

高效液相色谱-质谱联用技术测定豆制品中 7种违禁色素的残留

张 杉*

(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-串联四极杆质谱法(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定豆制品中二甲基黄、二乙基黄、罗丹明 B、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22 和碱性嫩黄 7 种违禁色素残留量的分析方法。**方法** 豆制品经水溶解后,再以乙腈提取 7 种违禁色素,采用甲醇和 0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min,经 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 3.1 μm)进行分离,电喷雾电离源(ESI),正离子模式,多反应监测模式(MRM)对违禁色素的定性离子和定量离子进行监测。**结果** 本方法的线性范围为 0~10.0 ng/mL,相关系数(r^2)均大于 0.999,加标水平为 2.0 μg/kg 时,回收率范围是 80.5%~104.3%,相对标准偏差($n=6$)为 2.88%~7.63%,检出限为 2.0 μg/kg。**结论** 该方法前处理简单,分析时间短,适用于对豆制品中 7 种违禁色素残留的同时检测。

关键词: 高效液相色谱-质谱联用法; 违禁色素; 豆制品; 残留分析

Determination of 7 kinds of prohibited pigment residues in bean products by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

ZHANG Shan*

(National Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 7 kinds of prohibited pigments, including dimethyl yellow, rhodamine B, basic ora2, basic ora 21, basic ora 22 and auramine in bean products by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Bean products was dissolved by water, and extracted by acetonitrile. The samples were load onto an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column(50 mm×2.1 mm, 3.1 μm)and separated with gradient elution, with the mobile phases of methanol and 0.1% formic acid, and the flow rate at 0.3 mL/min. The electrospray was operated in the positive mode and the samples were monitored in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linear ranges of the method were 0~10.0 ng/mL, and correlation coefficients (r^2) were more than 0.999. When the standard was 2 μg/kg, the recoveries were 80.5%~104.3%. The RSD ($n=6$) was 2.88%~7.63%, and the LOD was 2 μg/kg. **Conclusion** This method is simple and rapid, and is suitable for the detection of 7 kinds of prohibited pigment residues in bean products.

KEY WORDS: high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; prohibited pigment; bean products; residue analysis

*通讯作者: 张杉, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全分析测定。E-mail: zhangshanazxy@sina.com.cn

*Corresponding author: ZHANG Shan, Intermediate Engineer, China National Food & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China. E-mail: zhangshanazxy@sina.com.cn

1 引言

7种用于豆制品中的违禁色素包括二甲基黄、二乙基黄、碱性嫩黄、罗丹明 B、碱性橙 2、碱性橙 21 和碱性橙 22。这几种违禁色素多用于工业,如油漆、鞋油、纺织品等的染色,长期摄取会引起中毒,并增加罹患肝癌、肺癌、膀胱癌的风险。在巨大的经济利益驱使下,我国食品中合成色素的超标、超范围使用现象屡禁不止,尤其是在腐竹、豆干等豆制品中添加违禁色素,使食物颜色变黄来吸引更多的食客。2014年从台湾地区进口的黑胡椒豆干和腐乳中检出二甲基黄。针对此种行为,国家已多次明令禁止,有关部门也要求严厉查处,但目前尚缺乏快速准确的检测方法。因此,建立灵敏、准确、快速的7种违禁色素残留检测方法,为执法提供技术鉴定依据,是当务之急。

目前,测定二甲基黄、二乙基黄、碱性嫩黄、罗丹明 B、碱性橙 2、碱性橙 21 和碱性橙 22 这7种违禁色素的方法主要有高效液相色谱法^[1-6]、液相色谱-质谱联用法^[7-15]等,但是还没有同时测定这7种违禁色素的方法。现有的方法基本上是采用甲醇或乙醇提取,旋转蒸干后直接测定,或过固相萃取小柱后再测定,操作较为繁琐。本研究先用水溶解样品,然后用乙腈超声提取,经液相色谱-串联质谱仪直接测定。本方法操作简便,能同时测定7种违禁色素,极大地节省了检测时间,且灵敏度、提取效率和回收率高,都达到了令人满意的效果。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Agilent 6410 型串联三重四极杆质谱,配 Agilent1200 型液相色谱仪及电喷雾电离源(ESI)(美国 Agilent 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Milli-Q 公司)。

甲醇、乙腈(色谱级,美国 Fisher 公司);氯化钠和甲酸(分析纯,北京化学试剂公司);二甲基黄、二乙基黄、碱性嫩黄、罗丹明 B、碱性橙 2、碱性橙 21 和碱性橙 22 标准品(纯度均在 95%以上, Sigma 公司);实验用水均由 Milli-Q 超纯水系统制备。

2.2 样 品

腐竹及豆干等豆制品均购自本地超市和市场。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

准确称取 2 g 样品置于 25 mL 容量瓶中,加 4 mL 水,涡旋混匀,加 2 g 氯化钠,再加 20 mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 30 min。用快速定性滤纸自然过滤,滤液过 0.2 μm 滤膜,液相色谱-串联质谱仪分析。

2.3.2 色谱条件

配有 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 3.1 μm)的色谱柱;流速为 0.3 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL。流动相: A 相为含 0.1%甲酸的水溶液、B 相为甲醇。洗脱梯度程序: 0~3.0 min, 80%A; 3.0~5.0 min, 80%A~10%A; 5.0~10.0 min, 10%A; 10.0~11.0 min, 10%A~80%A。

2.3.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;监测方式:多反应监测;干燥气: N₂;雾化气压力: 275.8 kPa;干燥气温度: 350 ℃;干燥气流速: 8 L/min。质谱分析的条件参数见表 1。

表 1 7种违禁色素的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters in multiple reaction monitoring (MRM) mode for 7 kinds of prohibited pigments

被测物质名称	母离子	子离子	断裂电压 /V	碰撞能量 /V
二甲基黄	226	121/77	120	20/25
二乙基黄	254	134/77	110	20/25
罗丹明 B	443	399/355	135	50/55
碱性嫩黄	268	147/107	80	30/30
碱性橙 2	213	121/77	60	10/20
碱性橙 21	315	300/285	135	20/30
碱性橙 22	391	376/220	100	25/30

3 结果与讨论

3.1 前处理条件的优化

违禁色素的提取液通常为甲醇或乙腈,而腐竹等豆制品中蛋白质含量高,所以采用乙腈作为提取

液。采用乙腈直接提取固体粉末时, 二甲基黄和二乙基黄的加标回收率为 50%~70%, 回收率偏低。改进以后, 先用水溶解样品, 并加入适量氯化钠促进分层, 然后再加乙腈提取。加标回收试验结果表明, 7 种违禁色素的回收率均大于 80%。

3.2 质谱条件的优化

将 7 种 100 ng/mL 的违禁色素标准溶液分别注入离子源中, 在正离子模式下进行全扫描, 分别得到每种违禁色素的分子离子峰, 将其作为母离子; 然后再进行二级质谱扫描, 采集全扫描的二级质谱图, 得到碎片离子信息, 并对得到的各种化合物的二级质谱参数如破碎电压、碰撞能量进行优化, 当每种化合物的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质谱条件, 并得到 7 种违禁色素的二级质谱图。

3.3 色谱条件的优化

为使 7 种违禁色素达到较好的分离度, 分别考察了 0.2% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸水溶液和甲醇、乙腈等有机溶液作为流动相时的分离效果。试验结果表明, 以 0.1% 甲酸的水溶液和甲醇为流动相做梯度洗脱时, 可使 7 种违禁色素得到较好的分离。图 1 为加标腐竹

样品的色谱图, 7 种化合物分别为罗丹明 B, 碱性橙 22, 碱性橙 21, 碱性嫩黄, 二乙基黄, 二甲基黄, 碱性橙 2(由上至下)。

3.4 线性范围

用空白基质溶液作为标准工作液的稀释液, 加入混合标准溶液获得浓度为 0、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL 的混合标准工作溶液, 将标准溶液由低浓度到高浓度依次进样 10 μ L, 以峰面积和标准溶液浓度作标准曲线。结果见表 2。

3.5 检出限

通过在实际样品(腐竹)中添加不同质量浓度的 7 种违禁色素的标准品, 前处理后由高至低检测直到信噪比等于 10($S/N=10$), 确定检测方法的检出限为 2.0 μ g/kg。

3.6 回收率和精密度

称取腐竹空白样品 6 份, 每份 2.0 g, 分别添加浓度为 10 ng/mL 的 7 种违禁色素的混合标准溶液 0.4 mL 和 0.8 mL, 按 2.3.1 方法制备后, 进行测定, 结果见表 3。从表 3 看出, 加标回收率在 80.5%~104.3% 之间, 相对标准偏差在 2.88%~7.63% 之间, 满足试验要求。

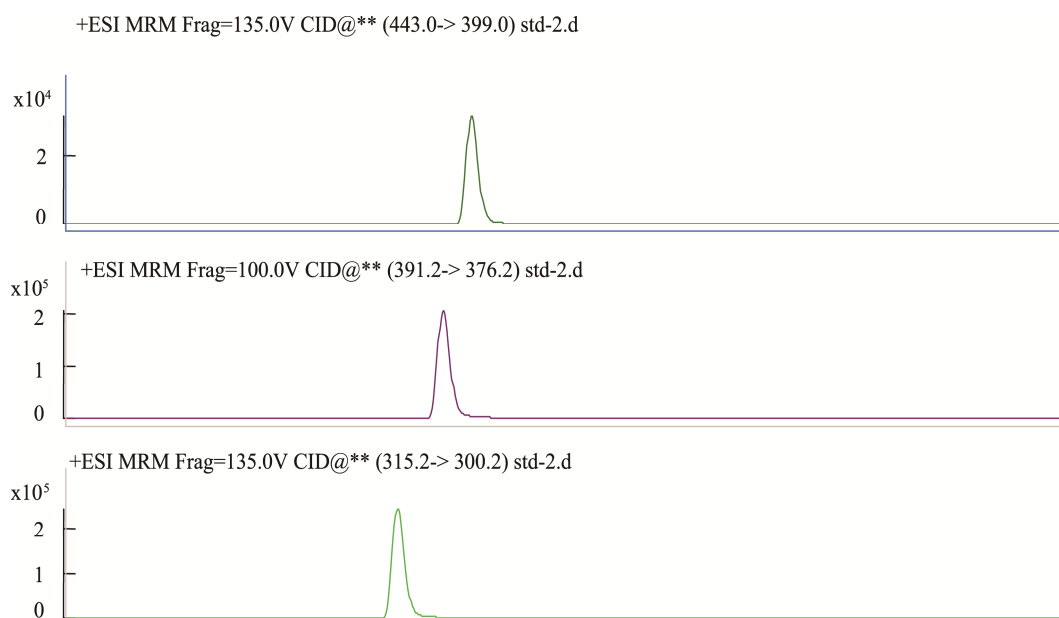
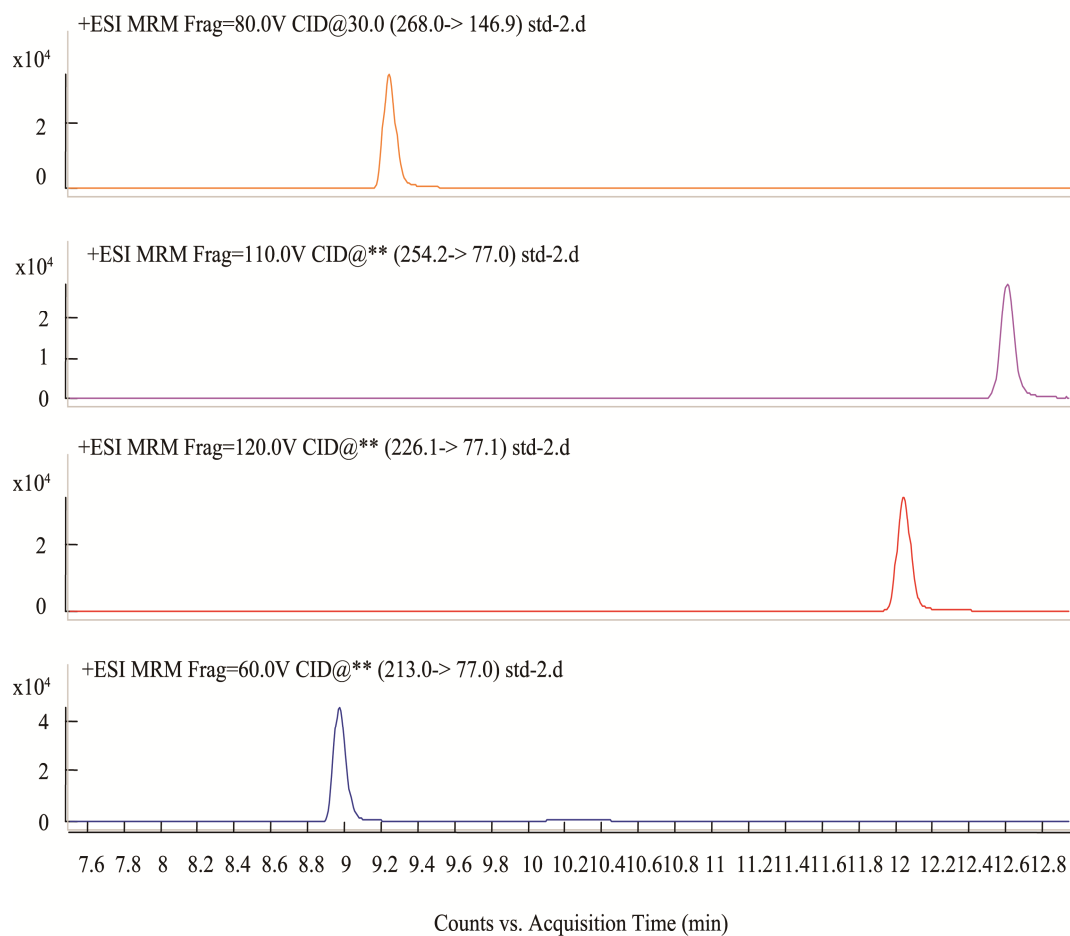


图 1 空白腐竹中添加 7 种违禁色素的 MRM 色谱图(加标 2 μ g/kg)

Fig. 1 MRM chromatograms of blank bean curd stick spiked with 7 kinds of prohibited pigments (add mark 2 μ g/kg)



续图 1 空白腐竹中添加 7 种违禁色素的 MRM 色谱图(加标 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Fig. 1 MRM chromatograms of blank bean curd stick spiked with 7 kinds of prohibited pigments(add mark 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

表 2 7 种违禁色素的回归方程、相关系数

Table 2 The linear regression equations and the linear correlation coefficients of 7 kinds of prohibited pigments

化合物	线性范围(ng/mL)	线性回归方程	线性相关系数(r)
二甲基黄	0.1~10.0	$Y=6809.20X-56500.02$	0.99963
二乙基黄	0.1~10.0	$Y=12227.12X-22574.62$	0.99985
罗丹明 B	0.1~10.0	$Y=4653.94X-18766.33$	0.99969
碱性嫩黄	0.1~10.0	$Y=11809.86X+33208.28$	0.99955
碱性橙 2	0.1~10.0	$Y=4342.11X-22109.75$	0.99985
碱性橙 21	0.1~10.0	$Y=8232.34X+99388.15$	0.99933
碱性橙 22	0.1~10.0	$Y=21439.95X+5792.71$	0.99942

表 3 腐竹中 7 种违禁色素的回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 7 kinds prohibited pigments in bean curd stick ($n=6$)

化合物	加标量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
二甲基黄	2.0	88.0~96.0	2.88
	4.0	86.0~101.1	6.15
二乙基黄	2.0	89.0~98.5	3.91
	4.0	91.2~99.7	2.93
罗丹明 B	2.0	83.0~95.5	5.36
	4.0	92.3~99.9	2.88
碱性嫩黄	2.0	82.5~94.5	5.12
	4.0	87.2~100.5	4.84
碱性橙 2	2.0	80.5~95.0	7.63
	4.0	88.8~102.7	4.80
碱性橙 21	2.0	82.0~94.0	6.67
	4.0	94.8~103.4	3.06
碱性橙 22	2.0	82.0~95.5	5.23
	4.0	90.4~104.3	4.59

3.7 方法的应用

将建立的方法分别应用于 70 份实际腐竹样品和 10 份豆腐干样品的检测, 70 种腐竹样品和 8 份大陆生产的豆腐干样品均未检出 7 种违禁色素, 而另外 2 种台湾地区生产的豆腐干均检出了二甲基黄, 检出值在 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 左右。

4 结 论

根据高效液相色谱-串联质谱技术, 本研究建立了一种简单、快捷、有效的针对豆制品中 7 种违禁色素的检测方法。该方法采用水溶解样品, 提高了提取效率, 其回收率、精密度和定量限均满足残留分析的要求。由于同时检测 7 种违禁色素, 比单组分检测节省了时间, 提高了工作效率。

参考文献

- [1] 林钦. 高效液相色谱法同时测定豆制品中的碱性橙和碱性嫩黄 O 染料[J]. 色谱, 2007, 25(5): 776-777.
Lin Q. Determination of basic ora and auramine in bean products by HPLC [J]. Chin J Chromatogr, 2007, 25(5): 776-777
- [2] 林钦, 郑小严, 何树坤, 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.

Lin Q, Zheng XY, He SK, *et al.* Simultaneous determination of chrysoidine, auramine O and safranine T in food by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2009, 30(14): 194-196.

- [3] 李小燕, 李梅, 陈其锋, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测葡萄酒中罗丹明 B[J]. 食品科学, 2011, 32(08): 238-243.
Li XY, Li M, Chen QF, *et al.* Determination of Rhodamine B in red wine by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2011, 32(08): 238-243.
- [4] 汪辉, 李永强, 彭新凯, 等. 液液萃取-高效液相色谱法测定豆干与腐竹中溶剂黄 2 及溶剂黄 56[J]. 分析测试学报, 2015, 34(9): 1077-1080.
Wang H, Li YQ, Peng XK, *et al.* Determination of solvent yellow 2 and solvent yellow 56 in dried bean curd and yuba by liquid-liquid extraction /high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2015, 34(9): 1077-1080.
- [5] 陈林, 温家欣, 雷毅, 等. 高效液相色谱法同时快速检测腌腊肉制品中 20 种非法添加合成色素[J]. 分析测试学报, 2015, 34(9): 1008-1013.
Chen L, Wen JX, Lei Y, *et al.* . Simultaneous rapid determination of 20 adulterated synthetic colors in cured meat products by HPLC [J]. J Instrum Anal, 2015, 34(9): 1008-1013.
- [6] 路 杨, 吕志强, 刘印平, 等. QuEChERS 净化超高效液相色谱法快速测定豆制品中的 9 种工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3804-3809.

- Lu Y, Lv ZQ, Liu YP, *et al.* Determination of 9 kinds of dyes in bean products by ultra performance liquid chromatography with QuEChERS cleanup [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(10): 3804–3809
- [7] 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]. *分析科学报*, 2009, 25(4): 409–413.
- Zheng XY. Simultaneous determination of chrysoidine, auramine O and safranin T in foods by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2009, 25(4): 409–413.
- [8] 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, 28(6): 590–595.
- Hu X, Xiao G, Pan W, *et al.* Simultaneous determination of 7 rhodamine dyes in hot chili products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(6): 590–595.
- [9] 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苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B[J]. *广东化工*, 2012, 225(39): 109–110.
- Zhang XG, Zeng YT, Li YL, *et al.* Determination of sudan orange G, dimethyl yellow, sudan black B in food by SPE-UPLC-MS/MS[J]. *Guangdong Chem Ind*, 2012, 225(39): 109–110.
- [10] 王建伟, 钟海娟, 梁焯琼. 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.
- Wang JW, Zhong HJ, Liang CQ. Determination of chrysoidin and auramine O in food by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Test Chnol Instrum*, 2010, 16(2): 108–112.
- [11] 卢晓蕊, 沈虹. 液相串联质谱法测定豆制品中的碱性橙 II 和碱性嫩黄 O[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(08): 166–169.
- Lu XR, Shen H. Determination of food color of basic orange II and basic flavine O in bean products by LC-MS/MS [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(08): 166–169.
- [12] 严恒, 余婷婷, 蒋丽萍, 等. 液相色谱-串联质谱法检测豆制品中的二甲基黄[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(4): 1459–1463.
- Yan H, Yu T, Jiang LP, *et al.* Determination of diethyl yellow in bean products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(4): 1459–1463.
- [13] 范素芳, 李强, 马俊美, 等. 改进的 QuEChERS 方法结合液相色谱-串联质谱法测定腐竹和豆干中的二甲基黄和二甲基黄[J]. *色谱*, 2015, 33(6): 657–661.
- Fan SF, Li Q, Ma JM, *et al.* Determination of dimethyl yellow and diethyl yellow in yuba and dried beancurd by modified QuEChERS method and Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(6): 657–661.
- [14] 赵珊, 张晶, 丁晓静, 等. 凝胶净化/超高效液相色谱电喷雾质谱法检测调味油中 11 种禁用偶氮染料及罗丹明 B[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(4): 448–452.
- Zhao S, Zhang J, Ding XJ, *et al.* Determination of 11 azo-dyes and rhodamine B in seasoning oil by gel permeation chromatography /ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2012, 31(4): 448–452.
- [15] 程慧, 李兵, 占春瑞. 腊肠中罗丹明 B 的高效液相色谱串联质谱检测方法[J]. *食品科学* 2010, 31(4): 223–225.
- Cheng H, Li B, Zhan CR. Determination of rhodamine B residue in Chinese preserved sausages by HPLC-MS/MS [J]. *Food Sci*, 2010, 31(4): 223–225.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张 杉, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全分析测定。

E-mail: zhangshanazxy@sina.com.cn