

# 液相色谱-串联质谱法检测豆制品中的二乙基黄

严恒\*, 余婷婷, 蒋丽萍, 张莉, 王会霞, 朱晓玲, 黎星  
(湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430070)

**摘要:** **目的** 建立一种简单、快速的豆制品中二乙基黄的液相色谱-串联质谱检测方法。**方法** 样品经乙腈超声辅助提取和离心分离, 进样后目标物经由 C<sub>18</sub> 柱分离, 0.1% 甲酸水溶液和乙腈做流动相梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正离子模式下选择离子反应监测(SRM)。**结果** 本法对二乙基黄的检出限为 0.5 μg/kg, 加标回收率为 85.5%~103.2%, 相对标准偏差(RSD)为 1.3%~4.9%(n=6), 且二乙基黄在 0.05~10 ng/mL 浓度范围内呈良好的线性关系, 线性回归系数(*r*)可达 0.9997。**结论** 本法适用于对豆制品中二乙基黄的快速检测。

**关键词:** 液相色谱-串联质谱法; 二乙基黄; 豆制品

## Determination of diethyl yellow in bean products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YAN Heng\*, YU Ting-Ting, JIANG Li-Ping, ZHANG Li, WANG Hui-Xia, ZHU Xiao-Ling, LI Xing  
(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a simple and rapid method for determination of diethyl yellow in bean products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with acetonitrile using ultrasonic-assisted extraction and separated by centrifugation. After injection, the chromatographic separation was achieved on a C<sub>18</sub> column using a mobile phase composed of a mixture of 0.1% formic acid and acetonitrile through gradient elution, and determined by electrospray mass spectrometry in the positive mode in selected ion monitoring mode (SRM). **Results** The limit of detection of diethyl yellow were 0.5 μg/kg. The recoveries for them spiked at three levels respectively ranged from 85.5 % to 103.2 %, and the RSDs were 1.3%~4.9% (n=6). The linear ranges of this method were 0.05~10.0 ng/mL and the correlation coefficients (*r*) were 0.9997. **Conclusion** The method was suitable for determination of diethyl yellow in bean products.

**KEY WORDS:** liquid chromatography-tandem mass spectrometry; diethyl yellow; bean products

## 1 引言

近几年来, 国家不断加大对食品安全的监管力度, 采取了一系列强有力的举措, 食品安全形势持续好转。然而, 食品领域威胁人类健康的恶性事件在各国仍然时有发生, 尤其是违规添加非食用色素

的案例不断被媒体披露, 引起了消费者的广泛关注和各国政府的高度重视<sup>[1]</sup>。近期有新闻报道了台湾“毒豆干”事件, 即在豆干中违规添加了非食用色素二乙基黄。二乙基黄又名溶剂黄 56, 化学名称为 N,N-二乙基-4(苯基偶氮)苯胺(结构式见图 1), 分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>, 是一种脂溶性工业染料, 多添加在汽柴

\*通讯作者: 严恒, 工程师, 硕士, 主要研究方向为食品质量安全检测。E-mail: yan.heng@hotmail.com

\*Corresponding author: YAN Heng, Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China. E-mail: yan.heng@hotmail.com

油、蜡油、印刷油墨、塑料制品等物中当作染剂,和苏丹橙 G、甲基黄、苏丹红 G、苏丹红 7B、苏丹红 B 等脂溶性着色剂均属于偶氮类化工染色剂,具有色泽鲜艳、着色稳定、价格低廉等特点,极有可能被非法添加到食品中<sup>[2-6]</sup>。有动物实验发现,长期摄取二乙基黄会增加罹患肝癌、肺癌、膀胱癌和接触性皮肤癌的风险,因此被国际癌症研究所(IARC)列为 2B 等级致癌物,不能使用于人体,以及禁止作为食物染剂<sup>[7]</sup>。不法商贩将其用于豆制品的染色,使其色泽光亮,给消费者的饮食安全埋下巨大隐患。因此,快速检测出豆制品中的二乙基黄非常重要和迫切。目前二乙基黄的检测方法尚未见报道,本研究通过乙腈提取,液相色谱串联质谱仪分析,以期建立一种简便可靠的检测方法。

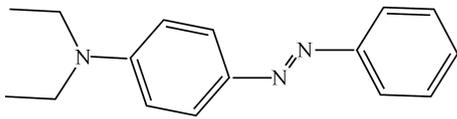


图 1 二乙基黄的分子结构式

Fig. 1 Structural formula of diethyl yellow

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

豆腐干、腐竹、豆油皮市购。

二乙基黄标准品(CAS: 2481-94-9, 纯度 99.0%)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 乙腈(色谱纯); 甲酸(分析纯); 氯化钠(分析纯); 超纯水(实验室自制)。

### 2.2 仪器与设备

TSQ Quantum Access Max 三重四极杆液相色谱串联质谱仪(配有电喷雾离子源(ESI)), 美国 Thermo Fisher 公司; Allergra 64R 高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; Milli-Q 超纯水纯化系统, 美国 Millipore 公司; 分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; 超声波清洗器, 德国 Elma 公司。

### 2.3 仪器参数

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm, 3 μm); 流动相: A 为 0.1% 的水溶液, B 为乙腈, 0~4 min 流动相 A 由 50% 变化到 10%, 4~7 min 流动相 A 保持 10% 不变, 7~8 min 流动相 A 由 10% 变化到 50%, 8~10 min 流动相 A 保持 50% 不变柱温: 30 °C; 流速: 0.30 mL/min; 进样量: 10 μL。

#### 2.3.2 质谱条件

电离方式: 电喷雾电离(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 电喷雾电压: 3500 V; 离子源温度: 350 °C; 鞘气压力: 0.276 MPa (40 psi); 辅助气压力: 0.138 MPa (20 psi); 碰撞气压力: 0.20 Pa (1.5 mTorr); 检测方式: 选择反应监测(SRM), 条件见表 1。

### 2.4 样品处理

称取粉碎后的豆制品试样约 2 g (精确至 1 mg) 于 50 mL 的具塞离心管中, 加入 5 mL 纯水, 涡旋混匀 30 s, 准确加入 20.0 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 超声提取 20 min, 加入 2.0 g 氯化钠, 混匀后于 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机系微孔滤膜, 待测定。

### 2.5 标准曲线及检测限

将标准品溶液稀释成几个不同浓度, 按浓度由低到高的顺序进样, 在选定的色谱条件和色谱条件下测定, 以进样浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归计算, 得到二乙基黄的线性方程和相关系数。通过空白样品加标实验, 计算 3 倍信噪比的样品浓度, 作为方法的检出限<sup>[8-11]</sup>。

### 2.6 精密度和回收率实验

为考察该方法的准确性, 选取 3 种不同基质样品, 分别添加不同体积的标准溶液, 按照 2.4 节进行样品前处理, 在 2.3.1 节的色谱条件和 2.3.2 节的质谱条件下测定, 计算样品的加标回收率。将每种样品连续重复进样 6 次, 测得各组分的峰面积, 计算其相对标准偏差(RSD), 来衡量方法的精密度。

表 1 二乙基黄的质谱扫描参数

Table 1 Parameters for diethyl yellow in SRM

被测物名称	分子式	母离( <i>m/z</i> )	子离( <i>m/z</i> )	透镜补偿电压(V)	碰撞能量(eV)
二乙基黄	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	254.1	77.0*	86	30
			133.9	86	23

\*离子为定量离子

### 3 结果与分析

#### 3.1 色谱条件的选择

由于二乙基黄溶于甲醇和乙腈, 因此初步选用甲醇、乙腈和水作为流动相。从分子结构式可以看出二乙基黄在  $C_{18}$  柱上保留性较好, 因此选择洗脱能力较强的乙腈作为有机相, 从实验结果来看, 缩短了分析时间。为了促进样品的离子化, 本实验分别考察了纯水、0.1%的甲酸水溶液和 5 mmol/L 的乙酸铵水溶液, 结果表明加入甲酸时离子丰度最强, 因此采用乙腈和 0.1%甲酸水为流动相, 梯度洗脱, 二乙基黄出峰时间为 3.83 min, 峰型较好, 其 SRM 模式的离子流图见图 2。

#### 3.2 质谱条件的选择

二乙基黄为弱极性分子, 所以采用电喷雾离子源进行离子化。研究了正、负两种离子化方式, 发现正离子模式下的离子响应明显高于负离子模式。在全

扫描模式下确定了二乙基黄的分子离子为 254.1, 子离子扫描模式下确定了定量离子为 77.0, 定性子离子为 133.9, 通过选择离子监测优化获得了最优透镜补偿电压和碰撞能量, 结果见表 1。

#### 3.3 标准曲线及检出限

根据上述条件, 取不同浓度的标准溶液进样, 以峰面积( $Y$ )对含量( $X$ )绘制标准曲线, 得到线性回归方程和相关系数。在阴性样品中添加目标化合物, 得到方法检出限 LOD(以  $S/N=3$  计), 结果见表 2。

#### 3.4 精密度和回收率

采用标准物质添加回收的方法, 在不含二乙基黄的豆制品中添加标准物质, 每种豆制品均设 3 个添加水平, 分别为 0.5、5.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 每个水平平行测定 6 次, 三种不同豆制品的加标回收率在 85.5%~103.2%, 相对标准偏差均小于 5%, 实验结果见表 3。

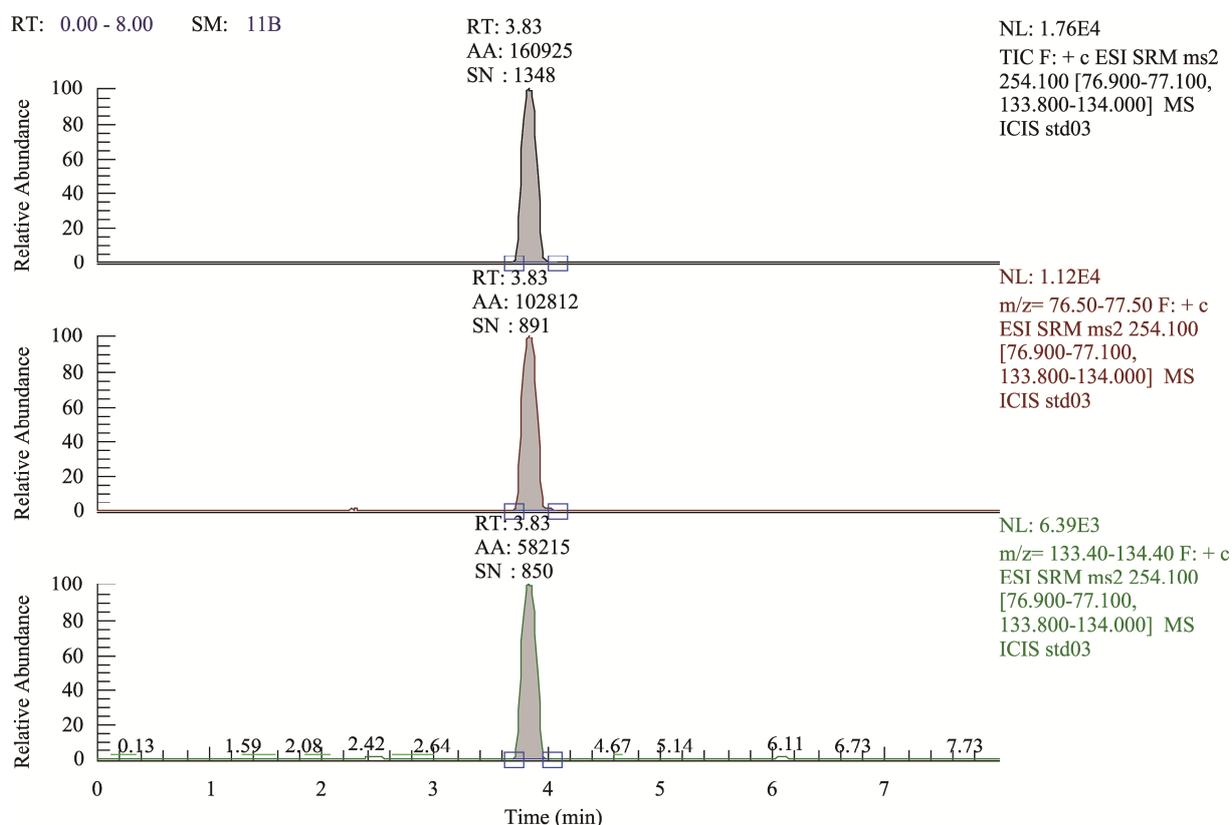


图 2 二乙基黄的 SRM 总离子流图

Fig. 2 Ion chromatogram of diethyl yellow

表2 线性方程、线性范围及检出限

Table 2 Linear regression equation, linear ranges and detection limits

线性方程	相关系数	线性范围 (ng/mL)	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
$Y=108327 * X - 7605.95$	0.9997	0.05~10.0	0.5

表3 样品测定的精密度与回收率实验结果( $n=6$ )Table 3 The average recovery and relative standard deviation of samples ( $n=6$ )

样品	添加量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率(%)	RSD(%)
豆干	0.50	99.6	3.1
	5.00	103.2	4.9
	50.00	101.1	1.3
腐竹	0.50	94.2	2.9
	5.00	91.3	4.4
	50.00	92.5	1.8
豆油皮	0.50	90.2	4.3
	5.00	86.9	3.6
	50.00	85.5	2.7

### 3.5 实际样品的检测

从市场抽取了 100 批次不同类别的豆制品进行检测,均未检出二乙基黄。在实际样品的测试过程中,未发现基质干扰现象,实际检测中灵敏度与准确度符合要求,说明该方法具有一定的适用性,能够满足日常检测工作的需要。

## 4 结论

本文针对豆制品中的非法添加物二乙基黄,建立了一种高效的液相色谱-串联质谱分析方法。该方法分析周期短且灵敏度高,检出限可达  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ;回收率高,可达  $85.5\% \sim 103.2\%$ ;重现性好,相对标准偏差(RSD)为  $1.3\% \sim 4.9\%$  ( $n=6$ ),能满足对二乙基黄的常规检测需求,为食品安全检测机构提供有效的技术支持。

### 参考文献

- [1] Aly HM, Amin AS. Utilization of ion exchanger and spectrophotometry for assaying amoxycillin and flucloxacillin in dosage form [J]. *Int J Pharm*, 2007, 338: 225-230.
- [2] 张协光, 曾泳艇, 黎永乐. 固相萃取-超高效液相串联质谱同时测定食品中的苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B[J]. *广东化工*,

2012, 39(1): 109-110.

Zhang XG, Zeng YT, Li YL. Determination of Sudan Orange G, Dimethyl Yellow, Sudan Black B in food by SPE-UPLC-MS/MS method [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2012, 39(1): 109-110.

- [3] 黄优生, 罗香, 熊华亮, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱法同时检测辣椒粉中 4 种碱性染料[J]. *分析实验室*, 2013, 32(10): 72-76.
- [4] Huang YS, Luo X, Xiong HL, *et al.* Simultaneous determination of four alkaline dyes in foods by solid phase extraction-high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. *Anal Lab*, 2013, 32(10): 72-76.
- [4] 洪红, 戚平, 刘冬豪, 等. 食品中违禁色素种类及高通量检测技术进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(8): 2448-2456.
- [5] Hong H, Qi P, Liu DH, *et al.* Progress on high throughputs detection technology for banned dyes in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(8): 2448-2456.
- [5] 韩劲松, 徐明霞, 陈湛. 高效液相色谱法测定食品中苏丹红的研究[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(7): 1245-1246.
- [6] Han JS, Xu MX, Chen Z. Study on the detection of Sudanhong from foods by using high performance liquid phase chromatography [J]. *China Tropical Med*, 2006, 6(7): 1245-1246.
- [6] 林欣, 郑小严, 河树坤, 等. 高效液相色谱法同时检测食品中的碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 染料含量[J]. *食品科学*, 2009, 30(14): 194-196.
- [7] Lin X, Zheng XY, He SK, *et al.* Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of Chrysoidine, Auramine O and Safranin T in food [J]. *Food Sci*, 2009, 30(14): 194-196.
- [7] Tripathi M, Khanna SK, Das M. Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis prevention of food adulteration act of india [J]. *Food Control*, 2007, 18: 211-219.
- [8] 路勇, 渠岩, 冯楠, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法快速筛查食品中的 45 种工业染料[J]. *食品科学*, 2012, 33(6): 176-180.
- [9] Lu Y, Qu Y, Feng N, *et al.* Rapid screening of 45 industrial Dyes in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2012, 33(6): 176-180.
- [9] 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*, 2006, 12(4): 202.
- [9] Gu Y, Cui SL, Zhou Y, *et al.* High performance liquid chromatography diode array detection method for basic Brilliant Orange G and Rhodamine B in cayenne [J]. *Anal Tech Instrum*, 2006, 12(4): 202.

- [10] 高洁, 尹峰, 何国亮, 等. 高效液相色谱法测定豆制品中的碱性嫩黄 O[J]. 分析试验室, 2008, 27(5): 230-232.

Gao J, Yin F, He GL, *et al.* Study on the detection of Auramine O from bean products by using high performance liquid phase chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(5): 230-232.

- [11] 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 Chrysoidine, Auramine O and Safranine T in foods by ultra performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Sci, 2009, 25(4): 409-413.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



严 恒, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: yan.heng@hotmail.com