

## 高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中五种黄色化工染料

林赛君<sup>1\*</sup>, 屠海云<sup>1</sup>, 孙 岚<sup>1</sup>, 肖海龙<sup>1</sup>, 潘向荣<sup>1</sup>, 马晓燕<sup>2</sup>

( 1. 杭州市质量技术监督检测研究院, 浙江 杭州 310019 ; 2. 中国计量学院, 浙江 杭州 310018 )

**摘要** : 采用高效液相色谱-串联质谱法( HPLC-MS/MS )建立了食品中非法添加的碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 这 5 种黄色工业染料的定量定性分析方法。使用 Agilent ODS C18 分离柱( 50 mm × 2.0 mm, 1.8 μm ), 以 5 mmol/L 乙酸铵水溶液( 0.1% 甲酸 )-乙腈( 3:2, v/v )为流动相, 流速为 0.3 mL/min。采用电喷雾离子化源, 以多反应监测( MRM )方式分别在正、负离子模式下进行检测。在最佳检测条件下, 得到了较宽的线性范围和较低的定量检出限。碱性橙和碱性嫩黄的线性范围均为 5.0 ~ 80.0 mg/L, 酸性橙 I、酸性橙 II 及酸性黄 36 的线性范围均为 10.0 ~ 160.0 μg/L。食品中碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙 I、酸性橙 II 及酸性黄 36 的定量限分别为 20、20、40、40、40 ng/g。该方法重现性较好, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别不大于 0.50% 和 2.14%。本研究还测定了鸡肉、豆制品和黄色中添加了 5 种化工染料, 回收率在 79.8% ~ 95.2% 之间, 结果令人满意。

**关键词** : 高效液相色谱-串联质谱法 ; 黄色工业染料 ; 鸡肉 ; 豆制品 ; 黄色 ; 食品

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713( 2011 ) 01-0079-04

## Simultaneous determination of five yellow dyes in foods by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

LIN Saijun<sup>1\*</sup>, TU Haiyun<sup>1</sup>, SUN Lan<sup>1</sup>, XIAO Hailong<sup>1</sup>, PAN Xiangrong<sup>1</sup>, MA Xiaoyan<sup>2</sup>

( 1. Hangzhou Institution of Quality and Technical Supervision and Inspection, Hangzhou 310019, China ;  
2. China Jiliang University, Hangzhou 310018, China )

**Abstract** : A method based on high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry ( HPLC-MS/MS ) was developed for simultaneous determination of five yellow industrial dyes. The separations were performed with an Agilent ODS C18 column at a flow rate of 0.3 mL/min. The mobile phase was 5 mmol/L ammonium acetate ( containing 0.1% formic acid )-acetonitrile ( 3:2, v/v ). Under the optimized detection conditions, the linear ranges for Chrysoidine G and Basic Yellow 2 were 5.0 – 80.0 mg/L, and for Acid Orange I, Acid orange II and Acid Yellow 36 were 10.0 – 160.0 μg/L. The limits of quantification for Chrysoidine G, Basic Yellow 2, Acid Orange I, Acid Orange II and Acid Yellow 36 were 20, 20, 40, 40 and 40 ng/g, respectively. The relative standard deviations of reproducibility of this method for retention time and peak area were no more than 0.50% and 2.14%, respectively. The method was applied to determine the recoveries of the above five dyes in chicken, bean products and yellow croaker were between 79.8% – 95.2% with satisfactory results.

**Key words** : high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry ( HPLC-MS/MS ); yellow industrial dyes ; chicken ; bean products ; yellow croaker ; foods

近几年来有很多关于向黄色、鸡肉、咸菜及豆制品等食品中非法添加违禁黄色工业染料的报道。在这些违禁黄色化学染料中, 碱性橙、碱性嫩黄、酸性

橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 毒性较大, 均为国家禁止在食品中添加的有毒化学染料。碱性橙、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 为偶氮类工业染料, 比食

\* 通讯联系人 : 林赛君, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。Tel : ( 0571 ) 81995233.

基金项目 : 浙江省质量技术监督系统青年科技创新计划项目( No. 20090307 )。

收稿日期 : 2010-09-09

用色素更容易使鱼类表皮着色,且不易褪色,通过这些染料染色后的杂鱼和养殖黄鱼的颜色与野生黄鱼极为相近,因而常被不法商贩用于这类食品的着色。

目前碱性橙的分析方法有高效液相色谱法(HPLC)<sup>[1-3]</sup>、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)<sup>[4,5]</sup>;碱性嫩黄的分析方法有HPLC法<sup>[1,5]</sup>、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)<sup>[6]</sup>等;酸性橙的主要分析方法有HPLC-MS法<sup>[7]</sup>、HPLC法<sup>[8,9]</sup>、示波极谱法<sup>[10]</sup>等。目前还未见同时测定食品中碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 的报道。本文建立了 HPLC-MS/MS 同时检测食品中碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 的方法,并获得了较好的结果。该方法对于监控这些工业染料在食品中的非法添加情况具有应用价值。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

Agilent 6410A 高效液相色谱/质谱联用仪。碱性橙和酸性橙 I 购自 Fluka 公司,碱性嫩黄购于 Tokyo Tgi 公司,酸性橙 II 和酸性黄 36 购自 Dr. Ehrenstorfer 公司。WAX 固相萃取柱(Waters, 60 mg/3 mL)。乙酸铵、甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯试剂,实验用水为 Millipore 超纯水。黄鱼、豆腐干和鸡肉样品购自当地超市。

称取一定量的 5 种标准品的固体粉末溶解于甲醇,配制质量浓度为 100 mg/L 的单标准储备液。分别吸取碱性橙和碱性嫩黄各 1 mL、酸性橙 I、酸性橙 II 及酸性黄 36 各 2 mL 的单标准储备液到 100 mL 容量瓶,用流动相定容至刻度,配制成含 1 mg/L 碱性橙和碱性嫩黄,含 2 mg/L 酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄 36 的混合标准溶液,检测时用流动相配制所需浓度的工作溶液。

### 1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent ODS C18 柱(50 mm × 2 mm, 1.8 μm);流动相:5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)-乙腈(3:2, v/v);流速:0.3 mL/min;进样体积:1 μL,柱温 30 ℃。

### 1.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI),正、负离子方式检测;检测模式:多反应监测(MRM);干燥气温度:350 ℃;干燥气流速:10 L/min;喷雾器:206.8 kPa;毛细管电压:4 000 V;校准方法:质量轴自动调谐校准。其他条件见表 1。

### 1.4 样品的前处理

取 200 g 样品(可食部分),均质后备用。

表 1 5 种黄色染料标准物质的主要特征离子

Table 1 Characteristic ions of standards of five yellow dyes

Dye	Mode	Parent ion ( <i>m/z</i> )	Daughter ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage/ V	Collision energy/ eV
Chrysoidine G	+	213	196/121	120	20
Basic Yellow 2	+	268	252/147	120	35
Acid Orange I	-	327	247/171	120	20
Acid Orange II	-	327	171/156	120	25
Acid Yellow 36	-	352	156	120	30

称取 1.0 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇(含 1% 甲酸)-50 mmol/L 乙酸铵水溶液(1:1, v/v)组成的提取液,超声提取 30 min,以 10 000 r/min 速率离心 10 min 后,将上清液转移至另一离心管中,残渣中加入 10 mL 提取液再次提取。合并两次提取液定容至 20 mL。

取 5.0 mL 上述样品提取液,用固相萃取柱平衡溶液(含 1% 甲酸的 50 mmol/L 乙酸铵水溶液)稀释定容至 10 mL,过 WAX 固相萃取柱(事先依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水、3 mL 平衡溶液活化),然后分别用 2 mL 上述提取液淋洗、2 mL 水洗柱、5 mL 洗脱液(含 5% 氨水的甲醇溶液)洗脱。收集洗脱液,氮气吹至近干,并用 1.0 mL 流动相溶解,经 0.22 μm 滤膜过滤后,利用 HPLC-MS/MS 仪测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件优化

为选择提取效果最佳的提取液,取均质后的黄鱼、豆腐干和鸡肉样品各 50 g,加入 100 mg/L 5 种黄色染料的标准溶液 2 mL,充分混匀,放置 24 h。

称取 1.0 g 样品,分别以 10 mL 的无水乙醇、75% 乙腈水溶液、甲醇(含 1% 甲酸)-50 mmol/L 乙酸铵水溶液(1:1, v/v)、50% 甲醇溶液及甲醇为提取液,每个样品提取两次,每次超声提取 30 min,10 000 r/min 离心 10 min;合并两次提取液,上清液定容至 20 mL,过 0.22 μm 滤膜后用 HPLC-MS/MS 测定。每种提取方法重复测定 3 个样品。上述 5 种提取液的提取率依次为 49% ~ 60%、26% ~ 36%、66% ~ 88%、68% ~ 87%、69% ~ 85%。可以看出甲醇(含 1% 甲酸)-50 mmol/L 乙酸铵水溶液(1:1, v/v)、50% 甲醇溶液和甲醇这 3 种提取液的提取效果基本一致。考虑到甲醇比水溶液更易挥发,污染严重,且质谱检测时乙酸铵对离子化更有利,综合考虑后采用甲醇(含 1% 甲酸)-50 mmol/L 乙酸铵水溶液(1:1, v/v)作为提取液。

为了去除样品中的杂质,减少基质干扰,采用固相萃取小柱对样品净化浓缩。考察了不同型号(Waters HLB, C18, MCX 及 WAX)的小柱的浓缩效果,发现 Waters WAX 固相萃取柱能有效去除杂质,并且对 5 种染料均有较好的净化浓缩效果,提高了检测灵敏度。

## 2.2 标准曲线与定量检出限

用流动相稀释标准储备液来制备以下 5 种混合标准溶液。其中含有碱性橙和碱性嫩黄的质量浓度依次为 5.0、10.0、20.0、40.0、80.0  $\mu\text{g/L}$ ;含有酸性

橙 I、酸性橙 II、酸性黄 36 的质量浓度依次为: 10.0、20.0、40.0、80.0、160  $\mu\text{g/L}$ 。图 1a 和 b 为 5 种染料的质量浓度分别为 5.0、5.0、10.0、10.0、10.0  $\mu\text{g/L}$  的混合标准溶液的 MRM 色谱图。以 5 种染料的质量浓度  $X$  ( $\text{mg/L}$ ) 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,同时以信噪比( $S/N$ )为 10 时对应的质量浓度换算成在样品中的含量确定方法的定量限,结果见表 2。由表 2 可以看出本方法具有较宽的线性范围,线性关系良好。

表 2 5 种黄色染料的线性回归方程、相关系数、线性范围及定量检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients ( $r$ ), linear ranges and limits of quantification of the five yellow dyes

Dye	Regression equation	$r$	Linear range/( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ/( $\text{ng/g}$ )
Chrysoidine G	$Y = 464243.01X - 377.33$	0.9989	5.0 - 80.0	5
Basic Yellow 2	$Y = 618022.58X + 857.5$	0.9989	5.0 - 80.0	5
Acid Orange I	$Y = 185153.23X + 141.25$	0.9998	10.0 - 160.0	10
Acid Orange II	$Y = 193995.97X + 57.13$	0.9998	10.0 - 160.0	10
Acid Yellow 36	$Y = 1093970X - 772.96$	0.9997	10.0 - 160.0	10

$Y$ : peak area;  $X$ : mass concentration,  $\mu\text{g/L}$ .

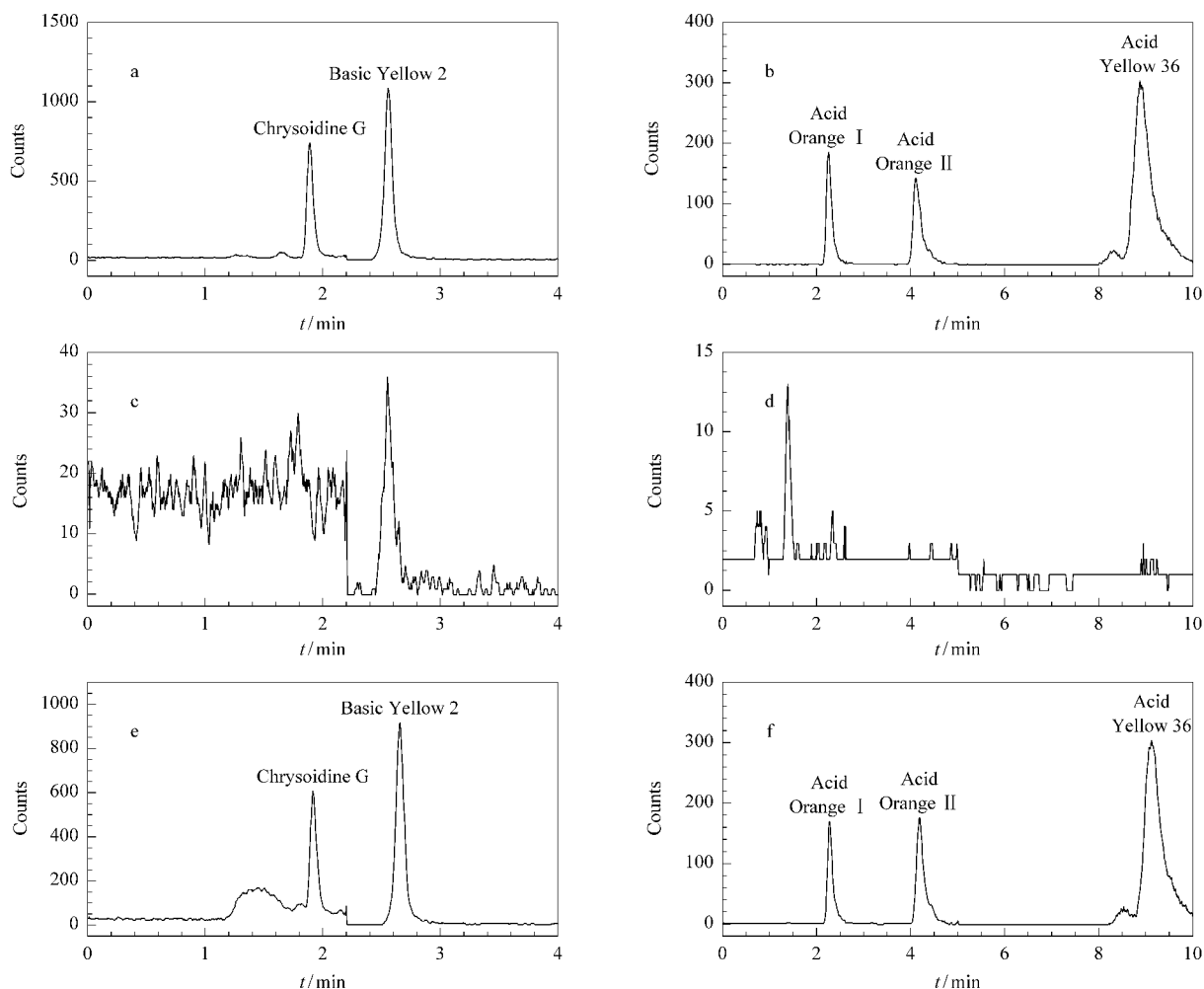


图 1 (a, b) 5 种染料混合标准溶液、(c, d) 黄鱼基质空白及 (e, f) 该空白样品在定量限添加水平下的 MRM 谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of (a, b) a mixed standard solution of five yellow dyes, (c, d) a blank yellow croaker sample and (e, f) the blank sample spiked with five yellow dyes

### 2.3 重现性、回收率和精密度实验

向豆制品、黄鱼和鸡肉 3 种食品样品中分别添加 5 种黄色工业染料标准品溶液, 3 种食品样品中碱性橙和碱性嫩黄的加标水平为 20、40、100 ng/g; 酸性橙 I、酸性橙 II、酸性黄为 40、80、200 ng/g, 每个加标水平重复测定 6 次。图 1c~f 为黄鱼基质空白及其在定量限水平下加标的 MRM 色谱图。不同食品中黄色工业染料的加标回收结果见表 3, 回收

率在 79.80% ~ 95.20% 之间, 相对标准偏差(RSD) 小于 4.0%。

为考察仪器的重现性, 以质量浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的碱性橙、碱性嫩黄和质量浓度为 200  $\mu\text{g/L}$  的酸性橙 I、酸性橙 II、酸性嫩黄 36 的混合标样为例, 重复测定 5 次, 保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.07% ~ 0.50% 和 1.40% ~ 2.14% 之间。本方法的重复性、回收率和精密度均令人满意。

表 3 不同食品中 5 种黄色染料的回收率和精密度

Table 3 Recoveries and precisions of the five yellow dyes in different foods

Food	Dye	Spiked/(ng/g)	Found/(ng/g)	Recovery/%	RSD (n=6)/%
Bean product	Chrysoidine G	20.0	18.4	92.00	3.1
	Basic Yellow 2	20.0	18.5	92.50	2.6
	Acid Orange I	40.0	35	87.50	2.8
	Acid Orange II	40.0	32	80.00	3.0
	Acid Yellow 36	40.0	36	90.00	3.3
Yellow croaker	Chrysoidine G	40.0	37.5	93.75	2.8
	Basic Yellow 2	40.0	38	95.00	1.9
	Acid Orange I	80.0	72	81.30	3.5
	Acid Orange II	80.0	71.2	82.25	3.2
	Acid Yellow 36	80.0	73.2	79.80	2.6
Chicken	Chrysoidine G	100.0	95.2	95.20	2.5
	Basic Yellow 2	100.0	94	94.00	2.3
	Acid Orange I	200.0	162.6	89.95	1.8
	Acid Orange II	200.0	164.5	90.30	2.7
	Acid Yellow 36	200.0	159.6	87.38	1.6

### 3 结语

本文运用 HPLC-MS/MS 法同时测定食品中非法添加的碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙 I、酸性橙 II 及酸性黄 36。建立的方法具有快速、灵敏、准确等优点, 可用于食品中上述 5 种非法添加的黄色工业染料的同时测定及确证。该方法可为建立食品中非法添加黄色工业染料的检测提供借鉴。

#### 参考文献:

[1] Lin Q. Chinese Journal of Chromatography (林钦. 色谱), 2007, 25(5): 776  
 [2] Shu P, Yang W H, Zhao H J, et al. Yunnan Chemical Technology (舒平, 杨卫花, 赵浩军, 等. 云南化工), 2009, 36(5): 24  
 [3] Zheng X Y. Journal of Analytical Science (郑小严. 分析科学学报), 2009, 25(4): 409

[4] Wang X, Song G X, Wu W P, et al. Chromatographia, 2008, 68(7/8): 659  
 [5] Gao J, Yin F, He G L, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (高洁, 尹峰, 何国亮, 等. 分析试验室), 2008, 27: 230  
 [6] Zhang H Q, Liang L J, He Z Y, et al. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (张海琪, 梁丽军, 何中央, 等. 质谱学报), 2010, 31(1): 48  
 [7] Chen C X, Liu H H, Zhong Y T, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (陈春晓, 刘红河, 仲岳桐, 等. 中国卫生检验杂志), 2008, 18(11): 2209  
 [8] Li Y S, Pan Y, Chen Y. Occupation and Health (李亚森, 潘英, 陈艳. 职业与健康), 2008, 24(2): 123  
 [9] Jiang Y H, Chen Y B, Qiu S D, et al. Food Research and Development (江迎鸿, 陈亚波, 邱舜钊, 等. 食品研究与开发), 2009, 30(7): 153  
 [10] Chen D Y, Gou J R, Yu R. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (陈大义, 苟家蓉, 余蓉. 中国卫生检验杂志), 2001, 11(2): 170