

# 改进 QuEChERS-液质联用法 测定食品中 6 种非食用色素

曾 凯<sup>1,2</sup>, 罗明标<sup>1\*</sup>, 唐 俊<sup>2</sup>, 万 亮<sup>2</sup>, 陈春艳<sup>2</sup>

(1. 东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013;

2. 南昌市食品药品检验所, 南昌市中药质量控制与安全性评价重点实验室, 江西 南昌 330012)

**摘要:**建立了 QuEChERS 提取和净化样品的改进方法, 利用超高效液相色谱-三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)同时测定食品中 6 种非食用色素碱性橙 II、罗丹明 B、苏丹红 I~IV 的方法。针对不同基质样品采用乙腈或乙腈-水萃取、低温冷冻、C<sub>18</sub> 净化、液相分离后多反应离子监测模式(MRM)测定。对红酒、葵花籽、糖果的检测结果表明, 6 种非食用色素的方法检出限为 1.0~20.0 μg/kg; 回收率为 72.4%~114.7%, 相对标准偏差(RSD)为 3.7%~11.3%。与传统前处理方法相比, 该方法在有机试剂消耗量、时间上均可节省 50% 以上。

**关键词:** QuEChERS; 液质联用; 食品; 非食用色素

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)11-0198-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.11.046

## Simultaneous determination of six inedible pigments in food by improved QuEChERS-UPLC-MS/MS method

ZENG Kai<sup>1,2</sup>, LUO Ming-biao<sup>1\*</sup>, TANG Jun<sup>2</sup>, WAN Liang<sup>2</sup>, CHEN Chun-yan<sup>2</sup>

(1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang 330013, China; 2. Nanchang Key Laboratory of Quality and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanchang Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330012, China)

**Abstract:** An improved QuEChERS method is developed for the extraction and purification of food samples. The simultaneous determination method of six inedible pigments including basic orange II, Rhodamine B, Sudan red I, II, III and IV in the samples are simultaneously determined by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) is also established. The samples with different matrix are extracted by acetonitrile or acetonitrile-water, then frozen in refrigerator, purified by C<sub>18</sub> and separated by UPLC, finally detected by mass spectrometry in the mode of multiple reaction monitoring (MRM). The detection results on red wine, sunflower seeds and candy show that the detection limits for six inedible pigments by this method varies from 1.0 to 20 μg·kg<sup>-1</sup>, the average recovery rates range from 72.4% to 114.7%, the relative standard deviations are in the range of 3.7% to 11.3%. Compared with the traditional pretreatment method, this method can save more than 50% of organic reagents usage and operation time.

**Key words:** QuEChERS; UPLC-MS/MS; food; inedible pigments

工业染料对人体有致癌作用、遗传毒性作用<sup>[1-2]</sup>, 对消费者的身体健康造成极大危害, 故食品监管部门将这些工业染料列为非食用物质, 禁止在食品中添加。碱性橙 II、罗丹明 B、苏丹红是常被非法添加的工业染料, 是一线食品检验工作监控的重点。目前, 常用的非食用色素的前处理方法有液液萃取法<sup>[3]</sup>、固相萃取法<sup>[4-6]</sup>、凝胶渗透净化法<sup>[7-8]</sup>, 测定方法主要为液相色谱法<sup>[3-5,9]</sup>和液相色谱-质谱联

用法<sup>[6-8,10]</sup>, 这些方法存在前处理步骤较为复杂, 有机试剂用量太大, 净化试剂质量参差不齐, 导致结果差距大, 难同时检测多种非食用色素等问题。

QuEChERS 技术较传统前处理技术具有精准度高, 操作更简单, 成本更低廉, 环境友好等众多优势, 逐渐替代传统前处理方法。QuEChERS 法多用于农药残留、兽药残留的前处理<sup>[11-14]</sup>, 很少用于食品中非食用色素的研究<sup>[15-18]</sup>, 难点首先在于这些染料有

收稿日期: 2017-06-20

基金项目: 江西省质谱科学与仪器重点实验室开放基金项目(JXMS201503); 长江学者和创新团队发展计划资助(IRT13054); 南昌市指导性科技计划项目(洪科字 96 号第 123 项)

作者简介: 曾凯(1983-), 男, 博士, 高级工程师, 从事食品质量安全研究, 89692176@qq.com; 罗明标(1963-), 男, 博士, 教授, 从事分析化学研究, 通讯联系人, luomingbiao\_ecut@126.com。

油溶性的,也有水溶性的,难以从各类食品中高效提取这些染料;其次,食品中各种染料容易被大部分吸附剂吸附,难解析。

笔者改进了 QuEChERS 方法,建立适用于低浓度多种非食用色素同时检测方法,为食品中非食用色素的风险检测提供更准确、便捷、环保的技术支持。

## 1 实验方法

### 1.1 仪器与试剂

1290-6460 液相色谱串联质谱仪,美国安捷伦公司生产;XS205 十万分之一天平,美国 Mettler Toledo 公司生产;TDL-5 离心机,上海安亭科学仪器厂生产。

碱性橙 II、罗丹明 B 和苏丹红 I ~ 苏丹红 IV 标准品, Sigma-Aldrich LAB Chemikalien GmbH 生产;乙腈、乙酸铵,色谱纯,德国 Merck 公司生产;氯化钠,分析纯,国药集团生产;0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜、 $\text{C}_{18}$  净化剂,上海安谱实验科技股份有限公司生产;实验室用水为超纯水。

### 1.2 标准溶液的配制

准确称取适量苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、罗丹明 B、碱性橙 II 标准品,用乙腈溶解,得到标准储备液,避光于 4℃ 下保存,使用前稀释。

### 1.3 样品处理

纯油基质样品:称取 2.00 g 样品于 15 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈,涡旋提取 5 min, 5 000 r/min 离心 2 min, -20℃ 冷冻 1 h, 取出后移取 2 mL 乙腈

层于装有 100 mg  $\text{C}_{18}$  的 15 mL 离心管中,涡旋 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜,待测。

非纯油基质样品:称取 2.00 g 样品于 15 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈、5 mL 超纯水,涡旋提取 2 min, 加入 1 g 氯化钠,涡旋震荡 2 min, 5 000 r/min 离心 2 min, -20℃ 冷冻 1 h。迅速移取 2 mL 乙腈层溶液,加入到装有 100 mg  $\text{C}_{18}$  的 15 mL 离心管中,涡旋 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜,待测。

### 1.4 液相色谱串联质谱条件

#### 1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX-SB- $\text{C}_{18}$  (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 进样量: 5  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 40℃; 流速: 0.3 mL/min; 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	w(A)/%	w(B)/%
0.00	0.3	70	30
1.00	0.3	70	30
6.00	0.3	5	95
9.50	0.3	5	95
10.5	0.3	70	30

#### 1.4.2 质谱条件

离子源: ESI 正模式; 雾化气: 氮气; 雾化气压力: 15 psi; 离子喷雾电压: 3 500 V; 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 15 L/min; MRM 模式监测。优化确定的质谱条件如表 2 所示。

(上接第 197 页)

- [14] 姜斌, 梁士锋, 冯佳佳. 催化吸收稳定系统的多目标优化[J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(1): 63-66.
- [15] 岳金彩, 曲波, 程华农, 等. NSGA-II 用于光气吸收塔的多目标优化[J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(2): 181-184.
- [16] Palit S. The future vision of the application of genetic algorithm in designing a fluidized catalytic cracking unit and chemical engineering systems-a far-reaching review [J]. International Journal of Chemtech Research, 2015, 7(4): 1665-1674.
- [17] 吴勇, 程明, 项敏建. 基于 NSGA-II 的催化裂化分馏塔的多目标优化[J]. 计算机测量与控制, 2015, 23(1): 70-72.
- [18] 熊俊文, 吕翠英. 催化裂化分馏塔多目标遗传算法优化[J]. 计算机与应用化学, 2006, 23(5): 462-464.
- [19] 刘蓉, 吕翠英. 自适应粒子群法于应用催化裂化分馏塔多目标的优化[J]. 计算机与应用化学, 2010, 27(6): 771-774.
- [20] 申慧敏, 李鹏. 多目标遗传优化算法自适应策略及其在石油加工中的应用[J]. 石油化工自动化, 2007, (4): 29-32.

- [21] 周晓静, 吕翠英. 基于改进蚁群算法的催化裂化分馏塔在线多目标优化[J]. 计算机与应用化学, 2009, 26(4): 443-446.
- [22] Liu B, Yan F, Hu J, et al. Modeling and multi-objective optimization of NO<sub>x</sub> conversion efficiency and NH<sub>3</sub> slip for a diesel engine[J]. Sustainability, 2016, 8(5): 478-491.
- [23] 李大中, 郭放. 生物质气化工中污染物氨催化脱除过程工况优化[J]. 可再生能源, 2013, 31(10): 115-119.
- [24] 侯吉礼, 马跃, 李术元, 等. 世界油页岩资源的开发利用现状[J]. 化工进展, 2015, 34(5): 1183-1190.
- [25] 杨微, 苏成利, 李平. 油页岩干馏过程的流程模拟与多目标优化[J]. 控制工程, 2015, 22(2): 270-275.
- [26] 汪捷, 岳金彩, 郑世清. NSGA-II 求解丙酮回收过程的废料最少化[J]. 计算机与应用化学, 2011, 28(12): 1557-1560.
- [27] Mitra K, Majumdar S. Selection of catalyst for the esterification step of the PPT polymerization process[J]. Macromolecular Theory and Simulations, 2006, 15(6): 497-506. ■

表 2 6 种非食用色素质谱分析条件

名称	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	碎裂电压/V	碰撞能量/V
碱性橙 II	213.0	129.9, 77.0*	122	18, 18
罗丹明 B	443.0	355.0, 399.0*	140	46, 68
苏丹红 I	249.0	93.0, 231.9*	104	30, 10
苏丹红 II	276.9	155.8, 120.9*	104	10, 18
苏丹红 III	353.1	76.7, 156.1*	140	30, 22
苏丹红 IV	381.2	223.8, 91.0*	140	18, 22

注: \* 为定量离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件的选择

经典 QuEChERS 方法一般采用石墨化碳 (GCB)、N-丙基乙二胺 (PSA)、硅胶 ( $C_{18}$ ) 3 种填料配合使用达到净化目的, 6 种非食用色素分子均存在苯环而被 GCB 紧密吸附并难以解析, 不适用非食用色素的净化; 有研究采用 PSA 作为 QuEChERS 法的净化剂<sup>[15, 17]</sup>, 试验中显示 PSA 对罗丹明 B 等具有一定的吸附能力, 调节 pH 至适当碱性虽能大部分解析, 但杂质同样被解析出来, 不予采用。QuEChERS 前处理机理及步骤如图 1 所示。

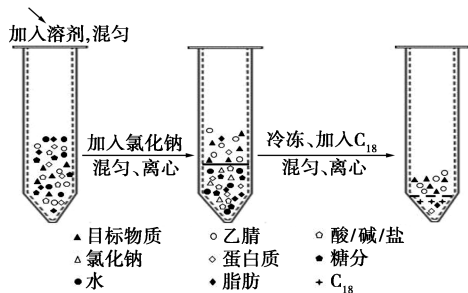


图 1 QuEChERS 前处理流程图

乙腈对碱性橙 II、罗丹明 B、苏丹红 I ~ IV 的溶解性好, 难溶解蛋白质、糖类、脂肪, 对含油样品选择乙腈为提取试剂; 考虑水对各种基质食品的溶解能力, 对于不含油样品选择乙腈和水作为提取试剂。加入溶剂后可将样品中的目标物、蛋白质、糖分、酸碱等物质溶出; 加入氯化钠后由于盐析效应乙腈、水分层, 酸、碱、盐和大部分蛋白质等留在水相中; 通过低温冷冻样液中的大部分脂肪凝固被去除, 再快速转移用  $C_{18}$  净化剂将样液剩余的少量杂质清除。天然色素多是水溶性, 且对检测不造成影响, 去除步骤复杂, 可能部分存在样液中。

$C_{18}$  质量 (0、50、100、150、200 mg) 对检测结果的影响如表 3 所示。由表 3 可以看出, 使用 50、100、

150 mg  $C_{18}$ , 前 5 种非食用色素回收率较好, 苏丹红 IV 回收率稍差; 原因是苏丹红 IV 极性最小,  $C_{18}$  质量不足时样液残留的弱极性杂质抑制苏丹红 IV 电离,  $C_{18}$  过量对苏丹红 IV 有一定吸附。因此,  $C_{18}$  的质量选择 100 mg。

表 3  $C_{18}$  质量对回收率的影响

$C_{18}$ 质量/ mg	碱性 橙 II	罗丹 明 B	苏丹 红 I	苏丹 红 II	苏丹 红 III	苏丹 红 IV
0	87.5	79.2	74.7	75.3	70.6	63.7
50	94.2	88.1	85.4	82.9	83.5	74.6
100	103.0	94.6	90.2	87.3	87.4	82.7
150	99.8	92.5	88.9	87.0	85.5	78.2
200	88.1	89.1	89.1	82.3	82.3	70.5

### 2.2 液相条件的优化

试验比较了以 10 mmol/L 乙酸铵、0.1% 甲酸水溶液分别与甲醇、甲醇-乙腈 (体积比为 1:1)、乙腈配伍作为流动相对检测的影响; 乙腈为流动相时, 目标物分离效果较好, 色谱峰少拖尾且响应灵敏; 分别用 10 mmol/L 乙酸铵、0.1% 甲酸水溶液为流动相, 与乙腈梯度洗脱 6 种非食用色素色谱峰相差不大, 考虑未来扩展本方法同时测定更多非食用色素尤其是酸性染料, 故而选用 10 mmol/L 乙酸铵溶液与乙腈作为流动相梯度淋洗。6 种非食用色素样品加标色谱图如图 2 所示。

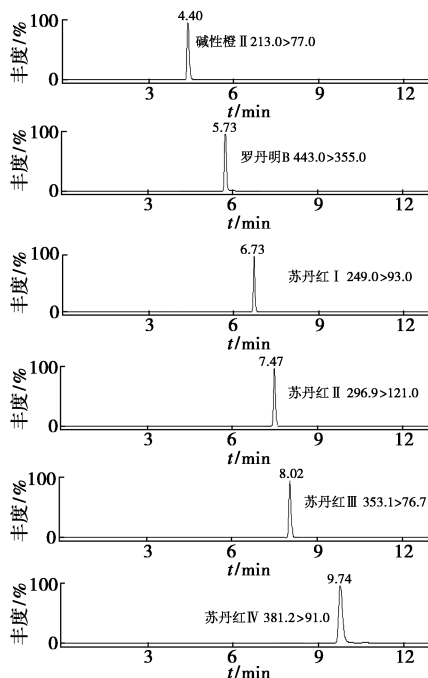


图 2 6 种非食用色素加标样品 MRM 色谱图

## 2.3 方法验证

配制一系列不同质量浓度的6种非食用色素混合标准溶液,结果表明,罗丹明B、碱性橙II、苏丹红I和苏丹红II在2.0~100  $\mu\text{g}/\text{L}$  范围内线性关系良好,苏丹红III和苏丹红IV在8.0~250  $\mu\text{g}/\text{L}$  范围内线性关系良好。以空白样品添加标准溶液进行检出限、不同浓度水平回收率和精密度实验(平行测定6次),结果如表4所示。由表4可以看出,除苏丹红IV回收率、精密度稍差,其他5种非食用色素的方法检出限低,回收率、精密度好。

表4 6种非食用色素的检出限、回收率、相对标准偏差

名称	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	加标 浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	红酒		葵花籽		糖果	
			回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %
碱性橙II	4.0	50	104.4	6.2	102.7	5.4	109.3	5.5
		200	100.7	4.2	102.9	4.7	102.5	4.8
罗丹明B	1.0	50	105.2	5.4	98.4	4.9	105.8	6.2
		200	98.7	4.0	96.7	3.7	103.2	5.6
苏丹红I	4.0	50	92.3	6.1	92.8	6.4	103.5	6.1
		200	93.1	4.1	95.0	4.3	102.9	4.8
苏丹红II	2.0	50	92.0	5.5	93.1	5.8	98.6	5.4
		200	95.4	4.2	95.8	5.0	99.6	4.4
苏丹红III	7.5	100	85.6	6.8	91.3	6.2	86.8	7.5
		400	89.5	5.3	91.9	5.5	87.2	5.1
苏丹红IV	20	100	82.7	9.2	87	8.5	87.5	9.8
		400	86.9	6.3	92.2	5.5	88.0	7.1

## 2.4 方法应用

对市售78份样品进行测定,若采用固相萃取法净化<sup>[4]</sup>,完成前处理约需消耗8000 mL有机试剂,耗时超过7 h。而用本文所述方法仅消耗400 mL有机试剂,完成净化步骤仅耗时3 h,极大地提高了检验效率并减少环境污染。在一批次假冒红酒中检出罗丹明B的质量分数为5.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,而采用SN/T 2430—2010《进出口食品中罗丹明B的检测方法》未能检出罗丹明B。

## 3 结语

采用改进的QuEChERS法对红酒、葵花籽、糖果等食品进行净化,建立了UPLC-MS/MS同时检测食品中碱性橙II、罗丹明B、苏丹红I~IV的方法。样品经乙腈或乙腈-水提取,低温冷冻,  $\text{C}_{18}$  净化,有效去除杂质,采用乙腈-10 mmol/L醋酸铵为流动相进行分离检测。与传统前处理操作相比,该方法检

出限低,有机试剂消耗量、时间均可节省50%以上,对于提高这些染料检验灵敏度、准确性和效率具有重要实用意义。

## 参考文献

- [1] 魏明,候进,李萍.苏丹红的毒性研究进展[J].医学综述,2012(21):97-99.
- [2] 王静.食品中常见的非食用色素的危害及其检测[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(6):24-27.
- [3] 李兰,刘俊,王丰.高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定胶囊壳中20种禁用工业染料[J].分析化学,2016(7):1112-1118.
- [4] GB/T 19681—2005.食品中苏丹红染料的检测方法高效液相色谱法[S].北京:国家质量监督检验检疫总局,2005.
- [5] GB/T 23496—2009.食品中禁用物质的检测碱性橙染料高效液相色谱法[S].北京:国家质量监督检验检疫总局,2009.
- [6] 冯月超,何雅荃,王建凤,等.固相萃取-液质联用法同时测定食品中11种禁用工业染料[J].食品科学,2013,34(24):174-177.
- [7] 赵延胜,董英,张峰,等.食品中46种禁用合成色素的分级提取净化体系研究[J].分析化学,2012,40(2):249-256.
- [8] 郭新东,沈燕萍,罗海英,等.凝胶净化/超高效液相色谱串联质谱法测定调味酱中32种工业染料[J].分析测试学报,2012,31(6):658-663.
- [9] Zacharis C K, Kika F S, Tzanavaras P D, et al. Development and validation of rapid HPLC method for the determination of five banned fat-soluble colorants in spices using a narrow-bore monolithic column[J]. Talanta, 2011, 84:480-486.
- [10] 赵珊,张晶,丁晓静,等.超高效液相色谱电喷雾串联四极杆质谱法检测豆制品中12种禁用工业染料[J].分析测试学报,2016(4):432-437.
- [11] 唐俊,曾凯,张敏,等.基于QuEChERS-液质联用法同时测定大米中五种新型农药残留[J].食品工业,2016,37(3):276-279.
- [12] Zhu Chengyun, Wei Jie, Dong Xuefang, et al. Fast analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leuco-crystal violet in fish tissue based on a modified QuEChERS procedure[J]. 色谱, 2014, 32(4):419-425.
- [13] 李娜,张玉婷,刘磊,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中4类29种禁用兽药残留[J]. 色谱, 2014, 32(12):1313-1319.
- [14] 魏杰,郭志谋,沈爱金.基于QuEChERS前处理技术和弱阳离子交换色谱的牛奶和奶粉中三聚氰胺的快速检测方法[J]. 色谱, 2011, 29(7):687-690.
- [15] 刘丽,吴青,林凤英,等. QuEChERS-HPLC快速测定食品中七种食用合成色素[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12):81-85.
- [16] 唐俊,曾凯,张敏. UPLC-MSMS快速测定辣椒油中苏丹红的方法研究[J]. 广州化工, 2016(20):88-89.
- [17] 张燕,舒平,张妮妮,等. QuEChERS前处理高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中6种工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7):2790-2797.
- [18] 粟有志,马晓雯,孟茹,等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定酵母抽提物中9种黄色合成色素[J]. 2016, 33(2):234-238. ■