

评估几种在分析苏丹染料之前用于 净化辣椒的凝胶渗透色谱 (GPC) 柱 子

关键字

辣椒粉
Envirobeads S-X3
EnviroPrep
EnviroSep-ABC
凝胶渗透色谱
GPC
GPC AutoPrep 2000
Optima
胡椒粉
苏丹红染料

摘要

苏丹 1 号、2 号、3 号和 4 号是单偶氮染料和重氮染料，被归类为可能的致癌物质。近来这些染料已经被发现非法使用于辣椒粉和咖喱粉。凝胶渗透色谱 (GPC) 经常被用于采用气相色谱/质谱 (GC/MS)、高效液相色谱 (HPLC) 或者 LC/MS 分析这些染料之前的快速净化过程。有关在苏丹染料分析之前采用快速 GPC 萃取净化辣椒粉和咖喱粉，这一最有效的方法，只有极其有限的文献。这篇文章评估了用于 GPC 净化辣椒粉中的苏丹染料的几种溶剂和几种不同类型的柱子。GPC 的净化采用 OI 分析仪器公司的 GPC AutoPrep 2000 系统 (图 1)，配置 2.5-mL 或者 5-mL 的采样环。使用的柱子包括玻璃柱和 Optima™ 柱，填充 Envirobeads® S-X3 凝胶，或者是不锈钢的 EnviroSep™-ABC 柱子，能够使用多种不同的洗脱溶剂，或者是一根 Polymer Labs 的 EnviroPrep 柱子。研究了采用不同 GPC 柱子的每种类型的染料的洗脱时间。



图 1 GPC AutoPrep 2000 系统配置 1096TB 型自动进样器

在 AOAC 年度会议和展览中
报告, 奥兰多市, 佛罗里达州,
2005 年 9 月 11-15 日



简介

苏丹 1 号、2 号、3 号和 4 号是能够溶解于油的单偶氮染料和重氮染料（图 2）。它们被广泛应用于皮革和纤维行业，也可做地板和鞋子抛光剂中的增色之用。它们是可能的致癌物质，被国际癌症研究会归类为三类损害 DNA 的致癌物质。在美国于 1918 年、在加拿大于 1934 年，苏丹染料已经被禁止使用于食品行业。在 1995 年在欧洲被禁止使用于食品行业。近来，在整个世界范围内，这些染料在大量含有胡椒粉的食品中被发现。自从 2004 年 1 月起，欧共体规定干的胡椒粉和咖喱粉中不能够含有苏丹染料。需要随机抽查食品中是否含有苏丹染料。美国食品和药品监督局和加拿大食品监督局也开始检查辣椒粉中是否含有苏丹染料。

苏丹染料经常是在快速净化步骤之后，采用中间极性的溶剂从咖喱粉中萃取出来，然后采用 HPLC、LC/MS 或者 GC/MS 进行分析。GPC 可以作为一种快速净化的方法，在分析苏丹染料之前，以去除胡椒粉中天然存在的、大分子量的干扰色素（通常与苏丹染料添加剂是一样的颜色）和树脂。有关在苏丹染料分析之前采用快速 GPC 萃取净化胡椒粉，这一最有效的方法，只有极其有限的文献。这篇文章评估了在分析苏丹 1 号、2 号、3 号和 4 号之前，用于 GPC 净化胡椒粉的几种溶剂和几种不同类型的柱子。GPC AutoPrep 2000 系统自动执行整个 GPC 的净化步骤。

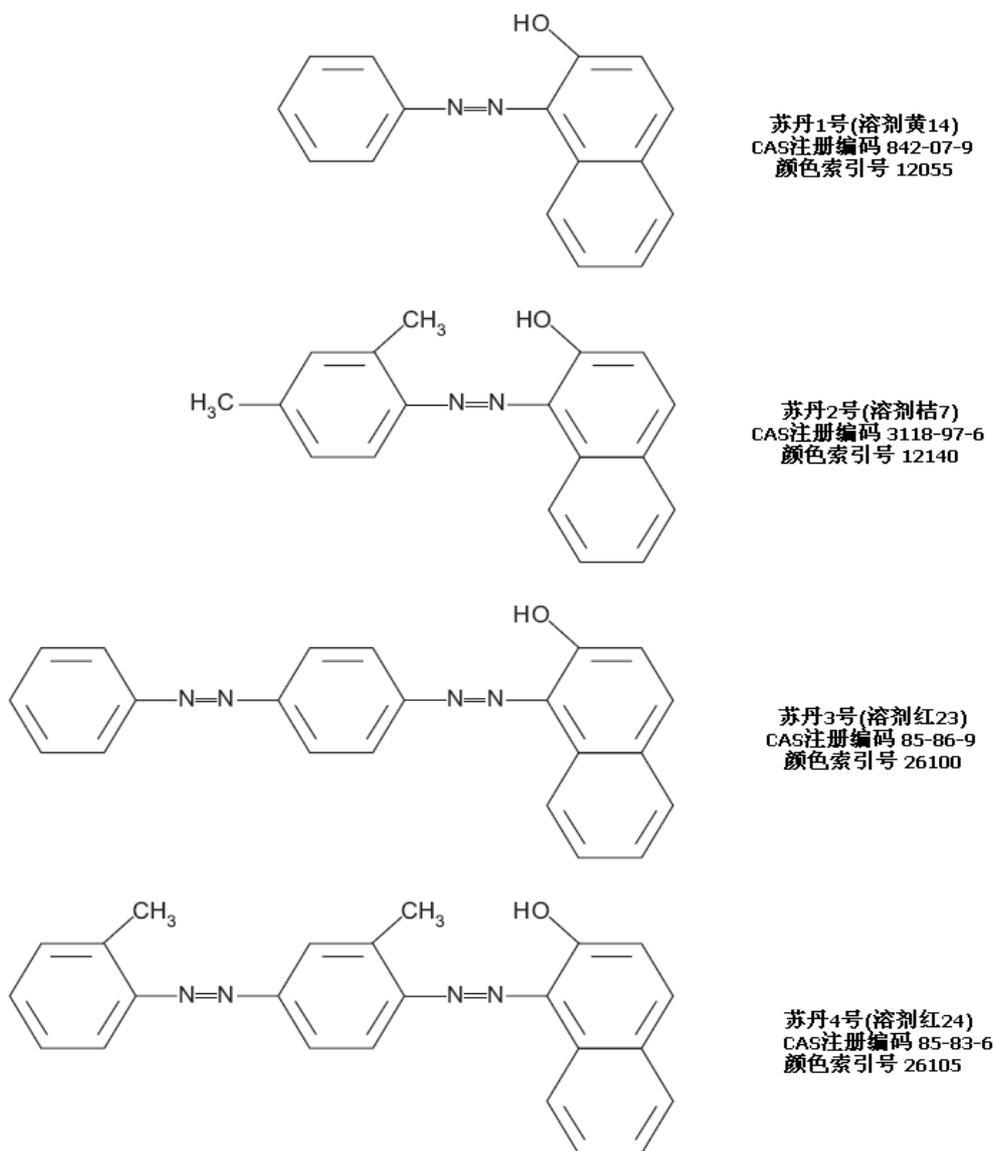


图 2 苏丹染料的化学结果

实验

材料

所有的溶剂都经过蒸馏并储存在玻璃容器中，适用于 HPLC、GC、农残分析和光谱分析。所有的化学物质都是 ACS 试剂级别。苏丹染料 1、2、3 和 4 号来自于 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO)。确认无苏丹染料的红辣椒来自于 McCormick Inc. 公司的 Ed Philander 博士 (Hunt Valley, MD)。GPC 的校准标样按照 USEPA 方法 3640A 进行制备，含有玉米油、邻苯二甲酸酯、甲氧滴滴涕、二萘嵌苯和硫。

萃取

称重 1 克红辣椒并加入 50 mL 适当的 GPC 移动相制备红辣椒萃取液。混匀大约 1-2 分钟使辣椒沉淀下来。通过一个 Whatman 0.45- μ m TF 注射器过滤器过滤这个萃取液。转移 10 mL 萃取液到一根 16 X 100-mm 的管中用于 GPC 净化。将管子置于 GPC AutoPrep 2000 自动进样器托盘的适当位置。

GPC 净化

称重每种 0.05 克染料倒入一个 100-mL 的容量瓶，加入适当的 GPC 移动相以制备苏丹染料 1、2、3 和 4 号。混匀然后转移 10 mL 溶液到一根 16 X 100-mm 的测试管中。将管子置于 GPC AutoPrep 2000 自动进样器托盘的适当位置。

采用 GPC AutoPrep 2000 进行 GPC 净化的工作条件显示于表 1。

表 1 GPC 净化条件

柱子	树脂	移动相	流速 (mL/min)	采样环体积 (mL)
玻璃	Envirobeads, SX-3, 60 克	1: 1 乙酸乙酯: 环己烷	5.0	5.0
玻璃	Envirobeads, SX-3, 60 克	1: 1 二氯甲烷: 环己烷	5.0	5.0
Optima	Envirobeads, SX-3, 21 克	1: 1 乙酸乙酯: 环己烷	4.0	2.5
不锈钢柱子 (350mm x 21mm)	EnviroSep-ABC	100% 乙酸乙酯	5.0	2.5
不锈钢柱子 (300mm x 25mm)	PL EnviroPrep	100% 乙酸乙酯	5.0	2.5

每种染料和红辣椒色素的洗脱时间，通过每三分钟分段收集洗脱液到 GPC AutoPrep 2000 自动进样器的收集托盘的测试管中进行检测。WinSEP™ GPC 软件能够自动完成这个过程（见图 3 和图 4 中的详细说明）。采用在 USEPA 方法 3640A 中描述的校准方法，每星期校准柱子。

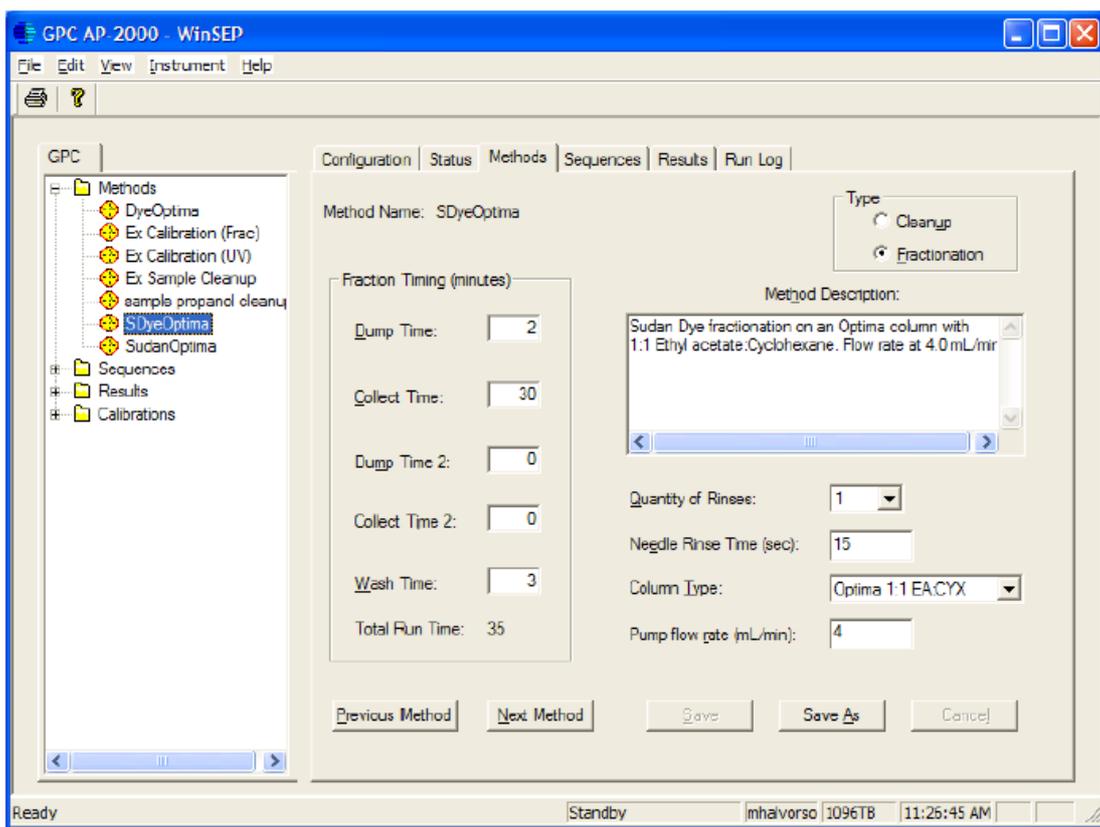


图 3 WinSEP 软件的方法页面，用于设置红辣椒萃取液和苏丹染料从 GPC 柱子洗脱出来的分段收集参数

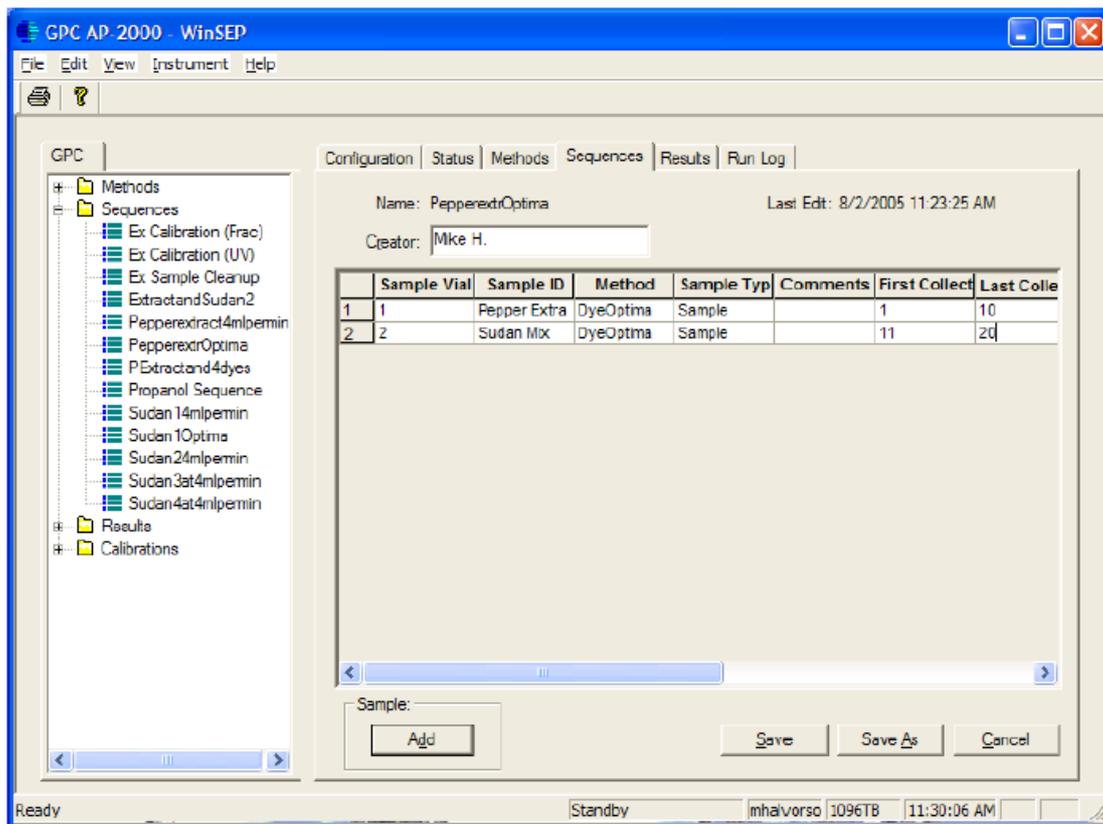


图 4 WinSEP 软件的序列页面。设置序列分段收集到 10 个不同的管中。每个管中的收集时间由（在方法页面中设置的）收集时间以及放置管子的总量等份分配得到。例如，如果采用 30 分钟的收集时间和 10 个管子，每个管子收集洗脱液的时间为 3 分钟。

结果



图5 采用一根填充了60克 Envirobeads SX-3 的玻璃 GPC 柱, 1: 1 的乙酸乙酯: 环己烷移动相从红辣椒萃取液中洗脱天然色素和树脂, 流速为 5mL/min。从柱子洗脱出来的萃取色素收集于第4管到第7管。



图6 采用一根填充了60克 Envirobeads SX-3 的玻璃 GPC 柱, 1: 1 的乙酸乙酯: 环己烷移动相洗脱出来苏丹4号, 流速为 5mL/min。苏丹4号主要收集于第11管到第13管, 对比收集于第4管到第7管的天然红辣椒色素和树脂。

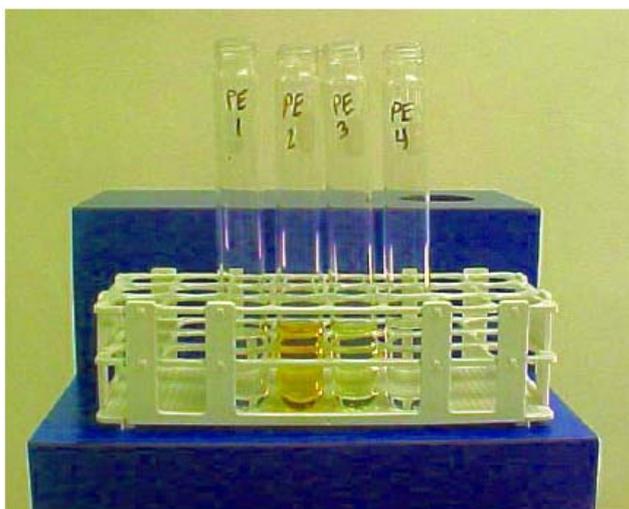


图7 采用一根填充了21克 Envirobeads SX-3 的 Optima 柱, 1: 1 的乙酸乙酯: 环己烷移动相从红辣椒萃取液中洗脱天然色素和树脂, 流速为 4mL/min。

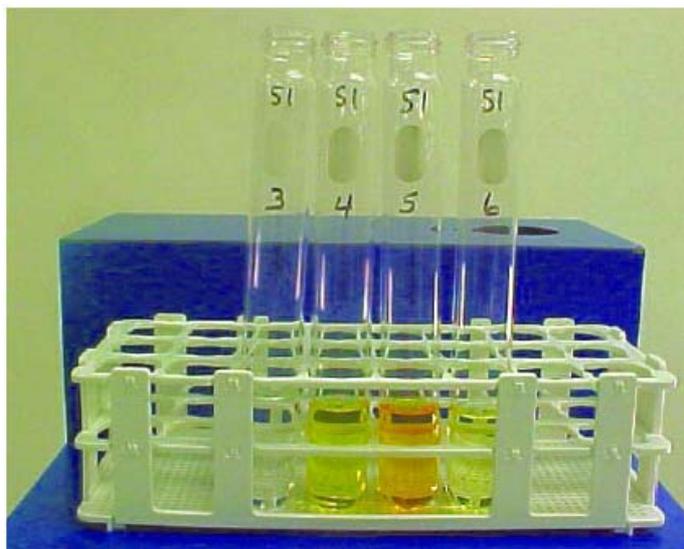


图 7 采用一根填充了 21 克 Envirobeads SX-3 的 Optima 柱，1: 1 的乙酸乙酯: 环己烷移动相洗脱出来苏丹 1 号，流速为 4mL/min。

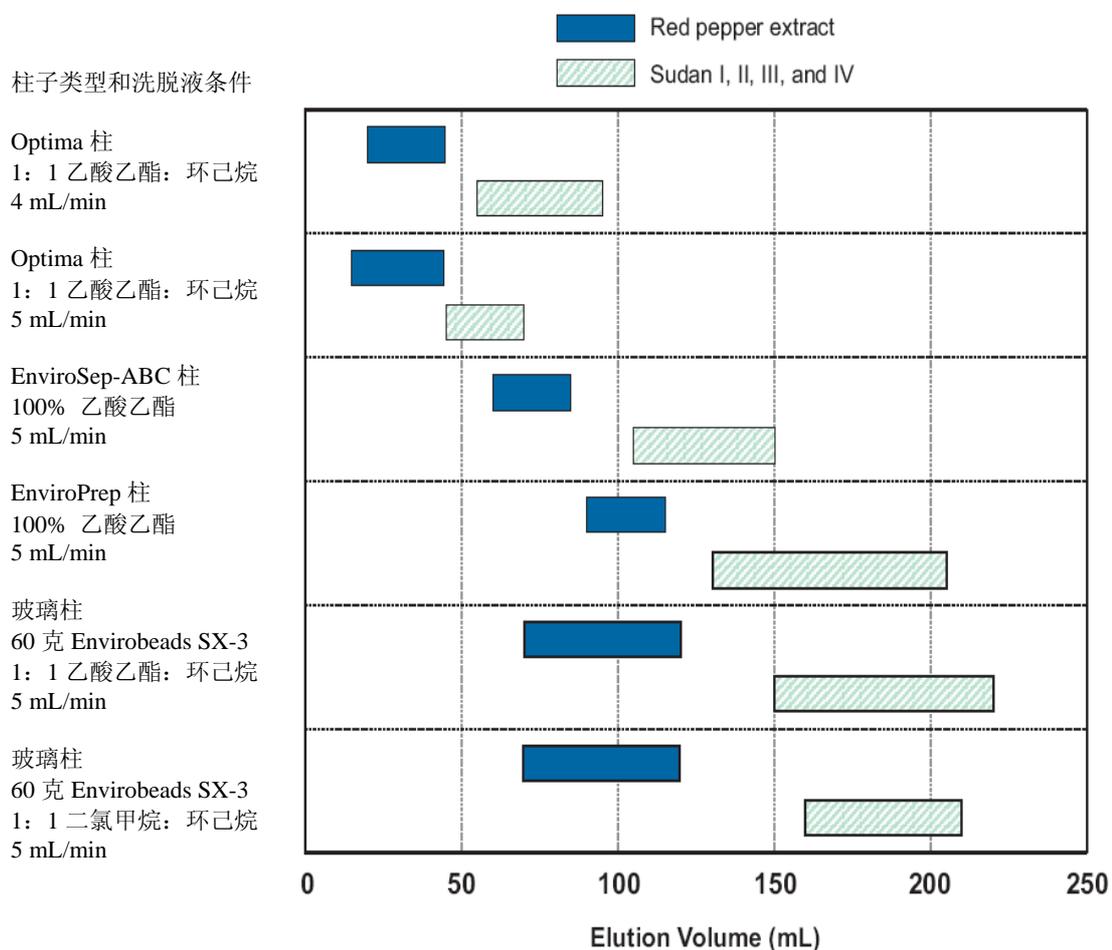


图 9 采用不同的 GPC 柱子和洗脱条件的红辣椒萃取液和苏丹 1、2、3 和 4 号的洗脱体积

结论

在采用 HPLC、LC/MS 或者 GC/MS 分析苏丹 1、2、3 和 4 号之前，GPC 是一个高效的从红辣椒萃取液中分离和去除大分子量的色素和树脂的工具。所有参与测试的柱子分离出来的净化液都能够将红辣椒中的苏丹染料与天然色素和树脂分离开来。最佳的分离是采用一根填充 60 克 Envirobeads SX-3 的玻璃柱，1: 1 的二氯甲烷: 环己烷移动相，流速为 5mL/min 得到的。虽然如此，这根柱子使用大量的含有二氯甲烷的洗脱溶剂，使废弃物的排放成本大大增加。而不锈钢的 EnviroSep-ABC 柱子采用 100% 乙酸乙酯作为洗脱溶剂，提供了更短的洗脱时间和更少的溶剂消耗等优势。而且这根柱子还能够使用其它的洗脱溶剂。这根柱子相对于其它 GPC 柱子的缺点在于其价格较高。Optima 柱采用 1: 1 的乙酸乙酯: 环己烷，4mL/min 这一更低的流速，足够分离开这些物质。这根柱子的优点在于很低的价格以及相比于其它所测试的柱子，是使用少量的洗脱溶剂。

这个方法采用 OI 分析仪器公司的 GPC AutoPrep 2000 系统能够极其方便地实现自动化。GPC 净化相对于其它萃取方法具有相当多的优势，包括：它不会破坏分析物，保护了昂贵的 HPLC 和 GC 的柱子，适用于多种类型的物质并且易于实现自动化。

参考

采用高效液相色谱（HPLC）分析苏丹 1、2、3 和 4 号的方法，加拿大食品监督局；ACIA-CFIA 方法 MET-027-00。

采用 HPLC 侦查和检测辣椒粉中的苏丹 1 号，食品标准；Lincolne Sutton and Wood Ltd.，Norwich，2003 年；方法 145A。

Envirobeads 是 Bio-Rad Laboratories 公司的注册商标

EnviroSep 是 Phenomenex 公司的商标



P.O. Box 9010
College Station, Texas 77842-9010
Tel: (979) 690-1711 • FAX: (979) 690-0440 • www.oico.com