

LCMS-IT-TOF测定食品中五种偶氮类黄色染料的检测技术研究

LCMS-IT-TOF-021

摘要： 本文采用LCMS-IT-TOF法建立了食品中非法添加的碱性嫩黄、碱性橙、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄36工业染料的定量检测方法，进行三级质谱分析并推导出可能的裂解规律。通过对样品的超声提取、离心、固相萃取、浓缩和上机，建立了同时检测五种染料的液相色谱质谱联用分析方法，测得的线性范围：酸性橙 I、酸性橙 II 及酸性黄36为50.0~1000.0 ng/mL；碱性嫩黄和碱性橙为5.0~100.0 ng/mL， $r \geq 0.9977$ 。定量检出限为：碱性嫩黄10 ng/mL；碱性橙7 ng/mL；酸性橙 I 58 ng/mL；酸性橙 II 52 ng/mL；酸性黄41 ng/mL，方法重现性相对标准偏差：1.4~2.1%。

关键词： 偶氮类黄色染料 液相色谱-质谱法 添加剂 LCMS-IT-TOF

近几年来在食品中频频发现关于违禁黄色化学染料及违规色素在黄鱼、鸡肉、咸菜及豆制品中的非法添加使用。虽然国家监督部门严加禁止了化学染料在食品中的使用，但仍有不法商人使用违禁化学染料来掩盖食品的真相(掺伪)达到卖相好，以次充鲜、以假乱真、抬高价格以谋取暴利的目的，此类掺伪现象普遍存在，使消费者的健康受到严重危害。

在这些违禁黄色化学染料中，主要有碱性橙、碱性嫩黄O、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄36这五种毒性较大的化学物质(图1)，均为国家禁止在食品中使用的黄色有毒化学染料，且碱性橙、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄36为偶氮类工业染料，比食用色素更易与鱼类表皮着色，不易退色，染色后的杂鱼和养殖黄鱼的表面颜色与野生黄鱼的颜色极为相近。使用黄色染料对杂鱼进行染色的目的是对鱼体泛白、脱鳞、质量偏差的小黄鱼起到美色以谋取暴利。

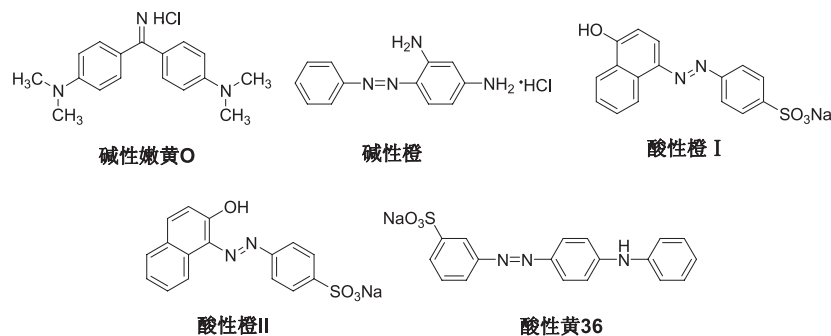


图1 本文研究的几种染料的结构式

鉴于这几年频频发生的食品安全问题，在染色黄鱼、染色豆制品的事件中暴露出的问题，急需对食品制造业产品中禁用化学染料的使用进行市场调研，抽取可能添加黄色化学染料的食品进行检测，并汇总检测结果。目前碱性橙的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法及气相色谱-质谱联用法，碱性嫩黄的检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等。酸性橙的主要检查方法有液相色谱-质谱联用法、液相色谱法、示波极谱法等。这些方法容易在检测过程中产生较大误差，尤其对于复杂基质检测灵敏度较低，而且并没有同时检测五种染料(碱性嫩黄、碱性橙、酸性橙 I、酸性橙 II 和酸性黄36)的方法。目前缺少一套灵敏度高、检测限低的检测方法。高效液相-电喷雾质谱的联用(HPLC/ESI/MS)具有分析速度快、分辨率高和灵敏度高的特点，已广泛应用于药物的检测及其它相关领域。而采用IT-TOF检测的方法至今没有报道。本文建立了一种50 mmol/L 乙酸铵水溶液含甲醇50%、甲酸1%超声提取、WAX固相萃取柱净化、氮吹浓缩并用离子阱飞行时间串联质谱(LCMS-IT-TOF)的测定方法。IT-TOF高灵敏度、高分辨率、高质量数准确度、及可行的线性范围，在复杂基质多残留检测应用领域具有光明的前景。

实验方法

1.1 仪器及方法

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪岛津UFLCXR系统，包括LC-20ADXR×2(输液泵)，SIL-20ACXR(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，DGU-20A3(在线脱气机)和LCMSsolution(工作站)。质谱仪：岛津LCMS-IT-TOF。

1.1.1 仪器

碱性橙和酸性橙 I 购自FLUKA，碱性嫩黄购自TOKYO TGI、酸性橙 II 和酸性黄36购自Dr.Ehrenstorfer GmbH公司。标准储备液：100 μg/mL，称取五种标准品的固体粉末溶解于甲醇溶液。临用时用流动相配制成需要浓度的工作溶液。醋酸铵，甲酸，乙腈，甲醇溶液均为色谱纯试剂。流动相用水为Milli-Q超纯水。

1.1.3 HPLC条件

流动相A：5 mM醋酸铵0.1%甲酸水溶液；流动相B：乙腈；流速：0.2 mL/min；色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS，2.0 mm×75 mm，2.2 μm；进样体积：5 μL；柱温：40℃；洗脱方式：梯度洗脱；梯度条件：流动相初始30%B。

Time	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	60
6.00	Pumps	Pump B Conc.	60
6.10	Pumps	Pump B Conc.	30
10.00	Controller	Stop	

1.1.4 质谱条件

离子源：ESI，正负离子同时检测；采集范围：m/z 150-500；加热模块温度：250℃；CDL温度：200℃；雾化气流速：1.5 L/min；干燥气流速：10 L/min；离子源电压：正离子+4.5 kV，负离子-3.5 kV；检测器电压：1.70 kV；校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

1.2 样品的前处理

称取1.0 g试样于50 mL离心管中，加入10 mL提取溶液(50 mmol/L乙酸铵水溶液含甲醇50%、甲酸1%)，超声提取30 min，10000 r/min离心10 min，上清液转移至另一离心管中，残渣中加入10 mL提取溶液再次提取，合并两次提取溶液。

取5.0 mL样品提取液，用固相萃取柱平衡溶液(50 mmol/L乙酸铵水溶液含甲酸1%)稀释定容至50 mL，过WAX固相萃取柱(3 mL甲醇、3 mL水、3 mL平衡溶液活化)，用2 mL淋洗液(50 mmol/L乙酸铵水溶液含甲醇5%，甲酸1%)、2 mL水、5 mL洗脱液(5%氨水甲醇)洗脱，收集洗脱液，氮气吹至近干，用样品稀释液(5 mmol/L乙酸铵水溶液含甲醇50%、甲酸1%)定容至1.0 mL，过0.22 μm滤膜后液相色谱质谱测定。

1.3 样品的分离条件

经过流动相条件优化，最终选取5 mM醋酸铵0.1%甲酸水溶液做流动相A，乙腈为流动相B，在此流动相条件下，酸性橙 I、酸性橙 II、酸性黄36在负离子模式下检测；碱性嫩黄和碱性橙在正离子模式下检测，且均有良好峰形和响应。下图2为1 μg/mL五种混标的色谱图。

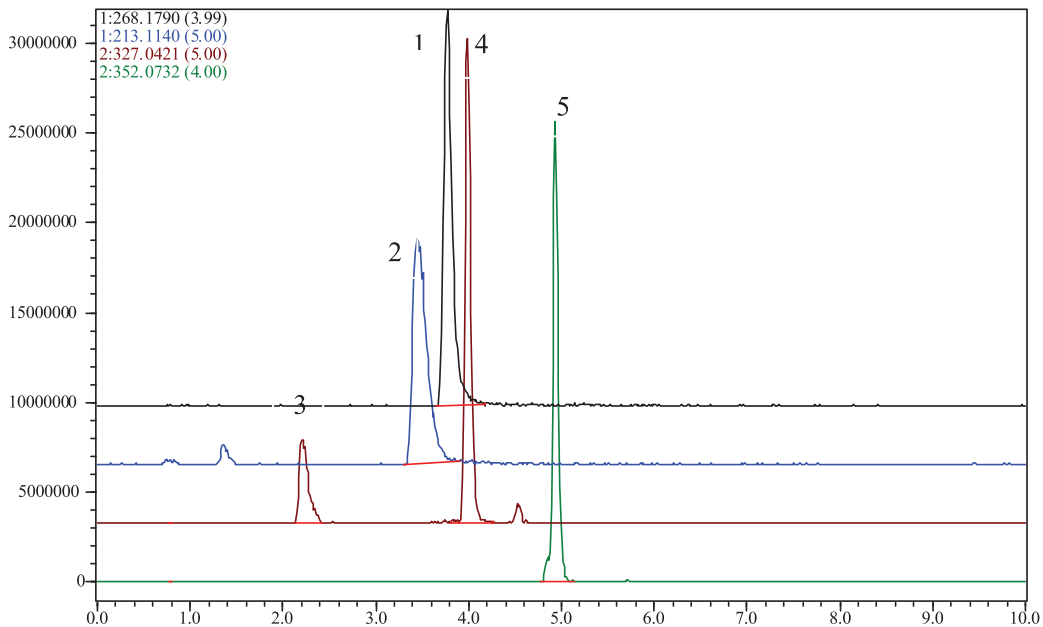


图2 五种染料混标色谱图(1.碱性嫩黄；2.碱性橙；3.酸性橙 I；4.酸性橙 II；5.酸性黄 36)

结果

2.1 定量分析

2.1.1 标准曲线与检出限

表1 五种染料的线性回归方程、相关系数及检出限

染料名称	线性回归方程	相关系数	检出限 LOQs(ng/mL)
碱性嫩黄	$Y=(33,155.96)X+(520,990.4)$	0.9977	10
碱性橙	$Y=(240,170.8)X+(214,779.1)$	0.9994	7
酸性橙 I	$Y=(5,695.165)X+(30,429.100)$	0.9991	58
酸性橙 II	$Y=(20,225.69)X+(168,886.8)$	0.9998	52
酸性黄 36	$Y=(21,787.80)X+(155,560.0)$	0.9996	41

注：Y为峰面积，X为进样浓度(ng/mL)

标准储备液用甲醇稀释配制以下工作溶液。工作溶液：酸性橙 I、酸性橙 II、酸性黄36混标系列浓度为：50.0, 100.0, 200.0, 500.0, 1000 ng/mL；碱性嫩黄和碱性橙依次为：5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 ng/mL，分别得到5种染料的标准工作曲线(图3)及线性回归方程(表1)，分别测得线性范围如下：酸性橙 I、酸性橙 II及酸性黄36 50.0~1000.0 ng/mL；碱性嫩黄和碱性橙5.0~100.0 ng/mL， $r \geq 0.9977$ 。以3倍信噪比计算五种染料的检测限(LOD)如下：碱性嫩黄：10 ng/mL；碱性橙：7 ng/mL；酸性橙 I：58 ng/mL；酸性橙 II：52 ng/mL；酸性黄：41 ng/mL。

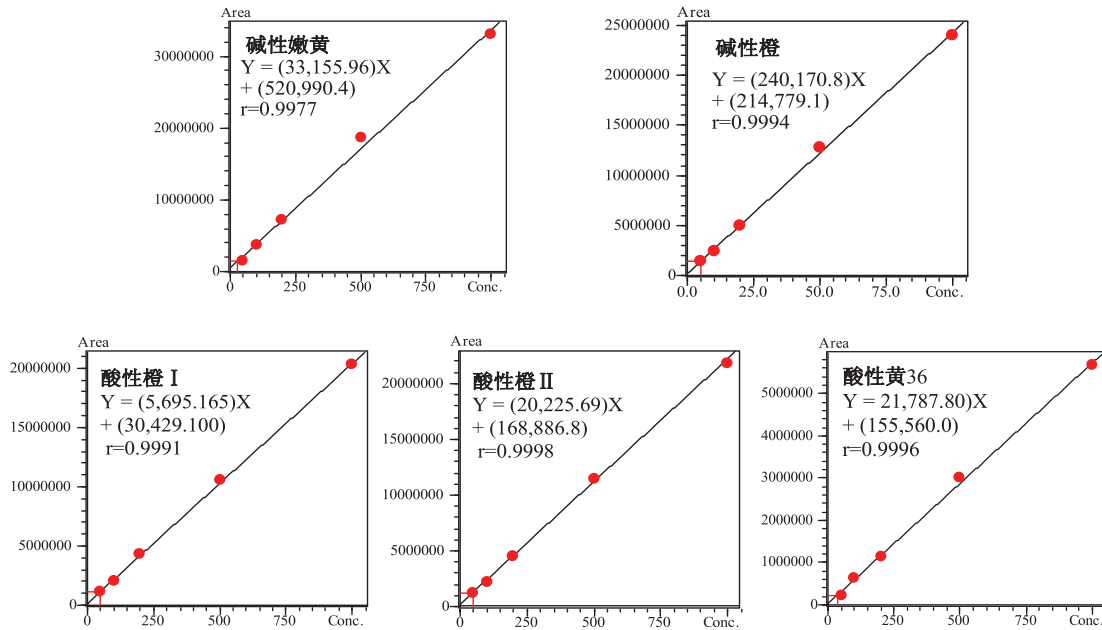


图3 几种染料的标准工作曲线

2.1.2 重现性和回收率实验

以1000 ng/mL酸性橙 I、酸性橙 II、酸性黄36和100 ng/mL碱性嫩黄和碱性橙标准溶液为例，每个样品检测5次，考察仪器的重现性，数据如表2。从表2中可以看出，经过对5个样分别进行5次重复测定，方法重现性相对标准偏差：1.4~2.1%。

表 2 五种染料的重现性实验

项目	碱性嫩黄		碱性橙		酸性橙 I		酸性橙 II		酸性黄 36	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
1	3.770	36,383,007	3.427	26,740,858	2.208	6,595,053	3.986	24,081,372	4.935	26,123,953
2	3.770	35,973,927	3.471	25,394,720	2.214	6,833,800	3.990	23,999,640	4.937	25,891,875
3	3.772	35,126,712	3.457	26,463,336	2.215	6,583,618	3.991	24,101,678	4.938	25,868,132
4	3.769	35,381,408	3.471	26,488,084	2.222	6,857,912	3.990	24,797,374	4.936	25,997,324
5	3.768	35,293,079	3.467	26,322,481	2.213	6,619,822	3.990	24,501,573	4.941	27,206,734
平均	3.770	35,631,627	3.459	26,281,896	2.214	6,698,041	3.989	24,296,327	4.937	26,217,604
RSD%	0.039	1.48	0.53	1.97	0.22	2.02	0.049	1.40	0.047	2.14

分别取三种食品，添加三种浓度的五种黄色化工染料标准品溶液，测定其加标回收结果，得出在不同食品中黄色化工染料的回收率在79.80~95.20%之间，RSD($\%$)<math><5.0</math>。

表 3 五种染料的回收率实验

黄色染料	食品类型	本底值	添加量 (ng/g)	测定值 (ng/g)	回收率 (%)	RSD (% $, n=6$)
碱性嫩黄	豆制品	ND	20.0	18.4	92.00	3.1
	黄鱼	ND	40.0	37.5	93.75	2.8
	肉	ND	100.0	95.2	95.20	2.5
碱性橙	豆制品	ND	20.0	18.5	92.50	2.6
	黄鱼	ND	40.0	38	95.00	1.9
	肉	ND	100.0	94	94.00	2.3
酸性橙 I	豆制品	ND	80.0	72	90.00	2.9
	黄鱼	ND	200.0	162.6	81.30	3.5
	肉	ND	400.0	359.8	89.95	1.8
酸性橙 II	豆制品	ND	80.0	71.2	89.00	2.8
	黄鱼	ND	200.0	164.5	82.25	3.2
	肉	ND	400.0	361.2	90.30	2.7
酸性黄 36	豆制品	ND	80.0	73.2	91.50	3.1
	黄鱼	ND	200.0	159.6	79.80	2.6
	肉	ND	400.0	349.5	87.38	1.6

2.2 定性分析

采用流动注射模式，分别进2 μg/mL五种染料单标溶液分析，得到样品的多级测试结果。

2.2.1 碱性嫩黄(C₁₇H₂₁N₃·HCl)

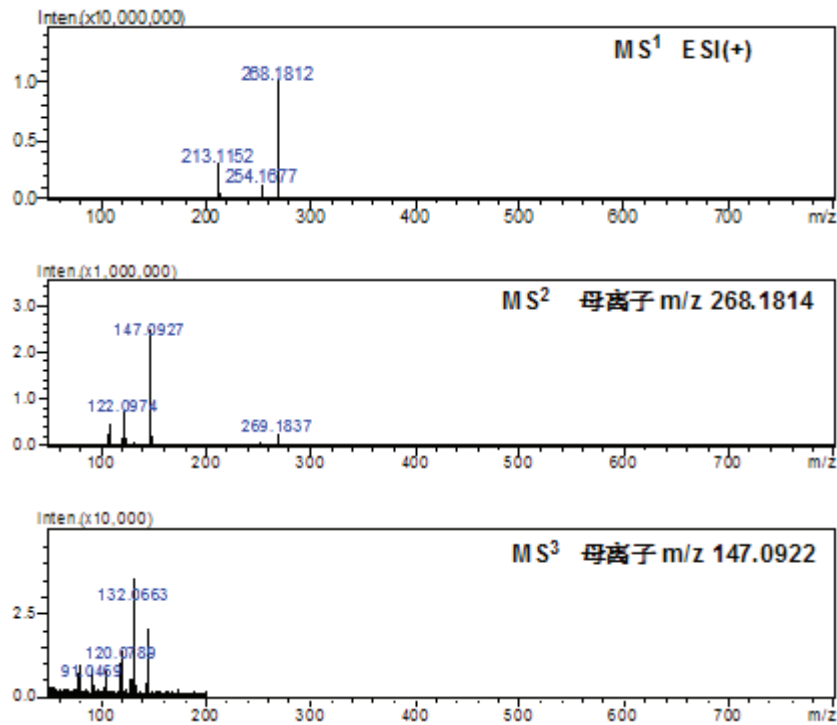


图4 碱性嫩黄的裂解图谱

在正离子模式下，碱性嫩黄的[M+H]⁺分子离子峰为268，其特征碎片离子为m/z 147与m/z 132。这可能是质子化的碱性嫩黄丢失苯胺部分后产生特征的碎片离子m/z 147，进一步通过丢失甲基产生自由基离子m/z 132，这些离子代表了碱性嫩黄的结构特点，都可以作为定性分析这类化合物的特征离子。碱性嫩黄可能的碎裂机理推测如下：

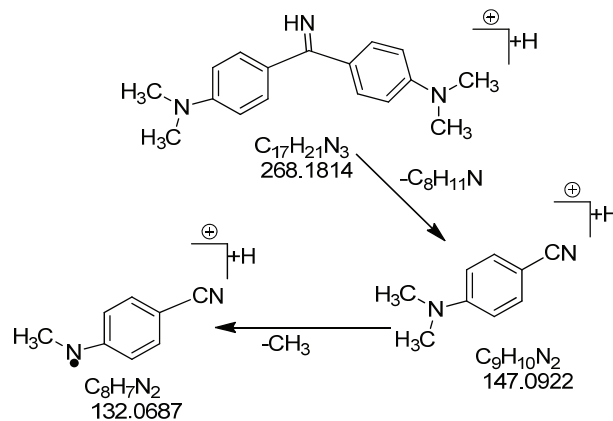


图5 碱性嫩黄(C₁₇H₂₁N₃·HCl)的裂解规律

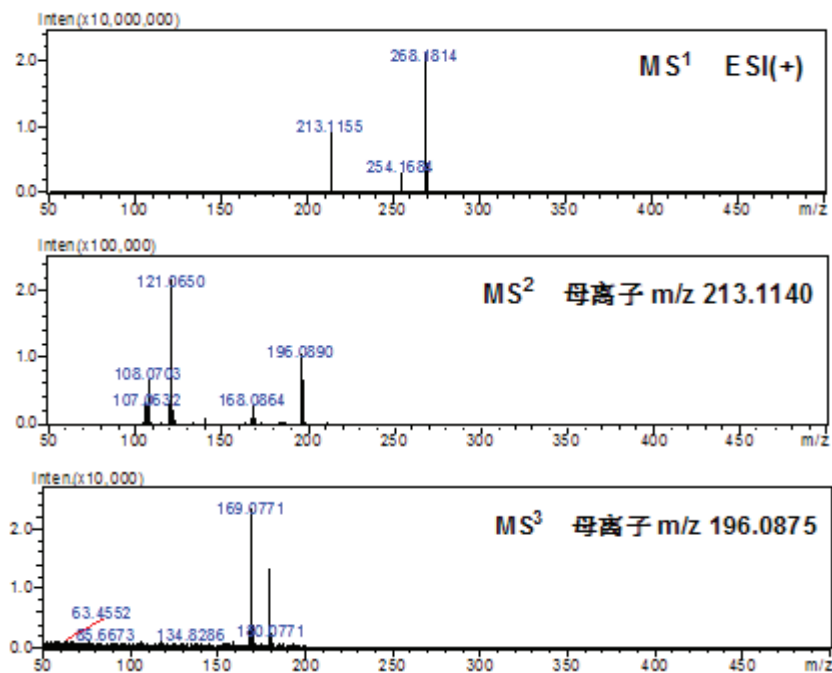
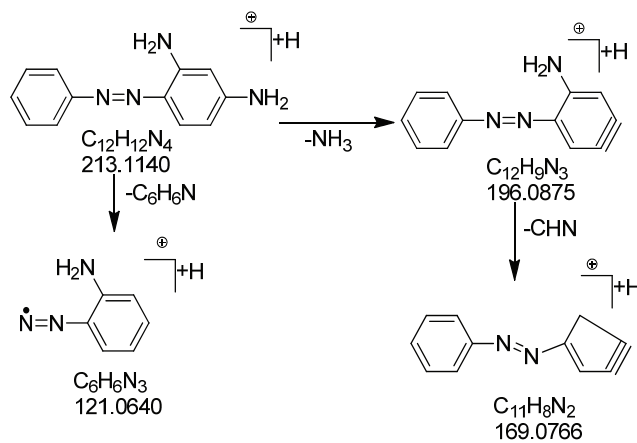
2.2.2 碱性橙($C_{12}H_{12}N_4 \cdot HCl$)


图6 碱性橙的裂解图谱

在正离子模式下，碱性橙的 $[M+H]^+$ 分子离子峰为213，其特征碎片离子为 m/z 196， m/z 169与 m/z 121。质子化的碱性橙除了发生一般的中性丢失例如氨基得到碎片离子 m/z 196，这个碎片离子进一步丢失 CHN 得到碎片离子 m/z 169，同时也发生丢失苯环部分产生特征的自由基碎片离子 m/z 121。碱性橙可能的碎裂机理推测如下：


 图7 碱性橙($C_{12}H_{12}N_4 \cdot HCl$)的裂解规律

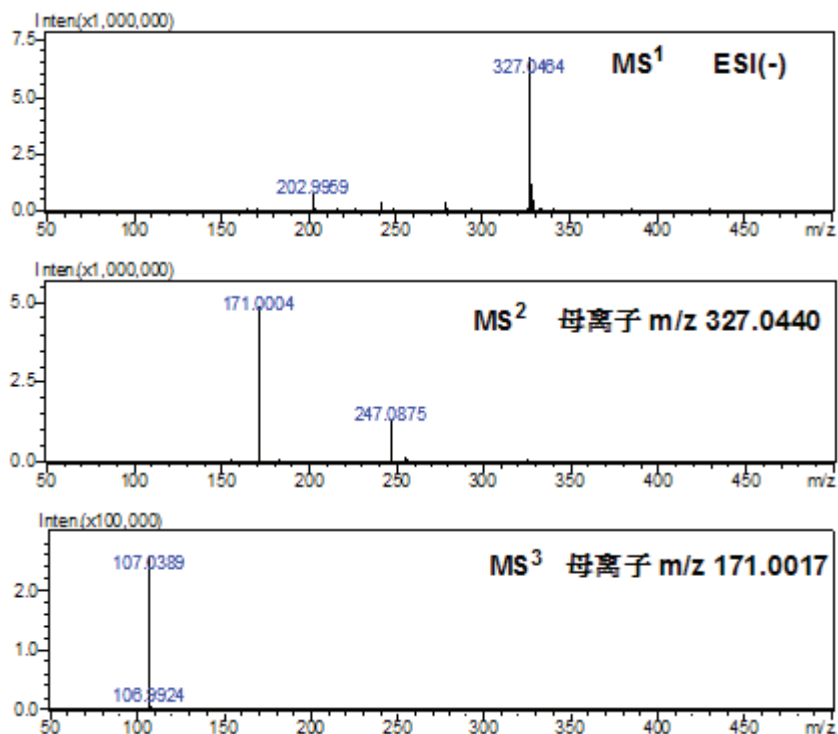
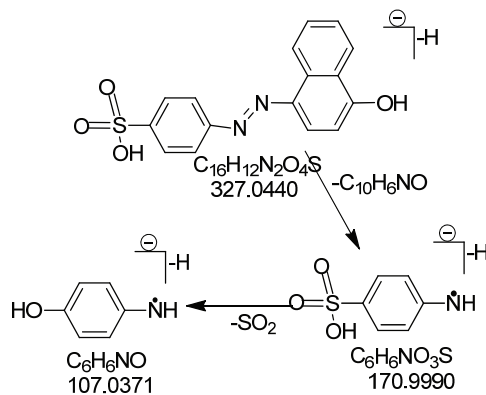
2.2.3 酸性橙 I ($C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$)


图 8 酸性橙 I 的裂解图谱

在负离子模式下，酸性橙 I 的 $[M-H]^-$ 分子离子峰为 327，其特征碎片离子为 m/z 171，与 m/z 107。去质子的酸性橙 I 容易通过丢失萘酚部分产生特征的自由基离子 m/z 171，这个碎片离子进一步丢失二氧化硫产生碎片离子 m/z 107。酸性橙 I 可能的裂解规律如下：


 图 9 酸性橙 I ($C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$) 的裂解规律

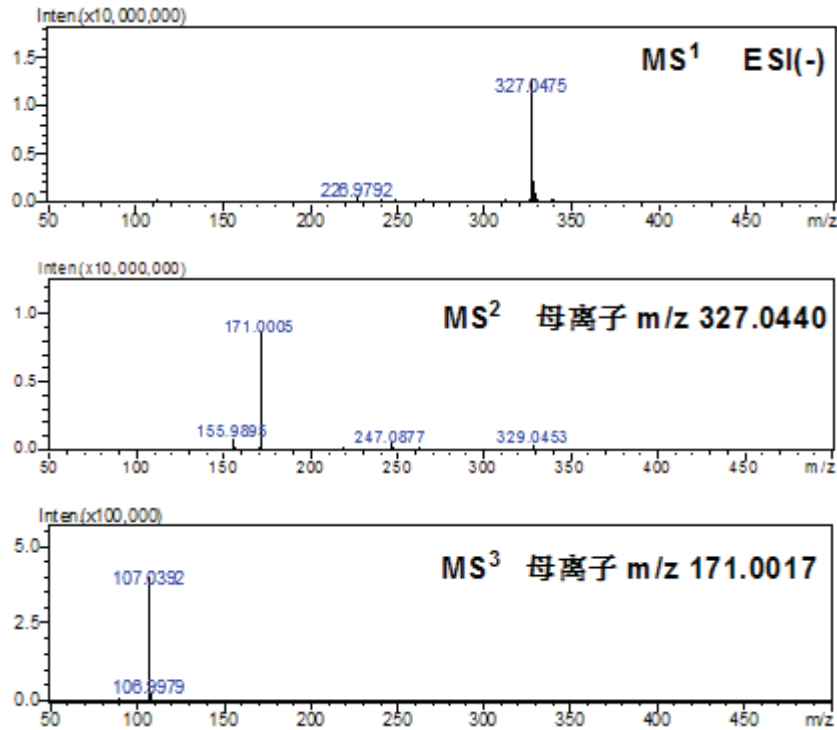
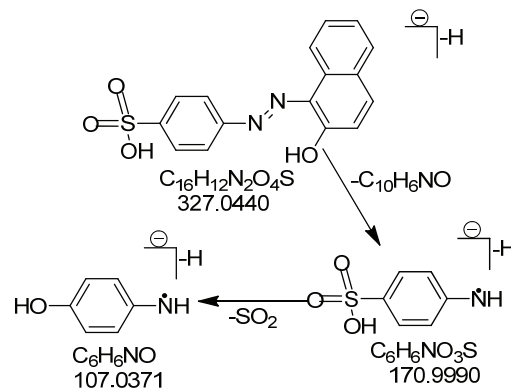
2.2.4 酸性橙 II ($C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$)


图 10 酸性橙 II 的裂解图谱

在负离子模式下，酸性橙 II 的 $[M-H]^-$ 分子离子峰为 327，其特征碎片离子为 m/z 171，与 m/z 107。去质子的酸性橙 I 容易通过丢失萘酚部分产生特征的自由基离子 m/z 171，这个碎片离子进一步丢失二氧化硫产生碎片离子 m/z 107。酸性橙 II 可能的裂解规律如下：


 图 11 酸性橙 II ($C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$) 的裂解规律

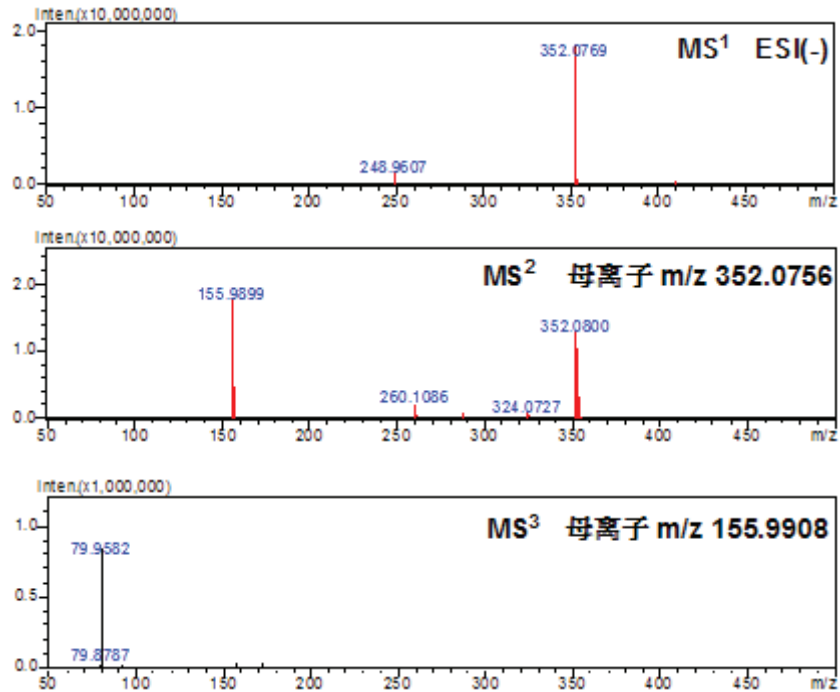
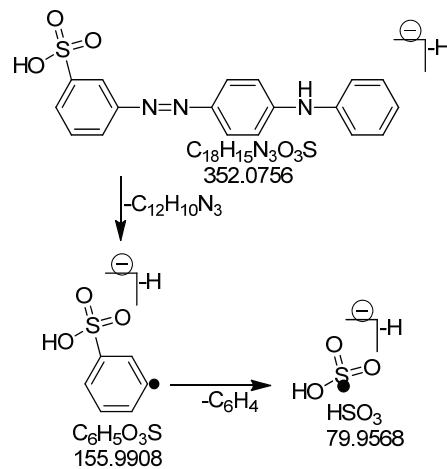
2.2.5 酸性黄36(C₁₈H₁₄N₃O₆Na)


图 12 酸性黄的裂解图谱

在负离子模式下，酸性黄36的[M-H]⁻分子离子峰为352，其特征碎片离子为m/z 156，与m/z 80。去质子的酸性黄36容易通过丢失偶氮部分产生特征的自由基离子m/z 156，这个碎片离子进一步通过丢失苯环部分产生碎片离子m/z 80。酸性黄36可能的裂解规律如下：


 图 13 酸性黄 36(C₁₈H₁₄N₃O₃Na)的裂解规律

■ 结论

本方法快速、灵敏、准确，可用于食品中碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙Ⅰ、酸性橙Ⅱ及酸性黄36等非法添加的工业染料的同时测定及确证。

本文研究的碱性橙、碱性嫩黄、酸性橙Ⅰ、酸性橙Ⅱ及酸性黄36五种黄色化工染料在不同食品中的检测一直处于盲区，建立一套高效的同时测定方法，为目前食品行业的监管提供有效地检测方法作了大量的研究工作，并深入探讨分析了五种化工染料的化学结构的裂解方式，确保精确地定量和定性分析。