

高效液相色谱荧光法测定辣椒酱中的罗丹明 B

刘谦, 白帆, 刘丽丽 (保定出入境检验检疫局, 河北保定 071051)

摘要 [目的]建立辣椒酱中罗丹明 B 的高效液相色谱荧光检测法。[方法]将样品中的罗丹明 B 用一定比例的丙酮和正己烷提取, 经过氧化铝固相萃取柱净化浓缩后, 用液相色谱荧光检测器检测其含量。[结果]试验得出, 罗丹明 B 在 0.005 ~ 0.050 mg/kg 浓度范围内, 线性关系良好, 相关系数为 0.999; 方法的定量检测限为 0.005 mg/kg, 平均回收率高。[结论]该试验建立的方法快速、准确、灵敏度高, 适用于辣椒酱中罗丹明 B 的测定。

关键词 液相色谱; 荧光检测法; 罗丹明 B

中图分类号 O657.7⁺2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)01-00248-02

Determination of Rhodamine B in Chili Patse by HPLC Fluorimetric Method

LIU Qian et al (Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of Baoding City, Baoding, Hebei 071051)

Abstract [Objective] The aim was to establish a HPLC fluorimetric method for the determination of Rhodamine B in chili patse. [Method] Rhodamine B was extracted with acetone/hexane from chili patse samples. After concentrated and purified by alumina cartridge, the Rhodamine B content in the chili patse was determined by using high performance liquid chromatography with fluorescence detector. [Result] Within the concentration range of 0.005-0.050 mg/kg, the peak area of Rhodamine B presents good linear relation with the concentration with the related coefficient of 0.999. The detection limit of the method is 0.005 mg/kg and with high average recovery rate. [Conclusion] It is a fast and accurate method to detect Rhodamine B in chili patse with high sensitivity.

Key words Liquid chromatography; Fluorimetric method; Rhodamine B

罗丹明 B, 俗称“花粉红”, 又称玫瑰红 B 或碱性玫瑰精, 是一种人工合成的具有鲜桃红色的染料, 分子式为 $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, 分子量为 479.017 5, 化学结构式如图 1 所示。罗丹明 B 常温下为绿色结晶或红紫色粉末, 易溶于水、甲醇及乙醇, 微溶于丙酮、氯仿、盐酸和氢氧化钠溶液。由于罗丹明 B 在溶液中荧光现象比较强烈, 在实验室中细胞荧光染色剂、有机玻璃和特色烟花爆竹、环境保护、钢铁生产、矿石生产等行业中得到了比较广泛的应用^[1-4]。

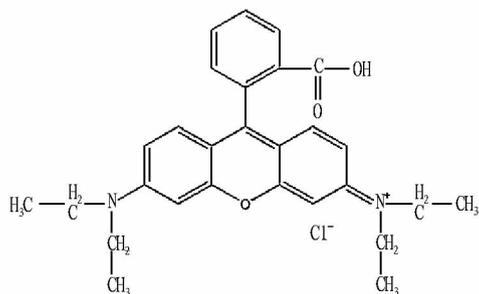


图 1 罗丹明 B 化学结构式

罗丹明 B 曾经被用做食品添加剂, 但也有研究结果表明^[5-6], 罗丹明 B 有致癌性, 同时其可能造成人皮肤及内脏红染、心肌纤维断裂、横纹模糊和肺水肿等, 该物质的摄取、吸入及皮肤接触均会造成急性和慢性中毒伤害。但罗丹明 B 具有价格低廉的特点, 脂溶性良好, 比其他水溶性染料如诱惑红、赤鲜红和柠檬黄等更易于在辣椒及制品上染色且不易褪色, 一些不法企业及商贩用罗丹明 B 作为食用色素对辣

椒及其制品进行染色, 以次充好。我国将罗丹明 B 列入《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第一批)》进行重点监督, 欧盟等国家也都不允许其在食品中使用。笔者采用液相色谱荧光检测法测定辣椒酱中的罗丹明 B, 前处理采用有机溶剂提取, 氧化铝固相萃取柱净化, 得到辣椒酱中罗丹明 B 快速、准确、灵敏度高的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料 辣椒酱, 市售。主要仪器: 高效液相色谱仪, 配荧光检测器; 固相萃取装置; 1/1000 天平; 旋转蒸发仪; 漩涡混合器。主要试剂: 甲醇、丙酮、正己烷, 均为色谱纯; 水为去离子水; 罗丹明 B 标准品、氧化铝萃取柱(1 000 mg/3 ml), 上海安谱试剂公司。

1.2 样品的处理 取辣椒酱样品称取 2.00 g 置于 100 ml 具塞离心管中, 加入 20 ml 20% 丙酮的正己烷液, 振荡 100 min, 上层提取液慢慢加入氧化铝层析柱中, 用 10 ml 20% 丙酮的正己烷液洗涤残渣, 上层提取液慢慢加入氧化铝层析柱中, 柱中保持液面为 2 mm 左右时上样, 流速 1 滴/s; 待样液完全流出后, 用 15 ml 20% 丙酮的正己烷液洗柱, 直至流出液颜色变浅, 弃去全部淋洗液, 用 90% 甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 10 ml 容量瓶中, 用 0.45 μ m 针筒过滤器过滤供 LC 测定。

1.3 标准曲线的制备 取空白样品, 经“1.2”处理后制备空白基质溶液, 配制罗丹明 B 标准溶液, 浓度为 1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 ng/ml。

1.4 色谱条件 色谱柱: C_{18} 4.6 mm \times 250 mm, 不锈钢柱; 流动相: A 泵甲醇 B 泵水(70:30); 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μ l; 检测器: 荧光检测器, 激发波长(Ex) 550 nm, 发射波长(Em) 580 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

标准品特征离子谱图在上述仪器条件下, 9.5 min 出峰且峰形尖锐而对称, 测试结果见图 1, 空白样品对照见图 2。

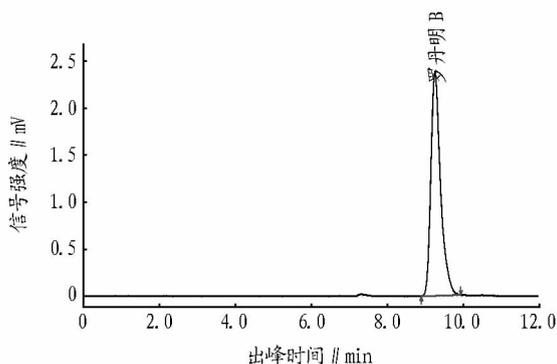


图1 辣椒酱中图罗丹明 B 特征离子谱

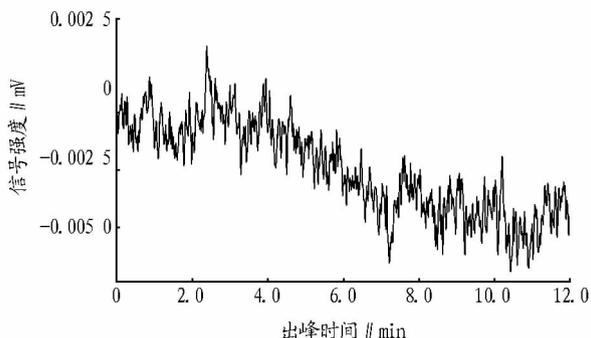


图2 空白辣椒酱样品特征离子谱

2.1 添加回收率和精密度 采用空白阴性样品, 添加罗丹明 B 浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 经过“1.2”处理后检测结果的回收率符合 GB/T27404-2008 中对回收率的规定, 罗丹明 B 最小检出浓度为 $0.005 \text{ mg}/\text{kg}$ 。

标准曲线制备过程见“1.3”, 以 2 种目标物的特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。其相应的回归方程为 $y = 2.63e - 007x + 2.25e - 006$, 相关系数大于 0.999。

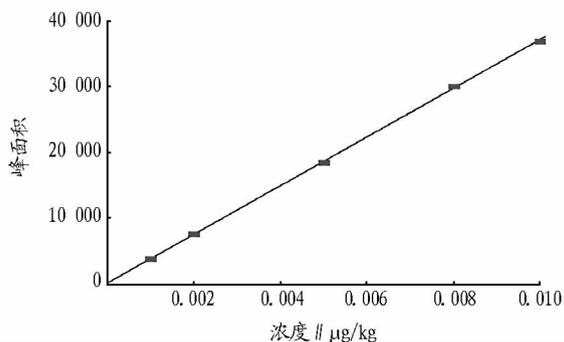


图3 罗丹明 B 标准曲线

采用空白阴性样品, 罗丹明 B 添加浓度为 5.0 、 30.0 、 $50.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 共 3 个浓度, 每个浓度做 6 个平行, 经样品处理后, 取 $10 \mu\text{l}$ 进样分析, 每个浓度重复进样 3 次。根据峰面积计算添加回收率和变异系数 (CV), 检测结果见表 1。

表1 罗丹明 B 的回收率和相对标准偏差

加标量// $\mu\text{g}/\text{kg}$	平均回收率//%	精密度(RSD)//%
5	78	6.4
30	84	8.4
50	86	7.9

2.2 样品的提取和纯化 由于辣椒本身就含有比较多的油分, 过固相萃取小柱时容易出现堵塞柱子的情况。SN/T2430-2010 中提到需要使用凝胶色谱进行前处理, 由于 GPC 的采集时间长, 如果想提高净化效果, 就会牺牲采集时间, 降低目标物的回收率, 否则就不能完全除去样品中的油脂和颗粒, 会堵塞萃取柱; GPC 的有机试剂用量大, 既提高了检测成本, 也在一定程度上造成了环境污染。该试验中采用丙酮和正己烷作为提取溶剂, 效果比较好。

2.3 流动相的选择 试验分别对比了不同体积比的乙腈-水、甲醇-水作为流动相, 结果发现, 乙腈-水做流动相时, 色谱峰比较宽, 有时会有拖尾的现象; 甲醇-水作为流动相时, 干扰峰与目标物可以完全分离, 出峰峰型好, 灵敏度高。罗丹明 B 是碱性染料, pH 对其灵敏度也有一定的影响。试验中发现, 在流动相中加入 0.1% 的甲酸, 对出峰效果和回收结果有很大的提高。

3 结论

研究通过高效液相色谱荧光检测法测定辣椒酱中罗丹明 B 含量, 结果表明, 该方法具有前处理简单快速、灵敏度高、准确性好、可操作性强的特点, 适合大批次样品的罗丹明 B 含量的检测, 具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 王勇, 武娜. 高效液相色谱-紫外光检测法测定食品中罗丹明 B 的含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8723-8725.
- [2] 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.
- [3] 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 B [J]. 贵州化工, 2012, 37(4): 30-32.
- [4] 占立明, 夏爱萍, 张旭, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中罗丹明 B 的含量[J]. 食品工程, 2012(12): 17-19.
- [5] 杨仁惠, 胡立立, 许乾丽. 高效液相色谱荧光检测法测定辣椒制品中罗丹明 B 的含量[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(4): 481-485.
- [6] 李小平, 潘胜东, 赵永纲. 固相萃取-高效液相色谱荧光法同时测定辣椒面中罗丹明 B 和罗丹明 123 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1766-1769.