

茶叶中禁用绿色偶氮染料的检测方法研究

向丽萍^{1,2}, 王兰兰², 穆丽娟²

(1. 中国农业大学食品学院, 北京 100083 2. 贵州省遵义市质量技术监督检测所, 贵州遵义 563000)

摘要: 茶叶中违规添加的常见绿色偶氮染料(主要以直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 为例), 利用聚酰胺粉吸附, 与茶叶中天然色素分离, 然后用乙醇-氨水-水混合液解吸, 中和挥发后与表面活性剂溴代十六烷基铵 (CTAB) 反应, 用异戊醇提取后, 在高效液相色谱、紫外分光光度计上进行定性、定量。最佳的 CTAB 添加量为摩尔比 1:1 最佳的萃取溶剂为异戊醇; 分光光度法标准曲线的相关系数分别是 0.995 0.995 0.999 (1.000), 高效液相色谱检测的回收率分别是 88%、90%、80%, 相对标准偏差为 1.33%、1.55%、2.12%。

关键词: 检测, 分光光度法, 高效液相色谱法, 偶氮染料

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)08-0237-03

目前我国食品中违规添加人工合成染料、颜料的食品安全事件屡屡曝光。2005年4月, 贵州省质监局稽查局查处了一违法添加“铅铬绿”的制茶窝点, 茶叶染色引起了广大消费者关注, 所查获的成品茶“铅含量”超国家标准35倍。一些不法分子, 在茶叶的加工过程中, 还违规添加一些人工合成绿色偶氮染料, 染绿茶叶误导消费者, 致使有毒茶叶流入市场, 对人体健康造成严重危害。我国是世界茶叶大国, 全国茶叶种植面积居世界第一, 全国茶叶居世界第2位, 全国茶叶出口量居世界第3位。绿茶又是其中消费量最大的产品, 加强对其中染料的检测, 保护广大消费者的合法利益, 规范绿茶生产将起到积极意义。常见的绿色偶氮染料如直接绿 26 (C. I. Direct Green 26 34045), 分子式 $C_{50}H_{33}N_{12}Na_5O_{18}S_6$, 酸性绿 125 (C. I. Acid Green 125), 分子式为 $C_{28}H_{20}N_2Na_8O_8S_2$, 媒介绿 17 (C. I. Mordant Green 17, 17225), 分子式为

$C_{16}H_{10}N_4Na_8O_{10}S_6$ 。

1 材料与方法

1.1 实验材料

聚酰胺粉 100~200目, 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂; 硅胶 G 青岛海洋化工厂; 氧化铝 广州化学试剂厂; 硅镁型吸附剂 Florisil 国药集团化学试剂有限公司; 染料直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 (含量 95% 以上) 广州海生染料有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 上海化学试剂厂。

1.2 样品前处理 (染料的吸附和解吸)

将吸附剂聚酰胺粉装入层析柱中, 高 5cm, 用 10mL 水预淋洗备用, 将 0.01% 的直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 水溶液各 10mL 注入层析柱中, 用 60℃ pH4 的水洗涤 3~5 次, 然后用甲酸-甲醇混合液洗涤 3~5 次, 再用水洗至中性, 用乙醇-氨水-水解吸 3 次, 每次 5mL, 收集解吸液中和后, 挥发至近干, 用水溶解定容至 10mL。

1.3 样品检测

1.3.1 分光光度法检测

1.3.1.1 仪器设备 UV1100 双光束紫外分光光度计 北京普析; 电子天平 AL204 梅特勒托利多。

1.3.1.2 实验步骤 吸取 0.5% 直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 各 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 10.0mL, 与 CTAB (摩尔比 1:1) 反应后, 用 10mL 异戊醇萃取, 用双光束分光光度计在 400、620nm 下进行比色, 分别计算其回归方程和相关系数。

1.3.1.3 标准曲线 见表 1。

1.3.2 高效液相色谱法检测

1.3.2.1 仪器设备 高效液相色谱仪 安捷伦 LC1100 带紫外检测器 DAD, HC-C₁₈ 柱。

1.3.2.2 实验步骤 流动相 (甲醇:0.02mol/L 乙酸铵) 为 90:10 流速 1.0mL/min 进样量 10μL, 柱温 20℃。检测波长 400nm, 参比波长 480nm; 检测波长 620nm, 参比波长 760nm。

1.3.2.3 谱图 见图 1~图 3。

收稿日期: 2007-03-02

作者简介: 向丽萍 (1970-), 女, 在读硕士, 高级工程师 (副高), 研究方向: 食品安全检测。

表 1 标准曲线和回归方程

染料	dyes	标准曲线	0.5mL	1.0mL	2.0mL	3.0mL	4.0mL	5.0mL	回归方程	相关系数
直接绿 26		400nm	0.348	0.721	1.387	2.153	3.153	4.245	$Y = -0.198x + 0.851$	0.995
酸性 125		620nm	0.312	0.639	1.302	2.004	2.674	3.782	$Y = -0.141x + 0.746$	0.995
媒介绿 17		400nm	0.184	0.344	0.687	1.111	1.530	1.879	$Y = -0.051x + 0.388$	0.999
		620nm	0.172	0.356	0.654	0.954	1.304	1.606	$Y = 0.022x + 0.317$	1.000

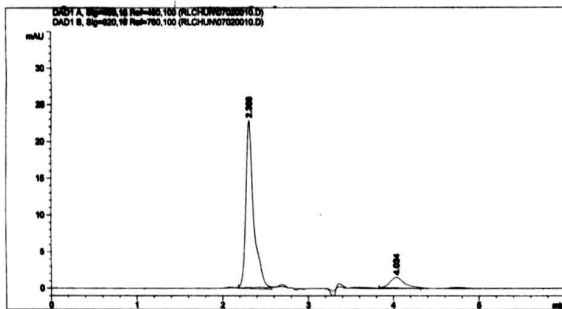


图 1 直接绿 26 在波长 400nm 处标准谱图

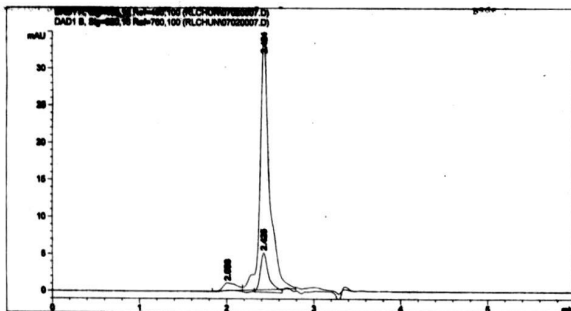


图 2 酸性绿 125 在波长 620nm 处标准谱图

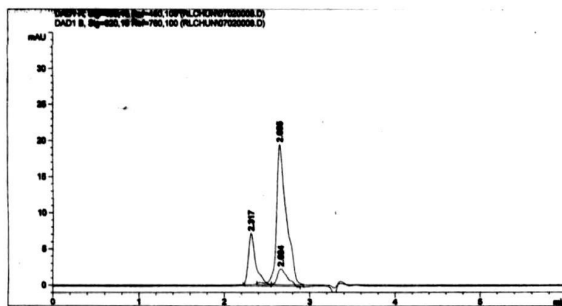


图 3 媒介绿 17 在波长 400nm 和 620nm 处标准谱图

2 结果与讨论

2.1 吸附剂的选择

将各吸附剂(聚酰胺粉、硅胶 G、氧化铝、硅镁型吸附剂)分别装入层析柱中高 5cm,用 10mL 水预淋洗备用,将 0.01% 的直接绿 26 酸性绿 125、媒介绿 17 水溶液各 10mL 注入层析柱中,用 60℃ pH4 的水洗涤 3~5 次,然后用甲酸-甲醇混合液洗涤 3~5 次,再用水洗至中性,用乙醇-氨水-水解吸 3 次,每次 5mL,收集解吸液中和后,挥发至近干,用水溶解定容至 10mL 与 CTAB 反应后用异戊醇提取分光光度计比色。实验表明,聚酰胺粉的吸附和解吸效果优于其他三种吸附剂,结果见图 4。

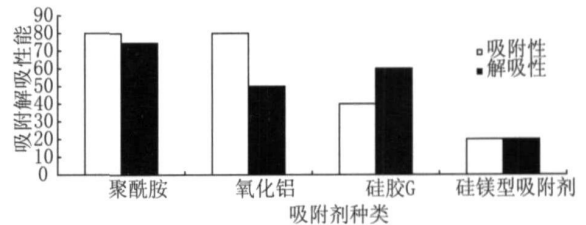


图 4 不同吸附剂的吸附和解吸效果

2.2 染料最大吸收波长的确定

将 0.01% 直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 标准溶液 10mL 与 10mL CTAB 络合后进行光谱扫描,确定它们的最大吸收波长分别在 400nm 和 620nm 左右。

2.3 络合试剂 CTAB 添加量的确定

改变 CTAB 的添加量,与 10mL 0.01% 直接绿 26 酸性绿 125、媒介绿 17 标准溶液进行反应,确定最佳的使用量。CTAB 量太少不能有效地生成疏水的络合物,太多后容易形成胶束,在水中的溶解度增大,降低萃取效率。当直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 与 CTAB 的摩尔比为 1:1 时萃取效果最好,见图 5。

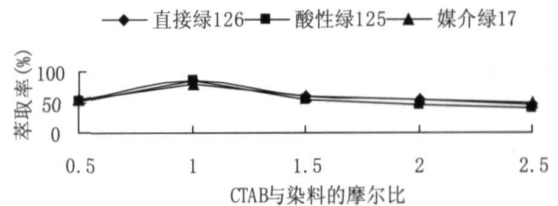


图 5 CTAB 添加量对萃取率的影响

2.4 萃取试剂的选择

萃取试剂初步选定为乙醚、异戊醇(均为天津市大茂化工试剂厂),甲醇(Dina technology NC),甲苯(上海化学试剂厂)。取 10mL 上述萃取试剂,与 10mL 染料溶液混合后振荡,测定萃取液的吸光度值,计算萃取率,结果见图 6。由图 6 可以看出,异戊醇的萃取效果最好。

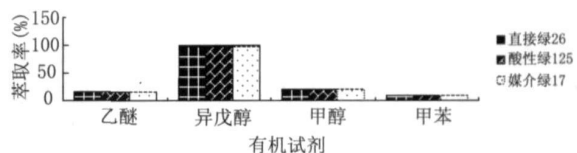


图 6 不同有机试剂对萃取率的影响

2.5 样品的回收实验

制作添加染料的茶叶:选取经萎凋、杀青、理条、干燥至含水率 20% 的茶叶半成品,按照 0.1% 比例添

(下转第 242 页)

表 3 HPLC方法回收率实验结果

样品中糠氨酸含量 (μg)	加入标样量 (μg)	糠氨酸理论值 (μg)	实际测定值 (μg)	回收率 (%)
482.9	400	882.9	851.0	92.0
254.6	400	654.6	627.5	93.2

表 4 糠氨酸含量和荧光强度之间的对应关系 (n= 3)

复原乳比例 (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
荧光强度	60.99 ±1.90	65.97 ±1.88	79.80 ±0.90	85.79 ±1.58	90.39 ±0.90	94.93 ±2.74	109.22 ±0.40	121.55 ±0.21	125.45 ±0.64	131.20 ±0.82	141.52 ±2.01
糠氨酸含量 (HPLC方法) (mg/100g蛋白质)	8.84 ±1.59	61.3 ±1.6	113.6 ±2.7	160.2 ±2.5	216.9 ±4.3	254.8 ±5.5	300.2 ±4.7	349.8 ±6.8	387.5 ±7.2	430.9 ±5.4	482.9 ±6.9

参考文献:

[1] Maite Rada Mendoza. Chemical Indicators of Heat Treatment in Fortified and special Milks [J]. J Agri Food Chem, 2005, 53: 2995~ 2999.
 [2] Asylbek Kuhnryzave, Didier Levieux, Eric Dufour. Front-face fluorescence spectroscopy allows the characterization of milk heat treatments applied to milk, relations with the denaturation of milk proteins [J]. J Agri Food Chem, 2005, 53: 502~ 507.
 [3] Kaspar Ruoff. Authentication of the Botanical Origin of Honey by Front-face Fluorescence spectroscopy: A Preliminary Study [J]. J Agri Food Chem, 2005, 53: 1343~ 1347.
 [4] J Christensen. Application of Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Evaluation of Processed Cheese During Storage [J]. J Dairy Sci 86: 1101~ 1107.

[5] Dufour E, Riaublanc A. Potentiality of spectroscopic methods for the characterization of dairy products: front-face fluorescence study of raw, heated and homogenized milks [J]. Lait 1997, 77: 657~ 670.
 [6] Max Feinberg. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milk [J]. Food Chemistry, 2006, 98: 188~ 194.
 [7] Asylbek Kuhnryzave, Eric Dufour. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy [J]. Lait 2002, 82: 725~ 735.
 [8] 中华人民共和国农业行业标准 NY/T 939~ 2005.
 [9] 王璋等译. 食品科学 (第五版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 189~ 190.
 [10] 食品中蛋白质含量的测定, GB/T 5009.5- 2003

(上接第 238页)

加偶氮染料直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17, 分别炒至水分低于 10%。分别取 10g 染色茶叶进行前处理后, 用液相色谱进行检测, 回收率为 88%、90%、80%, 同时测定 3 次, 相对标准偏差为 1.33%、1.55%、2.12%, 见表 2。

表 2 回收率及精密度实验 (n= 3)

组分	加入量 (%)	回收量 (%)	回收率 (%)	RSD (%)
直接绿 26	0.1	0.088	88	1.33
酸性绿 125	0.1	0.09	90	1.55
媒介绿 17	0.1	0.08	80	2.12

3 结论

茶叶中的偶氮染料直接绿 26 酸性绿 125 媒介绿 17 先经过聚酰胺吸附后, 与茶叶中天然色素分离, 经乙醇-氨水-水解析后, 1:1 与 CTAB 反应, 形成疏水缔合物, 用异戊醇进行萃取, 再经液相色谱仪和分光光度计进行定性和定量。液相色谱保留时间分别是 2.306、2.424、2.317 (2.655) min, 样品添加标准的回收率分别为 88%、90%、80%, 分光光度计检测的相关系数分别为 0.995、0.995、0.999 (1.000)。本方法适用于检测茶叶中违规添加的常见偶氮染料。

参考文献:

[1] 肖刚, 王景国. 染料工业技术 [M]. 化学工业出版社,

2004: 26~ 133.
 [2] 王佩珍, 陈芸, 等. 高效液相色谱法测定纺织品上禁用偶氮染料 [J]. 化学世界, 2000 (7): 353~ 355.
 [3] 代喜斌, 贺海霞. 溶剂浮选光度法测定水中混合偶氮染料的含量 [J]. 应用化工, 2006, 35 (9): 727~ 729.
 [4] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 19681- 2005. 食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法 [S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2005- 03- 29.
 [5] 中华人民共和国农业部. SC/T 3021- 2004. 水产品中孔雀石绿残留量的测定 液相色谱法 [S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2004- 01- 07.
 [6] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 17592- 2006. 纺织品禁用偶氮染料的测定 [S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2006- 05- 25.
 [7] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009- 2003. 食品卫生检验方法 理化部分 [S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2003- 08- 11.
 [8] Determination of certain azo colourants in dyed leathers [J]. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists 2002, 86: 299~ 305.
 [9] 骆和东, 贾玉珠, 等. 凝胶净化液相色谱法同时检测染红食品中对位红和苏丹红染料 [J]. 理化检验 - 化学分册, 2006, 42 (2): 86~ 90.