

高效液相色谱法测定食品中的黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2

奚星林, 邵仕萍, 徐娟, 王岚, 邹志飞, 吴宏中, 庞世琦

(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

[摘要] 目的: 建立食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 含量的高效液相色谱测定方法, 采用液质联用法定性。方法: 样品中的黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 用正己烷提取, 中性氧化铝固相萃取柱净化, 采用 C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分离, 以甲醇和水溶液为流动相梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测定量。结果: 黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 标准曲线范围为 0.5 mg/L ~ 10.0 mg/L, 回收率范围为 80.3% ~ 95.8%, 相对标准偏差为 1.51% ~ 5.75%。结论: 该法准确度高, 分离效果好, 结果稳定可靠, 适合于食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 含量的测定。

[关键词] 高效液相色谱法; 液质联用; 黄色 2G; 奶油黄; 柑橘红 2; 固相萃取

[中图分类号] O657.7⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004 - 8685(2012)08 - 1739 - 03

Determination of yellow 2G, butter yellow and citrus red 2 in foods by HPLC

XI Xing - lin, SHAO Shi - ping, XU Juan, WANG Lan, ZOU Zhi - fei, WU Hong - zhong, PANG Shi - qi

(Guangdong Entry - exit Inspection and Quarantine Technology Centre, Guangzhou 510623, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the quantitative analysis of yellow 2G, butter yellow and citrus Red 2 in foods and identification by liquid chromatography mass spectrometry. **Methods:** The target chemicals in foods were extracted with hexane and purified with neutral alumina solid phase extraction column. The separation was carried out on C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30°C with MeOH + H₂O as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml. Diode - array detector was used for quantitative analysis. **Results:** There was good linear relationship in the range of 0.5 mg/L ~ 10.0 mg/L for the three target chemicals. The recovery rate of the method were between 80.3% and 95.8% with RSDs of 1.51% ~ 5.75%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and suitable for the determination of yellow 2G, butter yellow and citrus Red 2 in foods.

[Key words] HPLC; Liquid chromatography mass spectrum; Yellow 2G; Butter yellow; Citrus Red 2; Solid - phase extraction

合成色素具有色泽鲜艳、着色力强、色调多、成本低的特点, 故为生产厂家广泛使用。合成色素是以苯、甲苯、萘等化工产品为原料, 经过一系列有机反应而制成, 合成的色素因混有中间产物而具有一定毒性。毒理学及临床医学的发展证明, 某些合成色素有慢性毒性或致癌性。2004 年广东和香港等地水果市场相继发现“染色橙”, 含禁用及可能致癌的柑桔红 2 号色素。过去用于人造奶油着色的奶油黄, 早已被证实可以导致人和动物患上肝癌, 而其它种类的合成色素如橙黄能导致皮下肉瘤、肝癌、肠癌和恶性淋巴瘤等。各国对人工合成色素

在食品中允许使用的品种、范围和添加量作了严格的规定, 我国 GB/T 2760 - 2011《食品添加剂使用卫生标准》明确规定食品中添加食用色素的范围和用量, 在我国黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 是不允许使用的。

色素的测定常用液相色谱法^[1-8], 黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 都是油溶性色素, 检测柑橘红 2 有高效液相色谱法^[9], 但目前未查到食品中黄色 2G、奶油黄的检测方法, 也没有和柑橘红 2 含量同时检测的文献报道。本文首次报道用正己烷提取色素, 用中性氧化铝柱纯化, 反相高效液相色谱检测食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 含量, 并用质谱定性。结果表明该方法专属性好, 重现性好, 能有效的用于复杂基质的食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 的测定。

黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 的结构式如下:

[基金项目] 中国检验检疫科学院基本科研业务费专项基金资助项目(2009JK011); 广东省科技基础条件建设项目(粤科财字[2008]658, [2010]185)

[作者简介] 奚星林(1965 -), 男, 硕士研究生, 高级工程师, 主要从事食品添加剂检测和放射性检测方面研究。

1 试验条件

1.1 仪器及条件

高效液相色谱仪(waters e2695 型),配备二极管阵列检测器;色谱柱:Ultimate C18 柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm);流速:1.0 ml/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:350 nm、410 nm 和 514 nm;进样量:10 μ l。固相萃取装置(Supleco 公司)。

1.2 试剂与材料

黄色 2G(纯度 98%)、奶油黄(纯度 98%)和柑橘红 2(纯度 90%)均购自 Sigma 公司,甲醇(色谱纯),其他试剂均为分析纯。层析用中性氧化铝(100 目):用前于 105 $^{\circ}$ C 烘 2 h,取下置干燥器中冷至室温,装入玻璃瓶中密闭放置 24 h。

固相萃取柱:取 5 ml 塑料注射器管,下端口塞入小块脱脂棉,装入处理好的氧化铝约 3 cm 高,压实,放置备用。

标准储备溶液:准确称取黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 标准品 10.0 mg,置于 100 ml 容量瓶中,用少量甲醇溶解,并用甲醇定容至刻度,混匀,该溶液浓度为 100 μ g/ml。

标准系列:根据需要移取适量标准储备液,用甲醇稀释配制 0.50 mg/L、1.00 mg/L、3.00 mg/L、5.00 mg/L、7.00 mg/L 和 10.0 mg/L 系列标准溶液。

1.3 实验方法

准确称取样品 2 g,加入 10 ml 正己烷,振荡 1 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分离出上层清液,残渣加入 10 ml 正己烷,重复提取一次,合并两次提取液,混匀,供固相萃取净化。用 5 ml 正己烷活化洗层析柱,用滴管将上清液加入层析柱中,萃取过程中流动相速度稳定控制在 5 ml/min \sim 8 ml/min。用 10 ml 正己烷淋洗层析柱,待洗柱的流出液无色时,加入 5 ml 甲醇,收集洗脱液,置于 50 $^{\circ}$ C 水浴中,氮气流下吹干。用 1 ml 甲醇溶解残渣,振荡,经 0.45 μ m 滤膜过滤,供液相色谱测定。

1.4 测定

在本实验条件下,分别对标准系列和样液进样分析。以待测物色谱峰的峰面积对其浓度绘制标准标准曲线。以二极管阵列检测器的光谱图进行定性分析。

2 结果和讨论

2.1 提取条件的选择

2.1.1 提取溶剂 根据有关资料介绍,黄色 2G 溶于乙腈、丙酮、三氯甲烷、吡啶和热乙醇,微溶于水。奶油黄溶于醇、醚、三氯甲烷、苯、石油醚和无机酸,不溶于水;柑橘红 2 溶于甲醇、芳烃类溶剂,不溶于水。选择正己烷、乙腈、甲醇为提取溶剂,结果表明,正己烷的提取效果最佳。

2.1.2 净化方式的选择 液-液分配、聚酰胺吸附法和 SPE 小柱净化是实验室常用的色素检测净化手段。本实验采用聚酰胺粉吸附净化时,3 种色素损失严重。HLB 固相萃取柱适用于水溶性色素净化。我们试验用

自制氧化铝柱净化,回收率在 80% \sim 95% 之间。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 检测波长的选择 黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 色谱峰的吸收波长分别为 350 nm、410 nm 和 514 nm。故分别选择这三个波长为奶油黄、黄色 2G 和柑橘红 2 的检测波长。

2.2.2 流动相的选择 分别考察甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸铵溶液、乙腈-乙酸铵溶液等流动相系统对于待测物的色谱峰形的影响。结果表明,以甲醇-水和甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液流动相,两者没有明显区别,以甲醇-水更为简便。随着甲醇比例的增加,洗脱能力逐渐增强,兼顾到合适的保留时间和良好的色谱峰形,最终选择甲醇初始比例为 80%。20 min 升至 100%, 2 min 后恢复到 80%。

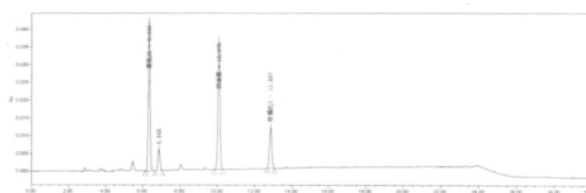


图 1 黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 标准品色谱图

2.2.3 柱温的选择 对不同的柱温(25 $^{\circ}$ C \sim 40 $^{\circ}$ C)进行考察。结果表明,当柱温为 35 $^{\circ}$ C 时,待测物的保留时间和色谱峰形最为理想。

2.2.4 色谱柱的选择 分别考察了 Kromasil C₁₈(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i. d.)、Supleco C₁₈(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i. d.)、Ultimate C₁₈(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i. d.) 等不同色谱柱条件下待测物的色谱峰形。结果表明,Ultimate C₁₈(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i. d.) 作为色谱柱,色谱峰形最为尖锐。

2.3 标准曲线及方法的定量限

根据本方法所确定的实验条件,取 0.50 mg/L、1.00 mg/L、3.00 mg/L、5.00 mg/L、7.00 mg/L 和 10.0 mg/L 系列标准溶液进样,以峰面积对浓度作图。结果表明,待测物在 0.50 mg/L \sim 10.0 mg/L 范围内,线性方程和线性相关系数见表 2。当样品中的待测物超过此线性范围时,可适当加大样品的稀释倍数。按信噪比为 3 计算方法的检出限,按信噪比为 10 计算方法的定量限。

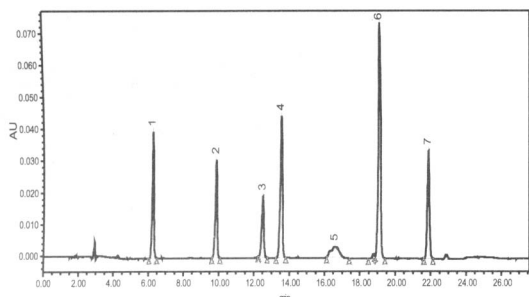
表 2 线性方程和线性相关系数

名称	线性方程	线性相关系数(r)	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
黄色 2G	$Y = 4.63e + 04 - 3.74e + 03$	0.9996	1.0	5.0
奶油黄	$Y = 8.08e + 04 - 6.97e + 03$	0.9996	1.0	5.0
柑橘红 2	$Y = 2.58e + 04 - 2.72e + 03$	0.9997	1.0	5.0

2.4 方法的抗干扰能力

在 10.0 μ g/L 待测物标准溶液中加入等量的苏丹红 I、苏丹红、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 甲醇溶液,上

机测定,发现苏丹红色素对黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 测定不造成干扰,分离效果见图 2。



1. 黄色 2G, 2. 奶油黄, 3. 柑橘红 2, 4. 苏丹红 I, 5. 苏丹红, 6. 苏丹红 II, 7. 苏丹红 III, 8. 苏丹红 IV

图 2 待测 3 种色素与苏丹红色素分离色谱图

2.5 方法回收试验

选用复杂基质的香肠和辣椒油为样品做回收率试验,设置 3 个添加浓度,每个添加浓度进行 6 次试验。回收率结果见表 3 和表 4。

表 3 香肠中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 回收率和精密度试验结果 (n=6)

样品名称	试样本底 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	平均测定值 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
黄色 2G	ND	1.0	0.803	80.3	3.95
		2.0	1.698	84.9	5.75
		5.0	4.515	90.3	5.09
奶油黄	ND	1.0	0.904	90.4	2.63
		2.0	1.884	94.2	1.51
		5.0	4.58	91.6	3.09
柑橘红 2	ND	1.0	0.945	94.5	2.76
		2.0	1.792	89.6	2.69
		5.0	4.515	90.3	3.92

注: ND 代表未检出

表 4 辣椒油中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 回收率和精密度试验结果 (n=6)

样品名称	试样本底 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	平均测定值 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
黄色 2G	ND	1.0	0.812	81.2	5.35
		2.0	1.606	80.3	4.44
		5.0	4.23	84.6	4.68
奶油黄	ND	1.0	0.935	93.5	3.45
		2.0	1.916	95.8	2.17
		5.0	4.51	90.2	3.52
柑橘红 2	ND	1.0	0.848	84.8	4.59
		2.0	1.808	90.4	4.50
		5.0	4.295	85.9	5.37

注: ND 代表未检出

2.6 质谱确认

电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式: 正离子扫描/负离子扫描; 检测方式: 多反应监测模式 (MRM); 气帘气: 15 L/min; GS1 雾化气: 60 L/min; GS2 辅助加热气: 70 L/min; CAD 碰撞气: Medium; 辅助加热气温度: 500℃; 喷雾电压: 5000 V。黄色 2G 化合物采用负离子模式,柑橘红 2 和奶油黄化合物采用正离。在分别获得每个化合物的分子离子峰(母离子)后,进行二级质谱(子离子)扫描,优化碰撞能量,从中选出两个丰度比较高的子离子分别作为定性和定量离子,从而建立多反应监测 (MRM) 模式的质谱方法。各种色素的质谱分析参数见表 5。

表 5 待测物标准物质的主要特征离子

待测物	Q1	Q3	去簇电压 DP	碰撞能量 CE
黄色 2G	257.9	210.9/226.9	-80	-31/-30
奶油黄	226.1	77.0/120.0	60	40
柑橘红 2	309.2	138.1/153.2	80	40/38

3 结论

本文首次利用液相色谱检测食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 色素的含量,并确定了质谱法鉴定的条件。实验表明,该方法具有简便、快捷、灵敏、准确、重现性好等特点,满足实际检测工作的需要。

[参考文献]

[1] GB 2760-2011. 食品安全国家标准 食品添加剂使用卫生标准 [S].
 [2] GB/T 5009.35-2003. 食品中人工合成着色剂的测定方法 [S].
 [3] Fuh MR, Chia KJ. Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection [J]. Talanta, 2002, 56(4): 663-671.
 [4] Minioti KS, Sakellariou CF, Thomaidis NS. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector [J]. Anal Chim Acta, 2007, 583(1): 103-100.
 [5] Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. Talanta, 2008, 74(5): 1408-1413.
 [6] Ma M, Luo XB, Chen B, et al. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1103(1): 170-176.
 [7] Chen QC, Mou SF, Hou XP, et al. Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography [J]. J Chromatogr A, 1998, 827(1): 73-81.
 [8] 郑玲,李丽华,李湧,等. 凝胶渗透-高效液相色谱法测定棕榈油中的对位红和苏丹色素 [J], 中国油脂, 2009, 34(7): 74-76.
 [9] 陈毓芳,林海丹,李为鹏,等. 高效液相色谱法测定果汁和果蔬中柑橘红 2 号染料 [J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47(5): 536-538.

【论著】

(收稿日期: 2011-11-24)

尘肺病患者外周血中 SDC-2 基因的表达变化

赵红胜¹, 余国营², 姜峰¹, 王平¹, 韩林¹, 刘康栋³, 赵凤玲¹, 吕玉民^{1,3*}

(1. 河南省职业病防治研究院, 郑州 450052; 2. 匹茨堡大学西蒙斯间质肺病研究中心, 美国 PA 15090; 3. 郑州大学基础学院, 郑州 450001)

【摘要】 目的: 测定尘肺病患者外周血中 SDC-2 基因的表达水平, 探讨检测该指标作为尘肺病相关生物标志物的可行性。**方法:** 分别用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和实时定量 RT-PCR 方法, 对 77 例尘肺病患者和 162 例健康体检者外周血中 SDC-2 基因的表达变化进行测定。**结果:** 尘肺病患者血清 SDC-2 的浓度为 42.37 ± 19.32 pg/ml, 健康对照组为 37.08 ± 6.24 pg/ml, 两组之间的差异没有统计学意义 ($F = 3.278$, $P = 0.074$); 矽肺患者血清 SDC-2 的浓度水平高于煤工尘肺患者, 但两者未有统计学差异 ($F = 0.803$, $P = 0.377$); 不同影像分期尘肺病患者血清中 SDC-2 的浓度水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 尘肺病患者肺功能损害程度与血清 SDC-2 浓度没有相关性 ($r = -0.159$, $P = 0.361$); SDC-2 基因转录水平的变化趋势与其血清浓度的变化趋势基本一致。**结论:** SDC-2 基因的表达变化作为尘肺病相关血液学生物标志物可能是不可行的。

【关键词】 尘肺; 外周血; SDC-2; 生物标志物

【中图分类号】 R135.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-8685(2012)08-1742-04

Expression change of syndecan-2 gene in peripheral blood from patients with pneumoconiosis

ZHAO Hong-sheng¹, YU Guo-ying², JIANG Feng¹, WANG Ping¹, HAN Lin¹, LIU Kang-dong³, ZHAO Feng-ling¹, LU Yu-min^{1,3*}

(1. Henan Institute of Occupational Medicine, Zhengzhou 450052, China; 2. Simmons Center of Interstitial Lung Diseases, University of Pittsburgh, PA 15090, America; 3. Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

【Abstract】 Objective: To detect the expression change of syndecan-2 gene in peripheral blood from the patients with pneumoconiosis, and explore the feasibility of the index as a potential biomarker of pneumoconiosis. **Methods:** Human peripheral blood samples of 77 patients with pneumoconiosis and 162 healthy subjects were collected, and the changes of SDC-2 gene expression were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time RT-PCR. **Results:** The SDC-2 concentrations in serum of the patients with pneumoconiosis were higher than those of the healthy subjects (42.37 ± 19.32 pg/ml vs. 37.08 ± 6.24 pg/ml), but the difference was not obvious ($F = 3.278$, $P = 0.074$). The serum SDC-2 concentrations of patients with silicosis were higher than those of coal workers with pneumoconiosis, but there was no statistical difference ($F = 0.803$, $P = 0.377$). The serum SDC-2 concentrations had no significant difference among different stages of pneumoconiosis ($P > 0.05$). The increased SDC-2 levels were not associated with the degree of respiratory impairment ($r = -0.159$, $P = 0.361$). Change trend of SDC-2 gene in transcription level was essentially consistent with the change in serum concentration. **Conclusion:** The expression change of SDC-2 gene as a hematological biomarker of patients with pneumoconiosis was not feasible.

【Key words】 Pneumoconiosis; Peripheral blood; SDC-2; Biomarker

【基金项目】 国家临床(职业病)重点专科建设项目(2011)

【作者简介】 赵红胜(1970-), 本科, 副主任技师, 主要从事医学检验工作。

* 通讯联系人, E-mail: lu_yumin63@yahoo.com.cn

多配体蛋白聚糖-2 (Syndecan-2, SDC-2) 是一种跨膜蛋白聚糖, 属于硫酸乙酰肝素蛋白聚糖类 (Heparan-sulfate proteoglycans, HSPG's) 的多配体蛋白聚糖家族成员, 可通过跨膜蛋白或以脱落蛋白的形式结合多