

水产品中碱性嫩黄 O 残留量的液相色谱-串联质谱测定

张海琪¹, 梁丽军^{1,2}, 何中央¹, 施礼科¹

(1. 浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310032)

摘要:建立了水产品中碱性嫩黄 O 工业染料残留的高效液相色谱-电喷雾串联质谱测定方法。样品经甲醇超声提取、旋转蒸发浓缩、过滤后,在正离子电喷雾离子源(ESI⁺),多反应监测(MRM)模式下进行测定。方法线性范围为 2.5~100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,在添加水平为 5.0~20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时的平均回收率为 78.9%~92.1%,相对标准偏差小于 11%,定量限为 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

关键词:高效液相色谱-串联质谱;碱性嫩黄 O;碱性染料;水产品

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2010)01-0048-05

Determination of Auramine O in Fishery Products by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Hai-qi¹, LIANG Li-jun^{1,2}, HE Zhong-yang¹, SHI Li-ke¹

(1. Zhejiang Fishery Quality Testing Center, Hangzhou 310012, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science,

Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: Auramine O in fishery products was determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Sample was ultrasonically extracted from homogenized samples with methanol, then concentrated and purified. Analytes were finally determined by electrospray ionization(ESI) in positive mode using multiple reactions monitoring (MRM). The method was validated, and good results were obtained with respect to spiked recovery. The linear range is from 2.5 to 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recoveries are between 78.9% and 92.1% in the spiked range of 5.0—20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, its relative standard deviation is lower than 11%. The limit quantification(LOQ) is 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Key words: high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Auramine O; basic dye; fishery products

碱性嫩黄 O (Auramine O) 别名盐基淡黄 O、盐基槐黄、碱性荧光黄 GR, 是一种芳香胺类碱性工业染料, 其结构示于图 1, 主要用于棉织品、人造丝、纸张、皮革、油漆等染色^[1]。碱性类工业染料比食用色素更易在食品中染色, 且不易褪色、价格低廉, 因此常被一些不法水产商用来自对鱼、虾等进行染色。

对水产品进行染色来增加产品的色相, 以次充鲜^[2-4]。有资料表明: 碱性嫩黄 O 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^[5], 且很难自然降解, 体内残留物具有毒性、致癌性、致突变^[6], 给消费者的健康带来了严重危害。因此, 不允许在食品中使用, 且未曾在《食品添加剂食用卫生标准》(GB 2760—2007) 中列出^[7]。

目前, 有关食品中碱性染料检测方面的研究报道有: 水产品中孔雀石绿、结晶紫及其它的代谢物检测^[8-10], 豆制品中碱性嫩黄 O、碱性橙的检测^[5, 11-12]。而关于水产品中碱性嫩黄 O 的检测未见报道。本工作对样品前处理方法、液相色谱条件、质谱条件进行系统优化, 拟建立水产品中碱性嫩黄 O 残留分析的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法。

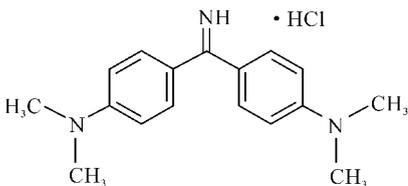


图 1 碱性嫩黄 O 的结构式

Fig. 1 The structure of Auramine O

1 实验部分

1.1 主要仪器

Agilent 1100 HPLC 仪(美国 Agilent 公司产品)-API3000 三重四极杆质谱(美国 ABI 公司产品), 配有自动进样器、电喷雾离子源; 高速冷冻离心机; LG 10-2.4A 型高速台式离心机; WH-866 型涡旋混合仪; KQ-800DB 型可控温超声波仪; Milli-Q 纯水器; R2OS 增强型旋转蒸发仪; 微型高速万能试样粉碎机。

1.2 主要材料与试剂

碱性嫩黄 O (CAS No. 2465-27-2, C. I. 41000); 购自 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、甲酸

(色谱纯), 无水乙醇(分析纯); 购自 Merck 公司; 实验用水为 Milli-Q 超纯水。样品为均质后的中华鳖, 黄鱼, 蟹类水产品。

1.3 标准溶液

精密称取 10 mg 碱性嫩黄 O 标准品, 置于 100 mL 棕色瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 配成浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品储备液, 置于 $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。取 2.5 mL 标准品储备液, 用无水乙醇定容至 100 mL, 配成浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品工作液, 冷藏保存。

1.4 样品前处理

取 5.00 g (精确到 0.05 g) 已均质的样品于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 甲醇, 超声提取 15 min, $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 重复提取 2 次, 合并提取液, 于 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至近干。用 70% 甲醇水溶液溶解残渣并定容至 10 mL。取适量的定容液, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件 Waters Atlantis C₁₈ 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} \times 5 \text{ }\mu\text{m}$); 柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 $10 \text{ }\mu\text{L}$; 流速 $200 \text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相: 乙腈(A) 和 0.1% 甲酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0 min A 10% (φ), 1 min A 10% (φ), 2 min A 100% (φ), 9 min A 100% (φ), 9.1 min A 10% (φ), 15 min A 10% (φ)。

1.5.2 质谱条件 电喷雾正离子(ESI⁺)电离模式, 多反应监测(MRM)方式, 单位分辨率, 电喷雾电压 5 000 V, 辅助气流速 $7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 离子源温度 $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 聚焦电压 200 V, 入口电压 5 V, 出口电压 22 V, 雾化气 $7.58 \times 10^4 \text{ Pa}$, 气帘气 $6.21 \times 10^4 \text{ Pa}$, 碰撞气 $4.83 \times 10^4 \text{ Pa}$ 。监测离子对, 去簇电压(DP), 碰撞气能量(CE)列于表 1。

表 1 碱性嫩黄 O 优化后的 MRM 参数

Table 1 Optimized multiple reaction monitoring parameters for Auramine O

化合物	监测离子对/(m/z)	DP/V	CE/V
碱性嫩黄 O	268.3/147.1*	56	45
	268.3/252.2	56	55
	268.3/107.4	56	53

注: * 为定量离子

2 结果与讨论

2.1 质谱定量定性

根据碱性嫩黄 O 分子结构的特征,实验选用电喷雾正离子(ESI⁺)电离模式以流动注射泵连续进样对标准液进行 Q1 全扫描,找出准确的 $[M+H]^+$ m/z 268.3 峰为碰撞诱导解离的母离子,继续对其子离子进行 Q3 全扫描,找出 2~3 个信号较强的碎片离子,示于图 2。再以母离子与子离子组成监测离子对,以多反应监测模式对待测物进行定性和定量检测,同时优化去簇电压、聚焦电压、碰撞能量等质谱条件。其中 CE 对离子对的丰度影响最大,示于图 3。接着用 FIA 方式优化雾化气,气帘气,碰撞气,电喷雾电压等参数(优化后的质谱条件如 1.5.2)。

从离子扫描图可以得出,碱性嫩黄 O 的主要碎片离子为 m/z 252.2、147.1、122.3、107.4,选择 m/z 252.2、147.1、107.4 作为碱性嫩黄 O 的特征碎片离子。为了满足欧盟 2002/65/EC 指令规定,对于禁用药物的质谱确证方法需要 4 个 IPs,选择 m/z 268.3/147.1 为定量离子对, m/z 268.3/147.1 和 m/z 268.3/252.2 为定性离子对进行定量定性分析。裂解途径推断如下:碱性嫩黄 O 的氯化物 m/z 303.8 脱氯断裂后得到分子离子 m/z 268.3,分子离子 m/z 268.3 脱去芳香胺上的甲基得到 m/z 252.2 $[M^+ - H - CH_3]$,分子离子 m/z 268.3 脱去其中 1 个苯胺得到 m/z 147.1 $[M^+ - C_6H_5NC_2H_6]$, m/z 147.1 进一步脱去酰胺得到 m/z 122.3 $[M^+ - C_6H_4NC_2H_6 - CN]$, m/z 122.3 继续脱掉 1 个甲基得到 m/z 107.4,示于图 2。

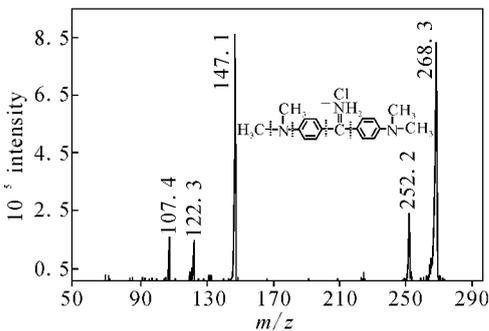


图 2 碱性嫩黄 O 离子扫描图和解离图

Fig. 2 Product ion scans spectra and proposed fragmentation scheme of Auramine O

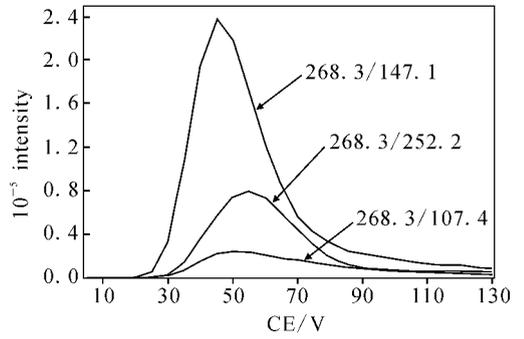


图 3 不同碰撞能量对离子对丰强度的影响

Fig. 3 The effects of collision energy on the intensity of product

2.2 色谱条件优化

选择流动相时,比较了乙腈和含不同体积分数(0%~0.3%)甲酸的水溶液,发现当甲酸含量为 0.1%时,各待测物的响应值相对较高,在很大程度上增加了目标物的分子离子化程度和检测灵敏度,所以最终选用乙腈和 0.1%甲酸水溶液为流动相,并采取梯度洗脱程序。加标样品和标准品的 MRM 色谱图示于图 4,从图 4 可见,优化后的色谱条件可以将 4 种目标物和基质干扰很好的分开,获得各组分的良好分离。

2.3 线性范围和检出限

取适量体积的标准品工作液,用空白样品提取液配制成浓度为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准工作液,以峰面积 y 对待测物的质量浓度 x ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作标准曲线方程,得方程为 $y = 519x + 249$,相关系数 $r = 0.9997$ 。实验表明,碱性嫩黄 O 在 2.5~100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,质谱均有良好的线性响应。以 10 倍信噪比计算方法的定量限(LOQ)为 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4 基质效应、回收率与精密度实验

为了考察基质离子抑制对定量结果的影响,在 5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的添加水平下,采用空白样品提取液加标和标准溶液进行比较,结果发现,空白样品提取液加标回收率低于 35%,标准溶液回收率可达 90% 以上,离子化效率为 40%~75%,可见存在着基质减弱效应,严重影响实验回收率。因为没有找到碱性嫩黄 O 与之相匹配的内标物,所以采取外标法进行,在实验中考虑扣除基质干扰,从而提高定量的准确性。

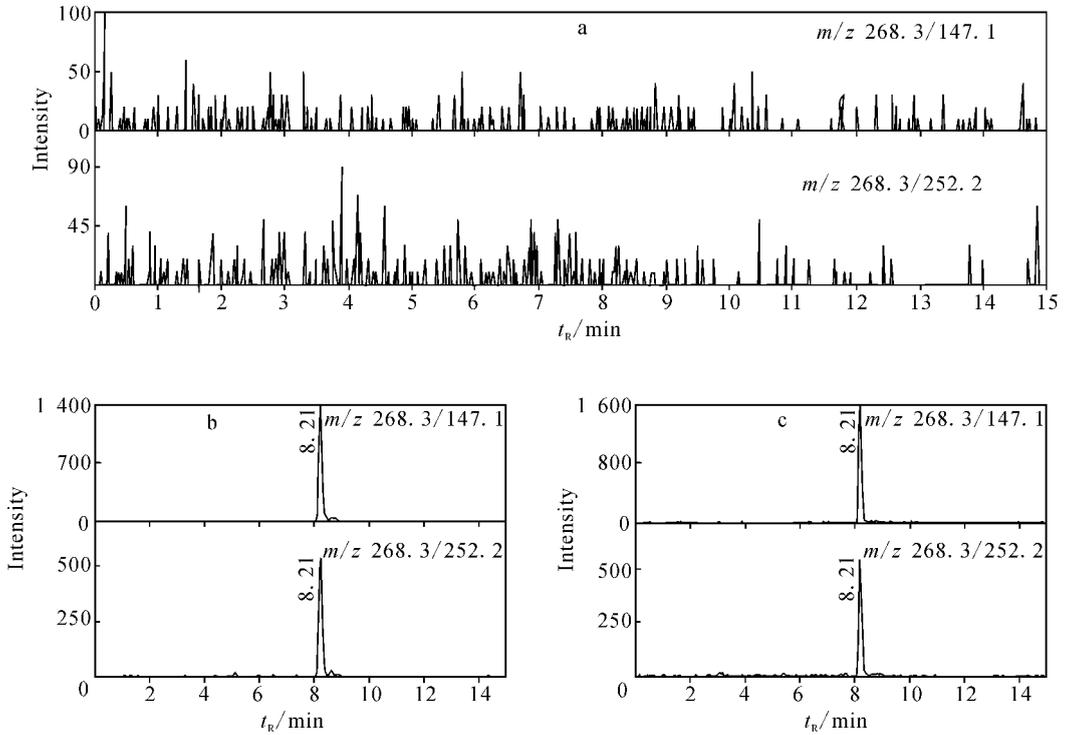


图 4 多反应监测模式下碱性嫩黄 O 的 MRM 色谱图

a. 空白样品; b. 空白加标样; c. 标准溶液

Fig. 4 Chromatograms of Auramine O by MRM mode

a. blank sample; b. blank sample spiked with Auramine O($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$); c. standard solution($25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

对中华鳖、黄鱼、蟹 3 种不同基质的水产品进行 5.0 、 10.0 、 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 三个水平的添加回收实验,结果列于表 2。实验表明,在添加浓度为 $5.0 \sim 20.0 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内,平均回收率在 $78.9\% \sim 92.1\%$ 之间, RSD 在 $4.2\% \sim 10.8\%$ 之间。

表 2 水产品中加标回收率试验结果($n=4$)Table 2 Results of spiked recovery experiments($n=4$)

基质	加标/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/%
中华鳖	5.0	75.6, 90.4, 86.8, 95.2	87.0	9.6
	10.0	81.6, 89.4, 86.0, 82.4	84.9	4.2
	20.0	87.4, 83.0, 97.7, 100.2	92.1	8.9
大黄鱼	5.0	87.3, 90.0, 96.8, 85.1	89.8	5.7
	10.0	92.6, 78.1, 95.8, 88.1	88.7	8.7
	20.0	90.8, 95.1, 93.5, 86.2	91.4	4.3
蟹	5.0	83.2, 90.9, 76.5, 82.3	83.2	7.1
	10.0	71.6, 80.6, 90.3, 73.1	78.9	10.8
	20.0	90.5, 99.1, 85.8, 86.9	90.6	6.7

2.5 方法应用

应用上述 LC-MS/MS 法分别对中华鳖,黄鱼,蟹类等水产品进行检测。结果表明,该方法具有快速简单、检出限低、实用性强、抗干扰能力强等特点,能够对痕量样品进行很好的定性定量认证,满足动物源性食品中碱性工业染料残留检测的要求,可为水产食品安全监督检测提供有力的技术依据。

参考文献:

- [1] 周公度. 化学辞典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 346.
- [2] 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): 95-96.
- [3] 冯济富, 黄明. 一起使用碱性橙浸染小黄鱼案的评析[J]. 中国卫生监督杂志, 2003, 10(6): 351-352.
- [4] 黄百芬, 铁晓威, 钱欣, 等. 固相萃取-高效液相色谱荧光检测法测定染色虾米中的碱性玫瑰精含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 17-19.

[5] 高 洁,尹 峰,何国亮,等. 高效液相色谱法测定豆制品中的碱性嫩黄 O[J]. 分析试验室,2008,27: 230-232.

[6] 钟金汤. 偶氮染料及其代谢产物的化学结构与毒性关系的回顾与前瞻[J]. 环境与职业医学,2004, 21(1):58-32.

[7] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,全国食品添加剂标准化技术委员会秘书处. GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社,2008.

[8] 吴学立,吴永宁,赵云峰,等. 液相色谱-线性离子阱质谱法检测草鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物 [J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(3):209-214.

[9] RUSHING L G, HANSEN E B. Confirmation of malachite green, gentianviolet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 1997, 700: 223-231.

[10] RUSHING L G, WEBB S F, THOMPSON H C. Determination of leucogentian violet and gentian violet in catfish tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection[J]. Journal of Chromatography B, 1995, 674: 125-131.

[11] 罗美中,李碧芳,何小青. 高效液相色谱-二极管阵列法测定豆制品中碱性嫩黄 O 的含量[J]. 分析检测, 2005,26(8):166-170.

[12] 林 钦. 高效液相色谱法同时测定豆制品中的碱性橙和碱性嫩黄 O 染料[J]. 色谱,2007,25(5): 776-777.

=====

第二期“液质联用(LC/MS)应用技术培训班”即将举办

信立方质谱培训中心致力于有机质谱应用技术培训工作。2009 年培训中心与仪器行业最大的门户网站仪器信息网合作,分别开设气质联用(3 期)、液质联用(1 期)、谱图解析(2 期)等不同类型和层次的质谱培训班,受到广大学员欢迎和好评。2010 年培训中心将继续举办此系列培训班,首先于 2010 年 3 月 22 日在北京举办“液质联用应用技术培训班”,欢迎有志于提高液质联用水平人员前来参加。

【培训大纲】LC/MS 联用仪的基本结构及性能、定性定量分析方法及相关技术;LC/MS 应用及常见问题、ESI 离子化技术、子质量分离及选择检测;色谱柱的选择与色谱条件优化;样品的预处理技术;答疑和讨论等。

【主讲专家】王光辉、盛龙生、苏焕华等

【报名方式】电话:010-51299927-101,13269178446;传真:010-51413697;联系人:张老师;
E-mail:training@instrument.com.cn

信立方质谱培训中心还将在 4—6 月举办“气质联用”、“有机质谱谱图解析”、“有机质谱在石油石化领域应用培训班”,更多内容及详细课程设置请查阅 <http://www.instrument.com.cn/training/>

(仪器信息网供稿)