

固相分散-液相色谱质谱联用法检测辣椒粉中的碱性橙和碱性玫瑰精

刘小川¹, 李永刚², 刘潇², 闻胜^{2*}

(1. 湖北省嘉鱼县血防医院, 嘉鱼 437200; 2. 湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079)

摘要: **目的** 建立辣椒粉中的碱性橙和碱性玫瑰精的高效液相色谱-串联四极杆质谱测定方法。**方法** 样品经乙腈超声提取后, 经 ODS-C₁₈ 和乙二胺-*N*-丙基硅烷(PSA)的固相分散净化后直接进样分析。使用安捷伦 Zorbax Eclipse Plus-C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)色谱柱分离, 以 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸-乙腈为流动相, 流速为 0.25 mL/min。采用电喷雾离子化源, 以多反应监测(MRM)方式分析, 正离子化进行检测。**结果** 碱性橙和碱性玫瑰精的线性范围为 5~1000 μg/L, 相关系数良好。辣椒粉中碱性橙和碱性玫瑰精的检出限分别为 2 μg/kg 和 0.5 μg/kg, 该方法在三个水平上添加回收率为 88.1%~106.4%, 相对标准偏差为 5.3%~11.7%。**结论** 本方法灵敏度高, 操作简单高效, 适合于辣椒粉中碱性橙和碱性玫瑰精的定量及确证分析。

关键词: 液质联用仪; 碱性橙; 碱性玫瑰精; 辣椒粉

Determination of chrysoidine G and rhodamine B in paprika by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase dispersion

LIU Xiao-Chuang¹, LI Yong-Gang², LIU Xiao², WEN Sheng^{2*}

(1. Jiayu Town Lake Hospital of Schistosomiasis Prevention and Control, Jiayu 437200, China;
2. Hubei Province Centre for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, China)

ABSTRACT: Objective To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase dispersion for the determination of chrysoidine G and rhodamine B in paprika. **Methods** The sample was ultrasonically extracted from homogenized samples with acetonitrile, and cleaned up by dispersive ODS-C₁₈ and PSA, then determined by electrospray ionization in positive mode using multiple reactions monitoring (MRM) finally. **Results** There was a good linear relationship in range of 5~1000 μg/L of chrysoidine G and rhodamine B. The limit of detection for chrysoidine G and rhodamine B was 2 μg/kg and 0.5 μg/kg. The recoveries were 88.1%~106.4% of three spiked levels, and RSDs were between 5.3%~11.7% (*n*=6). **Conclusion** This method is simple, effective and sensitive, and it is suitable for the determination and confirmation of chrysoidine G and rhodamine B in paprika.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20907048)、卫生公益性科研专项(200902009)、中国博士后科学基金项目(20090450459)、湖北省卫生厅青年人才项目(QJX2010-33)

Fund: Supported by the National Nature Science Foundation of China (20907048), Science and Technology Projects of the Ministry of Health (200902009), National Postdoctoral Science Fund (20090450459), and the Special Foundation for Young Scientists of Department of Health of Hubei Province (QJX2010-33)

*通讯作者: 闻胜, 副研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: wenshenggy@qq.com

*Corresponding author: WEN Sheng, Associate Professor, major in food safety, Hubei Province Centre for Disease Control and Prevention, Zhuodaoquan North Road 6, Wuhan 430079, China. E-mail: wenshenggy@aliyun.com

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chrysoidine G; rhodamine B; paprika

1 引言

碱性橙和碱性玫瑰精属于芳香胺类工业染料, 主要用于纺织和印染工业中, 具有致癌、致畸变^[1-3]等毒性。《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》及《中华人民共和国食品安全法》中规定, 严禁碱性橙和碱性玫瑰精作为食品添加剂使用在食品生产中, 但仍有不法商贩使用碱性橙和碱性玫瑰精对玉米、小麦粉等进行染色, 以此来冒充辣椒粉, 严重危害消费者的身体健康。目前对于辣椒粉中碱性橙和碱性玫瑰精的检测方法主要有: 高效液相色谱法^[4-6]和固相萃取前处理的液相色谱-串联质谱法^[7], 液相色谱-串联质谱法由于其灵敏度高, 既能定性又能定量的优势, 是芳香胺类工业染料的主要检测方式^[3,8-13]。本研究首先使用乙腈对样品进行超声波提取, 然后利用 ODS-C₁₈和乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)的固相分散净化, 最后用液相色谱-串联质谱测定辣椒粉中的碱性橙和碱性玫瑰精。与传统的液液萃取、固相萃取等处理方式相比较, 该方法灵敏度高、重现性好, 具有较高的回收率和精密度, 且检测时间快, 能够简便快捷的检测辣椒粉中的碱性橙和碱性玫瑰精。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

1200SL-QQQ6460 液相色谱-串联质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 均质机(美国 PRO 公司); Direct-Q5 超纯水器(美国 Millipore 公司); TDL-5000B 离心机(上海安亭科学仪器厂); KQ5200DB 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

碱性橙和碱性玫瑰精(Sigma-Aldrich 公司, 纯

度 95%), ODS- C₁₈ 和乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)(Agilent, 40 μm), 乙腈、乙醇、乙酸铵(TEDIA、色谱级)。

2.2 方法

2.2.1 标准曲线的制备

准确称取碱性橙和碱性玫瑰精标准品, 用乙醇溶解并定容至 50 mL, 配制成 1000 μg/L 的储备液。然后用空白样品提取液配制成 5、20、50、100、200、1000 μg/L 的工作液。分别进 5 μL 上机。以待测物的丰度为纵坐标, 以待测物的浓度为横坐标, 用加权最小二乘法进行线性回归, 得到基质添加标准曲线。

2.2.2 样品前处理

称取 5 g(精确到 0.01 g)辣椒粉样品于 50 mL 塑料离心管内, 加入 20 mL 乙腈, 超声萃取 20 min, 然后在 0~4 °C 的条件下以 5000 r/min 的速度离心 10 min。取 1 mL 上清液转移到装有 ODS-C₁₈ 和 PSA 各 100 mg 的 2 mL 的离心管中, 震荡或者涡旋 1 min 后, 5000 r/min 离心 2 min, 上清液过 0.22 μm 的滤膜后上机分析。

2.3 液相和质谱条件

液相色谱柱为 Zobax Eclipse Plus-C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸, B 为乙腈, 梯度(B%/min): 30/0, 90/4, 90/9, 30/10.5, 30/15; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL, 流速为 0.25 mL/min。

质谱参数: 离子源: 电喷雾离子源(ESI), 正离子方式检测; 检测模式为: 反应监测(MRM); 干燥气温度为 320 °C, 干燥气流量为 6 mL/min, 雾化器压力为 40 psi, 鞘流气温度为 350 °C, 鞘流气流量为 10 L/min。

表 1 碱性橙和碱性玫瑰精的 MRM 参数
Table 1 MRM parameter of chrysoidine G and rhodamine B

化合物	母离子	子离子	碎裂电压(V)	碰撞能量(V)	驻留时间(ms)	离子源模式
碱性橙	213	120.1	128	20	20	正模式
	213	105.1	128	40	20	正模式
碱性玫瑰精	443.2	399.2	180	50	20	正模式
	443.2	355	180	55	20	正模式

3 结果

3.1 色谱条件的优化

在色谱柱的选择方面,采用 Zobax Eclipse Plus-C₁₈ 目标化合物峰形较好,完全适合碱性橙和碱性玫瑰精的分离与检测。分别使用 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈、0.1%甲酸-乙腈为流动相、5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸-乙腈,发现使用 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸-乙腈做为流动相能够完全分离碱性橙和碱性玫瑰精,水相中 5 mmol/L 乙酸铵的添加能改善碱性玫瑰精的峰形,因此,选择 2.3 中的条件。碱性橙和碱性玫瑰精的保留时间分别为: 3.0 min、7.8 min 总离子流图见图 2。

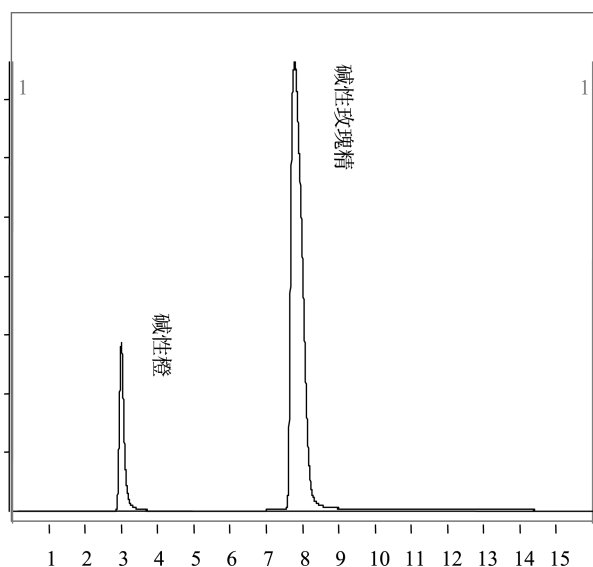


图 2 碱性橙和碱性玫瑰精的总离子流图

Fig. 2 Total ion current of chrysoidine G and rhodamine B

3.2 质谱条件的优化

采用直接进样方式将浓度为 1 μg/mL 的碱性橙和碱性玫瑰精标液,在离子源为 ESI 的检测方式下进行母离子全扫描,得到其分子离子峰,根据欧盟 2002/657/EC 指令规定低分辨率液相色谱-质谱联用仪检测应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。全扫描后得到的分子离子峰的质荷比,以该离子峰为母离子,优化毛细管两端的电压,然后进行二级质谱扫描,最后采集全扫描的二级质谱图,得到碎片离子信息,然后再对得到二级质谱参数碰撞能量等

进行优化,使定性离子与定量离子产生的离子对强度比例达到最大时为最佳,具体参数见表 1,得到的标液 MRM 图谱见图 3。

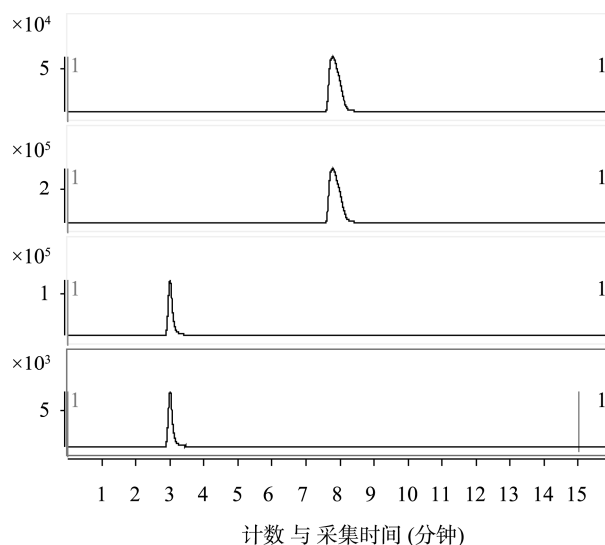


图 3 碱性橙和碱性玫瑰精的 MRM 色谱

Fig. 3 The MRM chromatography of chrysoidine G and rhodamine B

3.3 样品前处理条件选择

针对不同基质的样品采取不同的提取溶液,乙腈的优点是很多亲脂性化合物如脂肪、蜡质物等不易被萃取,而碱性橙和碱性玫瑰精能够很好的被萃取。提取液颜色很深,直接上机检测会对色谱柱,以及整个系统造成污染。本实验采用固相分散净化的方法净化乙腈提取液,比较了石墨化碳, ODS-C₁₈ 和 PSA 三种净化剂,石墨化碳对待测物的吸附很高,两种色素的回收率都在 20% 以下。ODS-C₁₈ 能够去除脂肪和酯类等非极性干扰物。PSA 能够吸附基质中的碳水化合物、脂肪酸、有机酸、酚类和色素。ODS-C₁₈ 和 PSA 的组合能更好的净化提取液,与传统的液液萃取、固相萃取相比较,不仅节约试剂耗材,而且耗时短,效率高,方法的灵敏度和检出限都能达到要求。

3.4 基质效应

化学分析中,基质指的是样品中被分析物以外的组分。基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰,并影响分析结果的准确性。例如,溶液的离子强度会对分析物活度系数有影响,这些影响和干扰被称为基质效应(matrix effect)。本实验中用 0.1 μg/mL 的纯

表 2 碱性橙和碱性玫瑰精的线性回归方程, 相关系数, 线性范围和检测限
Table 2 Calibration curves, linear ranges and detection limits of chrysoidine G and rhodamine B

化合物	线性回归方程	相关系数(R^2)	线性范围($\mu\text{g/L}$)	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$
碱性橙	$Y=15885.1X+386332$	0.9947	5~1000	2.0
碱性玫瑰精	$Y=157165X-1552559.7$	0.9987	5~1000	0.5

表 3 碱性橙和碱性玫瑰精在不同加标水平下的加标回收率及相对标准偏差($n=6$)
Table 3 Standard recovery rate and RSDs of chrysoidine G and rhodamine B spiked in different levels ($n=6$)

化合物	20 $\mu\text{g/kg}$		100 $\mu\text{g/kg}$		500 $\mu\text{g/kg}$	
	回收率%	相对标准偏差%	回收率%	相对标准偏差%	回收率%	相对标准偏差%
碱性橙	96.7	5.5	95	11.7	103.7	7.4
碱性玫瑰精	93.4	9.5	106.4	8.2	88.1	5.3

标准品和用空白样品提取液配制的同等浓度的标准品进行基质效用的验证, 重复进样 5 次, 取平均值比较仪器响应值的差异, 基质效用分别为碱性橙 117.5%, 碱性玫瑰精 116.3%, 可以发现, 基质对碱性橙和碱性玫瑰精的离子信号有所加强, 所以要用基质配制校正曲线来消除基质的影响。

3.5 线性关系及检出限

用空白样品提取液配制的标准工作液, 分别进样 5 μL , 测定结果经线性回归, 线性良好, 结果见表 2。同时进行样品添加实验, 通过工作站计算添加回收的最低点的信噪比, 以信噪比为 $S/N=3$ 确定方法的检出限见表 2, 将空白样品添加成浓度为检出限的加标样品, 按照方法处理后, 经检测 S/N 大于 3。

3.6 方法的回收率和精密度

准确称取空白辣椒粉样品, 碱性橙、碱性玫瑰精的添加浓度为 20、100、500 $\mu\text{g/kg}$ 。平均加标回收率和相对标准偏差见表 3。表明本方法的精密度和准确度, 满足痕量分析的要求。

3.7 实际样品的检测

针对 2013 年湖北省 9 市超市和农贸市场 68 份辣椒粉样品进行抽样检测, 只在荆州某农贸市场上采样的一份辣椒粉中检出碱性橙, 其含量为 886.7 $\mu\text{g/kg}$ 。

4 结 论

建立了辣椒粉中碱性橙和碱性玫瑰精的超高效

液相色谱-串联质谱联用检测方法。该方法采用 ODS- C_{18} 和 PSA 作为分散剂的固相分散净化方法, 与传统的液液萃取、固相萃取等净化方法相比较, 具有速度快, 节约试剂的优点。采用液相色谱-串联质谱联用作为检测仪器, 具有灵敏度高、重现性好的优点, 同时本方法具有较高的回收率和精密度, 各项指标满足分析的要求。非常适合辣椒粉中碱性橙和碱性玫瑰精的检测。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 范文锐, 吴青, 劳扬, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 7 种非食用色素[J]. 分析化学研究报告, 2012, 40(2): 292-297.
Fan WR, Wu Q, Lao Y, *et al.* Simultaneous determination of 7 non edible pigments in food by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40 (2): 292-297.
- [3] 江迎鸿, 陈亚波, 邱舜钿, 等. 超声提取-高效液相色谱法测定食品中碱性橙染料[J]. 食品研究开发, 2009, 30(7): 153-155.
Jiang YH, Chen YB, Qiu SX, *et al.* Determination of basic orange II in food by ultrasonic extraction and high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2009, 30 (7): 153-155.
- [4] 赵宏, 图雅, 胡芬. 高效液相色谱法测定辣椒粉中的碱性橙[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 19-20.
Zhao H, Tu Y, Hu F. HPLC method for the determination of basic orange in paprika [J]. Chin J Health Lab Tech, 2012, 22 (1):

- 19–20.
- [5] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙、玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器. 2012 (4): 202–204.
Gu Y, Cui SL, Zhou Y, *et al.* Determination of basic orange and rhodamine in paprika by high performance liquid chromatography [J]. Anal Test Tech Instrum, 2012 (4): 202–204.
- [6] 谭莹, 吴平谷, 张晶, 等. HPLC 法测定辣椒中碱性橙的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 3(20): 522–524.
Tan Y, Wu PG, Zhang J, *et al.* Determination of basic orange in capsicum by HPLC [J]. Chin J Health Lab Tech, 2010, 3 (20): 522–524.
- [7] 赵榕, 赵海燕, 李兵, 等. 建立同时测定调味品中非法添加的 4 种工业染料 SPE-UPLC-MS/MS 法研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 410–414.
Zhao R, Zhao HY, Li B, *et al.* Simultaneous determination of 4 kinds of illegally added industrial dyes by SPE-UPLC- MS /MS [J]. Chin J Food Hyg, 2009, 21 (5): 410–414.
- [8] 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.
Lin SJ, Tu HY, Sun L, *et al.* Simultaneous determination of five yellow dyes in food by HPLC- MS/MS [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29 (1): 79–82.
- [9] 郑小严. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 409–413.
Zheng XY. Simultaneous determination of basic orange, auramine O and safranin T in food by UPLC- MS /MS [J]. J Anal Sci, 2009, 25 (4): 409–413
- [10] Gui WJ, Xu Y, Shou LF. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of chrysoidine in yellow-fin tuna [J]. Food Chem, 2010, 122(4): 1230–1234.
- [11] Hou XL, Li YG, Cao SJ. Analysis of Para Red and Sudan Dyes in Egg Yolk by UPLC–MS–MS [J]. Chromatographia, 2010, 71, 135–138.
- [12] 赵珊, 张晶, 杨奕, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四极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.
Zhao S, Zhang J, Yang Y, *et al.* Determination of 27 industrial dyes in juice and wine using ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28 (4): 356–362.
- [13] 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]. 分析化学研究报告, 2011, 39(11): 1670–1675.
Cao P, Qiao XG, Lou XS, *et al.* Simultaneous determination of 6 industrial dyes in food by SPE-UPLC- MS /MS [J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39 (11): 1670–1675.

(责任编辑: 叶琼娟)

作者简介



刘小川, 中专, 主管技师, 科主任,
主要研究方向为医学检验。
E-mail: 409006572@qq.com



闻胜, 博士, 副研究员, 副所长, 主
要研究方向为食品安全。
E-mail: wenshengy@aliyun.com