

固相萃取-高效液相色谱法测定 食品中痕量花粉红染料*

奚星林, 邵仕萍

(广东出入境检验检疫局技术中心食品实验室 广州 510623)

摘要: 本实验建立了测定食品中痕量花粉红色素的高效液相色谱方法。样品经正己烷等溶液提取,经过中性氧化铝柱净化,以甲醇和水溶液为流动相进行色谱分离,在激发波长 550 nm,发射波长 580 nm 的荧光条件下检测。花粉红的浓度在 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内与其色谱峰面积的线性关系良好 ($r = 0.999$),在 1、5、10 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平时的回收率为 56.3% ~ 80.1%, RSD 为 2.8% ~ 5.7%。方法的定量检出限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 高效液相色谱法; 花粉红; 中性氧化铝食品; 测定

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标识码:** B **国家标准学科分类代码:**

Determination of Rhodamine B dyestuff in foods by solid-phase extraction-HPLC method

Xi Xinglin, Shao Shiping

(Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Centre, Guangzhou 510623, China)

Abstract: To develop a method for the quantitative analysis trace amount of Rhodamine B dyestuff in foods, the sample which was dissolved in n-hexane solution was extracted by adsorption with Alumina N-neutral column. HPLC was carried out on the Aluminium oxide neutral column with the fluorescence detector and methyl alcohol -water solution as mobile phase. The excitation wavelength is 550 nm, and the emission wavelength is 580nm. There was good linear relationship between the peak area and the sample content injected in the ranges of 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~ 10.0 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.999$) for Rhodamine B. The recovery rate of Rhodamine B was between 56.3% and 80.1%, and RSD was 2.8% ~ 5.7%. The detection limit is 1.0 $\mu\text{g/kg}$. The method is simple, accurate, and suitable for the determination of Rhodamine B dyestuff in foods.

Key words: HPLC; Rhodamine B; aluminium oxide neutral; food; determination

1 引言

花粉红,也称罗丹明 B,是一种具有鲜桃红色的人工合成的染料,其分子结构见图 1。花粉红在溶液中有强烈的荧光,对于它的光谱机理

已有相关的研究^[1-2]。花粉红通常用作实验室中的细胞荧光染色剂,在工业上用于制造油漆、画图颜料,也可用于腈纶、麻、蚕丝等织物的染色及麦秆、皮革制品的着色等。由于其具有潜在的致癌性^[3],各国均不容许将其用作食品染色。

* 项目基金: 广州市重大科技工程(2006Z1-E0121)资助项目

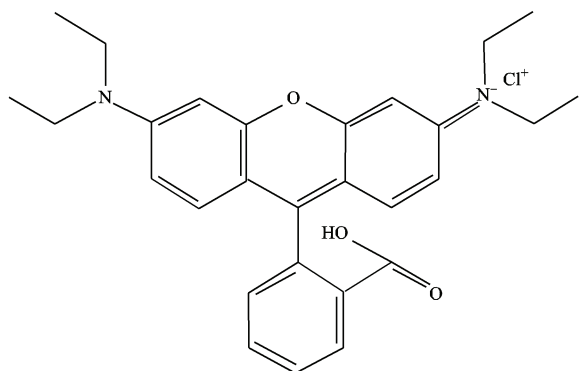


图1 花粉红的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Rhodamine B

花粉红具有脂溶性,因而被不法商贩用作调味品(主要是辣椒粉和辣椒油)染色剂,从而造成食品污染。另据报道,某批次出口日本的大葱因为使用了含花粉红色素的包装绳而被检出花粉红,导致退货事件。因此,建立食品中花粉红的检测方法具有重要的现实意义。据文献报道,检测花粉红的方法有高效液相色谱法^[4-6]和分光光度法^[7-8],王传现等^[5]利用 Envi-C₁₈ 固相萃取小柱提取净化,用液相色谱分离检测食品中罗丹明 B。本文利用自制中性氧化铝小柱,反相高效液相色谱法实现了食品中痕量花粉红的测定,不仅拓展了检测途径,而且节约了检测成本,并达到了满意的效果。

2 材料与方法

2.1 仪器

Waters 2695e 高效液相色谱系统; Waters 2475 荧光检测器和 Empower 色谱信息管理系统;固相萃取装置(Supelco 公司);恒温氮吹装置(TurboVa PLV);振荡机(IKA MS3)。

2.2 试剂和材料

甲醇(色谱纯);丙酮(分析纯);正己烷(分析纯);中性氧化铝(国药集团);花粉红(sigma 公司,纯度为 99.5%)。

层析用中性氧化铝(100 目):用前于 105℃ 烘 2 小时,取下置干燥器中冷至室温,装入玻璃瓶中密闭放置。

固相萃取柱:取 5 mL 塑料注射器管,下端口塞入小块脱脂棉,装入处理好的氧化铝约 3 cm

高,放置备用。

50% 丙酮的正己烷液:取 100 mL 丙酮加 100 mL 正己烷混合。

标准储备溶液:准确称取花粉红标准品 10 ± 0.1 mg,置于 100 mL 容量瓶中,用少量甲醇溶解,并用甲醇定容至刻度,混匀,该溶液浓度为 100 μ g/mL。

标准工作溶液:根据需要移取适量标准储备液,用甲醇稀释配置 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 μ g/L 系列工作溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:Supelco RP18, 250 mm $\times$ 4.6 mm (5 μ m);进样量:10 μ L;柱温:35℃;流动相:甲醇+水=75+25;流量:1.0 mL/min;荧光检测的激发波长为 550 nm,发射波长为 580 nm。

2.4 样品制备

2.4.1 提取步骤

饮料等含水较多的样品:准确称取样品 10 g,加入 10 mL 正己烷,振荡 1 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,分离出上层清液,再重复提取两次,合并三次提取液,混匀,供固相萃取净化。

固体等含水较少的样品:准确称取样品 1g,加入 20 mL 含 50% 丙酮的正己烷,振荡 1 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分离出上层清液,残渣加入 10 mL 含 50% 丙酮的正己烷,重复提取一次,合并两次提取液,混匀,供固相萃取净化。

2.4.2 净化步骤

用 5 mL 含 50% 丙酮的正己烷活化洗层析柱,用滴管将上清液加入层析柱中,萃取过程中流动相速度稳定控制在 5~8 mL/min。用 10 mL 含 50% 丙酮的正己烷淋洗洗层析柱,待洗柱的流出液无色时,加入 5 mL 甲醇,收集洗脱液,置于 50℃ 水浴中,氮气流下吹干。用 1 mL 甲醇溶解残渣,振荡,经 0.45 μ m 滤膜过滤,供液相色谱测定。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

将花粉红标准溶液用荧光检测器检测,测定其最大激发波长和发射波长,选择激发波长 550 nm,发射波长 580 nm 为测定波长。

3.2 流动相的选择

以甲醇-水、甲醇-硫酸铵溶液(0.02 mol/L)、甲醇-四丁基溴化铵(0.4 g/L)为流动相,试验发

现,硫酸铵和四丁基溴化铵并没有增强花粉红的荧光强度,考虑到色谱柱的寿命,我们选择甲醇-水为流动相,花粉红标准品的色谱图见图2。

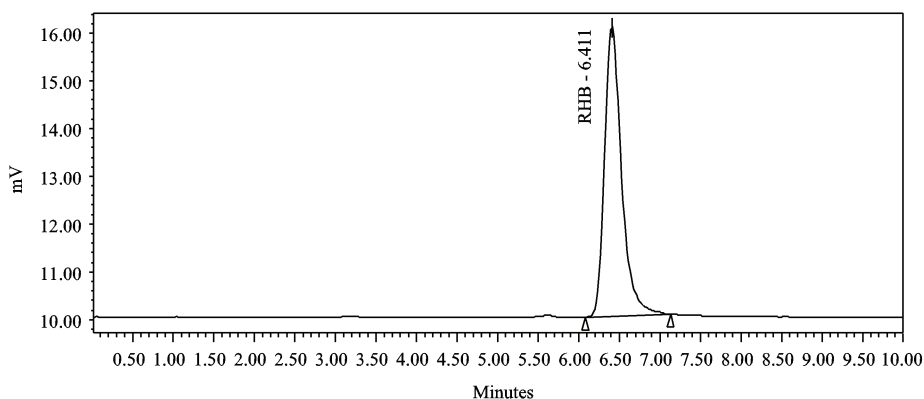


图2 花粉红标准品的色谱图

Fig.2 Chromatograms of Rhodamine B reference substance

3.3 样品处理条件的选择

在辣椒粉中加入 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的花粉红标准品,依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 80% 丙酮的正己烷溶液作为样品提取和净化淋洗液,甲醇洗脱上机测定,50% 丙酮的正己烷溶液所得到的回收率最高,丙酮浓度与回收率的关系见图3。

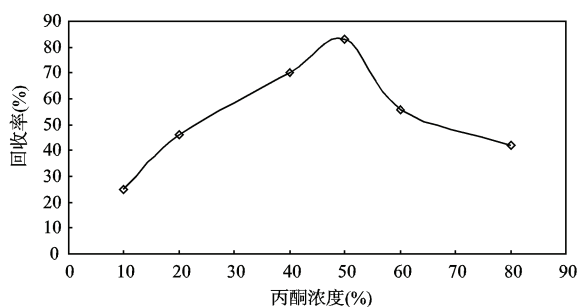


图3 丙酮浓度与回收率的关系图

Fig.3 The relationship between acetone concentration and recovery rate of Rhodamine B

3.4 方法的抗干扰能力

在 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 花粉红标准溶液中加入等量的苏丹红 I、苏丹红、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、亮蓝色素的甲醇溶液,上机测定,发现这些色素在本方法的荧光条件下均无吸收,不会对花粉红色素测定

造成干扰。

3.5 标准曲线和线性范围

以标准品浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),计算标准曲线线性回归方程,在 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内,浓度与色谱峰面积的线性关系良好,线性回归方程 $Y = 1.24E + 05X + 2.32E + 03$ 。相关系数 $r = 0.9996$ 。标准曲线见图4。

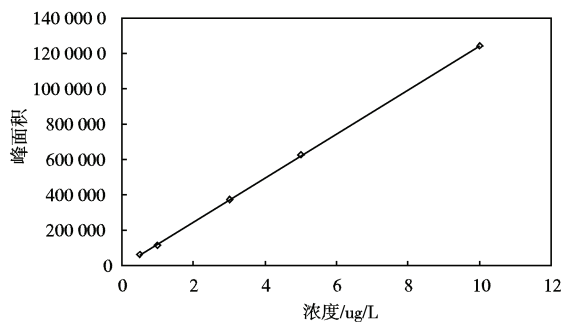


图4 花粉红的标准曲线

Fig.4 The standard curve of Rhodamine B

3.6 回收率和精密度

在上述优化的试验条件下,以饮料、大葱、辣椒粉和腊肉为基质,测定了 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平时花粉红的回收率,结果见表1至表4。实验结果表明,本方法的准确度可以满足日常样品检测需要。

表 1 菊花茶中花粉红的加标回收率 ($n=6$)Table 1 The recoveries of Rhodamine B (for chrysanthemum tea) ($n=6$)

添加水平 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)	RSD (%)
1	68.5	71.5	60.8	67.1	72.3	70.4	68.4	6.1
5	69.7	72.8	76.1	70.8	75.6	81.0	74.3	5.6
10	79.6	82.1	80.8	75.6	76.8	85.6	80.1	4.5

表 2 大葱中花粉红的加标回收率 ($n=6$)Table 2 The recoveries of Rhodamine B (for green Chinese onion) ($n=6$)

添加水平 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)	RSD (%)
1	71.6	69.0	68.2	65.9	71.0	68.8	69.1	3.0
5	80.4	77.3	75.0	72.4	73.6	81.6	76.7	4.8
10	79.1	74.8	82.2	80.1	79.4	75.8	78.6	2.8

表 3 辣椒粉中花粉红的加标回收率 ($n=6$)Table 3 The recoveries of Rhodamine B (for paprika) ($n=6$)

添加水平 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)	RSD (%)
1	53.5	58.1	60.3	56.9	53.7	55.3	56.3	4.7
5	67.3	69.3	63.9	70.2	67.8	67.2	67.6	3.2
10	78.3	74.7	80.4	81.5	79.3	80.0	79.0	3.0

表 4 腊肉中花粉红的加标回收率 ($n=6$)Table 4 The recoveries of Rhodamine B (for cured meat) ($n=6$)

添加水平 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)	RSD (%)
1	59.6	60.6	67.3	62.5	63.7	60.4	62.4	4.6
5	69.6	72.8	65.8	70.9	72.5	62.9	69.1	5.7
10	78.4	73.6	71.0	80.5	73.7	78.9	76.0	4.9

3.7 方法的检出限

按信噪比 3 计算,本方法的检出限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$,完全可以满足日常检验业务需要。

3.8 和文献方法的比较

以大葱为基质,以 $10 \mu\text{g/kg}$ 的加标量进行加标回收试验,以自制中性氧化铝柱和文献[5]

所使用的 Envi- C_{18} 固相萃取小柱为净化柱,分别按本文上述方法和文献[5]方法进行实验。结果见表 5。将两种固相萃取柱的萃取结果进行比较后发现,本文所使用自制中性氧化铝柱不仅可以达到文献[5]的实验效果,而且成本低廉,经济适用,更利于推广。

表 5 不同固相萃取柱提取结果比较 ($n=6$)Table 5 The comparison of different extraction results with different solid-phase extraction columns ($n=6$)

净化柱	加标量 ($\mu\text{g/kg}$)	实际检出量 ($\mu\text{g/kg}$)	RSD (%)	平均回收率 (%)
中性氧化铝柱	10	75.8, 80.1, 74.6, 71.8, 79.9, 78.5	76.7	4.39
Envi- C_{18} 柱	10	81.4, 75.8, 74.5, 78.0, 80.4, 73.8	77.3	4.06

4 结 论

本实验利用自制中性氧化铝小柱,反相高效液相色谱法实现了食品中痕量花粉红的测定,该方法具有较高的灵敏度和准确度,重现性良好,简便快速,经济适用,广泛适用于测量食品中痕量花粉红染料。

参考文献

- [1] 魏永巨,康志敏,刘翠格,等. 罗丹明 B 的共振散射光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12):1659-1662.
WEI Y J, KANG ZH M, LIU C G, et al. Resonance Scattering Spectroscopic Study of rhodamine B [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004, 24(12):1659-1662.
- [2] 黄保军,李建军,屈凌波. 罗丹明 B 荧光光谱机理的研究[J]. 天津师范大学学报:自然科学版, 2005, 25(3):8-11.
HUANG B J, LI J J, QU L B. Study on the Mechanism of RhB by Fluorescence Spectroscopy [J]. Journal of Tianjin Normal University: Natural Science Edition, 2005, 25(3):8-11.
- [3] 陈国珍,黄贤智,郑朱梓,等. 荧光分析法:第2版[M]. 北京:科学出版社, 1990:69.
CHEN G ZH, HUANG X ZH, ZHENG ZH Z, et al. Fluorescence Analytical Method: Second version. [M]. Beijing: Science press, 1990:69.
- [4] GALIARDI L, CAVAZZUTTI G, Multari G, et al. HPLC determination of rhodamine B (CI 45170) in cosmetic products [J]. Chromatographia, 1996, 43(1-2):76-78.
- [5] 王传现,韩丽,方晓明,等. 食品中罗丹明 B 的高效液相色谱荧光检测[J]. 仪器分析, 2008, 1:27-30.
WANG CH X, H L, FANG X M, et al. Determination of rhodamine B in food by high performance liquid chromatography-fluorescence detection[J]. Analytical Instrumentation, 2008, 1:27-30.
- [6] MASON RW, EDWARDS IR. High-performance liquid chromatographic determination of Rhodamine B in rabbit and human plasma [J]. J Chromatogr, 1989, 491(2):468-472.
- [7] POURREZA, NRASTEGARZADEH, SLAKI. Micelle-mediated cloud point extraction and spectrophotometric determination of rhodamine B using Triton X-100 [J]. Talanta, 2008, 77(2):733-736.
- [8] BALCERZAK M. Sensitive spectrophotometric determination of osmium with tin (II) chloride and Rhodamine B after flotation using cyclohexane [J]. Analyst, 1988, 113:129-132.

作者简介



奚星林,男,1965年生,中国科学院长春应用化学研究所硕士毕业,高级工程师,从事食品添加剂和生物毒素研究。

E-mail: ciqxxl@163.com

Xi Xinglin, was born in 1965, and he graduated from Changchun institute of applied chemistry Chinese academy of science in 1992. Now he is a senior engineer, working in Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Centre and he devotes himself to the scientific study of analytical chemistry in the field of food additives and biological toxin.