

# 高效液相色谱-串联质谱法测定豆制品中的 二甲基黄残留量

丁安帮<sup>1</sup>, 熊晓辉<sup>2\*</sup>, 施祖灏<sup>1</sup>, 陆利霞<sup>2</sup>, 史昕平<sup>2</sup>, 汪开银<sup>1</sup>

(1. 国家轻工业食品质量监督检测南京站, 南京 210009; 2. 南京工业大学食品与轻工学院, 南京 210009)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定豆制品中的二甲基黄的含量。**方法** 豆制品经乙腈超声提取, 经色谱柱 Thermo C<sub>18</sub> Acclaim RSLC 分离, 采用乙腈:水(85:15, V:V)作为流动相进行等度洗脱; 质谱(electronic spray ion, ESI+)采用多离子监测模式(multiple reactions monitoring, MRM)对二甲基黄的定量离子和定性离子进行监测。**结果** 本方法在 5 min 内可完成二甲基黄的分离分析。二甲基黄在 10~500 μg/L 范围内具有良好的线性关系, 在 50、100 和 200 μg/L 3 个添加水平下的加标回收率为 90.2%~94.2%, 相对标准偏差为 0.926%(n=9), 方法的检出限为 0.4 μg/kg。**结论** 该方法快速准确、灵敏度高, 适用于测定豆制品中二甲基黄的残留量。**关键词:** 高效液相色谱串联质谱法; 豆制品; 二甲基黄

## Determination of dimethyl yellow in bean products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DING An-Bang<sup>1</sup>, XIONG Xiao-Hui<sup>2\*</sup>, SHI Zu-Hao<sup>1</sup>, LU Li-Xia<sup>2</sup>, SHI Xin-Ping<sup>2</sup>, WANG Kai-Yin<sup>1</sup>

(1. The State Light Industry Food Quality Supervision and Detection Station, Nanjing 210009, China;  
2. College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method for determination of dimethyl yellow in bean products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The dried tofu samples were extracted with acetonitrile by ultrasonic extraction, and separated by Thermo C<sub>18</sub> Acclaim RSLC column using acetonitrile water (85:15, V:V) as mobile phase for isocratic elution. Mass spectrometry (ESI+) used multiple reactions monitoring to identify the quantitative ion and qualitative ion of dimethyl yellow. **Results** This method could complete the separation and analysis of dimethyl yellow within 5 min. The dimethyl yellow had a good linear relationship in the range of 10~500 μg/L. The recoveries spiked at 3 levels of 50, 100 and 200 μg/L were ranged from 90.2% to 94.2% with relative standard deviations (RSD) of 0.926% (n=9), and the limit of detection (LOD) for the dimethyl yellow was 0.4 μg/kg. **Conclusion** The proposed method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for detecting dimethyl yellow in bean products.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; bean products; dimethyl yellow

\*通讯作者: 熊晓辉, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: xxh@njtech.edu.cn.

\*Corresponding author: XIONG Xiao-Hui, Ph.D, Professor, College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China. E-mail: xxh@njtech.edu.cn

## 1 引言

二甲基黄属于亲脂性偶氮染料, 主要被用作酸碱指示剂、非水溶液滴定用指示剂及胃液中游离盐酸的测定, 二甲基黄还用于锡、碘、硒、钨、砷、溴酸根和铜等物质的测定<sup>[1-6]</sup>。有相关动物实验研究发现, 长期口服二甲基黄会引起肝癌、肺癌、膀胱癌、肾肿瘤以及接触性皮肤病<sup>[7,8]</sup>。1987年, 国际癌症研究中心已将二甲基黄列为2B级致癌物质, 即指有动物致癌性, 因二甲基黄可能对人类具有致癌性, 中国、日本和欧盟等国家已将二甲基黄列为不准作为人工合成色素添加到食品中<sup>[9]</sup>, 然而一些不法商户为了牟取利益, 将其用作食品着色剂添加到豆干中。2014年, 我国台湾地区不断报道出在豆干中检出二甲基黄, 再次给我国食品安全监管敲响了警钟, 因此建立二甲基黄快速准确的检测方法很有必要。

目前, 检测豆制品中二甲基黄的方法主要有高效液相色谱法<sup>[10]</sup>, 气相色谱-质谱联用法<sup>[11,12]</sup>和液相色谱-质谱联用法<sup>[13-15]</sup>。与液相色谱法相比较, 高效液相色谱-串联质谱法的检出限更低、重现性更好、灵敏度更高且特异性更强。本研究参考了其他偶氮染料的检测条件<sup>[16-19]</sup>, 采用更为简便的样品前处理方法, 同时建立高效液相色谱-串联质谱法测定豆制品中二甲基黄的含量, 以期对豆制品中二甲基黄的监测提供技术参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Thermo UltiMate3000 高效液相色谱仪(美国热电公司); Thermo TSQ 质谱仪(美国热电公司); GL-20G-II 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

0.22  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜(岛津技迈(上海)商贸有限公司); 去离子水由 Millipore Q3 系统 (Millipore 公司, 美国) 制备; 二甲基黄(纯度 98.5%, 德国 DR 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品前处理

准确称取 5 g 粉碎均匀的豆干试样至 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 于超声波中超声提取 30 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  的有机滤膜过滤, 待测。

#### 2.2.2 仪器条件

##### (1) 色谱条件

色谱柱: Thermo Acclaim RSLC 120 C<sub>18</sub> (3.0 mm $\times$ 100 mm, 2.2  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈: 水(85: 15, V: V)等度洗脱; 色谱柱流速: 0.3 mL/min, 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

##### (2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方法: 选择反应监测; 加热气温度: 400  $^{\circ}\text{C}$ ; 喷雾电压: 4000 V; 鞘气压力: 40 bar; 辅助气压力: 10 bar; 离子传输毛细管温度: 320  $^{\circ}\text{C}$ ; 母离子( $m/z$ ): 226.1, 子离子( $m/z$ ): 77.4、120.3、133.2<sup>\*</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 总离子流图

图 1~图 3 是在最佳仪器条件下, 标准溶液、空白基质和基质加标所对应的总离子流(total ion chromatography, TIC)图, 由总离子流图可见, 在检测豆干中不存在二甲基黄基质干扰。

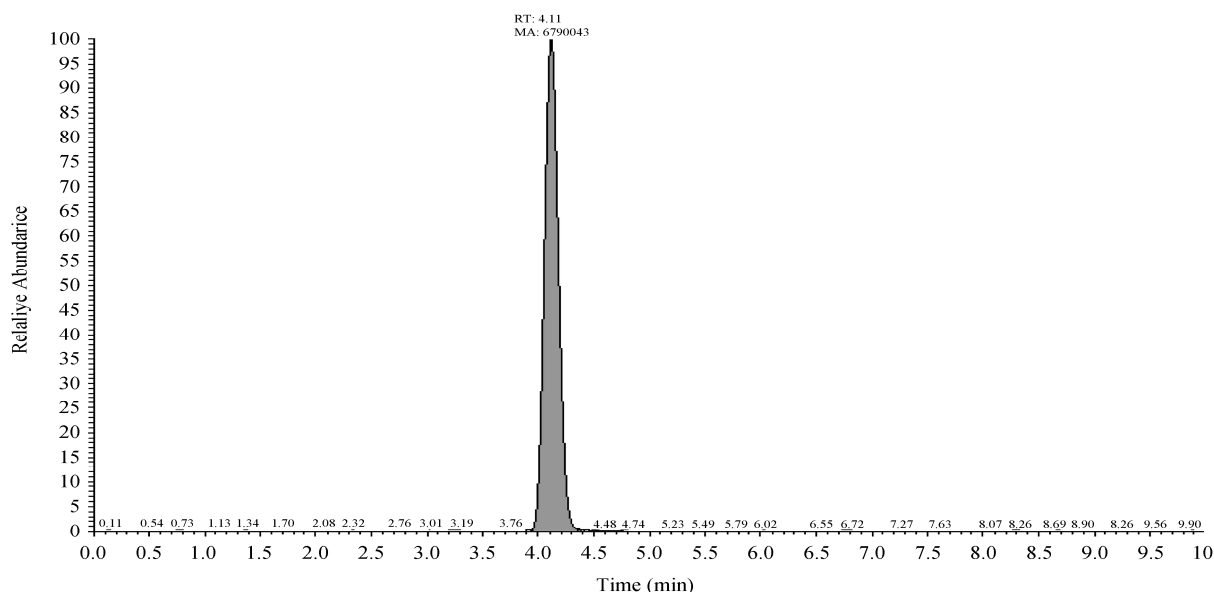


图 1 标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

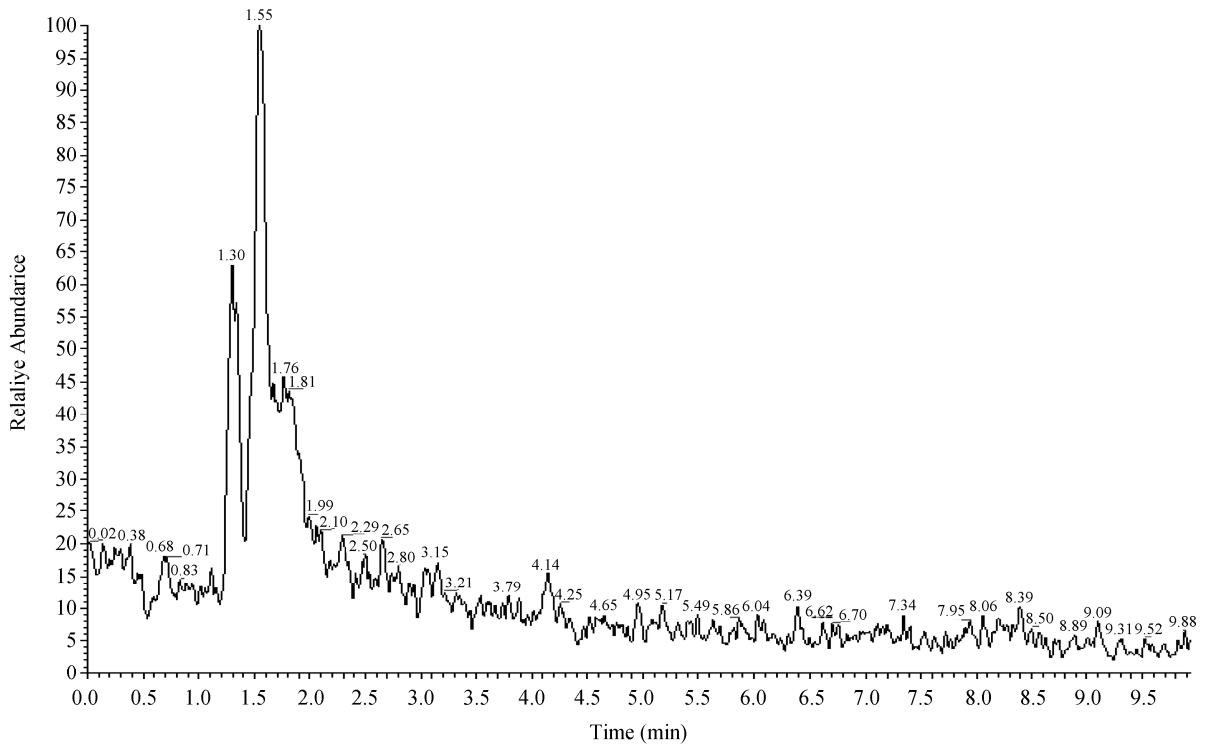


图 2 豆干提取液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the dried tofu extraction

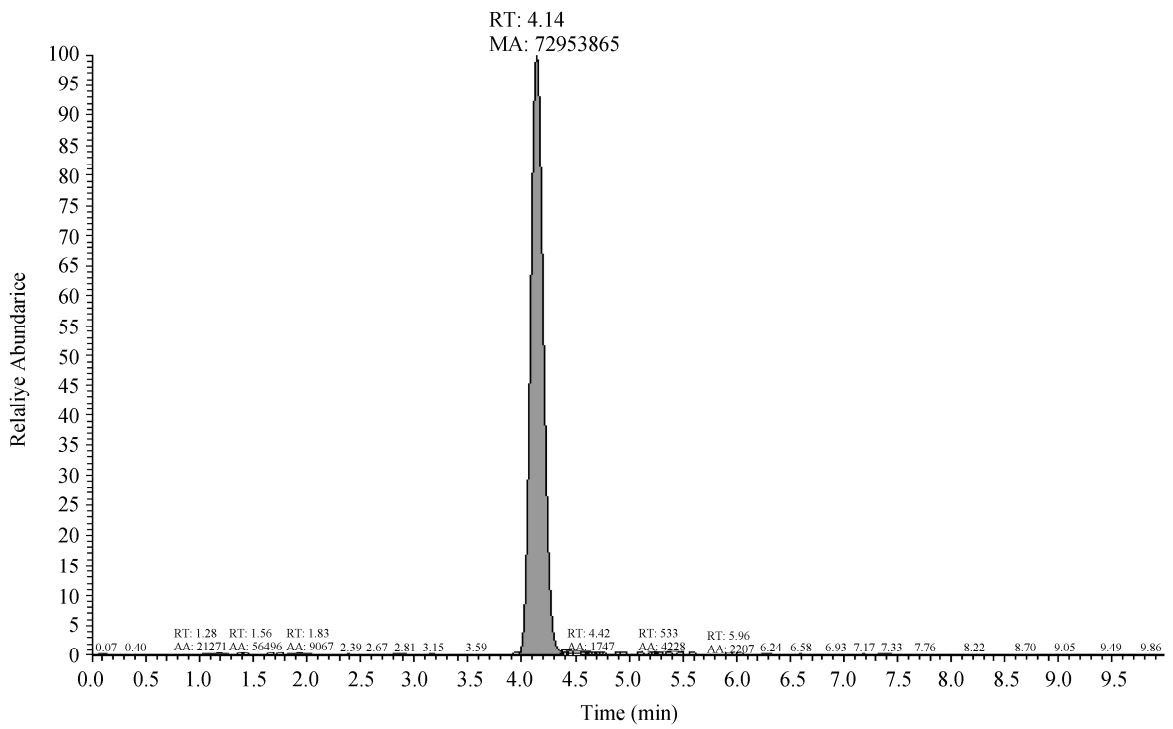


图 3 豆干基底加标的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the spiked dried tofu matrix

### 3.2 线性范围

在最佳色谱、质谱条件下, 分别用豆干提取液配制的 10、25、50、100、200、300 和 500  $\mu\text{g/L}$  的二甲基黄的标准溶液进样, 以响应的峰面积为纵坐标, 二甲基黄的浓度为横坐标作线性回归, 结果见图 4。

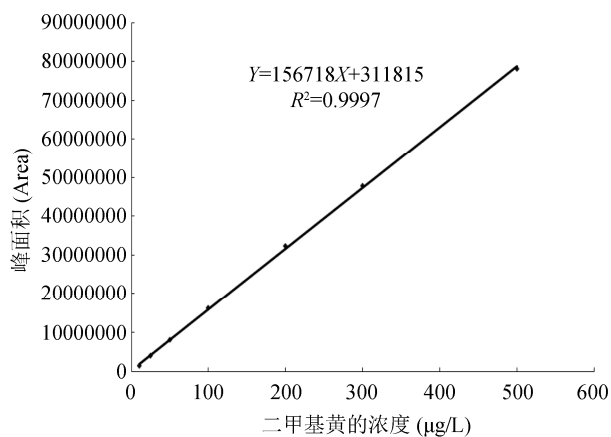


图 4 二甲基黄的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of dimethyl yellow

由图 4 可知, 二甲基黄的线性回归方程为:  $Y=156718X+311815$ ,  $R^2=0.9997$ , 实验结果表明, 二甲基

黄在 10~500  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内具有良好的线性关系。

### 3.3 加标回收率

称取 12 份 5 g 粉碎均匀的豆干试样, 平均分为 4 组, 每组分别加入 0、0.5、1.0 和 2.0 mL 2 mg/L 的二甲基黄标准溶液, 按 2.2.1 样品前处理方法进行操作, 按 2.2.2 仪器条件进行测定, 结果见表 1。由表 1 可知, 豆干中二甲基黄的加标回收率在 90.2%~94.2% 之间, 满足 GB/T 27404-2008<sup>[20]</sup>检测方法中加标回收率的要求。

### 3.4 精密度

称取 9 份 5 g 粉碎均匀的豆干试样, 分别添加 1.5 mL 2 mg/L 的二甲基黄标准溶液, 按 2.2.1 样品前处理方法进行操作, 按 2.2.2 仪器条件进行测定。由表 2 可知, 豆干中二甲基黄相对标准偏差为 0.926%( $n=9$ ), 满足 GB/T 27404-2008<sup>[20]</sup>检测方法确认精密度要求。

### 3.5 检出限

用  $D=3N/S$  倍信噪比作为豆干中二甲基黄的检出限, 称取 3 份 5 g 粉碎均匀的空白豆干基质, 分别加入 40、20、10  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g/L}$  的二甲基黄, 按 2.2.1 样品前处理方法进行操作, 按 2.2.2 仪器条件进行测定。当样品中二甲基黄的加标量为 20  $\mu\text{L}$ , 信噪比略大于 3。最终确定豆干中二甲基黄的最低检测限为 0.4  $\mu\text{g/kg}$ , 满足实验对豆干中微量二甲基黄含量的测定。

表 1 豆干中二甲基黄的加标回收率( $n=3$ )

Table 1 Spiked recoveries of dimethyl yellow in dried tofu samples( $n=3$ )

序号	样品含量/ $\mu\text{g}$	加标含量/ $\mu\text{g}$	(标准+样品)测定值/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%
1	0	1	0.902	90.2	
2	0	1	0.924	92.4	91.2
3	0	1	0.910	91.0	
4	0	2	1.864	93.2	
5	0	2	1.852	92.6	92.9
6	0	2	1.858	92.9	
7	0	4	3.768	94.2	
8	0	4	3.734	93.4	93.7
9	0	4	3.744	93.6	

表 2 精密度结果

Table 2 Results of relative standard deviations (RSDs)

测得值( $\mu\text{g/kg}$ )									平均值( $\mu\text{g/kg}$ )	RSD(%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9		
2.788	2.856	2.844	2.842	2.794	2.81	2.826	2.796	2.792	2.816	0.926

## 4 结 论

豆干样品经乙腈超声提取,用高效液相色谱串联质谱法测定。实验结果表明,二甲基黄在 10~500  $\mu\text{g/L}$  范围内具有良好的线性关系,样品的加标回收率在 90.2%~94.2% 之间,相对标准偏差为 0.926%( $n=9$ ),检出限为 0.4  $\mu\text{g/kg}$ ,满足 GB/T 27404-2008<sup>[20]</sup>的要求。该实验方法操作简便快捷,准确度、精密度和检出限均满足测定要求,可适用于豆干等豆制品中二甲基黄含量的测定。

### 参考文献

- [1] Wang AX, Han CX. Determination of trace copper by negative catalytic spectrophotometry in  $\text{Cu}(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ -dimethyl yellow system [J]. Metallurg Anal, 2005, 25(1): 55-57.
- [2] Zhou ZR, Wang Q, Zhang SY. Catalytic effects of trace ruthenium on oxidation of dimethyl yellow with bromate and its application [J]. J China Univ Mining Technol, 2008, 18(4): 613-617.
- [3] Han CX, Feng SC. Photometric determination of microamounts of iodate by color-fading reaction of dimethyl yellow [J]. Physical Test Chem Anal Part B: Chem Anal, 2004, 40(7): 384-386.
- [4] Zhou ZR, Zhou LM, Xu WY, *et al.* Kinetic spectrophotometric determination of trace selenium (IV) in foodstuff based on its catalytic effect on the oxidation of dimethyl yellow with potassium bromate [J]. Food Sci, 2006, 27(1): 181-186.
- [5] Lin X, Huang YH, Yang GS. Aalytic spectrophotometric method for the determination of trace arsenic(V) based on potassium bromate oxidizing dimethyl yellow using polyacrylate sodium as sensitizer [J]. J Zhangzhou Teach Coll (Nat Sci), 2006, (1): 74-77.
- [6] Han CX. Photometric determination of microamounts of bromate by the oxidation-decoloration of dimethyl yellow [J]. J Anal Sci, 2002, 18(4): 309-311.
- [7] Guan WL, Yang YH. The effects of supplementing low protein diet with whole egg powder or choline on DAB-carcinogenesis in rat livers and the effects on changes of nucleic acids and phospholipids in DAB-carcinogenic rat livers [J]. Acta Acad Med Zhongshan, 1981, 2(3): 571-576.
- [8] Yang YH, Luo CQ, Luo JY, *et al.* Observation of transcriptional activity of genomes on albino rats during dimethylamino- azobenzene (DAB)-hepatomized process [J]. Acta Acad Med Zhongshan, 1985, 6(2): 1-6.
- [9] Ge Y. The development of the regulatory and the standard testing methods of synthetic pigments in foods [J]. Qual Stand, 2011, 09: 31-35.
- [10] Ding AB, Shi ZH, Lu LX, *et al.* Determination of dimethyl yellow in dried tofu by high performance liquid chromatography method [J]. Agric Food Eng, 2015, (11): 53-55.
- [11] Li GS, Chen GQ, Yang G, *et al.* Chromatography-mass spectrometry with gel permeation chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2005, 34(12): 1399-1402.
- [12] Xia D, Ding AB, Shi ZH, *et al.* Determination of dimethyl yellow in dried tofu by gas chromatography tandem mass spectrometry method [J]. Agric Food Eng, 2015, (8): 56-58.
- [13] Tateo F, Bononi M, Gallone F. Rapid detection of dimethyl yellow dye in curry by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. Czech J Food Sci, 2010, 28(5): 427-432.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Calbiani F, Careri M, Elviri L, *et al.* Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1058(1-2): 127-135.
- [17] Olga Pardo, Vicent Yusà, Nuria León, *et al.* Development of a method for the analysis of seven banned azo-dyes in chilli and hot chilli food samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2009, 78(1): 178-186.
- [18] Calbiani F, Careri M, Elviri L, *et al.* Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products [J]. J Chromatogr A, 2004, 1042(1-2): 123-130.
- [19] 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.
- [20] GB/T 27404-2008 Food physical and chemical testing [S].

(责任编辑:姚 菲)

### 作者简介



丁安帮, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: anbangding@163.com



熊晓辉, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: xxh@njtech.edu.cn