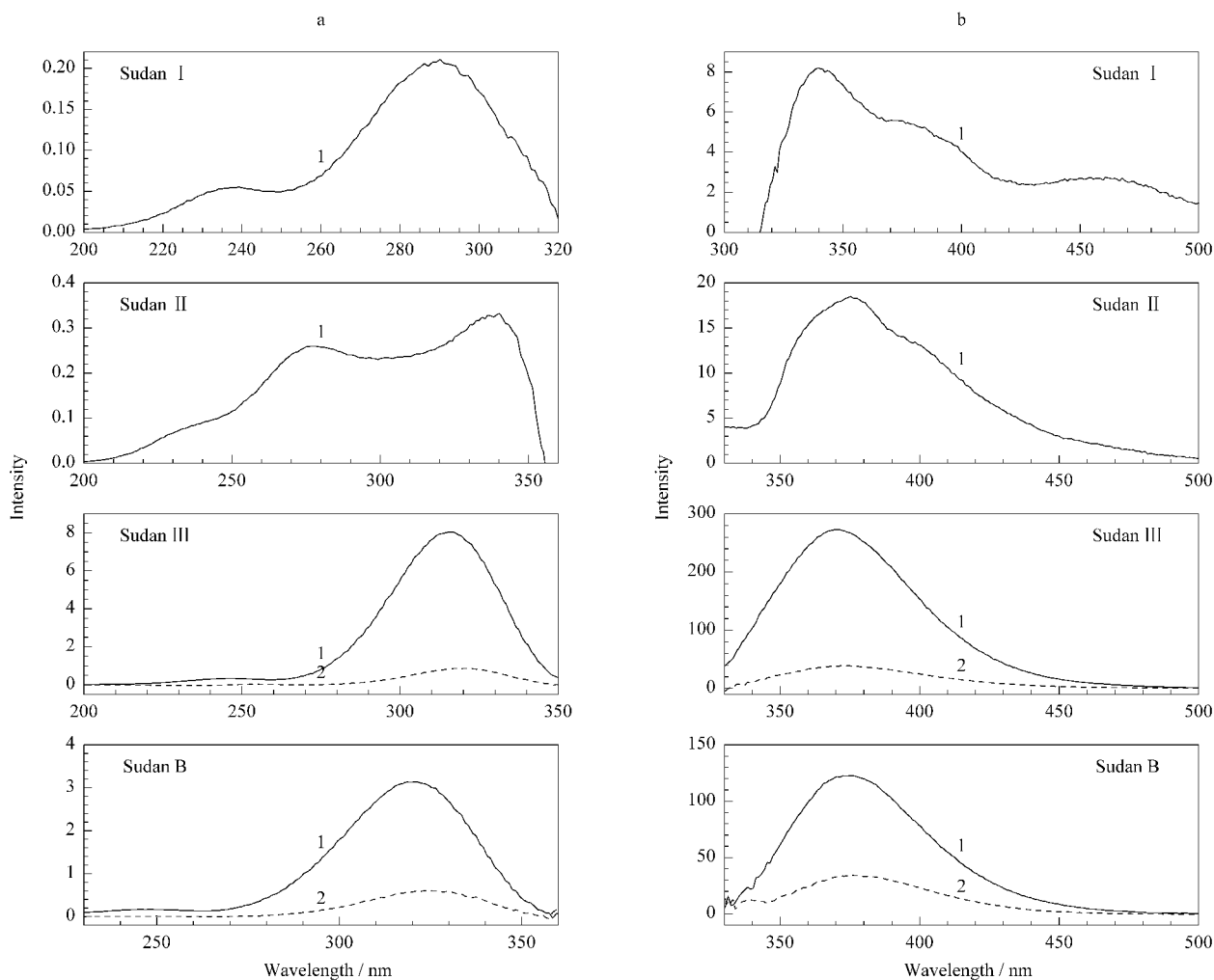


图 2 苏丹红染料光照前、光照后的 (a) 激发光谱和 (b) 发射光谱

Fig. 2 (a) Excitation and (b) emission spectra of Sudan dyes before and after irradiation

Conditions: PTFE tube length, 6 m; irradiation time, 65 s; lamp voltage, 220 V. Curves: 1. UV lamp ON; 2. UV lamp OFF.

根据上述实验结果,对 4 种待测组分进行光化学衍生、荧光检测条件的优化,设置了 FLD 和 PCR 的工作参数,其中 FLD 和 PCR 均编成固定的时间程序进行激发波长和发射波长及灯电压的控制(见表 1)。

2.3 光化学衍生条件的优化

光照时间和强度、反应介质酸度和反应温度是光化学衍生反应中需要优化的条件,实验中考察了上述因素对待测组分荧光信号强度的影响。

当流动相流速固定时,光化学反应时间决定于光化学反应管的长度。实验考察了 PTFE 光化学反应管长为 2.0、4.0、6.0、8.0 m (对应的光照时间为 21、42、65、84 s) 时各组分荧光信号强度的变化,结果见图 3。图 3 中结果表明,在 2~6 m 的管长范围内,随着反应管长度的增长即光照时间增加,苏丹红 I 的荧光信号增强;而在 6~8 m 的管长范围时,随

着管长的增长苏丹红 I 的荧光信号减弱;而苏丹红 II、苏丹红 III 和苏丹红 B 的荧光信号则随着反应管长度的增加而一直增强。考虑到管长为 6.0 m 时各组分均有较强的荧光信号,且管长增长对色谱峰变宽有一定的影响,最终选择反应管长为 6.0 m。

光源的辐射强度对光化学反应的速率与效率影响最大。实验中使用实验室自制的程序控制时间/光强光化学反应器,通过 PLC 来控制不同时段光源的电压,从而控制光照强度。在固定流速时,考察了不同管长(2.0、4.0、6.0、8.0 m)条件下,灯电压分别为 130、150、170、180、200、220 V 时各组分的荧光信号强度变化,实验结果见图 3。结果表明 4 种组分的荧光信号强度在不同管长条件下,基本随着灯电压的增加而增强(苏丹红 I 在管长 8 m 的情况下除外)。因此在选择 6.0 m 管长的条件下,设置紫外灯的电压为 220 V。

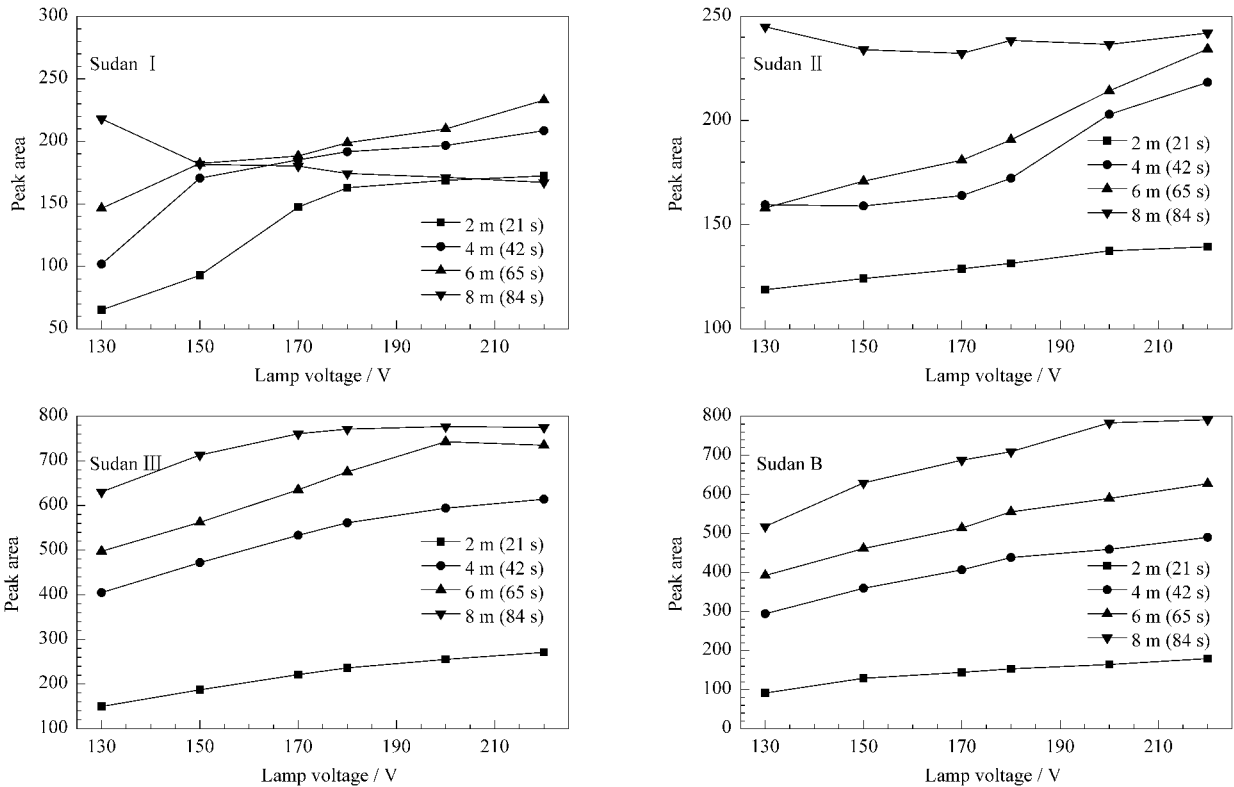


图 3 光照时间及光强对苏丹红荧光信号强度的影响
Fig. 3 Effects of irradiation time and light intensity on the fluorescence signals of Sudan dyes

为了考察反应介质酸度对苏丹红荧光信号强度的影响,在流动相中添加 0.001% (体积分数,下同)、0.005%、0.01%、0.05%、0.1% 的甲酸,结果见图 4。苏丹红 I 和 II 的荧光强度随酸度变化不大,苏丹红 III 的荧光强度随酸度的增强而减弱,苏丹红 B 的荧光信号随酸度的增强而增强。4 种目标物的荧光强度受酸度影响的差异较大,这可能是由其分

子结构差异所致。故实验选择流动相中不加甲酸。
图 5 为光化学反应器温度从 16~45 °C 时荧光信号强度的变化。由图 5 可知,苏丹红 I 和 II 的荧光信号强度受温度变化影响不大;而苏丹红 III 和 B 的荧光信号强度随温度的升高均有减弱,这表明反应温度升高对这两种组分的光衍生不利。因此,实验在 16 °C 条件下进行。

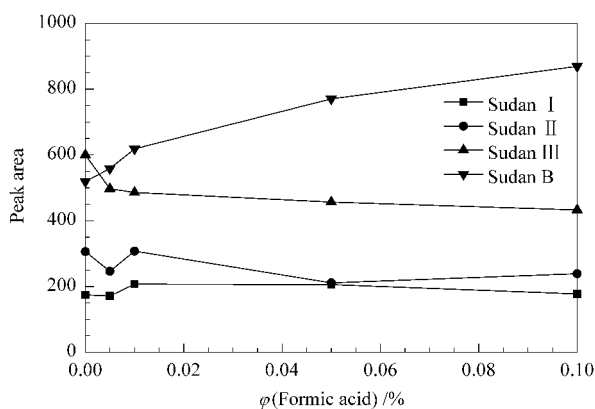


图 4 流动相中甲酸含量对苏丹红染料荧光信号强度的影响
Fig. 4 Effect of formic acid content in mobile phase on the fluorescence signals of Sudan dyes

The conditions were the same as in Fig. 2.

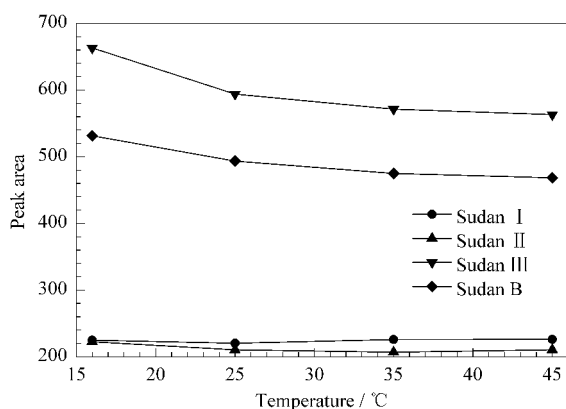


图 5 反应温度对苏丹红染料荧光信号强度的影响
Fig. 5 Effect of reaction temperature on the fluorescence signals of Sudan dyes

The conditions were the same as in Fig. 2.

2.4 方法的精密度与准确度

实验以相对标准偏差(RSD)来表示方法的精密度。配制 6 份在辣椒油中添加待测组分的人工合成样品,各目标物的含量均为 0.8 mg/kg。按照 1.3 节和 1.4 节所述方法进行样品前处理和测定,计算荧光信号强度的 RSD。结果表明,苏丹红 I、II、

III 和 B 的 RSD 分别为 2.6%、3.5%、3.2% 和 3.8%, 可满足实际样品测定要求。

在辣椒油样品中添加待测各组分,计算各组分的加标回收率,以此评价方法的准确度。在辣椒油样品中分别添加上述 4 种苏丹红标准品得到含量分别为 0.8、2、4 mg/kg 的样品,每个含量水平的样品平行测定 3 次,结果如表 2 所示。实验结果表明,添加 3 个不同浓度水平的标准溶液,各组分的加标回收率范围为 81.3%~100.4%,可满足微量组分的定量测定要求。

表 2 辣椒油样品中 4 种苏丹红标准品的加标回收率

Table 2 Recoveries of Sudan dyes spiked in a chili oil sample

Analyte	0.8 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	%
Sudan I	93.1	89.8	86.6	
Sudan II	100.4	99.4	85.2	
Sudan III	81.3	93.4	81.4	
Sudan B	92.7	86.9	82.6	

2.5 方法的线性范围及检出限

分别移取适量体积的苏丹红单标准溶液,用乙腈稀释成一定浓度的混合标准溶液,按上述优化的实验条件进样测定。以峰面积(y)对质量浓度(x, mg/L)作图,所得线性回归方程、线性范围及相关系数(r^2)如表 3 所示。结果表明,各组分在相应的浓度范围内有良好的线性响应($r^2 \geq 0.9963$)。

在辣椒油样品中添加低浓度水平的目标物,依照 1.3 节、1.4 节方法进行样品前处理和测定,以所得标准偏差(SD, $n = 10$)的 3 倍对应的浓度为方法的检出限(LOD);以 10 倍标准偏差对应的浓度为方法的定量限(LOQ)。表 3 所示的实验结果表明,本工作建立的方法对各组分的 LOD 和 LOQ 与不经 PCR 光化学衍生而直接进行 PDA 测定的方法相比接近或更低,其中苏丹红 III 和 B 的检出限要比 PDA 测定方法低一个数量级,更适合测定较低含量的苏丹红 III 和 B。

表 3 HPLC-FLD 方法的线性范围、线性方程、线性相关系数(r^2)及 HPLC-PDA/FLD 方法的检出限和定量限

Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r^2) for HPLC-FLD method, and limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs) for HPLC-PDA/FLD method

Analyte	Linear range / (mg/L)	(Retention time \pm SD) (n = 5) / min	Linear equation	r^2	LOD / (mg/kg)		LOQ / (mg/kg)	
					FLD	PDA	FLD	PDA
Sudan I	0.1 - 10.0	6.08 \pm 0.01	$y = 227.98x + 16.459$	0.9963	0.052	0.054	0.172	0.180
Sudan II	0.1 - 10.0	8.75 \pm 0.02	$y = 183.58x + 28.086$	0.9994	0.054	0.081	0.181	0.270
Sudan III	0.01 - 2.0	12.1 \pm 0.03	$y = 10233x - 25.594$	0.9981	0.009	0.092	0.030	0.307
Sudan B	0.02 - 2.0	18.0 \pm 0.02	$y = 2342x - 38.15$	0.9998	0.022	0.199	0.074	0.664

y: peak area; x: mass concentration, mg/L.

3 结语

利用苏丹红染料在光化学衍生之后产生强荧光

物质的现象建立了高效液相色谱-在线光化学衍生荧光检测联用测定苏丹红 I、II、III 和 B 的新方法。光衍生具有装置简单、操作简便、重现性好的特点。

新建立的测定方法灵敏度高,特别是对苏丹红Ⅲ和苏丹红B的检出限达0.009 mg/kg和0.022 mg/kg,与传统的使用PDA检测器的方法相比要低一个数量级,适合于低含量苏丹红染料的测定。

参考文献:

- [1] Liu L N, Lin T L, Cao Y. *Fine and Specialty Chemicals* (刘丽娜,林天乐,曹永. 精细与专用化学品), 2005, 13(8): 16
- [2] Ministry of Health. No. 5 Bulletin in 2005 of the Ministry of Health of the People's Republic of China (卫生部. 中华人民共和国卫生部公告2005年第5号). (2005-04-04) [2010-09-01]. http://www.moh.gov.cn/open/web_edit_file/20061116170226.doc
- [3] Commission Regulation (EC) No. 669/2009
- [4] Capitán F, Capitán-Vallvey L F, Fernández M D, et al. *Anal Chim Acta*, 1996, 331: 141
- [5] Pielesz A, Baranowska I, Rybak A, et al. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2002, 53: 42
- [6] Yu K J, Yang F, Lu S Y. *Chinese Journal of Health Laboratory and Technology* (余孔捷,杨方,卢声宇. 中国卫生检验杂志), 2004, 14(5): 596
- [7] Wang X J, Miao H, Wen J. *Chinese Journal of Health Laboratory and Technology* (王鲜俊,缪红,文君. 中国卫生检验杂志), 2005, 12: 1475
- [8] Lancaster M, Goodall D M, Bergström E T, et al. *J Chromatogr A*, 2005, 1090: 165
- [9] Lancaster M, Goodall D M, Bergström E T, et al. *Anal Chem*, 2006, 78(3): 905
- [10] Pang Y L, Wang H Y. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (庞艳玲,王怀友. 分析试验室), 2008, 27(1): 60
- [11] Wu H Q, Huang X L, Huang F, et al. *Chinese Journal of Instrumental Analysis* (吴惠勤,黄晓兰,黄芳,等. 分析测试学报), 2005, 24(3): 1
- [12] Lin Z G, Tan J, Chen M Y, et al. *Environmental Chemistry* (林竹光,谭君,陈美瑜,等. 环境化学), 2006, 25(5): 639
- [13] Zhang S B, Han C, Liu J D, et al. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* (张胜帮,韩超,刘继东,等. 中国食品学报), 2009, 9(2): 187
- [14] Cornet V, Govaert Y, Moens G, et al. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(3): 639
- [15] Ertaş E, Özer H, Alasalvar C. *Food Chem*, 2007, 105(2): 756
- [16] Zheng M M, Wu J H, Luo D, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (郑明明,吴剑虹,骆丹,等. 色谱), 2007, 25(5): 619
- [17] Yu C H, Liu Q, Lan L D, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1188(2): 124
- [18] Fan Y C, Chen M L, Shentu C, et al. *Anal Chim Acta*, 2009, 650(1): 65
- [19] Xu Z X, Wang S, Fang G Z, et al. *Chromatographia*, 2010, 71: 397
- [20] Rebane R, Leito I, Yurchenko S, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(17): 2747
- [21] Wang P, Guo S F, Jing T, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (王鹏,郭少飞,荆涛,等. 色谱), 2008, 26(3): 353
- [22] Murty M R V S, Sridhara Chary N, Prabhakar S, et al. *Food Chem*, 2009, 115(4): 1556
- [23] Botek P, Poustka J, Hajšlova J. *Czech J Food Sci*, 2010, 25(1): 17
- [24] Hou X L, Li Y G, Cao S J, et al. *Chromatographia*, 2010, 71: 135
- [25] GB/T 19681-2005
- [26] European Commission. NEWS Notification: 03/99. [2011-11-10]. <http://www.instrument.com.cn/download/downloadHTTP.asp?id=110289>
- [27] Liu J, Fang F, Chen T, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (刘珺,方芳,陈婷,等. 分析测试学报), 2011, 30(10): 1100