

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241203006

引用格式: 王小贺, 吕卓, 袁磊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测香辛料中 13 种偶氮类工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(4): 194-202.

WANG XH, LV Z, YUAN L, *et al.* Rapid detection of 13 kinds of azo industrial dyes in spices by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(4): 194-202. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法快速检测香辛料中 13 种偶氮类工业染料

王小贺, 吕卓, 袁磊*, 徐长根, 陈若渝, 林芳

(陕西省食品药品检验研究院, 西安 710000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定香辛料中非法添加的 13 种偶氮类工业染料(苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、苏丹红 B、罗丹明 B、苏丹红 G、苏丹红 7B、对位红、苏丹橙 G、碱性橙 2、碱性橙 21 和碱性橙 22)的方法。**方法** 样品用水浸润后, 经酸化乙腈(含 1%乙酸)超声提取, 无水硫酸镁与氯化钠辅助净化, 浓缩后, 以乙腈-0.10%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)分离, 采用电喷雾多反应监测、正离子模式测定, 对香辛料中的 13 种偶氮类工业染料进行定性测定, 外标法定量。**结果** 13 种偶氮类工业染料分别在质量浓度 0.5~50.0、1~50 或 4~100 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.99; 检出限可达 1.0~10.0 μg/kg, 定量限可达 3.0~30.0 μg/kg。在 1 倍定量限、2 倍定量限与 10 倍定量限浓度水平的平均加标回收率为 75.7%~102.4%, 相对标准偏差均低于 10% ($n=6$)。**结论** 该方法前处理简便, 具有快速、准确、灵敏的优点, 适用于对香辛料中 13 种偶氮类工业染料的快速筛查与定量检测, 以期对偶氮类工业染料的非法添加监管提供强有力的技术支撑。

关键词: 香辛料; 偶氮类工业染料; 超高效液相色谱-串联质谱法; 快速检测

Rapid detection of 13 kinds of azo industrial dyes in spices by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Xiao-He, LV Zhuo, YUAN Lei*, XU Chang-Gen, CHEN Ruo-Yu, LIN Fang

(Shanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 13 kinds of illegally added azo industrial dyes (Sudan red I, Sudan red II, Sudan red III, Sudan red IV, Sudan red B, rhodamine B, Sudan red G, Sudan red 7B, para red, Sudan orange G, basic orange 2, basic orange 21, and basic orange 22) in spices using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** After the sample was soaked with water,

收稿日期: 2024-12-03

基金项目: 陕西省食品药品安全监测重点实验室项目

第一作者: 王小贺(1973—), 男, 主管技师, 主要研究方向为食品药品质量安全检验研究。E-mail: wangxhwsjd@126.com

*通信作者: 袁磊(1987—), 男, 工程师, 主要研究方向为食品药品安全检测与方法研究。E-mail: 529685582@qq.com

it was extracted with acidified acetonitrile (containing 1% acetic acid) by ultrasonic extraction, and purified with anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride. After concentration, acetonitrile-0.10% formic acid aqueous solution was used as mobile phase, gradient elution, C_{18} chromatographic column (2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μ m) separation, electrospray multi reaction monitoring and positive ion mode determination were used to qualitatively determine 13 kinds of azo industrial dyes in spices, and external standard method was used for quantitative determination. **Results** The 13 kinds of azo industrial dyes showed good linear relationships within the mass concentration ranges of 0.5–50.0, 1–50, or 4–100 ng/mL, with correlation coefficients (r^2) all greater than 0.99; the limits of detection could reach 1.0–10.0 μ g/kg, and the limits of quantification could reach 3.0–30.0 μ g/kg. The average spiked recovery rates at 1-fold, 2-fold, and 10 fold concentration levels were 75.7% to 102.4%, with relative standard deviations below 10% ($n=6$). **Conclusion** This method has the advantages of simple pretreatment, rapid, accurate, and sensitive, and is suitable for rapid screening and quantitative detection of 13 kinds of azo industrial dyes in spices, in order to provide strong technical support for the supervision of illegal addition of azo industrial dyes.

KEY WORDS: spices; azo industrial dyes; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; rapid detection

0 引 言

偶氮染料是以芳香类化合物为原料,经化学合成且在分子中含有偶氮基团(-N=N-)的一类工业合成的染料^[1-3]。与其他合成染料相比较,偶氮染料中的偶氮基团发色能力较好,且颜色基本覆盖了整个色系,光稳定性好,色泽鲜艳、价格低廉且不易褪色,在毛皮制品、塑料、纺织品、木制品、橡胶及陶瓷制品、绘画染料等工业领域得到广泛应用^[4-5]。由于偶氮染料的化学结构中均存在偶氮基团,可通过皮肤或食品进入人体,在消化系统作用下,分解产生具有致癌性的芳香胺,进一步作用改变人体的 DNA 结构引起病变和诱发癌症^[6-9]。近年来,一些食品生产经营者为了使食品的颜色看起来鲜亮、新鲜,以次充好,在外观上能更加吸引消费者,在其中添加偶氮类工业染料,如在辣椒粉、辣椒酱与禽蛋等食品中添加苏丹红与罗丹明 B^[10-12],黄花鱼中添加碱性橙^[13],豆制品中添加碱性嫩黄^[14]等。

目前,欧盟理事会、美国联邦法典等其他国家的法律法规对偶氮染料在食品中的使用都做了明确的限制^[15],自 2008 年以来,我国卫生部先后发布了 6 批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单》,碱性嫩黄、苏丹红等多种偶氮类工业染料被列入。

食用香辛料是在日常烹饪食品与食品工业中使用最频繁的物质,其质量安全也备受关注。香辛料受品种、产地等的影响,等级也不尽相同,价格差异较大,不法商家使用偶氮染料掺假,以改善香辛料外观,谋取利益,如 2011 年的重庆的毒花椒事件^[16]。针对香辛料非法添加偶氮类工业染料的问题,市场监督管理部门不断增加打击手段与力度,在技术上,市场监管局、出入境与农业农村部陆续发布了多个食品中合成染料的检测方法,如 GB/T

19681—2005《食品中苏丹红染料的检测方法 高效液相色谱法》、BJS 202204《豆制品中碱性嫩黄等 11 种工业染料的测定》等,但针对香辛料基质中偶氮染料的检测方法较少,且存在检测高风险化合物较少,通用性不强,无法覆盖检测方法外的化合物,造成较大的监管漏洞。

国内外对食品中偶氮类工业染料的检测方法有较多研究,主要为液相色谱法^[17-18]、高效液相色谱-串联质谱法^[19-20]、液相色谱飞行时间质谱法^[21-22]与电化学法^[23]等,但对于香辛料,采用上述方法检测存在诸多问题,研究表明,由于其基质复杂,高效液相色谱法会出现假阳性的问题;液相色谱飞行时间质谱法分析速度快、质量检测范围宽、分辨率及离子传输率高,在快速筛查分析方面应用较多,可建立标准质谱图库,将组分的质谱图与标准质谱图匹配,再进一步分析确认,但无法对目标物的含量进行准确定量;液相色谱串联-质谱法灵敏度高、抗干扰能力强,对于香辛料中偶氮类工业染料的检测应用较多,但基质中的蛋白质、挥发油、黄酮类、生物碱、甾醇等物质^[24-25]会产生基质效应,对检测灵敏度和准确度有较大的影响,因此优化前处理,降低基质效应是检测过程的关键。目前,对于香辛料基质,常用的前处理方法主要有直接提取法^[26]、凝胶渗透色谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, GPC)法^[27]、固相萃取法^[28]与 QuEChERS 法^[29],直接提取法操作简单,但是需要使用大量的有机溶剂,除杂与净化能力较差;GPC 法净化效果彻底,但需配备高昂的净化设备;固相萃取法净化效果较好,但操作步骤多,耗时长,部分项目回收率偏低;QuEChERS 法操作简单,但是填料种类较固定,对目标物的选择性不高,对脂溶性化合物检测时回收率偏低^[30]。

鉴于此,本研究以违法添加较多的 13 种偶氮类工业染料为研究对象,利用超高效液相色谱-串联质谱法,通过

对前处理与检测条件的优化,建立了香辛料中 13 种偶氮类工业染料的快速检测方法,以期对偶氮染料的非法添加监管提供强有力的技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

TRIPLE QUAD™ 4500 型超高效液相色谱-质谱联用仪(配有电喷雾离子源及 Analyst Software 数据处理系统,美国 SCIEX 公司); Frontier FC5718R 型冷冻离心机(奥豪斯国际贸易上海有限公司); XPE105 型电子分析天平(精度 0.01 mg, 德国赛多利斯公司); FA2104 型电子分析天平(精度 0.1 mg, 上海衡平仪器仪表有限公司); WIGGENS Vortex 3000-Elite 涡旋振荡器(维根技术北京有限公司); YTQX-5200DE 型超声波清洗器(上海叶拓科技有限公司); CMDS-12 型氮吹仪(北京成萌伟业科技有限公司); GWB-1T 型超纯水仪(北京普析通用仪器有限责任公司); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)。

1.2 试剂与材料

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙酸、硫酸镁、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸(色谱纯, 德国默克尔公司); 甲酸铵、乙酸铵(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 混合标准溶液(质量浓度为 100 μg/mL, 天津阿尔塔科技有限公司); 苏丹红 B 标准品(纯度 99.8%, 上海安谱实验科技股份有限公司); 罗丹明 B、苏丹红 G、苏丹红 7B、对位红、苏丹橙 G、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22(纯度均大于 98%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司)。

花椒、八角、香辛料等阴性基质样品(经检测不含偶氮类工业染料), 购自农贸市场。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温为 35 °C; 进样量为 2 μL; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.10% 甲酸水, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.3	5	95
2.0	0.3	5	95
5.0	0.3	90	10
7.0	0.3	90	10
7.5	0.3	5	95
10.0	0.3	5	95

1.3.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(正离子模式); 扫描方式为多反应监测; 离子化电压为 5500 V, 脱溶剂温度为 550 °C, 气帘气压力为 240 kPa, 辅助加热气压力为 380 kPa, 雾化气压力为 380 kPa。各化合物母离子、定量离子、定性、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2 13 种偶氮类工业染料质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of 13 kinds of industrial azo dyes

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 /V	碰撞电压 /eV
苏丹红 I	249.2	156.1*	90	48
		260.1		27
苏丹红 II	277.1	121.2*	90	37
		156.1		30
苏丹红 III	353.2	77.3*	90	39
		156.1		26
苏丹红 IV	381.2	91.2*	90	35
		198.0		27
苏丹红 B	381.1	91.2*	90	39
		106.1		28
罗丹明 B	443.2	399.2*	90	28
		385.1		39
苏丹红 G	279.2	156.2*	90	27
		123.1		33
苏丹红 7B	380.2	183.1*	90	36
		142.2		31
对位红	297.3	156.4*	90	33
		277.1		27
苏丹橙 G	215.2	121.8*	90	44
		169.1		34
碱性橙 2	213.1	94.1*	90	55
		77.1		60
碱性橙 21	315.1	270.1*	90	38
		285.4		35
碱性橙 22	391.3	299.3*	90	29
		220.2		38

注: *为定量离子。

1.3.3 标准溶液配制

准确吸取苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 混合标准溶液 1 mL, 用乙腈稀释, 配制成质量浓度为 1 μg/mL 的标准溶液。

准确称取苏丹红 B、苏丹红 G、苏丹红 7B、对位红、苏丹橙 G、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22 各 10 mg(精确至 0.01 mg), 用丙酮溶解, 乙腈定容, 混匀, 制成 100 μg/mL 的标准储备液, 再用乙腈稀释至 1 μg/mL 的标准溶液。

准确吸取一定体积的上述标准溶液, 用空白基质提取液配制一系列浓度水平的基质标曲工作溶液。

1.3.4 样品前处理

称取混合均匀的样品 2 g(精确至 0.001 g)置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 3 mL 水, 振荡, 使样品全部浸湿, 静置 10 min, 再加入 10 mL 酸化乙腈(含 1% 乙酸), 涡旋混匀 1 min, 超声提取 10 min, 再加入 3 g 无水硫酸镁, 1 g 氯化钠, 涡旋混合 1 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液至氮吹管中, 40 °C 氮气浓缩至近干, 精密加入 1 mL 乙腈复溶, 4 °C 下 10000 r/min 离心 5 min, 上清液供超高效液相

色谱-串联质谱仪分析。

空白基质提取液制备:取阴性样品,按上述方法进行。

1.4 数据处理

采用美国 AB SCIEX 公司数据采集与定量分析工作站进行数据进行定性、定量分析,采用外标法定量, WPS Office 2021 版软件作图表。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

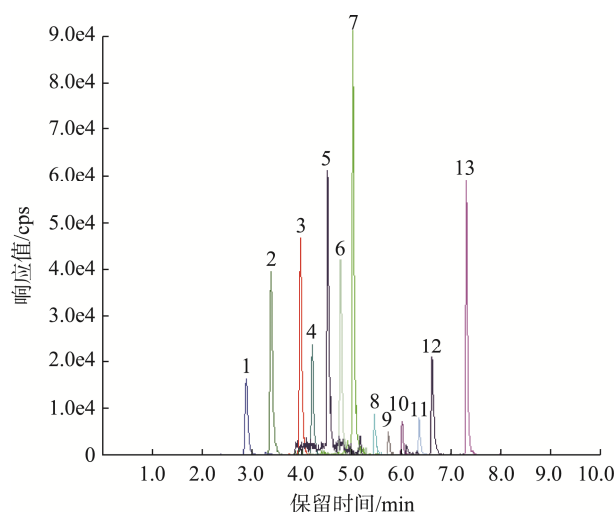
偶氮类工业染料都含有偶氮基团,部分化合物中还包含了氯元素、硫元素等,在电喷雾离子源正离子模式下容易形成 $[M]^+$ 或 $[M+H]^+$ 的分子离子峰。通过质谱进样针直接进样,对偶氮类工业染料分子离子峰进行质谱扫描,确定母离子质核比,再优化碰撞能量等参数。优选丰度比最高子离子作为检测的定量离子,丰度比次级的子离子作为检测的定性离子。优化时发现,苏丹红I两个定性离子分别为 $249.2>128.1$ 、 $249.2>260.1$,丰度比前者高于后者,在检测基质时,由于 $249.2>128.1$ 的基线较高,且存在基质干扰的情况,为保证定性准确,选择了 $249.2>260.1$ 作为定性离子,其他均无干扰情况。优化后的质谱参数见表2。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

依据国家发布的偶氮类工业染料检测标准与目前发表的研究论文,均采用了 C_{18} 色谱柱进行色谱分离^[31-32],常用色谱柱长度规格有50、100、150 mm,内径规格有2.1 mm、2.0 mm,粒径规格有2.7、2.1、1.8、1.7 μm ,对不同规格色谱柱检测13种偶氮类工业染料的分离度进行了测试,由于苏丹红IV与苏丹红B为同分异构体,经实验,仅有柱长为150 mm,内径为2.1 mm,粒径为1.7 μm 的色谱柱能使同分异构体与其他偶氮类工业染料实现基线分离,并对上述规格的Agilent SB- C_{18} 、Thermo AcclaimTM C_{18} 、Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 3个品牌的色谱柱分离

度进行比较, Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱的分离度最优,结果如图1所示,13种化合物均达到了较好的分离。



注:色谱峰1~13依次为:苏丹红B、苏丹红G、苏丹红7B、罗丹明B、对位红、苏丹红II、碱性橙2、苏丹红IV、苏丹红III、苏丹橙G、碱性橙21、苏丹红I、碱性橙22。

图1 13种偶氮类工业染料总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of 13 kinds of industrial azo dyes

2.2.2 流动相的优化

优化质谱条件扫描模式为电喷雾离子源正离子模式,因此流动相的水相采用纯水、0.1%甲酸水溶液、5 mol/L 甲酸铵水溶液、5 mol/L 乙酸铵水溶液、含有0.1%甲酸的5 mol/L 甲酸铵或乙酸铵水溶液,考察各化合物的响应与分离度。结果表明,含有甲酸铵或乙酸铵的水相,碱性橙2、碱性橙21、碱性橙22响应有所增强,其他化合物的响应值下降明显;甲酸水溶液峰型较纯水水相峰型窄,响应高,且分离度优。有机相选择甲醇或乙腈,调节水相中甲酸的含量分别为0.05%、0.10%、0.20%,比较化合物的响应值。结果如图2所示,与甲醇相比,乙腈的洗脱能力

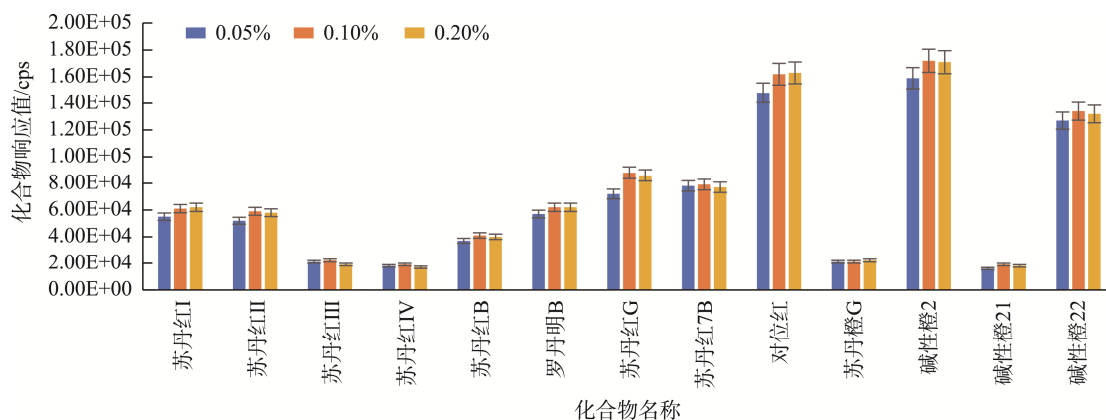


图2 不同浓度甲酸溶液中偶氮类工业染料响应($n=3$)

Fig.2 Response of azo industrial dyes in different concentrations of formic acid solutions ($n=3$)

强,分析效率高,化合物也可达到基线分离,水相中甲酸含量为 0.10%时,化合物响应与灵敏度最高,故确定流动相体系组成为乙腈和 0.10%的甲酸水溶液。并对洗脱程序进行了优化。优化后的程序见表 1。

2.3 前处理条件的优化

13 种偶氮类工业染料均为脂溶性化合物,难溶于水,GB/T 19681—2005、BJS 202204 等国家标准与文献报道^[29-32]中常用的提取溶剂有乙腈、正己烷、乙酸乙酯、丙酮。采用基质加标的方法对提取溶剂的提取效率进行了考察:模拟偶氮类染料的添加方式,称取一定量的阴性样品,向样品中加入使化合物含量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的标准溶液,放置或加热使溶剂挥发,加入上述提取溶剂进行提取,采用溶剂标准曲线进行定量,计算目标化合物的回收率。结果如图 3,通过比较上述提取溶剂发现:乙腈能够有效沉淀基质中的蛋白质,也无法溶解挥发油等物质,提取的非目标物较少,13 种偶氮类工业染料的回收率最高,为 45%~70%;丙酮提取样品中物质较多,基质效应也较大,乙酸乙酯与正己烷,提取效率较低,需经过多次提取才能提高回收率,因此选择乙腈作为提取溶剂。但回收率仍不符合标准 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的技术要求。

13 种偶氮类工业染料均为碱性化合物或呈碱性化合物性质,向提取溶剂中加入一定量的酸可调节提取溶剂的 pH,有助于偶氮染料在提取溶剂中的溶解性,也会抑制在提取过程中可能发生的副反应,使其结构和性质不受影响,有效增加提取效率^[33-34]。经研究,向提取液中添加体积比为 1%乙酸可使提取效率达到最高。同时,向样品中加入提取溶剂前,加入一定量的水,使样品浸湿与溶胀,也可有效提高目标物的回收率。由于不同样品对水的吸收程度不同,且乙腈与水互溶,导致提取溶剂的计算体积发生变化,检测结果不准确,因此需除去提取溶

剂中多余的水。

样品前处理常用的吸水试剂主要为无水乙酸钠与无水硫酸镁,1 mol 无水硫酸镁可吸收 7 mol 水转化为七水硫酸镁,即 1 g 无水硫酸镁可吸收 1.05 g 水,1 mol 无水乙酸钠可吸收 3 mol 水转化为三水乙酸钠,即 1 g 无水乙酸钠可吸收 0.665 g 水,单位质量无水硫酸镁的吸水性大于无水乙酸钠,因此,选择无水硫酸镁作为吸水剂,并对样品、水与无水硫酸镁质量比进行了考察。考察采用空白基质加标的方式,加标量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每个比例重复 3 次,采用溶剂标准曲线定量,计算加标回收率及平均值,结果见表 3。结果表明,当样品、水与无水硫酸镁的质量比为 1:1.5:1.5 时(样品质量为 2 g),多数化合物回收率达到最高。

实验室常用的有机滤膜对染料有一定的吸附作用^[29],因此考察了实验室常用的尼龙、聚四氟乙烯与聚丙烯材质的 0.22 μm 滤膜对 13 种偶氮类工业染料的吸附性。选取质量浓度为 20 ng/mL 的 13 种偶氮类工业染料混合标准溶液,采用上述材料的滤膜进行过滤,对过滤前与过滤后溶液进行检测,比较两者在仪器上的响应,以过滤后与过滤前化合物响应的比值对滤膜的吸附性进行评价。由表 4 的结果可以看出,3 种有机滤膜对苏丹红 I~苏丹红 IV、罗丹明 B 与苏丹橙 G 有一定的吸附作用,故采用低温高速离心的方式代替过滤去除提取液中颗粒杂质。

2.4 基质效应的考察

本研究通过比较溶剂标准曲线与基质标准曲线的斜率来考察基质效应的影响。选择花椒、八角、五香粉空白样品制备空白基质溶液,并用其配制一定浓度的系列标准溶液,上机检测,绘制标准曲线得到基质标准曲线斜率,与相同浓度的溶剂标准曲线斜率进行比较,当比值大于 1 时,表示基质对目标化有增强效应,当比值小于 1 时,表示基质对目标化有抑制效应,当比值接近 1 时,表示基质对目标化合物无影响或影响较小。对 13 种偶氮类工业染料

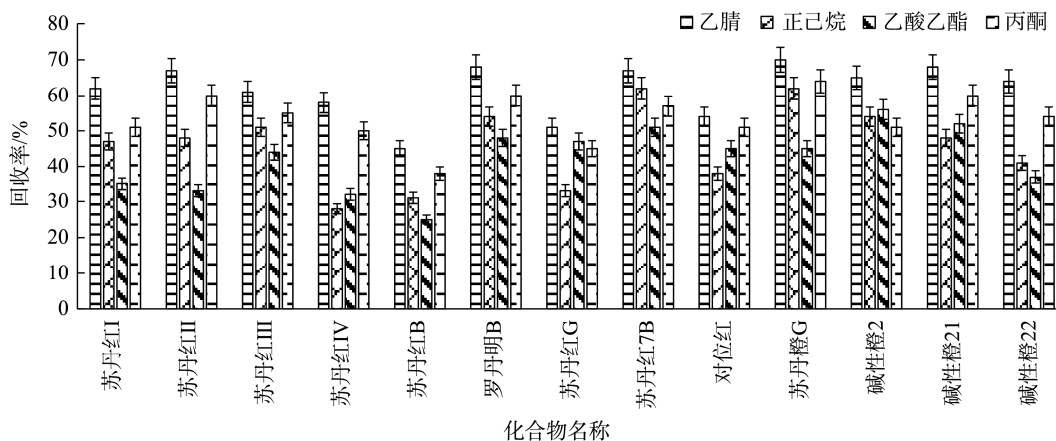


图 3 提取溶剂的优化($n=3$)

Fig.3 Optimization of extraction solvent ($n=3$)

在 3 种香辛料基质中的基质效应进行了考察和评价。表 5 结果表明, 3 种香辛料基质对 13 种偶氮染料检测均出现了不同程度的抑制效应, 因此, 采用基质标准曲线方法对目标物进行定量分析。

表 3 样品、水与无水硫酸镁质量比优化结果($n=3$)
Table 3 Optimization results of mass ratio of sample, water and anhydrous magnesium sulfate ($n=3$)

化合物	回收率 平均值/%		
	1:1:1	1:1.5:1.5	1:2:2
苏丹红 I	52.3	66.4	63.5
苏丹红 II	44.2	48.4	49.5
苏丹红 III	51.3	48.7	49.6
苏丹红 IV	42.5	49.6	48.9
苏丹红 B	65.3	78.2	73.4
罗丹明 B	70.3	72.5	71.2
苏丹红 G	38.9	45.2	44.8
苏丹红 7B	40.1	44.8	42.9
对位红	53.6	55.7	56.1
苏丹橙 G	71.2	76.9	75.4
碱性橙 2	44.8	59.6	57.2
碱性橙 21	69.8	75.4	71.5
碱性橙 22	70.3	68.7	66.9

表 4 滤膜吸附性评价结果表
Table 4 Table of membrane adsorption evaluation results

化合物	过滤后与过滤前化合物响应比值		
	尼龙	聚四氟乙烯	聚丙烯
苏丹红 I	0.73	0.69	0.81
苏丹红 II	0.68	0.71	0.65
苏丹红 III	0.66	0.69	0.71
苏丹红 IV	0.85	0.78	0.78
苏丹红 B	0.94	0.96	0.92
罗丹明 B	0.84	0.71	0.83
苏丹红 G	0.98	0.95	0.97
苏丹红 7B	0.95	0.93	0.91
对位红	0.94	0.92	0.94
苏丹橙 G	0.75	0.71	0.78
碱性橙 2	0.95	0.98	0.94
碱性橙 21	0.93	0.92	0.95
碱性橙 22	0.89	0.93	0.92

表 5 13 种偶氮类工业染料在 3 种香辛料基质中的基质效应
Table 5 Matrix effects of 13 kinds of azo industrial dyes in 3 kinds of spice matrices

化合物	花椒	八角	五香粉
苏丹红 I	0.65	0.70	0.74
苏丹红 II	0.60	0.68	0.70
苏丹红 III	0.65	0.71	0.76
苏丹红 IV	0.61	0.67	0.69
苏丹红 B	0.48	0.57	0.46
罗丹明 B	0.75	0.72	0.71
苏丹红 G	0.56	0.65	0.57
苏丹红 7B	0.81	0.75	0.73
对位红	0.71	0.77	0.70
苏丹橙 G	0.45	0.56	0.51
碱性橙 2	0.78	0.81	0.69
碱性橙 21	0.74	0.68	0.72
碱性橙 22	0.70	0.66	0.64

2.5 方法学考察

2.5.1 检出限、定量限与线性范围

向花椒阴性基质中加入一定量的标准溶液, 按照样品前处理的方法处理样品, 以 13 种偶氮染料定性离子信噪比(S/N) ≥ 3 的含量为检出限, 以定性离子信噪比(S/N) ≥ 10 的含量为定量限。以定量限对应的基质标准浓度为最低点, 配制一系列基质标准曲线浓度点, 上机检测, 以质量浓度为横坐标, 目标化合物定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明, 13 种偶氮类工业染料在一定浓度范围内呈线性, 线性相关系数均大于 0.99。浓度范围、检出限及定量限实验结果见表 6, 满足实验要求。

2.5.2 回收率与精密度

采用加标回收实验来评价方法的准确度和精密性。分别以花椒、八角、五香粉为阴性基质, 向其中分别添加含量为 1 倍定量限、2 倍定量限与 10 倍定量限 3 个水平的标准溶液, 每个浓度水平重复做 6 次, 计算平均加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 其结果见表 7。结果表明, 13 种偶氮类工业染料在 3 个浓度水平的平均回收率范围为 75.7%~102.4%, RSDs 均低于 10%。说明本方法稳定, 测定结果准确, 可以满足检测分析的要求。

2.5.3 实际样品的检测

采用本研究建立的方法, 对陕西省国省抽任务中的 36 批预包装香辛料样品与市售 24 批散装香辛料样品进行检测, 其中 1 批市售散装花椒中检测出罗丹明 B, 含量为 18.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其余均未检出。因此, 有必要对香辛料中的偶氮类工业染料进行监控, 从而保证其质量安全。

表 6 13 种偶氮类工业染料线性范围、检出限与定量限
Table 6 Linear ranges, limits of detection and limits of quantitation of 13 kinds of azo industrial dyes

化合物	线性范围/(ng/mL)	线性方程	线性相关性(r^2)	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
苏丹红 I	2~50	$Y=2.53152e^4X-4071.5$	0.993	5.0	15.0
苏丹红 II	1~50	$Y=5.56781e^4X-3014.2$	0.998	2.5	7.5
苏丹红 III	1~50	$Y=5.17415e^4X-2589.2$	0.997	2.5	7.5
苏丹红 IV	4~100	$Y=1.37415e^4X+1245.7$	0.997	10.0	30.0
苏丹红 B	1~100	$Y=4.72214e^4X-2071.3$	0.995	2.5	7.5
罗丹明 B	0.5~50.0	$Y=1.1425e^5X-6115.2$	0.990	1.0	3.0
苏丹红 G	1~50	$Y=4.91558e^4X-3697.2$	0.992	2.5	7.5
苏丹红 7B	1~50	$Y=5.17458e^4X-3247.6$	0.993	2.5	7.5
对位红	4~100	$Y=1.13258e^4X-2145.6$	0.994	10.0	30.0
苏丹橙 G	4~100	$Y=1.72365e^4X-1258.6$	0.993	2.5	7.5
碱性橙 2	0.5~50.0	$Y=1.3569e^5X-4578.6$	0.993	1.0	3.0
碱性橙 21	4~100	$Y=9.25745e^3X-1258.6$	0.993	2.5	7.5
碱性橙 22	0.5~50.0	$Y=1.3569e^5X-4578.6$	0.993	1.0	3.0

表 7 13 种偶氮类工业染料平均回收率与精密度($n=6$)
Table 7 Average recovery and precision of 13 kinds of azo industrial dyes ($n=6$)

化合物	添加浓度水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/% (RSDs/%)		
		花椒	八角	五香粉
苏丹红 I	15、30、150	83.1 (7.9)、87.4 (6.1)、91.3 (5.7)	81.4 (7.5)、83.1 (6.8)、88.4 (5.4)	80.6 (7.9)、84.1 (3.5)、87.3 (4.4)
苏丹红 II	7.5、15.0、75.0	86.8 (8.5)、89.7 (4.8)、91.6 (5.9)	87.9 (5.1)、90.3 (3.9)、95.2 (5.2)	81.4 (8.5)、84.6 (6.4)、89.6 (5.0)
苏丹红 III	7.5、15.0、75.0	82.6 (6.5)、85.4 (6.2)、88.9 (4.8)	87.2 (7.6)、91.2 (4.9)、94.2 (7.1)	80.6 (5.6)、84.9 (5.1)、91.7 (4.2)
苏丹红 IV	30、60、300	80.9 (4.7)、83.8 (5.9)、88.4 (6.6)	85.1 (8.1)、89.3 (5.6)、92.4 (4.7)	78.6 (6.9)、82.8 (5.5)、86.3 (5.1)
苏丹红 B	7.5、15.0、75.0	90.1 (7.1)、94.2 (5.2)、95.5 (4.1)	93.7 (4.9)、95.9 (3.7)、98.2 (2.8)	85.4 (6.2)、89.6 (4.6)、93.6 (3.9)
罗丹明 B	3、6、30	95.7 (4.8)、98.6 (3.6)、99.5 (1.5)	92.5 (5.9)、97.8 (4.4)、98.6 (3.1)	88.9 (6.5)、92.5 (7.5)、94.5 (2.8)
苏丹红 G	7.5、15.0、75.0	78.5 (6.5)、83.6 (3.8)、86.7 (2.9)	76.4 (5.7)、79.3 (5.1)、83.2 (7.2)	83.1 (4.9)、86.2 (3.4)、88.6 (4.9)
苏丹红 7B	7.5、15.0、75.0	76.2 (6.2)、81.4 (4.8)、85.6 (5.1)	79.3 (6.4)、82.3 (5.1)、89.2 (2.4)	75.9 (6.9)、78.3 (6.4)、81.2 (2.6)
对位红	30、60、300	81.6 (8.1)、82.2 (5.1)、87.3 (6.4)	85.6 (7.2)、89.9 (4.7)、96.2 (4.1)	78.1 (3.7)、82.5 (3.7)、89.6 (6.9)
苏丹橙 G	7.5、15.0、75.0	93.5 (6.1)、98.7 (2.6)、102.4 (7.1)	85.4 (3.9)、89.6 (3.7)、92.6 (2.4)	88.7 (5.9)、94.4 (1.8)、94.7 (2.6)
碱性橙 2	3、6、30	75.7 (6.8)、81.2 (4.3)、89.4 (2.2)	79.6 (3.5)、87.2 (3.2)、90.3 (4.2)	76.3 (4.7)、80.1 (5.6)、90.6 (2.8)
碱性橙 21	7.5、15.0、75.0	86.4 (3.6)、90.1 (5.1)、98.3 (2.8)	90.1 (4.3)、95.6 (2.7)、98.4 (3.6)	82.5 (4.7)、87.5 (3.9)、94.9 (3.6)
碱性橙 22	3、6、30	87.3 (3.9)、91.2 (4.8)、99.6 (2.1)	92.5 (4.4)、98.7 (2.9)、97.8 (4.3)	85.6 (2.5)、91.3 (2.8)、96.7 (1.4)

3 讨论与结论

本研究针对香辛料中非法添加偶氮类工业染料的问题,建立了高效液相色谱-串联质谱法同时测定香辛料中 13 种偶氮类工业染料的快速检测方法,样品经水溶胀,酸化乙腈提取,无水硫酸镁除水,氯化钠辅助沉淀与分层,

即可有效去除了样品中蛋白质、挥发油等杂质的干扰,无需固相萃取、GPC、QuEChERS 等方式净化,操作简便快捷、降低了试剂的消耗。同时,通过方法学考察,方法的检出限、定量限、线性范围、回收率和精密度等技术指标均能满足我国相关标准要求,方法具有较高的重现性和可操作性,能满足对香辛料中偶氮类工业染料的定性和定

量分析要求,为香辛料的安全监管提供了一种有效的技术手段。

本研究建立的快速检测方法,主要应用于香辛料中脂溶性偶氮类工业染料的检测,除添加风险较高的13种外,也可扩展应用于溶剂红1、中性红、碱性品红等其他脂溶性偶氮类工业染料的检测,加标回收率可达65%以上,但其在香辛料中风险较低,未进行深入研究。对于水溶性偶氮类工业染料,其化学性质与脂溶性偶氮类工业染料差异较大,用本方法检测时,回收率偏低,主要原因为基质效应有较大影响,需通过一定的净化方法,检测方法还需做进一步的研究。

参考文献

- [1] BALTAC T, VLAD G, SEBE I. The synthesis of some food azo dyes [J]. *Revista De Chimie*, 2012, 63(1): 18–21.
- [2] 熊志祥. 紫外吸收剂原料—偶氮染料合成研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
XIONG ZX. Study on the synthesis of azo dyes as raw materials of ultraviolet absorbers [D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [3] 高建荣. 染料化学工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
GAO JR. Dye chemical technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [4] 李昱霖, 杨乃蒙, 李海霞, 等. 液相色谱-串联质谱法测定彩色化妆品中15种水溶性偶氮染料含量[J]. *长春工程学院学报(自然科学版)*, 2024, 25(4): 117–121.
LI YT, YANG NM, LI HX, *et al.* Determination of fifteen kinds of azo dyestuffs in cosmetics by LC-MS [J]. *Journal of Changchun Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2024, 25(4): 117–121.
- [5] KRISTI T, ANASTASIA P, GLORIA P. Engaging students in real-world chemistry through synthesis and confirmation of azo dyes via thin layer chromatography to determine the dyes present in everyday foods and beverages [J]. *Journal of Chemical Education*, 2017, 94(4): 471–475.
- [6] JHA P, JOBBY R. Remediation of textile azo dye acid red 114 by hairy roots of *Ipomoea carnea* Jacq. and assessment of degraded dye toxicity with human keratinocyte cell line [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 311: 158–167.
- [7] BASU A, KUMAR GS. Interaction of toxic azo dyes with heme protein: Biophysical insights into the binding aspect of the food additive amaranth with human hemoglobin [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 289: 204–209.
- [8] 孙丽萍. 电催化生物膜反应器处理偶氮染料废水研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2022.
SUN LP. Study on treatment of azo dye wastewater by electrocatalytic biofilm reactor [D]. Tianjin: Tianjin Polytechnic University, 2022.
- [9] PIELESZ A, BARANOWSKA I, RYBAK A, *et al.* Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 53(1): 42–47.
- [10] CHEN XH, ZHOU LX, ZHAO YG, *et al.* Application of nanoring amino-functionalized magnetic polymer dispersive micro-solid-phase extraction and ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry in dicyandiamide residue analysis of powdered milk [J]. *Talanta*, 2014, 119: 187–192.
- [11] 罗峰, 余健, 黄亚梅, 等. 液相色谱-串联质谱法测定禽蛋及蛋制品中的苏丹红[J]. *食品安全导刊*, 2024(5): 98–104.
LUO F, YU J, HUANG YM, *et al.* Determination of Sudan red in eggs and egg products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *China Food Safety Magazine*, 2024(5): 98–104.
- [12] MISSAE L, ANTONI O, ARROYO O, *et al.* Determination of sulfonated azo dyes in chili powders by MALDI-TOF MS [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(22): 5833–5843.
- [13] 闵宇航, 刘斯琪, 余晓琴, 等. SPE-UPLC-MS/MS同时测定食品中24种酸性工业染料[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(1): 284–294.
MIN YH, LIU SQ, YU XQ, *et al.* Simultaneous determination of 24 acid industrial dyes in food by solid phase extraction-ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(1): 284–294.
- [14] 刘军, 李道霞, 唐昌云, 等. 食品中17种工业染料的液质联用检测方法研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(10): 298–305.
LIU J, LI DX, TANG CY, *et al.* Determination of 17 industrial dyes in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 46(10): 298–305.
- [15] DONG MY, WU HL, LONG WJ, *et al.* Simultaneous and rapid screening and determination of twelve azo dyes illegally added into food products by using chemometrics-assisted HPLC-DAD strategy [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 171(1): 106775.
- [16] 北方网. 重庆警方侦破“毒花椒”案有毒物染色具致癌性[EB/OL]. (2011-03-18). <http://news.enorth.com.cn/system/2011/04/29/006459804.shtml> [2025-04-29].
Enorth Netnews. Chongqing police detected the “toxic pepper” case, toxic dye has carcinogenicity [EB/OL]. (2011-03-18). <http://news.enorth.com.cn/system/2011/04/29/006459804.shtml> [2025-04-29].
- [17] 沈昌莹, 苏骏敏, 张树权, 等. 食品中合成色素和违禁染料色谱检测的分析研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(7): 34–38, 49.
SHEN CY, SU JM, ZHANG SQ, *et al.* Analytical study on chromatographic detection of synthetic pigments and prohibited dyes in food [J]. *Modern Food*, 2022, 28(7): 34–38, 49.
- [18] 鞠光秀, 吕晓静, 刘畅, 等. 高效液相色谱法测定番茄酱中11种工业染料[J]. *食品安全导刊*, 2022(28): 81–84.
JU GX, LV XJ, LIU C, *et al.* Determination of eleven industrial dyes in ketchup by high performance liquid chromatography [J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(28): 81–84.
- [19] CARDENAS-RIOJAS AA, CALDERON-ZAVALETA SL, QUIROZ-AGUINAGA U. Modified electrochemical sensors for the detection of selected food azo dyes: A review [J]. *ChemElectroChem*, 2024(4): 11.
- [20] 朱姐. 花椒活性成分研究现状及发展前景[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(4): 4–6.
ZHU N. Current situation and development prospect of active components of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim [J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(4): 4–6.

- [21] 林佳曼, 纪佼佼, 武丽娜, 等. 实时直接分析-高分辨质谱法快速筛查食品中 8 种非法添加染料[J]. 质谱学报, 2023, 44(5): 696–705.
LIN JM, JI JJ, WU LN, *et al.* Rapid screening of 8 dyes illegally added in food by direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry Society, 2023, 44(5): 696–705.
- [22] 成杰, 吴安理, 杨如娥, 等. 液相色谱-串联质谱法检测食品中合成染料的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 7986–7994.
CHENG J, WU ANL, YANG RE, *et al.* Recent progress of detection of synthetic dyes in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 7986–7994.
- [23] 陈驰. 基于液相色谱-飞行时间质谱建立食品中着色剂筛查方法的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
CHEN C. Studyh of screening colorants in food by LC-TOF-MS [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [24] SHEN Y, MAO S, CHEN F, *et al.* Electrochemical detection of Sudan red series azo dyes: Bibliometrics based analysis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2022, 163: 112960.
- [25] 郭晓宏, 郭一丹, 杜佳铭, 等. 花椒的营养价值和贮藏保鲜技术研究进展[J]. 中国果菜, 2022, 42(8): 8–17.
GUO XH, GUO YD, DU JM, *et al.* Advance on the nutritional value and storage technologies of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. China Fruit & Vegetable, 2022, 42(8): 8–17.
- [26] 孙卫明, 王权帅. 调料粉中苏丹红等 9 种工业染料的液相色谱测定法[J]. 职业与健康, 2015, 31(11): 1479–1481.
SUN WM, WANG QS. Determination of 9 industrial dyes in condiment powder by high performance liquid chromatography [J]. Occupational and Health, 2015, 31(11): 1479–1481.
- [27] 邓颖. 高效液相色谱串联质谱法测定食用香料中染料含量[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9): 112–119.
DENG Y. Determination of azo dyes in edible spices by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Food Additives, 2020, 31(9): 112–119.
- [28] 王志峰, 高娃. HLB 固相萃取-高效液相色谱法同时测定花椒粉中碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22 染料的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(4): 411–414.
WANG ZHF, GAO W. Detection of basic orange 2, basic orange 21 and basic orange 22 in prickly ash powder by both HLB solid-phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(4): 411–414.
- [29] 余晓琴, 闵宇航, 刘斯琪, 等. QuEChERS EMR-Lipid 净化结合超高效液相色谱串联质谱法快速测定食品中非法添加工业染料[J/OL]. 食品科学, 1-26. [2024-06-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231206.1254.021.html>.
YU XQ, MIN YH, LIU SQ, *et al.* Rapid determination of illegal addition of industrial dyes in food by QuEChERS EMR-Lipid combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. 食品科学, 1-26. [2024-06-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231206.1254.021.html>.
- [30] 陈林, 温家欣, 吴霞, 等. 改良 QuEChERS 技术结合液相色谱-串联质谱联用法同时快速检测辣椒制品中 14 种非法添加工业染料[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 296–302.
CHEN L, WEN JX, WU X, *et al.* Rapid simultaneous determination of 14 adulterated industrial dyes in chilli products by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS [J]. Food Science, 2017, 38(8): 296–302.
- [31] 刘瑜, 张柏瑀, 毕孝瑞, 等. 超高效液相色谱-四极杆串联离子阱复合质谱法测定肉制品中非法添加的碱性工业染料[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6343–6348.
LIU Y, ZHANG BY, BI XR, *et al.* Determination of illegally added basic industrial dyes in meat products by ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem ion trap combined mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(16): 6343–6348.
- [32] 林显活, 吴正双, 梁焱琼, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定豆制品中 12 种碱性染料[J]. 食品安全导刊, 2022(23): 114–118.
LIN XH, WU ZS, LIANG CQ, *et al.* Simultaneous determination of 12 basic dyes in soybean products by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2022(23): 114–118.
- [33] SAGAR D, KUANGLIN C, WALTER S, *et al.* Detection of azo dyes in curry powder using a 1064-nm dispersive point-scan Raman system [J]. Applied Sciences, 2018, 8(4): 564.
- [34] JIAO J, WANG J, II M, *et al.* Simultaneous determination of three azo dyes in food product by ion mobility spectrometry [J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2016, 1025: 105–109.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)