

# 固相萃取-分光光度法 快速检测腐竹中的碱性橙

李小燕<sup>1,2</sup>, 仝海娟<sup>1</sup>, 石展望<sup>1</sup>, 罗少芹<sup>1</sup>, 秦玉凤<sup>1</sup>, 李梅<sup>1</sup>

(1.广西民族大学化学与生态工程学院, 广西南宁 530006;

2.广西林产化学品开发与应用重点实验室, 广西南宁 530006)

**摘要:**目的: 建立固相萃取净化富集, 分光光度法快速检测腐竹中禁用色素碱性橙的方法。方法: 样品经甲醇超声提取, C<sub>18</sub>固相萃取柱萃取, 以20%甲醇溶液(V/V)为清洗剂净化, 80%甲醇溶液(V/V)为洗脱剂洗脱富集后, 用分光光度法进行测定。结果: 碱性橙在2.0~10.0 μg/mL浓度范围呈现良好的线性关系, 相关系数R=0.9955; 在2.0~8.0 μg/mL添加水平时回收率范围为102.24%~84.15%, 重复性实验平均回收率为98.45%, 相对标准偏差为1.87% (n=5)。结论: 该法灵敏度高、重复性好, 操作简便快速, 结果准确, 适用于腐竹中碱性橙的快速检测。

**关键词:**固相萃取, 分光光度法, 碱性橙, 腐竹

## Rapid determination of basic orange in dried beancurd sticks by solid phase extraction-spectrophotometry

LI Xiao-yan<sup>1,2</sup>, TONG Hai-juan<sup>1</sup>, SHI Zhan-wang<sup>1</sup>, LUO Shao-qin<sup>1</sup>, QIN Yu-feng<sup>1</sup>, LI Mei<sup>1</sup>

(1.College of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China;

2.Key Laboratory of Development & Application of Forest Chemicals of Guangxi, Nanning 530006, China)

**Abstract:** Objective: A novel method based on solid phase extraction followed by Spectrophotometry was developed for the analysis of prohibited colorant basic orange in dried beancurd sticks. Method: Basic orange in dried beancurd sticks was extracted with SIPORE SPE-C<sub>18</sub> SPE column, purified by 20% methanol aqueous solution (V/V), eluted by 80% methanol aqueous solution (V/V) and detected by Spectrophotometry with mensurated at the maximum absorption wavelength 446nm. Results: The linear correlation coefficient was 0.9955 over the range of 2.0~10.0 μg/mL. The recoveries were 102.24%~84.15% for spiked standards at 2.0~8.0 μg/mL level. The average recovery of repeated test was 98.45% with relative standard deviation (RSD) of 1.87% (n=5). Conclusions: This method with good linearity, high precision and rapidity was suitable for rapid determination of basic orange in dried beancurd sticks.

**Key words:** solid phase extraction; spectrophotometry; basic orange; dried beancurd sticks

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)11-0447-04

碱性橙, 俗名“王金黄”, 化学名为2,4-二氨基偶氮苯。由苯胺重氮化后, 与间苯二胺耦合而制得(分子式为C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>·HCl, 分子量为248.5, 结构式见图1), 为红褐色结晶性粉末或带绿色光泽的黑色块状晶体, 是一种偶氮类碱性染料, 主要用于皮革制品、纺织品及木制品的染色。美国卫生研究所化学品健康与安全数据库资料表明: 摄取、吸入或皮肤接触碱性橙可以导致急性和慢性中毒伤害。有确凿的动物实验数据表明, 碱性橙为致癌物质。根据我国

《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760)及《食品卫生法》等相关规定, 被严禁作为食品添加剂使用<sup>[1]</sup>。由于碱性橙比其他水溶性染料如柠檬黄、日落黄等更易于在豆腐以及海鱼上染色且不易褪色, 因此一些不法商贩用碱性橙对豆制品、黄鱼进行染色, 使豆皮和黄鱼的色泽光亮以次充好, 以假冒真, 欺骗消费者, 危害消费者的健康<sup>[2-3]</sup>。目前, 尚无检测食品中碱性橙的国家标准, 有不少关于食品中黄鱼、辣椒粉、豆制品、红糖中检出碱性橙的报道<sup>[4-8]</sup>, 这些检测方法多为液-液萃取、高效液相色谱或质谱检测, 尚未见运用固相萃取-分光光度法快速检测食品中碱性橙的报道。固相萃取(Solid-Phase Extraction, 简称SPE)是近年发展起来的一种样品预处理技术。它结合了液-固萃取和柱液相色谱两种技术的优点, 主要用于样品的分离、纯化和富集, 相对于传统的液液萃

收稿日期: 2010-08-30

作者简介: 李小燕(1961-), 女, 研究员, 主要从事现代分离分析技术研究。

基金项目: 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013047); 广西教育厅科研项目(200911LX84)。

表2 清洗剂的选择

清洗剂	10% 甲醇	20% 甲醇	30% 甲醇	40% 甲醇	50% 甲醇	60% 甲醇	70% 甲醇	80% 甲醇	90% 甲醇	无水甲醇
洗脱率 (%)	0	0	0	0.23	0.46	44.65	39.41	0.23	1.14	0.91

取而言此法更能提高分析物的回收率,更有效地将分析物与干扰组分分离,减少样品预处理步骤,操作简单、快速,已广泛地应用于医药、食品、环境、商检、化工等领域<sup>[9-13]</sup>。本文提出采用固相萃取技术对样品进行萃取净化处理,用分光光度法快速检测腐竹样品中痕量碱性橙的方法,为食品安全检测提供可借鉴的方法。

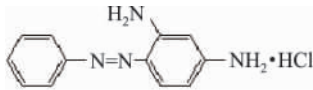


图1 碱性橙结构式

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

碱性橙 分析纯,上海晶纯试剂有限公司;甲醇、乙醇、乙酸乙酯 分析纯,汕头市西珑化工股份有限公司;乙腈 色谱纯,美国飞试公司;腐竹 市售品。

UV-9100 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; SIPORE SPE-C<sub>18</sub> 固相萃取柱(500mg/6mL) 大连思谱精工有限公司; KQ-100DE 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; BS110S 型电子天平 北京赛多利斯仪器有限公司; 800 型离心机 上海手术器械厂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 对照品贮备液的配制 精密称取碱性橙对照品 0.2000g 置于 100mL 容量瓶中,加入无水乙醇适量,超声使溶解,放冷并稀释至刻度,得浓度为 2mg/mL 的溶液;精密量取该溶液 10mL 置于 100mL 容量瓶中,用 50% 乙醇稀释至刻度,得浓度为 200 $\mu$ g/mL 的对照品贮备液。

1.2.2 碱性橙标准曲线的建立 取 10 $\mu$ g/mL 碱性橙乙醇溶液在 200~700nm 进行波长扫描,最大吸收波长为 446nm。

分别精密量取橙性碱对照品贮备液适量,置于 100mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,配制成浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu$ g/mL 的碱性橙溶液。以水为参比,在 446nm 处测定吸光度,以浓度 C( $\mu$ g/mL) 为横坐标,吸光度(A) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程:  $A = 0.0808C$ , 相关系数  $R = 0.9955$ 。

1.2.3 样品溶液的制备 取腐竹样品,研成细粉,精密称取 2g 置于 100mL 容量瓶中,加入 40mL 甲醇,超声处理 30min,用甲醇定容。精密量取该溶液 10mL 置于 100mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度。再分别精密量取此液适量置于 100mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,可配制成相应浓度的样品溶液,备用。

1.2.4 试样的处理 将固相萃取柱用 5mL 甲醇活化(5mL $\times$ 2),5mL 水平衡后(5mL $\times$ 2),将样品溶液注入固相萃取柱,分别用 20% 的甲醇水溶液(V/V) 清洗(5mL $\times$ 3),80% 的甲醇水溶液(V/V) 洗脱(5mL

$\times$ 4),收集洗脱液,加水定容至 20mL,备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固相萃取条件的选择

2.1.1 洗脱剂的选择 将固相萃取柱用甲醇活化(5mL $\times$ 2),用水平衡(5mL $\times$ 2)。精密量取 10.0 $\mu$ g/mL 的碱性橙对照品溶液 5mL,分别注入 3 支固相萃取柱中进行吸附后,分别用无水乙醇、乙腈、甲醇洗脱(5.00mL $\times$ 2 次),分别收集洗脱液并用水定容至 10mL,按 1.2.2 方法分别测定吸光度,计算浓度和洗脱率,结果见表 1。实验结果表明,三种洗脱剂中甲醇的洗脱能力最强,故选甲醇做洗脱剂。

表1 洗脱剂种类的选择

洗脱剂	无水乙醇	乙腈	甲醇
洗脱率 (%)	85.00	77.51	88.22

2.1.2 清洗剂浓度及清洗次数的选择 以碱性橙溶液作为上样液,选择适当的溶剂作清洗液,以达到除去实际样品腐竹中的干扰物,而又不使目标化合物碱性橙被洗脱的目的。将 C<sub>18</sub> 固相萃取柱用甲醇活化(5mL $\times$ 2),用水平衡(5mL $\times$ 2)。精密量取 10.0 $\mu$ g/mL 碱性橙对照品溶液 5mL 注入固相萃取柱,萃取两次,收集萃取后的滤液。再依次用 5mL 10%~90% 甲醇水溶液(V/V) 和甲醇连续清洗,分别收集各清洗液,加水稀释至 10mL。按 1.2.2 方法分别测定吸光度,计算浓度和洗脱率,结果见表 2。

实验结果表明,清洗至第四次时甲醇水溶液的浓度为 40%,此时目标物碱性橙已开始被洗下,因此清洗剂中甲醇的浓度应小于 40%。采用 20% 甲醇作清洗剂清洗三次时,总回收率为 0,证明碱性橙不受清洗过程的影响,依然可保留在萃取柱中。

2.1.3 洗脱剂浓度及洗脱次数的选择 由表 2 可看出,洗脱剂为 60% 甲醇时已有 44.65% 的碱性橙被洗脱,为此,以 60% 甲醇和 80% 甲醇为洗脱剂做对比实验,以确定洗脱剂浓度和洗脱次数。

将 C<sub>18</sub> 固相萃取柱用甲醇活化(5mL $\times$ 2),用水平衡(5mL $\times$ 2)。分别精密量取 10.0 $\mu$ g/mL 碱性橙溶液 5mL 注入固相萃取柱,萃取两次,收集滤液。分别用 20% 甲醇清洗(5.00mL $\times$ 3 次),收集各次清洗液。一支萃取柱用 80% 甲醇洗脱(5.00mL $\times$ 5 次),另一支萃取柱用 60% 甲醇洗脱(5mL $\times$ 5 次),收集各次洗脱液,分别加蒸馏水稀释至 10mL,按 1.2.2 方法分别测定吸光度,计算浓度和洗脱率,结果见表 3。

表3 60% 甲醇和 80% 甲醇溶液的洗脱效率

	柱 1		柱 2	
	次数	回收率 (%)	次数	回收率 (%)
60% 甲醇洗脱	1	8.95	1	84.12
	2	34.68	2	4.25
	3	25.95	3	0.89
	4	10.51	4	0.45
	5	4.25	5	0.45
80% 甲醇洗脱	1	8.95	1	84.12
	2	34.68	2	4.25
	3	25.95	3	0.89
	4	10.51	4	0.45
	5	4.25	5	0.45

表4 固相萃取程序验证

萃取程序	提取液	萃取后滤液	20% 甲醇清洗液	80% 甲醇洗脱液	乙酸乙酯洗脱液
吸光度	0.031	0.001	0.001	0.001	0.027

表5 加标回收实验结果

加标量(μg/mL)	2		4		6		8	
	对照液	加标液	对照液	加标液	对照液	加标液	对照液	加标液
回收率(%) (20% 甲醇清洗)	0	0	0	0	0	0	0	0
回收率(%) (80% 甲醇洗脱)	100.00	98.98	101.74	102.24	89.93	90.36	86.97	84.15

表7 固相萃取柱使用寿命实验结果

使用次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
回收率(%)	100.00	100.00	100.65	101.31	100.65	101.97	100.65	100.00	101.96	99.35

由表3结果可以看出,在碱性橙浓度高达10.0μg/mL的情况下,60%甲醇和80%甲醇为洗脱剂的总回收率分别为84.34%和90.16%。而80%甲醇在进行第一次洗脱时已将84.12%的目标化合物洗脱,洗脱至第四次时回收率已达89.71%,其洗脱效率明显优于60%甲醇。

因此可确定固相萃取条件为:以20%的甲醇溶液作为清洗剂,清洗三次;以80%的甲醇溶液作为洗脱剂,洗脱四次。

## 2.2 加标回收实验

取已粉碎的腐竹样品2g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入40mL甲醇,摇匀,超声处理30min,以1000r/min离心20min,取上清液作为提取液备用。取提取液5mL注入固相萃取柱中,分别收集萃取后的滤液、清洗液、洗脱液,并用乙酸乙酯继续洗脱并收集洗脱液,分别在446nm下测定吸光度,结果见表4。

实验结果表明,腐竹提取液中所含的基质组分绝大部分被保留在萃取柱中,在甲醇溶液的清洗、洗脱程序中不受影响,而继续用弱极性溶剂乙酸乙酯可将这些杂质组分除去。证明在清洗、洗脱过程中,可将基质组分与目标物碱性橙分离,而不影响碱性橙的测定,从而验证了萃取程序的可行性。

取碱性橙对照品0.2g和腐竹样品粉末1.0g,精密称定,置于容量瓶中,按1.2.3方法制备成含碱性橙浓度分别为2.0、4.0、6.0、8.0μg/mL的加标样品溶液。

取八支固相萃取柱,精密量取上述加标样品溶液及相同浓度的碱性橙对照品溶液各5mL,分别注入萃取柱,按1.2.4方法进行试样处理,按1.2.2方法分别测定吸光度,计算浓度和回收率,结果见表5。

由表5可知,在碱性橙浓度相同的情况下,碱性橙对照品溶液和加标样品液所得到的回收率很相近。说明加标溶液中的腐竹中强极性物质会在上样过程中随滤液流出柱子;而弱极性保留成分不受洗脱步骤的影响未被洗下,不会干扰目标物碱性橙的测定,因此进一步验证了本文固相萃取分离、富集法的可行性。由表中还可看出,随着上样浓度的增大,碱性橙的回收率降低,说明可能存在柱超载。故上样浓度在2~6μg/mL之间较为适宜,以确保洗脱完全。

## 2.3 精密度实验

精密量取4.0μg/mL碱性橙对照品溶液5mL,注入固相萃取柱,按1.2.4进行实验,平行测定五次,回收率分别为100.00%、100.60%、100.60%、100.00%、100.60%,平均回收率为100.36%,RSD为0.33%,表明该方法精密度良好。

## 2.4 重复性实验

取碱性橙对照品0.2g和腐竹样品2g,精密称定,置于100mL容量瓶中,按2.2方法制备5份含碱性橙4μg/mL的加标样品溶液,分别对洗脱液进行测定,结果见表6。

表6 重复性实验结果

实验次数	1	2	3	4	5
加入值(μg/mL)	4.00	3.99	4.00	4.01	4.01
测定值(μg/mL)	3.97	4.01	3.98	3.86	3.88
回收率(%)	99.25	100.50	99.50	96.26	96.76

由表6结果可知,重复性实验的平均回收率为98.45%,RSD为1.87%,表明该方法的重复性良好。

同时,在重复性实验中发现,在碱性橙浓度较低情况下,清洗1次、洗脱2次即可将目标物与基质分离和富集。

## 2.5 固相萃取柱使用寿命实验

用一支固相萃取柱,取加标水平为4μg/mL的样品溶液5mL,按1.2.4进行试样处理,按1.2.2测定吸光度。对一支固相萃取柱进行多次重复实验(固相萃取柱可用9:1的甲醇/冰醋酸(V/V)再生),计算各次的回收率,结果见表7。

实验结果表明,在加标水平4μg/mL的情况下,固相萃取柱重复使用10次,回收率在99.35%~101.97%之间,变化很小,均接近100%。因此,可以判定SIPORE SPE-C<sub>18</sub>固相萃取柱(500mg/6mL)至少可以重复使用十次。

## 2.6 实际样品测定

取市售腐竹样品2g,精密称定,按1.2.3方法制备样品溶液,按1.2.4方法进行试样的处理,收集洗脱液,按1.2.2方法测定吸光度,实验结果见表8。

由表8可知,所测定的腐竹样品中没有发现目标化合物碱性橙。虽然未找到阳性样品,但所建立的固相萃取条件能将目标化合物与杂质分离,本文研究的分离检测方法具有可行性。

## 3 结论

3.1 本文建立了固相萃取净化、分离、富集,可见分

表8 样品测定结果

腐竹来源	清洗次数及相应的 ABS 值			洗脱次数及相应的 ABS 值			
	1	2	3	1	2	3	4
民大菜市	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
利克隆超市	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
西乡塘市场①	0.001	0.000	0.001	0.002	0.001	0.000	0.001
西乡塘市场②	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
西大菜市	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

光光度法快速检测食品禁用色素碱性橙的方法,该方法灵敏度高,精密度和重复性好,结果准确。

3.2 对  $C_{18}$  固相萃取柱进行了使用寿命测试,回收率均接近 100%,表明此  $C_{18}$  固相萃取柱经再生处理后至少可以重复使用十次。

3.3 在固相萃取条件的选择中,当碱性橙浓度在  $2\sim 8\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,以 20% 甲醇水溶液作清洗剂清洗三次净化,以 80% 的甲醇水溶液作洗脱剂洗脱四次富集,回收率在 84.15%~102.24%。在浓度为  $4\mu\text{g}/\text{mL}$  的加标水平下,重复性实验的平均回收率为 98.45%,相对标准偏差为 1.87% ( $n=5$ ) 结果良好。

3.4 为保证检测结果的准确性,避免出现柱超载现象的发生,实验中碱性橙上样浓度应小于  $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.5 虽然在所购买的腐竹样品中未发现含碱性橙的阳性样品,但本文所建立的方法依然可作为快速检测腐竹中碱性橙的依据。

#### 参考文献

- [1] 卢士英, 邹明强. 食品中常见的非食用色素的危害与检测[J]. 中国仪器仪表, 2009(8): 45-50.
- [2] 徐正, 毛军初. 对一起加入非食品用化学物质生产加工豆制品案的评析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(10): 1945-1946.
- [3] 冯济富, 黄明. 一起使用碱性橙浸染小黄鱼案的评析[J]. 中国卫生监督杂志, 2003, 10(6): 351-352.
- [4] 铁晓威, 黄百芬, 任一平. RP-HPLC 法测定染色黄鱼中的碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59-60.
- [5] 林钦. 高效液相色谱法同时测定豆制品中的碱性橙和碱

性嫩黄 O 染料[J]. 色谱, 2007, 25(5): 776-777.

[6] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙、玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202-204.

[7] 舒平, 杨卫花, 赵浩军, 等. 反相高效液相色谱法测定红糖中的碱性橙[J]. 云南化工, 2009, 36(5): 24-26.

[8] 郑小严. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 409-413.

[9] 陈小霞, 岳振峰, 郑卫平, 等. 氯霉素分子烙印固相萃取柱的制备及萃取条件优化[J]. 华南理工大学学报, 2004(7): 51-55.

[10] Feng Zhang, Xiaogang Chu, Li Sun. Determination of trace food-derived hazardous compounds in Chinese cooked foods using solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1209: 220-229.

[11] 潘涛, 王成章, 郭睿莉, 等. 固相萃取——高效液相色谱法检测保健食品中违禁添加剂诺龙[J]. 食品开发与研究, 2009, 30(10): 114-117.

[12] 郭新东, 洗燕萍, 杜志峰, 等. 固相萃取——高效液相色谱法测定化妆品中的丙烯酰胺[J]. 日用化学工业, 2009, 39(4): 294-296.

[13] 林福华, 邱宁宁, 黄晓佳, 等. 搅拌棒固相萃取与液相色谱联用测定水样品中烷基酚类污染物[J]. 分析化学, 2010, 38(1): 67-71.

(上接第 446 页)

RSD ( $n=5$ ) 为 0.25%, 回收率高, 平均回收率为 100.97%。

#### 参考文献

- [1] 王荣耕.  $V_C$  单磷酸酯镁[J]. 精细与专用化学品, 2001(3): 14.
- [2] 乐微, 杨静. 胶束增敏法测定果蔬中  $V_C$  的含量[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(6): 35-36.
- [3] 杨秀芳, 程芳玲, 梁栋. 碘离子选择电极测定果蔬、药剂中  $V$  含量[J]. 辽宁化工, 2003, 32(8): 366-368.
- [4] 刘佳铭. 抑制-褪色光度法测定维生素 C[J]. 分析化学研究简报, 2000, 28(9): 1147-1149.
- [5] 游庆红, 尹秀莲. 响应面优化桑黄多糖提取工艺研究[J].

中国酿造, 2010(5): 67-69.

[6] 余安, 王承明. 响应面优化花生粕中植酸的提取工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(4): 80-84.

[7] 胡成旭, 侯欣彤, 冯永宁, 等. 响应面优化云芝多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2007(7): 124-126.

[8] 任雪峰, 吴冬青, 王永生, 等. 人参果多糖超声提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 9-11.

[9] 陈芹芹, 李淑燕, 杨阳, 等. 响应面优化超声波辅助提取苹果籽油的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(5): 52-56.

[10] 袁志发, 周静芋. 实验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 381.

[11] 周纪芬. 实用回归分析方法[M]. 上海: 上海科技技术出版社, 1990: 77-79.