

食品中罗丹明 B 检测技术的研究进展

段磐辉¹, 李增和¹, 张宜文², 马康^{3*}

(1. 北京化工大学化学学院, 北京 100029; 2. 北京市计量检测科学研究院, 北京 100029;
3. 中国计量科学研究院, 北京 100029)

摘要: 罗丹明 B (rhodamine B, RhB) 是三苯甲烷类碱性水溶性染料, 曾被用作食品添加剂, 后因其致癌性而被禁止用作食品着色剂。近年来罗丹明 B 作为苏丹红替代品, 被非法添加到多类型食品中, 引起了食品研究的重点关注。本文针对传统液液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE) 到新型磁性分子印迹聚合物整体固相萃取 (magnetic molecular imprinting polymer solid phase extraction, M-MIP-SPE) 等 10 余种前处理技术进行综述; 介绍了液相色谱法 (liquid chromatography, LC)、液相色谱串联质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、分光光度法、电化学法和现场快检方法的新进展。对食品中罗丹明 B 分析技术新进展进行梳理, 比较不同检测方法的优缺点, 总结了食品中罗丹明 B 的检测技术进展和发展趋势。以期为相关检测和研究人員提供参考。

关键词: 罗丹明 B; 违禁色素; 前处理技术; 分析方法

Research progress of detection technology for rhodamine B in foodstuff

DUAN Pan-Hui¹, LI Zeng-He¹, ZHANG Yi-Wen², MA Kang^{3*}

(1. College of Chemistry, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. Beijing Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 3. National Institute of Metrology of China, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: Rhodamine B (RhB) is a triphenylmethane-based alkaline water-soluble dye. It was once used as a food additive, and was banned from being used as a food colorant because of its carcinogenicity. In recent years, RhB has been illegally added into many types of food as a substitute for Sudan red, which has attracted the attention of food research. This paper reviewed more than 10 pre-treatment technologies, including traditional liquid-liquid extraction (LLE) and magnetic molecular imprinting polymer solid phase extraction (M-MIP-SPE), and introduced the new developments in liquid chromatography (LC), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), spectrophotometric, electrochemical and field rapid assay. This article also reviewed the new development of rhodamine B analysis technology in food, compared the advantages and disadvantages of different detection methods, and summarized the progress and development trend of rhodamine B detection technology in food, in order to provide reference for related detection and researchers.

KEY WORDS: rhodamine B; illegal dyes; sample preparation; analytical method

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFF0212800、2018YFF0212801)、基本科研业务费项目(21-AKY-1960)

Fund: Supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFF0212800 and 2018YFF0212801), and Basic Scientific Research Expenses (21-AKY-1960)

*通讯作者: 马康, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: makang@nim.ac.cn

*Corresponding author: MA Kang, Ph.D, Professor, National Institute of Metrology of China, No.18, North Third Ring Road East, Chaoyang District, Beijing 100029, China. E-mail: makang@nim.ac.cn

1 引言

食品着色剂是一类重要的食品添加剂, 因能赋予食品靓丽色彩而在食品中应用广泛。着色剂主要分为天然和合成两类, 其中天然着色剂是天然产物, 一般对人无害, 但价格昂贵, 稳定性差; 而合成着色剂具有成本低、色泽鲜艳、性能稳定、色调多、着色力强、使用方便等特点, 因此其应用更为广泛与普遍^[1]。我国允许添加的合成着色剂主要有柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝等, 对其可使用范围和限量标准等有明确规定^[2,3]。罗丹明 B 是三苯甲烷类碱性水溶性染料(化学结构见图 1), 曾被用作着色剂添加到食品中, 后因其致癌性而被禁止用作食品着色剂。近年来, 由于罗丹明 B 价格低廉、色泽鲜艳、稳定性强等特点, 一些不法商家为了降低成本, 常将其作为苏丹红替代品, 非法用作食品着色剂, 在调味品、牛肉干、蜜饯、水果干、糖果、酒类等产品中非法使用^[4,5]。罗丹明 B 在 1987 年被国际癌症研究机构列为第 3 类致癌物, 是一种致癌物、基因毒性物质和动物神经毒性物质^[6]。2005 年, 欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)发表了一份关于非法存在于欧洲联盟(European Union, EU)食品中的罗丹明 B 的意见, 并宣布罗丹明 B 具有潜在的基因毒性和致癌作用^[7]。罗丹明 B 在中国被列入了第一批《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名单》中^[8]。因在辣椒面中违法添加罗丹明 B 等染料, 大连的毒辣椒案件被公安部列为食品非法添加犯罪的十大案例^[9]。因此研究食品中罗丹明 B 的检测技术对严格控制食品中罗丹明 B 违法添加和风险预警具有重大意义。

罗丹明 B 在食品中的含量通常在 $\mu\text{g/g}$ 水平^[10], 同时食品的基质复杂, 因此, 食品中罗丹明 B 的检测流程一般包括食品基质前处理技术和定性定量分析方法研究^[11]。本文总结了 2010~2019 年食品中罗丹明 B 的检测技术, 重点阐述了近 5 年食品中罗丹明 B 的检测技术的研究新进展, 包括前处理技术和仪器检测方法, 以期对相关检测和研究 人员提供参考。

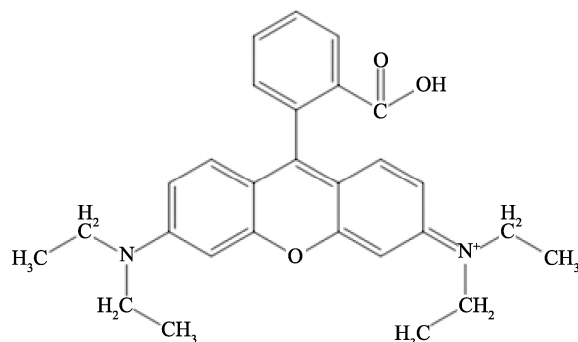


图 1 罗丹明 B 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of rhodamine B

2 前处理技术

食品基质中罗丹明 B 残留含量范围可从 $\mu\text{g/g}$ 低至 $\mu\text{g/kg}$ ^[10], 因此有效的样品前处理技术对罗丹明 B 的检测至关重要。本文整理了 2010~2019 年公开发表论文, 食品中罗丹明 B 的样品前处理技术共有 13 种, 主要包括: 液-液萃取技术(liquid-liquid extraction, LLE)^[12]、液相微萃取技术(liquid phase microextraction, LPME)^[13]、QuEChERS 技术^[14]、凝胶渗透色谱技术(gel permeation chromatography, GPC)^[15]、浊点萃取技术(cloud point extraction, CPE)^[16]、深度共晶萃取技术(deep eutectic solvent extraction, DESE)^[17]、固相萃取技术(solid phase extractant, SPE)^[18-20]、分散固相萃取(dispersive solid phase extraction, DSPE)^[21,22]、吸管尖端固相萃取技术(pipette-tip solid phase extraction, PT-SPE)^[23]、固相微萃取技术(solid phase microextraction, SPME)^[24,25]、分散固相微萃取技术(dispersive solid phase microextraction, DSPME)^[26]、分子印迹聚合物固相萃取技术(molecularly imprinted polymers-solid phase extraction, MIPs-SPE)^[27-29]和磁性固相萃取技术(magnetic solid phase extraction, MSPE)^[30-32]等。将前处理技术进行分类整理见图 2。在所有前处理技术中, 其中固相萃取法及其改进技术应用最多, 也是分析技术研究的热点^[18-32], 本文重点介绍了该类技术。

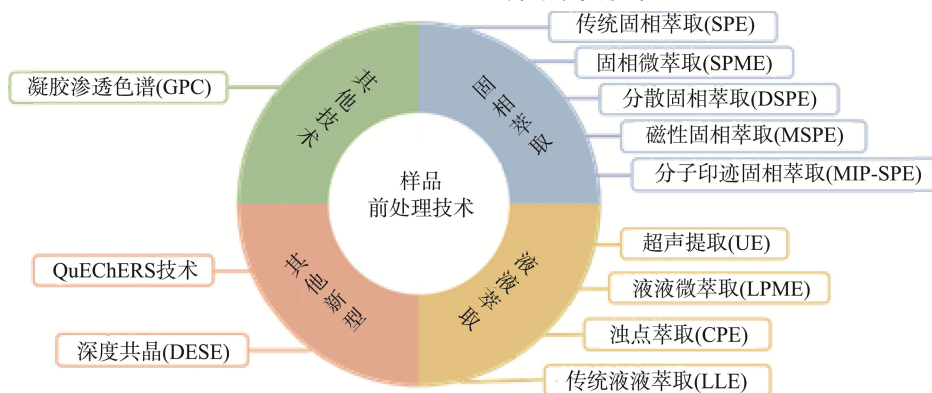


图 2 样品前处理技术总结

Fig.2 Summary of sample preparation

在食品中罗丹明 B 的样品前处理技术中, 分子印迹固相萃取技术是近年来的研究热点之一, 分子印迹技术是一种可对特定物质进行选择性和分离的技术。相较于传统的固相萃取, 该方法可实现对被检测物质低成本、高特异性的快速检测。Li 等^[27]使用磁性纳米材料用于分子印迹技术, 制备了包覆磁性二氧化硅纳米硅球分子印迹聚合物 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$), 并且, 合成的功能单体中含有硝基苯恶二唑荧光基团, 能够与罗丹明 B(模版分子)发生荧光共振转移。因此, 该分子印迹技术不仅可以对罗丹明 B 特异性识别, 还可以作为荧光传感器对罗丹明 B 进行检测。其对罗丹明 B 的最大吸附容量为 29.64 mg/g。为了克服传统分子印迹材料吸附容量低, 结合位点分布不均匀, 传质速率慢等问题, 近年来, 表面分子印迹技术得到了很大的发展。Long 等^[28]将表面分子印迹技术和硅胶改性技术相结合, 制备了罗丹明 B 印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)材料, 其制备过程见图 3, 封装成固相萃取整体柱(MIPs-SPE), 从含有 5 种类似结构物混合溶液对罗丹明 B 进行特异性识别, 并成功的用于测定红酒和饮料中罗丹明 B 的含量, 检出限 2.8×10^{-5} mg/mL, 回收率为 91.6%~93.1%。此外, 为了解决分子印迹材料合成时需要消耗大量的有毒物质和试剂的问题, Bagheri 等^[23]以低成本的壳聚糖为天然多功能生物单体,

罗丹明 B 为模板分子, 在不消耗有机溶剂的条件下合成 MIPs。选择性吸附剂辣椒粉样品中罗丹明 B, 用高效液相分离定量, 检出限为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和回收率大于 85.0%。

磁性固相萃取是使用特定的磁性材料, 将磁性吸附剂与样品混合, 利用固相萃取原理分离, 通过外磁场从样品中分离出分析磁性试剂。目前, 磁性固相萃取吸附剂正聚焦于具有特殊官能团的 Fe_3O_4 纳米颗粒上。Chen 等^[30]结合离子液体和纳米颗粒的优点, 使用离子液体(ionic liquids, ILs)对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米颗粒进行包覆形成 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{IL}$)核-壳结构用于辣椒粉和花椒中罗丹明 B 的磁性固相萃取, 同时用液相色谱进行检测, 回收率 98.9%~101.8%, 检出限为 120.08 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。Yan 等^[31]使用三维还原氧化石墨烯覆盖在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面上对罗丹明 B 进行吸收, 由于三维还原氧化石墨烯具有大的离域 π 电子系统、超高的表面积和多孔的三维网状结构, 使其对罗丹明 B 具有较高的特异性亲和力。联合液相色谱对辣椒粉和自来水中罗丹明 B 进行检测, 回收率 95.66%~99.98%, 检出限 7.4×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{L}$ 。此外, 磁性材料还可用于分子印迹固相萃取等样品前处理技术中^[27,32,33], 磁性材料的引入, 使得用于食品中罗丹明 B 的样品前处理技术的操作更加简便, 萃取能力和萃取效率更高。

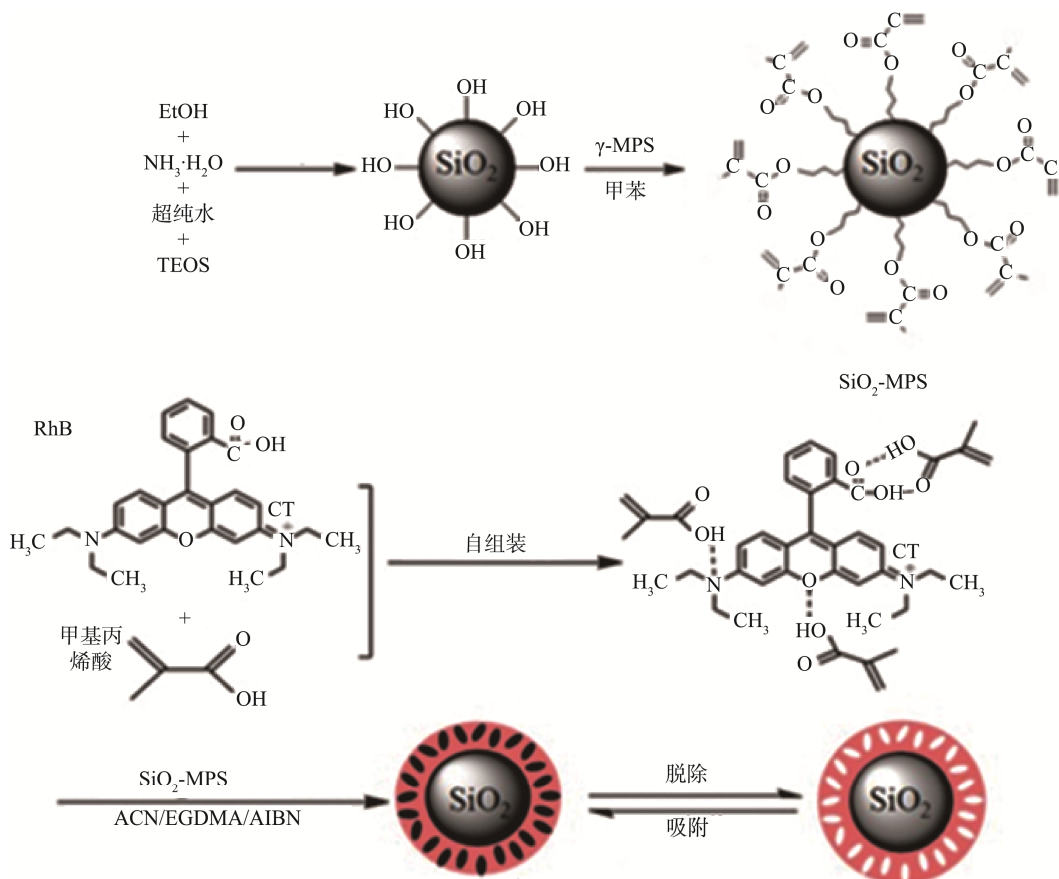


图 3 罗丹明 B 分子印迹聚合物^[27]

Fig.3 Rhodamine B molecular imprinted polymer

为了解决固相萃取样品预处理时间较长和溶剂消耗较多的问题,除了目前研究较多的分子印迹固相萃取和磁性固相萃取外,其他基于固相萃取的改进技术,如吸管尖端固相萃取、固相微萃取、分散固相萃取和分散固相微萃取等也得到了应用。吸管尖端固相萃取是固相萃取技术的小型化应用,可以很大程度上减少吸附剂和样品的用量,从而节省了分析的成本和时间^[34]。Bagheri 等^[23]使用吸管尖端固相萃取测定 0.5 g 辣椒粉样品中的罗丹明 B,其吸附剂用量为 10 mg,很大程度上减少了样品及吸附剂用量。固相微萃取是利用平衡萃取原理以及选择性吸附原理把样品体系中的目标化合物向萃取相中转移,是一种集取样、萃取和浓缩于一体的样品前处理方法。Wei 等^[35]使用固相微萃取测定食品中罗丹明 B,在相同条件下对比了固相微萃取与固相萃取对辣椒中罗丹明 B 萃取时的有机溶剂用量、分析时间和回收率。结果表明,固相微萃取的有机溶剂用量、分析时间和回收率分别为 0.5 mL、0.5 h 和 85%,对比 SPE 的 15 mL、3 h 和 79.8%,各参数均有明显的优势。Chen 等^[22]使用聚合物阳离子交换(polymer cation exchange, PCX)吸附剂的反相分散固相萃取(reversed-dispersive solid phase extraction, r-DSPE)技术联合高分辨质谱对辣椒粉和辣椒油中罗丹明 B 进行检测,该方法具有快速(3 min)、经济(0.1 美元)、灵敏度高(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、重复性好等优点。分散固相微萃取通过添加分散剂来改善样品溶液和萃取剂之间的接触面积,进一步缩短萃取时间,减少萃取剂的消耗。Xu 等^[25]使用分散固相微萃取在提取 5 g 辣椒油样品时,吸附剂用量 15 mg,萃取时间 3 min,联合液相色谱进行检测,检出限 0.28 $\mu\text{g}/\text{L}$,回收率 85.1%~96.0%。

其他新的样品前处理技术如 QuEChERS 技术、浊点萃取等,近年来也被应用在罗丹明 B 的检测中。林子豪等^[14]使用 QuEChERS 净化,液相色谱-串联质谱内标法测定调味品中罗丹明 B,检出限 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率 94.8%~95.3%,在超市及农贸市场的 50 批次调味品进行测定,在 4 批次的辣椒粉中检测出罗丹明 B。Bisgin 等^[16]比较了浊点萃取和固相萃取样品前处理技术在自来水等样品中罗丹明 B 的检测结果,表明浊点萃取的检出限和定量限为 0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 1.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 优于传统固相萃取的 1.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 3.2 $\mu\text{g}/\text{L}$,浊点萃取回收率为 96%~99%。

3 检测方法

罗丹明 B 的主要分析方法有:液相色谱法^[11,30,36-41]、液相色谱-质谱/质谱法^[10,21,42-48]、分光光度法^[13,32,49]、电化学法^[50-57]和现场快检方法^[58-62]。其中液相色谱法和液相色谱-质谱/质谱是用来检测食品中罗丹明 B 研究最多的方法。电化学法和现场快检技术近年来也得到了快速发展。

3.1 液相色谱

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是罗丹明 B 检测最常用的方法之一。罗丹明 B 吸收可见光波,最佳检测波长在 550 nm 附近,且罗丹明 B 具有天然的荧光特性,激发波长为 550 nm,发射波长为 580 nm。因此,高效液相色谱可使用紫外-可见光检测器(ultraviolet-visible, UV-VIS)、二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)、荧光检测器(fluorescence detector, FLD)用于罗丹明 B 的检测。Unsal 等^[36]使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)-UV-VIS 检测饮料、食品、工业废水和口红样品中罗丹明 B 的含量,相对标准偏差 5%($n=11$),相关系数大于 0.99,样品的加标回收率为 98%~118%,检出限 3.14 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。Chen 等^[30]使用 HPLC-DAD 检测辣椒粉和花椒中罗丹明 B,回收率 98.9%~101.8%,检出限 0.08 $\mu\text{g}/\text{L}$,相对标准偏差 0.51%($n=6$)。因自然界荧光物质较少,相较于紫外-可见光和二极管阵列检测,荧光检测具有更好的特异性和灵敏度,在罗丹明 B 的检测中也更为常用。Qi 等^[37]使用 HPLC-FLD 检测了辣椒粉和辣椒油中罗丹明 B,检出限和定量限分别为 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,辣椒粉的回收率在 98%~103%之间,辣椒油的回收率在 87%~100%之间。

除最常用的高效液相色谱外,近年来,其他液相色谱技术如超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)和毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)等也被用于食品中罗丹明 B 的检测。超高效液相色谱是在高效液相色谱的基础上,通过使用颗粒更小的填料和压力更高的输液泵等措施来提高检测的速度、灵敏度、分离度,缩短了分析时间,同时减少了溶剂用量。Wang 等^[17]使用深度共晶技术,选择性的从辣椒油中分离出罗丹明 B,使用 UPLC 对罗丹明 B 进行检测,检出限 1.67 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率 73.1%~75.3%。毛细管电泳法是以毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术。与传统的液相色谱相比,毛细管电泳具有更快的检测速度和更少的有机溶剂消耗^[39,40]。目前,毛细管电泳法主要使用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)检测器和激光诱导荧光(laser-induced fluorescence, LIF)检测器对食品中罗丹明 B 进行检测。丁晓静等^[41]使用胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)-LIF 检测法对番茄酱、番茄沙司和辣椒粉中罗丹明 B 进行检测,检测时长在 10 min 内,检出限 5 $\mu\text{g}/\text{L}$,回收率 100.9%~105.8%。

3.2 液相色谱-质谱/质谱

质谱检测由于具有较高的灵敏度和选择性,其使用频率也很高。罗丹明 B 的 LC-MS 检测中,电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)是最常用的电离源。质量分析

器主要是三重四极杆(triple quadrupole, QQQ), 大多数情况下使用的是多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 母离子 m/z 443.2, 选择离子对 m/z (443.2-399.2)和 m/z (443.2-355.2)进行分析。Chen 等^[22]使用超高效液相色谱串联质谱(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)对辣椒粉中罗丹明 B 进行测量, 选择离子对 m/z 443.2-399.2 和 m/z 443.2-355.2 进行定性和定量分析, 方法的检出限 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率 76.7%~104.9%。Ates 等^[42]使用 HPLC-ESI-MS/MS 分别检测了液体(葡萄酒)、半液体(辣椒酱)和固体(辣椒粉)3 种状态基质下的罗丹明 B, 使用浊点萃取对样品进行前处理, 平均回收率 98.9%~115.6%, 检出限 0.03 mg/kg 。

此外, 一些复合性、高分辨质量分析器也被用于食品中罗丹明 B 检测, 相比于传统的质谱, 高分辨质谱在罗丹明 B 检测中的应用使得罗丹明 B 的定性和定量更加精确^[10,38]。Amate 等^[43]使用三重四极杆复合线性离子阱(triple quadrupole/quadrupole-linear ion trap, QQQ/QTrap)用于检测辣椒粉中罗丹明 B, 回收率 97%~105%, 检出限 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。张东雷等^[44]使用离子阱-飞行时间(ion trap-time of flight, IT-TOF)质量分析器用于检测肉制品中罗丹明 B, 回收率 94.82%~116.53%, 检出限 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Wang 等^[10]使用超高效液相色谱-串联四极杆复合线性离子阱质谱(ultra performance liquid chromatographytriple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry, UPLC-Qtrap-MS)检测了 292 个辣椒, 胡椒, 番茄等食品样品中罗丹明 B 的含量, 其中 22.7%的辣椒粉、18.5%等胡椒粉、11.1%的辣椒油、9.1%的胡椒油中检测出罗丹明 B, 平均含量分别为 743、4.1、1.0、0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 表明罗丹明 B 在食品中违法使用的情况依然很严重。

近年来, 快速质谱分析方法也在食品中罗丹明 B 的检测中得到了一定的应用, 快速质谱不需要串接液相色谱, 直接快速筛查。快速质谱分析方法包括直接灌注质谱分析、基质辅助激光解吸/电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)质谱分析和敞开式质谱分析等。杨子辉^[45]分别使用直接 ESI 分析和 APCI 分析对辣椒粉中罗丹明 B 进行检测, 并通过化学气相辅助增强 ESI 离子化效率, 从而使罗丹明 B 分析效率增强了 4 倍; 通过莱顿弗洛特效应辅助增强 APCI 离子化效率, 使罗丹明 B 检出限达 10 ng/mL 。Zhen 等^[46]基于基质辅助激光解吸/电离提出表面辅助激光解吸/电离(surface-assisted laser desorption/ionization, SALDI), 以钴掺杂纳米孔碳作为表面辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(surface-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, SALDI-TOF-MS)的吸附剂和基质检测水中罗丹明 B 含量, 检出限为 1 pg/L 。Chao 等^[47]使用热解吸/电喷雾电离源(thermal desorption-electrospray ionization, TD-ESI)敞开式质谱对中国传统糕

点中罗丹明 B 进行检测(见图 4), 该方法无需样品前处理, 可直接对样品进行检测, 检测时长 30 s, 检出限 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实时直接分析(direct analysis in real time, DART)是近年来出现的一种常压敞开式离子化技术, 也同样被用到了罗丹明 B 的检测中。Wen 等^[48]建立了高温脱附实时直接分析的高分辨质谱(high temperature desorption-direct analysis in real time-high resolution mass spectrometric, HTD-DART-HRMS)用于辣椒粉和辣椒油等食品中罗丹明 B 检测, 与传统的液相色谱相比, 其不需要色谱过程, 检测时长更短, 且灵敏度更高, 检出限 1 $\mu\text{g}/\text{L}$, 回收率 87.2%~118.5%。

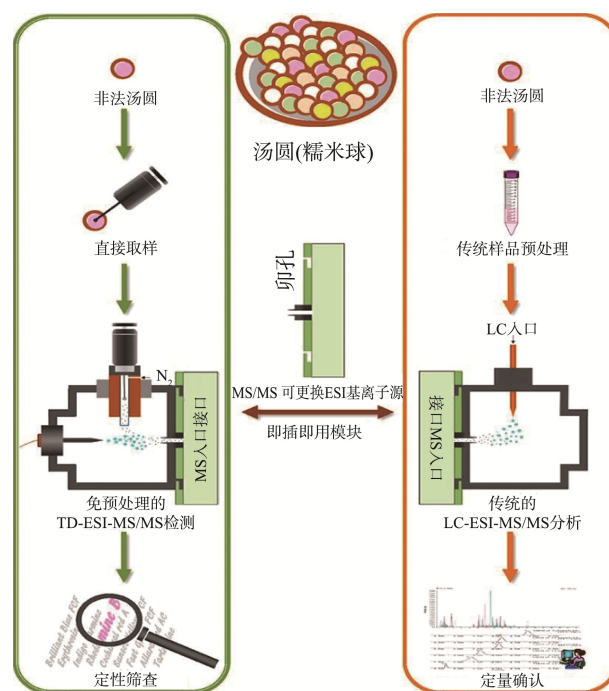


图 4 热解吸/电喷雾电离源(TD-ESI)敞开式质谱法和 LC-ESI-MS 法用于传统中国糕点(汤圆)分析的过程示意图^[47]

Fig. 4 Schematic representation of the process of analyzing traditional Chinese pastry(Tang yuan) using TD-ESI-MS and LC-ESI-MS^[47]

3.3 分光光度法

分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定范围内光的吸收度, 对该物质进行定性和定量分析的方法。分光光度法具有操作简便、分析成本低、准确度好等优点, 但易受低浓度和基质效应的影响^[13]。用于罗丹明 B 测定的分光光度法主要有紫外-可见分光光度法和荧光分光光度法。Bakheet 等^[32]使用荧光分光光度法测定辣椒等食品中罗丹明 B 的含量, 检出限 5.2 ng/mL , 相对标准偏差

3.1%($n=3$), 检测范围 0.01~9 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数大于 0.9987。Yilmsz 等^[13]使用紫外-可见光分光光度法测定化妆品和水中罗丹明 B 的含量, 检出限 2.2 $\mu\text{g/L}$, 相对标准偏差 2.3%($n=3$), 回收率 98%~110%。此外, 为了消除基体效应等影响, Ji 等^[49]提出了一阶导数吸收光谱法测定辣椒素中罗丹明 B 的方法, 该方法具有快速、准确、可靠、重复性好、经济等优点。测得辣椒中罗丹明 B 的最佳平均回收率和相对标准偏差分别为 101%和 2.4%。

3.4 电化学法

电化学法是通过测量被测物质电信号变化, 对被测物质进行定性和定量的一种方法。近年来, 电分析技术以其操作简单、准确度高优点受到越来越多的关注^[50-52]。Yu 等^[53]基于玻碳电极的简易伏安法测定果脯和果汁等食品中罗丹明 B, 检出限为 2.93 $\mu\text{g/L}$ 。该方法不需要复杂的电极修饰和样品预处理, 可以与低成本便携式电化学仪器相结合用于现场分析。然而, 在使用玻碳电极检测食品中罗丹明 B 存在电化学响应较差的问题。因此, 为了改善玻碳电极在测定食品中罗丹明 B 时电化学响应较差的问题, Sun 等^[54]使用钴-镍氧化物来修饰玻碳电极用于食品中罗丹明 B 的检测, 线性范围 0.03~1 $\mu\text{mol/L}$, 检出限 5.3 nmol/L。Zhang 等^[55]使用硅柱磷酸锆/全氟磺酸复合材料修饰玻碳电极用于果脯和辣椒粉中罗丹明 B 的测定, 在 0.01~5 $\mu\text{mol/L}$ 线性良好, 检出限 4.3 nmol/L。Sun 等^[56]使用石墨烯纳米薄片修饰玻碳电极来增强罗丹明 B 氧化信号, 用于不同酱油样品中罗丹明 B 的检测, 检测值分别为 0.279, 0.329, 0.231, 0.286, 0.311 mg/L, 与相同条件下液相色谱方法的检测结果 0.261, 0.314, 0.246, 0.273, 0.295 mg/L 相一致。此外, 为了简化电极制作过程和降低电极成本, Wang 等^[57]使用 MnO_2 纳米棒/电还原氧化石墨烯复合材料修饰玻碳电极, 该电极比单纯的玻碳电极峰值响应电流信号强 17 倍, 检出限为 6 nmol/L, 且对该电极进行稳定性测试时, 两周后该电极的峰值电流信号偏差仅为 5.9%, 稳定性较好。总体来说这些改进的电极通常涉及繁琐和复杂的制造过程, 电极的制造成本过高, 阻碍了此类方法的应用。

3.5 现场快速检测法

生物分析法是用于食品中罗丹明 B 现场快速检测的方法之一, 主要包括免疫层析法(immunochromatography assay, ICA)和酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。周丽岩^[58]利用戊二醛将罗丹明 123 分别与牛血清蛋白和卵清蛋白进行偶联, 采用皮下多点免疫 3 月龄的新西兰大耳兔制备罗丹明 B 的多克隆抗血清, 以此为基础建立了罗丹明 B 的间接竞争酶联免疫吸附法。该方法对罗丹明 6G、苏丹红和胭脂红的交叉反应率分别为 55.93%、8.82%、0.51%。同时建立了以胶体金标

记抗体为基础的罗丹明 B 免疫层析检测技术。以胶体金作为示踪标记物, 以硝酸纤维素膜为固相载体, 包被卵清蛋白偶联物作为检测带, 包被羊抗兔二抗作为质控带。检测限为 0.5 ng/mL。该方法操作简单、结果直观, 无需特殊设备即可实现现场快速检测, 适合于调味品及部分食品中罗丹明 B 的快速定性免疫检测。徐声乐^[59]使用 N-羧基琥珀酰亚胺活性脂法, 合成罗丹明 B 完全抗原, 并以此为基础建立了酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析检测方法用于罗丹明 B 的检测。

可用于食品中罗丹明 B 现场快速检测的另一种方法是表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman scattering, SERS), 该方法是一种简单、快速、灵敏的无损分析检测技术, 具有化学和结构信息含量高, 可以检测痕量浓度的目标样品, 且能够用于食品的现场快速检测等优势。表面增强拉曼光谱一般使用含有金、银、铜等贵金属的基底, 用于拉曼光谱信号的增强。Wang 等^[60]使用植酸稳定的金-银核壳双金属纳米粒子钠盐作为基底的表面增强拉曼光谱法, 用于测定辣酱样品中微量罗丹明 B。其水中的检出限为 5 nmol/L 低于中国出入境检验检疫局所允许的 10 nmol/L。同时, 将该检测方法与便携式拉曼光谱系统结合, 用于辣酱中罗丹明 B 的现场检测。近年来, 复合纳米材料被用于 SERS 中以提高检测的灵敏度、稳定性和重现性。Lupa 等^[61]使用具有覆盆子结构和可控金纳米颗粒覆盖的复合颗粒用作罗丹明 B 的 SERS 底物。结果表明, 复合纳米材料的增强效率明显高于传统方法制备的金纳米颗粒。马超等^[62]通过在类石墨相氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)纳米片上组装 Ag 纳米粒子的方式构筑了 $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{Ag}$ 复合材料用于 SERS 对棒棒糖中罗丹明 B 的检测。回收率 93.6%~95.04%, 相对标准偏差 4.57%~5.24%, 检出限为 0.39 nmol/L。各种方法的比较见表 1。

4 总结与展望

在食品中罗丹明 B 的测定(含量 $\mu\text{g/kg}$)中, 高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用技术, 因其高效分离能力以及与罗丹明 B 理化性质的兼容性、高灵敏度和稳定性, 是应用最为广泛的方法, 也是分析人员的首选方法。本文对比了不同检测方法的优缺点, 为分析工作者选择方法, 提供参考。食品中罗丹明 B 的未来检测技术趋势是既要快速定性筛查, 又能准确定量, 操作简单, 低成本。前处理技术将向高选择性、高回收率、高稳定性的方向发展, 固相萃取与特异性结合的改进技术和 QuEChERS 技术将会有更大发展与应用, 高灵敏度的检测方法, 如快检质谱技术, 将会有越来越多的研究。相信随着科研人员孜孜不倦的钻研和食品组学的深入发展, 其必将在食品安全监测中发挥更大作用。

表 1 食品中罗丹明 B 不同检测技术比较
Table 1 Comparison of different detection techniques for rhodamine B in food

检测方法	优点	缺点	参考文献
液相色谱法	液相色谱具有分离效率高, 选择性好, 检测灵敏度高, 应用范围广等优点。	分析成本相对较高, 分析时间较长。且无法满足罗丹明 B 现场快速筛查的需求。	[11,30,36-38]
液相色谱-质谱/质谱	检测范围广, 几乎适用于所有化合物的检测, 能给出丰富的结构信息和分子量。	仪器价格较为昂贵, 检测成本高, 检测步骤较为繁琐等。	[10,22,43-48]
分光光度法	具有操作简单, 分析成本低等优点	灵敏度较低, 无法检测出较低浓度的罗丹明 B。易受基质效应的影响。	[13,32,49]
电化学法	操作简单, 测量范围宽, 且可与便携式电化学仪器相结合分析。	电化学响应较差, 选择性差, 易受基质效应的影响。	[50-57]
免疫检测法	特异性强, 检测速度快, 成本较低, 适用于现场快速检测。	难以进行定量, 只能用于前期筛查。	[58,59]
表面增强拉曼光谱法	简单, 快速, 可重复性高, 不需要进行复杂的样品前处理	需要基底进行信号增强, 但存在基底制备过程复杂, 稳定性较差的问题	[60-62]

参考文献

- 武太鹏, 张京晨, 马康. UPLC-DAD 法同时测定预调鸡尾酒中 24 种水溶性合成色素[J]. 分析测试学报, 2019, 38(2): 207-212.
Wu TP, Zhang JC, Ma K. Simultaneous determination of 24 water-soluble synthetic colors in premade cocktails by ultra-performance liquid chromatography with diode array detector [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(2): 207-212.
- GB 2760-2014 中华人民共和国国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National standards of the People's Republic of China-Standards of using food additives [S].
- Ma K, Yang YN, Jiang XX, *et al.* Simultaneous determination of 20 food additives by high performance liquid chromatography with photo-diode array detector [J]. Chin Chem Lett, 2012, 23(4): 492-495.
- Chen XH, Zhao YG, Shen HY, *et al.* Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine [J]. J Chromatogr A, 2012, 1263(9): 34-42.
- Ma K, Li XJ, Wang HF. Rapid and sensitive method for the determination of eight food additives in red wine by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Anal Methods, 2015, 8: 203-212.
- 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.
- Branton G. Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU [J]. EFSA J, 2005, 263: 1-71.
- 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名单(第 1-5 批汇总) [EB/OL]. [2011-04-22]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/201406/38e5c8a53615486888d93ed05ac9731a.shtml>.
List of non-edible substances that may be illegally added to food and food additives that are easy to abuse (summary of batches 1-5) [EB/OL]. [2011-04-22]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/201406/38e5c8a53615486888d93ed05ac9731a.shtml>.
- 穆奕. 食品非法添加犯罪十大案例公布[J]. 安全与健康, 2011, (19): 24.
Mu Y. Ten cases of illegal food addition crimes announced [J]. Saf Health, 2011, (19): 24.
- Wang MJ, Nie XL, Tian L, *et al.* Rhodamine B in spices determined by a sensitive UPLC-MS/MS method [J]. Food Addit Contam Part B, 2019, 12(1): 59-64.
- Arabi M, Ostovan A, Bagheri AR, *et al.* Hydrophilic molecularly imprinted nanospheres for the extraction of rhodamine B followed by HPLC analysis: A green approach and hazardous waste elimination [J]. Talanta, 2020, 215: 120933.
- Khan MR, Khan JM, Alqadami AA. A simple solvent extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the identification and quantification of rhodamine B in commercial lip balm samples [J]. Spectrochim Acta Part A, 2019, 206: 72-77.
- Yimsz E, Soyllak M. A novel and simple deep eutectic solvent based liquid phase microextraction method for rhodamine B in cosmetic products and water samples prior to its spectrophotometric determination [J]. Spectrochim Acta Part A, 2018, 202: 81-86.
- 林子豪, 戚平, 周庆琼, 等. 液相色谱-串联质谱内标法同时测定调味品中 11 种工业染料[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 301-307.
Lin ZH, Qi P, Zhou QQ, *et al.* Simultaneous determination of 11 industrial dyes in condiments by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using internal standard method [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(7): 301-307.
- 李蓉娟, 刘栋, 李芳, 等. GPC-HPLC-MS 法检测辣椒油中罗丹明 B[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2018, 25(2): 77-81.
Li RJ, Liu D, Li F, *et al.* Determination of rhodamine B in chill oil with GPC-HPLC-MS method [J]. J Liaodong Univ (Nat Sci Ed), 2018, 25(2): 77-81.
- Bisgin AT, Surme Y, Ucan M, *et al.* Separation, preconcentration and spectrophotometric determination of rhodamine b in industrial, cosmetic and water samples by cloud point and solid phase extraction [J]. J Anal Chem, 2018, 73(5): 452-458.

- [17] Wang WD, Du YG, Xiao ZE, *et al.* Determination of trace rhodamine b in chili oil by deep eutectic solvent extraction and an ultra high-performance liquid chromatograph equipped with a fluorescence detector [J]. *Anal Sci*, 2017, 33(6): 715–717.
- [18] Wu ZL, Liu Q, Chen XQ, *et al.* Preconcentration and analysis of rhodamine B in water and red wine samples by using magnesium hydroxide/carbon nanotube composites as a solid-phase extractant [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(19): 3404–3411.
- [19] Ping WH, Zhu XS, Wang BS. An Ionic Liquid Loaded β -Cyclodextrin-cross-linked polymer as the solid phase extraction material coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of rhodamine B in food [J]. *Anal Lett*, 2014, 47(3): 504–516.
- [20] Huang YT, Wang DM, Liu W, *et al.* Rapid screening of rhodamine B in food by hydrogel solid-phase extraction coupled with direct fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2020, 316: 126378.
- [21] Hu ZB, Qi P, Wang N, *et al.* Simultaneous determination of multiclass illegal dyes with different acidic-basic properties in foodstuffs by LC-MS/MS via polarity switching mode [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125745.
- [22] Chen DW, Zhao YF, Miao H, *et al.* A novel cation exchange polymer as a reversed-dispersive solid phase extraction sorbent for the rapid determination of rhodamine B residue in chili powder and chili oil [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1374: 268–272.
- [23] Bagheri AR, Ghaedi M. Synthesis of chitosan based molecularly imprinted polymer for pipette-tip solid phase extraction of rhodamine B from chili powder samples [J]. *J Biol Macromol*, 2019, 139: 40–48.
- [24] 郑璐. 基于凝胶固相萃取荧光技术检测食品添加剂的研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
Zheng L. Study on the detection of food additives based on gel-solid phase microextraction and fluorescence [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2018.
- [25] Xu X, Zhang MH, Wang LL, *et al.* Determination of rhodamine B in food using ionic liquid-coated multiwalled carbon nanotube-based ultrasound-assisted dispersive solid-phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography [J]. *Food Anal Methods*, 2016, 9(6): 1696–1705.
- [26] Li YY, Hou LY, Shan FJ, *et al.* A Novel Aggregation-induced emission luminogen based molecularly imprinted fluorescence sensor for ratiometric determination of rhodamine B in food samples [J]. *Chemistryselect*, 2019, 4(38): 11256–11261.
- [27] Li HY, Li NJ, Jiang J, *et al.* Molecularly imprinted magnetic microparticles for the simultaneous detection and extraction of Rhodamine B [J]. *Sens Actuators B*, 2017, 246: 286–292.
- [28] Long ZR, Xu WW, Lu Y. Nanosilica-based molecularly imprinted polymer nanoshell for specific recognition and determination of rhodamine B in red wine and beverages [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1029: 230–238.
- [29] 刘静静, 肖申鸿, 张伟, 等. 罗丹明 B 强吸附分子印迹材料的制备及吸附性能评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 958–962.
Liu JJ, Xiao SH, Zhang W, *et al.* Synthesis of molecularly imprinted polymer for strong adsorption of rhodamine B and the evaluation of its adsorption ability [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(3): 958–962.
- [30] Chen J, Zhu X. Magnetic solid phase extraction using ionic liquid-coated core-shell magnetic nanoparticles followed by high-performance liquid chromatography for determination of rhodamine B in food samples [J]. *Food Chem*, 2016, 200: 10–15.
- [31] Yan J, Cen JM, Tan XC, *et al.* Determination of trace rhodamine B by spectrofluorometry and magnetic solid phase extraction based on a 3D reduced graphene oxide composite [J]. *Anal Methods*, 2017, 9(37): 5433–5440.
- [32] Bakheet AAA, Zhu XS. Determination of rhodamine B in food samples by Fe₃O₄@Ionic liquids-beta-cyclodextrin cross linked polymer solid phase extraction coupled with fluorescence spectrophotometry [J]. *J Fluoresc*, 2017, 27(3): 1087–1094.
- [33] Khani R, Sobhani S, Yari T. Magnetic dispersive micro solid-phase extraction of trace rhodamine B using imino-pyridine immobilized on iron oxide as nanosorbent and optimization by Box-Behnken design [J]. *Microchem J*, 2019, 146: 471–478.
- [34] Yan ZM, Hu BQ, Li QL, *et al.* Facile synthesis of covalent organic framework incorporated electrospun nanofiber and application to pipette tip solid phase extraction of sulfonamides in meat samples [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1584: 33–41.
- [35] Wei LL, Yan Y, Kang XJ. Application of packed-nanofibers solid-phase extraction for determination of rhodamine B in dry chilli, fruit drink and red wine [J]. *Chem J Chin Univ*, 2017, 38(6): 935–941.
- [36] Unsal YE, Soylak M, Tuzen M, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction-spectrophotometry combination for determination of rhodamine B in food, water, and environmental samples [J]. *Desalin Water Treat*, 2015, 55(8): 2103–2108.
- [37] Qi P, Lin ZH, Li JX, *et al.* Development of a rapid, simple and sensitive HPLC-FLD method for determination of rhodamine B in chili-containing products [J]. *Food Chem*, 2014, 164: 98–103.
- [38] Lim HS, Choi E, Lee JH, *et al.* Analysis of illegal colourants (citrus red II, diethyl yellow, dimethyl yellow, metanil yellow and rhodamine B) in foods by LC-UV and LC-MS/MS [J]. *Food Addit Contam*, 2020, 37(6): 895–904.
- [39] Calcerrada M, Gonzalez-Herraez M, Garcia-Ruiz C. A microdestructive capillary electrophoresis method for the analysis of blue-pen-ink strokes on office paper [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1400: 140–148.
- [40] Park M, Bahng SH, Woo N, *et al.* Highly sensitive wavelength-dependent nonaqueous capillary electrophoresis for simultaneous screening of various synthetic organic dyes [J]. *Talanta*, 2016, 152: 236–243.
- [41] 丁晓静, 刘文叶, 王萍. 胶束电动毛细管色谱-激光诱导荧光检测法测定番茄酱、番茄沙司和辣椒粉中罗丹明 B[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 287–292.
Ding XJ, Liu WY, Wang P. Determination of rhodamine B in ketchup, tomato sauce and chili powder by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection [J]. *Food Sci*, 2020, 41(4): 287–292.
- [42] Ates E, Mittenforf K, Senyuva H. LC/MS method using cloud point extraction for the determination of permitted and illegal food colors in liquid, semiliquid, and solid food matrices: Single-Laboratory validation [J]. *J AOAC Int*, 2011, 96(6): 1853–1862.
- [43] Amate CF, Unterluggauer H, Fischer RJ, *et al.* Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010,

- 397: 93–107.
- [44] 张东雷, 汪丽娜, 陈小珍, 等. 超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱法测定肉制品中 10 种碱性染料[J]. 色谱, 2012, 30(8): 770–776.
Zhang DL, Wang LN, Chen XZ, *et al.* Determination of ten basic dyes in meat products by ultra fast liquid chromatography-ion trap time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(8): 770–776.
- [45] 杨子辉. 食品安全分析中快速质谱方法及应用研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
Yang ZH. Research on rapid mass spectrometry method and its application in food safety analysis [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2019.
- [46] Zhen DS, Jiang N, Geng HC, *et al.* Cobalt-doped nanoporous carbon as SALDI-TOF-MS adsorbent and matrix for quantification of cetyltrimethylammonium bromide, rhodamine B and malachite green at sub-ppt levels [J]. *Microchim Acta*, 2019, 186: 691.
- [47] Chao YY, Chen YL, Chen WC, *et al.* Rapid detection of illegal colorants on traditional Chinese pastries through mass spectrometry with an interchangeable thermal desorption electrospray ionization source [J]. *Food Chem*, 2018, 252: 189–197.
- [48] Wen RZ, Zeng D, Yang ZH. Rapid Analysis of illegal cationic dyes in foods and surface waters using high temperature direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(28): 7542–7549.
- [49] Ji RD, Zhao ZM, Yu XL, *et al.* Determination of rhodamine B in capsicol using the first derivative absorption spectrum [J]. *Optik*, 2019, 181: 796–801.
- [50] Sun J, Gan T, Li Y, *et al.* Rapid and sensitive strategy for rhodamine B detection using a novel electrochemical platform based on core-shell structured Cu@carbon sphere nanohybrid [J]. *J Electroanal Chem*, 2014, 724: 87–94.
- [51] Zhu XL, Wu GL, Wang CZ, *et al.* A miniature and low-cost electrochemical system for sensitive determination of rhodamine B [J]. *Measurement*, 2018, 120: 206–212.
- [52] Zhu GB, Wu XY, Sun H, *et al.* Sensitive electrochemical determination of rhodamine B based on cyclodextrin-functionalized nanogold/hollow carbon nanospheres [J]. *Anal methods*, 2015, 7(12): 4965–4970.
- [53] Yu LL, Mao YX, Qu LB. Simple voltammetric determination of rhodamine b by using the glassy carbon electrode in fruit juice and preserved fruit [J]. *Food Anal Methods*, 2013, 6(6): 1665–1670.
- [54] Sun JY, Gan T, Yang C, *et al.* Novel electroanalytical platform based on bimetallic oxide nanospheres for the sensitive determination of rhodamine B [J]. *Can J Chem*, 2014, 92(7): 640–646.
- [55] Zhang J, Zhang L, Wang WC. Sensitive electrochemical determination of rhodamine b based on a silica-pillared zirconium phosphate/nafion composite modified glassy carbon electrode [J]. *J AOAC Int*, 2016, 99(3): 760–765.
- [56] Sun D, Yang XF. Rapid determination of toxic rhodamine b in food samples using exfoliated graphene-modified electrode [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 10(6): 2046–2052.
- [57] Wang MJ, Nie XL, Tian L, *et al.* Rapid and sensitive voltammetric detection of rhodamine b in chili-containing foodstuffs using MnO₂ nanorods/electro-reduced graphene oxide composite [J]. *J Electrochem Soc*, 2019, 166(10): B805–B813.
- [58] 周丽岩. 食品中罗丹明 B 免疫快速检测技术的研究及应用[D]. 保定: 河北大学, 2015.
Zhou LY. Research and application of detection of rhodamine b in foods by rapid immunoassay [D]. Baoding: Hebei University, 2015.
- [59] 徐声乐. 罗丹明 B 单克隆抗体的制备及免疫学检测方法的初步建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
Xu SL. Preparation and established primary immunoassay of monoclonal antibodies against rhodamine B [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
- [60] Wang H, Guo XY, Fu SY, *et al.* Optimized core-shell Au@Ag nanoparticles for label-free Raman determination of trace Rhodamine B with cancer risk in food product [J]. *Food Chem*, 2015, 188: 137–142.
- [61] Lupa D, Oćwieja M, Piergies N, *et al.* Gold nanoparticles deposited on silica microparticles-Electrokinetic characteristics and application in SERS [J]. *Colloid Inter Sci Commun*, 2019, 33: 100219.
- [62] 马超, 武佳炜, 朱琳, 等. G-C₃N₄/Ag 纳米复合材料表面增强拉曼基底对婴幼儿糖果中的罗丹明 B 的痕量检测[J]. 化学学报, 2019, 77(10): 1024–1030.
Ma C, Wu JW, Zhu L, *et al.* Trace Detection of Rhodamine B in Infant Candy by g-C₃N₄/Ag nanocomposite as surface-enhanced raman scattering substrate [J]. *Acta Chim Sin*, 2019, 77(10): 1024–1030.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



段馨辉, 硕士研究生, 主要研究方向为食品分析检测与标准物质研制。
E-mail: 13121100128@163.com



马 康, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: makang@nim.ac.cn