

河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中角黄素残留的超高效液相色谱法测定和超高效液相色谱-串联质谱法确证

薄海波^{*2}, 星玉秀⁴, 雒丽丽³, 贾光群¹, 庞国芳¹

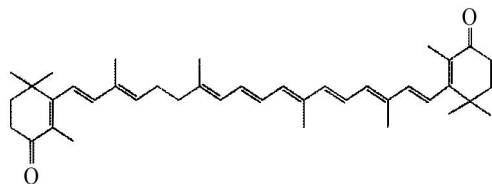
- (1. 秦皇岛出入境检验检疫局, 秦皇岛 066002; 2. 青海出入境检验检疫局, 西宁 810000;
3. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 4. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810000)

摘 要: 建立了河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中角黄素残留的超高效液相色谱测定方法和超高效液相色谱-串联质谱确证方法。样品用抗氧化剂焦性没食子酸保护, 乙腈均质提取, 正己烷液-液分配净化, 超高效液相色谱-紫外检测器测定, 外标法定量, 超高效液相色谱-串联质谱法确证。测定方法采用 BEHC18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, i. d. 1.7 μm), 流动相为 V(0.1% 的甲酸) V(乙腈) = 3 97, 检测波长 470 nm。实验结果表明, 角黄素在 0.05 ~ 2.0 mg/L 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 在空白样品中, 添加低、中、高 3 个浓度水平 (0.05, 0.1, 1.0 mg/kg), 角黄素的回收率均在 82.52 % ~ 96.96 % 之间, 相对标准偏差为 6.9 % ~ 15 %。方法的检出限 (LOD) 为 0.02 mg/kg, 定量限 (LOQ) 为 0.05 mg/kg。串联质谱确证方法采用电喷雾 (ESI) 离子源, 在正离子模式下以多反应监测 (MRM) 扫描方式检测, 定性离子对 565.5/203.2 和 565.5/133.1, 定量离子对 565.5/203.2。

关键词: 角黄素; 河豚鱼; 鳗鱼; 烤鳗; 超高效液相色谱; 超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: O657.7; O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2009)11-048-05

角黄素又称斑蝥黄素或斑蝥黄质^[1], 是从一种可食用蘑菇中分离出来的类胡萝卜素^[2], 存在于自然界中的角黄素大部分为全反式异构体。全反式角黄素中文系统命名为全反式-4, 4'-二酮基-β, β-胡萝卜素, 英文系统命名为 4E, 4'E'-diketo-β, β-carotene。分子式为 C₄₀H₅₂O₂, 分子量为 564.86, 化学结构式为:



角黄素具有抑制多不饱和脂肪酸的氧化、改善视力、提高免疫力、促进色素形成等重要的生

物学功能^[3], 被广泛应用于饲料、食品、化工、医药等行业。目前, 角黄素常被添加到禽类及水产动物的饲料中来改善禽蛋产品及水产品的色泽。长期食用含有过量角黄素的食物会引起人体视网膜损伤。欧盟食品科学委员会 1997 年制订了饲料中角黄素的最大限量^[4, 5] (三文鱼肌肉中 10 mg/kg, 鳕鱼肌肉中 5 mg/kg), 并在 2003 年以立法的形式颁布实施。日本“肯定列表制度”规定^[6]: 禽蛋和猪、牛、水产品等动物源性食品中角黄素最大残留限量为 0.1 mg/kg。我国在角黄素检测方面相关报道不多, 也未曾制定或立项国家标准、行业标准。因此研究食品中角黄素的检测方法具有十分紧迫的现实意义。

角黄素的测定方法主要为液相色谱法^[7~13]。

* 收稿日期: 2008-12-10; 修订日期: 2009-03-01

基金项目: 国家标准 2007 年第七批制修订计划 (20079498-T 469) 项目资助

作者简介: 薄海波 (1962 -), 女, 高级工程师; E-mail: bohbl212@163.com

液相色谱-质谱联用技术应用于低含量类胡萝卜素分析也已有报道^[12, 13], 但因类胡萝卜素的不稳定性, 液相色谱-质谱联用法定量分析重复性差, 多用于定性分析。比如日本对食品中角黄素测定的官方方法就是用高效液相色谱法定量测定, 液相色谱-质谱联用进行确证的^[12]。由于 HPLC-VIS 分离效果好、选择性高、检测灵敏度足够, 分离速度快, 是食品中类胡萝卜素定量测定的理想设备, 必要时由液相色谱-串联质谱配合进行确证。

本文采用液相色谱和质谱技术, 研究了河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中角黄素残留的定性、定量分析方法和确证方法。本方法的专属性强, 检测灵敏度高, 方法最低定量限达到 0.05 mg/kg, 能够满足或超过当前国内外对河豚鱼、鳗鱼和烤鳗的安全卫生管理要求, 为我国河豚鱼、鳗鱼和烤鳗的检测提供方法依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity 超高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器(PDA, 美国 Waters 公司); Acquity 超高效液相色谱-Quattro Premier 串联四极杆质谱联用仪, 配电喷雾离子源(美国 Waters 公司)。组织捣碎机, Milli-Q 超纯水机, 快速混匀仪, 旋转薄膜蒸发仪, 低速台式离心机(5000 r/min), 0.22 μ m 微孔滤膜。

角黄素标准品: 纯度 95.8 % (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 标准储备溶液(1.0 mg/mL): 称取标准品 0.100 g, 用乙腈溶解定容于 100 mL 容量瓶, -18 $^{\circ}$ C 冷冻保存, 保质期 30 天; 乙腈, 正己烷, 色谱纯; 甲酸, 优级纯; 无水硫酸钠, 焦性没食子酸为分析纯, 水为超纯水; 无水硫酸钠用前在 650 $^{\circ}$ C 灼烧 4 h, 置于干燥器中冷却后备用。

1.2 色谱条件

Acquity UPLCTM BEHC18 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, i. d. 1.7 μ m), 流动相: V(0.1 % 的甲酸) V(乙腈) = 3 : 97, 流速: 0.4 mL/min, 柱温: 35 $^{\circ}$ C, 检测波长: 470 nm, 进样量: 3.0 μ L。

1.3 实验方法

1.3.1 试样的制备 抽取河豚鱼、鳗鱼和烤鳗样品约 500 g, 取可食用部分, 绞碎, 充分混匀, 分装入洁净的容器内, 密闭并作好标记, -18 $^{\circ}$ C 冷冻保存。在制样的操作过程中, 应防止样品受到污染, 且尽可能避光操作, 减少氧气接触机会并尽

快完成, 防止角黄素含量发生变化。

1.3.2 提取 称取 5.00 g 试样于 50 mL 具塞离心管中, 加入 10 g 无水 Na₂SO₄, 0.1 g 焦性没食子酸, 乙腈 20 mL, 用组织捣碎机均质提取 1 min。以 3000 r/min 离心 3 min。移取上层乙腈于另一个 50 mL 塑料离心管中。重复上述步骤, 合并乙腈提取液, 待净化。

1.3.3 净化 在乙腈提取液中加入 20 mL 乙腈饱和的正己烷, 涡旋混匀后振荡 3 min, 以 2000 r/min 的转速离心 2 min, 弃去上层正己烷, 取乙腈层 20 mL, 旋转蒸发近干, 用 1.0 mL 乙腈溶解残渣, 滤膜过滤, 供液相色谱和液相色谱-串联质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

角黄素对光和氧及过氧化物敏感。为保持样品中角黄素的稳定性, 本文在提取步骤中添加焦性没食子酸作为抗氧化剂。实验表明, 焦性没食子酸加入量为 0.1 g 即可有效防止样品中角黄素含量发生变化。

角黄素的分子结构中因含氧具有一定的极性, 在极性有机溶剂中有较大的溶解度。文献报道的提取溶剂有丙酮/石油醚、乙腈、甲醇/CH₂Cl₂ 等有机溶剂。本文经试验, 以上溶剂的提取效果均能满足要求, 用乙腈提取可减少脂溶性杂质进入提取液, 有利于后续净化步骤的简化, 因而选择乙腈作为提取剂。加无水硫酸钠吸收样品中水分并提高样浆极性, 减少了乙腈提取液中含水量, 改善了提取效果。经实验对比, 采用超声波、振荡和均质提取 3 种方法, 均质提取的回收率最高, 而且相对稳定, 简便快速。所以本方法采用均质器匀浆 1 min, 重复提取 2 次的方法进行提取。

2.2 净化方法的选择

食品中角黄素提取溶液的净化, 文献方法主要有液-液萃取法和固相萃取法。本方法采用硅胶柱、氟罗里硅土、中性氧化铝及 C18 等小柱, 正己烷溶液上柱, 丙酮-正己烷溶剂体系(5 % ~ 100 %)洗脱, 其回收率不能令人满意(在不同小柱上回收率在 25 % ~ 65 %之间)。实验还测试了采用 GPC 的净化效果, 角黄素不能与脂肪峰完全分开。采用正己烷脱脂, 既可满足 HPLC 的检测要求, 又可减少被测物在操作过程中损失, 获得了满意回收率。

2.3 流动相的选择

比较了甲醇/水体系和乙腈/水体系作流动相对河豚鱼和烤鳗样品的分离分析,发现分离效果优劣顺序为 $V(\text{乙腈}) : V(0.1\% \text{甲酸}) = 97 : 3$ 、 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 95 : 5$ 、 $V(\text{甲醇}) : V(0.1\% \text{甲酸}) = 95 : 7$ 、 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 95 : 5$; 即用 $V(\text{乙腈}) : V(0.1\% \text{甲酸}) = 97 : 3$ 时角黄素与干扰峰分离较

好,峰形对称。所以本方法选择 $V(\text{乙腈}) : V(0.1\% \text{甲酸}) = 97 : 3$ 作流动相。以 0.40 mL/min 的流速等度洗脱,角黄素的保留时间为 1.1 min 。角黄素标准品的色谱图、河豚鱼、鳗鱼和烤鳗的空白样品色谱图和空白样品添加最低检出浓度角黄素的色谱图见图 1。

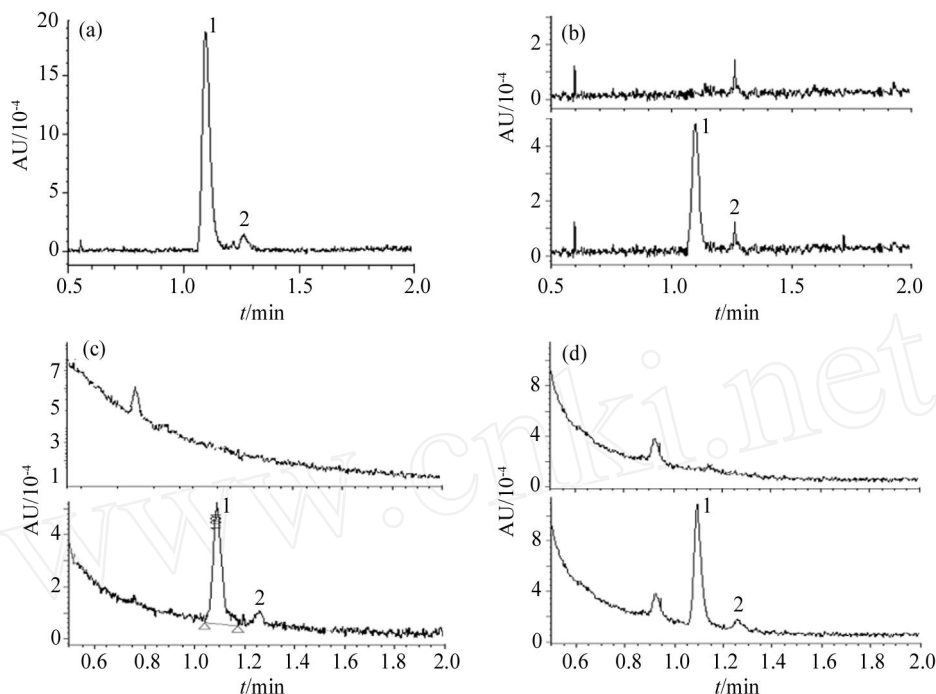


图 1 角黄素标准溶液、空白样品和添加样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a canthaxanthin standard, blank samples and spiked samples

1-反式角黄素; 2- 顺式角黄素; a- 角黄素标准溶液; b- 河豚鱼空白样品与河豚鱼加标样品; c- 鳗鱼空白样品与鳗鱼加标样品; d- 烤鳗空白样品和鳗鱼加标样品

2.4 线性和灵敏度

在 $0.05 \sim 2.0 \text{ mg/L}$ 浓度范围,角黄素呈良好线性,相关系数 $r = 0.9999$,回归方程为 $y = 85.7\rho + 191$ 。

分别以 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 和 10 倍信噪比 ($S/N = 10$) 确定本方法的最低检出限和定量限。结果表明,不同基质中角黄素的 LOD 值和 LOQ 值略有差异,LOD 均不大于 0.01 mg/kg ,LOQ 值均不大

于 0.05 mg/kg (表 1),可满足各国对角黄素的限量要求。

2.5 回收率和精密度

采用标准添加法,在空白河豚鱼、鳗鱼和烤鳗样品中添加 3 个浓度水平的角黄素标准溶液,每个水平下平行测定 6 次。实验数据表明,方法的平均回收率为 $82.5\% \sim 97\%$,相对标准偏差 (RSD) 为 $6.9\% \sim 15\%$ (表 1)。

表 1 空白河豚鱼、鳗鱼、烤鳗样品添加角黄素的回收率、精密度、检测限和定量限

Tab. 1 Recoveries, precisions, limits of detection (LOD) and limits of quantity (LOQ) of canthaxanthin (n = 6)

样品	添加量 w/(mg/kg)	测得量 w/(mg/kg)	回收率/ %	RSD/ %	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
Fugu	0.05	0.047	94.2	12	0.020	0.050
	0.1	0.868	86.8	6.9		
	1.0	0.857	85.7	9.4		
鳗鱼	0.05	0.041	82.5	7.6	0.015	0.040
	0.1	0.928	92.8	12		
	1.0	0.909	90.9	15		
烤鳗	0.05	0.048	96.5	9.4	0.020	0.050
	0.1	0.885	88.6	9.2		
	1.0	0.913	91.3	11		

3 确证实验

3.1 确证方法的色谱-质谱条件

3.2.1 超高效液相色谱分析条件 流动相流速：0.30 mL/min，其余同 1.2。

3.2.2 串联质谱分析条件 采用注射泵直接进样方式，以 10 μ L/min 将角黄素的标准溶液注入串联质谱的离子源中，采用电喷雾离子源以正离子扫描方式进行一级质谱分析，确定准分子离子峰 $[M + H]^+$ (m/z 565.6) 为母离子，优化了电离电压。对准分子离子碰撞，进行二级质谱分析。优化了碰撞能量、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量、锥孔反吹气流量等参数。优化的质谱参

数为：

扫描方式：多反应监测 (MRM)；毛细管电压：3.5 kV；锥孔电压：38 V；离子源温度：120 ；去溶剂气温度：400 ；去溶剂气 (氮气) 流量：800 L/h；锥孔气 (氮气) 流量 (N_2)：50 L/h；碰撞能量：20 V；碰撞气流量：0.1 L/h；检测离子对：定性：565.6/203.2，565.6/133.1，定量：565.6/203.2，离子丰度比 2 1。

在上述条件下，反式角黄素的参考保留时间为 1.4 min，顺式角黄素的参考保留时间为 1.6 min。标准品、河豚鱼、鳗鱼和烤鳗空白样品和添加限量水平角黄素的液相色谱-串联质谱图见图 2。

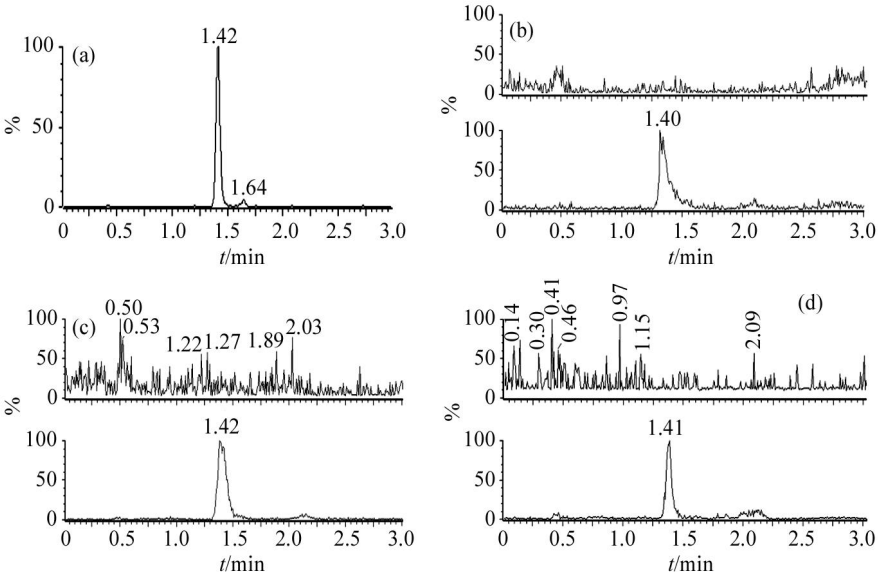


图 2 角黄素标准溶液 (a)、河豚鱼空白样品及添加 (b)、鳗鱼空白样品及添加 (c)、烤鳗空白样品及添加 (d) 的 UPLC-MS/MS TIC 图

Fig. 2 The UPLC-MS/MS TIC of the canthaxanthin standard solution (a), the fugu blank and spiked sample (b), the eel blank and spiked sample (c), and the roast eel blank and spiked sample (d)

参考文献

- [1] 汪洪涛, 徐学明, 金征宇. 粮食与饲料工业, 2003, (6): 31
- [2] Haxof. Botan Gaz, 1950, 112(2): 228
- [3] 陆开形, 蒋霞敏, 翟兴文. 宁波大学学报, 2003, 16(1): 95
- [4] 国家食品安全信息中心. [http: www.fsr.org.cn/User-Log.asp](http://www.fsr.org.cn/User-Log.asp)
- [5] 国家进出口食品安全信息网. [http: www.tbtsps.gov.cn/foodsafety/XLBZ/Pages/default.aspx](http://www.tbtsps.gov.cn/foodsafety/XLBZ/Pages/default.aspx)
- [6] The Japan food Chemical Research Foundation, List of pesticide and Maximum Residue limits. [2006-5029]. [http: www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/foodddl.php?inq=9300](http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/foodddl.php?inq=9300)
- [7] 朱明军, 宗敏华, 吴振强等. 食品工业科技, 2000, (2): 79
- [8] 余孔捷, 钱疆, 杨方等. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 145
- [9] 刘良忠, 张民, 彭光华等. 色谱, 2004, 22(3): 197
- [10] 王全林, 史萍萍, 张淑芬. 色谱, 2007, 25(6): 865
- [11] 王强, 韩雅珊. 色谱, 1997, 15(6): 534
- [12] JAP-074 角黄素检测方法. [http: down.foodmate.net/standard/sort/13/10535.html](http://down.foodmate.net/standard/sort/13/10535.html)
- [13] 张华, 杨鑫, 马莺等. 色谱, 2008, 26(3): 392

Ultra performance liquid chromatographic determination and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric confirmation of anthraxanthin residues in fugu, eel and roast eel

BO Hai-bo^{*2}, XING Yu-xiu⁴, LUO Li-li³, JIA Guang-qun¹ and PANG Guo-fang¹ (1. Qinhuangdao Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066002; 2. Qinghai Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xining 810000; 3. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730030; 4. Northwest Institute of Altiplano Biology, CAS, Xining 810000), Fenxi Shiyanshi, 2009, 28(11): 48~52

Abstract: A method was developed for the determination of canthaxanthin residues in fugu, eel and roast eel by ultra performance liquid chromatography equipped with an UV detector (UPLC-UV) and confirmation by ultra performance liquid chromatography equipped with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Under the protection of antioxidant pyrogalllic acid, the samples were extracted with acetonitrile by homogenizer, and cleaned up by liquid-liquid extraction with n-hexane, then determined by UPLC-UV and confirmed by UPLC-MS/MS, quantified by the external standard method. For determination, BEHC18 column (50 mm × 2.1 mm, i. d., 1.7 μm) was used, mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile (3:97, v/v), at a flow rate of 0.4 mL/min, detection wavelength was 470 nm. The calibration curve was linear between the area and the concentration of canthaxanthin from 0.05 to 2.0 mg/L, the correlation coefficient was 0.9999. The average recoveries for the spiked fugu, eel and coast eel at the concentrations of 0.05, 0.1, 1.0 mg/kg ranged from 82.52% to 96.96% with relative standard deviation less than 14.8%. The limit of detection (LOD) was 0.02 mg/kg and the limit of quantity (LOQ) was 0.05 mg/kg. For confirmation, electrospray ionization was applied and operated in the positive ion with multiple reaction monitoring (MRM) scan mode in MS/MS analysis.

Keywords: Canthaxanthin; Residue analysis; Ultra performance liquid chromatography; Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Fugu; Eel; Roast eel