

固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定食品中 8 种禁用色素

胡江涛¹, 何成艳², 刘兴睿¹, 俞凌云¹, 于刚¹, 薛康¹

(1. 成都海关技术中心, 食品安全检测四川省重点实验室, 四川成都 610041; 2. 成都中医药大学, 四川成都 611137)

摘要 [目的] 建立固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定食品中 8 种禁用色素(碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、罗丹明 B、罗丹明 6G、分散红 1、柑桔红 2)。[方法] 样品经乙酸铵和甲醇提取, 经固相萃取柱净化, 用液相串联质谱测定。测定 8 种禁用色素同时进行了液相色谱条件及质谱条件的优化, 选择最佳条件进行测定, 优化的条件下进行测定每种色素, 计算出浓度。重复测定 5 次, 计算方法精密度。[结果] 碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、罗丹明 B、罗丹明 6G、分散红 1 和柑桔红 2 的精密度分别为 4.79%、5.82%、5.13%、4.88%、3.09%、4.38%、4.60%、5.30%。[结论] 选择最佳条件后, 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱检测方法能有效地检测出食品中 8 种禁用色素, 满足工业检测要求。

关键词 食品; 禁用色素; 测定; 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法

中图分类号 TS 207.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)01-0204-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.061



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Simultaneous Determination of Eight Banned Pigments in Food by Solid Phase Extraction-Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

HU Jiang-tao¹, HE Cheng-yan², LIU Xing-rui¹ et al (1. Technical Center of Chengdu Customs, Food Safety Detection Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610041; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of eight banned pigments in foods (basic orange 2, auramine O, basic orange 21, basic orange 22, rhodamine B, rhodamine 6G, disperse red 1, citrus red 2). [Method] The sample was extracted with ammonium acetate and methanol, purified by a solid phase extraction column, and determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Eight kinds of banned pigments were measured, and liquid chromatography conditions and mass spectrometry conditions were optimized. The optimum conditions were selected for measurement, and each pigment was measured under optimized conditions to calculate the concentration. Repeat the measurement 5 times to calculate the precision of the method. [Result] The precision of basic orange 2, auramine O; basic orange 21, basic orange 22, rhodamine B, rhodamine 6G, disperse red 1 citrus red 2 were 4.79%, 5.82%, 5.13%, 4.88%, 3.09%, 4.38%, 4.60%, 5.30%, respectively. [Conclusion] After selecting the optimum conditions, the solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method can effectively detect 8 kinds of banned pigments in foods and meet the industrial testing requirements.

Key words Food; Banned pigment; Detection; Solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method

洪红等^[1]研究发现,在辣椒制成的调味品、有色彩的水果酱类、熟食及腌制肉制品、饮料及果酒类、谷类食品、坚果类食品及家禽产品中易添加工业色素,因此这些类别食品为重点检测对象。郑小严^[2]研究发现,碱性橙类、碱性嫩黄 O 等易在中性及偏碱性条件下与蛋白质吸附,不易褪色,并对消费者健康造成极大伤害具有致癌、致畸作用。根据阮成旭等^[3]的研究,罗丹明 B 对人体具有极大危害,长期食用会导致死亡。因此需要一个能够准确快速检测出食品中违禁色素的方法,来保证食品行业安全。目前食品中色素的检测方法多种多样,如薄层色谱法、分光光度法、极谱法、液相色谱法、气相色谱法、液相色谱质谱联用、免疫学方法、红外光谱、拉曼光谱法等^[4-10],各有各的优点及缺点,食品检验检测机构一般运用液相色谱质谱联用方法,因为此方法满足准确度、灵敏度要求,并且适用大批量检测。笔者选择以固相萃取为净化样品配合超高效液相色谱串联质谱法检测食品中 8 种禁用色素的方法。

1 材料与方法

1.1 试验原理 食品中 8 种禁用色素(碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、罗丹明 B、罗丹明 6G、分散红 1、柑桔红 2)先后经 50 mmol/L 乙酸铵溶液和甲醇提取,经 Oasis HLB 固相萃取柱净化后,用液相色谱串联质谱法测定,外标法定量。

1.2 试剂与材料 除另有说明外,该方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水;乙腈、甲醇、甲酸、氨水、乙酸铵(色谱纯);Oasis HLB 固相萃取柱;8 种禁用色素标准品:碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、罗丹明 B、罗丹明 6G、分散红 1、柑桔红 2,纯度均大于等于 90%。

1.3 仪器和设备 高效液相色谱串联质谱仪(三重四极杆串联质谱,配有电喷雾离子源);分析天平;具塞离心管;涡旋混合器;超声波清洗器;离心机;组织捣碎机;氮吹仪。

1.4 测定步骤

1.4.1 样品前处理方法。

1.4.1.1 提取。称取 2.0 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 50 mmol/L 乙酸铵溶液 10 mL,涡旋混匀,超声提取 30 min,以 10 000 r/min 的速度离心,收集上清液;再向残渣中加入 10 mL 甲醇,涡旋混匀,超声提取 30 min,以 10 000 r/min 的速度离心,收集上清液。合并 2 次

基金项目 四川省科技项目(2017SZ0091);四川出入境检验检疫局科技项目(SK201708)。

作者简介 胡江涛(1974—),男,四川遂宁人,高级工程师,硕士,从事食品理化检验研究。

收稿日期 2019-07-01; **修回日期** 2019-07-25

上清液,混匀,待净化。

1.4.1.2 净化。准确移取 2.0 mL 上述提取液,在 40 °C 下经 N₂ 吹干后,用 2% 乙腈水溶液 3.0 mL 溶解残渣,待上柱。分别用 3.0 mL 甲醇和水活化 Oasis HLB 固相萃取柱,上样,控制样品过柱速度为 30 滴/min。依次用 3.0 mL 5% 氨水-乙腈溶液、1.0 mL 乙腈进行洗脱。收集洗脱液,待浓缩。

1.4.1.3 浓缩。收集上述洗脱液,在 40 °C 下经 N₂ 吹干后,用 0.1% 甲酸+甲醇溶液(70+30, V/V) 溶解定容至 1.0 mL,混匀,待进样分析。

1.4.2 仪器分析条件。

1.4.2.1 液相色谱分离条件。色谱柱:Eclipse XDB C₁₈ 柱, 150 mm×4.6 mm, 5 μm;柱温 30 °C;进样量 10 L;流速 0.2 mL/min;流动相:甲醇:0.1% 甲酸水溶液=3:7,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Programme of gradient elution

时间 Time//min	流速 Flow rate mL/min	甲醇(A) Methanol (A) %	0.1%甲酸溶液(B) 0.1% formic acid solution (B) //%
0.01	0.2	30	70
6.00	0.2	95	5
10.00	0.2	100	0
11.00	0.2	100	0
11.10	0.2	30	70
16.00	0.2	30	70

1.4.2.2 质谱分析条件。离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);质谱参考条件:电喷雾电压 5 500 V;雾化器压力 413.69 kPa;气帘气压力 103.42 kPa;碰撞气压力 41.37 kPa;离子源温度 550 °C。

1.4.3 液相色谱串联质谱测定。根据样液中待测物的含量,选定浓度相近的标准工作溶液一起进行色谱分析。待测样液中 8 种禁用色素的响应值均应在仪器检测的线性范围

内。对标准工作溶液及样液等体积参插进样测定。

1.4.4 定性检测。按照上述条件测定样品和标准品,样品中待测物色谱峰保留时间与标准品对应的保留时间偏差应一致,允许偏差小于±2.5%;并且在扣除背景后的样品谱图中,各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,相对离子丰度>50%的最大允许误差不超过±20%;>20%~50%不超过±25%;>10%~20%不超过±30%,最大不超过±50%;≤10%不超过±50%,则可判断样品中存在对应的被测物。

1.5 空白试验 除不加试样外,均按“1.4”测定步骤进行。

1.6 结果计算和表述 用 LC-MS/MS 的数据处理软件或按下式(1)计算试样中 8 种禁用色素的含量,计算结果应扣除空白值。

$$X = \frac{A \times c \times V}{A_s \times m} \quad (1)$$

式中,X 为试样中色素含量(μg/kg);A 为样液中色素的峰面积;c 为标准工作溶液中色素的浓度(ng/mL);V 为样品溶液最终定容体积(mL);A_s 标准工作溶液中色素的峰面积;m 为样品溶液所代表最终试样的质量(g)。

2 结果与分析

2.1 检测离子对的选择及其质谱条件的优化 用甲醇-0.1%甲酸(3:7, V/V) 配制浓度为 1.0 μg/mL 的 8 种禁用色素标准溶液,采用注射器泵的输注方式直接将混标溶液(1.0 μg/mL) 分别以 10.0 μL/min 的流速输入质谱,进行离子对选择试验。该试验采用的离子源是 ESI 离子源,它兼具使化合物软性电离和液相色谱与质谱接口的作用。

检测 8 种被测物质的质谱条件见表 2。每对 MRM 离子对的去簇电压(DP)与碰撞电压(CE)通过观察改变这 2 个参数对信号丰度的影响以反复优化,选择能产生丰度高的 MRM 信号的 DP、CE 值作为检测条件。以信号强度最高的 MRM 监测离子对作为定量离子,次强的作为定性离子。各物质的 Q3 扫描图见图 1。

表 2 8 种禁用色素的检测离子对及相关参数

Table 2 Detection ion pairs and related parameters of 8 banned pigments

待测物 Determinand	母离子 Parent ion(Q1, m/z)	子离子 Daughter ion(Q3, m/z)	去簇电压(DP) V	碰撞电压(CE) V
碱性橙 2 Basic orange 2	213.0	213.0>77.0	110	30
		213.0>121.2	110	30
		213.0>95.2	110	30
碱性嫩黄 O Auramine O	268.7	268.0>148.2	90	40
		268.0>253.4	90	45
碱性橙 21 Basic orange 21	315.1	315.0>285.2	90	42
		315.0>300.2	90	33
碱性橙 22 Basic orange 22	391.9	391.0>362.3	95	39
		391.0>377.3	95	47
罗丹明 B Rhodamine B	443.4	443.0>399.2	80	56
		443.0>355.2	80	77
罗丹明 6G Rhodamine 6G	444.0	444.0>416.4	80	47
		444.0>387.3	80	56
分散红 1 Disperse red 1	315.1	315.0>134.0	80	25
		315.0>255.1	80	30
柑桔红 2 Citrus red 2	309.1	309.0>153.2	80	22
		309.0>278.2	80	17

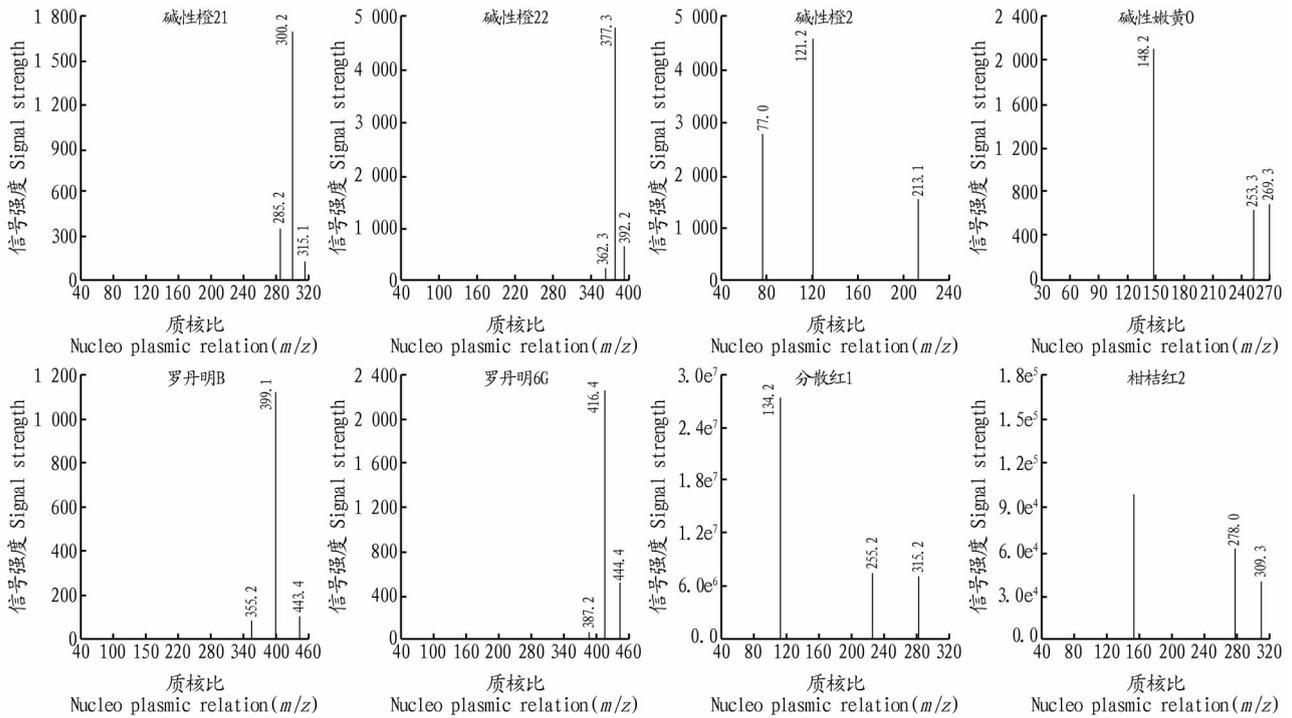


图1 8种待测物质的Q3子离子扫描图

Fig. 1 Q3 ion scan of 8 kinds of test substances

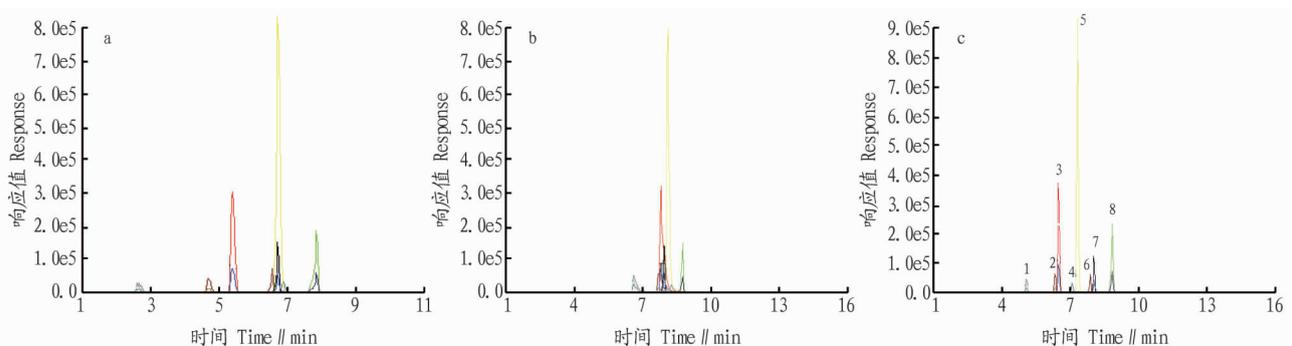
之后继续优化质谱离子源的其他参数。这些参数大多不能针对单个离子进行优化,其中重要的参数包括CUR、Gas1、Gas2、IS、TEM,故通过质谱仪自带软件对其进行优化,优化结果为气帘气CUR:103.42 kPa,雾化气Gas1:413.69 kPa,辅助气Gas2:482.63 kPa,电喷雾电压IS:5500 V,源温度TEM:550℃,碰撞气入口电压EP:12.00 V,碰撞气出口电压CXP:12.00 V。

2.2 液相条件的优化与选择

2.2.1 色谱柱的选择。试验考察了CAPCELL PAK-C₁₈ (150 mm×2.0 mm, 5 μm)和Eclipse XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)2种色谱柱对8种禁用色素的分离效果,结果发现8种待测组分由Agilent SB-C₁₈色谱柱分离时,无论是

峰形还是灵敏度均要优于Eclipse XDB C₁₈色谱柱。因此该试验选用Eclipse XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行分离。

2.2.2 流动相的优化。常用的流动相是甲醇和乙腈,由于采用正离子模式,流动相中水相的选择多用水、甲酸、乙酸等。该试验比较了乙腈-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液、甲醇-水、乙腈-水对8种违禁色素分离的影响,结果表明,甲醇-0.1%甲酸溶液的流动相体系优于其他体系,结果见图2。当采用乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相时,8种待测成分不能同时实现完全分离,且柑桔红峰形不好。当采用甲醇-水作为流动相时,待测组分分离不好,因此最终确立了甲醇-0.1%甲酸溶液作为流动相。



注:a.流动相为乙腈-0.1%甲酸;b.流动相为甲醇-水;c.流动相为甲醇-0.1%甲酸。1.碱性橙2;2.碱性嫩黄0;3.碱性橙21;4.碱性橙22;5.罗丹明B;6.罗丹明6G;7.分散红1;8.柑桔红2

Note:a. The mobile phase is acetonitrile - 0.1% formic acid;b. The mobile phase is methanol-water;c. The mobile phase is methanol - 0.1% formic acid. 1. Basic orange 2;2. Auramine O;3. Basic orange 21;4. Basic orange 22;5. Rhodamine B;6. Rhodamine 6G;7. Disperse red 1;8. Citrus red 2.

图2 不同流动相组成的色谱图

Fig. 2 The chromatogram for different mobile phase

流动相的组成和比例不同也会影响待测物的分离效果。该试验通过多次调整甲醇和 0.1% 甲酸的比例对洗脱条件进行了优化。在固定其他液相色谱条件的基础上,探索多个梯度洗脱程序对分离结果的影响,最终确立的梯度分析程序如表 3 所示。

表 3 8 种禁用色素测定的梯度洗脱程序

Table 3 The gradient elution program for the detection of eight banned pigments

时间 Time min	流速 Flow rate mL/min	甲醇 A Methanol A %	0.1% 甲酸溶液 B 0.1% Formic acid B %
0.01	0.2	30	70
6.00	0.2	95	5
10.00	0.2	100	0
11.00	0.2	100	0
11.10	0.2	30	70
16.00	0.2	30	70

表 4 方法的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 The linear ranges, regression equations, correlation coefficients, detection limits and limits of quantification of this method

色素 Pigment	线性范围 Linear ranges $\mu\text{g/mL}$	回归方程 Regression equations	相关系数 Correlation coefficients (r)	检出限 Detection limits $\mu\text{g/L}$	定量限 Limits of quantification mg/kg
碱性橙 2 Basic orange 2	0.5~100.0	$y = 1\ 142.5x - 362.2$	0.999 8	29.6	0.098
碱性嫩黄 O Auramine O	0.5~100.0	$y = 422.4x - 104.3$	0.999 9	75.1	0.250
碱性橙 21 Basic orange 21	0.5~100.0	$y = 615.6x - 174.9$	0.999 7	56.9	0.190
碱性橙 22 Basic orange 22	0.5~50.0	$y = 1\ 038.1x - 200.9$	0.999 9	29.5	0.098
罗丹明 B Rhodamine B	0.5~50.0	$y = 1\ 009.5x - 310.2$	0.999 7	35.0	0.120
罗丹明 6G Rhodamine 6G	0.5~100.0	$y = 1\ 254.0x - 354.8$	0.999 7	28.0	0.093
分散红 1 Disperse red 1	0.5~100.0	$y = 1\ 078.2x - 367.5$	0.999 9	31.5	0.100
柑桔红 2 Citrus red 2	0.5~100.0	$y = 1\ 433.1x - 347.0$	0.999 9	25.1	0.083

表 5 方法的回收率

Table 5 Recoveries of the method

色素 Pigment	加标回收率 Adding standard recovery			加标回收率的相对标准偏差 Relative standard deviation of adding standard recovery
	低浓度 Low concentration	中浓度 Medium concentration	高浓度 High concentration	
碱性橙 2 Basic orange 2	101.0	101.0	98.4	1.50
碱性嫩黄 O Auramine O	101.0	104.0	110.0	4.36
碱性橙 21 Basic orange 21	97.8	93.3	100.0	3.52
碱性橙 22 Basic orange 22	107.0	108.0	110.0	1.41
罗丹明 B Rhodamine B	98.6	106.0	96.6	4.93
罗丹明 6G Rhodamine 6G	92.0	94.6	97.0	2.65
分散红 1 Disperse red 1	101.0	103.0	104.0	1.49
柑桔红 2 Citrus red 2	95.6	90.4	91.6	2.94

3 结论与讨论

针对 8 种食品中禁用色素,该方法经过色谱及质谱条件优化,确定了最佳测定条件,在 10 min 内就可以检测 8 种禁用色素,在快速的基础上方法的精密度达到了 3.09%~5.82%,回收率达到了 92.0%~108.0%,因此该方法可以作为实验室检测目标色素的一个参考方法。

参考文献

[1] 洪红,戚平,刘冬豪,等.食品中违禁色素种类及高通量检测技术进展[J].食品安全质量检测学报,2014,5(8):2448-2456.
 [2] 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].分析科学学报,2009,25(4):409-413.
 [3] 阮成旭,陈梅兰,王晓丽,等.食品中罗丹明 B 快速检测方法的建立与实现[J].中国食品学报,2015,15(6):167-172.

2.3 方法的线性范围、回归方程、检出限及定量限 用水稀释 8 种混合标准使用液,在优化的条件下进行测定,以标准物质的质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标建立标准线性方程,以基线噪声的 3 倍信号响应值计算方法的检出限 (LOD),以基线噪声的 10 倍信号响应值计算方法的定量限 (LOQ),结果见表 4。

2.4 方法的精密度 用水稀释 8 种混合标准使用液,在优化的条件下进行测定每种色素,计算出浓度。重复测定 5 次,计算方法精密度,其中,碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、罗丹明 B、罗丹明 6G、分散红 1 和柑桔红 2 的精密度分别为 4.79%、5.82%、5.13%、4.88%、3.09%、4.38%、4.60%、5.30%。

2.5 方法的回收率 选择目标待测物质,添加不同量的混合标准使其成为低 (1.0 $\mu\text{g/mL}$)、中 (10.0 $\mu\text{g/mL}$)、高 (25.0 $\mu\text{g/mL}$) 3 种浓度来考察该方法的回收率,如表 5。

[4] 曹鹏,乔旭光,娄喜山,等.固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J].分析化学,2011,39(11):1670-1675.
 [5] 高洁,尹峰,何国亮,等.高效液相色谱法测定豆制品中的碱性嫩黄 O [J].分析实验室,2008,27(S1):230-232.
 [6] 王建伟,钟海娟,梁焱琼.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.
 [7] 葛宇.食品中人工合成色素使用法规及检测标准进展[J].质量与标准化,2011(9):31-35.
 [8] 李必斌.食用合成色素检测方法的研究进展[J].中国卫生检验杂志,2002,12(6):758,739.
 [9] 赵飞.食用合成色素及其检测技术的研究进展[J].食品安全导刊,2012(Z1):32-33.
 [10] 肖义夫,廖百森.食品中非食用色素及其检测方法研究进展[J].现代预防医学,2008,35(16):3159-3160,3164.