

## 实验技术与方法

液相色谱串联质谱法检测鲍鱼汁中的酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 刘华良<sup>1</sup> 荣维广<sup>1</sup> 王联红<sup>2</sup> 吉文亮<sup>1</sup> 马永建<sup>1</sup>

(11江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

21南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘要:**目的 建立了液相色谱/串联质谱(HPLC/MS/MS)测定鲍鱼汁中酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 的方法,并用于实际样品的分析。方法 样品经甲醇+乙酸铵溶液(体积比为1+1)振荡提取后用OASIS WAX SPE柱净化,以乙腈-乙酸铵缓冲溶液为流动相,在 $C_{18}$ 色谱柱(21 mm @50 mm, 117 Lm)上经梯度洗脱分离后以多反应监测质谱测定( $m/z$  3261.9y 1701.8, 3261.9y 1551.8)。结果 方法的最低定量浓度(LOQ)为0.1 mg/kg 5和50 mg/kg两个水平加标样的平均回收率分别为87.1%和10.11%,线性相关系数为0.999,线性范围为10~5000 Lg/L。对14份食品专项整治抽检样品进行分析检测,其中7份检出酸性橙 $\dot{\text{O}}$ ,其含量范围为11.2~731.8 mg/kg。结论 该方法能够满足鲍鱼汁中酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 的测定要求。

**关键词:**高效液相色谱/串联质谱法;固相萃取柱;酸性橙 $\dot{\text{O}}$ ;鲍鱼汁

中图分类号: O657.172; S944.145 文献标识码: A 文章编号: 100428456(2010)0120016203

Detem ination of Acid Orange $\dot{\text{O}}$  in Abalone Soup with High Performance  
Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

LU Hua2liang RONG We2guang WANG Lian2hong JIW en2liang MA Yong2jian

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China)

**Abstract** Objective To develop an analytical method for the analysis of acid orange $\dot{\text{O}}$  in abalone soup with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). Method Samples were extracted by methanol+ ammonium acetate buffer (1+1, v/v) and purified on an OASIS WAX SPE column. The chromatographic column of HPLC/MS/MS was Waters Acuity BEH  $C_{18}$  (21 mm @50 mm, 117 Lm). Acid orange $\dot{\text{O}}$  was detected by monitoring the ion transition of  $m/z$  3261.9y 1701.8 and 3261.9y 1551.8 using multiple reaction monitoring (MRM) mode. Results The limit of quantification (LOQ) was 0.1 mg/kg and the recoveries of two spiked samples (5 mg/kg and 50 mg/kg) were 87.1% and 10.11% respectively. The calibration curves showed good linearity in the range of 10~5000 Lg/L with correlation coefficients larger than 0.999. The detection of acid orange $\dot{\text{O}}$  in 14 samples from restaurants showed that the concentration of acid orange $\dot{\text{O}}$  in 7 samples were 11.2~731.8 mg/kg. Conclusion The method could meet the requirement for fast and accurate detection of acid orange $\dot{\text{O}}$  in abalone soup.

**Key words** High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; Solid Phase Extraction Column; Acid Orange $\dot{\text{O}}$ ; Abalone Soup

酸性橙 $\dot{\text{O}}$ ,又名酸性金黄 $\dot{\text{O}}$ 、橙黄 $\dot{\text{O}}$ 、2,2-萘酚偶氮对苯磺酸钠,主要用于蚕丝、羊毛织品的染色,禁止作为食品添加剂使用。然而绵阳市疾病预防控制中心1999-2003年间监测了186份共20类食品样品,酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 阳性检出88份,检出率47.13%,检出阳性的食品种类为腌卤肉制品、红壳瓜子、辣椒面和豆瓣酱<sup>[1]</sup>。

文献报道酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 的测定方法有纸层析定性示

波极谱测定法<sup>[2]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[3-5]</sup>。卫生部食品整治办发布[2009]29号通知5关于印发全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治抽检工作指导原则和方案的通知6(以下简称5专项整治6)推荐了辣椒粉中酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 的高效液相色谱/串联质谱法(HPLC/MS/MS)。本文在5专项整治6测定方法的基础上,研究建立了鲍鱼汁中酸性橙 $\dot{\text{O}}$ 的HPLC/MS/MS测定法,并在本次专项整治抽检工作中得到应用,检出了阳性样品,现报告如下。

收稿日期: 2009205222

基金项目: 江苏省卫生厅预防医学课题(Y200709)

作者简介: 刘华良 男 博士 副研究员 研究方向为卫生检验

E-mail: LHL21@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

酸性橙 $\dot{\text{O}}$  (纯度99.1%, 苏州市卫生监督所提

供); 甲醇、乙腈、正己烷(色谱纯, TEDIA 公司); 提取溶液: 称取 319 g 乙酸铵用水溶解, 加入 1010 ml 甲酸, 用水定容到 500 ml 后, 用甲醇定容到 1000 ml 固相萃取柱平衡溶液: 称取 319 g 乙酸铵用水溶解, 加 1010 ml 甲酸, 用水定容到 500 ml 淋洗溶液: 称取 319 g 乙酸铵用水溶解, 加 1010 ml 甲酸和 2510 ml 甲醇, 用水定容到 500 ml 洗脱溶液: 取 5 ml 氨水用甲醇定容至 100 ml 流动相 B 称取 0139 g 乙酸铵用水溶解, 加 0150 ml 甲酸, 用水定容到 500 ml

固相萃取柱(OASIS WAX, 60 mg/3ml, Waters 公司); 鲍鱼汁样品为 2009 年 4 月苏州市卫生监督所提供。

## 112 仪器与设备

超高效液相色谱/串联质谱(Acquity/Quattro micro Waters 公司); 12 孔固相萃取装置(Supelco 公司)。

## 113 标准溶液的配制及定量方法

准确称取 10 mg(精确至 011 mg)经 110 e 干燥 2 h 的酸性橙 0, 用 50% 甲醇水溶液定容至 1010 ml 得浓度为 110 mg/ml 的储备液。储备液用 20% 甲醇溶液稀释成 10、50、100、500、5000 Lg/L 浓度系列, 以标准溶液浓度对定量离子峰面积绘制标准曲线, 外标法定量。

## 114 样品前处理方法

称取 1g(精确至 0101 g)试样于 10 ml 离心管中, 加入提取溶液至刻度, 再加入用提取液饱和的正己烷 1 ml 振荡提取 20 min, 10 000 r/min 离心 10 min。用一次性注射器或移液器从正己烷液层下取 110 ml 样品提取液, 用固相萃取柱平衡溶液稀释至 10 ml 过已活化好的弱阴离子固相萃取柱, 用 2 ml 淋洗液、2 ml 水淋洗, 5 ml 洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 用氮气吹至近干, 用 20% 甲醇定容至 110 ml 过 0122 Lm 滤膜后 HPLCMS/MS 测定。

## 115 色谱条件

超高效色谱柱为 Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> 柱(211 mm @50 mm, 117 Lm); 流动相流量 0125 ml/min, 采用如表 1 所示梯度洗脱程序; 进样量 5 L。

表 1 流动相梯度洗脱参考条件

时间 (min)	乙腈 (%)	乙酸铵 2 甲酸缓冲液 (%)
0	10	90
015	10	90
315	90	10
410	90	10
415	10	90
610	10	90

## 116 质谱条件

离子化方式采用 ESI; 毛细管电压: 3100 kV;

源温度: 120 e; 脱溶剂气温度: 400 e; 脱溶剂气流量: 500 L/h 锥孔气流量: 50 L/h 碰撞室压力: 315 @10<sup>-3</sup> mbar 质谱采集方法: 多反应监测 (MRM) 串联质谱模式, 母离子 m/z 为 32619, 定量离子 m/z 为 17018, 辅助定性离子为 15518, 锥孔电压为 35 eV 碰撞诱导解离能量为 25 eV。

## 2 结果

### 211 方法的线性范围和定量下限

在设定色谱条件下, 酸性橙 0 标准系列溶液的浓度与色谱峰面积线性相关, 线性回归方程为  $y = 21057x - 41638$ ,  $r = 019991$ , 线性范围为 10 ~ 5000 Lg/L。按信噪比  $S/N = 10$  计算定量下限 (LOQ) 为 0101 mg/L。按照本检测方法操作, 对应的样品最低定量浓度为 011 mg/kg。

酸性橙 0 不是食品添加剂, 没有卫生标准限值。但酸性橙 0 的分子结构与日落黄接近, 差别是前者包含 1 个磺酸钠基团, 后者包含 2 个磺酸钠基团。酸性橙 0 的卫生标准限值暂时参考日落黄的卫生标准限值 011 g/kg<sup>[6]</sup>。本检测方法样品最低定量浓度为 011 mg/kg 远低于 011 g/kg 应该能满足需要。

### 212 准确度与精密度

向空白鲍鱼汁样品中分别加入低、高两种浓度的混合标准溶液, 使加标量分别为 5 和 50 mg/kg 混匀后静置 2 h 依照前述样品处理方法进行测定, 每个添加水平平行测定 6 份。低、高两种浓度加标样的平均回收率分别为 871% 和 1011%, 相对标准偏差分别为 514% 和 418%。

### 213 实际样品分析

在 14 份被检样品中, 有 7 份检出酸性橙 0, 检出浓度范围为 112 ~ 7318 mg/kg 图 1 为在 MRM 模式下某阳性样品的离子色谱图。其中, 酸性橙 0 保留时间为 2166 min, 定量离子 32619y 17018 的峰面积为 43311, 定性离子 32619y 15518 的峰面积为 14716, 通过与其标准品图谱比较, 依照保留时间和子离子峰面积比定性, 依据定量离子峰面积定量, 计算得酸性橙 0 的含量为 211 mg/kg 此外, 实际样品测试中未发现干扰峰, 说明样品的前处理方法是满意的。

## 3 讨论

### 311 样品前处理方法优化

样品前处理方法借鉴了 5 专项整治 6 推荐的辣椒粉中酸性橙 0 的 HPLCMS/MS 法。同时, 鉴于鲍鱼汁这种呈粘稠液体状样品, 对其前处理方法作了如下改动: 1 提取方式由超声提取改为振荡提取。

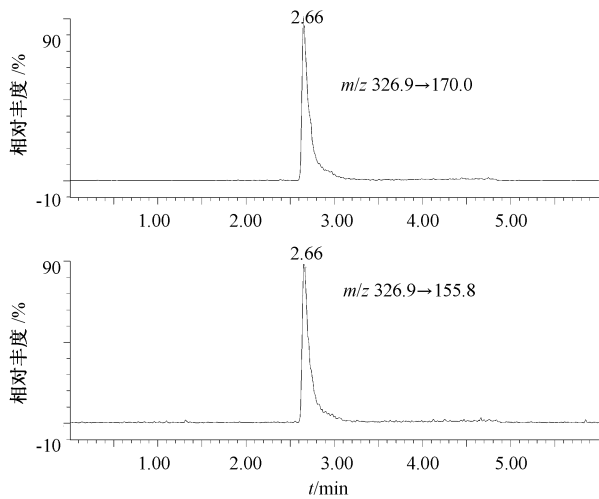


图 1 MRM 模式下某阳性样品的离子色谱图

超声方式适合固体样品,而对液体样品,振荡提取更合适。提取液中加入了用提取液饱和的正己烷,用来萃取脂肪。提取次数由 2 次减为 1 次,减少操作步骤。 $\frac{1}{4}$  减小净化步骤中提取液的消耗体积。原方法把 5 ml 提取液稀释定容至 50 ml 过柱净化,提取液的消耗体积过多,万一后续步骤失败则需要重新进行样品提取,另外,50 ml 的小柱上样体积过大,耗时长,易堵塞。本文在最低检出浓度满足需要前提下,仅取用 110 ml 样品提取液。

### 3.1.2 质谱条件的选择

酸性橙 0 分子结构中含有羟基基团,所以电离方式选择负离子电离。在串联四极质谱仪的 MS1 中对化合物标准进行扫描,确定分子离子峰丰度最大的条件,得到酸性橙 0 的母离子  $m/z$  326.19,在 MS2 中进行子离子扫描,改变诱导碰撞能量,选用丰度较大的 2 个子离子  $m/z$  326.19  $y$  170.18 ( $C_{10}H_7ON_2$ ) 和  $m/z$  326.19  $y$  155.18 ( $C_6H_4O_3S$ ) 分别作为定量离子和辅助定性离子,优化仪器参数使其在保证分辨率的条件下灵敏度最佳。酸性橙 0 的特征子离子扫描图见图 2,特征子离子碎片形成机制见图 3。5 专项整治 6 推荐方法中定量和辅助定性离子分别为 327.10  $y$  155.19、327.10  $y$  79.18 与本文 MRM 离子的选择有所不同,这可能是由于质谱仪器不同所致。

### 3.1.3 标准曲线的制备

当基质效应大时,HPLCMSMS 检测法一般采用基质加标工作曲线定量,但会增加操作步骤(与标准曲线法相比)。本研究同时绘制了基质加标工作曲线,即取空白样品按照 11.4 处理,用所得的样品溶液将酸性橙 0 储备液逐级稀释得到 10、50、100、

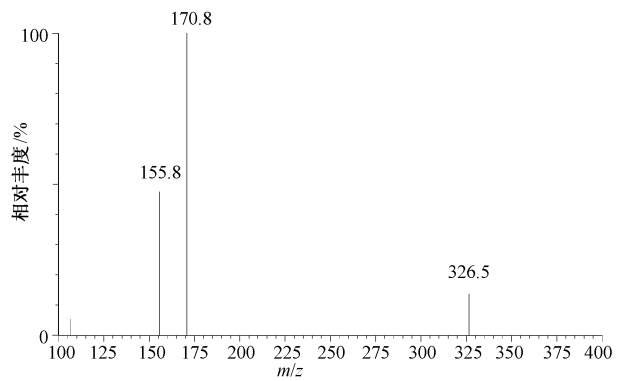


图 2 酸性橙 0 标准品的特征离子扫描图

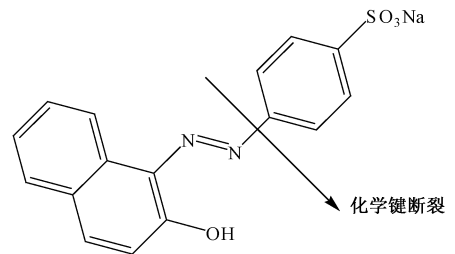


图 3 特征子离子碎片形成机制

500、5000  $\mu\text{g/L}$  系列浓度标准工作液,上机测定,绘制曲线。通过该曲线计算低、高两种浓度加标样的平均回收率分别为 88.14% 和 103.10%,与标准曲线定量的结果 (21.2) 无显著差异。这是因为本试验中样品前处理净化采用了弱阴离子交换固相萃取柱 (WAX),WAX 柱兼有分配色谱和离子交换色谱的性质,属双重净化柱,净化后可以得到相对干净的样品溶液,样品基质对质谱检测的离子抑制效应被大大限制。本研究用标准曲线代替基质加标工作曲线,在不影响准确度的前提下减少了工作强度。

### 参考文献

- [1] 严昌武,段晋超. 1999年 - 2003年绵阳市市售食品中非法使用酸性橙 0 的调查 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(6): 5382-539.
- [2] 陈大义. 纸层析定性示波极谱法测定非食用色素酸性橙 [J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(2): 1702171.
- [3] 向仲朝,龚光隆. 食品中酸性橙 0 测定法的研究及污染调查 [J]. 现代预防医学, 2003, 30(2): 1722173.
- [4] 张秀尧,蔡欣欣. 反相高效液相色谱法快速测定食品中违规使用的酸性橙 II 染料 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(2): 204.
- [5] 肖白曼,刘宁,朱正浩. HPLC 法测定食品中非食用色素酸性橙 0 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(5): 4222424.
- [6] 卫生部,国家标准化委员会. GB 2760-2007 食品添加剂使用卫生标准 [S].