

【化学测定方法】

高效液相色谱分析市售皮蛋、咸蛋中的苏丹红

刘虹，谢承恩，曾远伟，黎大禹

(广州市越秀区疾病预防控制中心，广州 510155)

[摘要] 目的：对广州市售咸蛋、皮蛋中的苏丹红染料进行分析。方法：采用高效液相色谱(HPLC)法等度洗脱。结果：苏丹红一、二、三、四在0.32~2.56 mg/L时其峰面积与进样质量浓度呈良好的线性关系，其线性相关系数为0.9999、0.9996、0.9995和0.9997，加标样品测定的相对标准偏差(RSD)为1.6%、2.9%、2.4%和6.1%(n=6)。苏丹红一、二、三、四的最小检出限均为10 μg/kg，苏丹红一、二、三、四回收率均为90%~105%。结论：这种等度洗脱的高效液相色谱法测量苏丹红快速、灵敏、可靠、简便、重现性好。

[关键词] 咸蛋；皮蛋；苏丹红一；苏丹红二；苏丹红三；苏丹红四；高效液相色谱

[中图分类号] O657.7⁺² **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-8685(2009)12-2847-03

High performance liquid chromatography for determination of Sudan dyes in saled and preserved eggs

LIU Hong, XIE Cheng-en, ZENG Yuan-wei, LI Da-yu

(Yuexiu Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510155, China)

[Abstract] Objective: To detect Sudan dyes in saled egg and preserved egg. Methods: By reversed - phase high performance liquid chromatography. Results: Sudan dyes have good linearity in the range from 0.32 to 2.56 mg/L, the correlation coefficients are 0.9999, 0.9996, 0.9995 and 0.9997 respectively for four Sudan dyes. The relative standard deviations of spiked sample are 1.6%, 2.9%, 2.4% and 6.1% (n=6). The detection limits of all four Sudan dyes are 10 μg/kg. The average recovery of four Sudan dyes is 90% to 105%. Conclusion: This method is rapid, sensitive, simple, accurate and reproducible.

[Key words] Salted egg; Preserved egg; Sudan dye I; Sudan dye II; Sudan dye III; Sudan dye IV; High performance liquid chromatography (HPLC)

苏丹红(Sudan dyes)是一种人工合成的偶氮类、油溶性的化工染料,被广泛用于溶剂、油、蜡和汽油的增色以及鞋、地板的增光,共分为苏丹红一、二、三、四,都有致癌毒性,其中苏丹红四毒性最大,已被国际癌症研究机构列为三类致癌物之一,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的威胁^[1]。我们应用高效液相色谱法^[2,3]对市售咸蛋和皮蛋黄中的四种苏丹红染料进行测定。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪, PDA检测器, 自动进样器, 四元梯度泵, MILLIPORE公司的超纯水仪, KQ-50DB型数控超声波清洗器。

1.2 试剂

苏丹红标准储备液: 分别精密称取10 mg苏丹红一、二、三、四, 溶于少量乙腈, 移入250 mL容量瓶中加乙腈至刻度, 混匀, 每升含苏丹红一、二、三、四各40 mg, 冰箱保存; 苏丹红

标准使用液: 吸取标准储备液0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mL, 用乙腈定容至25 mL容量瓶, 此标准系列的浓度为0.32, 0.64, 1.28, 2.56 mg/L; 乙腈(色谱纯); 乙酸水(165+1000)。

1.3 色谱条件

1.3.1 色谱柱 Diamond C₁₈ 4.5 ×250 mm 色谱柱, 柱温40℃; 流动相: 乙酸水(165+1000): 乙腈(色谱纯)(10:90), 流速1.0 mL/min, 进样量50 μL。

1.3.2 波长 经过扫描确定苏丹红一、二、三、四在500 nm处有很好的吸收, 采用500 nm波长进行检测。

1.4 样品处理

准确称取蛋黄5.0 g, 加入20 mL乙腈, 搅匀, 超声波提取30 min, 离心10 min, 吸取上清液过0.45 μm滤膜, 上机待测。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

在上述实验条件下, 分别取苏丹红一、二、三、四标准使用液, 以峰面积对含量绘制标准曲线, 结果如下:

[作者简介] 刘虹(1977-),女,硕士,主管技师,主要从事理化检验研究。

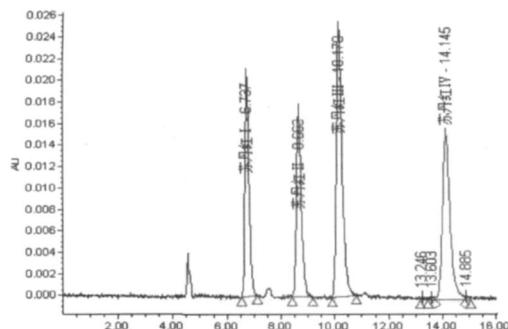
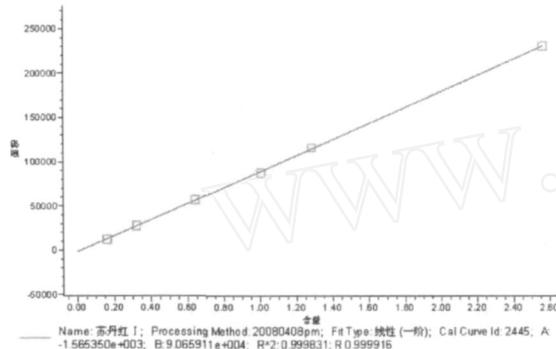
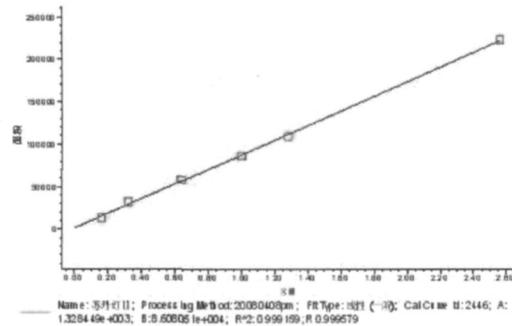


图1 苏丹红标准谱图



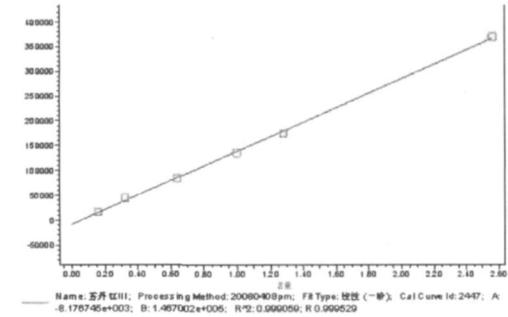
苏丹红 I 线性方程及相关系数:以 $y = -1.56530e+003x + 9.065911e+004$, $r = 0.9999$, 式中:x - 浓度;y - 峰面积

图2 苏丹红 I 标准曲线



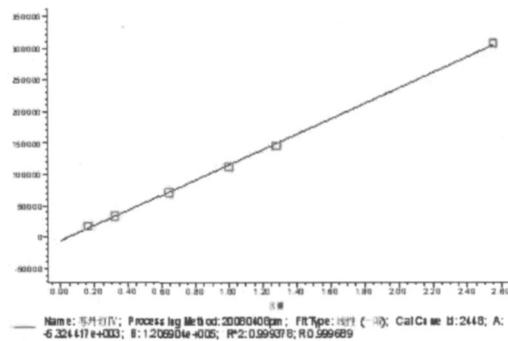
苏丹红 II 线性方程及相关系数:以 $y = 1.328449e+003x + 8.60805e+004$, $r = 0.9996$, 式中:x - 浓度;y - 峰面积

图3 苏丹红 II 标准曲线



苏丹红 III 线性方程及相关系数:以 $y = -8.176745e+003x + 1.467002e+004$, $r = 0.9995$, 式中:x - 浓度;y - 峰面积

图4 苏丹红 III 标准曲线



苏丹红 线性方程及相关系数:以 $y = -5.324417e+003x + 1.206904e+005$, $r = 0.9997$, 式中:x - 浓度;y - 峰面积

图5 苏丹红 标准曲线

2.2 精密度

在重复性条件下获得的两个独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。按此方法测定样品中苏丹红 I、II、III 含量,平行测定 7 份,以峰面积计算苏丹红 I 的相对标准偏差为 1.6%;苏丹红 II 的相对标准偏差为 2.9%;苏丹红 III 的相对标准偏差为 2.4%;苏丹红 I 的相对标准偏差为 6.1%,满足实验要求。

2.3 回收实验

采用添加回收实验来考查方法准确度,测定食品中苏丹红加标回收实验结果见下表,均在 94.3% ~ 101.6% 之间,准确性很好。

表1 食品中苏丹红 加标回收实验结果

样品名称	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
样品	0.646	0.34	0.985	99.7	97.4
			0.975	96.8	
	0.64	1.258	95.6		
		1.266	96.9		
	1.92	2.540	98.6		
		2.505	96.8		

表2 食品中苏丹红 加标回收实验结果

样品名称	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
样品	0.658	0.34	0.985	96.2	97.9
			0.984	95.9	
	0.64	1.281	97.3		
		1.272	95.9		
	1.92	2.501	96.0		
		2.537	97.9		

(下转第 2870 页)

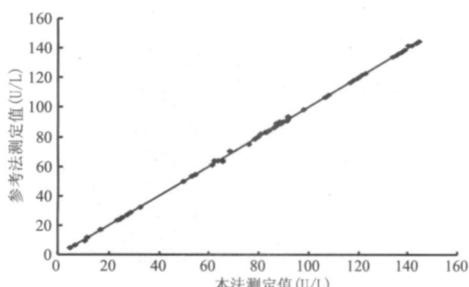


图 3 本法 - 参考法测定值回归曲线

2.6 干扰试验

在本法测定条件下,胆红素少于 20 mg/dL、甘油三酯少于 750 mg/dL、血红蛋白少于 100 mg/dL、抗坏血酸少于 4 mg/dL 对 37 U/L 腺苷脱氨酶测定无干扰。

3 讨论

血清 ADA 的测定方法已经发展了五代,目前最常用的测定方法为测定氨生成速率^[7]及有色酰生成速率^[8]的连续监测法,这两种方法可实现血清 ADA 的自动化分析,方便、快捷,但检测时依赖价格昂贵的全自动生化分析仪,在基层实验室无法开展应用,且前者在测定血清 ADA 含量时易受内源性氨的干扰。本文在测定有色酰生成速率^[8]的连续监测法的基础上,建立了以盐酸胍为反应终止剂、嘌呤核苷磷酸化酶 - 黄嘌呤氧化酶 - 过氧化物酶 (PNP - XTO - POD) 偶联的可见光匀相终点法,该法灵敏快速,抗胆红素、甘油三酯、血红蛋白及维生素 C 干扰能力强,且不受内源性氨干扰,使用普通的分光光度计即能完成测试,检测结果可与全自动生化分析仪相媲美,特别适合在基层实验室开展使用。

在 PNP - XTO - POD 偶联可见光匀相终点法测定血清 ADA 中,酶反应终止液的 pH 值及盐酸胍浓度对检测结果的准确与否有着重要影响。本法工作液一的 pH 值控制在 pH7.8 ± 0.5,在此 pH 值下 ADA 的活性得以完全发挥;加入工作液二

后,pH 值控制在 pH 8.5 ± 0.5,酶反应得以很大程度抑制。酶反应终止液中的盐酸胍为一种蛋白酶抑制剂,它的加入使酶反应得到有效抑制。实验必须选择合适的盐酸胍浓度,浓度过小,不能完全抑制血清 ADA 的继续反应;浓度过大则易使显色不稳定。试验结果表明,40 g/L 的盐酸胍能达到理想效果。

实验还考察了 Brij聚氧乙烯月桂基醚系列、Tween失水山梨醇聚氧乙烯系列、TrionX - 100、乳化剂 OP、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯 - 聚氧丙烯聚醚等不同类型非离子型表面活性剂对测定体系的影响,试验结果表明,在 R₁ 中加入 TrionX - 100 和 Tween - 80 可使反应灵敏度增加,显色稳定期延长,并使 PNP、XTO、POD 等酶的稳定性显著,尤其以 0.2% Tween - 80、0.1% TritonX - 100 的混合溶液效果最佳。

参考文献

- [1] 马至如,黄天禄,陈宏础,等.两点法测定腺苷脱氨酶 [J].四川省卫生干部管理学院学报,1997,16(3):131-133.
- [2] 王百龄,王增祥,谢树莲.血清腺苷脱氨酶对肝脏疾病的诊断研究 [J].河北中西医结合杂志,1997,6(2):174.
- [3] 王桂菊,刘少君,侯风喜,等.白血病患者血清腺苷脱氨酶活性测定的临床意义 [J].河南医科大学学报,1994,29(4):357-358.
- [4] 史成章,郭慧平,郭飞.脱氨腺苷酶和结核抗体的测定对诊断结核性腹水的临床价值 [J].中国实用内科杂志,1999,19(7):400-402.
- [5] ZA Ozturk, S Koklu, MF Erol, et al. Serum adenosine deaminase levels in diagnosis of acute appendicitis [J]. Emerg Med J, 2008, 2(29): 583-585.
- [6] 严霜红,陈小南,薛锦,等.ADA、hs-CRP联合测定在肺部疾病中的意义 [J].中国卫生检验杂志,2009,19(2):378-379.
- [7] 叶应妩,王毓敏,申子瑜.全国临床检验操作规程 [M].第3版.南京:东南大学出版社,2006:429-431.
- [8] 何战胜,邓健,许金生,等.催化光度法测定体液腺苷脱氨酶的活性 [J].中国卫生检验杂志,2005,15(5):546-547.

(收稿日期:2009-06-17)

(上接第 284 页)

表 3 食品中苏丹红 加标回收实验结果

样品名称	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
样品	0.638	0.34	0.980	100.6	101.6
			0.983	101.5	
	0.64	1.297	103.0		
		1.293	102.3		
	1.92	2.580	101.1		
		2.593	101.2		

表 4 食品中苏丹红 加标回收实验结果

样品名称	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
样品	0.642	0.34	0.980	99.4	94.3
			0.958	92.9	
	0.64	1.230	91.9		
		1.233	92.3		
	1.92	2.479	95.7		
		2.437	93.5		

2.4 干扰实验

试剂空白测定结果显示试剂在食品中苏丹红测定均少于最低检出限。

2.5 方法最低检出限

按三倍信噪比计,得最低检出限为 10 μg/kg。

2.6 测定结果

对广州市售的 162 份皮蛋、咸蛋进行分析测量,均未检出苏丹红。

参考文献

- [1] 黄曙海,庞维群.苏丹红染料毒性研究及食品中苏丹红检测方法简述 [J].广西预防医学,2005,11(6):380-383.
- [2] GB/T19681-2005.食品中苏丹红染料的检测方法-高效液相色谱法 [S].
- [3] 仲岳桐,陈春晓,徐锦洪,等.食品中苏丹红一号的检测方法研究 [J].中国卫生检验杂志,2007,17(2):265-267.

(收稿日期:2009-08-26)