

高效液相色谱串联质谱法测定黄花鱼中硫黄素 T

姜学涯*, 钟彩丽

(深圳凯吉星农产品检测认证有限公司, 深圳 518000)

摘要: 目的 建立高效液相色谱串联质谱法检测黄花鱼中硫黄素 T 的方法。**方法** 样品以甲醇作为萃取溶剂, 经 C₁₈ 反相色谱柱分离, 以甲醇和 0.1% 甲酸酸化的 0.02 mol/L 乙酸铵作为流动相梯度洗脱, 流速为 0.30 mL/min, 采用电喷雾离子源, 正离子多反应检测扫描方式监测, 基质匹配标准曲线法定量。**结果** 硫黄素 T 在 1~100 ng/mL 范围内具有良好的线性, 方法定量限为 1.2 μg/kg, 回收率为 85.5%~93.8%, 相对标准偏差为 0.5%~3.1%。**结论** 该检测方法操作简单, 结果准确, 可应用于黄花鱼中硫黄素 T 的日常检测。

关键词: 高效液相色谱串联质谱法; 黄花鱼; 硫黄素 T

Determination of thioflavin T in yellow croaker by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

JIANG Xue-Ya*, ZHONG Cai-Li

(Shenzhen Kaijixing Food Quality Testing Tech Center Co. Ltd., Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of thioflavin T in yellow croaker by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with methanol as solvent, separated by C₁₈ reverse phase chromatography with gradient elution using methanol and 0.1% formic acidified 0.02 mol/L ammonium acetate as the mobile phases. The flow rate was 0.30 mL/min. The electrospray ionization source was used. The positive ion multiple reaction detection scanning method was used for monitoring. The matrix matching standard curve method was used for quantitative analysis. **Results** The thioflavin T had good linearity in the range of 1–100 ng/mL. The limit of quantitation was 1.2 μg/kg, the recoveries were 85.5%–93.8%, and the relative standard deviation were 0.5%–3.1%. **Conclusion** The method is simple and the result is accurate. It can be applied to the daily detection of thioflavin T in yellow croaker.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; yellow croaker; thioflavin T

0 引言

黄花鱼是一种优质名贵经济鱼类, 广泛分布于北起黄海南部, 经东海、台湾海峡, 南至南海雷州半岛以东, 由于其本身具有很高的营养价值, 因此深受消费者欢迎^[1-3]。黄花鱼体色是其作为商品价值的重要指标, 而黄花鱼本身不能合成黄色素, 其需要摄食大量富含色素的各种浮游动

植物或饲料等从而体色鲜艳^[4-6]。但经常有媒体报道, 市民购买的黄花鱼鱼身金黄、个头硕大、品相非常好, 但是在宰杀黄花鱼时其腹部存在掉色的情况, 市民怀疑在黄花鱼养殖过程或流通时存在非法添加黄色素的情况。按照 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[7]要求, 目前黄色素不得在水产养殖过程中使用, 因此有必要加强黄花鱼中黄色素的研究。

*通信作者: 姜学涯, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jiangxy@f-q-t.com

*Corresponding author: JIANG Xue-Ya, Engineer, Shenzhen Care-green Agriculture Products Testing & Certification Co., Ltd., Dongtai Road, Longgang District, Shenzhen 518000, China. E-mail: jiangxy@f-q-t.com

目前市场上常见的黄色素主要有日落黄、柠檬黄、硫黄素 T 等多种黄色素,其中日落黄、柠檬黄等检测方法有较多的研究^[8-15],且在国抽、省抽等食品安全管控领域均有涉及。但是硫黄素 T 相关方面的研究极少,且停留在利用液相色谱检测的阶段^[16]。硫黄素 T 又称碱性黄 1,是一种化工染料,若长期食用含硫黄素 T 的食品会导致肠胃吸收功能障碍,情况严重者有可能影响儿童智力发展、致癌等症状。目前液相色谱串联质谱仪已经成为一种常规的检测设备,但是目前没有利用液相色谱串联质谱法检测硫黄素 T 的相关研究,并且利用液相色谱法检测硫黄素 T 时仅能通过出峰时间及光谱图进行定性及定量,极易出现误检的行为。本研究通过对黄花鱼的样品进行净化和提取,利用高效液相色谱串联质谱联用法检测硫黄素 T,以期对于日后硫黄素 T 的研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

LC-20A 液相色谱仪(日本岛津公司); API 4000 串联质谱联用仪(美国 SCIEX 公司); X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Cascada 纯水仪(美国 PALL 公司); Multi Reax 振荡器(德国 Heidolph 公司); KQ-100E 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

空白基质黄花鱼,购于某大型超市。

甲醇、乙腈、乙醇(色谱纯,美国 J.T.Baker 公司)。

硫黄素 T 标准物质(25 g/瓶,用甲醇稀释至 0.1 μg/mL 中间储备溶液,美国 J&K 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 仪器条件

串联质谱联用仪条件:电喷雾离子源(ESI+);质谱扫描方式为多反应监测;电喷雾电压 3.2 kV;离子源温度 150 °C;雾化温度 400 °C;碰撞气为高纯氮气;碰撞气流速 0.16 mL/min。硫黄素 T 检测离子对、锥孔电压(cone)、碰撞能量(collision energy, CE)见表 1。

表 1 硫黄素 T 的特征离子对、锥孔电压、碰撞能量
Table 1 Precursor ion, product ion, cone, CE of thioflavin T

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
硫黄素 T	282.800	267.300 ^{*1}	91.00	50.00
	282.800	252.000 ^{*2}	91.01	59.00

注: *1 表示硫黄素 T 定量离子对、*2 为硫黄素 T 定性离子对。

液相色谱仪条件: Inersil ODS-3 液相色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μm); 流速 0.30 mL/min; 柱温 35 °C;

进样量 10 μL; 流动相: A 甲醇, B 0.1%甲酸+0.02 mol/L 乙酸铵, 梯度洗脱, 洗脱条件见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱条件
Table 2 Gradient elution condition of mobile phase

时间/min	甲醇/%	0.1%甲酸+0.02 mol/L 乙酸铵/%
0	20	80
2	20	80
4	80	20
6	20	80
8	20	80

1.3.2 标准工作溶液

用移液枪准确吸取适量的 0.1 μg/mL 的中间储备标准溶液,再用空白黄花鱼基质甲醇溶液逐步稀释并配制成为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 标准工作溶液。

1.3.3 样品前处理

将已均质碎好黄花鱼样品放置至室温,搅拌均匀,准确称取 5 g 样品于 50.0 mL 离心管中并记录重量,往离心管中准确移取 10.0 mL 甲醇并盖好盖子摇匀,利用振荡器振荡 5 min 后再放入超声仪中超声 5 min,离心管在 7000 r/min 的条件下,利用离心机离心 2 min,收集上层提取液并过 0.22 μm 滤膜上机测试^[8-9]。

2 结果与分析

2.1 硫黄素 T 的定量及定性质谱图

通过基质加标的方式对样品进行测试,从图 1 可以看出硫黄素 T 的定量及定性质谱图目标物干扰少、峰型尖锐,峰型对称,并且在 4.74 min 出峰。说明 1.3.3 所述前处理流程及仪器方法有效,能准确、快速检测样品中硫黄素 T,具体见图 1。

2.2 检出限与线性范围

在空白黄花鱼基质中准确加入适量的硫黄素 T 的标准溶液,按照步骤 1.3.3 进行前处理实验,取处理后上清液上液相色谱串联质谱联用仪上机测试,依据 S/N 信噪比大于 10 得出定量限为 1.2 μg/kg,其线性方程和相关系数为 $Y=1.51e+005X+1.56e+004$ ($r=0.999$)。

2.3 萃取溶剂的选择对回收率的影响

硫黄素 T 极易溶于热水,水溶液呈黄色,且易溶于乙醇、甲醇等,呈黄色带绿色荧光。为更加充分的验证萃取溶剂对硫黄素 T 的影响,现选择甲醇、乙醇及乙腈 3 种萃取剂作为提取液。在空白黄花鱼基质中加入硫黄

素 T 标准溶液,按照“1.3.3 样品前处理”进行提取,回收率见表 3, 硫黄素 T 由甲醇提取时回收率最高,提取效果最好。

2.4 振荡及超声时间对回收率的影响

在空白黄花鱼样品中分别准确添加适量标准溶液,

使空白基质样品中硫黄素 T 浓度分别为 0.5、1、2 ng/mL, 分别振荡 5 min+超声 5 min、振荡 10 min+超声 10 min、振荡 15 min+超声 15 min、振荡 20 min+超声 20 min, 按照“1.3.3 样品前处理”进行提取, 分别计算硫黄素 T 的回收率, 见表 4。

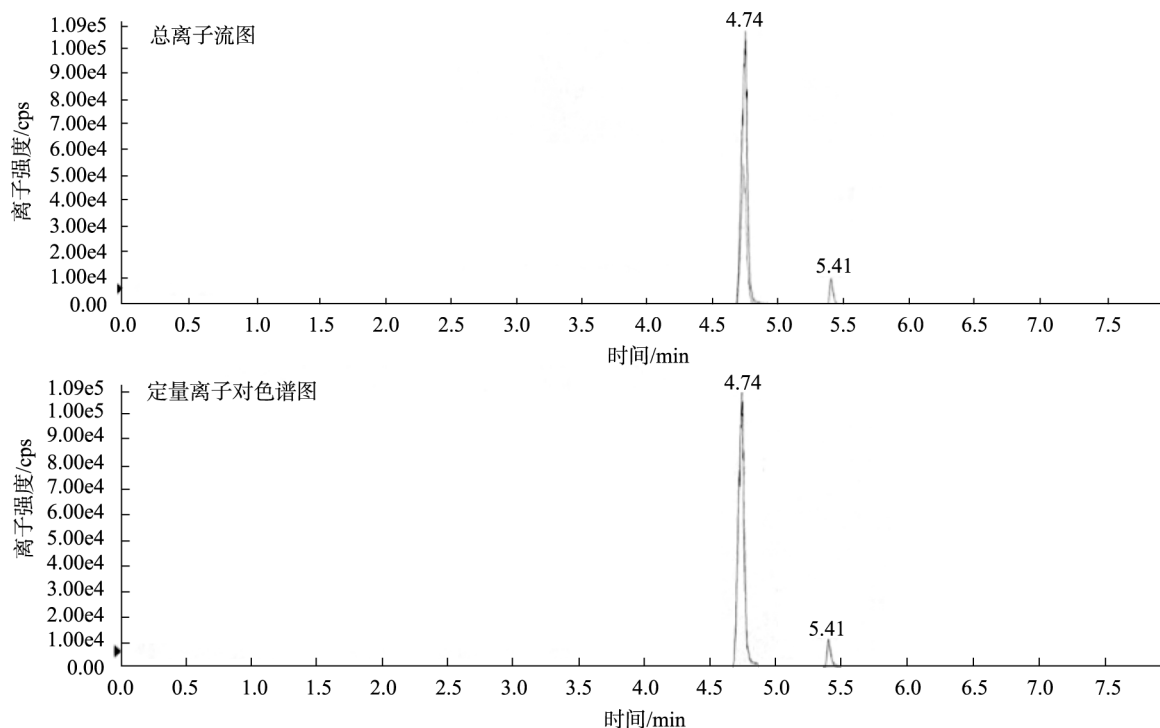


图1 硫黄素质谱图

Fig.1 Chromatogram of Thioflavin T

表3 不同萃取溶剂对于回收率的影响

Table 3 Effects of different extraction solvents on recovery rate

项目	理论添加浓度/(ng/mL)	甲醇/%	乙醇/%	乙腈/%
硫黄素 T	0.5	90.2	87.1	80.3
	1	91.5	88.5	83.5
	2	92.6	90.0	85.4

表4 不同振荡时间对于回收率的影响

Table 4 Effects of different oscillating time on recovery rate

项目	理论添加浓度/(ng/mL)	振荡 5 min+超声 5 min	振荡 10 min+超声 10 min	振荡 15 min+超声 15 min	振荡 20 min+超声 20 min
硫黄素 T	0.5	90.0%	90.5%	91.8%	91.5%
	1	91.1%	91.8%	92.1%	92.0%
	2	92.4%	92.0%	93.2%	92.9%

由表 4 可知, 硫黄素 T 振荡时间越长, 回收率有逐步增长的趋势, 但是超过 15 min 后回收率有一定的回落, 在振荡 15 min+超声 15 min 时回收率最高, 提取效果最好。但是考虑到在实际检测过程中的检测效率问题及回收率, 实验前处理振荡时间建议振荡 5 min+超声 5 min 较适宜。

2.5 方法的精密度与回收率

由表 5 可知, 通过空白黄花鱼基质中加入一定量的硫黄素 T 标准溶液, 测试其平均回收率均在 87.9%~92.0%之间, 说明 1.3.3 所述前处理方法回收率良好; 精密度在

0.5%~3.1%之间, 说明 1.3.3 所述前处理方法精密度良好。结合二者数据可以看出 1.3.3 所述前处理方法能很好的应用于黄花鱼中硫黄素 T 的检测。

2.6 实际样品检测

为调研流通环节黄花鱼的硫黄素 T 的食品安全现状, 在批发市场、超市及菜市场等 3 个流通环节节点各抽取 5 批次的黄花鱼样品, 按照 1.3.3 的前处理方法进行前处理等上机测试, 检测结果见表 6, 未发现流通环节黄花鱼中硫黄素 T 非法添加情况, 食品安全现状良好。

表 5 硫黄素 T 的精密度和回收率
Table 5 RSDs and recoveries of Thioflavin T

序号	硫黄素 T/(ng/mL)	进样次数						精密度/%
		1	2	3	4	5	6	
1	0.20	0.180	0.171	0.173	0.185	0.172	0.174	3.1
2	0.50	0.463	0.455	0.469	0.459	0.451	0.460	1.4
3	1.00	0.928	0.914	0.919	0.922	0.918	0.916	0.5

表 6 实际样品的检测
Table 6 Testing of actual samples

流通节点	样品名称	样品数量(批次)	检测项目	检测结果
批发市场		5	硫黄素 T	未检出
超市	黄花鱼	5	硫黄素 T	未检出
菜市场		5	硫黄素 T	未检出

3 结论

本研究建立高效液相色谱串联质谱法检测黄花鱼中的硫黄素 T 的方法, 方法中明确了硫黄素 T 的仪器方法及前处理方法。此方法前处理过程简单、快速, 利用高效液相色谱串联质谱联用法能准确的定性和定量, 对于日常黄花鱼中硫黄素 T 的检测起到一定的指导意义, 为黄花鱼中硫黄素 T 违规使用提供了检测技术基础。

参考文献

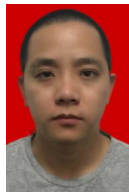
- [1] 黄钧, 杨淞, 覃志彪, 等. 泥鳅和瓦氏黄颡鱼的含肉率及营养价值比较研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 990-997.
HUANG J, YANG S, QIN ZB, *et al.* Comparative study about flesh contents and nutrient values in brown bullhead, loach and darkbarbel catfish [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2010, 34(5): 990-997.
- [2] 张明, 陶其辉, 肖秀兰, 等. 鄱阳湖黄颡鱼含肉率及肌肉营养分析[J]. 江西农业学报, 2001, (3): 39-42.
ZHANG M, TAO QH, XIAO XL, *et al.* Analysis of meat rate of *Pseudobagrus fulvidraco* from poyang lake and nutrient composition in its muscle [J]. Acta Agric Jiangxi, 2001, (3): 39-42.
- [3] 黄峰, 严安生, 熊传喜, 等. 黄颡鱼的含肉率及鱼肉营养评价[J]. 淡水渔业, 1999, (10): 3-5.

- HUANG F, YAN AS, XIONG CX, *et al.* Evaluation of the nutrition and the rate of flesh in the whole body of *pelteobagrus fulvidraco* rich [J]. Freshwater Fish, 1999, (10): 3-5.
- [4] 张丽, 成艳波, 程炜轩, 等. 组胺对黄颡鱼生长及体色变异的影响[J]. 淡水渔业, 2017, (5): 79-84.
ZHANG L, CHENG YB, CHENG YX, *et al.* Effect of dietary histamine levels on growth performance and body pigmentation of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Freshwater Fish, 2017, (5): 79-84.
- [5] 丁小峰, 叶元土, 蒋蓉, 等. 饲料色素对黄颡鱼皮肤类胡萝卜素、叶黄素含量和酪氨酸酶活力的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(11): 1728-1735.
DING XF, YE YT, JIANG R, *et al.* Effects of feed pigments on carotenoids, lutein content and tyrosinase activity in the skin and serum of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. J Fish China, 2010, 34(11): 1728-1735.
- [6] 王斐, 彭淇, 吴彬, 等. 日粮中添加叶黄素与角黄素对瓦氏黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli* Richardson) 体色影响研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 879-885.
WANG F, PENG Q, WU B, *et al.* Effect of xanthophyll and canthaxanthin in diet on body color of yellow catfish (*Pelteobagrus vachelli* Richardson) [J]. Oceanol Et Limnol Sin, 2014, 45(4): 879-885.
- [7] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for use of food additives [S].
- [8] 廖若宇, 孙悦, 刘新保, 等. 食品中合成着色剂的提取方式及测定方法

- 研究进展[J/OL]. 食品工业科技, 2020, (20): 342-350.
LIAO RY, SUN Y, LIU XB, *et al.* Research progress in extraction and determination of synthetic colorants in food [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, (20): 342-350.
- [9] 胡贝, 李丽霞, 刘红, 等. SPE-HPLC 法测定食品中 8 种合成着色剂[J]. 食品工业, 2020, 41(1): 298-301.
HU B, LI LX, LIU H, *et al.* Determination of 8 synthetic colorants in food by high performance liquid chromatography with solid phase extraction [J]. *Food Ind*, 2020, 41(1): 298-301.
- [10] 胡江涛, 刘兴睿, 何成艳, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中 16 种禁用色素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6456-6462.
HU JT, LIU XR, HE CY, *et al.* Simultaneous determination of 16 prohibited in food by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(19): 6456-6462.
- [11] 严卓彦, 吴侯. 液相色谱法快速检测染色梅鱼中日落黄、柠檬黄的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2786-2790.
YAN ZY, WU Y, Rapid determination of sunset yellow and lemon yellow in *Collichthys niveatus* by liquid chromatograph [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(9): 2786-2790.
- [12] 翟海云, 刘振平, 何建英, 等. 高效液相色谱法同时测定黄花鱼中 4 种禁用黄色工业染料[J]. 理化检验(化学分册), 2013, 49(9): 1110-1113.
ZHAI HY, LIU ZP, HE JY, *et al.* Four forbidden yellow industrial dyes in yellow croaker were determined by HPLC simultaneously [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2013, 49(9): 1110-1113.
- [13] 郑月明, 国伟, 聂雪梅, 等. 食品中违禁添加的非食用色素检测技术综述[J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 222-228.
ZHENG YM, GUO W, NIE XM, *et al.* Research on detection methods of inedible pigment illegally added to food [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(9): 222-228.
- [14] 梁玉英, 曾俊洁, 田野, 等. 高效液相色谱法测定食品中碱性黄、碱性嫩黄、碱性橙 II、酸性橙 II、罗丹明 B[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(19): 2740-2742, 2749.
LIANG YY, ZENG JJ, TIAN Y, *et al.* Determination of basic yellow, basic flavine, basic orange II, acid orange II and rhodamine B in foods by high performance liquid chromatography method [J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2014, 24(19): 2740-2742, 2749.
- [15] ZHU SQ, ZHOU J, JIA HF, *et al.* Liquid-liquid microextraction of synthetic pigments in beverages using a hydrophobic deep eutectic solvent [J]. *Food Chem*, 2018, 243: 351-356.
- [16] 沙鸥, 陈太卫, 冯艳丽, 等. 大黄鱼中硫磺素 T 残留的 HPLC 分析[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(16): 3910-3911, 3914.
SHA O, CHEN TW, FENG YL, *et al.* Determination of thioflavin T in *pseudosciaenacrocea* with HPLC [J]. *Hubei Agric Sci*, 2014, 53(16): 3910-3911, 3914.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



姜学涯, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: jiangxy@f-q-t.com