

3 小结

通过对样品前处理和仪器分析条件进行优化,建立了二氯甲烷提取,QuEChERS萃取净化,同时测定水果中5种水果植物生长调节剂的气相色谱-串联质谱检测方法,5种植物生长调节剂的回收率和线性关系良好,能够满足水果中的植物生长调节剂的残留量检测分析。

参考文献

- [1] 李晓娜,刘龙腾,陈钟,等. 气相色谱法测定番茄中乙烯利的残留量[J]. 农药科学与管理,2013,34(6):32-35.
- [2] 陈友清,冯先桔. 衍生化气相色谱法测定柑橘果实中的2,4-二氯苯氧乙酸[J]. 浙江柑橘,2003,20(1):43-45.
- [3] 雷静,许立兴,崔新仪,等. 高效液相色谱法测定马铃薯中GA3含量[J]. 保鲜与加工,2016,16(4):123-127.
- [4] 谭莹,倪竹南,汤磊,等. 果蔬中多效唑的高效液相色谱快速

- 检测方法[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(23):3361-3365.
- [5] 闫震,聂继云,徐国锋,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水果中6种植物生长调节剂[J]. 园艺学报,2016,43(1):175-182.
- [6] 刘思洁,方赤光,崔勇,等. 植物生长调节剂在植物源性食品中残留量检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(1):8-13.
- [7] 黄何何,张缙,徐敦明,等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中21种植物生长调节剂的残留量[J]. 色谱,2014,32(7):707-716.
- [8] 周纯洁,赵博,吴丹,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中6种植物生长调节剂[J]. 食品工业科技,2016,37(10):94-110.
- [9] 徐宜宏,蒋施,付海滨,等. 苹果、番茄、玉米中7种植物生长调节剂的气相色谱-串联质谱检测方法[J]. 农药,2014,53(2):113-115.
- [10] 高强. 豆芽中多组分植物生长调节剂残留的质谱检测[D]. 河南:郑州大学,2015.

实验技术与方法

超高效液相色谱-荧光检测法准确定量调味油中罗丹明B的两种前处理方法比较

段鹤君^{1,2},丁晓静^{1,2},赵珊^{1,2}

- (1. 北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室,北京 100013;
2. 北京市预防医学研究中心,北京 100013)

摘要:目的 研究有效提取和净化调味油中罗丹明B的两种前处理方法,为超高效液相色谱-荧光检测(UPLC-FLR)法的准确定量提供有价值的参考。方法 第一种方法用酸化乙腈提取,混合型阳离子交换固相萃取(SPE)柱净化;第二种方法用含20%丙酮的正己烷提取,中性氧化铝SPE柱净化。两种方法的净化液吹至近干,用50%甲醇-水复溶,滤膜过滤后用UPLC-FLR测定。结果 两种方法中罗丹明B在5.0、50.0、200.0 μg/kg三个水平下的加标回收率分别在82.8%~101.9%、80.9%~93.6%之间,相应相对标准偏差(RSD)分别在1.5%~2.9%(n=6)、1.0%~2.1%(n=6)之间。结论 两种方法均可满足调味油中罗丹明B的测定,第一种方法在5.0、50.0 μg/kg加标水平的回收率均优于第二种方法,且无需大容量SPE柱;高浓度(200.0 μg/kg)加标水平的回收率差异无统计学意义(P>0.05)。

关键词:固相萃取;超高效液相色谱;荧光检测;罗丹明B;调味油;违法添加物;色素

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)05-0566-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.05.009

Two pretreatment methods for the accurate determination of rhodamine B in chili oil by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection

DUAN He-jun^{1,2}, DING Xiao-jing^{1,2}, ZHAO Shan^{1,2}

- (1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China;
2. Beijing Center for Preventive Medical Research, Beijing 100013, China)

收稿日期:2017-05-09

作者简介:段鹤君 女 副研究员 研究方向为分析化学 E-mail: dhj@vip.163.com

通信作者:赵珊 女 主任技师 研究方向为食品卫生 E-mail: ms_zhaoshan@aliyun.com

Abstract: Objective Two sample pretreatment method for the effective extraction and purification of rhodamine B in chili oil were investigated in detail. Valuable information for the accurate assay of rhodamine B by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection (UPLC-FLR) was provided. **Methods** The chili oil was extracted with acidified acetonitrile and then purified by a mixed type cation exchange solid phase extraction (SPE) column in the first method. In the second method, n-hexane containing 20% acetone was used to extract rhodamine B. The extraction was then purified by a neutral alumina SPE column. Both of the purified sample solution was blown to nearly dryness, re-dissolved in 50% methanol-water, filtrated and then analyzed by UPLC-FLR. **Results** The recoveries at three spiked levels (5.0, 50.0, 200.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively) were in the ranges of 82.8% -101.9% and 80.8% -93.6%, with relative standard deviations ranging from 1.5% -2.9% ($n=6$) and 1.0% -2.1% ($n=6$), respectively. **Conclusion** Both of the two pretreatment method could meet the requirements of accurate determination of rhodamine B in chili oil. However, the recoveries at spiked levels (5.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of the first method were higher than those of the second method. Furthermore, no large capacity SPE column was needed. There was no significant difference between recoveries of the two method at high spiked level (200.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Key words: Solid phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography; fluorescence detection; rhodamine B; chili oil; adulterant; pigment

罗丹明 B, 又称玫瑰红 B、玫瑰精 B、罗丹明 610 和若丹明 B 等, 是一种玫红色的合成荧光染料^[1]。罗丹明 B 具有价格低廉、色泽红艳、着色能力强等特点^[2], 不法商贩将其用于调味品(辣椒粉、调味油、火锅底料等)的染色^[3]。2008 年已被我国禁用, 不得在食品中检出^[4]。

文献报道^[5-11]罗丹明 B 的检测方法主要为高效(或超高效)液相色谱-荧光检测 [H(U)PLC-FLR] 法和高效(或超高效)液相色谱-串联四极杆质谱 [H(U)PLC-MS-MS] 法, 这两种方法均具有较高的灵敏度, 而 H(U)PLC-FLR 具有成本低、方法稳定、干扰信号少的特点, 更适于实验室的常规检测^[9-10]。

调味油中罗丹明 B 的前处理方法一般采用正己烷提取, 中性氧化铝固相萃取柱 (Al-N SPE 柱) 或凝胶色谱系统 (GPC) 净化^[12-13], 然而 GPC 净化试剂消耗量大且耗时长, 本实验室研究^[14]发现, 调味油中罗丹明 B 经过 GPC 净化后, 随着浓度递增, 回收率逐渐降低, 而且结果的重现性不理想。有文献^[15]将强阳离子固相萃取 (P-SCX SPE) 柱及 Al-N SPE 柱用于辣椒粉和辣椒酱的样品前处理, 并进行了比较。本试验采用与文献^[15]不同品牌的 SPE 柱, 对调味油中罗丹明 B 的两种前处理方法进行了比较: 采用酸化乙腈反萃取, 混合型阳离子交换 (MCX) SPE 柱净化; 采用含 20% 丙酮的正己烷提取, Al-N SPE 柱净化, 为 UPLC-FLR 法准确测定调味油中罗丹明 B 提供高效而简便的样品前处理方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

调味油购于北京市超市, 经过质谱确认后样品中无目标化合物; CNCA-16-A10《辣椒油中罗丹明 B

的测定能力验证》计划中的 3 份辣椒油能力验证样品由国家认证认可监督管理委员会 (CNCA) 委托重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心提供。本实验室获得的样品编号分别为 5022、4677 和 1687。

1.1.2 主要仪器与试剂

ACQUITY™ 超高效液相色谱仪 (配荧光检测器)、Sep-Pak Al-N SPE 柱 (2 g/12 ml)、Oasis 混合型阳离子交换 MCX SPE 柱 (60 mg/3 ml) 均购自美国 Waters, 高速离心机, 多用途旋涡混合振荡器, 超声波清洗仪, Milli-Elix/RiOs 超纯水仪。

罗丹明 B (编号: DRE-C16813550, 含量 > 99.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer), 三氟乙酸 (色谱级, 美国 Sigma), 甲酸 (纯度 > 98%), 冰乙酸 (分析纯), 乙腈、甲醇均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

标准储备液: 准确称量适量罗丹明 B (按纯度标示折算), 用甲醇溶解并定容, 配制成 1 000 mg/L 标准储备液, -20 °C 保存。

标准工作液: 用甲醇-水溶液 (50:50, V/V) 逐级稀释标准储备液, 现用现配。

1.2.2 前处理方法

酸化乙腈提取、MCX SPE 柱净化: 称取 1.0 g 调味油 (液态或固态) 置于 50 ml 离心管中, 加入 2 ml 正己烷使样品充分溶解, 加入 10 ml 含 0.5% 冰乙酸的酸化乙腈提取液, 涡旋 2 min, 超声提取 10 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 收集乙腈层清液; 再次加入 10 ml 提取液, 重复提取一次, 合并两次提取液, 在 40 °C 下氮吹至近干, 用 6 ml 乙腈-1% 甲酸水溶液 (10:90, V/V) 超声溶解, 待净化。分别用甲醇、水和 0.1 mol/L 盐酸溶液活化 MCX SPE 柱, 将提取液缓慢通过 SPE 柱, 加入 6 ml 甲醇淋洗、抽干; 用 8 ml

5% 氨化甲醇洗脱,收集洗脱液,在水浴 40 °C 下氮吹至近干,最后用甲醇-水溶液 (50:50, V/V) 复溶至 1 ml,过 0.22 μm 有机系滤膜,上机测定。

含 20% 丙酮的正己烷提取、Al-N SPE 柱净化^[15]:称取 1.0 g 调味油 (液态或固态) 置于 50 ml 塑料离心管中,加入 10 ml 含 20% 丙酮的正己烷,混合均匀后超声提取 10 min,用一次性塑料吸管将上清液取出,重复提取一次,合并上清液,待过柱净化。先用 6 ml 正己烷活化 Al-N SPE 柱,上清液全部上样过柱,用 10 ml 含 20% 丙酮的正己烷淋洗,流出液弃去;用 10 ml 含 2% 氨水的甲醇洗脱,收集洗脱液,在水浴 40 °C 下氮气吹至近干,用 1 ml 50% 甲醇-水溶液 (50:50, V/V) 定容,上机测定。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:色谱柱 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),柱温 40 °C,进样体积 10 μl,流速 0.3 ml/min。荧光检测器:激发波长 E_x = 550 nm,发射波长 E_m = 580 nm。流动相 A 为甲醇,B 为含 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program on for UPLC

t/min	流速/(ml/min)	流动相 B/%	流动相 A/%
0.0	0.3	70	30
5.0	0.3	40	60
6.0	0.3	10	90
7.0	0.3	10	90
7.1	0.3	70	30
9.0	0.3	70	30

1.3 统计学分析

用外标法绘制标准曲线,计算样品中罗丹明 B 的含量,公式为:

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1\,000}$$

其中:X 为罗丹明 B 含量,mg/kg;ρ 为上样液中罗丹明 B 的仪器测定结果,mg/L;V 为样液最终定容体积,ml;m 为称样量,g。

采用 SPSS 18.0 统计学软件对实验室测定值进行统计分析。运用方差齐性检验和独立样本 t 检验 (t-test) 用于比较不同净化处理方法的回收率统计分析。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

乙腈用于辣椒粉、辣椒酱中罗丹明 B 的提取已有文献^[14-18]报道,对于调味油基质,大多选择环己烷等非极性溶剂,因为其对于调味油具有良好的溶解性。考虑到目标物罗丹明 B 易溶于水和乙醇,微溶于丙酮,属于中等极性化合物,其在乙腈中的溶解

性优于环己烷,因此,采用极性较强的乙腈溶剂从极性弱的油脂中反萃取罗丹明 B 的同时可去除调味油基质中弱极性的脂溶性物质。将提取液乙腈酸化后,可使罗丹明 B 的分子带正电,更有利于被乙腈提取,本试验还比较了乙腈中添加不同比例的冰乙酸和三氟乙酸对罗丹明 B 提取效率的影响。在乙腈提取液中分别加入 0.5%、2% 的冰乙酸以及 0.5%、1% 的三氟乙酸,提取效率采用方差同质性检验方法 (homogeneity of variance),用 Tamhanes's T₂ 检验酸化乙腈提取效率的情况。经检验后,未酸化乙腈与其他四组比较,提取效率偏低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。0.5% 冰乙酸酸化乙腈提取与其他三组酸化乙腈提取效率比较,差异无统计学意义 (P > 0.05);0.5% 三氟乙酸酸化乙腈提取与其他三组酸化乙腈提取效率比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),即各酸化乙腈组间差异均无统计学意义 (P > 0.05)。所以最终选择价廉且容易获得的 0.5% 冰乙酸酸化乙腈作为提取液。

2.2 方法学验证

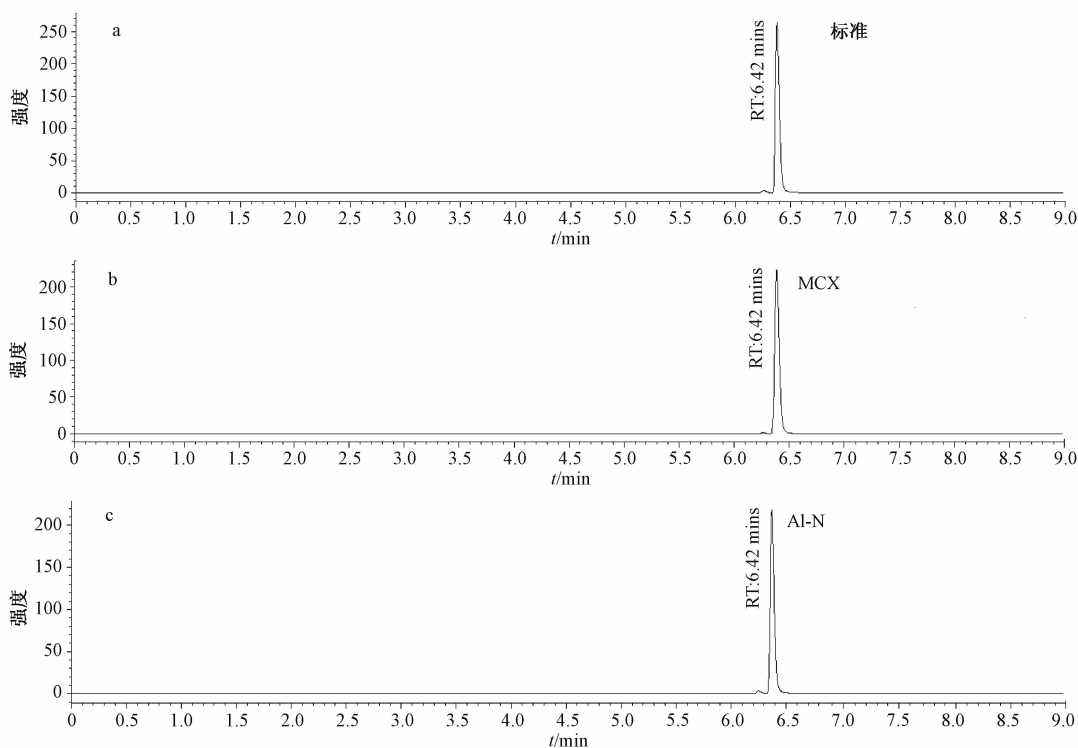
2.2.1 检出限、定量限、线性范围及相关系数

将罗丹明 B 标准储备液用流动相 A 稀释,分别配制成浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 和 500.0 μg/L 的标准溶液,以峰面积对质量浓度绘制标准曲线,线性方程为 y = 84400x + 13100,线性范围为 5.0 ~ 500.0 μg/L,相关系数为 0.999 8,方法检出限为 0.5 μg/kg (S/N = 3)。罗丹明 B 标准溶液的色谱图和经 MCX SPE 柱、Al-N SPE 柱净化后调味油中罗丹明 B 的色谱图见图 1。

2.2.2 加标回收率和方法精密度试验

取 1.0 g 调味油空白样品,分别添加 5.0、50.0、200.0 μg/kg 三个浓度水平的罗丹明 B 标准溶液,每个添加水平做 6 份样品进行平行性试验。回收率结果及相对标准偏差 (RSD) 见表 2。

经过方差齐性检验后进行独立样本 t 检验,结果显示:低、中浓度 (5.0、50.0 μg/kg) 水平加标试验中,酸化乙腈提取、MCX SPE 柱净化效果比含 20% 丙酮的环己烷提取、Al-N SPE 柱净化效果好,前者平均回收率在 89.3% ~ 97.0% 之间,RSD 为 2.1% ~ 2.9%,低、中浓度检测结果差异有统计学意义 (Sig = 0.009, P < 0.05; Sig = 0.039, P < 0.05)。而高浓度 (200.0 μg/kg) 加标试验中,两种方法的回收率分别为 82.9% 和 84.2%,差异无统计学意义 (Sig = 0.16, P > 0.05),RSD 为 1.5% 和 2.1%。尽管两种前处理方法均能满足试验要求,但对含量未知的实际样品分析,建议采用酸化乙腈提取、MCX SPE 柱净化的方法进行前处理。



注:a 为罗丹明 B 标准溶液色谱图;b 为调味油中罗丹明 B 色谱图(MCX SPE 柱净化后);c 为调味油中罗丹明 B 色谱图(Al-N SPE 柱净化后)

图 1 罗丹明 B 色谱图

Figure 1 Chromatograms of rhodamine B

表 2 两种 SPE 柱净化的回收率结果

Table 2 Recovery results of rhodamine B purified by two SPE columns

SPE 柱	添加水平 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%						平均回收率 /%	RSD /%	变异系数 /%
		1	2	3	4	5	6			
Al-N	5.0	92.1	92.4	93.2	92.8	93.6	91.2	92.6	1.0	0.9
	50.0	88.8	86.2	86.5	88.8	87.9	88.4	87.8	1.4	1.3
	200.0	80.9	81.3	84.8	84.9	82.9	82.3	82.9	2.1	2.1
MCX	5.0	98.3	95.1	96.8	95.1	101.9	94.9	97.0	2.9	2.8
	50.0	82.9	84.1	82.8	85.1	84.2	85.8	89.3	2.1	1.3
	200.0	87.9	91.1	88.5	92.9	89.3	89.8	84.2	1.5	2.2

2.3 能力验证样品的测定

为验证本试验所建立 MCX SPE 柱净化和 Al-NSPE 柱净化两种前处理方法的有效性,对国家认证认可监督管理委员会实验室能力验证计划发放的 3 份辣椒油样品采用 0.5% 冰乙酸-乙腈提取,每份样品平行处理 3 次,UPLC-FLR 定量测定,获得理想结果,见表 3、4。

表 3 酸化乙腈提取、MCX SPE 柱净化的能力验证样品中罗丹明 B 的结果

Figure 3 Results of rhodamine B in proficiency test sample extracted by acidified acetonitrile and purified by MCX SPE

样品编号	罗丹明 B 含量/(mg/kg)			平均值 /(mg/kg)
	1	2	3	
5022	0.195	0.202	0.198	0.198
4677	0.158	0.166	0.161	0.162
1687	0.521	0.527	0.516	0.521

表 4 20% 丙酮的环己烷提取、Al-N SPE 柱净化的能力验证样品中罗丹明 B 的结果

Figure 4 Results of rhodamine B in proficiency test sample extracted by n-hexane containing 20% acetone and purified by Al-N SPE

样品编号	罗丹明 B 含量/(mg/kg)			平均值 /(mg/kg)
	1	2	3	
5022	0.192	0.194	0.200	0.195
4677	0.156	0.160	0.164	0.160
1687	0.513	0.526	0.520	0.520

果。对大批量样品的分析,建议采用酸化乙腈提取、MCX SPE 柱净化的方法处理样品,因该方法在酸化乙腈提取目标化合物的同时可除去大量油脂,选用较小容量的 MCX 柱即可满足净化要求,且 MCX 对目标化合物的选择性优于 Al-N 柱,较好的净化效果有利于延长色谱柱的使用寿命、减少质谱的基质抑制、提高定性定量的准确性。

两种前处理方法均可获得较为准确的定量结

3 小结

UPLC-FLR 测定调味油中罗丹明 B 的前处理方法,既可用 0.5% 冰乙酸-乙腈提取、MCX SPE 净化,也可用 20% 丙酮的环己烷提取、Al-N SPE 柱净化,前者对目标物的选择性好,在低于 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平下回收率均优于后者,且无需大容量 SPE 柱,方法准确、可靠,简便易行。

参考文献

- [1] 卢士英,邹明强. 食品中常见的非食用色素的危害与检测[J]. 中国仪器仪表,2009(8):45-50.
- [2] 周海珍,臧永军,唐菊,等. UPLC-MS-MS 法检测辣椒及其制品和肉酱中的罗丹明 B 含量[J]. 肉类研究,2014,28(2):22-24.
- [3] 汪敏,江生,毛庆,等. 调味品中违禁添加的非食用色素检测技术综述[J]. 中国调味品,2016,41(11):152-155.
- [4] 陈美兰. 罗丹明 B 的危害及其在食品中快速检测方法的建立[D]. 福州:福州大学,2014.
- [5] 全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治领导小组. 关于印发《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(第一批)》的通知:食品整治办[2008]3号[A/OL]. (2008-12-12)[2017-03-10]. http://www.gov.cn/gzdt/2008-12/15/content_1178408.htm.
- [6] 周鹏,余请,林钦,等. 液质联用法测定辣椒红色素中罗丹明 B 含量[J]. 食品研究与开发,2013,34(4):74-76.
- [7] 周海珍,臧永军,唐菊,等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱联用法检测辣椒及其制品和肉酱中的罗丹明 B 含量[J]. 肉类工业,2014(5):25-27.
- [8] 曹鹏,乔旭光,娄喜山,等. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J]. 分析化学,

- 2011,39(11):1670-1675.
- [9] 张贞理,张平,申大忠. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产调味品中的罗丹明 B、结晶紫和孔雀石绿[J]. 分析化学,2012,40(3):487-488.
- [10] 韩文杰,蔡荣华,童玉海. 调味油树脂中罗丹明 B 检测方法对比研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(14):105-108.
- [11] 吴坤. 食品中柑橘红 2 号与罗丹明 B 及苏丹红 I~IV 的高效液相色谱检验方法[J]. 农产品加工(学刊),2014(10):67-68.
- [12] 林长虹,胡书玉,黄达错,等. 辣椒及其制品中罗丹明 B 的超高效液相色谱荧光检测[J]. 广东化工,2011,38(4):140-141.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中罗丹明 B 的检测方法:SN/T 2430—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [14] 赵珊,张晶,丁晓静,等. 凝胶净化/超高效液相色谱电喷雾质谱法检测调味油中 11 种禁用偶氮染料及罗丹明 B[J]. 分析测试学报,2012,31(4):448-452.
- [15] 薛昆鹏,金小青,余冲,等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光法测定辣椒制品中罗丹明 B[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(6):2375-2380.
- [16] 韦娜,王煜,张孝芳,等. 辣椒制品中罗丹明 B 的基质固相分散提取条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(3):275-281.
- [17] 韩春晖,栾爽,耿欣,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定花椒中罗丹明 B 的含量[J]. 分析测试技术与仪器,2014,20(4):210-214.
- [18] ZHAO S, YIN J, ZHANG J, et al. Determination of 23 dyes in chili powder and paste by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Food Anal Methods,2012,5(5):1018-1026.

· 资讯 ·

美国更正果汁和果汁饮料中钙的添加量

据美国联邦公报消息,8月22日美国食品药品监督管理局(FDA)发布条例,更正果汁及果汁饮料中钙的添加量。

据了解,7月26日美国食品药品监督管理局发布相关通报,拟修订果汁及果汁饮料中钙与维生素 D₃ 的添加量。

按照原先拟定限量,果汁与果汁饮料生产企业使用钙进行产品强化时,钙添加的绝对量应该分别为 330 与 130 mg,取代以往的推荐摄入量比例数值,同时纳入最新版美国食品化学法典参考值更新维生素 D₃ 的规格。

然而,8月22日美国食品药品监督管理局发布勘误通报指出,更正上述通报中钙的添加量,果汁和果汁饮料中钙的正确添加量分别为 330 与 100 mg。

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2017/08/440981.html>)