

固相萃取-液质联用同时检测豆制品中4种红黄色系工业染料

朱晓军, 颜春荣*, 董 璨, 徐春祥

(江苏省产品质量监督检验研究院, 南京 210007)

摘 要: **目的** 以 WAX 固相萃取柱净化处理, 建立豆制品中违禁添加色素碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和罗丹明 B 的前处理方法。**方法** 利用电喷雾离子源(ESI), 碱性橙、碱性嫩黄和罗丹明 B 采用正离子模式, 酸性橙采用负离子模式, 建立正负离子切换的多反应监测(MRM)的检测方法。**结果** 碱性橙 II、碱性嫩黄 O 的检出限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$, 酸性橙 II 和罗丹明 B 的检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 方法回收率为 84.2~95.1%, 相对标准偏差(RSD)小于 4.5%。**结论** 建立的液质联用方法具有快速、灵敏、准确等优点, 可用于豆制品中上述 4 种非法添加的红黄色系工业染料的同时测定及确证。

关键词: 碱性橙 II; 酸性橙 II; 碱性嫩黄 O; 罗丹明 B; 液质联用方法; 豆制品

Simultaneous determination of 4 industrial dyes in soybean products by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHU Xiao-Jun, YAN Chun-Rong*, DONG Can, XU Chun-Xiang

(Jiangsu Province Products Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China)

ABSTRACT: Objective To develop a pre-treatment method for the 4 illegal added dyes of Chrysoidine II, Auramine O, Orange II and Rhodamine B in soybean products purified with WAX solid phase extraction column. **Methods** Positive ESI mode was used for Chrysoidine II, Auramine O and Rhodamine B while negative ESI mode for Orange II, the positive-negative switch MRM detection method was developed. **Results** The LOD for Chrysoidine II and Auramine O was 1.0 $\mu\text{g/kg}$, while it was 0.5 $\mu\text{g/kg}$ for Orange II and Rhodamine B, the recovery rate for this method was from 84.2 to 95.1%, the RSD values were less than 4.5%. **Conclusion** The obtained liquid chromatography-tandem mass spectrometric method is fast, sensitive and accurate, and it can be used for the analysis and confirmation of the 4 illegally added industrial dyes in soybean products.

KEY WORDS: Chrysoidine II; Auramine O; Orange II; Rhodamine B; liquid chromatography-mass spectrometric method; soybean products

碱性橙 II、酸性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 均属于卫生部公布的可能添加到食品中的非食用物质, 主要用于家具、纸张、纺织品等工业品染色, 根据浓度不同, 染色后物品色泽呈黄色至红色。这些染料都有致癌、致畸、致突变性, 食用后会对人体健康

产生危害。但由于这些染料染色后色泽稳定、鲜艳, 尽管明令禁止, 仍有不法商人会将其违法加入豆制品等食品中。

目前这四种工业染料的检测方法主要为液相色谱法^[1]和液质联用法^[2-7]。液相色谱法使用范围广, 但

*通讯作者: 颜春荣, 女, 山东济宁人, 硕士研究生学历, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。Email: chunrongyan@gmail.com

紫外检测器灵敏度低, 定性能力弱, 尤其在检测复杂基质的食品时, 会难以定性; 采用荧光检测器仅对少数有荧光特性的化合物具有较好的响应。采用液相色谱-串联质谱法灵敏度高、选择性好、可以同时建立多组分的检测, 现尚无采用液质联用法同时检测上述四种工业染料的报道。本研究以 WAX 固相萃取柱净化处理, 建立了豆制品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和罗丹明 B 违禁添加色素的液相色谱-串联四级杆质谱的测定方法。通过本方法的建立, 可以对豆制品中违禁添加工业染料进行监控, 保障食品安全。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

G6410B 液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 固相萃取装置(supelco); 分析天平(Mettler AE-160); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); 高速离心机(德国 Backman 公司)。

碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和罗丹明 B(纯度>98%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯; 乙酸铵为优级纯。

1.2 标准溶液配制

储备液: 分别准确称取 0.0100 g 碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和罗丹明 B 标准品, 用甲醇溶解定容至 10 mL, 4 ℃冰箱存放。

标准工作液的配制: 准确量取适量储备液, 以 50%甲醇水溶液为溶剂逐级稀释, 配制混合标准工作溶液, 使碱性橙 II、酸性橙 II 浓度为 0.5、2.5、10、25、50.0、500 μg/L, 碱性嫩黄 O、罗丹明 B 浓度为 1.0、5.0、20.0、80.0、100.0、1000.0 μg/L。

1.3 样品制备

称取 1.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇(含 1%甲酸) 和 50 mmol/L 乙酸铵水溶液(1 : 1, V : V)组成的提取液, 超声提取 30 min, 以 10000 r/min 速率离心 10 min 后, 将上清液转移至另一离心管中, 残渣中加入 10 mL 提取液再次提取。合并两次提取液定容至 20 mL。取 5.0 mL 上述样品提取液, 用固相萃取柱平衡溶液(含 1%甲酸的 50 mmol/L 乙酸铵水溶液)稀释定容至 10 mL, 过 WAX 固相萃取柱(事先依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水、3 mL 平衡溶液活化), 然后分别用 2 mL 上述提取液淋洗、2 mL 水洗柱、5 mL 洗脱液(含 5% 氨水的甲醇溶液)洗脱。收集洗脱液, 氮气吹至近干, 并用 1.0 mL 流动相溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 准备上机测定。

1.4 色谱和质谱条件

色谱柱: Thermo Scientific Hypersil Gold (150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0. 1% 甲酸), B 为乙腈(A : B =50 : 50, V : V); 流速: 0.3 mL /min; 进样体积: 5 μL; 柱温: 30 ℃。

离子源: 电喷雾离子源(ESI), 碱性橙 II、碱性嫩黄和罗丹明 B 采用正离子模式, 酸性橙 II 采用负离子模式; 检测模式: 多反应监测(MRM); 干燥气温度: 350 ℃; 干燥气流速: 10 L/min; 毛细管电压: 4000 V。正负离子分开采集, 质谱分析参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 前处理条件讨论

质谱检测时乙酸铵对离子化更有利, 综合考虑后采用甲醇(含 1%甲酸)-50 mmol/L 乙酸铵水溶液

表 1 4 种染料的多反应监测质谱参数
Table 1 MRM MS parameters of the 4 dyes

染料	离子模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(eV)	裂解电压(V)
罗丹明 B	ESI(+)	443.3	399.2*	45	135
			355.1	50	135
酸性橙 II	ESI(-)	327.1	171.1*	23	135
			156	23	135
碱性嫩黄 O	ESI(+)	268.2	147.2*	30	135
			107.1	30	135
碱性橙 II	ESI(+)	213.2	121.1*	20	135
			77	20	135

*定量离子 Quantitative ion

(1:1, $V:V$)作为提取液。实验中比较了 WAX 小柱和 SCX 固相萃取小柱对样品的净化效果,结果显示 SCX 小柱对于罗丹明 B 吸附效果好,回收率高,但对于其他 3 种物质的回收率很低,所以采用 WAX 小柱对样品进行萃取。

2.2 标准曲线和检出限

以 4 种染料的质量浓度 X (ng/L)为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程及相关系数,同时以信噪比(S/N)为 10 时对应的质量浓度换算成在样品中的含量确定方法的定量限,结果见表 2。由表 2 可以看出本方法具有较宽的线性范围,线性关系良好。

2.3 添加回收率和精密度

向豆制品样品中分别添加 4 种黄色工业染料标准品溶液,碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的加标水平为:0.01、0.05、0.50 mg/kg;酸性橙 II、罗丹明 B 为 0.02、0.10、1.00 mg/kg,每个加标水平重复测定 6 次。加标样品中四种染料的质谱图见图 1~4。加标回收结果见表 3,回收率在 84.2~95.1% 之间,相对标准偏差(RSD)小于 4.5%。为考察仪器的重现性,以质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的碱性橙 II、碱性嫩黄 O 和质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 的酸性橙 II、罗丹明 B 的混合标样为例,重复测定 5 次,保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.07%~0.50% 和 1.40%~2.14% 之间。本方法的重复性、回收率和精密度均满意。

表 2 豆制品中 4 种染料的线性范围、相关系数和检出限

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients and detection limits of the 4 dyes in soybean products				
染料	回归方程	相关系数	线性范围($\mu\text{g/L}$)	定量检出限($\mu\text{g/kg}$)
罗丹明 B	$Y=8340.8X+12661.1$	0.9994	1.0–1000	1.0
酸性橙 II	$Y=8850.3X+14494.3$	0.9968	1.0–1000	1.0
碱性嫩黄 O	$Y=11671.9X+996.4$	0.9991	0.5–500	0.5
碱性橙 II	$Y=11410.5X+602.7$	0.9952	0.5–500	0.5

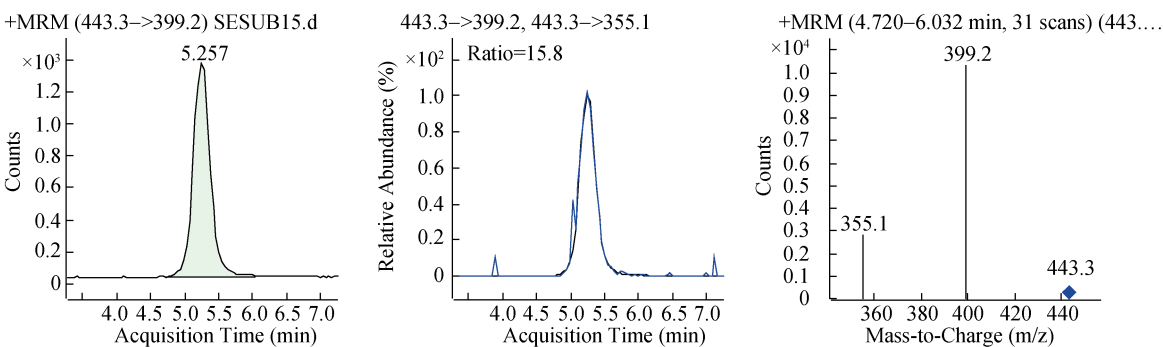


图 1 豆制品中罗丹明 B 的 MRM 色谱图、定量离子色谱图及碎片离子质谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram, quantitative ion chromatogram and fragment ion MS profiles of Rhodamine B in soybean products.

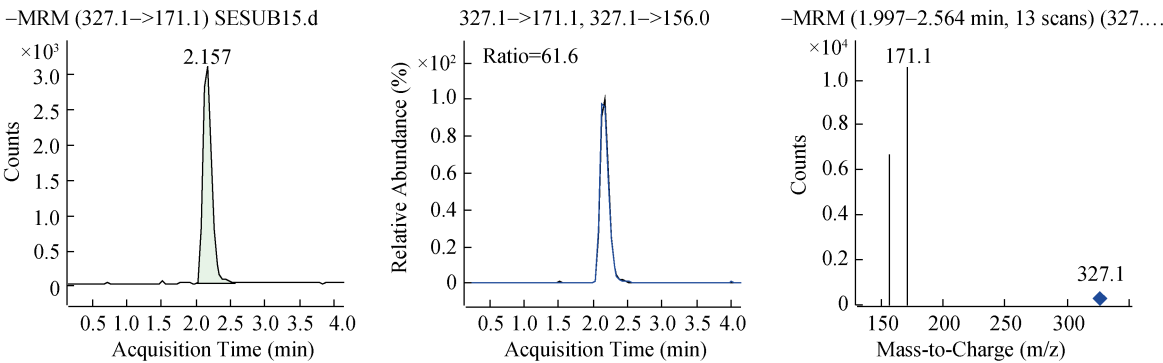


图 2 豆制品中酸性橙 II 的 MRM 色谱图、定量离子色谱图及碎片离子质谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram, quantitative ion chromatogram and fragment ion MS profiles of Orange II in soybean products.

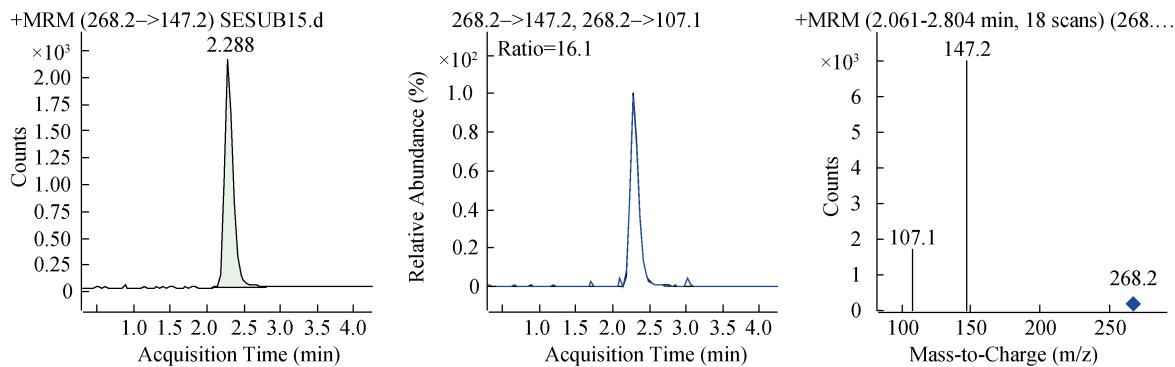


图 3 豆制品中碱性嫩黄 O 的 MRM 色谱图、定量离子色谱图及碎片离子质谱图

Fig. 3 Total ion chromatogram, quantitative ion chromatogram and fragment ion MS profiles of Auramine O in soybean products.

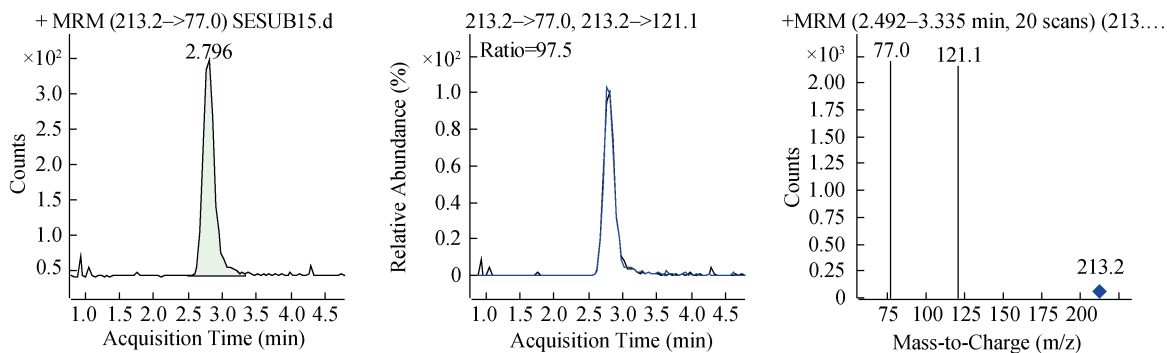


图 4 豆制品中碱性橙 II 的 MRM 色谱图、定量离子色谱图及碎片离子质谱图

Fig. 4 Total ion chromatogram, quantitative ion chromatogram and fragment ion MS profiles of Chrysoidine II in soybean products.

表 3 豆制品中 4 种染料的回收率和精密度(n=6)
Table 3 Recovery rate and RSD of the 4 dyes in soybean products

染料	添加浓度(mg/kg)	回收率(%)	RSD(n=6)
罗丹明 B	0.02	87.2	3.20
	0.10	91.0	3.15
	1.00	93.4	4.51
酸性橙 II	0.02	84.2	4.33
	0.10	89.0	4.00
	1.00	92.5	3.29
碱性嫩黄 O	0.01	89.9	3.08
	0.05	89.0	3.09
	0.50	95.1	4.11
碱性橙 II	0.01	91.0	2.16
	0.05	94.2	4.15
	0.50	93.1	4.02

2.4 实际样品分析结果

采用本方法对南京市市场市售的多种豆制品进行了检测, 未发现样品中含有罗丹明 B、酸性橙 II、碱

性嫩黄 O 和碱性橙 II。

3 讨论

本研究运用 HPLC-MS/MS 检测碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 和罗丹明 B, 碱性橙 II、碱性嫩黄 O 的检出限为 1.0 μg/kg, 酸性橙 II 和罗丹明 B 的检出限为 0.5 μg/kg, 方法回收率在 84.2~95.1%, 相对标准偏差(RSD)小于 4.5%, 与文献报道的其他方法相比, 具有快速、灵敏、准确等优点, 可用于豆制品中上述 4 种非法添加的红黄色系工业染料的同时测定及确证。该方法可有效满足质检机构及其他食品质量检验部门对食品中检测碱性橙 II、碱性嫩黄 O、酸性橙和罗丹明 B 的快速准确检测, 为建立食品中非法添加红黄色系工业染料的标准检测方法提供借鉴。

参考文献

[1] 赵海燕, 赵榕, 李兵, 等. HPLC 同时测定调味料中非法添加多组分工业染料的方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011,

- 23(6): 527-531
- [2] 赵珊, 张晶, 杨奕, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法检测果汁和葡萄酒中的 27 种工业染料[J]. 色谱, 2010, 28(4): 356-362.
- [3] 曹鹏, 乔旭光, 娄喜山, 等. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J]. 分析化学, 2011, 11: 1670-675.
- [4] 卢晓蕊, 沈虹. 液相串联质谱法测定豆制品中的碱性橙和碱性嫩黄 O[J]. 食品与发酵工业, 2010, 37(8): 166-169.
- [5] 胡侠, 肖光, 潘炜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定辣椒粉及辣椒油中的 7 种罗丹明染料[J]. 色谱, 2010, 6: 590-595.
- [6] 王建伟, 钟海娟, 梁炽琼. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定食品中碱性橙、碱性嫩黄 O[J]. 分析测试技术与仪器, 2010, 16(2): 108-112.

- [7] 林赛君, 屠海云, 孙岚, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中五种黄色化工染料[J]. 色谱, 2011, 29(1): 79-82.

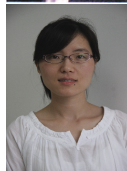
(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



朱晓军, 男, 江苏泰兴人, 硕士研究生学历, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: xjzhunj@163.com



颜春荣, 山东济宁人, 硕士研究生学历, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: chunrongyan@gmail.com

“食品过敏原”专题征稿函

近年来, 食品安全问题广受关注, 也得到了国家越来越多的重视, 《中华人民共和国食品安全法》也于 2009 年颁布。但与此同时, 食物过敏性疾病的发病率明显上升, 已成为影响人类健康最常见的全球性疾病之一。

鉴于此, 《食品安全质量检测学报》编辑部特别策划了“**食品过敏原**”专题, 由中国检验检疫科学院首席专家**陈颖**研究员担任专题主编, 围绕**食品过敏原的分析与检测、致敏蛋白研究、脱敏方法研究**等多种方法技术展开讨论, 计划于 2012 年 8 月出版。

编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 8 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部