

液相串联质谱法测定豆制品中的碱性橙II和碱性嫩黄O

卢晓蕊 沈虹

(北京市产品质量监督检验所 北京 100013)

摘要 建立同时测定豆制品中的碱性橙II和碱性嫩黄O的液相串联质谱法。以乙醇为溶剂,经超声提取、离心分离,利用 Oasis HLB 固相萃取柱对样品进行净化,以0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇溶液为流动相,LC-MS/MS测定碱性橙II和碱性嫩黄O的含量。结果显示:在0~500 ng/mL内,碱性橙II和碱性嫩黄O所得的回归方程均呈较好的线性关系,相关系数>0.995,检出限为碱性橙II 0.5 μg/kg,碱性嫩黄O 0.8 μg/kg。该方法的平均回收率为87.2%~94.5%,RSD为1.65%~4.08%。

关键词 液相串联质谱法 碱性橙II 碱性嫩黄O

碱性橙II和碱性嫩黄O均为芳香胺类碱性工业染料,用于丝、麻、皮革、纸、草编织品等的染色,这2种物质对皮肤黏膜有轻度刺激,可引起结膜炎、皮炎和上呼吸道刺激症状,人接触或者吸入都会引起中毒,且很难自然降解,体内的残留物具有毒性、致癌性和致突变性,给消费者的健康带来了严重危害。

根据 GB2760-2007《食品添加剂使用卫生标准》规定^[1],这2种物质严禁作为食品添加剂使用。由于在中性及偏碱性条件下,碱性橙II和碱性嫩黄O与蛋白质吸附较牢固,不易褪色,因此有些不法商人就将其用于豆制品的染色,使腐竹、豆皮等豆制品的色泽光亮,欺骗消费者,使消费者的身体健康受到严重影响。目前报道的碱性橙II的检测方法主要是高效液相色谱法^[2-4]、单扫描极谱法^[5],碱性嫩黄O的检测方法主要有高效液相色谱法。本文建立了液相串联质谱法同时测定豆制品中的碱性橙II和碱性嫩黄O的方法,该方法简便、快速、定量准确,可用于日常的分析检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity 型超高效液相色谱(UPLC)仪,配TQD四级杆串联质谱仪(美国,Waters公司)2-16PK型冷冻离心机(美国Sigma公司),SK2510HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),固相萃取装置(戴安中国有限公司),氮吹仪(DSY-III,北京东方精

华苑科技有限公司)。

碱性橙II和碱性嫩黄O标准品,购于美国Sigma公司;甲醇、乙腈(色谱纯,北京迪马公司),固相萃取柱(Oasis HLB 6mL)(美国,Waters公司),实验用水为二级蒸馏水(屈臣氏公司),洗脱液:5%氨水甲醇,稀释液:V(甲醇):V(水)=50:50,定容液:V(甲醇):V(水)=50:50,含1%甲酸。

1.2 色谱条件

WATERS 充信号 BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司),柱温为 30℃,进样量为 2 μL。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/ min	流速/ (mL · min ⁻¹)	0.1% 甲酸甲醇 溶液 / %	0.1% 甲酸水 溶液 / %
0.00	0.2	50	50
3.00	0.2	70	30
4.00	0.2	50	50

1.3 质谱条件

离子源:ESI(+);检测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.5 kV;离子源温度:150℃;脱溶剂气温度:350℃;脱溶剂气流量:650 L/h;碱性橙II和碱性嫩黄O的质谱分析优化参数见表 2。

表 2 碱性橙II和碱性嫩黄O的质谱分析优化参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电 压 / V	碰撞能 量 / eV
碱性橙II	213.0	76.7	35	20
		121.1	35	20
碱性嫩黄O	268.1	147.0	35	30
		107.1	35	30

1.4 标准曲线的绘制

准确称取碱性橙II和碱性嫩黄O标准品各

第一作者:硕士,工程师(沈虹高级工程师为通讯作者)。

收稿日期:2011-02-17 改回日期:2011-07-15

0.0100 g,用少量甲醇溶解,移置 100 mL 容量瓶中,用稀释液稀释定容至刻度,配制成浓度为 0.10 mg/mL 的标准储备液。分别取适量该标准储备液,用稀释液稀释,配制成质量浓度为 0、50、100、200、300、400、500 ng/mL 的标准系列混合溶液(见表 3)。以峰面积(y)对质量浓度(x)绘制标准曲线。

表 3 碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 标准系列混合

		溶液的配制						ng/mL
系列	系列 1	系列 2	系列 3	系列 4	系列 5	系列 6	系列 7	
碱性橙 II	0	50	100	200	300	400	500	
碱性嫩黄 O	0	50	100	200	300	400	500	

1.5 样品预处理和测定

1.5.1 提取

将样品粉碎混匀,称取 5 g(准确至 0.01 g)样品,置于 50 mL 离心管中,加 5 g 无水 Na_2SO_4 ,10 mL 正己烷,超声 10 min,除去正己烷杂质层,再用 25 mL 无水乙醇超声提取 30 min,10 000 r/min,离心 10 min,将上层提取清液倾出置于离心管中,再次加入 10 mL 无水乙醇,重复提取 3 次,合并提取液,10 000 r/min,离心 10 min,将上层提取清液倾倒入圆底烧瓶中,于 40℃ 减压浓缩至近干,待净化。

1.5.2 净化

样品提取液用 10 mL 稀释液少量多次溶解,上 Oasis HLB 固相萃取柱(3 mL 甲醇 3 mL 水活化),加入 3 mL 样品提取液,调节流速为 2 mL/min,用 3 mL 水 3 mL 甲醇淋洗,5 mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液,在 40℃ 条件下氮气吹干,用定容液(甲醇与水体积比为 50:50,含 1% 甲酸)定容至 1 mL,经 0.2 μm 滤膜过滤后待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

反相色谱法的流动相常选甲醇、乙腈和四氢呋喃。甲醇对碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 有一定的溶解度、洗脱度、选择性好、试剂价廉易得,因此实验选用甲醇与水为基础的溶剂作流动相。流动相的酸度变化能改变溶质的解离程度和待测物的存在形式。因此,文中比较了不同流动相:水-甲醇梯度淋洗,0.1% 甲酸水-甲醇梯度淋洗,0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸甲醇梯度淋洗条件下,目标物的分离效率。结果显示,0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸甲醇梯度淋洗条件下,目标物 t_R 值最小,峰面积最大,分离效果和峰型最好。这是因为随着酸度增加,碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 分子

中的氨基质子化程度增加,摩尔吸光系数增大,峰面积增大。但是 pH 值过小,对色谱柱有影响。因此,本实验选择流动相为 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸甲醇溶液。图 1~图 3 分别为浓度为 100 ng/mL 碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 标准物质的总离子流图和子离子流图。碱性橙 II 的保留时间为 1.33 min,碱性嫩黄 O 的保留时间为 2.11 min。

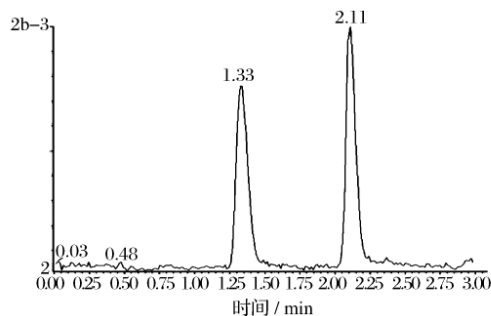


图 1 碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 总离子流图

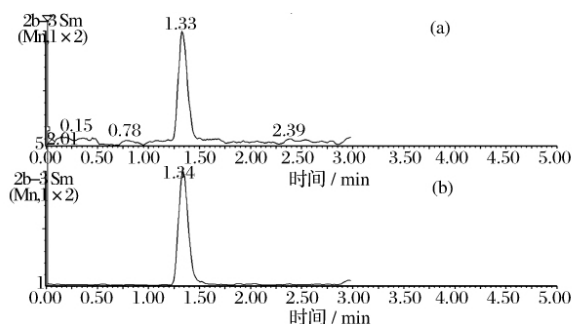


图 2 碱性橙 II 子离子流图(a - 定性 b - 定量)

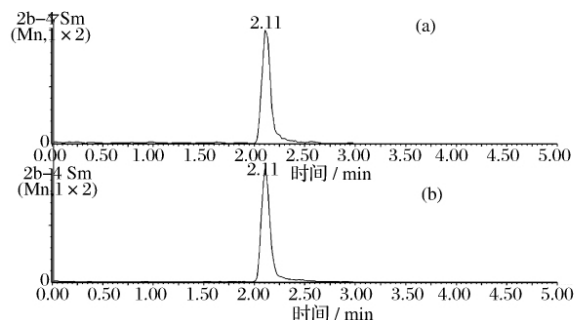


图 3 碱性嫩黄 O 子离子流图(a - 定性 b - 定量)

2.2 质谱条件的选择

首先配制 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 标准溶液,由注射泵直接进样。首先在正离子模式下进行母离子全扫描,碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 均有很强的分子离子峰,母离子分别在 213.0 m/z 和 268.1 m/z。再对以上母离子进行子离子扫描,优化质谱参数,如锥孔电压、碰撞电压、雾化气、锥孔气和碰撞气流量等,以使质谱灵敏度达到检测的要求。碱性橙 II

定量和定性分子离子分别是 76.7 m/z 和 121.1 m/z , 而碱性嫩黄 O 则分别采用 147.0 m/z 和 107.1 m/z 定量、定性。碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的母离子和子离子质谱图见图 4 ~ 图 7。

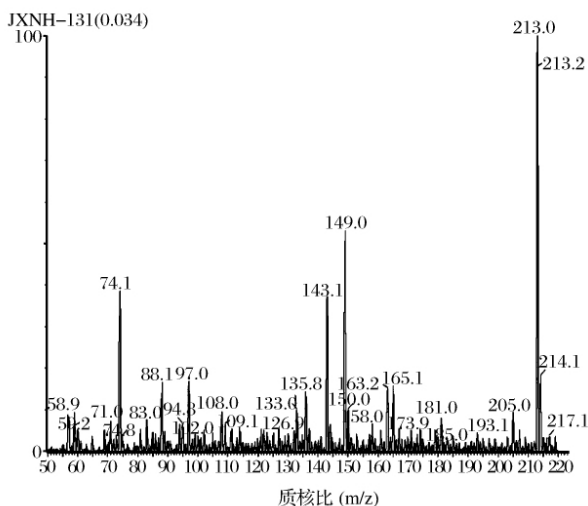


图 4 碱性橙 II 母离子质谱图

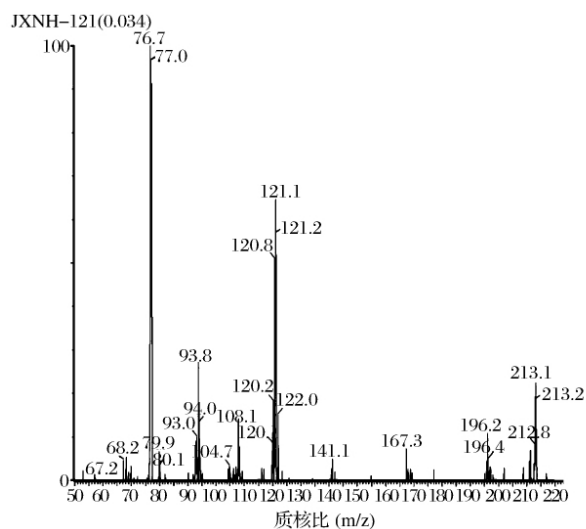


图 5 碱性橙 II 子离子质谱图

2.3 前处理条件的选择

提取溶剂的选择主要取决于被测物质和待测样品的性质。本实验分别采用水、甲醇和无水乙醇作为提取剂。实验发现,在水溶液中碱性染料极易被吸附,而用甲醇做提取液,提取效率不高。因此,本文采用正己烷萃取除去脂肪等杂质,然后再用无水乙醇提取,无水乙醇对碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 均有良好的溶解性,并且能有效排除油脂、胶质和蛋白质的干扰,提取效率高。同时,实验比较了聚酰胺小柱和 Oasis HLB 固相萃取小柱对样品的净化效果。结果表明,

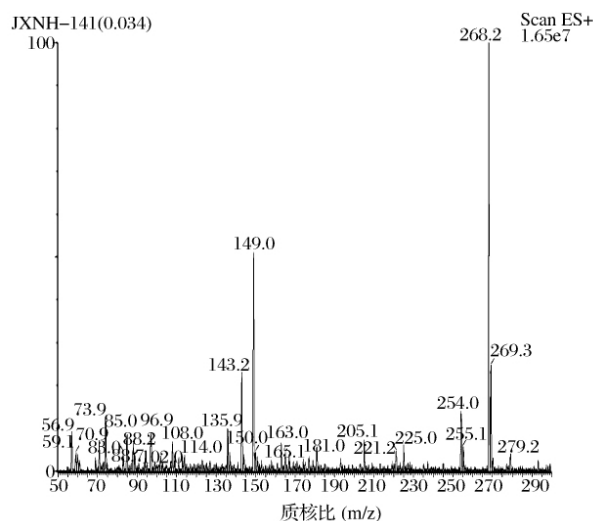


图 6 碱性嫩黄 O 母离子质谱图

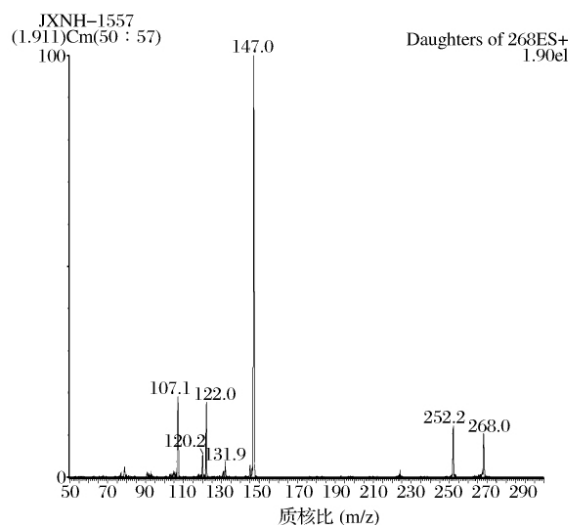


图 7 碱性嫩黄 O 子离子质谱图

聚酰胺小柱对碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的吸附和净化效果不理想,回收率较低。HLB 固相萃取小柱净化及回收率较好,因此样品采用 Oasis HLB 固相萃取小柱进行净化处理。经过该方法处理后,样品提取液杂质大量减少,颜色接近于无色,能有效延长色谱柱的使用寿命,有利于减小样品的离子抑制干扰,提高了检测的准确度。

2.4 标准曲线与检出限

配制不同浓度的标准溶液,分别得到碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的标准曲线、回归方程、相关系数及检出限(见表 4)。结果显示,在 0 ~ 500 ng/mL 的线性范围内,碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 所得的回归方程均呈较好的线性关系,相关系数 > 0.995。按信噪比为 3 计算,本方法中碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的检出限分

别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 4 碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的回归方程、相关系数及检出限

化合物	线性范围/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
碱性橙 II	0 ~ 500	$y = 148.824x - 88.876$	0.999 0	0.5
碱性嫩黄 O	0 ~ 500	$y = 200.9x - 211.872$	0.995 7	0.8

2.5 回收率与精密度实验

取不含碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的豆制品, 分别有豆皮、豆腐干、腐竹、素鸡、熏干 5 种豆制品为样本, 样本中选择 0.1, 1.0, 10.0 mg/kg 3 个高、中、低添加

浓度进行回收率试验, 每个添加浓度进行 6 次平行测定, 结果见表 5。结果显示, 该方法的平均回收率为 87.2% ~ 94.5%, RSD 为 1.65% ~ 4.08%, 结果能满足检测的要求。

2.6 实际样品检测

采用本方法对北京市场市售的 26 种豆制品, 包括豆腐、豆腐干、豆皮、腐竹、素鸡、熏干和烤干等进行了检测, 未发现样品中含有碱性橙 II 和碱性嫩黄 O。

表 5 样品加标回收试验结果 ($n=6$)

样品	低浓度(0.1 mg/kg) 加标				中浓度(1.0 mg/kg) 加标				高浓度(10.0 mg/kg) 加标			
	回收率/%		RSD/%		回收率/%		RSD/%		回收率/%		RSD/%	
	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O	碱性 橙 II	碱性 嫩黄 O
豆皮	89.6	88.9	1.65	3.69	91.2	87.2	2.98	2.86	89.3	89.1	2.01	2.43
豆腐干	94.5	93.4	2.97	3.57	92.8	94.1	2.60	2.17	93.3	93.5	2.26	2.95
腐竹	93.1	90.6	2.84	3.75	92.7	89.7	3.86	3.92	92.2	91.2	3.21	3.13
素鸡	90.4	92.3	1.99	2.33	89.2	91.6	2.71	3.07	91.6	91.2	2.87	3.21
熏干	88.7	87.4	3.21	2.94	89.6	87.8	2.35	4.08	89.4	89.1	3.56	3.40

3 结论

本文建立了豆制品中碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 的液相串联质谱检测方法。该方法回收率高, 流动相简单, 试剂易得, 分析时间短, 线性范围宽, 准确度和灵敏度高。可有效为各级产品质量监管部门对豆制品中碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 检测提供有力的技术支持, 提高产品质量, 保障人民身体健康。

参 考 文 献

[1] GB2760-2007. 食品添加剂使用卫生标准[S].

[2] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙、玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202-204.

[3] 肖义夫, 顾万红. 高效液相色谱法同时测定食品中的金橙 II 和苏丹红 I ~ IV [J]. 现代预防医学, 2007, 34(8): 1547-1549.

[4] 铁晓威, 黄百芬, 任一平. RP-HPLC 法测定染色黄鱼中的碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59-60.

[5] 陈文, 王正猛, 吴晓蓉, 等. 扫描极谱法连续测定食品中非食用色素酸性金黄和酸性大红[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 210-212.

Determination of Food Color of Basic Orange II and Basic Flavine O in Bean Products by LC-MS/MS

Lu Xiao-rui, Shen Hong

(Beijing Products Quality Supervision and Inspection Institute, Beijing 100013, China)

ABSTRACT To establish a LC-MS/MS method for simultaneous determination of Basic Orange 2 and Basic flavine O in soy product. The samples were extracted with ethanol and cleaned up by Oasis HLB solid phase extraction column, 0.1% water formic acid-0.1% methanol formic acid was used as mobile phase. Basic Orange 2 and Basic flavine O were determined by LC-MS/MS. There was a good linear relationship at the range of 0 ~ 500 ng/mL of Basic Orange 2 and Basic flavine O with $r > 0.995$, the limitation of detection of Basic Orange 2 and Basic flavine O were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The rate of recovery was from 87.2% to 94.5% and the relative standard deviations were from 1.65% to 4.08%. The method is rapid, accurate and suitable for simultaneous determination of Basic Orange 2 and Basic flavine O in soy product.

Key words LC-MS/MS, basic wrange II, basic flavine O