

分析测试新方法 (210 ~ 214)

超高效液相色谱-串联质谱法测定 花椒中罗丹明 B 的含量

韩春晖, 栾爽, 耿欣

(大连市药品检验所, 辽宁 大连 116021)

摘要: 建立了一套固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定花椒中罗丹明 B 含量的分析方法. 样品经 20% 丙酮正己烷溶液提取后, 采用中性氧化铝固相萃取柱进行净化处理. 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作流动相, C_{18} 色谱柱分离, 多重反应监测正离子扫描模式下进行检测. 罗丹明 B 在 0.25 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内, 线性方程为 $y = 2800.6x - 113.6$, 线性相关系数 $r = 0.99993$, 方法检出限 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, RSD 为 1.75% ~ 2.29%, 回收率在 89% ~ 102% 之间. 方法操作简便, 检出限低, 结果准确可靠, 可以用于花椒中罗丹明 B 的含量分析.

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 罗丹明 B; 花椒; 固相萃取

中图分类号: O657.63

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2014)04-0210-05

罗丹明(Rhodamine)是一种以氧杂蒽为母体的碱性咕吨荧光染料(结构式见图 1), 主要包括罗丹明 110、罗丹明 123、罗丹明 B、罗丹明 6G、罗丹明 101、乙基及丁基罗丹明 B 等, 常用于腈纶、造纸、油漆的染色和生物学中的荧光标记等领域. 根据国际癌症研究署(IARC)化学品致癌风险评价表明: 摄取、吸入以及皮肤接触该物质均会造成急性和慢性的中毒伤害. 有动物实验表明, 该物质吸入时有致癌作用, 可能引起诱变或致畸^[1].

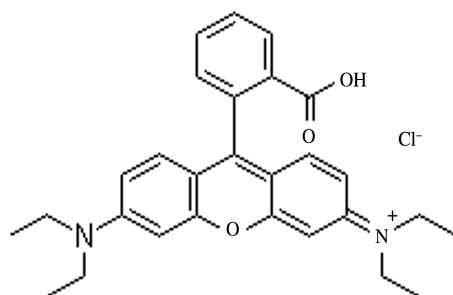


图 1 罗丹明 B 的结构式

Fig.1 Structure of Rhodamine B

我国国家标准 GB2760-2007 中, 未将罗丹明纳入食品添加剂范围. 但是, 由于罗丹明比其它食用水溶性染料更易于在果脯、烤虾、蜜饯、辣椒制品上染色且不易褪色, 而且成本低, 因此一些不法商贩用

罗丹明染料对这些食品进行染色, 以次充好, 以假冒真, 欺骗损害消费者, 危害消费者的身体健康. 自 2008 年曝光辣椒及辣椒制品中使用罗丹明 B 染色以来, 各有关部门对罗丹明 B 开展了专项检验及大力查处. 目前市场上染色辣椒几乎绝迹, 但是不法分子又将罗丹明 B 用于花椒及花椒制品的染色.

目前国外对于罗丹明 B 始终作为一种工业染料使用, 未发现调味品中非法添加, 所以未见此类研究报道. 国内对于其检测手段主要分为 3 类: 一是使用高效液相色谱法荧光检测器^[2-6]. 该方法对硬件配置要求较低, 最大的问题是荧光检测器作为一种通用型检测器定性能力不足, 方法专属性差, 抗干扰能力差; 二是使用液质联用法 GPC 净化^[1,7-10]. 该方法主要问题是耗时较长, 易污染, 假阳性率高; 三是使用液质联用法固相萃取柱净化^[11-14]. 目前该方法仅适用于辣椒及辣椒制品, 对于高脂肪含量的花椒及花椒制品有明显的基质效应, 无法进行准确的定量分析. 本文基于固相萃取前处理技术, 建立了一种操作便捷、灵敏度高、检出限低、结果准确可靠的花椒及花椒制品中罗丹明 B 检测方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290/6460 液质联用仪, 美国安捷伦公

收稿日期: 2014-11-08; 修订日期: 2014-12-16.

作者简介: 韩春晖(1983-), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向为食品药品检验. E-mail: hanchunhui@126.com

司;Milli-Q 超纯水机,美国 Millipore 公司;TTL-DC II 氮吹仪,北京同泰联科技有限公司;高速冷冻离心机,日本 HITACHI 公司;GM200 刀式研磨机,德国 Retsch 公司;漩涡混匀器,德国 IKA 公司.

甲酸,色谱纯,美国 SIGMA 公司;甲酸铵,色谱纯,美国 Fluka 公司;甲醇、乙腈、丙酮及正己烷均为色谱纯,美国 Fisher 公司. 样品由大连市食品化妆品监督所提供.

罗丹明 B 标准品,纯度 95. 0%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,批号 10201.

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

精密称取适量的罗丹明 B 标准物质用乙腈配制成 100 μg/mL 的标准储备液. 量取罗丹明 B 标准储备液适量,用乙腈稀释成 1 μg/mL 的标准工作溶液(临用现配). 分别量取标准工作溶液适量置 1.5 mL 液相小瓶中,加入乙腈适量,逐级稀释,配制成 0.50、1.00、5.00、10.00、50.00、100.00 ng/mL 6 个浓度水平的标准曲线溶液.

1.2.2 样品溶液的制备

从原始样品的上、中、下部各选均匀分布的 5 个点,取出部分样品,混匀,用四分法缩分出适量试样.

称取 2.00 g 经粉碎的样品于 50 mL 离心管中,加 20% 丙酮正己烷溶液 20 mL,置漩涡混匀器上涡旋 30 s,40 ℃ 超声 15 min,12 000 r/min,常温,离心 5 min. 精密量取上清液 1 mL,上柱. 使用 Cleanert Alumina-N-SPE(1 000 mg/6 mL)柱,预先用 20% 丙酮正己烷溶液 3 mL 活化,样品上柱后等待自然流净,用 20% 丙酮正己烷溶液 3 mL 淋洗,淋洗液弃去. 用 2% 氨水甲醇溶液 3 mL 洗脱,收集洗脱液 40 ℃ 氮吹至干,残渣精密加入 0.2% 甲酸乙腈溶液 1 mL,超声溶解,12 000 r/min,常温,离心 5 min. 取上清液,作为供试品溶液.

1.2.3 液相色谱条件

色谱柱:Agilent SB-C₁₈, 1.8 μm, 2.1×50 mm;流动相:乙腈-0.1% 甲酸水溶液(80:20, V/V);流速:0.3 mL/min;进样量:2 μL;柱温:35 ℃.

1.2.4 质谱参数

离子源类型:ESI;扫描模式:正离子模式;检测方式:多重反应监测(MRM);干燥气温度:325 ℃;干燥气流量:6 L/min;雾化器压力:35 psi;鞘气温度:350 ℃;鞘气流量:10 L/min;毛细管电压:3 500 V;喷嘴电压:0 V;其他参数见表 1.

表 1 罗丹明 B 的多重反应监测质谱参数				
Table 1 Mass spectrum parameters of Rhodamine B				
母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	Fragmentor	碰撞 能量	碰撞池加 速电压
443	355	130	72	3
443	399	130	48	3

2 实验结果

2.1 目标化合物的定量依据

罗丹明 B 的相对分子量为 479.0,脱去氯离子后形成 m/z=443.0 的母离子,将母离子进一步碰撞碎裂,产生二级质谱图^[7],见图 2.

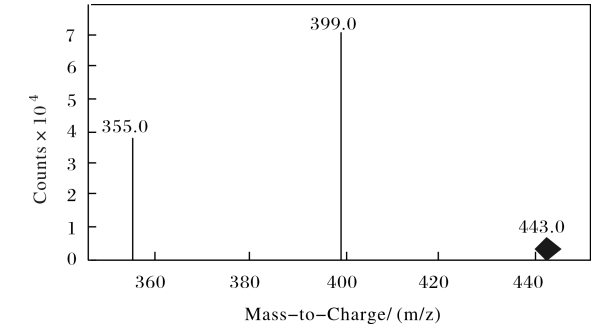


图 2 罗丹明 B 的二级质谱图
Fig.2 Two grade mass spectrum of Rhodamine B

选取丰度较高的 m/z=399.0 的子离子作为定量离子,标准品多重反应监测(MRM)离子色谱图见图 3.

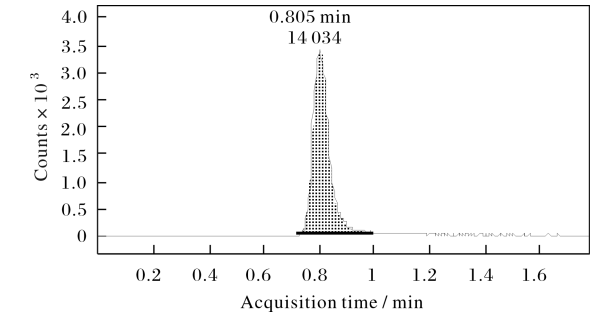


图 3 标准品多反应监测(MRM)定量离子流色谱图
Fig.3 Multiple reaction monitoring chromatogram of standard

2.2 标准曲线

选取不含罗丹明 B 的阴性样品,按照供试品溶液处理方法提取、净化、氮吹,用标准曲线溶液定容后检测. 横坐标(x)为浓度,纵坐标(y)为峰面积,

得到基质加标标准曲线,罗丹明 B 在 $0.25 \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内线性良好,线性方程为 $y = 2800.6x - 113.6$,线性相关系数 $r = 0.99993$.

2.3 检出限

选取不含罗丹明 B 的阴性样品 2.00 g , 加入

0.1 mL 的 $1 \text{ ng}/\text{mL}$ 标准曲线溶液,按照供试品溶液处理方法得到 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的样品溶液. 该加标回收样品定量、定性离子对信噪比均大于 200 (见图 4),考虑到不同花椒制品基质效应干扰不同,将该浓度水平作为方法检出限.

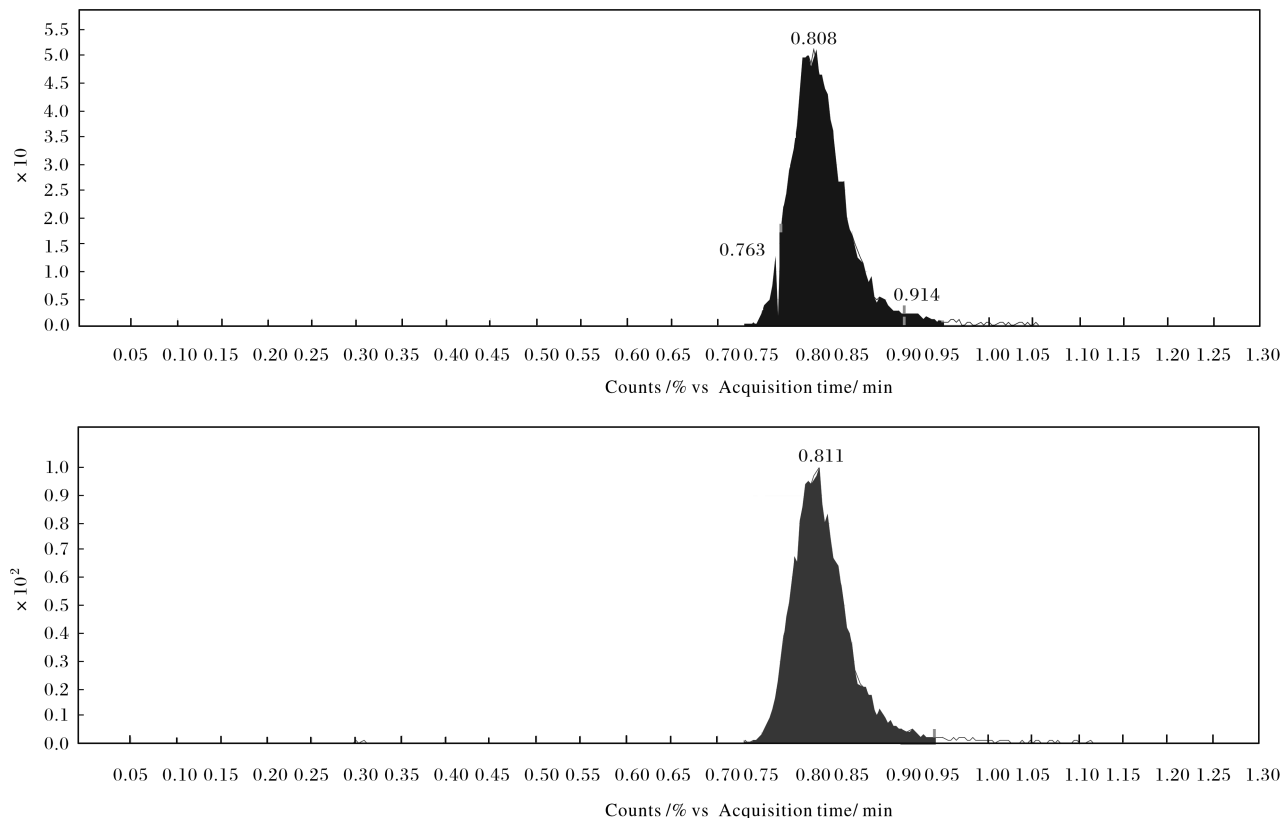


图4 检出限浓度的信噪比

Fig. 4 Signal to noise ratio chromatograms at detection limit concentration

2.4 回收率及精密度

在空白花椒中分别添加浓度为 5 、 10 、 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的标准溶液,每个浓度级别 3 个样品,每个样品重复测定 6 次,结果见表 2.

3 讨论

3.1 提取与净化方法的选择

罗丹明 B 本身极性较弱,用甲醇、乙腈等极性溶剂提取效果不理想^[7],如果单纯使用正己烷提取,提取较完全,但会带入大量花椒油类物质,给净化过程增加难度,并干扰测定. SN/T2430-2010^[15] 中采用 GPC 净化的前处理方法除去提取液中的脂肪类物质.经考察此方法在实际工作中净化时间长,每个样品需要 40 min 以上.通量小,且 1 台 GPC 仪每次只能净化 1 个样品.有机溶剂消耗量大污染环

境,每个样品需要 200 mL 以上正己烷乙酸乙酯混合液.最主要的是罗丹明 B 作为染料附着力极强,当有阳性样品出现或者回收率加标实验时罗丹明 B 会污染整个 GPC 仪的管路和凝胶柱,很难清洗干净,容易造成假阳性结果的产生.

本文采用 20% 丙酮正己烷溶液提取,在能够较完全的提取罗丹明 B 的前提下,尽量减少花椒中脂肪类物质的带入.后续采用固相萃取法进行净化,工作时间短,仅用 15 min .通量大,可同时净化 24 个样品.有机溶剂消耗量小.固相萃取柱用后弃去可避免假阳性的产生.

3.2 液相色谱及质谱条件的选择

比较了甲醇-水、乙腈-水 2 种流动相体系^[8].发现 2 种体系中,系统压力在 $0.2 \text{ mL}/\text{min}$ 时,甲醇-水 达到 490 bar ,乙腈-水则为 260 bar ,系统压力较

表 2 罗丹明 B 的回收率及相对标准偏差 (n=6)

Table 2 Precision and recovery of Rhodamine B

加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5.00	5.08	101.60	102.6	1.75
5.00	5.05	101.00		
5.00	5.14	102.80		
5.00	5.16	103.20		
5.00	5.29	105.80		
5.00	5.06	101.20		
10.00	8.95	89.50	89.1	2.29
10.00	8.92	89.20		
10.00	8.99	89.90		
10.00	9.16	91.60		
10.00	8.54	85.40		
10.00	8.91	89.10		
50.00	46.9	93.80	93.5	1.75
50.00	46.4	92.80		
50.00	47.9	95.80		
50.00	47.5	95.00		
50.00	45.8	91.60		
50.00	46.1	92.20		

低. 对于耐压 600 bar 的色谱柱,可以使用较高的 0.3 mL/min 流速,峰型尖锐且响应值较高. 水相中加入 0.1% 甲酸对罗丹明 B 的峰形及响应值改善明显,可以将拖尾因子由 2.25 缩小到 1.06,水相中加入甲酸铵对罗丹明 B 的离子化促进作用不明显. 使用梯度淋洗会导致峰严重变型,因此最终使用乙腈-0.1% 甲酸水溶液(80 : 20, V/V)作为流动相.

取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的罗丹明 B 标准溶液,进行质谱条件优化. 主要针对离子源参数中的干燥气温度在 250 ~ 350 $^{\circ}\text{C}$ 、干燥气流量在 4 ~ 10 L/min、雾化器压力在 15 ~ 50 psi、鞘气温度在 250 ~ 400 $^{\circ}\text{C}$ 、鞘气流量在 7 ~ 12 L/min、毛细管电压在 2 500 ~ 4 000 V 范围进行了优化,得到 1.2.4 项下最优质谱参数. 对多重反应监测条件中的毛细管电压在 90 ~ 150 V、碰撞能量在 10 ~ 100 范围进行了优化,得到毛细管电压 130 V,碰撞能量为 72、48 时定量、定性离子对的峰度最高.

3.3 实际样品的分析

对市场上 62 个不同厂家、不同品种、不同批次的花椒及花椒制品的样品进行检测,仅检出一个阳性样品,含量为 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$,整体产品质量状况较好.

由于检出含量较低,此浓度水平下罗丹明 B 无法用肉眼观察出颜色,人为添加可能性较低,可能是由于花椒在生产过程中被污染而带入.

4 结论

本文采用固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定花椒及花椒制品中非法添加物罗丹明 B 的含量,采用 20% 丙酮正己烷溶液提取,中性氧化铝固相萃取柱进行净化处理. 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作流动相, C_{18} 色谱柱分离,多重反应监测正离子扫描模式下进行检测. 罗丹明 B 在 0.25 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内,线性方程为 $y = 2800.6x - 113.6$,线性相关系数 $r = 0.99993$,方法检出限 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$,RSD 为 1.75% ~ 2.29%,回收率在 89% ~ 102% 之间. 该方法单个样品检测时间在 1 小时以内,多批样品效率更高,满足监管部门筛查过程中大批量检验的需要.

参考文献:

[1] 胡侠. 食品中罗丹明类染料的高效液相色谱及高效液相色谱-串联质谱分析方法的研究[D]. 大连:大连理工大学硕士论文, 2010:32-36.

- [2] 王传现,韩丽,方晓明. 食品中罗丹明 B 的高效液相色谱荧光检测[J]. 分析仪器, 2008, 24(1):27-30.
- [3] 林长虹,胡书玉,王达锴. 辣椒及其制品中罗丹明的超高效液相色谱荧光检测[J]. 广东化工, 2011, 38(4):140-141.
- [4] 缪璐,郭振华,莫佳琳. 超高效液相色谱荧光法检测调味品中罗丹明 B 残留量[J]. 广州化学, 2011, 73(3):58-60.
- [5] 王桂苓,李琳琳,丁轶聪. HPLC 法快速测定辣椒中罗丹明 B[J]. 化学分析计量, 2013, 22(5):84-86.
- [6] 咸瑞卿,高文超,王小兵,等. 调味品中罗丹明 B 的 HPLC-FLD-DAD 测定方法研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(8):109-112.
- [7] 程慧,李兵,占春瑞. 腊肠中罗丹明 的高效液相色谱串联质谱检测方法[J]. 食品科学, 2010, 31(4):233-225.
- [8] 周鹏,余清,林钦,等. 液质联用法测定辣椒红色素中罗丹明含量[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(4):74-76.
- [9] 龙四红,熊瑛. 高效液相色谱-串联质谱法测定油辣椒中罗丹明[J]. 贵州化工, 2012, 37(4):30-32.
- [10] 赵珊,张晶,丁晓静. 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, 56(4):124-127.
- [11] 张贞理,梅英杰,张全美. 固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定调味品中的罗丹明[J]. 分析试验室, 2012, 31(4):15-19.
- [12] 尹峰,丁召伟,杨志坚. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测香辛料中罗丹明[J]. 色谱, 2012, 30(7):672-676.
- [13] 张剑峰,陈彦凤,孙艳芳. 固相萃取-液质联用法同时测定调味品中罗丹明和苏丹红工业染料[J]. 中国卫生工程学, 2013, 12(5):398-400.
- [14] 乔勇升,韩芷玲,刘媛. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定食用调味油中的罗丹明[J]. 理化检验化学分册, 2013, 49(7):842-844.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T2430-2010 进出口食品中罗丹明 B 的检测方法[S].

Determination of Rhodamine B in Zanthoxylum Bungeanum Maxim by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

HAN Chun-hui, LUAN Shuang, GENG Xin

(Dalian Institute for Food and Drug Control, Dalian 116021, China)

Abstract: A method based on the ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) has been developed for the determination of rhodamine B in zanthoxylum bungeanum maxim. The sample was extracted with 20 % acetone-normal hexane and then cleaned up by the Cleanert Alumina-N-SPE. The target analytes were separated on a C₁₈ column using acetonitrile and water containing 0.1% formic acid as the mobile phases, and were detected by a multiple reaction monitoring positive model. Under optimized detection conditions, the linear range for rhodamine B were 0.25 ~ 50 µg/kg. The linear equation was $y = 2800.6x - 113.6$, the coefficient of correlation was $r = 0.99993$. The limits of quantification was 0.05 µg/kg. The relative standard deviations of reproducibility were 1.75% ~ 2.29%. The recoveries of the method were 89% ~ 102%. The method is simple, rapid, highly sensitive, and is suitable for the determination of rhodamine B in zanthoxylum bungeanum maxim.

Key words: UPLC-MS/MS; rhodamine B; zanthoxylum bungeanum maxim; SPE.

Classifying number: O657.63