

【化学测定方法】

高效液相色谱测定食品中的罗丹明 B

孙磊龙 杨志华

(广东省揭阳市疾病预防控制中心 广东揭阳 522031)

[摘要] 目的: 建立食品中罗丹明 B 的高效液相色谱测定方法。方法: 样品经提取、净化、浓缩, 然后进高效液相色谱 (HPLC) 经 C_{18} 分离, 紫外/可见光 (UV/VIS) 检测器检测。结果: 方法在 0.1 mg/L ~ 10 mg/L 范围内线性良好, 相关系数 (r) 为 0.9994 以上, 方法加标回收率为 96.1% ~ 100.4%, 相对标准偏差 $RSD(\%)$ 在 1.8% ~ 3.9%。结论: 该方法操作简单, 灵敏度高, 干扰少, 选择性好, 精密度良好, 准确度可靠。

[关键词] 高效液相色谱法; 罗丹明 B; 测定

[中图分类号] O657.7⁺²

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)07-1648-02

HPLC determination of Rhodamine B in foods

SUN Lei-long, YANG Zhi-hua

(Jieyang Center for Disease Control and Prevention, Jieyang 522031, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of Rhodamine B in food by HPLC method. **Methods:** Samples were extracted, purified, concentrated, and then went into the high performance liquid chromatography (HPLC), separated by C_{18} and detected by UV/visible (UV/VIS) detector. **Results:** There is a good linearity in the range of 0.1 mg/L ~ 10 mg/L, correlation coefficient (r) is 0.9994 or more, the method recovery is 96.1% ~ 100.4%, relative standard deviation $RSD(\%)$ is 1.8% ~ 3.9%. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, less interference, accuracy and reliable with good selectivity and good precision.

[Key words] High performance liquid chromatography; Rhodamine B; Determination

罗丹明 B 又名罗丹明 610、玫瑰红 B、蕊香红 B、若丹明 B、玫瑰精 B 等, 英文名: Rhodamine B, 是一种红色的人工合成染料, 分子式: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, 分子量: 479.0175, 绿色结晶或红紫色粉末, 易溶于水、乙醇, 微溶于丙酮、氯仿、盐酸和氢氧化钠溶液。用于实验室中细胞荧光染色剂, 工业染料, 由于具有潜在的致癌性, 被国家列为第一批“食品中可能违法添加的非食用物质名单”之一, 但目前国家尚未有标准检验方法。现有检验方法有高效液相色谱荧光检测法^[1]、高效液相色谱-质谱/质谱法^[2], 由于质谱仪比较昂贵, 荧光检测器也未能全面普及, 本文报道了高效液相色谱-紫外/可见光 (UV/VIS) 检测器检测法。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器

戴安 U-3000 型高效液相色谱仪 (配有四元梯度泵、紫外/可见光检测器)、超声波振荡器、固相萃取装置、离心机、氮吹仪、振荡器。

1.2 试剂

甲醇 (MERCK 色谱纯)、罗丹明 B (AR, 天津光复精细化工研究所)、正己烷 (AR)

1.3 色谱条件

Acclaim 120 C_{18} 柱 (5 μm 4.6 mm \times 250 mm); 进样量: 20 μl ; 流动相: 甲醇 + 水 (75 + 25), 流速 1.0 ml/min; 检测波长: 550 nm。

1.4 标准曲线

标准物 (罗丹明 B) 用 75% 甲醇配制成 1 mg/ml, 再用 75% 甲醇稀释成 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 标准系列。

1.5 样品前处理

1.5.1 提取

1.5.1.1 辣椒粉, 调味品, 水制辣椒酱: 5 g 样品, 加 5 ml 甲醇, 振荡器振荡 2 min, 超声 10 min, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

1.5.1.2 油制辣椒酱, 肉类: 5 g 样品, 加 5 ml 甲醇, 振荡器振荡 2 min, 超声 10 min, 加正己烷 5 ml, 振荡器振荡 2 min, 4000 r/min 离心 10 min, 取醇层备用。

1.5.2 净化 Sep-pak C_{18} 小柱用 3 ml 甲醇活化, 5 ml 水平衡, 吸提取液 2.5 ml 加 2.5 ml 水注入固相萃取小柱, 控制流速 5 ml/min ~ 8 ml/min, 依次用 5 ml 水、5 ml 50% 甲醇淋洗。再用 75% 甲醇洗脱, 收集洗脱液。

1.5.3 浓缩 洗脱液置 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 氮吹仪吹干, 用 1.0 ml 75% 甲醇溶解残渣, 过 0.45 μm 滤膜, 供液相色谱测定。

[作者简介] 孙磊龙 (1976-), 男, 本科, 主管理化检验师, 主要从事理化检验工作。

2 结果与讨论

2.1 波长选择

罗丹明 B 的 75% 甲醇溶液于紫外/可见分光光度计扫描, 测得该溶液在 550 nm 有最大吸收, 选择 550 nm 作为测定波长, 既可以保证有最高灵敏度, 也可以排除许多无颜色有机物的干扰。

2.2 流动相选择

选择液相色谱最为普通的甲醇、水作为流动相, 既避免了接触毒性较大乙腈, 又减少其它溶液配制步骤, 但流动相中甲醇比例太低时, 罗丹明 B 很难洗脱出来, 100% 甲醇又比较快就洗脱出来, 选择 75% 甲醇作为该方法的流动性, 既可以保证罗丹明 B 在适当时间(保留时间 8.6 min) 内洗脱出来, 又可以与大部分干扰物质分离。

2.3 方法线性范围与检出限

标准系列各进样 20 μl, 得到其色谱图(见图 3), 以标准液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线; 其线性回归方程为 $Y = 0.3282 + 5.2339X$, 相关系数为 0.9994。该方法在 0.1 μg/ml ~ 10 μg/ml 的线性良好, 检出限 0.02 μg/ml, 定量下限 0.05 μg/ml。

样品进样 20 μl, 得到其色谱图(见图 1, 2), 其峰面积在标准曲线上查得其所对应的含量, 或者将其峰面积代入线性回归方程得到其所对应的含量。按上述步骤操作, 样品检测限低至 0.008 mg/kg。

2.4 方法回收率与精密度

在样品中加入高、中、低三个不同量的标准, 使每一浓度分别进行 6 次重复测定, 回收率, 精密度见表 1。

表 1 方法回收率和精密度结果

名称	加标量(μg/ml)	实测值(μg/ml)	回收率(%)	RSD(%)
水制辣椒酱	0.1	0.0967	96.7	3.9
	1.0	0.975	97.5	2.6
	10.0	10.042	100.4	2.1
油制辣椒酱	0.1	0.0961	96.1	3.7
	1.0	0.983	98.3	2.0
	10.0	9.829	98.3	1.8

该方法回收率在 96.1% ~ 100.4%, 相对标准偏差 RSD(%) 在 1.8% ~ 3.9%, 说明方法的精密度和准确度良好。

2.5 方法干扰试验

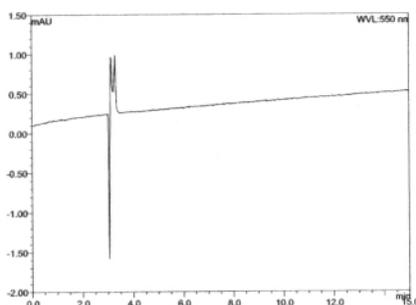


图 1 罗丹明 B 阴性样品色谱图

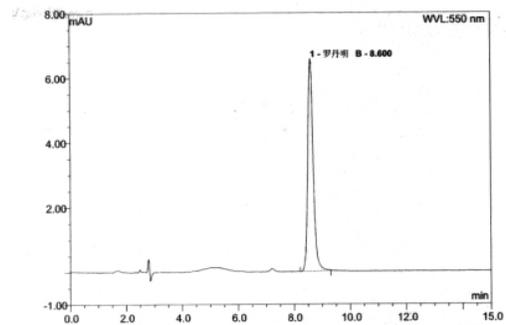


图 2 罗丹明 B 阳性样品色谱图

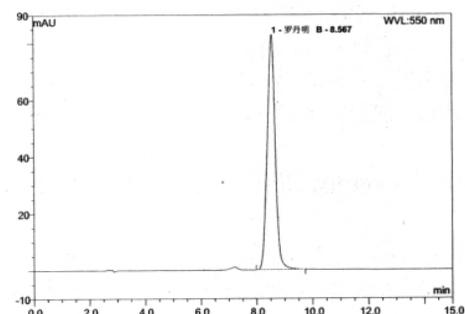


图 3 罗丹明 B 标准色谱图

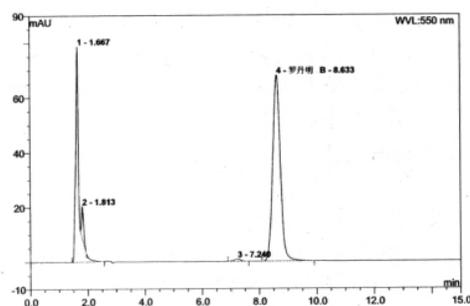


图 4 干扰试验色谱图

图 1 图 2 分别是罗丹明 B 阴性、阳性样品, 由于选择的波长为 550 nm, 落在可见光区, 食品中许多无颜色的有机物在该波长下均未吸收或吸收很小, 可以忽略不计, 所以基线很平滑, 干扰物质很少; 图 3 是罗丹明 B 标准物色谱图; 图 4 是含有罗丹明 B、胭脂红、苋菜红、诱惑红、赤鲜红、苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 各 5 μg/ml 溶液的色谱图, 由图 3、图 4 可以看出在该色谱条件下常见的水溶性红色色素胭脂红、苋菜红、诱惑红、赤鲜红和常见的脂溶性红色色素苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 均未对罗丹明 B 检测造成干扰。

3 结论

本方法填补了国家标准空白, 由于高效液相色谱-紫外/可见光检测器比较普及, 适合于基层单位罗丹明 B 检验, 为打击“食品中可能违法添加的非食用物质”提供有力依据。

本方法操作简单, 由于选择波长为 550 nm, 在可见光波段, 干扰少, 选择性好, 灵敏度高, 准确度和精密度都很好。

[参考文献]

[1] 邵仕萍, 奚星林. 食品中花粉红染料的测定[J]. 中国卫生检验杂志 2010 20(1): 84-85.
 [2] SNT 2430-2010. 进出口食品中罗丹明 B 的检测方法[S].

(收稿日期: 2011-05-12)