

香肠中红色 2G 的 HPLC 法及 UPLC-MS/MS 检测

凌云^{1,2}, 储晓刚², 孙利², 张峰², 王菡^{2,3}, 陈琦^{2,4}, 吴永宁^{1,*}

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025;
3. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866; 4. 陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 712081)

摘要:建立香肠中红色 2G 色素的高效液相色谱法(HPLC)测定和确证的超高压液相色谱-质谱/质谱法(UPLC-MS/MS)。以 0.662 mol/L 氨水为提取液, 样品均质提取两次, 离心后用 C₁₈ 柱净化, 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)检测, 流动相为乙酸-乙酸铵缓冲液-甲醇(55:45, V/V), 等度洗脱, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 530 nm, 阳性结果用 UPLC-MS/MS 确证。HPLC-DAD 法在 0.0212 ~ 1.06 mg/L 范围内, 红色 2G 的峰面积与其相应浓度呈现良好相关性, $r > 0.999$, 方法测定限为 0.106 mg/kg, 在空白样品中添加已知浓度的红色 2G 色素, 平均回收率在 79.0% ~ 86.5% 之间, 相对标准偏差(RSD)在 3.19% ~ 5.06% 之间。UPLC-MS/MS 法的测定限为 0.005 mg/kg, 平均回收率在 75.5% ~ 80.2% 之间, RSD 在 3.62% ~ 9.97% 之间。该方法可用于香肠中红色 2G 的检测及确证。

关键词: 红色 2G; 色素; 香肠; 高效液相色谱; 超高压液相色谱串联质谱; 确证

Determination of Red 2G in Sausage by High-performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LING Yun^{1,2}, CHU Xiao-gang², SUN Li², ZHANG Feng², WANG Han^{2,3}, CHEN Qi^{2,4}, WU Yong-ning^{1,*}

(1. Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China;
3. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
4. College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 712081, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography method (HPLC) was developed for the determination of red 2G in sausage. Sausage samples were extracted twice with 0.662 mol/L NH₃ · H₂O and the extract was cleaned up on a C₁₈ column. Red 2G was analyzed by HPLC with diode array detector and confirmed by UPLC-MS/MS. The limit of quantification (LOQ) of HPLC was 0.106 mg/kg and the average recoveries ranged from 79.0% to 86.5% with RSD values between 3.19% and 5.06%. The LOQ of UPLC-MS/MS was 0.005 mg/kg and the average recoveries ranged from 75.5% to 80.2% with RSD values between 3.62% and 9.97%. The developed HPLC method and UPLC-MS method can be applied for the determination and confirmation of red 2G in sausage.

Key words: red 2G; color; sausage; high-performance liquid chromatography (HPLC); ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); confirmation

中图分类号: R155.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0231-04

红色 2G (Red 2G), 别名食品红 10 号, 为单偶氮化合物, 溶于水, 微溶于乙醇, 分子式为 C₁₈H₁₃N₃Na₂O₈S₂,

相对分子质量 509, 为人工合成色素, 常作为食品加工中的红色色素, 着色力强, 性质稳定, 不易褪色。因

收稿日期: 2010-06-17

基金项目: 北京市科技计划项目(D08050200310804)

作者简介: 凌云(1979—), 女, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为营养与食品卫生。E-mail: linyun_505@163.com

* 通信作者: 吴永宁(1962—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品卫生。E-mail: wuyn@public.bta.net.cn

其可能具有致癌性^[1], 欧盟委员会已宣布在欧盟范围内禁止使用该色素^[2], 中国也已禁止使用红色 2G 作为食品添加剂^[3]。

我国关于人工合成色素检测方法的国家标准有 5 项^[4-8], 尚没有红色 2G 检测方法的标准。王全林等^[9]建立了二极管阵列高效液相色谱法测定食品中红色 2G, 但前处理较为复杂。国外关于红色 2G 的分析方法有分光光度计法、液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法及液质联用方法^[10-15], 但这些方法检测限较高, 液质方法仅为液相色谱-单级四级杆质谱法。本实验建立香肠中红色 2G 的 HPLC 分析方法, 提高方法的灵敏度, 同时用超高压液相色谱-质谱/质谱确证技术(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS/MS)确证阳性结果, 并简化样品前处理步骤, 为香肠中红色 2G 的测定提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红色 2G 标准品(纯度 > 99.0%) 瑞士 Fluka 公司。氨水、乙酸、乙酸铵为分析纯; 甲醇为色谱纯; 乙酸-乙酸铵缓冲液: 称取 1.554g 乙酸铵溶于 900mL 水中, 加入 1mL 乙酸, 定容至 1.00L, pH4.7; 标准品用超纯水配制成 1060mg/L 标准储备液, 于 4℃ 保存。

1.2 仪器与设备

C₁₈ 固相萃取柱(500mg/6mL)、1100 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器(DAD)) 美国 Agilent 公司; 超高效液相色谱-Quattro Premier 三重四级杆质谱仪(配有电喷雾离子源(ESI))、固相萃取装置 美国 Waters 公司; 万分之一分析天平; 3K30 冷冻离心机 德国 Sigma 公司; 酸度计 日本 Horiba 公司; 超纯水器 美国 Millipore 公司; 高速均质器 美国 Omnigh 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品提取与净化

将待测肉样品切碎, 称取肉碎末 5.00g, 置于 50mL 离心管中, 加入 15mL 0.662mol/L 氨水, 均质约 2min, 30000 × g 离心 10min, 取出上清液, 残余物再重复上述操作一次, 合并上清液, 用水定容至 50mL, 取出 20mL, 用乙酸调 pH 值至 5~6 之间, 10000 × g 离心 5min, 吸取上清液, 残余物用 5mL 蒸馏水提取两次, 合并上清液。C₁₈ 柱用 4mL 甲醇及 4mL 水活化后, 将样品提取液全部加样到净化柱中, 先用 4mL 水淋洗, 再用 4mL 水-甲醇(1:1)洗脱, 将洗脱液收集, 并定容至 5mL, 20000 × g 离心 5min 后供 HPLC-DAD 或 UPLC-MS/MS 分析。

1.3.2 HPLC 测定条件

色谱柱: Waters Atlantis C₁₈(4.6mm × 250mm, 5.0μm); 柱箱温度: 30℃; 流动相: 乙酸-乙酸铵缓冲液-甲醇(55:45), 等度洗脱, 流速为 1mL/min; 进样量: 20μL; 检测波长: 530nm。

1.3.3 UPLC-MS/MS 测定条件

色谱柱: Waters Acquity BEH C₁₈(50mm × 2.1mm, 1.7μm); 流动相: 乙腈-乙酸铵缓冲液(2mmol/L), 梯度淋洗, 初始条件: 0~2min 10% 乙腈线性上升至 45%, 2~3min 乙腈保持 45%, 3~3.1min 45% 乙腈下降至 10%, 流速: 0.3mL/min; 进样量: 10μL。质谱条件: 采用电喷雾负离子模式, 多反应监控扫描模式: m/z 231.7 > 157.9, 碰撞能量, 15eV; m/z 231.7 > 178.9, 碰撞能量, 10eV; 毛细管电压: 2.75kV; 锥孔电压: 26.74V; 源温度: 110℃; 脱溶剂气温度: 400℃; 脱溶剂气流量: 650L/h; 电子倍增电压: 650V。

2 结果与分析

2.1 样品提取

红色 2G 属于人工合成色素, 极易与蛋白质结合或被吸附。本实验采用 0.662mol/L 氨水的均质提取, 蛋白质溶解度提高, 吸附的色素被释放, 能够提高提取效率。但是, 实验过程中用乙酸调节提取液 pH 值时, 由于蛋白质盐析, 产生大量沉淀。称取香肠样品, 添加 1.00mg/kg 红色 2G, 对比以下两种前处理方法的回收率: 样品均质提取后, 用乙酸调 pH 值, 离心定容后, 取部分样液注入液相色谱仪测定, 添加回收率只有 51.4%; 而样品均质提取后, 用乙酸调 pH 值, 离心后沉淀用 5mL 蒸馏水提取两次, 将所有提取液合并后定容, 取部分样液注入液相色谱仪测定, 添加回收率为 82.3%, 可见在蛋白质沉淀过程中共沉淀作用降低了红色 2G 的回收率。

2.2 样品净化

Minioti 采用 HPLC 法测定水溶性食品中 13 种人工合成色素^[4], 水提取液过滤后直接分析, 没有样品净化步骤, 本实验涉及的样品基质是肉类食品, 提取液中的少量脂肪和蛋白质对分析产生影响。量取 1μg 的标准溶液, 用 10mL 氨水(0.662mol/L)稀释, 并用乙酸调整 pH 值为 5~6 后加到 C₁₈ 柱上, 经 4mL 水淋洗, 4mL 水-甲醇(1:1)洗脱, 收集洗脱液测定, 结果表明红色 2G 的回收率达到 104%, 可见通过调节 pH 值使红色 2G 吸附于 C₁₈ 柱上, 甲醇-水(1:1)能够将其全部洗脱, 故选用 C₁₈ 柱进行样品净化, 既能去除样品中大分子干扰, 还能确保目标组分的回收。

2.3 HPLC 法

2.3.1 检测波长的选择

吸取 424ng/mL 的红色 2G 标准溶液, 注入 HPLC, 记录二极管阵列扫描图(200 ~ 800nm), 图 1 为红色 2G 的紫外 - 可见光谱图, 在 235、311、505、530nm 都有较强的吸收, 由于 530nm 波长处的吸收很强, 同时可见区干扰较小, 故选其作为检测波长。

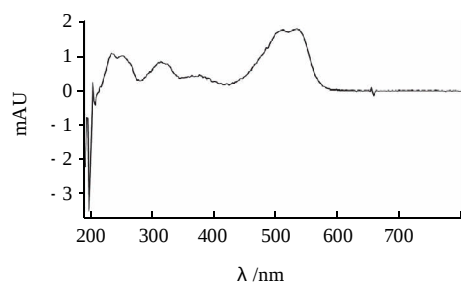
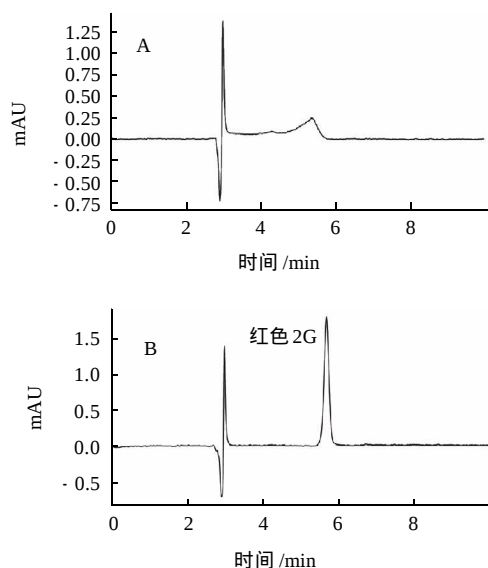


图 1 红色 2G 的紫外 - 可见光谱图
Fig.1 UV-Vis spectrum of Red 2G

2.3.2 流动相的选择

红色 2G 属于单偶氮化合物, 且为磺酸钠盐, 流动相的 pH 值对其分离影响较大。本实验比较甲醇 - 水作为流动相和甲醇 - 缓冲溶液(乙酸 - 乙酸铵)的差别, 发现采用前者作为流动相进行洗脱时, 色谱峰前伸, 峰形差, 选择甲醇 - 缓冲溶液(乙酸 - 乙酸铵)后, 峰形得到有效的改善。



A. 甲醇 - 水作为流动相; B 为甲醇 - 缓冲液为流动相。

图 2 流动相对红色 2G 分离的影响

Fig.2 Effect of mobile phase composition on red 2G separation

2.3.3 线性实验

吸取红色 2G 标准储备液, 用超纯水稀释为 0.0212、0.0424、0.0530、0.106、0.212、0.424、0.636、1.06mg/L 的标准工作液, 依次注入 HPLC 分析, 以标准溶液的相应峰面积对应其质量浓度进行线性回归计算, 线性方程

为 $y=0.0311x - 0.1418(r=0.9996)$ 。

2.3.4 方法的加标回收及精密度、测定限

将 3 个不同添加水平的红色 2G 标准溶液分别添加于香肠样品中, 具体添加水平见表 1。每个添加水平平行测定 6 次, 红色 2G 的平均回收率在 79.0% ~ 86.5% 之间, 相对标准偏差(RSD)在 3.19% ~ 5.06% 之间, 结果见表 1。按信噪比 $R_{SN}=10$ 计算红色 2G 的测定限为 0.106mg/kg。

表 1 HPLC 方法的加标回收率和精密度实验结果 ($n = 6$)
Table 1 Accuracy and precision of HPLC method ($n = 6$)

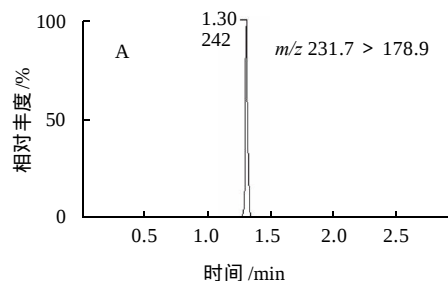
添加水平/(mg/kg)	平均测定值/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.200	0.173	86.5	5.06
0.800	0.660	82.5	3.61
2.00	1.58	79.0	3.19

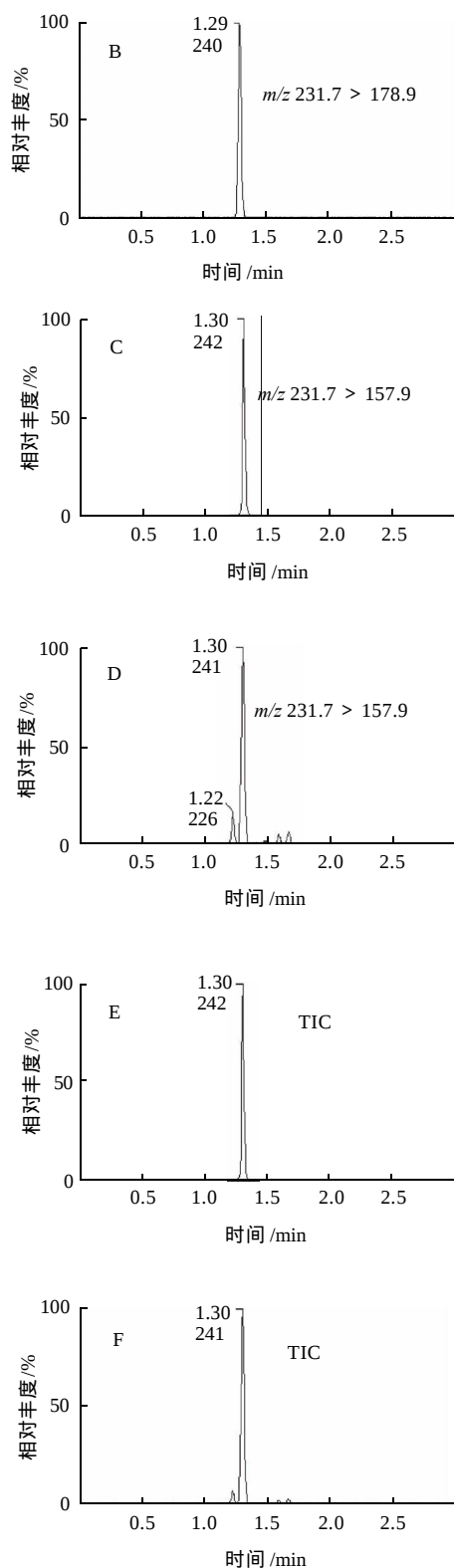
2.4 UPLC-MS/MS 确证方法

以准分子离子峰 $[M-2Na]^+$ 为母离子 ($m/z=231.7$) 进行扫描, 选择丰度较高的碎片峰 $[M-2Na-C_4H_6-N_2]^+$ 和 $[M-2Na-C_4H_6-N_2-COCH_2]^+$ 作为子离子, m/z 分别为 178.9 和 157.9, $m/z=157.9$ 碎片峰的优化碰撞电压为 15eV; $m/z=178.9$ 碎片峰的优化碰撞电压为 10eV, $m/z=178.9$ 与 $m/z=157.9$ 的离子比率为 1.3:1.0。在仪器的检测限为 0.001mg/L(信噪比 $R_{SN}=3$), 将 2 个不同浓度水平的红色 2G 标准溶液分别添加于香肠样品中, 具体添加水平见表 2, 按以上样品处理方法操作并测定, 每个添加水平平行测定 6 次, 红色 2G 的平均回收率在 75.5% ~ 80.2% 之间, 相对标准偏差(RSD)在 3.62% ~ 9.97% 之间, 结果见表 2。按信噪比 $R_{SN}=10$ 计算红色 2G 的测定限为 0.005mg/kg, 图 3 为红色 2G 的标准谱图(标准质量浓度为 0.212mg/L)及标准添加样品谱图(标准添加水平为 0.200mg/kg)。

表 2 UPLC-MS/MS 方法的准确度和精密度实验结果 ($n = 6$)
Table 2 Accuracy and precision of UPLC/MS/MS method ($n = 6$)

添加水平/(mg/kg)	平均测定值/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.0500	0.0401	80.2	9.97
0.200	0.151	75.5	3.62





A、C、E. 标准谱图；B、D、F. 标准添加样品谱图。

图3 红色2G的UPLC/MS/MS谱图

Fig.3 UPLC/MS/MS chromatography of red 2G

2.5 实际样品测定

从超市购买6种品牌的香肠用所建立的方法进行测定，均未检出红色2G。

3 结论

本研究建立香肠中红色2G的HPLC分析方法和UPLC-MS/MS确证方法。通过线性、准确度、精密度的实验以及样品的测定，验证了方法的可行性。本方法灵敏度高，测定结果准确可靠，使用范围广。

参考文献：

- [1] Commission Regulation (EC) No 884/2007 of 26 July 2007 on emergency measures suspending the use of E 128 Red 2G as food colour[J]. Official Journal of the European Union, 2007, L195: 8-9.
- [2] European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on the food colour Red 2G (E128) based on a request from the Commission related to the re-evaluation of all permitted food additives [EB/OL].(2007-07-16)[2010-06-17].http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178624461311.htm.
- [3] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. GB/T 2760—2007食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [4] GB/T 5009.35—2003 食品中合成着色剂的测定[S].
- [5] GB/T 5009.141—2003 食品中诱惑红的测定[S].
- [6] GB/T 9695.6—2008 肉制品中胭脂红着色剂的测定[S].
- [7] GB/T 21916—2008 水果罐头中合成着色剂的测定高效液相色谱法[S].
- [8] GB/T 21912—2008 食品中二氧化钛的测定[S].
- [9] 王全林, 应路, 张书芬, 等. 二极管阵列高效液相色谱法测定食品中红色2G[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 164-167.
- [10] MINIOTI K S, SAKELLARIOU C F, THOMAIDIS N S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector[J]. Anal Chim Acta, 2007, 583(1): 103-110.
- [11] RYVOLOVA M, TABORSKY P, VRABEL P, et al. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2007, 1141(2): 206-211.
- [12] ISHIKAWA F, SHIGEOKA S, NAGASHIMA M, et al. Analytical method of 21 coal-tar dyes in protein-rich foods by solid-phase extraction and HPLC[J]. Journal of Food and Hygiene Society of Japan, 2000, 41(3): 194-199.
- [13] ISHIKAWA F, OISHI M, SHINDO T, et al. Confirmation of non-permitted detected dyes in akasu (red vinegar) by LC/MS[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2005, 46(5): 228-233.
- [14] YOSHIOKA N, ICHIHASHI K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection[J]. Talanta, 2008, 74(5): 1408-1413.
- [15] ZALACAIN A, ORDOUDI S A, BLAZQUEZ I, et al. Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin[J]. Food Addit Contam, 2005, 22(7): 607-615.