DOI:10.13526/j.issn.1006-6144.2014.04.024

液相色谱-串联质谱法测定浓缩樱桃李汁中罗丹明 B 和苏丹红染料

粟有志[1],李 芳[1],李艳美[1],雷红琴[1],刘 俊[*2]
(1.伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心,新疆伊宁 835000;
2.新疆出入境检验检疫局技术中心,新疆乌鲁木齐 830063)

摘 要:建立了液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法同时检测浓缩樱桃李汁中罗丹明 B 和苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 5 种染料的分析方法。样品经水稀释、乙腈提取,凝胶渗透色谱(GPC)净化,采用 Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱进行分离。在电喷雾正离子模式下(ESI^+),用多重反应监测(MRM)方式进行离子监测,基质匹配外标法定量。5 种染料在各自线性范围内,相关系数(r^2)均大于 0.998,检出限(信噪比 = 3)为 0.2 ~ 3.0 μg/kg,定量限(信噪比 = 10)为 0.5 ~ 10.0 μg/kg,回收率在 74.4% ~ 95.3% 之间,相对标准偏差为 3.6% ~ 7.9%。

关键词:凝胶渗透色谱;罗丹明 B;苏丹红;液相色谱-串联质谱
中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1006-6144(2014)04-545-04

樱桃李(*Prunus cerasifera* Ehrh)是我国珍稀濒危生物资源之一,为世界罕见的原始野生林果,在国内仅新疆霍城县有少量分布[1]。浓缩樱桃李汁是成熟的果实经过打浆、浓缩、除菌等工艺加工而成,含有丰富的花青苷类物质、氨基酸及矿物质成分,呈现自然红[2]。苏丹红染料和罗丹明 B 显红色,广泛运用于工业生产,是卫生部关于"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)"中的违禁染料。苏丹红染料的检测主要采用高效液相色谱法[3]、液相色谱-质谱法[4]、气相色谱-质谱法[5]、酶联免疫吸附法[6]、薄层色谱法[7]等;罗丹明 B 的检测主要采用高效液相色谱法[8]、液相色谱法-质谱法[9]。

本研究旨在建立浓缩樱桃李汁中苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和罗丹明 B 5 种染料的检测方法。该法以乙腈为提取剂,样品经凝胶渗透色谱(GPC)净化,液相色谱-串联质谱仪(MPLC-MS/MS)法同时分析浓缩樱桃李汁中苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和罗丹明 B。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

1260-6460A 高效液相色谱-串联质谱仪(美国,Agilent 公司);J2 Scientific Preplinc AS4 凝胶色谱净化系统(美国,J2 Scientific 公司);MiIli-Q Advangtage A10 超纯水系统(美国,Millipore 公司)。

罗丹明 B 和苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ标准品(纯度均大于 99%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);乙腈、乙酸乙酯、环已烷(色谱纯,德国 MERCK 公司),实验用水均为经 Milli-Q 超纯水器纯化超纯水。

浓缩樱桃李汁为实验室送检样品。

1.2 基质匹配标准曲线的配制

称取标准品 10 mg(精确至 0.01 mg)于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,配成质量浓度为 1 000

收稿日期:2013-09-13 修回日期:2013-10-15
基金项目:国家质检总局科研制标项目(2013IK187)
* 通讯作者:刘 俊,男,硕士,工程师,研究方向:食品安全检测技术.

mg/L 的标准储备液,储存于 4 ℃ 冰箱中备用,使用时用乙腈 -水(1∶1) 溶液配制成苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、罗丹明 B 质量浓度分别为 100、100、200、200、10 ng/mL 的混合标准溶液,将混合标准溶液稀释 1、2、5、10、20、50 倍,得系列混合标准溶液,待用。称取 2 g(精确到 0.01 g) 空白基质样品 6 份,按照 1.3 节处理样品,最后用稀释倍数为 1、2、5、10、20、50 的上述系列混合标准溶液各 1 mL 溶解残渣,配制基质匹配标准溶液。

1.3　样品前处理

称取样品 2 g(精确到 0.01 g) 于 50 mL 具塞离心管中,加入 1 g 氯化钠、10 mL 水、20 mL 乙腈,涡旋混匀 30 s,振荡 10 min,静置 5 min 分层,收集上层有机相于梨形瓶中,剩余水相再加入 20 mL 乙腈提取,合并有机相,40 ℃ 条件下旋转至干,加入 10 mL 乙酸乙酯 -环己烷(1∶1) 溶解残渣,转移溶解液于凝胶色谱进样管内,采用 GPC 进行净化。GPC 净化条件:聚苯乙烯凝胶(Biobeads S-X3 填料,100 g,400×25 mm);洗脱液为乙酸乙酯 -环己烷(1∶1);流速为 5.0 mL/min; 检测波长为 254 nm;进样体积为 5.0 mL;收集时间 22 ~ 30 min。收集液于 40 ℃ 下旋转蒸发至近干,用 1.0 mL 乙腈 -水(1∶1) 溶液溶解残渣,过 0.22 μm 尼龙膜,滤液待测。

1.4　色谱质谱条件

色谱条件　色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱(100×3.0 mm,1.8 μm);柱温:40 ℃;进样量:5 μL;流速:0.4 mL/min;流动相:A 相为 0.1% 甲酸溶液,B 相为乙腈,梯度洗脱程序如下: 0 ~ 1.0 min,50%B,1.0 ~ 4.0 min,50% ~ 95%B,4 ~ 14.0 min,95%B,14.0 ~ 15.0 min,95% ~ 50%B,15.0 ~ 20.0 min,50%B。

质谱条件:电离模式:电喷雾正离子源模式(ESI^+);多重反应监测(MRM);干燥气温度:350 ℃;干燥气流量:9.0 L/min;毛细管电压:4 kV;鞘气温度:250 ℃;鞘气流速:11.0 L/min。

苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 和罗丹明 B 质谱采集参数见表 1。

表 1　罗丹明 B 和苏丹红 Ⅰ ~ Ⅳ 监测离子对质谱参数

Table 1　Mass spectrometric conditions of the pair ion for Rhodamine B and Sudan Ⅰ-Ⅳ

Compund	t_R(min)	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Fragmentation voltage(V)	Collison energy(eV)
Rhodamine B	2.84	443.1	399.2*, 355.1	150	48、48
Sudan Ⅰ	6.43	249.0	156.0*, 232.1	110	12、8
Sudan Ⅱ	7.81	277.0	121.1*, 156.1	90	20、12
Sudan Ⅲ	8.84	355.0	77.1*, 197.1	130	32、25
Sudan Ⅳ	11.51	381.0	91.1*, 224.1	150	32、20

* quantitative ion.

2　结果与讨论

2.1　色谱条件的优化

试验了以水 -乙腈、0.1% 甲酸水 -甲醇、0.1% 甲酸水 -乙腈、水 -甲醇时为流动相时,5 种染料的分离效果。结果显示:在流动相为 0.1% 甲酸水 -乙腈时,苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 的响应信号、峰形明显优于其他流动相。进一步考察水相中分别添加 0.2%、0.1%、0.05% 三个浓度的甲酸对分析的影响,结果发现:苏丹红 Ⅲ 和苏丹红 Ⅳ 在水相为 0.1% 甲酸时,离子信号最强,苏丹红 Ⅰ 和苏丹红 Ⅱ 在水相为 0.2% 甲酸时,离子信号最强,考虑到苏丹红 Ⅰ、Ⅱ 灵敏度总体比苏丹红 Ⅲ、Ⅳ 高 2 ~ 5 倍,故选择最终选择水相中含 0.1% 甲酸。研究还分析了在 0.1% 甲酸中添加 10 mmoL 乙酸铵对化合物响应的影响,结果发现:乙酸铵的加入使苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 的离子信号减弱,可能是乙酸铵的加入增强流动相中盐浓度,盐浓度过高反而抑制化合物的离子化,导致离子信号减弱。故本文最终选择 0.1% 甲酸水 -乙腈为流动相,进行梯度洗脱。

2.2　提取剂的选择

选择正己烷和乙酸乙酯 -环己烷(1∶1) 作为提取剂,在样品加水稀释和不稀释状态下,罗丹明 B 和苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 的回收率均偏低。以甲醇作为提取剂,样品完全溶解于甲醇,加入氯化钠盐析后,水相与甲醇相不分层,提取液浓缩后糖分含量过高,继而无法进行 GPC 净化。以乙腈为提取剂,样品不加水稀释

时，5 种染料的回收率偏低；而样品在加水稀释，氯化钠盐析后，均能满足检测的要求。不同提取剂对实验回收率的影响见图 1。

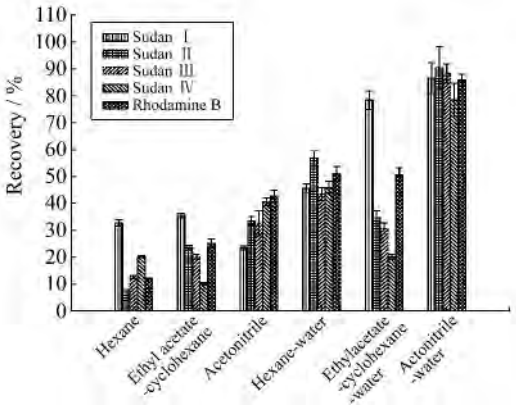

图 1　加标浓度均为 50 μg/kg 时不同提取剂的提取效果

Fig. 1　Comparison of extraction efficiencies of different solvents at the spiked level of 50 μg/kg

2.3　凝胶渗透色谱条件的选择

检测波长为 254 nm，流速为 5.0 mL/min 时，取 10 mg/L 的苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 和罗丹明 B 混合标准溶液 5 mL 上样。实验表明，混合标准溶液在 24 ～ 28 min 出现吸收峰。未经 GPC 净化时，样品基质干扰较大，10 ng/mL 的苏丹红 Ⅲ、Ⅳ 无响应信号；经 GPC 净化基质后苏丹红 Ⅲ、Ⅳ 离子响应信号明显低于乙腈-水溶液中的响应信号，故经 GPC 净化后样品基质仍然对苏丹红 Ⅲ、Ⅳ 有一定的抑制效应。

2.4　线性关系、检出限、定量限

实验采用基质匹配标准曲线定量消除基质效应。空白样品按 1.3 节前处理，苏丹红 Ⅰ、Ⅱ 配制浓度为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的基质标准溶液，苏丹红 Ⅲ、Ⅳ 配制浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的基质标准溶液，罗丹明 B 配制浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10 ng/mL 的基质标准溶液。以峰面积对质量浓度作线性回归，绘制标准曲线。5 种染料的线性回归方程、检出限(S/N = 3)、定量限(S/N = 10) 见表 2。

表 2　5 种染料的基质添加标准曲线、相关系数(r^2)、检出限(LOD) 和定量限(LOQ)($n = 6$)

Table 2　Linear equations, correlation coefficients(r^2), limits of detection(LOD) and limits of quantification(LOQ) for five dyes in matrix($n = 6$)

Inedible pigments	Linear equation	Linear range (ng/mL)	r^2	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
Sudan Ⅰ	$y = 14.4x + 41.8$	2 ～ 100	0.999	1.5	5.0
Sudan Ⅱ	$y = 49.9x + 39.8$	2 ～ 100	0.999	0.8	2.5
Sudan Ⅲ	$y = 7.8x + 56.4$	5 ～ 200	0.998	2.4	8.0
Sudan Ⅳ	$y = 4.6x + 11.5$	5 ～ 200	0.998	3.0	10.0
Rhodamine B	$y = 3757.4x + 2632.6$	0.2 ～ 10	0.999	0.2	0.5

2.5　回收率和精密度

在 2.0 g 空白样品中添加适量罗丹明 B 和苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 混合标准液，每个添加水平行 6 次测定，精密度和回收率实验结果见表 3。

表 3　不同添加水平下 5 种工业染料的加标回收率和精密度($n = 6$)

Table 3　Recoveries and precisions of five idustrial dyes spiked in different levels($n = 6$)

Inedible pigments	Spiked (μg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	Inedible pigments	Spiked (μg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Sudan Ⅰ	5	85.5	4.6	Sudan Ⅳ	10	80.3	5.9
	25	90.6	5.8		50	85.4	6.3
	50	87.8	6.3		100	90.6	4.8
Sudan Ⅱ	5	93.5	4.7	Rhodamine B	0.5	74.4	5.6
	20	92.4	7.9		2.5	90.6	3.6
	50	95.3	6.6		5	90.7	7.6
Sudan Ⅲ	10	80.8	4.8				
	50	85.6	5.4				
	100	90.5	4.7				

2.6　实际样品测定

采用本方法对实验室送检的 30 份浓缩樱桃李汁进行分析。均未检测出苏丹红 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 和罗丹明 B。

3　结论

本文建立了浓缩樱桃李汁中苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和罗丹明 B 的液相色谱 -串联质谱仪分析方法。样品经乙腈提取,凝胶渗透色谱(GPC)净化后,有效地降低了基体干扰,提高了分析灵敏度。该方法的定量限、回收率和精密度均满足痕量分析的要求,适用于分析浓缩樱桃李汁中罗丹明 B 和苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ残留。

参考文献:

[1] LAN Shi-bo(兰士波). Forest By-Product and Speciality in China(中国林副特产)[J],2008,**96**(5):89.

[2] ZHANG Shi-kang(张士康),XIAO Zheng-chun(肖正春),ZHANG Guang-lun(张广伦),ZHANG Wei-ming(张卫明). Chinese Wild Plant Resources(中国野生植物资源)[J],2004,**23**(3):1.

[3] YUAN Yi-qin(袁奕沁),ZHU Zhi-jia(朱智甲),REN Yi-zhen(任一臻),ZHANG Wei(张　薇). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],2012,**28**(1):110.

[4] CHEN Jing(陈　静),LIU Zhao-jin(刘召金),AN Bao-chao(安宝超),XU Qun(许　群),ZHANG Xiang-min(张祥民). Chinese Journal of Analyticl Chemistry(分析化学)[J],2013,**41**(9):1418.

[5] WU Hui-qin(吴惠勤),HUANG Xiao-lan(黄晓兰),HUANG Fang(黄　芳),LIN Xiao-shan(林晓珊),DENG Xin(邓　欣),CAI Da-chuan(蔡大川). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)[J],2005,**24**(3):1.

[6] HAN Dan(韩　丹),YU Meng(于　梦),WU Mei(吴　梅),DENG An-ping(邓安平). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)[J],2007,**35**(8):1168.

[7] PANG Yan-li(庞艳玲),WANG Huai-you(王怀友). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析试验室)[J],2008,**27**(1):60.

[8] CAO Peng(曹　鹏)QIAO Xu-guang(乔旭光). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],2010,**26**(5):617.

[9] SN/T 2430-2010. Determination of Rhodamine B in Foods for Import and Export(进出口食品罗丹明 B 的检测方法)[S].

Determination of Rhodamine B and Sudan Dyes in Myrobalan Plum Juice Concentrate by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Mass Spectrometry

SU You-zhi[1], LI Fang[1], LI Yan-mei[1], LEI Hong-qin[1], LIU Jun*[2]

(1. *Comprehensive Technical Service Centre of Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Yining* 835000;

2. *Technical Center of Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Urumqi* 830063)

Abstract: A new method was developed for the simultaneous determination of Rhodamine B and Sudan Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ in Myrobalan Plum juice concentrate using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The sample was diluted by water and extracted with acetonitrile, then cleaned up by gel permeation chromatography. The analytes were separated on a Zorbax Eclipse Plus C_{18} column(100×3.0 mm, 1.8 μm). Electrospray positive ion source, multiple reaction monitoring mode, black matrix external standard method were used to analyse samples. The good correlation coefficients($r^2 > 0.998$) of five dyes were obtained within their respective linear ranges. The limits of detection were in the range of 0.2-3.0 μg/kg(S/N = 3), and the limits of quantification were in the range of 0.5-10.0 μg/kg(S/N = 10). The recoveries were in the range of 74.4%-95.3% with the relative standard deviations varying from 3.6%-7.9%.

Keywords: Gel permeation chromatography; Rhodamine B; Sudan; High performance liquid chromatography-tandem mass spectromery