固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测香辛料中罗丹明 B

尹 峰* , 丁召伟 , 杨志坚

(国家副食品质量监督检验中心 , 北京 100070)

摘要 :建立了香辛料中罗丹明 B 的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱分析方法。样品经乙腈提取后离心 ,在提取液中加入 10 mL 1% 三氯乙酸溶液后 ,用 Bond Elut Plexa PCX 强阳离子固相萃取柱净化、富集 ,Pursuit C18 色谱柱 (100 mm × 2.0 mm , 3 μm) 分离 ,以 0.1% 甲酸水和甲醇为流动相梯度洗脱 ,电喷雾电离正离子模式下多反应监测 (MRM) 模式进行定性、定量检测。结果表明 ,在 0.6 ~ 6 μg/L 范围内的线性相关系数 $R^2 > 0.99$;方法的定量限为 1.2 μg/kg ,添加量分别为 1.197、2.992 及 5.985 μg/L 时的加标回收率为 80% ~ 121% ,相对标准偏差 < 15%。同时对流动相的洗脱梯度、提取溶剂、固相萃取柱等条件进行了优化。该方法的专属性较强 ,基质效应较小 ,可用于固体香辛料产品中罗丹明 B 的定性、定量分析。

关键词 :固相萃取 ;高效液相色谱-串联质谱法 ;罗丹明 B ;香辛料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2012)07-0672-05

Determination of rhodamine B in spices by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YIN Feng* , DING Zhaowei , YANG Zhijian

(State Non-Staple Food Quality Supervision and Test Center , Beijing 100070 , China)

Abstract : Rhodamine B (RB) , as an unlawful colour , is forbidden to add into foods by Chinese government. A solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS) method for the determination of RB in spices has been developed. The sample was extracted by acetonitrile and then centrifugated , purified and enriched with a strong positive ion exchange SPE column (Bond Elut Plexa PCX SPE column) after adding 10 mL 1% trichloroacetic acid solution. The HPLC separation was performed on a Pursuit C18 column (100 mm × 2.0 mm , 3 μm) by gradient elution with 0.1% (v/v) formic acid solution and methanol as the mobile phase. The analyte was detected by electrospray ionization in positive ion mode-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The good linearity ($R^2 > 0.99$) was obtained over the range of 0.6 ~ 6 μg/L. The limit of quantification (LOQ) for RB was 1.2 μg/kg. The average recoveries were ranged from 80% to 121% at the spiked levels of 1.197 , 2.992 and 5.985 μg/L , and the relative standard deviations (RSDs) were not more than 15%. The conditions of mobile phase elution gradients , extraction solvents , and SPE columns were optimized. This method is highly selective and has weak matrix effect for qualitative and quantitative analyses of RB in spices.

Key words : solid phase extraction (SPE) ; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) ; rhodamine B ; spices

罗丹明 B(rhodamine B , RB)也称为碱性玫瑰精 B ,是具有鲜桃红色的人造染料。世界卫生组织

国际癌症研究署(IARC)化学品致癌风险评价显示 :罗丹明类染料被摄取、吸入以及皮肤接触均可造成

* 通讯联系人 :尹 峰 , 硕士 , 工程师 , 主要从事兽药残留、食品添加剂的检验工作。 E-mail : fifayinfeng@ yahoo. com. cn.
收稿日期 2012-02-13

急性和慢性中毒伤害;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]。欧洲食品安全局(EFSA)也证实了这个结论^[2]。目前,欧美、日本等国家已禁止在食品加工中使用该物质^[3]。罗丹明B的染色能力较强且不易褪色,由于成本低使不法商贩用于辣椒制品、花椒等产品的染色。鉴于其危害,国家卫生部在食品整治办(2008)3号文件“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”中,将罗丹明B纳入首批可能违法添加的非食用物质,严禁在食品中添加。

食品中罗丹明B的前处理方式有固相萃取(硅胶键合十八烷基硅烷(C18)柱^[4-6]、氧化铝柱^[7]、亲水亲脂平衡(HLB)柱(聚苯乙烯-二乙烯基苯-吡咯烷酮)^[8]、凝胶色谱净化(GPC)系统^[3,9]、直接提取^[10,11]等。这些方法均具有一定的弱点,如C18柱选择性较差,且耗材价格较高;GPC系统价格昂贵,且试剂用量大,难以大批量处理样品;直接提取法因较强的基质效应及污染而不适用于高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检验。

罗丹明B是以氧杂蒽为母体的碱性染料,通常使用的是其氯化物(分子式 $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$,相对分子质量479.01),其结构式见图1。其分子结构中C=N双键的N原子较活泼,在酸性水溶液中易失去结合的氯离子,从而处于阳离子状态。本文利用此特性,先用乙腈提取目标物,再加入1%三氯乙酸溶液使溶液呈酸性,然后采用强阳离子固相萃取柱进行净化、富集,经HPLC-MS/MS测定表现出良好的色谱学特性,可用于天然的固态香辛料中罗丹明B的定性、定量检验。

图1 罗丹明B结构式
Fig. 1 Structure of rhodamine B

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian 210 高效液相色谱仪/320 三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司), Arium 611 超纯水器、BS2202s 天平(德国 Sartorius 公司), 3-18K 离心机(Sigma 公司), BESEP 固相萃取系统(德国

Macherey-Nagel 公司)。

罗丹明B(纯度 $\geq 95\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。甲醇(美国 Fisher 公司)、甲酸(Dikma 公司)均为色谱纯,乙腈、氨水、三氯乙酸等均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。Bond Elut Plexa PCX 固相萃取柱(60 mg/3 mL, Agilent 公司),使用前分别用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化;Oasis HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL, Waters 公司),使用前分别用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化。实验所使用的香辛料样品均来源于市场随机采样。

1.2 标准溶液的配制

准确称取标准品 5.0 mg,用甲醇溶解于 50 mL 容量瓶中并定容,配成 100 mg/L 的标准储备液;准确吸取该储备液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容,得到 1.0 mg/L 的标准中间液;准确吸取中间液适量,用甲醇稀释成 0.5 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

以花椒粉为方法的研究对象。称取样品 1.0 g(精确到 0.01 g)置于 50 mL 聚酯离心管中,准确加入 10.0 mL 乙腈,超声提取 10 min,于 10 000 r/min 下离心 10 min;准确吸取 5.0 mL 上清液置于另一 50 mL 离心管,加入 10 mL 1% 三氯乙酸溶液,离心,上清液待净化。

将上清液加至经预处理的 PCX 固相萃取柱,重力自流,然后分别用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗,减压抽干,然后用 5 mL 5% (v/v) 氨水甲醇洗脱,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹干,用初始流动相定容至 1.0 mL,过滤膜,滤液待测。

取阴性样品,按上述方法处理后分别做基质加标回收以及基质加标标准曲线试验。

1.4 HPLC 条件

色谱柱:Pursuit C18 柱(100 mm $\times$ 2.0 mm, 3 μm);进样量:10 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相:A 相为 0.1% 甲酸水,B 相为甲醇,流速 0.2 mL/min。梯度洗脱曲线:0 ~ 1 min, 20% B;1 ~ 3 min, 20% B ~ 60% B;3 ~ 10 min, 60% B;10 ~ 11 min, 60% B ~ 20% B;11 ~ 15 min, 20% B。

1.5 MS/MS 条件

离子源:电喷雾电离源(ESI);扫描方式:正离子扫描;离子源温度:50 $^{\circ}\text{C}$;喷雾气压力:345 kPa;喷雾电压:5.0 kV;干燥气温度/压力:300 $^{\circ}\text{C}$ /172 kPa;监测方式:多反应监测(MRM)模式;定性离子对 m/z 443.0/399.0, m/z 443.0/355.0;定量离子对 m/z 443.0/399.0;毛细管电压:160 V;碰撞电

压 34.0 V(m/z 399.0) , 45.0 V(m/z 355.0)。

2 结果与讨论

2.1 流动相洗脱梯度的选择

对流动相的洗脱梯度进行了考察。图 2 为不同洗脱梯度时 1 mg/L 基质标准溶液在全扫描(m/z 200 ~ 600)模式下的总离子流谱图及其提取离子谱图(m/z 443)。从图 2 可见 ,由于图 2a 所用流动相的洗脱能力较适中 ,目标物流出较均匀 ,与目标物共流出的物质相对较少 ,对目标物的影响较小 ,从提取离子色谱图看罗丹明 B 的响应强度较高 ;而图 2b 所用流动相的洗脱能力强 ,各物质流出集中 ,基质的

共流出抑制了罗丹明 B 的离子化 ,因此其响应强度也明显较弱。从 MRM 模式下定量离子对的峰面积数值比较 ,图 2b 条件下的响应值仅约为图 2a 的 45%。

此外 ,图 2b 梯度洗脱条件下的色谱峰虽然峰宽较窄(约 0.2 min)、柱效较高(8 000 理论塔板/m 左右) ,但色谱峰后有一小峰 ,分离度达不到要求 ,对准确定量有一定的干扰。而图 2a 梯度洗脱条件下得到的色谱峰虽较宽(约 0.4 min) ,柱效较低(约 5 000 理论塔板/m) ,但色谱峰对称 ,目标峰前后均无其他峰的干扰 ,具有更好的分离效果。因此最终选择了 1.4 节所述的梯度洗脱程序。

图 2 不同流动相梯度洗脱程序下罗丹明 B 基质标准溶液(1 mg/L)的全扫描(m/z 200 ~ 600)模式下的总离子流谱图及其提取离子(m/z 443)谱图

Fig. 2 Total ion current chromatograms (TIC) of matrix spiked rhodamine B standard solution (1 mg/L) in full scan (m/z 200 ~ 600) mode and its extracted ion chromatograms (EIC)(m/z 443) under different gradient elution programs
Mobile phases : A , 0.1% (v/v) formic acid solution ; B , methanol. Gradient elution programs : a. 0 ~ 1 min , 20% B ; 1 ~ 3 min , 20% B ~ 60% B ; 3 ~ 10 min , 60% B ; 10 ~ 11 min , 60% B ~ 20% B ; 11 ~ 15 min , 20% B. b. 0 ~ 1 min , 30% B ; 1 ~ 2 min , 30% B ~ 90% B ; 2 ~ 5 min , 90% B ; 5 ~ 6 min , 90% B ~ 30% B ; 6 ~ 10 min , 30% B.

2.2 提取剂的选择

罗丹明 B 可溶于水、甲醇、乙醇、乙腈等溶剂中。这 4 种溶剂的极性由大到小的排列顺序为水 > 甲醇 > 乙腈 > 乙醇。本文考察了这几种溶剂对罗丹明 B 的提取效果。从提取后得到的溶液状况来看 ,采用酸性水(1% 三氯乙酸溶液)、甲醇能提取出更多的极性物质 ,这样在净化时很容易导致 SPE 柱的穿透 ,且净化并定容后的溶液颜色较深 ,显示净化效

果不好。采用乙醇能提取出更多的非极性物质 ,加入三氯乙酸溶液后有较多的物质析出 ,影响了目标物的回收 ;且定容后的溶液颜色也较深 ,显示净化效果不好。而采用乙腈作为提取剂不仅提取后的溶液较干净 ,加入三氯乙酸溶液后析出物较少 ,净化后的溶液呈无色透明 ,排除了大多数的干扰物质 ;且采用乙腈净化时有更好的加标回收率。故选择乙腈作为本方法的提取剂。

此外 ,对乙腈提取液的两种不同处理方式也做了比较。方式一 :将提取液浓缩至近干后 ,加入 1% 三氯乙酸溶液溶解、离心、净化。从加标回收率看 ,若在浓缩之前加入标准溶液 ,得到的目标物响应强度很弱 ,绝对回收率小于 1% ;若在三氯乙酸溶液溶解后再加入标准溶液 ,则可得到较好的回收率。因此可判断 ,造成提取-浓缩-溶解-净化方式回收率低的主要因素在于浓缩步骤。其原因可能是浓缩时 ,有很多油脂状物质析出并交联成团 ,而罗丹明 B 吸附性很强 ,将会伴其一起析出 ,并交联在析出物中 ,即使用三氯乙酸溶液也难以将其复溶到水溶液中 ,从而造成回收率低。方式二 :见 1.3 节。本方式中 ,由于未经过浓缩步骤 ,加入三氯乙酸溶液后虽然也有物质析出 ,但析出量相对要少很多 ,且不交联成团 ,从测试结果看 ,目标物的回收率较高 ,即采用提取-酸化-净化方式时 ,能得到较满意的实验结果。因此在接下来的实验中采用 1.3 节的方法来处理乙腈提取液。

同时 ,也考察了样品基质对目标物响应的影响。图 3 是按 1.3 节方法前处理后的基质标准溶液与纯标准溶液(50 μg/L ,氮气吹干后 ,用初始流动相定容)的色谱图 ,从峰面积响应值计算结果来看 ,基质标准溶液的响应是纯标准溶液的 83%。由于本方法只是基于花椒基质 ,对其他样品基质的影响尚未研

图 3 (a)基质标准溶液与 (b)纯标准溶液 (50 μg/L)响应强度的比较

Fig. 3 Comparison of response strengths between (a) matrix spiked with standard solution and (b) standard solution (50 μg/L)

Mobile phases : A , 0.1% (v/v) formic acid solution ; B , methanol. Gradient elution : 0 - 1 min , 20% B ; 1 - 3 min , 20% B - 60% B ; 3 - 10 min , 60% B ; 10 - 11 min , 60% B - 20% B ; 11 - 15 min , 20% B.

究 ,因此在样品分析过程中最好采用基质标准曲线 ,以排除基质效应。

2.3 固相萃取条件的选择

从罗丹明 B 的分子结构看 ,其分子构型较对称 ,具有一定的非极性 ;同时分子内的 C=N 双键中 N 原子较不稳定 ,易失去键合原子而使分子带正电 ;因此既可采用非极性的净化方法 ,也可采用阳离子交换的极性净化方法。据此 ,本实验比较了 HLB 与 PCX 两种不同固相萃取柱的净化效果 ,结果见表 1。

表 1 HLB 和 PCX 固相萃取柱的净化效果比较
Table 1 Comparison of purification effects between HLB and PCX solid phase extraction columns

SPE column	Spiked/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
HLB	1.197	0.084	7	9
PCX	1.197	0.99	83	3

HLB 的净化方法 :提取液以 1 ~ 2 mL/min 的流速经过预活化的萃取柱 ,然后用 6 mL 洗脱液(5% 氨水甲醇)洗脱 ,浓缩后以初始流动相定容至 1.0 mL。由于非极性 HLB 固相萃取柱选择性差 ,样品上柱时很多非极性物质与目标物一起被吸附 ,且未经过淋洗去杂质的过程 ,洗脱液中仍含有较多的杂质成分 ,未能达到净化的效果。阳离子交换 PCX 固相萃取柱具有较强的选择性 ,经淋洗后能完全去除非极性物质及大部分的极性物质 ,净化后的溶液无色透明 ;当罗丹明 B 质量浓度较高(> 100 μg/L)时能呈现出其水溶液的颜色 ,用肉眼即可大致定性。PCX 柱的净化效果见图 2。

2.4 线性关系、回收率、精密度及定量限

取阴性样品 ,按上述前处理方法处理后加入 0.6 ~ 6 μg/L 系列质量浓度的标准工作溶液 ,浓缩定容 ,制备成基质标准工作溶液 ,按建立的方法进行测定 ,以响应值 Y 对罗丹明 B 的质量浓度 C (μg/L)进行线性回归 ,得到 $Y = 2.43 \times 10^4 C - 1.13 \times 10^3$,相关系数 $r^2 = 0.9948$ 。另取阴性样品若干份 ,加入 3 个水平(1.197、2.992、5.985 μg/L)的标准工作溶液 ,烘干后按 1.3 节所述方法处理 ,每个水平测定 3 份平行样品 ,得到的添加回收率及精密度分别为 121%、81%、80% 及 11%、8%、3% ;同样 ,按阴性样品加标方法 ,确定方法定量限为 1.2 μg/kg。

2.5 方法的应用

由于罗丹明 B 可能被非法添加到花椒、大料、辣椒等颜色较深的产品中 ,因此从市场上随意抽取了 8 份样品(包括花椒(粉)4 份、大料 2 份、辣椒粉 2 份) ,应用本方法对其进行测定。测定结果表明在这些样品中均未检出此违禁成分。鉴于抽样的产品

种类较少,尚需在其他类产品中验证本方法的适用性。

3 结 论

本文利用罗丹明 B 在酸性水(1% 三氯乙酸溶液)中被阳离子化的特性,使用阳离子固相萃取柱 PCX 柱富集、净化目标物,并通过流动相的优化来排除基质的影响,建立了罗丹明 B 的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱检测方法,能满足固态香辛料产品检验工作中目标物的定性定量要求。

参考文献:

[1] World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans , Volume 16 (1987). http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/allmonos45_voll16/volume16.pdf

[2] Larsen J C. Trends Food Sci Tech , 2008 , 19 : S64
[3] Cheng H , Li B , Zhan C R. Food Science (程慧,李兵,占春瑞. 食品科学), 2010 , 31(04) : 223
[4] Sun L L , Yang Z H. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (孙磊龙,杨志华. 中国卫生检验杂志), 2011 , 21(7) : 1648
[5] Li X Y , Li M , Chen Q F , et al. Food Science (李小燕,李梅,陈其峰,等. 食品科学), 2011 , 32(8) : 238
[6] Huang Y N , Chen N Y , Chen X M. Agricultural Research and Application (黄奕娜,陈楠瑜,陈旭明. 农业研究与应用), 2011 (4) : 23
[7] Hu X , Xiao G , Pan W , et al. Chinese Journal of Chromatography (胡侠,肖光,潘炜,等. 色谱), 2010 , 28(6) : 590
[8] DB33/T 703-2008
[9] SN/T 2430-2010
[10] Lin C H , Hu S Y , Huang D K , et al. Guangdong Chemical Industry (林长虹,胡书玉,黄达锴,等. 广东化工), 2011 , 38(4) : 140
[11] Zhong S S. Modern Food Science and Technology (钟少枢. 现代食品科技), 2011 , 27(8) : 1047