

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240611005

高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 7 种红曲色素

张 蕤*, 郭舒岗, 张春萍, 熊慧霞, 薛红波

(山西省疾病预防控制中心, 太原 030000)

摘 要: **目的** 建立通过式固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 7 种红曲色素。**方法** 样品经过乙腈提取, Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 cc)净化, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱分离, 采用高效液相色谱串联质谱仪检测, 基质匹配外标法定量。并对豆制品、糕点、酸奶、腐乳、熟肉、饮料以及腊肠 7 种基质中红曲色素回收率进行了考察。**结果** 7 种基质中潘红胺、红曲红胺、红曲素、红斑素、红曲黄素、红曲玉红素、红曲红素的加标回收率分别为 73.9%~112.1%, 70.1%~92.6%, 72.4%~103.4%, 73.8%~93.5%, 73.4%~113.3%, 71.6%~105.7%, 75.0%~112.1%; 7 种色素的相对标准偏差为 0.2%~15.7%; 红曲黄素的检出限为 3.0 μg/kg, 其余 6 种色素的检出限为 1.0 μg/kg。**结论** 该方法前处理简单快速、灵敏度高、准确度和精密度良好, 采用基质匹配的标准曲线定量, 适用于不同基质中 7 种红曲色素的测定。**关键词:** 红曲色素; 高效液相色谱-串联质谱法; 食品添加剂

Determination of 7 kinds of *Monascus* pigments in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Rui*, GUO Shu-Gang, ZHANG Chun-Ping, XIONG Hui-Xia, XUE Hong-Bo

(Shanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan 030000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 7 kinds of *Monascus* pigments in food by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, purified by Oasis PRiME HLB solid phase extraction column (200 mg, 6 cc), separated by Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column, and detected by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer, and quantified by matrix matching external standard method. The recovery rates of red yeast pigment in 7 kinds of matrices such as soy products, pastries, yogurt, fermented bean curd, cooked meat, beverages, and sausages was examined. **Results** In the validation, the recoveries of rubropunctamine, *Monascus* amine, monascin, rubropunctuation, ankaflavin, monascorubin and *Monascus* red in 7 kinds of matrices were 73.9%~112.1%, 70.1%~92.6%, 72.4%~103.4%, 73.8%~93.5%, 73.4%~113.3%, 71.6%~105.7%, 75.0%~112.1%, respectively, the relative standard deviations of 7 kinds of pigments were 0.2%~15.7%. The limits of detection of

基金项目: 山西省卫生健康委科研项目(2023132)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Shanxi Health Committee (2023132)

*通信作者: 张蕤, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: sxcdezhangrui@163.com

*Corresponding author: ZHANG Rui, Master, Supervisor Technician, Shanxi Center for Disease Control and Prevention, No.8, Xiaonanguan Road, Yinze District, Taiyuan 030000, China. E-mail: sxcdezhangrui@163.com

ankaflavin was 3.0 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of detection of the other 6 kinds of pigments was 1.0 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive, accurate and precise, and can be used to detect 7 kinds of monascus pigments in different substrates.

KEY WORDS: *Monascus* pigments; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food additives

0 引言

纯天然色素是指来自天然可食用原料,以适当的生物或食品加工方法生产的有机色素^[1]。据报道,天然色素中产量最大的是焦糖色素,其次就是红曲色素^[2]。红曲作为药食两用的食材,迄今已有千余年的使用历史^[3],红曲色素是在红曲霉生长代谢过程中产生,由羰基、醚键等官能团和环己烯、 γ -内酯环等结构组成的聚酮类化合物,还含有以共轭双键结构为单位的特殊共轭结构^[4],这些特殊的官能团和共轭结构使红曲色素具有降血脂^[5-6]、降血糖^[7]、抗氧化^[8]、抗阿尔兹海默症^[9]、抗癌^[10]、抗炎活性^[11]等生物活性。红曲色素作为食品中天然、绿色的着色剂,因具有生物活性在功能性食品、制药等方面有更广阔的应用前景,目前广泛应用于肉品、调味品、酿酒等食品行业^[12]。红曲霉的次级代谢产物众多,其发酵物中的桔霉素则是一种对人畜有害的真菌毒素,2024 年 3 月日本小林制药公司称,有部分消费者在使用该公司生产的含有红曲成分保健品后,出现肾脏疾病,甚至出现死亡病例^[13]。应引起人们对于红曲类产品食用安全性的关注,因此红曲色素在食品中添加存在潜在的安全隐患。

红曲色素家族成分多、各成分结构相似(目前使用较多的主要有潘红胺、红曲红胺、红曲素、红斑素、红曲黄素、红曲玉红素以及红曲红素等),但功能性差异明显^[14],主要由红、橙、黄 3 类色素组成^[15],红曲色素的检测方法主要有薄层色谱法、分光光度法、高效液相色谱法^[16-17]、液相色谱-质谱法等^[18-19]。液相色谱质谱联用仪因其灵敏度高、抗干扰性强已广泛应用于食品检测。食品样品基质复杂,常用的处理方法有固相萃取法^[20-21]和 QuEChERS 法^[22-24],Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(solid phase extraction, SPE)是在 Oasis HLB SPE 技术基础上开发的新一代反相固相萃取吸附剂,可有效吸附样品中蛋白质、色素和磷脂类等物质,无需活化、平衡及洗脱步骤,直接快速净化后即可测试,较常规 SPE 具有载量高、易操作和萃取物纯度高的优势^[25],已成功用于畜禽^[26]、水产品^[27]和乳制品^[28]等食品的快速检测分析。

GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定红曲色素可在各种食品中按生产需要适量使用。目前分离提纯的商品化红曲色素标准品已有 7 种,而现行 GB 5009.150—2016《食品安全国家标准 食品中红曲色素的测定》中仅能检测 3 种红曲色素(红曲红素、红曲素、红曲红胺),出入境行业标准 SN/T 3843—2014《出口食品

中红曲色素的测定》能检测 4 种红曲色素(增加了红曲黄素)。2020 国家卫生健康委员会发布的第 8 号公告^[29]扩大了红曲红色素使用范围,允许其在新型豆制品(大豆蛋白及其膨化食品、大豆素肉)领域按生产需求适量使用。目前在新型豆制品中关于红曲色素的检测研究鲜少报道,Oasis PRiME HLB SPE 净化技术与超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)相结合用于食品中红曲色素的检测也少有报道。

鉴于此,本研究以新型豆制品、腐乳、熟肉等作为研究对象,采用通过式 Oasis PRiME HLB 固相萃取技术净化样品基质,建立 UPLC-MS/MS 同时快速检测食品中 7 种红曲色素,为食品质量安全与风险监测工作提供全面、高效、准确的分析技术。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

60 份食品样品均购买于太原当地大型超市或农贸市场。LCMS-8060 超高效液相色谱-串联质谱仪(日本岛津有限公司);KDC-220HR 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Multi Vortex 多样品涡旋混匀器(广州得泰仪器科技有限公司);KQ-300V 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水仪(美国默克生命科学公司);Oasis PRiME HLB SPE(6 cc, 200 mg)、Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)(上海沃特世科技有限公司);Sep-Pak C_{18} 柱(500 mg, 6 cc)、Captiva EMR-Lipid 柱(600 mg, 6 cc)(中国安捷伦科技有限公司);0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)针式过滤器(上海安谱实验科技股份有限公司);SQP 万分之一天平(中国赛多利斯有限公司)。

潘红胺、红曲红胺、红曲素、红斑素、红曲黄素、红曲玉红素标准品(纯度>98%)、红曲红素标准溶液(5000 $\mu\text{g/mL}$, 北京美正检测技术有限公司);甲醇、乙腈、正己烷、甲酸(色谱纯,美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的处理及测定

豆制品、糕点、腐乳、熟肉以及腊肠样品高速均质器混匀,酸奶及饮料样品充分混匀,密封保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下。

取 2 g 样品, 加入 10 mL 乙腈涡旋混匀, 超声提取 15 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取 3 mL 上清液过 Oasis PRiME HLB SPE, 收集滤液, 取 1 mL 滤液加 1 mL 水稀释, 过 0.22 μm 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.2 液相条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相为 0.02% 甲酸水, B 相为 0.02% 甲酸乙腈; 梯度程序: 0~1.0 min, 20% A; 1.0~5.0 min, 20%~90% A; 9.0~9.1 min, 90%~20% A; 9.1~12.0 min, 20% A; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 4 μL ; 流速: 0.2 mL/min。

1.2.3 质谱条件

离子源模式: 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI) 正离子模式, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 雾化气流量: 3 L/min; 加热气流量: 10 L/min; 干燥气流量: 10 L/min; 接口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; DL 温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 加热块温度: 400 $^{\circ}\text{C}$; 质谱条件参见表 1。

1.3 数据处理

本研究前处理条件优化均为 3 次平行样品测定, 方法学验证为 6 次平行测定, 实际样品检测均为双平行测定。岛津质谱数据方法学考察数据处理采用 LabSolution 工作站, 实验检测原始数据用 Excel 2019 计算, 图形采用 Origin 2014 绘制。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化

采用 1 $\mu\text{g/mL}$ 红曲色素混合标准溶液优化 7 种化合物的质谱参数, 在正离子模式下进行全扫描, 确定 7 种化合物的母离子; 以各化合物的母离子为前体离子进行产物离子扫描, 确定 7 种物质的子离子。在确定的离子对条件下, 优化碰撞能量、 Q_1 偏差、 Q_3 偏差, 优化结果见表 1。

表 1 质谱参数
Table 1 MS parameters

化合物	母离子	子离子	Q_1 偏差	碰撞能量/eV	Q_3 偏差
潘红胺	354.0	310.3 [*]	-12	17	-16
		256.0	-11	24	-18
红曲红胺	382.1	179.2 [*]	-16	21	-13
		160.2	-22	12	-18
红曲素	358.9	215.2 [*]	-10	25	-21
		287.1	-17	19	-25
红斑素	354.9	311.2 [*]	-10	18	-16
		293.1	-12	20	-11
红曲黄素	386.9	215.0 [*]	-14	25	-10
		261.2	-17	21	-23
红曲玉红素	382.9	339.1 [*]	-14	18	-17
		321.2	-14	23	-23
红曲红素	358.9	215.1 [*]	-13	21	-21
		187.3	-13	22	-23

注: ^{*}为定量离子。

2.1.2 色谱条件的优化

红曲类色素的极性均较弱, 在 C_{18} 色谱柱上均有较好地保留, 选用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 通过梯度洗脱的方式, 各组分都有较好的保留且峰型尖锐。红曲类色素易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂, 质谱分析采用正离子模式, 本研究选取水-乙腈、甲酸水-乙腈以及甲酸水-甲酸乙腈 3 种流动相, 结果表明采用甲酸水-甲酸乙腈体系时, 7 种化合物响应最高, 且离子丰度比率较为固定。这是因为质谱分析模式为正离子模式, 微量的甲酸有助于化合物的离子化。对添加甲酸的量做了进一步的优化, 选取甲酸添加浓度为 0.01%、0.02%、0.05%、0.10%、0.20%, 对 10 ng/mL 混合标准物质进行分析, 结果表明 0.02% 甲酸水-0.02% 甲酸乙腈为流动相体系时, 7 种化合物响应最佳。因此本研究以 0.02% 甲酸水-0.02% 甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱, 分析 10 ng/mL 混合标准物质, 结果见图 1。

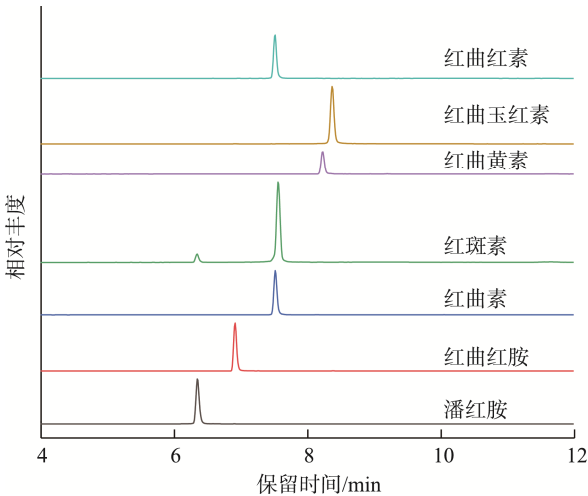


图1 7种红曲色素(10 ng/mL)的总离子流图
Fig.1 Total ion chromatogram diagram of 7 kinds of compounds (10 ng/mL)

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取液的优化

红曲色素难溶于水, 但易溶于有机试剂, GB 5009.150—2016 采用乙醇或 80%乙醇为提取液, 与其他研究^[14]采用乙腈-水(90:10, V:V, 下同)相同。因此本研究选取乙醇、乙醇-水(80:20)、乙醇-水(50:50)、乙腈、乙腈-水(80:20)、乙腈-水(50:50) 6 种体系为提取溶液, 对阴性素牛排 0.1 mg/kg 加标样品进行提取。素牛排样品中油脂含量较多, 使用乙醇-水(50:50)和乙腈-水(50:50)为提取液时, 油脂浮于提取液上层, 提取液浑浊, 使用乙醇-水(80:20)和乙腈-水(80:20)为提取液时, 油脂浮于提取液上层, 提取液浑浊有所改善, 乙腈、乙醇提取时, 油脂沉于提取液下方, 提取液澄清。采用 8000 r/min 冷冻离心 10 min 以及 5 mL

正己烷萃取处理提取液, 含有水的提取体系, 提取液依旧浑浊, 过 0.22 μm PTFE 滤膜进样分析。结果见图 2, 结果表明, 含水量为 50% 的提取体系, 7 种红曲色素回收率均小于 20%, 含水量为 20% 的提取体系, 7 种红曲色素回收率均小于 50%。采用含水提取体系时, 一些杂质也被提取出来, 溶剂的提取效率较低, 有明显的基质效应(matrix effects, ME), 影响了待测物的回收。乙醇提取时 7 种红曲色素的回收能达到 60%~80%, 乙腈提取时能达到 70%~90%, 最终选取乙腈为提取液。在对乙腈提取液分析时, 发现 7 种待测物的离子丰度比变化较大, 采用 1:1 水稀释后离子丰度比较为固定, 最终确定上机溶剂为乙腈:水(50:50)。这是因为待测物在纯有机相中离子化效率不稳定, 适量水的加入能有效提高待测物的离子化效率。

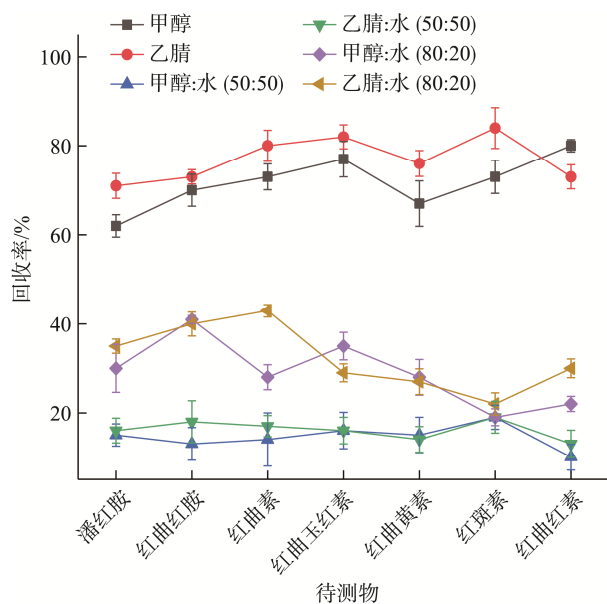


图2 不同提取溶剂下7种色素的提取效率
Fig.2 Extraction effects of 7 kinds of pigment under different extraction solvent

2.2.2 提取方式的优化

选取阴性素牛排样品, 添加 0.1 mg/kg 标准物质, 加

入 10 mL 乙腈溶液进行提取, 采用涡旋、超声提取两种方式提取 10 min, 离心取上清, 加水 1:1 (V:V) 稀释, 过 0.22 μm PTFE 滤膜进样分析。结果表明, 提取方式对提取效率的影响较小。采用超声提取样品, 提取时间分别为 10、15 和 20 min, 结果表明, 提取时间对待测物的加标回收率有影响。适当延长提取时间有利于提高提取效率, 但过多延长提取时间, 待测物回收率会降低, 这是由于长时间的振荡会导致样品内源性杂质大量溶出, 杂质干扰待测物的离子化效率, 导致 7 种红曲色素的灵敏度与准确度均有降低。因此, 确定 15 min 为最佳的提取时间。

2.2.3 净化柱的优化

食品样品中含有大量杂质, 选取了 Oasis PRiME HLB (500 mg, 6 cc)、Sep-Pak C₁₈ (500 mg, 6 cc)、Captiva EMR-Lipid (600 mg, 6 cc) SPE, 这 3 种 SPE 对去除食品杂质有较好的去除效果, 用 10 ng/mL 乙腈标准溶液对 3 种净化柱做回收率评价, 选取直通式净化方式, 3 种净化柱对 7 种红曲色素均有 90% 以上回收率。按照实验方法对红曲色素最终加标质量浓度为 10 ng/mL 的空白素牛排样品进行测定, 3 种净化柱的回收率与相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 见表 2。Captiva EMR-Lipid 净化柱对红曲红胺、红斑素和红曲玉红素的回收率较低, 潘红胺回收率偏高, 其余 3 种色素回收率在 70%~120%。PRiME HLB 和 Sep-Pak C₁₈ SPE 对素牛排样品中 7 种红曲色素回收率在 70%~120%。

选取阴性腐乳和熟肉样品, 添加 0.1 mg/kg 标准物质, 乙腈涡旋提取 15 min, 取 5 mL 提取液过 Oasis PRiME HLB 和 Sep-Pak C₁₈ 两种 SPE, 净化液加水 1:1 (V:V) 稀释后, 过 0.22 μm PTFE 滤膜进样分析, 两种基质中 7 种红曲色素的回收率与 RSDs 见表 3。腐乳样品用 Sep-Pak C₁₈ 净化后回收率在 62.9%~99.9%, Oasis PRiME HLB 净化后回收率在 65.0%~115.0%; 熟肉样品用 Sep-Pak C₁₈ 净化后回收率在 56.5%~144.7%, Oasis PRiME HLB 净化后回收率在 62.2%~126.0%, 两种净化柱对样品的净化效果都不理想, 但 Oasis PRiME HLB 净化效果略优于 Sep-Pak C₁₈ 净化柱, 最终确定采用 Oasis PRiME HLB 净化柱。由于这两种样品基质较为复杂, 可能是 ME 引起的回收率较差。

表 2 3 种净化柱的加标回收实验结果(%)
Table 2 Results of spike recovery experiments for the 3 kinds of purification columns (%)

不同净化柱	潘红胺		红曲红胺		红曲素		红斑素		红曲黄素		红曲玉红素		红曲红素	
	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs
Oasis PRiME HLB	92.9	2.4	98.3	2.9	99.3	3.3	79.8	4.0	105.7	4.4	89.8	3.6	77.8	0.9
Sep-Pak C ₁₈	71.5	3.7	70.3	3.0	97.2	1.9	82.9	3.5	101.1	3.1	95.3	3.0	90.9	2.2
Captiva EMR-Lipid	128.3	2.3	59.8	2.7	89.3	1.5	28.2	2.6	85.3	2.5	30.1	1.1	100.2	3.4

表 3 2 种净化柱的加标回收实验结果(%)
Table 3 Results of spike recovery experiments for the 2 kinds of purification columns (%)

样品	SPE 柱	潘红胺		红曲红胺		红曲素		红斑素		红曲黄素		红曲玉红素		红曲红素	
		回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs
腐乳	Sep-Pak C ₁₈	94.4	5.7	99.9	4.6	97.6	3.1	62.9	2.2	78.9	0.9	63.1	7.2	92.3	1.8
	Oasis PRiME HLB	102.8	3.1	93.1	0.3	115.0	2.9	65.0	6.1	95.2	2.1	87.0	3.9	107.8	1.1
熟肉	Sep-Pak C ₁₈	144.7	2.0	65.8	1.8	97.2	5.5	56.5	4.8	82.9	2.7	82.9	2.6	80.6	4.4
	Oasis PRiME HLB	126.0	1.3	90.0	4.2	119.0	3.1	62.2	3.5	114.1	3.4	79.0	1.7	109.7	2.5

2.3 基质效应

选择 7 种阴性代表性基质(素牛排、腐乳、熟肉、酸奶、糕点、果汁饮料和腊肠)样品,按 1.2.1 方法处理,获得空白基质液,用此空白基质液配制标准溶液,同时用乙腈-水(50:50, *V/V*)溶液为溶剂配制标准溶液并进行分析,评价不同样品基对待测物响应值的影响。采用 NATALIA 等^[30]报道的 ME 评价方法,评价不同样品基对待测物响应值的影响。ME 计算公式: $ME/\%=[\text{基质匹配标准曲线的斜率}/\text{溶液标准曲线的斜率}-1]\times 100\%$ 。当 ME 为正值时,为基质增强效应;当 ME 为负值时,为抑制效应。以 $|ME|>50\%$ 为强基质效应, $20\%<|ME|<50\%$ 为中等基质效应, $|ME|<20\%$ 为弱基质效应作为评价依据。由图 3 可知素牛排样品为弱基质效应,其余 6 种样品的 ME 明显。

对 7 种样品作加标回收实验(加标浓度 20 μg/kg),用溶剂标准曲线得出实测含量,同时计算加标回收率,结果如图 4A 所示,素牛排样品的回收范围在 77.8%~105.7%,

腐乳 65.3%~115.4%,其余样品都有部分待测物回收率明显偏高,都超过了 120%,有明显的基质增强效应。采用基质匹配标准曲线对加标后的结果进行计算,回收率结果如

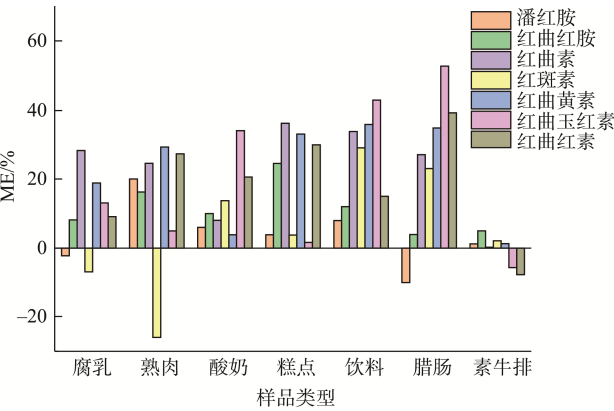
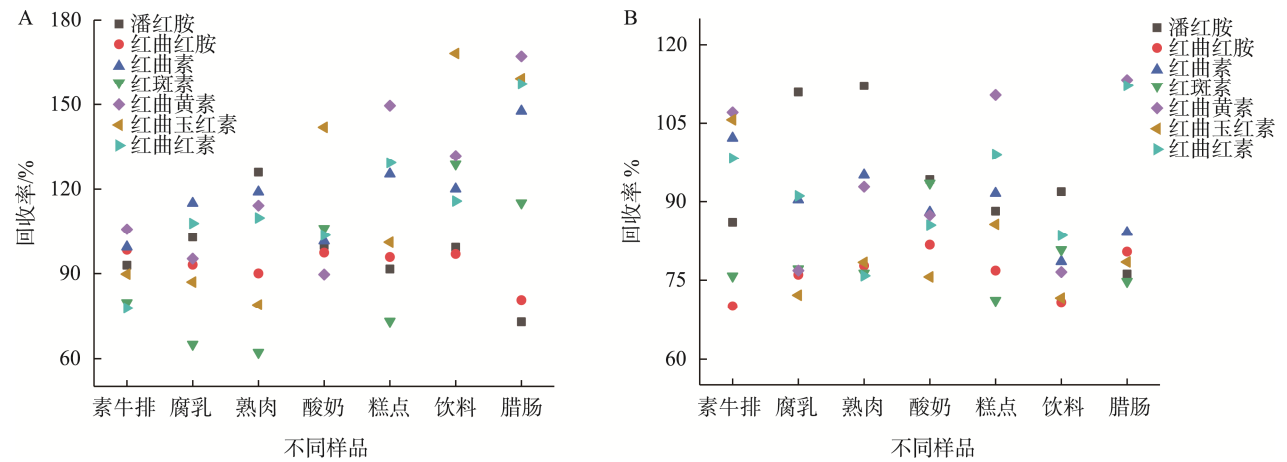


图3 不同样品的ME
Fig.3 Matrix effects of different sample



注: A: 溶剂标准曲线; B: 基质匹配标准曲线。

图4 ME对不同样品加标回收率的影响
Fig.4 Effects of matrix effects on the extraction recovery of different sample

图 4B 所示,采用溶剂匹配的标准曲线校正之后的回收率有明显改善,都能达到回收率在 70%~120%之间,最终确定采用基质匹配的标准曲线定量。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围和检出限

在本研究确定的实验条件下,以乙腈-水(50:50, V:V)配制 7 种待测物质量浓度为 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 标准系列点,以标准溶液质量浓度为横坐标(X , ng/mL),峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,7 种红曲色素的线性方程、相关系数(r)、线性范围如表 4,7 种待测药物的标准曲线在线性范围内均具有良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.999。按照 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》规范,以 ME 最强的样品基质为基准,7 种待测药物以信噪比法确定检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),7 种待测药物 LODs 为 1.0~3.0 $\mu\text{g/kg}$, LOQs 为 3.0~10.0 $\mu\text{g/kg}$ 。表明该方法线性范围宽,线性良好,检出限低,灵敏度高。

2.4.2 准确度和精密度

考察 7 种样品(素牛排、腐乳、熟肉、酸奶、糕点、果汁饮料和腊肠)加标回收率和精密度。称取 2 g 空白样品,分别添加低(10 $\mu\text{g/kg}$)、中(20 $\mu\text{g/kg}$)、高(80 $\mu\text{g/kg}$)浓度水

平混合标准品,待样品混匀后,按 1.2.1 节方法处理样品,每个样品重复测定 6 次,计算方法的平均回收率和 RSD。结果见表 5,7 种基质中潘红胺的加标回收率 73.9%~112.1%,红曲红胺的回收率 70.1%~92.6%,红曲素的回收率 72.4%~103.4%,红斑素的回收率 73.8%~93.5%,红曲黄素的回收率 73.4%~113.3%,红曲玉红素的回收率 71.6%~105.7%,红曲红素的回收率 75.0%~112.1%,7 种色素的 RSDs 为 0.2%~15.7%。表明该方法精密度高,准确性好。

2.4.3 样品的检测

采用 UPLC-MS/MS 检测 20 份辣条、5 份腐乳、15 份熟肉、10 份豆制品、5 份酸奶以及 5 份饮料中 7 种红曲色素。实验结果表明,豆制品、酸奶以及饮料中 7 种色素均未检出,辣条和熟肉中部分样品检出 3 种色素,红腐乳样品均检出 5 种色素,检测结果见表 6。检测发现几类食品的检出率有显著差异,红腐乳检出率最高,辣条以及熟肉制品的检出率明显高于其他类食品,腐乳中同时检测出 5 种红曲色素。红曲色素在食品中添加存在潜在的安全隐患,而 GB 2760—2014 只对红曲素以及红曲黄素做了部分规定,对多数食品中其他红曲色素的最大使用量没有做明确规定,对文中已检出的红斑素以及红曲玉红素无适用范围以及使用限量,值得引起关注。

表 4 7 种红曲色素的线性方程、检出限与定量限
Table 4 Linear equations, limits of detection and limits of quantitation of 7 kinds of *Monascus* pigments

色素	回归方程	线性范围/(ng/mL)		相关系数(r)	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
潘红胺	$Y=114006X-11688.3$	1~100		0.9999	1.0	3.0
红曲红胺	$Y=94934.1X+15129.3$	1~100		0.9993	1.0	3.0
红曲素	$Y=58912.7X+16763.4$	1~100		0.9998	1.0	3.0
红斑素	$Y=252289X-96391.3$	1~100		0.9996	1.0	3.0
红曲黄素	$Y=24211.6X+30435.8$	1~100		0.9992	3.0	10.0
红曲玉红素	$Y=183992X-18553.2$	1~100		0.9998	1.0	3.0
红曲红素	$Y=76413.7X+28854.9$	1~100		0.9996	1.0	3.0

表 5 实际样品的加标回收实验结果(%)
Table 5 Results of spike recovery experiments of actual samples (%)

基质样品	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	潘红胺		红曲红胺		红曲素		红斑素		红曲黄素		红曲玉红素		红曲红素	
		回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs
素牛排	10	76.3	9.5	72.4	6.7	98.7	10.4	73.8	8.6	83.7	0.2	86.7	2.2	80.7	5.4
	20	86.1	6.6	70.1	12.0	102.2	6.3	75.8	6.5	107.1	5.8	105.7	6.3	98.4	10.6
	80	88.2	4.3	80.9	5.9	103.4	5.8	86.9	4.8	104.8	1.4	95.7	5.7	90.3	11.8
腐乳	10	108.6	7.3	70.8	10.2	83.4	8.2	74.9	9.2	80.4	8.9	76.3	13.5	75.0	7.4
	20	110.9	6.3	76.0	8.2	90.3	6.0	77.1	12.0	76.8	3.6	72.2	10.8	91.1	14.9
	80	105.2	4.4	79.6	5.4	92.1	0.9	83.4	8.7	83.2	6.8	77.5	5.0	105.4	2.1

表 4(续)

基质样品	加标浓度 (μg/kg)	潘红胺		红曲红胺		红曲素		红斑素		红曲黄素		红曲玉红素		红曲红素	
		回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs
熟肉	10	109.3	12.5	73.9	12.8	91.7	12.2	80.3	3.2	96.1	14.4	80.1	9.8	80.1	15.7
	20	112.1	4.1	77.7	12.5	95.1	4.5	76.3	9.8	92.8	12.1	78.3	11.8	75.8	6.0
	80	95.7	7.3	83.4	5.8	89.3	11.5	82.5	4.6	100.7	9.4	96.3	6.6	79.1	9.6
酸奶	10	88.3	10.6	86.7	13.8	72.4	6.7	89.7	15.7	79.0	8.4	73.8	9.7	93.7	8.4
	20	94.2	3.2	81.7	3.4	88.0	13.3	93.5	9.3	87.4	3.8	75.6	8.7	85.5	9.8
	80	95.7	5.0	92.6	6.9	84.7	9.5	92.2	5.8	86.4	4.6	80.4	2.3	103.2	7.7
糕点	10	76.9	8.7	74.8	9.7	79.8	6.1	76.8	13.9	109.8	11.6	83.4	7.1	88.6	9.4
	20	88.2	4.4	76.8	5.8	91.6	5.8	77.2	11.4	110.3	7.1	85.7	8.4	99.1	8.1
	80	92.1	2.2	85.5	4.1	86.7	1.2	81.6	5.1	106.4	2.7	92.5	5.5	86.7	2.1
饮料	10	88.3	10.3	73.6	9.2	80.7	8.5	83.7	6.7	77.8	9.5	73.5	10.6	77.4	6.4
	20	91.9	5.9	70.8	7.6	78.5	7.0	80.7	10.7	76.5	7.7	71.6	7.8	83.5	1.7
	80	90.7	6.7	79.4	5.5	81.3	3.4	90.2	6.1	73.4	3.0	79.4	3.1	76.8	0.6
腊肠	10	73.9	9.8	82.1	13.7	79.8	6.6	75.9	14.9	109.7	11.6	81.5	4.9	108.4	5.9
	20	76.2	1.7	80.4	7.5	84.1	3.8	74.8	3.0	113.3	14.0	78.4	2.3	112.1	7.6
	80	80.3	3.6	88.9	3.4	90.3	4.5	80.5	0.9	103.7	9.9	88.6	0.8	103.6	3.5

表 6 样品的检出率以及浓度范围
Table 6 Detection rates and concentration ranges of the samples

		红曲素	红斑素	红曲黄素	红曲玉红素	红曲红素
辣条	检出率/%	75	—	30	—	30
	浓度/(μg/kg)	3.55~61.7	—	10.10~22.70	—	8.10~53.0
红腐乳	检出率/%	100	100	100	100	100
	浓度/(mg/kg)	0.44~1.51	0.0479~0.0603	1.10~4.60	0.083~0.141	0.386~1.45
熟肉	检出率/%	26.6	—	46.6	—	46.6
	浓度/(μg/kg)	6.15~31.0	—	17.40~35.30	—	2.21~23.20

注: —为未检出该种化合物。

3 结 论

本研究采用 Oasis PRiME HLB SPE 净化, 建立了 UPLC-MS/MS 同时测定食品中 7 种红曲色素的分析方法, 该方法简单快速, 抗干扰能力强, 灵敏度高, 回收率高且精密度良好, 采用基质匹配的标准曲线定量, 可检测不同基质中的 7 种红曲色素, 检出限满足国内添加剂使用量的要求, 较现行的 GB 5009.150—2016 新增了胺、红斑素, 红曲玉红素和红曲黄素 4 种目标化合物。本研究结果可以为国内红曲色素添加剂的研究提供参考。

参考文献

[1] 刘青青, 任剑波, 刘向阳, 等. 浅谈色素红曲的应用及其发展[J]. 酿酒科技, 2015, 8: 79–82.
LIU QQ, REN JB, LIU XY, *et al.* Application and development of *Monascus* pigment [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2015, 8: 79–82.

[2] 赵燕, 温辉梁, 胡晓波. 红曲色素及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 4: 90–93.
ZHAO Y, WEN HL, HU XB. *Monascus* pigments and its application in food industry [J]. China Food Addit, 2004, 4: 90–93.

[3] AGBOYIBOR C, KONG WB, CHEN D, *et al.* *Monascus* pigments

- production, composition, bioactivity and its application: A review [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2018, 16: 433–477.
- [4] 杨洋, 陈冬, 达文燕, 等. 红曲、红曲霉和红曲色素[J]. 生物学通报, 2017, 52(7): 1–3.
- YANG Y, CHEN D, DA WY, *et al.* Hongqu, *Monascus* and *Monascus* pigments [J]. Bull Biol, 2017, 52(7): 1–3.
- [5] ZHOU WB, GUO RL, GUO W, *et al.* *Monascus* yellow, red and orange pigments from red yeast rice ameliorate lipid metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis in Wistar rats fed on a high-fat diet [J]. Food Funct, 2019, 10(2): 1073–1084.
- [6] LEE CL, WEN JY, HSU YW, *et al.* The blood lipid regulation of *Monascus*-produced monascin and ankaflavin via the suppression of low-density lipoprotein cholesterol assembly and stimulation of apolipoprotein A₁ expression in the liver [J]. J Microbiol Immunol, 2018, 51(1): 27–37.
- [7] HSU WH, PAN TM. A novel PPAR gamma agonist monascin's potential application in diabetes prevention [J]. Food Funct, 2014, 5(7): 1334–1340.
- [8] 陈琴, 王顺, 周坚, 等. 红曲色素的抗氧化活性及对 HepG2 氧化损伤的保护作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 58–65.
- CHEN Q, WANG S, ZHOU J, *et al.* Study on antioxidant activity of monascus pigments and its protective effects on oxidative damage of HepG2 [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 58–65.
- [9] ZHENG YQ, PAN QH, MO LD, *et al.* *Monascus* pigment rubropunc-tatin derivative FZUH reduces A β (1-42)-induced neurotoxicity in Neuro-2A cells [J]. RSC Adv, 2018, 8: 17389–17398.
- [10] CHAUDHARY V, KATYAL P, PANWAR H, *et al.* Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer properties of the red biopigment extract from *monascus purpureus* [J]. J Food Biochem, 2024, 57: 103523.
- [11] 毛禹清, 高坤辉, 刘曾丽, 等. 红曲黄色素对 LPS 诱导的 THP-1 细胞和 RAW264.7 细胞炎症的影响[J/OL]. 食品与发酵工业, 1-9. [2024-07-18]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.039836>
- MAO YQ, GAO KH, LIU ZL, *et al.* Effects of monascus azaphilone yellow pigments on LPS-induced inflammation in THP-1 cells and RAW264.7 cells [J/OL]. Food Ferment Ind, 1–9. [2024-07-18]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.039836>
- [12] 孙婷, 王峰. 红曲色素在食品中的应用[J]. 农产品加工, 2019, 9: 70–72.
- SUN T, WANG F. Application of monascus pigment in food [J]. Farm Prod Process, 2019, 9: 70–72.
- [13] 徐晓语. “红曲风波”震动日本功能性食品行业[N]. 解放日报, 2024-04-22(008).
- XU XY. “Red yeast Storm” shook Japan functional food industry [N]. Liberation Daily, 2024-04-22(008).
- [14] 玛合沙提·努尔江, 包天雨, 张添琪, 等. 红曲色素的生物活性及其作用机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 6: 1–12.
- MAHESHATI NERJ, BAO TY, ZHANG TQ, *et al.* Advance in research on the biological activity and action mechanism of *Monascus* pigment [J]. Food Ferment Ind, 2022, 6: 1–12.
- [15] LIU LJ, WU S, WANG W, *et al.* Sulfonation of *Monascus* pigments to produce water-soluble yellow pigments [J]. Dyes Pigm, 2020, 173: 107965.
- [16] 王思缘, 段鹏雪. 全自动固相萃取-高效液相色谱法测定食品中红曲色素[J]. 食品安全导刊, 2023, 4: 87–89.
- WANG SY, DUAN PX. Determination of monascus pigment in food by automatic solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. China Food Saf Magaz, 2023, 4: 87–89.
- [17] HUANG ZB, ZHANG SY, XU Y, *et al.* Development of an HPLC-UV detection method for the simultaneous determination of two *Monascus* pigments in red yeast rice [J]. Food Anal Method, 2016, 9(1): 148–155.
- [18] 王震. 液相色谱-质谱/质谱串联法测定番茄酱中六种红曲色素[J]. 现代食品, 2022, 15: 198–203.
- WANG Z. Determination of six monascus pigments in tomato paste by LC-MS/MS [J]. Mod Food, 2022, 15: 198–203.
- [19] WU CL, KUO YH, LEE CL, *et al.* Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascin, ankaflavin, and the lactone and acid for monacolin K in the red mold rice [J]. J AOAC Int, 2011, 94(1): 179–190.
- [20] SHIZUKA S, KOUJI S, JUMPEI N, *et al.* Determination of total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine tissues and eel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using external calibration [J]. J Chromatogr B, 2017, 1109(1): 37.
- [21] 石梦涵, 邢骞文, 武晓琦, 等. 磁性固相萃取前处理-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中阿维菌素类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 227–234.
- SHI MH, XING SW, WU XQ, *et al.* Determination of residues of avermectins in milk by magnetic solid phase extraction pre-treatment coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 227–234.
- [22] LIU YT, DONG J, YANG QH, *et al.* Determination of niclosamide and amphenicols residues in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-HESI/MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(8): 955.
- [23] 夏宝林, 张亚清, 殷晶晶, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定枸杞子中 65 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(1): 110–111.
- XIA BL, ZHANG YQ, YIN JJ, *et al.* Simultaneous determination of 65 kinds of pesticide residues in Lycium barbarum by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(1): 110–111.
- [24] 沈洁, 戴尽波. QuEChERS-超高效液相色谱-质谱法同时测定豆芽中 9 种氟唑诺酮类药物和植物生长调节剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 259–268.
- SHEN J, DAI JB. Simultaneous determination of 9 kinds of

- fluoroquinolones and plant growth regulators in bean sprouts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(12): 259–268.
- [25] 张丹, 刘柏林, 赵紫薇, 等. PRiME HLB 柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定果蔬制品中 5 种新型真菌毒素[J]. *分析化学*, 2023, 51(8): 1343–1352.
- ZHANG D, LIU BL, ZHAO ZW, *et al*. Rapid determination of five kinds of emerging mycotoxins in fruit and vegetable products by PRiME HLB purification coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2023, 51(8): 1343–1352.
- [26] BIAN H, QIN Y, YU CH, *et al*. Simultaneous determination of 120 veterinary antibiotics in meat by combined pretreatment system coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(2): 162.
- [27] JU LY, LI ZJ, WANG J, *et al*. Rapid screening of 28 pesticides endocrine disruptors in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2017, 36(12): 1445.
- [28] MORENO-GONZÁLEZ D, HAMED AM, GILBERT-LÓPEZ B, *et al*. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis quadrupole time of flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1510(6): 100.
- [29] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委员会公告 2020 年第 8 号 [EB/OL]. [2020-11-11]. [www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id= \[2024-05-12\]](http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id= [2024-05-12]).
- National Health Commission. National Health Commission Announcement No.8, 2020 [EB/OL]. [2020-11-11]. [www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id= \[2024-05-12\]](http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id= [2024-05-12]).
- [30] NATALIA B, VERÓNICA C, HORACIO H, *et al*. Matrix effects and interferences of different citrus fruits co-extractives in2 pesticide residue analysis using ultra high-performance liquid3 chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(23): 4819–4829.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介

张 蕤, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: sxcdczhangrui@163.com