

液相色谱-质谱法分析禽蛋中的苏丹红

曹莹, 黄士新, 张文刚

(上海市兽药饲料监察所, 上海 201103)

[收稿日期] 2006-12-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2007)06-0001-03 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了禽蛋中苏丹红的液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测方法。液相色谱柱为 Waters SunfireTM C₁₈ 150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm, 柱温 30 ℃, 流动相 A 为乙腈, B 为 0.2% 甲酸和乙腈的混合溶液, 梯度洗脱, 流速 0.25 mL/min; 质谱选择电喷雾离子源(ESI⁺)。此条件下苏丹红 I 和苏丹红 II 的线性范围是 0.1~500 μg/L, 检测限 0.1 μg/kg; 苏丹红 III 和苏丹红 IV 的线性范围是 0.5~500 μg/L, 检测限 0.5 μg/kg。四种苏丹红的回收率为 60%~80%。

[关键词] 禽蛋; 苏丹红; 液相色谱-质谱法

Determination of Sudan Red in Eggs by LC-MS

CAO Ying, HUANG Shixin, ZHANG Wengang

(Shanghai Institute for Veterinary Drug and Feedstuffs Control, Shanghai 201103, China)

Abstract A LC-MS method for sudan red in eggs was established. The HPLC conditions were: a column of C₁₈ 150 mm × 2.1 mm (i.d.); acetonitrile as mobile phase A; acetonitrile and 0.2% formic acid (15:85) as mobile phase B; gradient elution with a flow rate of 0.25 mL/min. Mass conditions were ESI⁺ and SM mode. The linearity range was 0.1~500 μg/L of sudan I and II, 0.5~500 μg/L of sudan III and IV. The LOQ was 0.1 μg/kg for sudan I and II, 0.5 μg/kg for sudan III and IV. The recovery rate was 60%~80%.

Key words eggs; sudan red; LC-MS

苏丹红是一种人工合成的红色工业染料, 被广泛用于如溶剂、油、蜡、汽油的增色以及鞋、地板增光等方面。苏丹红的原形和体内代谢物都具有较强的致癌性、致敏性和遗传毒性, 1995年欧盟等国家已禁止其作为色素在食品中进行添加, 我国也于1996年出台《食品添加剂使用卫生标准》禁止其用于食品生产。但由于其染色鲜艳, 仍有一些食品加工企业为提升产品的感观效果而私自添加。近几年来, 有些禽蛋企业, 特别是咸鸭蛋的生产加工点, 为了追求“红心蛋”的品牌效应, 增加销售利润, 在蛋禽饲养过程中添加苏丹红, 危害了人体健康。

目前, 国内对苏丹红的研究主要在食品卫生领域, 制定了 GB/T 19681-2005“食品中苏丹红染料的检测方法——高效液相色谱法”, 该方法分析时间较长, 没有提及禽蛋的样品处理方法, 且灵敏度(10 μg/kg)也不能满足禽蛋中苏丹红的分析要求。本试验应用液相色谱-质谱联用仪分析禽蛋中的苏丹红, 具有回收率好、灵敏度高、稳定性好等特点, 为食用禽蛋制品的安全提供了有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 仪器 液质联用仪: Waters 2695液相色谱仪, ZQ 2000质谱检测器(配有电喷雾电离源), 美国

作者简介: 曹莹(1978年-), 男, 畜牧师, 主要从事药物残留检测方法的制定以及分析技术的研发。Tel: 021-62688731;

E-mail: caoyingver@gmail.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

WATERS公司。离心机,美国 IEC 公司;旋转蒸发器,德国 Heidolph 公司;电子分析天平,美国 OHAUS公司;旋涡混合仪,德国 Heidolph 公司;振荡器,广州 IKA 公司。

1.2 药品和试剂 对照品:苏丹红 I 批号 40517,纯度 97.5%;苏丹红 II 批号 50404 纯度 90.0%;苏丹红 III 批号 40517,纯度 97.0%;苏丹红 IV,批号 40517,纯度 91.0%;德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。乙腈,色谱纯, MERCK 公司。其他试剂均为分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司。水为重蒸馏水。中性氧化铝小柱 1 g:3 mL, SUPELCO 公司。

1.3 对照溶液的配制 苏丹红 I~IV 标准液:精密称取苏丹红对照品,用丙酮配成约 100 mg/mL 对照品贮备液;贮备液再用丙酮依次稀释成浓度为 0.1、0.5、1、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 的对照品工作液。

1.4 试验方法

1.4.1 色谱条件 Waters SunfireTM C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.25 mL/min;进样量 10 μL 。流动相 A 为乙腈;流动相 B 为 0.2% 甲酸:乙腈 (85:15)。梯度洗脱程序:0~10 min, 85% 流动相 A 线性变化至 100%;10~13 min, 100% 流动相 A;13~14 min, 100% 流动相 A 线性变化至 85%;14~17 min, 85% 流动相 A。

1.4.2 质谱条件 电离方式为电喷雾电离源 (ESI⁺);离子源温度 110 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$;毛细管电压 3.50 kV;气体流速 350 L/h;RF 六极杆透镜电压 0.5 V;萃取锥孔电压 2 V;离子能量 1.0 V;碎片离子监测条件见表 1。

表 1 碎片离子监测条件表

组分名称	监测碎片的荷质比 (m/z)	锥孔电压 /V	监测时段 /min
苏丹红 I	249, 232, 156	28	3.0~6.0
苏丹红 II	277, 260, 156	25	6.0~9.0
苏丹红 III	353, 197, 118	41	8.0~11.0
苏丹红 IV	381, 224, 132	46	11.5~15.0

1.4.3 标准曲线 以工作液的浓度由小到大的次序,按上述色谱和质谱条件进样分析,以选择离子的峰面积 (y) 对浓度 (x) 作图,计算线性方程和相关系数。

1.4.4 样品预处理 将鲜蛋或生的咸蛋煮熟,取蛋黄并研磨均匀后备用。称取 1.0 g 蛋黄,加入 15 mL 乙腈和 1 g 无水硫酸钠,涡旋 1 min,振荡 10 min, 6 000 r/min 离心 5 min,取上清液。再加入 8

mL 乙腈和 8 mL 丙酮重复提取一次,合并上清液于 50 mL 梨形瓶,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上旋转蒸发至干,加入 1 mL 正己烷溶解残余物,备用。中性氧化铝小柱用 10 mL 正己烷淋洗后加入备用液,再用 5 mL 正己烷分两次洗涤梨形瓶,洗涤液上柱,最后用 4 mL 丙酮洗脱 (控制滴速为两秒一滴),洗脱液蒸干后用 1 mL 流动相 (A:B=85:15) 溶解,经 0.2 μm 滤膜过滤后供 LC/MS 分析。

1.4.5 样品回收率及精密度测定 取空白禽蛋 1.0 g 定量加入苏丹红对照品,按样品预处理方法处理后,LC/MS 检测。

1.4.6 检测限和定量限测定 按色谱峰信噪比大于 3 的要求确定检测限,按色谱峰信噪比大于 10 的要求确定定量限。

2 结果

2.1 标准曲线 结果见表 2。

表 2 标准曲线表

组分名称	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数
苏丹红 I	0.1~500	$y = 28.471x + 84.989$	0.9993
苏丹红 II	0.1~500	$y = 19.385x + 105.154$	0.9991
苏丹红 III	0.5~500	$y = 4.5590x + 52.027$	0.9982
苏丹红 IV	0.5~500	$y = 3.3371x + 57.264$	0.9979

2.2 苏丹红的色谱图和质谱图 苏丹红 I~IV 选择离子色谱图见图 1,全扫描质谱图见图 2。

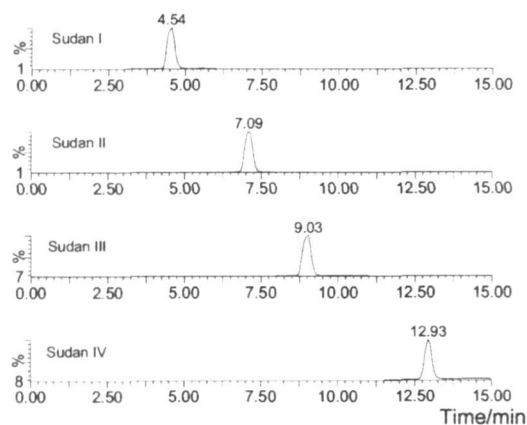


图 1 10 $\mu\text{g/L}$ 苏丹红对照品工作液的 SR 色谱图

2.3 样品回收率 在空白禽蛋样品中分别添加适量的苏丹红 I、II、III、IV 对照溶液,制成 0.1 (苏丹红 I、II)、0.5 (苏丹红 III、IV)、1、10、50 $\mu\text{g/kg}$ 浓度,每个浓度做 4 个平行,3 个批次,按样品预处理方法处理并检测,结果见表 3。

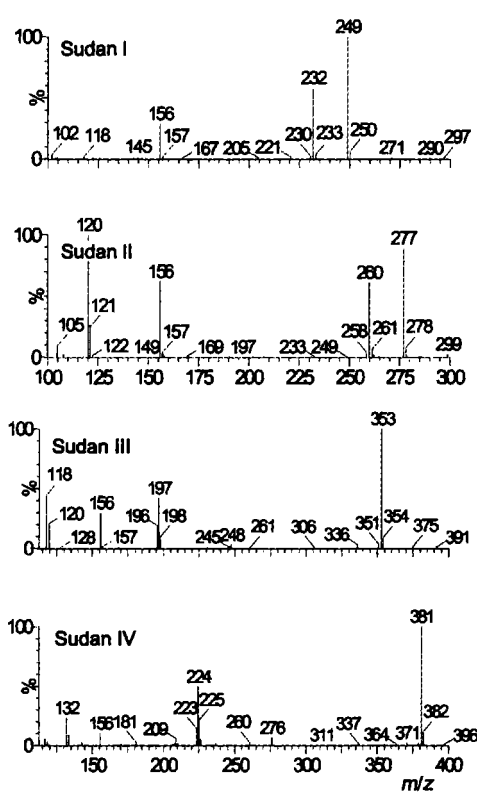


图 2 苏丹红 (浓度 100 µg/L)的质谱图

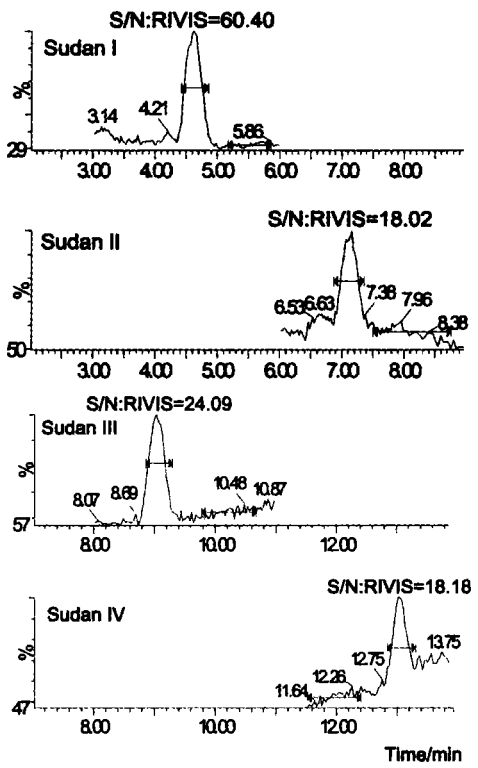


图 3 苏丹红 I II(添加浓度 0.1 µg/kg)和苏丹红 III IV(添加浓度 0.5 µg/kg)的信噪比

表 3 回收率测定结果

组分	添加浓度	回收率	批内 RSD	批间 RSD
	$/(µg \cdot kg^{-1})$	$F\%$	$F\%$	$F\%$
苏丹红 I	0.1	56.3	9.68	7.87
	1	63.2	8.44	6.35
	10	66.6	5.26	5.95
	50	73.6	3.24	2.33
苏丹红 II	0.1	52.0	9.10	6.95
	1	65.9	5.43	8.21
	10	69.8	3.36	4.04
	50	78.4	2.01	3.25
苏丹红 III	0.5	54.7	6.77	7.54
	1	60.3	6.15	6.22
	10	64.2	3.88	3.21
	50	71.5	2.57	4.27
苏丹红 IV	0.5	50.5	8.65	8.41
	1	60.5	3.86	4.45
	10	65.9	2.57	3.59
	50	72.7	3.04	5.02

2.4 检测限和定量限 在信噪比大于 10 的情况下苏丹红 I 和苏丹红 II 的定量限为 0.1 µg/kg 苏丹红 III 和苏丹红 IV 的定量限为 0.5 µg/kg (图 3)。在信噪比大于 3 的情况下苏丹红 I 和苏丹红 II 的检测限为 0.05 µg/kg 苏丹红 III 和苏丹红 IV 的检测限为 0.25 µg/kg。

3 讨论

3.1 碎片离子的选择 苏丹红 III IV 在锥孔电压 30 V 以下几乎不产生碎片, 只有稳定的分子离子峰 $[M + H]^+$, 在锥孔电压增加至 50 V 时有大量碎片峰出现。而苏丹红 II 在锥孔电压 30 V 以上时分子离子峰几乎消失, 故针对四种苏丹红必须选择不同的锥孔电压以保证其特征碎片离子稳定存在, 且相对丰度较大。

3.2 色谱条件确定 苏丹红 I II III 在等度条件下可以在 10 min 内完成检测, 但检出苏丹红 IV 需要将时间延长至 20 min 以上, 因此, 在前三种苏丹红检出后适当设置梯度条件可以有效的缩短检测时间, 改善色谱峰峰形。在一定浓度范围内, 提高甲酸浓度有利于碎片离子形成以及峰形优化。

3.3 提取溶剂的选择 正己烷在禽蛋样品中作为提取液效果并不好。在咸鸭蛋的处理过程中, 用正己烷提取, 蒸干后残余大量油状物, 上柱易堵塞。选用乙腈可以有效避免这一问题, 加入丙酮也是有利于苏丹红和一些有色物质的浸出。

参考文献:

[1] GB/T19681-2005 食品中苏丹红染料的检测方法——高效液相色谱法[S].