

超高效液相色谱-串联质谱法测定火锅底料中 柑橘红 2 号的含量

袁 宁*

(辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110015)

摘 要: **目的** 建立的超高效液相色谱-串联质谱法检测火锅底料中柑橘红 2 号含量的方法。**方法** 火锅底料样品用乙腈提取, 氨基固相萃取柱净化, 经 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱分离, 以乙腈与 0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 多反应监测模式测定, 基质外标法定量。**结果** 柑橘红 2 号在 1.00 ~ 40 ng/mL 范围内线性关系良好($r > 0.9955$), 检出限为 4.0 $\mu\text{g/kg}$ 。在添加水平分别为 8.0、25、100 $\mu\text{g/kg}$ 时, 加标回收率为 82.2% ~ 86.4%, 相对标准偏差为 1.17% ~ 3.20%。**结论** 该方法准确可靠、灵敏度高, 适用于火锅底料中柑橘红 2 号的检测。

关键词: 火锅底料; 柑橘红 2 号; 液相色谱串联质谱法

Determination of citrus red No. 2 in hotpot substrate by super performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YUAN Ning*

(Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of citrus red No.2 in hot pot bottoms by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Hot pot samples were extracted with acetonitrile, and purified by amino solid phase extraction column, and separated by Acquity UPLC BEH C₁₈ chromatographic column using acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase for gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min. The samples were detected by multi-reaction monitoring mode, quantified matrix external standard method. **Results** Citrus red No.2 had a good linear relationship in the range of 1.00–40 ng/mL ($r > 0.9955$), and the limit of detection was 4.0 $\mu\text{g/kg}$. When the addition levels were 8.0, 25, and 100 $\mu\text{g/kg}$, the recovery rates of standard addition were 82.2%–86.4%, and the relative standard deviations were 1.17%–3.20%. **Conclusion** This method is accurate, reliable, and highly sensitive, and is suitable for the detection of citrus red No.2 in hot pot bottoms.

KEY WORDS: hot pot bottom material; citrus red No.2; liquid chromatography tandem mass spectrometry

1 引 言

柑橘红 2 号是一种橘红色人造染料, 主要作为工业染

料使用^[1], 根据世界卫生组织国际癌症研究机构 2017 年 10 月 27 日公布的致癌物清单, 柑橘红 2 号属于 2B 类致癌物^[2]。我国 GB 2760-2014《食品安全国家标准食品添加剂

*通讯作者: 袁宁, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 553650551@qq.com

*Corresponding author: YUAN Ning, Master, Engineer, Liaoning Institute for Food Control (Liaoning Provincial Salt Quality Supervision and Inspection Center), No.58 Changqing District, Shenyang 110015, China. E-mail: 553650551@qq.com

使用标准》^[3]明确规定食品中添加食用色素的品种、范围和用量,柑橘红 2 号并未纳入其中,是不允许使用的。但由于柑橘红 2 号成本低廉、成分艳丽,被不法商人用于火锅底料中增加汤底外观、稳定色泽,但长期摄入会增加人体致癌风险,尤其是对孕妇、胚胎、婴儿^[4]。

目前,柑橘红 2 号的检测技术主要有液相色谱法、液相色谱-联用质谱法、表面增强拉曼光谱等技术^[5-7]。前处理方法主要有氧化铝柱、凝胶净化法、QuEChERS 法、氨基固相萃取法^[8-11]。国家市场监督管理总局发布 BJS 201912《食品中柑橘红 2 号的测定》食品补充检验方法规定了柑橘红 2 号的液相色谱-串联质谱测定方法,其检出限为 5 μg/kg^[12]。目前采用超高效液相色谱-串联质谱法测定火锅底料中柑橘红 2 号含量的报道较少。

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法对火锅底料中柑橘红进行测定,并对前处理条件和仪器条件进行优化,为相关抽检方法提供技术参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

柑橘红 2 号标准品(纯度 98.5%,美国 SIGMA-ALDRICH 公司);乙腈、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司);氯化钠、无水硫酸镁、无水醋酸钠(分析纯,国药化学试剂有限公司);实验用水为超纯水(18.0MΩ)。

2.2 仪器与设备

ESI TQD 三重四级杆质谱、XEVO 超高相液相色谱、Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司);TTL-DCII 氮吹仪(同泰联科技发展有限公司);DT512H 超声波恒温水浴振荡器(朗博仪器制造有限公司);氨基固相萃取柱(200 mg/6 mL,美国 Agilent 公司);Himac CR21N 高速冷冻离心机(日本日立公司);Milli-Q A10 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

2.3 溶液配制

柑橘红 2 号标准储备液:称取 10.020 mg 柑橘红 2 号标准品,置于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,制成浓度分别为 200.4 μg/mL 的标准中间液。

柑橘红 2 号标准中间液:取 0.5 mL 柑橘红 2 号标准储备液,置于 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。再量取 1.0 mL 该溶液,置于 10 mL 容量瓶中,制成浓度分别为 100.2 ng/mL 的标准中间液,4℃保存。

2.4 样品提取与净化

准确称取 2 g(精确至 0.001 g)样品置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 0.1%酸化乙腈,涡旋振荡 1 min,加入 6.0 g 无水硫酸镁和 1.5 g 无水醋酸钠的混合粉末,立即涡旋振荡 1 min,6000 r/min 离心,5 min,取上清液的酸化乙腈层

至 50 mL 离心管中,40℃氮吹浓缩至干,用 3 mL 0.1%酸化乙腈涡旋、超声溶解残渣,溶液待净化。

氨基固相萃取柱用 6 mL 乙腈活化,氨基柱内的液体放弃后,将样液转移至氨基固相萃取柱,控制样液流速,收集流出液。用 6 mL 乙腈淋洗 2 次,收集洗脱。40℃下氮吹浓缩至干,用 0.1%甲酸乙腈溶液定容至 10 mL,0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液上机测定。

2.5 基质标准工作液的配制

分别称取 6 个空白基质的火锅底料样品,加入一定浓度的柑橘红 2 号中间液,其余按 2.3 方法处理样品,即得到柑橘红 2 号浓度为 1.00、2.00、5.01、10.02、20.04、40.08 ng/mL 的基质样品标准溶液。

2.6 色谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)。流动相:乙腈,0.1%甲酸水溶液。流速:0.3 mL/min。柱温:35℃。进样量:2 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流速/(mL/min)	乙腈/%	0.1%甲酸水溶液/%
0.00	0.3	15	85
0.30	0.3	50	50
2.00	0.3	95	5
4.00	0.3	95	5
5.00	0.3	15	85

2.6 质谱条件

离子化:电喷雾;扫描方式:正离子模式;检测方式:多反应监测(multiple- reaction monitoring, MRM);离子源温度:450℃;雾化气流速:0.8 L/min;锥孔电压:25 V;质谱采集参数见表 2。

表 2 质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters

目标化合物	驻留时间 /s	锥孔电压 /V	碰撞能量 /V
柑橘红 2 号, 309.1/153.0*	0.025	25	20
柑橘红 2 号, 309.1/278.0	0.025	25	12

注:标注*的碎片为定量离子。

3 结果与分析

3.1 条件优化

3.1.1 提取条件

本研究采用酸化乙腈目标化合物进行样品提取,目

标化合物具有偶氮结构,因此考察了乙腈和添加 0.1%甲酸的乙腈溶液作为提取溶剂^[13],在观察目标物的反应情况,发现添加 0.1%甲酸乙腈溶液作为提取柑橘红 2 号的提取效果好,因此选择 0.1%甲酸乙腈作为样品提取溶剂。

3.1.2 净化条件的优化

本实验的样品中柑橘红 2 号的提取采用 0.1%甲酸乙腈溶液,因样品中油和水分含量较大,并且水和乙腈互溶,因此本研究采用无水硫酸镁和无水醋酸钠的混合粉末作为盐析剂,用于缓解提取过程中的乳化,同时除去水溶性杂质,减少样品对质谱污染^[4,14]。

3.1.3 色谱条件

为使柑橘红 2 号具有良好的峰型和较高的灵敏度,选用上述的流动相和色谱柱,优化后梯度洗脱程序见表 1。图 1 为 10.0 μg/kg 火锅底料中柑橘红 2 号的总离子流色谱图,保留时间 3.06 min 为目标峰。

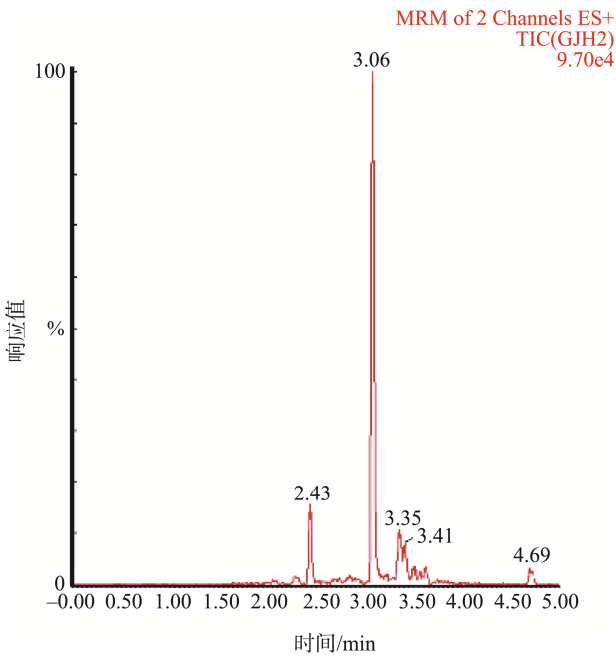


图 1 火锅底料中柑橘红 2 号的总离子流图
Fig.1 Total ion flow diagram of Citrus No.2 in hotpot substrate

3.1.4 质谱条件

将标准溶液配制成 200 ng/mL 的标准液进样,在正离子模式下进行全扫描分析,确定化合物的分子离子,以化合物的准分子离子为母离子,给予一定的碰撞能量和碰撞气体,通过改变锥孔电压,选择准分子离子响应最好的电压作为锥孔电压;对准分子离子进行二级全扫描,得到它的碎片离子信息;通过改变碰撞能量,选择稳定、丰度较强、干扰较小 2 个碎片离子作为特征离子,其中丰度相对较强的为定量离子,另一个作为定性离子,并对其碎片离子的碰撞能量进行优化,使定量离子和定性离子的响应达最优^[15]。优化得到的质谱参数见表 2。

3.2 线性方程、检出限与定量限

在优化的质谱条件和色谱条件下,测定 2.5 项的 6 个基质标准溶液工作曲线。以目标化合物定量离子的峰面积(Y)作为纵坐标、质量浓度(X, ng/mL)为横坐标绘制曲线,线性范围为 1.0 ~ 40 ng/mL,相关系数 *r* 为 0.9999,线性关系满足实验要求。检出限为 4.0 μg/kg,定量限为 8.0 μg/kg,如表 3。

表 3 柑橘红 2 号工作曲线方程、相关系数、检出限和定量限
Table 3 Working curve equation, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of citrus red No.2

药物	线性方程	相关系数	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
柑橘红 2 号	$Y=2816X+182.353$	0.99992	4.0	8.0

3.3 回收率和精密度

在空白火锅底料样品中添加柑橘红 2 号标准溶液,制备含量分别为 8.0、25 和 100 μg/kg 的加标样品,按照 2.4 项处理方法及 2.5 和 2.6 项的测定条件进行回收率试验,每个添加水平平行测定,结果见表 4。柑橘红 2 号的平均回收率为 82.2% ~ 86.4%,相对标准偏差为 1.17% ~ 3.20%。

3.4 实际样品检测

采用本研究建立的方法,对 20 批火锅底料进行检测,样品未检出柑橘红 2 号。

表 4 回收率和精密度实验
Table 4 Recoveries and precisions test

样品名称	添加量/(μg/kg)	检出值/(μg/kg)						平均回收率/%	RSD/%
柑橘红 2 号	8.0	6.72	6.83	6.51	6.38	6.59	6.43	82.2	2.63
	25	21.31	21.14	20.88	22.73	21.45	20.92	85.6	3.20
	100	86.29	84.78	83.59	85.01	84.22	83.77	86.4	1.17

4 结 论

本研究采用酸化乙腈提取方法, 结合固相萃取净化方法, 建立了 LC-MS/MS 柑橘红 2 号的分析方法。与 BJS 201912 标准相比, 检出限由 5 $\mu\text{g/kg}$ 变为 4 $\mu\text{g/kg}$, 提高了灵敏度。该方法准确可靠, 其灵敏度、回收率和精密度均符合检测技术的要求, 可以为食品检验检测机构进行柑橘红 2 号检测提供技术支持。

参考文献

- [1] 张艳侠, 尹丽丽, 薛霞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中柑橘号和苏丹红 I-IV 染料[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 286–292.
Zhang YX, Yin LL, Xue X, *et al.* Determination of citrus and Sudan I-IV dyes in food by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(23): 286–292.
- [2] 国家药品监督管理局. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[Z]. 2017.
National Medical Products Administration. World Health Organization International Cancer Research Institute list of carcinogens [Z]. 2017.
- [3] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for use of food additives [S].
- [4] 鄢兵, 张云伟, 胡海山. 超高效液相色谱法测定脐橙中橘红 2 号和苏丹红[J]. 理化检验-化学分册, 2015, (51): 807–809.
Yan B, Zhang YW, Hu HS. Determination of citrus red 2 and Sudan red in Navelorange by UHPLC [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2015, (51): 807–809.
- [5] 吴坤. 食品中柑橘红 2 号与罗丹明 B 及苏丹红 I-IV 的高效液相色谱检验方法[J]. 农产品加工(学刊), 2014, (20): 67–68.
Wu K. High performance liquid chromatography testing method of citrus red 2, rhodamine B, Sudan red I–IV in food [J]. Prod Process, 2014, (20): 67–68.
- [6] 胡莉, 雷绍荣, 郭灵安. 超高效液相色谱-串联质谱法测定脐橙中橘红 2 号染料[J]. 色谱, 2012, (8): 85–88.
Hu Li, Lei SR, Guo LA. Determination of citrus red 2 in navelorange by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, (8): 85–88.
- [7] 周世阳, 李占彬, 孙海达, 等. SERS 对柑橘类中柑橘红 2 号色素的检测分析[J]. 食品科技, 2017, 42(7): 309–312.
Zhou SY, Li ZB, Sun HD, *et al.* Detection and analysis of Citrus Red 2 pigment in Citrus by SERS [J]. Food Sci Technol, 2017, 42(7): 309–312.
- [8] 郑连姬, 邹勇, 张琪, 等. 氧化铝柱-高压液相色谱法测定重庆火锅底料中 7 种非食用色素及暴露评估[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 277–286.
Zheng LJ, Zou Y, Zhang Q, *et al.* Determination of seven non edible pigments in Chongqing hot pot by alumina column high pressure liquid chromatography and evaluation of their exposure [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(19): 277–286.
- [9] 奚星林, 王岚, 余书奇, 等. 凝胶净化液相色谱法同时检测高油脂食品中黄色 2G、奶油黄和柑橘红 2 色素[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 315–317.
Xi XL, Wang L, Yu SQ, *et al.* Simultaneous HPLC determination of yellow 2G, butter yellow and citrus red 2 in foodstuffs with high fat after purification with gel permeation chromatography [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(5): 315–317.
- [10] 杨明, 许晴, 李首道, 等. QuEChERS-HPLC-MS/MS 测定柑橘类水果中柑橘红 2 号染料[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 322–325.
Yang M, Xu Q, Li SD, *et al.* Determination of citrus red No. 2 in citrus by a QuEChERS method with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Ind, 2019, 40(12): 322–325.
- [11] 张剑峰, 陈彦凤, 孙艳芳, 等. 固相萃取-液质联用法同时测定调味品中罗丹明 B 和苏丹红工业染料[J]. 中国卫生工程学, 2013, 12(5): 47–49.
Zhang JF, Chen YF, Sun YF, *et al.* Simultaneous determination of Rhodamine B and Sudan industrial dye in condiments by SPE-LC-MS [J]. China Health Eng, 2013, (5): 47–49.
- [12] BJS 201912 食品中柑橘红 2 号的测定[S].
BJS 201912 Determination of citrus red 2 in food [S].
- [13] 汪福强, 彭雪梅, 伍燕飞. 陈皮药材中柑橘红 2 号检测方法的建立[J]. 现代妇女, 2014, (10): 99.
Wang FQ, Peng XM, Wu YF. Establishment of a method for the determination of tangerine No. 2 in tangerine pee [J]. Mod Women, 2014, (10): 99.
- [14] 刘晓茂, 杨志伟, 崔宗岩, 等. 固相萃取-液质联用测定火锅底料中 5 种生物碱[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 144–148.
Liu XM, Yang ZW, Cui ZY, *et al.* Determining of five alkaloids residues in hotpot seasoning using solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2016, 37(22): 144–148.
- [15] 赵飞, 高广慧, 贾宏新. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法测定麻辣烫中喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(6): 768–772.
Zhao F, Gao GH, Jia HX. Determination of quinolone residues in malatang by ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. J Anal Test, 2017, 36(6): 768–772.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

袁 宁, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 553650551@qq.com