

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉组织中9种黄色染色剂

潘颖,吕沈亮,夏苏捷,陈燕,徐伟东

(上海市食品药品检验研究院,上海 201203)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)正负离子切换模式同时测定鱼肉组织中9种黄色染色剂的分析方法。方法 试样经氨水甲醇溶液和甲酸水甲醇溶液提取,上清液旋蒸复溶,正己烷除脂,离心后上清液用UPLC-MS/MS法测定,外标法定量。结果 柠檬黄、日落黄、喹啉黄在2~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,酸性橙Ⅱ、碱性橙2、碱性橙21、碱性橙22、硫黄素T、碱性嫩黄O在0.2~3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性关系良好,检出限分别为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在80.03%~107.06%,相对标准偏差在1.2%~6.6%。结论 本方法适用于鱼肉组织中9种黄色染色剂的测定。

关键词:鱼肉组织;黄色染色剂;超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)01-0044-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.009

Determination of 9 yellow colorants in fish tissues by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

PAN Ying, LV Shenliang, XIA Sujie, CHEN Yan, XU Weidong

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish a detection method for 9 yellow colorants in fish tissues by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Sample was extracted by ammonia methanol solution and formic acid water methanol solution, the supernatant was evaporated and redissolved, the fat was removed by n-hexane, determined by UPLC-MS/MS method after centrifugation, and quantification was based on external calibration. **Results** The result showed good linearity in the ranges of 2-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for tartrazine, sunset yellow and quinoline yellow, 0.2-3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for acid orange II, basic orange 2, basic orange 21, basic orange 22, thioflavin T and auramine O, and the limits of detection were 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries were 80.03%-107.06% and the relative standard deviations ($n=6$) were 1.2%-6.6%. **Conclusion** The method can be applied to determine 9 yellow colorants in fish tissues.

Key words: Fish tissues; yellow colorants; ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

近年来,有报道一些不法商贩滥用柠檬黄等着色剂对黄鱼等鱼类进行染色,以次充好^[1]。亦有不法商贩在黄三鱼中添加黄栀,所售黄三鱼中检出酸性橙Ⅱ^[2]。向“伪黄鱼”或黄鱼中添加的染料有人工合成色素,如柠檬黄与日落黄等,还有黄色化工染料,如碱性橙、碱性嫩黄O等。其中,黄色化工染料具有致癌、致畸变性等毒性,会对人体造成严重的危害,卫生部公布的《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第1—5批

汇总)》中明确禁止碱性橙2、碱性嫩黄O、酸性橙Ⅱ等工业染料在食品中使用^[3]。

目前,食品中染色剂的检测方法主要有高效液相色谱法^[4-9]、高效液相色谱-串联质谱法^[10-13]。其中高效液相色谱法应用于食品中人工合成色素或单一化工染料的测定最为广泛,但在多种染色剂同时检测时,往往受到组分间互相干扰,被检测物性质差异较大,需要采用梯度洗脱,分段检测波长等技术手段。关于鱼类中多种人工合成色素和化工染料同时检测的高效液相色谱-串联质谱法的文献报道较少。

本试验采用液液萃取技术及超高效液相色谱-串联质谱法,对鱼肉组织中9种黄色人工合成着色剂和化工染料进行测定,提高了检测灵敏度,缩短了试验时间,可为相关检测和日常监管工作提供参考。

收稿日期:2021-04-23

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603400);上海市市场监督管理局2021年度科技项目(2021-52)

作者简介:潘颖 女 副主任药师 研究方向为食品药品质量安全检测 E-mail:panying_yjs@smda.sh.cn

通信作者:徐伟东 男 主任药师 研究方向为食品药品质量安全检测 E-mail:xuweidong@smda.sh.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

主要仪器与试剂:超高效液相色谱系统(日本 Shimadzu LC-20A);AB API 4000 三重四极杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);减压旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司)。

标准品:碱性橙 2(Sigma 99.1%)、碱性橙 21(CNW 96.9%)、碱性橙 22(Adamas-beta 98.0%)、酸性橙 II(Dr Ehrenstorfer 94.7%)、碱性嫩黄 O(Sigma 85%)、硫黄素 T(CNW 100%)、柠檬黄(中国计量院 0.500 mg/mL)、日落黄(中检院 90.0%)、喹啉黄(Sigma 100%)。甲醇、乙腈、乙酸铵均为色谱纯,甲酸、正己烷、氨水、异丙醇均为分析纯。样品购自市场。

1.2 方 法

1.2.1 样品前处理

取鱼可食组织匀浆后,准确称取 5 g 试样(精确至 0.01 g),置 50 mL 离心管中,加入 15 mL 5% 氨水甲醇溶液(5:95, V/V),涡旋 3 min,超声提取 15 min,15 000 r/min 离心 10 min,将上层提取液转移至 100 mL 梨形瓶中,残渣中加入 15 mL 5% 含 1% 甲酸水甲醇溶液(5:95, V/V),重复提取 1 次,合并提取液。在梨形瓶中加入 10 mL 异丙醇,于 30 ℃ 减压旋蒸浓缩至约 1 mL,加入 1 mL 乙腈,涡旋 2 min 使溶解,转移至 15 mL 离心管,用乙腈-水溶液(1:1, V/V)定容至 3 mL,加入 3 mL 正己烷,涡旋振荡 2 min,于 4 600 r/min 离心 5 min,弃去正己烷层,取下层溶液于 1.5 mL 离心管中,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定。

1.2.2 标准溶液的制备

称取或移取 9 种黄色染色剂适量,用甲醇溶解制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备液。分别取柠檬黄、日落黄、喹啉黄标准储备液 1 mL,酸性橙 II、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、硫黄素 T、碱性嫩黄 O 标准储备液 0.1 mL,置于同一 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合标准中间液。分别准确吸取混合标准中间液适量,用甲醇稀释成含柠檬黄、日落黄、喹啉黄 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 和 1.5 μg/mL,酸性橙 II、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、硫黄素 T、碱性嫩黄 O 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 和 0.15 μg/mL 的标准系列溶液。准确称取空白试样 5 g(精确至 0.01 g)共 7 份,分别精密量取标准系列溶液 100 μL 加入上述空白试样中,按试样同法制备,作为样品基质混合标准工作溶液。

1.2.3 仪器条件

1.2.3.1 色 谱

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C18

(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm);柱温为 35 ℃;流速为 0.3 mL/min;进样量为 3 μL。流动相 A 为 2 mmol/L 乙酸铵溶液,B 为乙腈。梯度洗脱:0~2 min,80% A;2~5 min,80% A→10% A;5~7 min,10% A,7~8 min,10% A→80% A,8~10 min,80% A。

1.2.3.2 质 谱

电喷雾离子源(ESI);MRM 模式正负离子同时扫描;电喷雾电压:4 500 V;雾化气:45 psi;辅助气:45 psi;离子源温度:300 ℃;气帘气:10 psi;质谱分析参数见表 1。

表 1 9 种染色剂质谱分析参数

序号	分析物	离子对 m/z	去簇电压(V)	碰撞能量(eV)
1	硫黄素 T	283.1/267.1*	76	47
		283.1/268.1	76	40
2	碱性嫩黄 O	268.1/147.1*	55	40
		268.1/252.1	55	46
3	碱性橙 2	213.1/121.2*	54	30
		213.1/196.0	54	29
4	碱性橙 21	315.2/300.2*	54	33
		315.2/285.1	54	41
5	碱性橙 22	391.2/376.2*	74	39
		391.2/361.0	74	51
6	酸性橙 II	327.0/170.8*	-70	-36
		327.0/155.7	-70	-40
7	柠檬黄	154.8/197.6*	-20	-12
		154.8/170.8	-19	-10
8	日落黄	203.0/206.7*	-35	-21
		203.0/170.7	-35	-20
9	喹啉黄	351.9/288.0*	-80	-43
		351.9/244.1	-80	-50

注:* 定量离子对

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

由于柠檬黄、日落黄、喹啉黄、酸性橙 II 在负离子模式下有较强响应,碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、碱性嫩黄 O、硫黄素 T 在正离子模式下有较强响应,故采用正负离子同时采集。考察了不同流动相组成对待测化合物峰形及离子化效率的影响,结果表明,当乙腈作为流动相时,各待测化合物响应好,灵敏度高,离子化效率优于甲醇,故采用乙腈作为有机相。分别考察了 2、5 和 10 mmol/L 乙酸铵作为水相时对待测物的影响,结果表明水相中含乙酸铵时,各组分均能出峰,但乙酸铵浓度高会抑制柠檬黄、日落黄等化合物的响应。另外,考察了含 0.05% 甲酸溶液、0.1% 甲酸溶液、0.1% 甲酸 5 mmol/L 乙酸铵溶液作为水相时对待测物的影响,结果表明一定比例的甲酸可有效改善硫黄素 T、碱性嫩黄 O、碱性橙的峰形以及增强响应,提高分离度,但会明显抑制柠檬黄、日落黄等化合物的响应,

甚至柠檬黄不出峰。综合考虑,最终采用乙腈-2 mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相进行梯度洗脱,增

加目标化合物的保留、提高分离度,并改善峰形,各化合物提取离子色谱图见图 1。

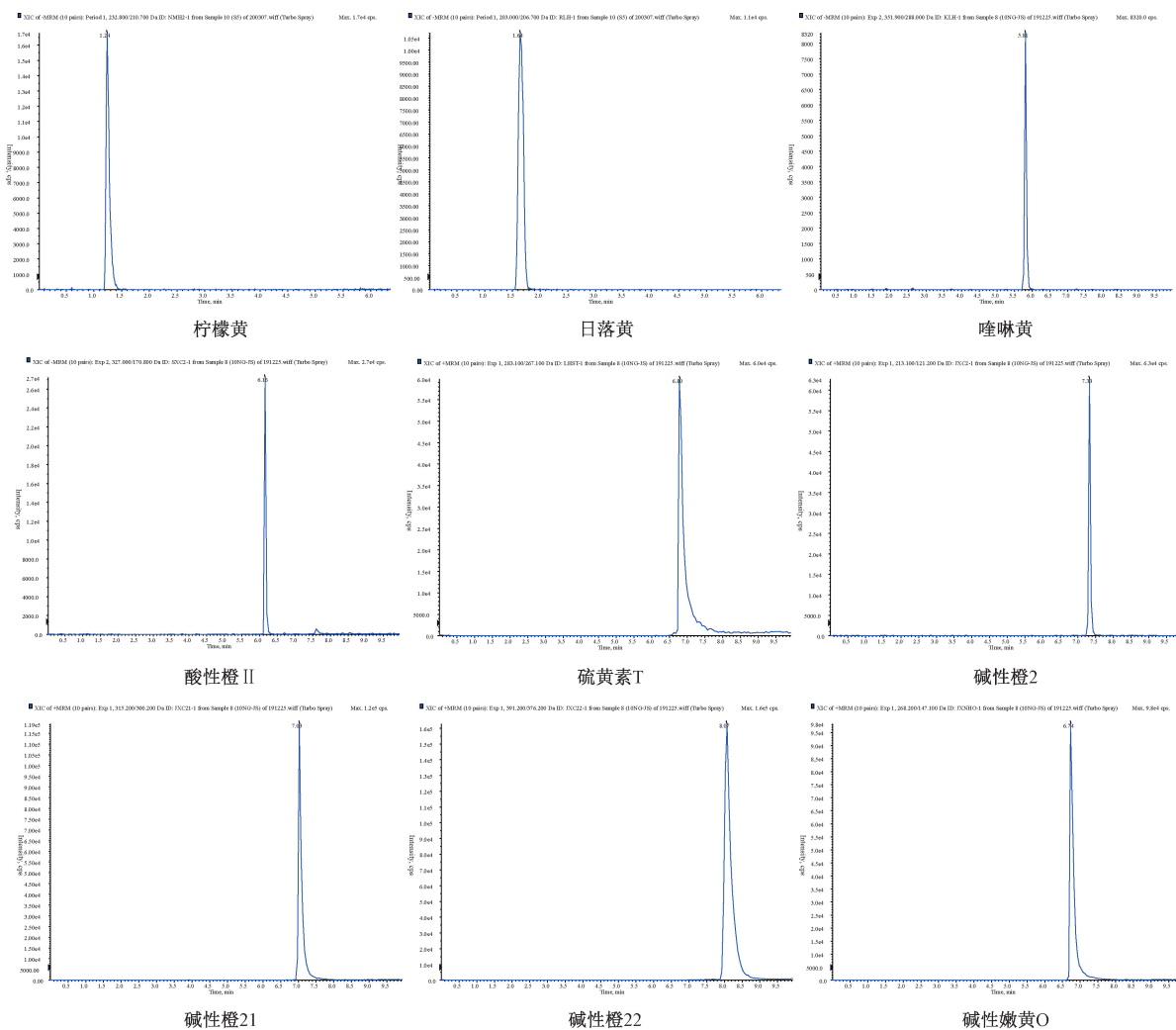


图 1 9 种染色剂的提取离子色谱图

Figure 1 Ion extracted chromatograms of 9 kinds of colorants

2.2 前处理方法的优化

由于碱性橙、酸性橙等极性较强的染色剂在乙醇、甲醇、乙腈等强极性溶剂中溶解性均较好,柠檬黄等水溶性色素在水中的溶解性较好,因此本文比较了甲醇、无水乙醇、乙腈等纯有机溶剂及有机相含量比例为 70%、80%、90%、95% 的水溶液的提取效率(图 2)。结果显示随着提取溶剂中有机相比例的增加,碱性橙、碱性嫩黄 O 等偏脂溶性染色剂的提取效率从 25% 增加到 80%,而纯有机溶剂下,柠檬黄等水溶性染色剂的提取效率低于 20%。由于 9 种化合物分别属于碱性和酸性染色剂,性质差异较大,本文比较了 95% 有机相水溶液、5% 氨水有机溶剂、5% 含 1% 甲酸水有机溶剂、5% 氨水有机溶剂+5% 含 1% 甲酸水有机溶剂,结果显示 5% 氨水甲醇+5% 含 1% 甲酸水甲醇溶液下,各化合物的提取效率均在 70% 以上(图 3)。

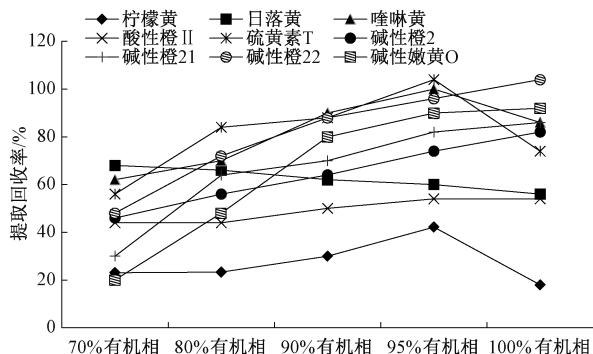


图 2 提取溶剂的优化

Figure 2 Optimization of extraction solvent

为了达到更好的净化效果,实验考察了各种固相萃取柱净化(C₁₈柱、MAX柱、HLB柱、中性氧化铝柱、JXA柱、MCX柱等)及正己烷除脂,结果显示由于各化合物的酸碱性及溶解性不同,各种固相萃取柱净化不能满足所有目标物的回收率,而正己烷

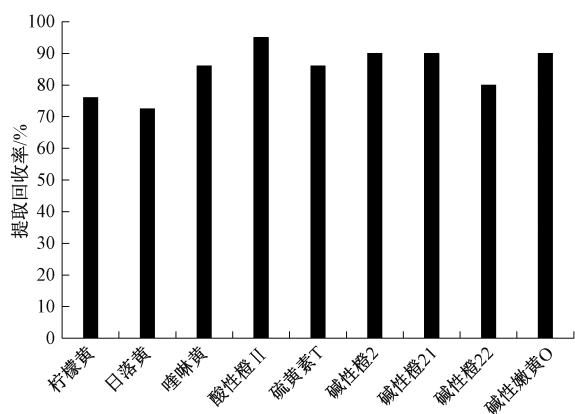


图3 5%氨水甲醇+5%含1%甲酸水甲醇的提取效率

Figure 3 Extraction efficiency of colorants by ammonia methanol solution and formic acid water methanol solution

除脂对各目标物的回收率没有影响。在复溶溶液考察过程中,研究选取了20%乙腈水溶液、50%乙腈水溶液、50%甲醇水溶液对回收率、色谱行为的影响,50%乙腈水溶液下各待测物峰形和响应均得到较好改善(图4)。

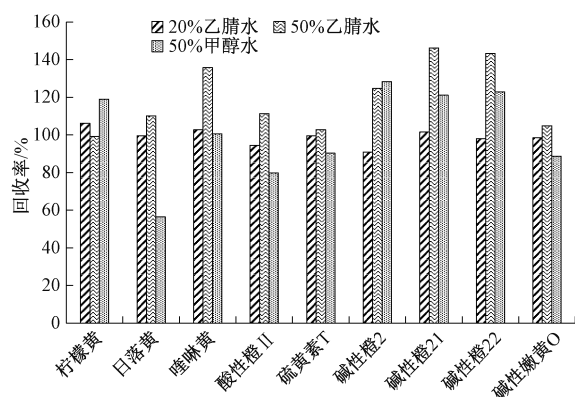


图4 复溶溶液的优化

Figure 4 Optimization of reconstitution solvent

2.3 方法学考察

2.3.1 检出限和线性范围

本研究采用相对响应值法考察基质效应,即通过比较每种目标化合物在基质中与纯溶剂中的峰面积来评价9种染色剂在鱼中的基质效应,结果表

明9种染色剂在基质中与纯溶剂中的峰面积比值范围为0.20~0.99,即9种染色剂的纯溶剂标样峰面积均大于基质标样峰面积,表明基质对其具有电离抑制作用,故本方法采用基质随行线性以消除基质效应。在空白样品中分别添加0.2 μg/kg和2 μg/kg的标准溶液,按样品同法处理,分别测定回收率和信噪比。结果表明,酸性橙 II、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、硫黄素 T、碱性嫩黄 O添加浓度为0.2 μg/kg,柠檬黄、日落黄、喹啉黄添加浓度均为2 μg/kg时,各待测化合物信噪比均分别大于3 ($S/N \geq 3$),且回收率均在60%~120%。分别精密量取标准系列溶液加入空白试样中,按供试品同法制备,计算各待测物线性回归方程及其相关系数。在相应的浓度范围内,9种化合物线性关系良好,相关系数 r 均在0.990 0以上,详见表2。

表2 9种染色剂线性范围、线性方程、相关系数、检出限

Table 2 Linear ranges, standard curves, LODs, of the 9 colorants

化合物	线性范围 / (μg/kg)	线性方程	相关系数	检出限 / (μg/kg)
柠檬黄	2 ~ 30	$y = 252x - 99.1$	0.995 1	2
日落黄	2 ~ 30	$y = 871x + 281$	0.998 6	2
喹啉黄	2 ~ 30	$y = 1.66e^3x + 92$	0.996 8	2
酸性橙 II	0.2 ~ 3	$y = 7.64e^3x + 97.6$	0.998 5	0.2
碱性橙 2	0.2 ~ 3	$y = 2.64e^4x + 729$	0.997 2	0.2
碱性橙 21	0.2 ~ 3	$y = 7.94e^4x + 2.28e^3$	0.999 4	0.2
碱性橙 22	0.2 ~ 3	$y = 1.17e^5x + 3.66e^3$	0.999 4	0.2
硫黄素 T	0.2 ~ 3	$y = 1.58e^4x - 423$	0.999 8	0.2
碱性嫩黄 O	0.2 ~ 3	$y = 4.51e^4x + 1.6e^3$	0.999 2	0.2

2.3.2 精密度和回收率试验

准确称取黄鱼空白样品,分别制成添加水平检出限(Limit of detection, LOD)为0.2 μg/kg(2.0 μg/kg)、2LOD为0.4 μg/kg(4.0 μg/kg)和10LOD为2 μg/kg(20 μg/kg)的样品各6份,按样品前处理方法进行加标回收率试验,计算平均回收率,考察方法的精密度。基质中各添加水平的平均回收率在80.03%~107.06%,相对标准偏差($n=6$)在1.2%~6.6%,均满足残留分析的要求,详见表3。

表3 9种染色剂的回收率和精密度($n=6$)Table 3 Recoveries and RSDs for 9 colorants ($n=6$)

化合物	LOD		2LOD		10LOD	
	回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
柠檬黄	95.21	4.5	100.83	4.3	96.33	6.1
日落黄	95.30	4.8	92.78	4.3	101.44	5.1
喹啉黄	100.53	4.1	104.20	4.5	107.06	2.0
酸性橙 II	105.86	2.3	104.71	2.7	103.72	2.9
碱性橙 2	102.81	6.0	97.06	3.9	92.71	6.6
碱性橙 21	87.61	6.3	87.53	2.1	97.49	2.6
碱性橙 22	86.00	5.3	88.33	3.4	93.11	2.6
硫黄素 T	89.76	1.3	80.03	4.2	91.66	4.8
碱性嫩黄 O	83.86	4.3	93.51	3.9	101.81	1.2

2.3.3 样品检测结果

本次研究对购于市场的 38 批次样品进行了测定,其中小黄鱼 16 批次、黄颡鱼 12 批次、大黄鱼 10 批次。通过试样溶液与标准品溶液色谱峰的保留时间及离子相对丰度比进行定性判定,其中 1 批次大黄鱼检出碱性橙 2,2 批次小黄鱼检出碱性嫩黄 O,1 批次小黄鱼检出酸性橙 II,检测结果见表 4。碱性橙 2、碱性嫩黄 O、酸性橙 II 均为非食用物质,禁止在食品中使用^[3],检测结果提示上述批次黄鱼中可能存在违法使用非食用物质的行为。

表 4 4 批次阳性样本检测结果

Table 4 Test results for 4 positive samples

样品	来源	检测项目	检测结果
大黄鱼 1	菜市场	碱性橙 2	0.7 μg/kg
小黄鱼 3	菜市场	碱性嫩黄 O	1.1 μg/kg
小黄鱼 4	网购	碱性嫩黄 O	0.2 μg/kg
小黄鱼 5	网购	酸性橙 II	0.9 μg/kg

3 小结

本方法通过对液相色谱条件和质谱条件的优化,以及前处理方法的研究,建立了鱼肉组织中 9 种黄色染色剂同时快速检测的超高效液相色谱-串联质谱法。该方法简单快速,灵敏度高,可作为黄鱼、黄颡鱼等鱼类非法添加染色剂的检测分析,为打击鱼类非法染色的食品安全监管提供技术支持。

参考文献

- [1] 陈建军. 黄鱼中掺有柠檬黄色素事件的调查[J]. 职业与健康, 2002, 18(5): 43-44.
- [2] 浙江在线. 不法商贩在黄三鱼中添加黄栀 被判销售价款十倍

赔偿[EB/OL]. (2020-11-23)[2021-05-22]. https://zjnews.zjol.com.cn/zjnews/tznews/202011/t20201123_12438836.shtml.

- [3] 卫生部. 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第 1—5 批汇总)[EB/OL]. (2011-04-23)[2021-05-22]. <http://news.foodmate.net/2011/04/179287.html>.
- [4] 沙鸥, 陈太卫, 冯艳丽, 等. 大黄鱼中硫磺素 T 残留的 HPLC 分析[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(16): 3910-3911, 3914.
- [5] 王晓驊. 高效液相色谱法快速测定染色大黄鱼的案例分析[J]. 中国科技信息, 2013(17): 68.
- [6] 沙鸥, 陈丽, 马卫兴, 等. 高效液相色谱法测定黄鱼中非法添加色素柠檬黄含量[J]. 中国食品添加剂, 2013(6): 195-198.
- [7] 沙鸥, 陈太卫, 马卫兴, 等. 高效液相色谱法测定黄鱼中非法添加染料碱性嫩黄 O 含量[J]. 食品科技, 2014, 39(4): 281-284.
- [8] 李莎, 王银花, 叶麟, 等. HPLC 法同时测定食品中酸性橙 II 和碱性嫩黄 O 的含量[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 234-238, 246.
- [9] 杨毅华, 徐明敏, 陈波, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定葡萄干中 5 种工业染料[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 52-56.
- [10] 李永刚, 刘潇, 陈明, 等. 液质联用法检测黄鱼中的碱性橙、碱性嫩黄和酸性橙 II [J]. 公共卫生与预防医学, 2013, 24(2): 97-98.
- [11] 张兰, 姜玲玲, 高广慧. Oasis PRiME HLB-高效液相色谱-串联质谱法测定黄鱼中的碱性嫩黄 O [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 7849-7852.
- [12] 王多娇, 颜春荣, 甘凝岚, 等. LC-MS/MS 测定黄鱼中碱性嫩黄 O 及酸性橙 II [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(17): 94-96.
- [13] 邵国健, 朱文涛, 韩建康. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定膨化食品中 10 种工业染料[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(6): 784-788.