超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 7 种色素

冯永巍[1], 杨 总[2], 孙嵇成[3], 沈晓芳[3], 汪振炯[4*]

(1. 无锡市食品安全检验检测中心, 无锡 214142; 2. SCIEX 中国应用中心, 上海 200335;
3. 江南大学食品学院, 无锡 214122; 4. 南京晓庄学院食品科学学院, 南京 211171)

摘 要: 目的 建立同时测定鸡蛋中 7 种色素含量的超高效液相色谱串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法。**方法** 鸡蛋样品用乙腈超声提取。经 Phenomenex Kinetex F5(100 mm×3.0 mm, 2.6 μm)色谱柱分离, 流动相 A: 0.1%的甲酸/水溶液; 流动相 B: 0.1%的甲酸/乙腈溶液作为流动相梯度洗脱。电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)正离子多反应监测模式定量分析。**结果** 7 种色素在浓度 1 ~ 20 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r^2≥0.998。叶黄素、角黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV的检出限均为 0.1 μg/kg, 核黄素的检出限为 0.2 μg/kg。7 种色素在加标量 2 ~ 10 μg/kg 范围内, 回收率为 80.2%~106.7%, 相对标准偏差为 1.5%~6.0%。**结论** 该方法准确、快速、高效, 可用于鸡蛋中色素的定性、定量分析。

关键词: 色素; 超高效液相色谱-串联质谱; 鸡蛋

Simultaneous determination of 7 kinds of pigments in egg by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FENG Yong-Wei[1], YANG Zong[2], SUN Ji-Cheng[3], SHEN Xiao-Fang[3], WANG Zhen-Jiong[4*]

(1. *Wuxi Institute for Food Control*, *Wuxi* 214142, *China*; 2. *Shanghai AB Sciex Analytical Instrument Trading Co. Ltd*, *Shanghai* 200335, *China*; 3. *School of Food Science and Technology*, *Jiangnan University*, *Wuxi* 214122, *China*
4. School of Food Science, *Nanjing Xiaozhuang University*, *Nanjing* 211171, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish the method for the simultaneous determination of 7 pigments in eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Egg samples were extracted by acetonitrile ultrasound, and separated by Phenomenex Kinetex F5 (100 mm×3.0 mm, 2.6 m) column. Mobile phase A: 0.1% formic acid/aqueous solution and mobile phase B: 0.1% formic acid/acetonitrile solution were used as mobile phase for gradient elution. Positive ion multi-reaction monitoring mode of electrospray ionization (ESI) was used for quantitative analysis. **Results** The linearity of the 7 pigments was good in the range of 1-20 g/L, and the correlation coefficient r^2≥0. 998. The detection limits of lutein, canthaxanthin, Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV were 0.1 g/kg, and that of riboflavin was 0.2 g/kg. The recoveries of 7 pigments were 80.2%-106.7% and the relative standard deviations were 1.5%-6.0% in the range of 2-10 g/kg. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and efficiency, which is suitable for qualitative and quantitative analysis of endogenous and exogenous pigments in eggs.

***通讯作者:** 汪振炯, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养安全研究。E-mail: wangzhenjiong@gmail.com

***Corresponding author:** WANG Zhen-Jiong, Ph.D, Associate Professor, School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China. E-mail: wangzhenjiong@gmail.com

KEY WORDS: pigment; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; egg

1 引 言

随着生活水平不断提高, 人们对天然有机食材的追求成为一种趋势。自然条件下散养鸡所产的蛋, 俗称“草鸡蛋”或“土鸡蛋”已越来越受到人们的青睐, 价格比普通鸡蛋高出 1 倍甚至几倍。普通消费者主要通过蛋黄颜色区分草鸡蛋和普通鸡蛋, 认为草鸡蛋的颜色更深。鸡蛋黄的颜色来自于核黄素、叶黄素等色素[1]。散养鸡有更多机会吃到富含叶黄素的树叶、种子等食物, 叶黄素是一种天然的类胡萝卜素物质, 经代谢后在蛋黄中富集, 使其呈现鲜艳桔黄色[2]。笼养鸡以吃人工饲料为主, 叶黄素摄入偏低, 产蛋周期也较短, 蛋黄多呈浅黄色。为了迎合消费者对蛋黄颜色的偏好, 不少养殖户在饲料中添加一种叫加丽素红的饲料添加剂, 使笼养鸡蛋黄的颜色变深, 再冒充草鸡蛋高价销售[3-7]。加丽素红的主要成分为角黄素, 是一种人工合成的类胡萝卜素。角黄素几乎没有营养价值, 过量摄入还可能对人的视力造成影响[8]。虽然加丽素红被允许在动物饲料中添加, 但将其用于制造假草鸡蛋的行为属于商业欺诈, 严重损害了消费者的知情权。近年来, 利用外源性色素改变禽蛋的颜色以谋取暴利的事件频频曝光, 除加丽素红外, 甚至有个别不法养殖户将工业染料苏丹红用于禽蛋制品等生产[9]。

我国是鸡蛋的生产和消费大国, 鸡蛋的质量安全关乎民生也影响市场稳定。鸡蛋中的内源性和外源性色素能在一定程度上反映鸡蛋的品质和安全风险。国内外目前已对鸡蛋中色素类物质的检测开展大量的研究, 如焦广睿等[10]建立了蛋黄中类胡萝卜素类着色剂的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测方法, 刘俊等[11-13]建立了禽蛋中的苏丹红检测方法, 何康昊等[14,15]建立了检测蛋黄中角黄素和虾青素的高效液相色谱法。上述方法的局限性在于检测的目标物比较单一, 前处理技术也各不相同, 无法同时对蛋黄中多种色素物质进行全面的分析。本研究建立了同时检测蛋黄中核黄素、叶黄素、角黄素、苏丹红I-IV等 7 种色素的超高效液相色谱串联三重四级质谱方法, 以期为基于色素分析的鸡蛋质量评价和草鸡蛋的快速鉴别提供有力的技术手段。

2 材料与方法

2.1 材 料

鸡蛋样品购于本地超市。

2.2 仪器与试剂

ABSCIEX QTRAP 4500 高效液相色谱质谱联用仪(美国 SCIEX 公司); AH-2010 高压均质机(加拿大 ATS 公司); Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机(德国艾本德公司); PL602E 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Vortex 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Phenomenex Kinetex F5 色谱柱(美国飞诺美公司); 有机微孔滤膜(0.22 μm, 美国安捷伦公司); IQ7000 型超纯水机(德国密理博公司)。

核黄素、角黄素、叶黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV标准品(纯度≥98%, 上海安普实验科技有限公司); 乙腈、甲酸(HPLC-MS 级, 上海安普实验科技有限公司); 无水硫酸镁(分析纯, 上海安普实验科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取适量的叶黄素、核黄素、角黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV标准品各 2 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 再用乙腈溶解并定容, 配制成浓度为 200 mg/L 的标准储备液。

2.2.2 样品前处理

称取均质后的鸡蛋样品 2 g, 置于 50 mL 离心管内, 加入乙腈 20 mL 和无水硫酸镁 4 g, 旋涡振荡 1 min, 超声提取 10 min 再 3000 r/min 离心 3 min, 上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 等待上机[10]。

2.2.3 仪器条件

(1)液相色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Kinetex F5(100 mm×3.0 mm, 2.6 μm), 流动相 A: 0.1%的甲酸/水溶液; 流动相 B: 0.1%的甲酸/乙腈溶液; 流速: 0.45 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 40 ℃, 液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序
Table 1 HPLC gradient elution program

时间/min	A/%	B/%
0.00	20.0	80.0
0.50	20.0	80.0
2.00	0.0	100.0
4.50	0.0	100.0
4.60	20.0	80.0
6.60	20.0	80.0

(2)质谱条件

电喷雾离子源(ESI)、正离子扫描模式; 离子源温度 550 ℃; 气帘气体 30 psi; 毛细管电压电压 5500 V; 雾化气压力 55 psi; 辅助气压力 55 psi。多反应监测、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2　质谱参数
Table 2　Mass detection parameters of each pigment

化合物	母离子 (*m/z*)	子离子 (*m/z*)	去簇电压/V	碰撞能量/V
核黄素	377.1	243.1	110	33
		172.1		53
叶黄素	568.4	338.1	80	24
		476.2		19
角黄素	565.4	203.2	85	25
		132.9		40
苏丹红I	249.2	156.1	100	20
		93.1		23
苏丹红II	277.2	156.1	90	20
		121.1		22
苏丹红III	353.2	156.1	120	28
		196.1		29
苏丹红IV	381.2	224.1	130	28
		156.1		31

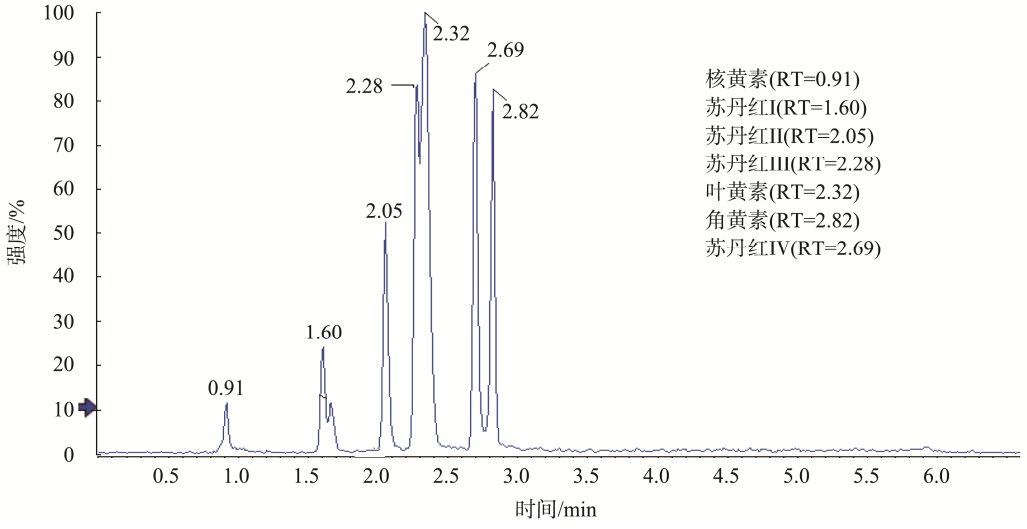
3　结果与分析

3.1　定性结果

7 种色素的提取离子色谱图见图 1。在检测目标物中, 叶黄素、角黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV的极性较弱, 核黄素的极性较强。如图 1 所示, 在方法条件下 3 min 之内, 极性差异较大的 7 种色素物质全部出峰, 且峰形良好, 易于定性、定量。

3.2　线性相关性与检出限

用乙腈稀释标准储备液, 得到浓度为 1、2、5、10、20 μg/L 标准工作液。将标准工作液按照 2.2.3 的方法进样测试。以进样浓度为横坐标, 以峰面积的响应值为纵坐标绘制标准曲线。以信噪比 3:1 作为最低检出限(limit of detection, LOD), 结果如表 3 所示。7 种色素在浓度 1~20 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r^2≥0.998。叶黄素、角黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV的检出限均为 0.1 μg/kg, 角黄素和苏丹红色素的检出限优于文献[11]中结果, 核黄素的检出限为 0.2 μg/kg。



注: RT: 出峰时间/min

图 1　7 种色素的色谱图

Fig.1　The chromatogram of 7 pigments

表 3　标准曲线与线性相关性
Table 3　Standard curve and linear correlation

色素成分	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数 r^2	检出限/(μg/kg)
核黄素	1~20	Y=7767.88231X+2240.7029	0.999	0.2
叶黄素	1~20	Y=70025X-30869.8	0.999	0.1
角黄素	1~20	Y=27157.84821X-7920.31471	0.998	0.1
苏丹红I	1~20	Y=4510.75123X+43.97	0.999	0.1
苏丹红II	1~20	Y=23136.33594X+3205.86519	0.999	0.1
苏丹红III	1~20	Y=29173.03255X+2402.59075	0.999	0.1
苏丹红IV	1~20	Y=46595.5X+3269.86523	0.999	0.1

3.3 回收率与精密度

取鸡蛋样品，按照 2.2.2 与 2.2.3 的方法提取、测定，得到 7 种色素物质的本底值。再向样品中分别加入 4、10、20 μg 的 7 种色素标准品，制备加标浓度 2、5、10 μg/kg 的样品，进行回收率和精密度试验。每个含量包含 6 组水平重复，取平均值，计算回收率和精密度，结果见表 4。7 种色素加标量在 2~10 μg/kg 浓度范围内，回收率为 80.2%~106.7%，相对标准偏差 RSD 为 1.5%~6.0%。

表 4 精密度与回收率(*n*=6)
Table 4 Results of recoveries and precisions(*n*=6)

	添加量/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
核黄素	2	80.2	6.0
	5	83.1	5.3
	10	85.2	5.1
叶黄素	2	86.4	4.2
	5	92.0	2.8
	10	93.2	2.7
角黄素	2	99.3	3.1
	5	102.2	1.8
	10	102.3	1.5
苏丹红I	2	90.1	3.1
	5	93.5	2.3
	10	98.4	2.0
苏丹红II	2	98.6	4.7
	5	104.1	3.0
	10	106.7	2.9
苏丹红III	2	89.6	5.6
	5	94.5	4.7
	10	95.3	4.3
苏丹红IV	2	90.6	4.5
	5	94.4	3.4
	10	96.2	2.3

4 结 论

本研究建立了同时检测鸡蛋中核黄素、叶黄素、角黄素、苏丹红I、苏丹红II、苏丹红III、苏丹红IV的超高效液相色谱串联三重四级杆质谱联用方法。该方法准确、快速、高效，实现了一次前处理一次分析同时检测不同极性的多种色素，可用于鸡蛋中内、外源色素的定性、定量分析。

参考文献

[1] 黄好强, 张立恒, 刘健, 等. 鸡蛋的外观性状与其质量的关系[J]. 现代牧业, 2018, 2(2): 46–49.
Huang HQ, Zhang H, Liu J, *et al*. Relationship between appearance and quality of egg [J]. Mod Anim Husband, 2018, 2(2): 46-49.

[2] 张权, 李辉, 徐鹏, 等. 叶黄素对蛋鸡蛋黄颜色、生产性能及蛋品质的影响[J]. 中国家禽, 2019, 41(6): 33–36.
Zhang Q, Li H, Xu P, *et al*. Effects of lutein on the color, production performance and quality of egg yolk in laying hens [J]. China Poul, 2019, 41(6): 33–36.

[3] 罗瑜, 田洋, 肖蓉, 等. 加丽素红在市售鸡蛋中残留情况的研究[J]. 中国食物与营养, 2013, 19(8): 16–19.
Luo Y, Tian Y, Xiao R, *et al*. Study on the residues of carophyll red in eggs sold in the market [J]. China Food Nutr, 2013, 19(8): 16–19.

[4] 裴贤, 大学. 变了“心”的柴鸡蛋[J]. 商品与质量, 2004, (17): 4–5, 2.
Pei X, Da X. The chai egg with changed "heart" [J]. Commod Qual, 2004, (17): 4–5, 2.

[5] Alonso AC, García–De BE, Mateo R. Dietary canthaxanthin reduces xanthophy ll uptake and red coloration in adult red–legged partridges [J]. J Exp Biol, 2018, 221: 22.

[6] 梁远东, 殷进炎, 黄炳福, 等. 日粮中添加角黄素和阿卜酯对母鸡产蛋性能和蛋黄颜色的效果研究[J]. 饲料博览, 2005, (5): 1–3.
Liang YD, Yin JY, Huang BF, *et al*. Effects of dietary addition of hornflavin and abb on egg laying performance and yolk color in hens [J]. J Feed Sci, 2005, (5): 1–3.

[7] 蔡元丽, 谢幼梅. 着色剂及其在家禽生产中的应用[J]. 山东畜牧兽医, 2000, (6): 52–53.
Cai YL, Xie YM. Colouring agent and its application in poultry production [J]. Shandong J Anim Husband Veter Med, 2000, (6): 52–53.

[8] 许晖. 高效液相色谱法测定饲料中角黄素[J]. 福建分析测试, 2017, 26(1): 36–39.
Xu H. Determination of hordoflavin in feed by high performance liquid chromatography [J]. Fujian Anal Test, 2017, 26(1): 36–39.

[9] 王宏伟, 刘素丽, 赵梅, 等. 食品中非法添加工业染料危害的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 1–7.
Wang HW, Liu SL, Zhao M, *et al*. Research progress on the harm of illegally adding industrial dyes to food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 1–7.

[10] 焦广睿, 王柯. 高效液相色谱–串联质谱法测定蛋黄中 4 种类胡萝卜素着色剂的含量[J]. 上海预防医学, 2018, 30(6): 472–475.
Jiao GR, Wang K. Determination of 4 carotene colorants in egg yolk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Shanghai J Pre Med, 2018, 30(6): 472–475.

[11] 刘俊, 朱吕, 陆春燕, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽蛋中的角黄素、对位红和苏丹红I～IV[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 4953–4958.
Liu J, Zhu L, Lu CY, *et al*. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and detection canthaxanthin, para red and Sudan red I~IV in the egg [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(18): 4953–4958.

[12] 左晓磊, 韩爱云, 刘强, 等. 超高效液相色谱–串联质谱法测定禽蛋中苏丹红的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(2): 457–462.
Zuo XL, Han AY, Liu Q, *et al*. Determination of Sudan red residues in poultry eggs by ultra high performance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(2): 457–462.

[13] 曹丽芬, 姚黎霞, 何良兴, 等. 高效液相色谱法快速检测食品中苏丹红的含量[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 1532–1533.
Cao LF, Yao LX, He LX, *et al*. rapid determination of Sudan red in food by high performance liquid chromatography [J]. Anhui Agric Sci, 2014, 42(5): 1532–1533.

[14] 何康昊, 邹晓莉, 刘祥, 等. 反相高效液相色谱–二极管阵列检测蛋黄中的角黄素和虾青素[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(1): 113–117.
He KH, Zou XL, Liu X, *et al*. Determination of hornflavin and astaxanthin in egg yolk by rp-diode array [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Ed), 2012, 43(1): 113–117.

[15] 余孔捷, 钱疆, 杨方, 等. 高效液相色谱法测定动物源性食品中角黄素、虾青素的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, (3): 145–148.
Yu KJ, Qian J, Yang F, *et al*. Determination of hornflavin and astaxanthin in food of animal origin by high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2008, (3): 145–148.

(责任编辑：王　欣)

作者简介

冯永巍，博士，高级工程师，主要研究方向为食品质量安全检测。
E-mail: 402200023@qq.com

汪振炯，博士，副教授，主要研究方向为食品营养安全研究。
E-mail: wangzhenjiong@gmail.com

“茶学研究”专题征稿函

茶叶源于中国，与咖啡、可可并称为世界三大饮料。茶叶可鲜食，也可以加工精制备用，具有降压、提神等多种保健功能，且含有多种有机化学成分和无机矿物元素。国内外对茶叶市场需求稳定增长，我国的茶产业增长潜力巨大，茶已成为社会生活中不可缺少的健康饮品和精神饮品。

鉴于此，本刊特别策划了“**茶学研究**”专题，主要围绕**茶叶的贮藏保鲜、精深加工、品质评价、生物化学和功能性成分、香气成分分析、污染物分析检测、茶树生长代谢、茶叶资源的质量标准化等方面**展开论述和研究，综述及研究论文均可。

本刊主编吴永宁研究员、专题主编肖文军教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件，综述、研究论文、研究简报均可，以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 **2020 年 7 月**出版，请在 **2020 年 5 月 15 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题，并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时，希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

谢谢您的参与和支持！

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明**茶学研究**专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明**茶学研究**专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部