

Oasis PRiME HLB-高效液相色谱-串联质谱法 测定黄鱼中的碱性嫩黄 O

张 兰¹, 姜玲玲², 高广慧^{3*}

(1. 鞍山市食品检验所, 鞍山 114001; 2. 沈阳海关技术中心, 沈阳 110001;
3. 辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110001)

摘要: **目的** 建立 Oasis PRiME HLB-高效液相色谱-串联质谱法测定黄鱼中的碱性嫩黄 O 的分析方法。**方法** 样品经乙醇提取液充分提取, 经涡旋、超声、低温高速离心后, 上清液过 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱净化, 流出液经氮吹吹干, 复溶, 待质谱分析。**结果** 在 1.5、15.0、30 $\mu\text{g/L}$ 3 个加标浓度下, 回收率为 85.3%~94.8%, 相对标准偏差为 3.0%~7.2%, 方法定量限为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法前处理十分简便, 固相萃取净化水平高, 色谱串联质谱分析快速灵敏, 回收率高, 灵敏度高, 适合黄鱼中非食用物质碱性嫩黄 O 的定性定量分析。

关键词: Oasis PRiME HLB; 高效液相色谱-串联质谱法; 黄鱼; 碱性嫩黄 O

Determination of auramine O in yellow croaker by Oasis PRiME HLB-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG-Lan¹, JIANG Ling-Ling², GAO Guang-Hui^{3*}

(1. Anshan Institute for Food and Drug Control, Anshan 114001, China; 2. Technological Center of Shenyang Customs, Shenyang 110001, China; 3. Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of auramine O in yellow croaker by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were fully extracted by ethanol extract, and purified by Oasis PRiME HLB solid phase extraction column after centrifugation at low temperature and high speed. The effluent was dried by nitrogen blowing and resolved, and then analyzed by mass spectrometry. **Results** At the spiked concentrations of 1.5, 15.0, and 30 $\mu\text{g/L}$, the recoveries ranged from 85.3%–94.8%. The relative standard deviation was 3.0%–7.2%, and the limit of quantitative of the method was 1 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is simple, rapid, sensitive, and sensitive, which is suitable for the qualitative and quantitative analysis of non-edible alkaline auramine O in yellow croaker.

KEY WORDS: Oasis PRiME HLB; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; yellow croaker; auramine O

*通讯作者: 高广慧, 主任药师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: gghggh2000@163.com

*Corresponding author: GAO Guang-Hui, Chief Pharmacist, Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110015, China. E-mail: gghggh2000@163.com

1 引言

碱性嫩黄 O 是一种黄色工业染料, 主要用于醋纤、棉织品的染色, 还用于纸张、皮革、油漆等的着色。国家食品整治办早在 2008 年就将其列入第一批可能添加到食品中的非食用物质名单, 但仍有不法商贩向食品中非法添加碱性嫩黄着色来欺骗消费者^[1-4]。向人工养殖黄鱼中添加碱性嫩黄来冒充野生黄鱼, 就曾多次被新闻媒体曝光。虽然目前有很多种方法可以用于检测食品中的碱性嫩黄 O, 例如液相色谱-串联质谱法^[5-9]、液相色谱法^[10-14]、分光光度法、酶联免疫法等, 但是大都前处理费时、步骤繁琐、过程复杂。近年来, 福建、吉林等一些省份陆续发布了地方标准用于检测食品中的碱性嫩黄 O, 但是国家卫生和市场监管部门尚未发布针对食品中碱性嫩黄的安全国家标准, 而且像黄鱼这类动物源性食品一般都存在比较明显的基质效应^[15,16]。

本研究采用目前最先进的固相萃取方法对待测样品中的碱性嫩黄 O 进行净化处理, 并针对样品的基质效应找到了很好的解决方法, 从样品的前处理、提取净化、色谱-质谱条件等方面进一步优化方法, 以期建立一种更便捷准确的测定方法, 以应对养殖行业 and 市场上经常出现的黄鱼染色事件, 为食品安全监管提供强有力的技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器

1260-6460 液相色谱-质谱/质谱仪(美国 Agilent 公司); 舒美 KQ-100DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器公司); 梅特勒 ME204E 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); AFS-50 旋涡混合器(天津奥特赛恩斯仪器公司); Allera64R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); MS-10 氮吹仪(上海屹尧仪器公司); W2-100SP 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); ML-10S 固相萃取装置(天津奥特赛恩斯仪器公司)。

2.2 试剂

碱性嫩黄 O(纯度均为 98%, 美国 ACROS Organics 公司); 无水硫酸钠(分析纯, 国药上海公司); 无水乙醇、氨水、甲醇、甲酸 88%、乙酸铵(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 试验用水(屈臣氏蒸馏水); Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(6 mL, 美国 Waters 公司)。

2.3 标准溶液配制

精密称取标准品 10 mg(精确至 0.1 mg), 用甲醇水(70:30, V:V)溶解, 并转移至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备液, 于 4 °C 条件下保存, 有效期 3 个月。用 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸甲醇溶液混合溶液(70:30, V:V)稀释, 摇匀, 作为系列标准工作

溶液, 浓度为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、75.0、100.0 ng/mL, 现用现配。

2.4 样品前处理

称取 5 g 左右已均质的黄鱼表皮样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 5 g 无水硫酸钠, 搅拌均匀, 加入 25 mL 无水乙醇, 涡旋混合 1 min, 超声提取 20 min, 以 4 °C、10000 r/m 离心 8 min, 上清液转移至鸡心瓶中, 再加入 25 mL 无水乙醇, 重复上述操作, 合并全部上清液于鸡心瓶中, 在 45 °C 旋转蒸发至近干, 待净化。样品提取浓缩液用 10 mL 水少量多次溶解, 上 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 调节流速 ≤ 2 mL/min, 用 6 mL 氨水甲醇溶液(5:95, V:V)洗脱, 40 °C 氮气吹干, 准确加入 1 mL 0.1% 甲酸水溶液定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供液相色谱-质谱仪分析测定。

2.5 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Flow phase gradient elution procedure

时间/min	A: 0.1%甲酸甲醇溶液/%	B: 0.1%甲酸水溶液/%
0	70	30
3.00	70	30
3.50	10	90
5.50	10	90
6.00	70	30
8.00	70	30

2.6 质谱条件

离子源: 电喷雾正离子源(ESI+); 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 4000 V; 源温度: 300 °C; 碰撞气: 氮气 0.4 mL/min; 锥孔气: 20 L/h; 驻留时间: 2 min。

3 结果与分析

3.1 净化条件的优化

碱性嫩黄 O 不易溶于常温水, 但极易溶于乙醇等有机溶剂, 选择乙醇作为提取液, 与其他有机溶剂相比节约成本, 更有利于环保。黄鱼等水产品样品基质复杂, 含有蛋白、脂肪等多种高氮有机物, 在提取待测物的同时, 很容易产生干扰和基质效应, 通过实验对比和查阅文献发现, 采用 Oasis PRiME HLB 新型固相萃取技术处理样品能节省萃取时间, 极大地降低了基质效应的干扰, 提高加标回收效果。

3.2 质谱条件的优化

为了保证定性和定量结果的准确性, 必须对化合物的监测离子对、扫描时间、碰撞能量、驻留时间等一系列质谱条件和参数进行优化, 以期达到最佳的检测效果。本研究在待测物不经色谱柱直接进质谱仪的情况下, 先采用全扫描(MS2 Full Scan)模式获取待测物的母离子; 接下来采用单离子监测扫描(MS2 Sim)模式优化毛细管出口电压, 保证母离子传输效率; 再采用子离子扫描(product ion scan)模式优化碰撞能; 最后采用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 优化每个子离子的碰撞能, 见表 2、图 1。

表 2 碱性嫩黄 O 质谱参数

Table 2 Chromatogram parameters of auramine O residues

保留时间 /min	离子对/(m/z)	毛细管出口电压 /V	碰撞能 /eV
3.72	268/147*; 268/107	90/90	30/30

注: *为定量离子对

3.3 方法线性范围、检出限、定量限

按照优化后的前处理方法处理, 用 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、75.0、100.0 ng/mL 的标准溶液上机检测, 以色谱峰面积为纵坐标, 化合物浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 外标法定量。以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限(limit of detection, LOD), 以 10 倍信噪比(S/N)计算定量限(limit of

quantification, LOQ)。线性范围、回归方程及相关系数、方法检出限、定量限及平均回收率见表 3。

3.4 回收率和精密度

对阴性样品进行加标回收测试, 使其添加浓度分别为 1.5、15.0、30 $\mu\text{g/L}$, 每个浓度水平重复测试 6 次, 回收率在 85.3%~94.8%之间, 相对标准偏差在 3.0%~7.2%之间, 说明该方法准确度较高, 具体结果见表 4。

3.5 实际样品测定

在 2018 年 12 月份, 对鞍山 4 个城区每个区随机挑选 2 家农贸市场抽取黄鱼样本, 检测碱性嫩黄 O, 并分别建立外标校准曲线、方法空白、样品基质空白, 同时做了加标回收实验, 添加量为方法定量限 1 $\mu\text{g/kg}$ 。检测结果为所有样本均为阴性。

4 结 论

本研究建立了利用 Oasis PRiME HLB-高效液相色谱-串联质谱法测定黄鱼中的碱性嫩黄 O 的分析方法, 并从线性范围、标准曲线、相关系数、定量限、回收率、精密度等方面对该方法进行考察, 相比目前的地标方法和文献报道方法, 本方法具有高通量、基质干扰少、萃取效率高、操作简便、更环保、成本低廉等优点, 为查处食品非法添加物、建立更高效更便捷的检验方法提供技术支持, 保障人民群众食品安全。

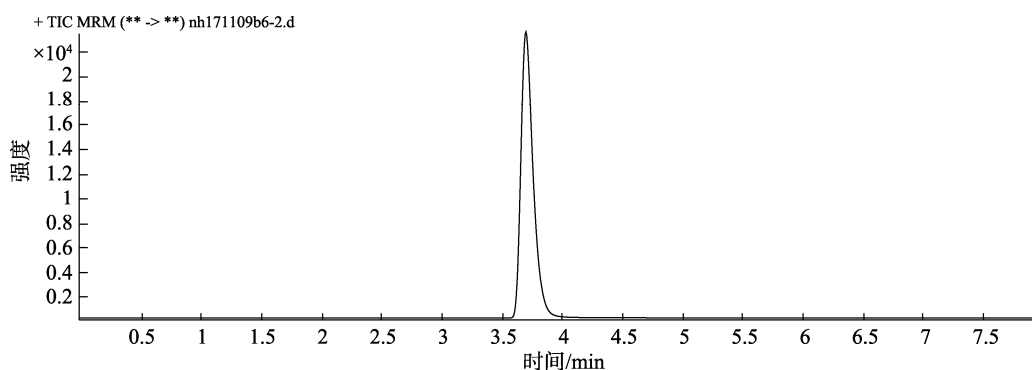


图 1 标准品总离子流图

Fig.1 Standard total ion flow chart

表 3 碱性嫩黄 O 的线性范围、回归方程、相关系数、检出限、定量限

Table 3 Linear ranges, standard curve, correlation coefficients, LOD, LOQ, and auramine O

化合物	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数 r^2	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
碱性嫩黄 O	2.5~100	$Y=1883.8X+1098.6$	0.9997	0.3	1.0

表 4 碱性嫩黄 O 的加标回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 4 Recoveries and RSDs of auramine O ($n=6$)

加标浓度水平	1.5 $\mu\text{g/kg}$		15.0 $\mu\text{g/kg}$		30.0 $\mu\text{g/kg}$	
	回收率%	RSD/%	回收率%	RSD/%	回收率%	RSD/%
测试结果	87.8	7.2	85.3	4.9	94.8	3.0

参考文献

- [1] 沙鸥, 陈太卫, 马卫兴, 等. 高效液相色谱法测定黄鱼中非法添加染料碱性嫩黄 O 含量[J]. 食品科技, 2014, (39): 281-284.
Sha O, Chen TW, Ma WX, *et al.* Determination of auramine O in yellow croaker by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2014, (39): 281-284.
- [2] 张海琪, 梁丽军, 何中央, 等. 水产品中碱性嫩黄 O 残留量的液相色谱-串联质谱测定[J]. 质谱学报, 2010, 31(1): 48-52.
Zhang HQ, Liang LJ, He ZY, *et al.* Determination of auramine O residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2010, 31(1): 48-52.
- [3] 李永刚, 刘潇, 陈明, 等. 液质联用法检测黄鱼中的碱性橙、碱性嫩黄和酸性橙 II[J]. 公共卫生与预防医学, 2013, 24(2): 97-98
Li YG, Liu X, Chen M, *et al.* LC-MS for determination of chrysoidine G, auramine O and acid orange II [J]. Publ Health Prev Med, 2013, 24(2): 97-98.
- [4] 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(8): 166-169.
Lu XR, Shen H. Determination of chrysoidine g and auramine O in soybean products by LC-MS [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(8): 166-169.
- [5] 黄思静, 汪义杰, 朱斌. 超高效液相色谱-高分辨质谱法测定糖果中的碱性嫩黄 O [J]. 食品科技, 2018, (2): 318-321.
Huang SJ, Wang YJ, Zhu B. Determination of auramine O in candy by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Food Sci Technol, 2018, (2): 318-321.
- [6] 林子豪, 戚平, 周庆琼, 等. 液相色谱-串联质谱内标法同时测定调味品中 11 种工业染料[J]. 现代食品科技, 2017, (7): 301-307.
Lin ZH, Qi P, Zhou QQ, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry internal standard method for simultaneous determination of 11 industrial dyes in condiments [J]. Mod Food Technol, 2017, (7): 301-307.
- [7] 林中, 陈忍, 陈麟霞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定小吃类食品和火锅底料中 5 种罂粟壳生物碱和 6 种工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (1): 107-115.
Lin Z, Chen R, Chen LX, *et al.* Simultaneous determination of five poppy-shell alkaloids and six industrial dyes in snack foods and hot pot bottoms by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, (1): 107-115.
- [8] 陈林, 温家欣, 刘潇潇, 等. HPLC 结合 LC-MS/MS 法快速检测穿山甲中掺加的 12 种黄色色素[J]. 中成药, 2017, (3): 556-560.
Chen L, Wen JX, Liu XX, *et al.* Rapid determination of 12 yellow pigments doped in pangolin by HPLC-LC-MS/MS [J]. Chin Patent Med, 2017, (3): 556-560
- [9] 斯中发. LCMS-8050 测定食品中的色素[J]. 食品界, 2017, (4): 117-117
Si ZF. LCMS-8050 Determination of pigments in food [J]. Food Ind, 2017, (4): 117-117
- [10] 祁菲菲. 环境水样和食品中工业染料检测的样品前处理新方法研究及应用[D]. 南京: 东南大学, 2017.
- Qi FF. Research and application of new sample pretreatment method for industrial dyes detection in environmental water samples and foods [D]. Nanjing: Southeast University, 2017.
- [11] 孙记涛, 阮长青, 刘文静, 等. HPLC 波长程序法同时检测非发酵豆制品中碱性橙和碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品工业科技, 2016, (14): 73-77.
Sun JT, Ruan CQ, Liu WJ, *et al.* Simultaneous determination of basic orange and basic yellow O in non-fermented soybeans by hplc wavelength program [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, (14): 73-77.
- [12] 李莎, 王银花, 叶麟, 等. HPLC 法同时测定食品中酸性橙 II 和碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品与发酵工业, 2017, (3): 234-238.
Li S, Wang YH, Ye L, *et al.* Simultaneous determination of acid orange II and auramine O in food by high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2017, (3): 234-238.
- [13] 李莎, 雷智棋, 朱红, 等. HPLC 同时检测酸性橙 II 和碱性嫩黄 O 色谱条件优化[J]. 中国酿造, 2016, (1): 165-169.
Li S, Lei ZQ, Zhu H, *et al.* Determination of acid orange II and auramine O chromatographic conditions optimization by high performance liquid chromatography [J]. China Brew, 2016, (1): 165-169.
- [14] 李乃洁, 张凯. 合成碱性嫩黄标准品的含量检测[J]. 染料与染色, 2018, (2): 49-51.
Li NJ, Zhang K. Content detection of synthetic auramine O standard [J]. Dyes Dyeing, 2018, (2): 49-51.
- [15] 李锦清, 綦艳, 廖桂福, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定豆制品中二甲基黄和碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, (12): 4753-4758.
Li JQ, Qi Y, Liao GF, *et al.* QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rapid determination of dimethyl yellow and auramine O in soybean products [J]. J Food Saf Qual, 2016, (12): 4753-4758.
- [16] 林奕云, 付强, 蔡大川, 等. UPLC-MS/MS 法测定食品中四种碱性工业染料[J]. 食品工业, 2016, (5): 278-282.
Lin YY, Fu Q, Cai DC, *et al.* UPLC-MS/MS determination of four basic industrial dyes in food [J]. Food Ind, 2016, (5): 278-282.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



张 兰, 工程师, 主要研究方向为食品理化分析。

E-mail: 18941210412@163.com



高广慧, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品、保健品等理化分析。

E-mail: gghggh2000@163.com