

高效液相色谱-串联质谱法同时检测辣椒制品中 4 种工业染料

李娟^{1,2}, 丁晓明¹, 刘丹丹¹, 陈宇¹, 郭飞¹, 刘宏民^{1,2*}, 张雁冰^{1,2*}

(1. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学新药研究开发中心, 河南 郑州 450001)

摘要: 为了同时检测辣椒制品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红, 利用超声提取结合液相色谱-串联质谱法, 采用 XTerra C18 柱分离, 以甲醇和含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱。在正离子模式下采用多反应监测(MRM)方式进行检测, 采用基质曲线外标法进行定量。辣椒制品用乙腈-水超声提取, 离心后取上清液进样分析。结果表明, 碱性嫩黄 O、罗丹明 B 的线性范围均为 0.2~10 $\mu\text{g/L}$, 碱性橙 II、对位红的线性范围均为 2~100 $\mu\text{g/L}$, 且线性相关系数均大于 0.99。4 种工业染料的检出限为 0.03~0.60 $\mu\text{g/kg}$, 回收率为 90.1%~116.0%, 相对标准偏差为 5.6%~14.8%。该方法选择性强, 灵敏度高, 且样品处理操作简单, 适合于食品中 4 种非法添加工业染料的同时测定及确证分析。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 碱性嫩黄 O; 碱性橙 II; 罗丹明 B; 对位红; 辣椒制品

中图分类号: S641.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0130-04

Simultaneous Determination of Four Kinds of Industrial Dyes in Chili Products by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Juan^{1,2}, DING Xiao-ming¹, LIU Dan-dan¹, CHEN Yu¹, GUO Fei¹,

LIU Hong-min^{1,2*}, ZHANG Yan-bing^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. New Drug Research & Development Center, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: An accurate method was developed for simultaneous determination of chrysoidine, auramine O, rhodamine B and para red in chili products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ultrasonic extraction. The target analytes were separated on a Xterra C18 column with gradient elution using methanol and 5 mmol/L ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid as mobile phase, and then detected using LC-MS/MS in multiple reaction monitoring(MRM) mode. Acetonitrile and water were used to extract the residues from chili products, and the supernatant was analyzed by chromatogram after centrifugated. The linear range of auramine O, rhodamine B was 0.2—10 $\mu\text{g/L}$, and which of chrysoidine, para red was 2—100 $\mu\text{g/L}$, the linear correlation coefficients were all more than 0.99. The LODs of four dyes were 0.03—0.60 $\mu\text{g/kg}$, the average recoveries of adding standard at six levels were 90.1%—116.0%, and the relative standard deviation of the method was 5.6%—14.8%. The method is simple, sensitive and accurate, and suitable for determination and confirmation of four industrial dyes added in chili products illegally.

Key words: HPLC-MS/MS; auramine O; chrysoidine; rhodamine B; para red; chili products

收稿日期: 2013-11-17

基金项目: 河南省教育厅重点项目(12A350009); 河南省科技攻关项目(132102110093)

作者简介: 李娟(1977-), 女, 河南正阳人, 讲师, 主要从事药物分析、食品分析等研究。E-mail: jli@zzu.edu.cn

* 通讯作者: 刘宏民(1960-), 男, 河南封丘人, 教授, 博士生导师, 主要从事药物化学研究。E-mail: liuhm@zzu.edu.cn

张雁冰(1958-), 女, 山东莱州人, 教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: zhangyb@zzu.edu.cn

对位红(Para Red)、碱性橙 II (Chrysoidine) 是一类偶氮类化合物,主要用于工业染色(如油漆、纺织品的着色等)和科研(如显微染色)^[1];罗丹明 B (Rhodamine B) 是氧杂蒽类染料,常用作指示剂和生物染色剂,广泛应用于环保、钢铁等领域;碱性嫩黄 O (Auramine O) 是芳香胺类碱性染料,主要用于纺织品、皮革、纸类的染色。由于它们价格低廉、色泽鲜艳,一些不法商人将其用于食品的染色,特别是辣椒制品、肉类制品、混合调味料。这些染料及某些体内代谢产物有潜在的致癌性^[2],并被国际癌症研究机构(IARC)划分为三类致癌物质,包括欧盟在内的许多国家都禁止将其添加到食品中^[3]。近年来,这些工业染料违法添加在食品中的事件却频频发生,添加量都在较低的水平,不易检测。因此,实现这些工业染料在低含量情况下的准确检测有重要意义。

目前,食品中偶氮类工业染料的同时检测方法报道较多,如高效液相色谱法(HPLC)^[4-7]、紫外-可见光(UV)法^[8-9]、质谱(MS)法^[10-14]等。而对于辣椒制品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红的同时测定方法未见报道。本研究采用混合溶剂超声提取样品,建立高效液相色谱-串联质谱法同时检测

辣椒制品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红的定量分析方法,以便对辣椒制品中违禁添加工业染料进行监控,保障食品安全。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

Quattro micro API 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司);Alliance 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);XS105 型电子分析天平(十万分之一,上海梅特勒-托利多公司);Milli-Q Advantage A10 Systems 超纯水系统(美国 Millipore 公司);XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械公司);Anke TGL-16G 离心机(上海安亭公司);AS3120 超声仪(天津奥特赛恩斯公司)。

1.2 试剂及材料

乙酸铵、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲酸均为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯。罗丹明 B、对位红、碱性嫩黄 O 和碱性橙 II(结构见图 1)均购于美国 Sigma 公司,纯度均大于 98.0%。空白辣椒为来源可靠的天然新鲜辣椒(洗净去蒂烘干,研成细粉),空白基质均在使用前经过检测,不含所研究的 4 种染料。

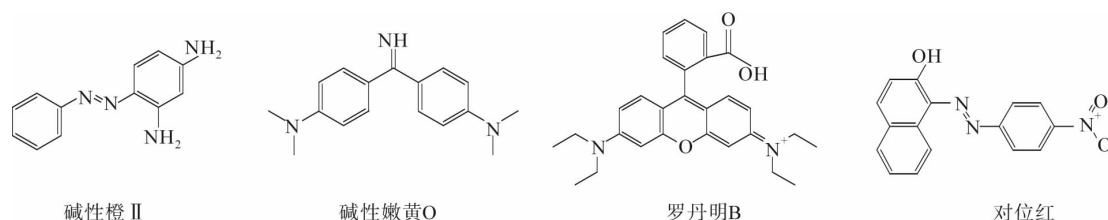


图 1 碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红的化学结构

1.3 标准溶液配制

分别精确称取罗丹明 B、碱性嫩黄 O、对位红和碱性橙 II 0.005 g 于 50 mL 容量瓶中,然后用甲醇溶解并稀释至刻度,于冰箱 4 °C 以下避光保存。用乙腈-水溶液将碱性嫩黄 O、罗丹明 B 储备液稀释成 1 μg/mL 工作液,将对位红、碱性橙 II 储备液稀释成 10 μg/mL 的工作液。

1.4 样品前处理

称取 2 g 样品,均匀粉碎,置于 15 mL EP 管中,加入 6 mL 不同提取溶剂[乙腈、丙酮、甲醇、乙腈/水(9/1)]于涡旋混合器中涡旋 2 min,超声萃取 30 min,再置于离心机中以 5 000 r/min 离心 10 min,静置后吸取上清液,过 0.22 μm 滤膜,待进样。

1.5 液相色谱及质谱条件

液相条件:色谱柱:Xterra C18,2.1 mm×150 mm 色谱柱(Waters,USA);柱温:35 °C;流速:0.2 mL/min;

进样量:5 μL。流动相:分别用乙腈/水、甲醇/水、甲醇/乙酸铵溶液分析样品。

质谱条件:正离子检测 MRM 模式;毛细管电压 3 kV;离子源温度 120 °C;干燥气温度 300 °C;干燥气和雾化气均为 N₂;碰撞气为 Ar。雾化气体流速 50 L/h;脱溶剂气体流速 450 L/h。

2 结果与分析

2.1 试验条件的选择

2.1.1 液相条件的优化 结果发现,用甲醇和乙酸铵溶液信号响应值较高,在流动相中加入 0.1% 甲酸可增加这 4 种染料在 ESI(+) 模式下的电离效率。以含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液和甲醇作流动相梯度洗脱,调整梯度的初始状态及转化时间,使 4 种分析物在 2.0 min 以后出峰,并达到最大程度的分离,且无内源干扰物影响组分的准确测

定。通过优化流动相体系、梯度洗脱等试验条件,确定采用甲醇(B) + 含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液(D)为流动相,梯度洗脱程序:0~5.0 min, 55%~100% B; 5.0~10.0 min, 100% B; 10.0~12.0 min, 100%~55% B。

2.1.2 质谱条件的优化 配制 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液,在全扫描正离子模式下,调节离子源参数得到信号最强的 $[M+H]^+$ 峰。然后对选定的母离子进行子离子扫描,优化碰撞能量,将响应信号较强的子离子作为分析物的特征离子。4 种工业染料的母离子、子离子及相应的质谱参数见表 1。

表 1 4 种染料的多反应监测质谱参数

染料	保留时间/min	母离子(m/z)	锥孔电压/V	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
碱性橙 II	2.50	213.2	30	121.0*/196.1	20
碱性嫩黄 O	3.45	268.3	35	147.1*/252.1	28
罗丹明 B	7.89	443.4	45	399.2*/413.1	42
对位红	10.86	294.2	30	247.1*/156.0	20

注: * 为定量离子。

2.1.3 提取溶剂的选择 乙腈、丙酮、甲醇、乙腈/水(9/1)溶液的提取效率依次为 58.3%~105.1%、20.2%~70.6%、11.5%~106.7%、90.1%~116.0%。表明乙腈/水(9/1)对辣椒制品中的 4 种染料都有较高回收率,且干扰较小。

2.2 线性范围、标准曲线及检出限

采用基质加标标准工作曲线外标法进行定量。以

4 种染料的质量浓度 $x(\mu\text{g/L})$ 为横坐标,以峰面积 y 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程及相关系数。采用在空白样品中添加目标化合物的方法,得出 4 种工业染料在辣椒中的检出限为 0.03~0.60 $\mu\text{g/kg}$,结果见表 2。

表 2 辣椒中 4 种染料检测方法的线性范围、相关系数和检出限

染料	回归方程	相关系数	质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检出限/ ($\mu\text{g/kg}$)
碱性橙 II	$y=13.2767x-5.48573$	0.9948	2~100	0.60
碱性嫩黄 O	$y=118.376x-9.23422$	0.9968	0.2~10	0.03
罗丹明 B	$y=273.241x-4.19389$	0.9994	0.2~10	0.03
对位红	$y=20.4742x-7.74782$	0.9958	2~100	0.45

2.3 回收率与精密度

为考察样品处理的可靠性,进行了加标回收率试验。在空白辣椒中添加碱性橙 II 和对位红分别为 7.5、30、120 $\mu\text{g/kg}$,添加碱性嫩黄 O 和罗丹明 B 分别为 0.75、3、12 $\mu\text{g/kg}$ 。以 6 个添加浓度进行回收率试验,每个添加浓度进行 5 次平行测定,以基质标定标准品定量,计算平均回收率及精密度[以相对标准偏差(RSD)表示]。图 2 为辣椒样品中 4 种染料的 MRM 色谱图。该方法对 4 种工业染料的回收率为 90.1%~116.0%,RSD 为 5.6%~14.8%(表 3)。表明该方法有良好的精密度和准确度,满足痕量分析的要求。

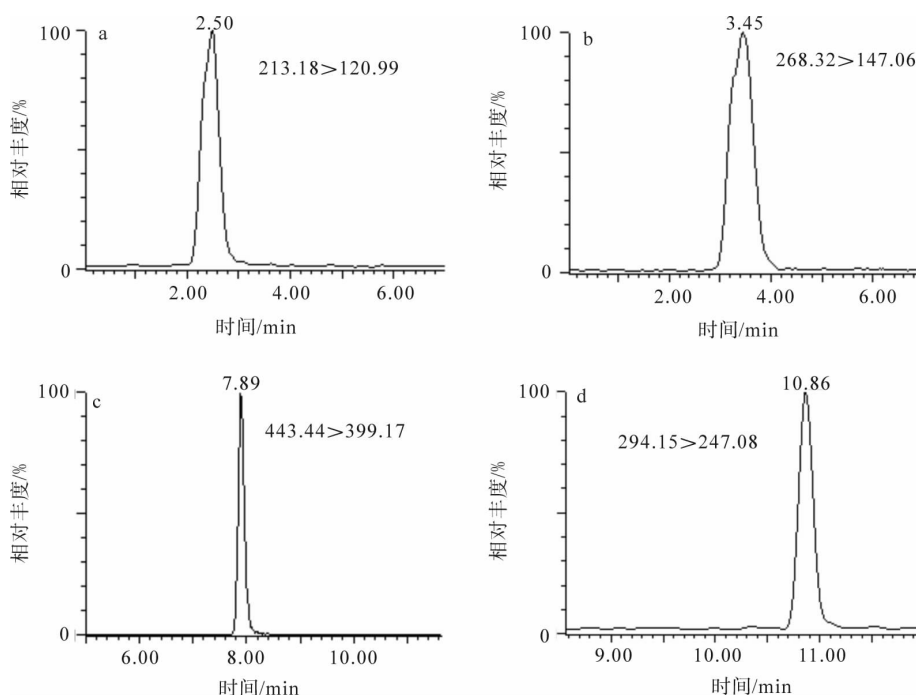


图 2 辣椒制品中碱性橙 II (a)、碱性嫩黄 O (b)、罗丹明 B (c)、对位红(d)的 MRM 色谱

表 3 辣椒中 4 种染料的日内、日间精密度和回收率

染料	添加质量浓度/(μg/kg)	日内		日间	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
碱性橙 II	7.5	112.4	14.1	116.0	14.6
	30	90.1	11.2	95.7	10.9
	120	97.1	14.2	97.9	12.9
碱性嫩黄 O	0.75	92.8	14.8	97.6	14.5
	3	96.0	6.8	97.0	11.5
	12	101.7	8.9	96.1	8.5
罗丹明 B	0.75	96.0	9.3	97.1	7.8
	3	97.0	12.9	98.3	13.5
	12	104.7	5.7	106.7	12.6
对位红	7.5	99.6	13.5	105.1	14.1
	30	91.7	5.6	96.8	12.7
	120	99.9	7.9	110.8	14.7

3 结论与讨论

本研究采用乙腈/水作为提取溶剂,无需净化处理,简化了样品前处理过程。采用串联质谱的MRM 检测模式显著提高了灵敏度与选择性,成功建立了辣椒制品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红的测定方法。4 种工业染料的检出限为 0.03~0.60 μg/kg,回收率为 90.1%~116.0%,RSD 为 5.6%~14.8%。与文献报道的其他方法相比^[12-13],该方法具有简单、快速、灵敏度高、选择性强等优点,可用于辣椒制品中上述 4 种非法添加的红黄色系工业染料的同时测定及确证。该方法可有效满足质检机构及其他食品质量检验部门对食品中碱性橙 II、碱性嫩黄 O、罗丹明 B 和对位红的快速准确检测,为建立食品中非法添加红黄色系工业染料的标准检测方法提供借鉴。

参考文献:

[1] Gajda J,Switka A,Kuzma K,*et al.* Sudan and other illegal dyes-food adulteration[J]. Rocz Panstw Zakl Hig,2006,57(4):317-323.

[2] Pan H,Feng J,He G,*et al.* Evaluation of impact of exposure of Sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria[J]. Anaerobe,2012,18(4):445-453.

[3] Fonovich T M. Sudan dyes:are they dangerous for human health? [J]. Drug Chem Toxicol,2013,36(3):343-352.

[4] Qi P,Zeng T,Wen Z,*et al.* Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC-DAD [J]. Food Chemistry,2011,125(4):1462-1467.

[5] Yan H,Qiao J,Pei Y,*et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography for determination of Sudan dyes in preserved beancurds[J]. Food Chemistry,2012,132(1):649-654.

[6] 黄晓雯. HPLC 法测定酱油中罗丹明 B、对位红和苏丹红[J]. 广州化工,2012,40(16):127-129.

[7] Wu Y L,Li C,Xia X,*et al.* Development and validation of a confirmatory HPLC method for simultaneous determination of Sudan dyes in animal tissues and eggs [J]. J Chromatogr Sci,2010,48(1):63-68.

[8] Mölder K,Künnapas A,Herodes K,*et al.* “Fast peaks” in chromatograms of Sudan dyes[J]. Journal of Chromatography A,2007,1160(1/2):227-234.

[9] 夏立娅,韩媛媛,匡林鹤,等. 薄层色谱扫描法同时检测豆制品中碱性橙、皂黄、柠檬黄和日落黄以及辣椒粉中酸性橙 II、丽春红 2R 和罗丹明 B[J]. 分析试验室,2010,29(6):15-18.

[10] Schummer C,Sassel J,Bonenberger P,*et al.* Low-level detections of Sudan I, II, III and IV in spices and chili-containing foodstuffs using UPLC-ESI-MS/MS [J]. J Agric Food Chem,2013,61(9):2284-2289.

[11] Fukuji T S,Castro-Puyana M,Tavares M F M,*et al.* Sensitive and fast determination of Sudan dyes in chili powder by partial-filling micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Electrophoresis,2012,33(4):705-712.

[12] 朱晓军,颜春荣,董璨,等. 固相萃取-液质联用同时检测豆制品中 4 种红黄色系工业染料[J]. 食品安全质量检测学报,2012,3(3):190-194.

[13] 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.

[14] 胡侠,肖光,潘炜,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定辣椒粉及辣椒油中的 7 种罗丹明染料[J]. 色谱,2010,12(8):590-595.