

食品中罗丹明 B 的测定

BJS 201905

1 范围

本方法规定了食品中罗丹明 B 的液相色谱测定方法及液相色谱-质谱/质谱确证方法。

本方法适用于半固态调味料、花椒及花椒粉、花椒油、牛肉干、蜜饯、水果干制品中罗丹明 B 的测定和确证。

2 原理

试样中罗丹明 B 用含酸的甲醇水溶液提取后，经混合型阳离子固相萃取小柱净化，采用液相色谱荧光检测器检测，外标法定量。试样中检出罗丹明 B 后采用液相色谱质谱/质谱法进行确证。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 3.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。
- 3.2 乙腈 (C₂H₃N)：色谱纯。
- 3.3 甲酸 (CH₂O₂)：色谱纯。
- 3.4 氨水 (NH₃·H₂O)：色谱纯。
- 3.5 含 0.1% 甲酸的水溶液：取甲酸 (3.3) 1 mL 用水稀释至 1000 mL，用滤膜 (0.22 μm，水相) 过滤后备用。
- 3.6 50% 甲醇水溶液：准确量取 500 mL 甲醇 (3.1) 于 1 L 容量瓶中，用水定容至刻度。
- 3.7 含 0.1% 甲酸的甲醇水溶液：取 1 mL 甲酸 (3.3)，用甲醇水溶液 (3.6) 稀释至 1000 mL。
- 3.8 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液：取 1 mL 甲酸 (3.3)，用乙腈 (3.2) 稀释至 1000 mL，滤膜 (0.22 μm，有机相) 过滤后备用。
- 3.9 含 0.1% 甲酸的乙腈水溶液：取 0.1 mL 甲酸 (3.3) 和 35 mL 乙腈 (3.2)，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 3.10 含 5% 氨水的甲醇溶液：取 5 mL 氨水 (3.4)，用甲醇稀释至 100 mL，混匀。(临用现配)
- 3.11 罗丹明 B 标准品：

罗丹明 B 标准品的分子式、相对分子量、英文名称、CAS 登录号见表 1，纯度 ≥ 99%。

表 1 罗丹明 B 标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

| 中文名称 | 英文名称 | CAS 登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
|------|------|---------|-----|-------|
|------|------|---------|-----|-------|

| | | | | |
|-------|-------------|---------|------------------------|--------|
| 罗丹明 B | Rhodamine B | 81-88-9 | $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ | 479.01 |
|-------|-------------|---------|------------------------|--------|

3.12 罗丹明 B 标准储备液：准确称取罗丹明 B 标准品 10 mg（精确至 0.0001 g），置于 100 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。

溶液转移至试剂瓶中，置于 -18°C 避光保存，有效期为 6 个月。

3.13 中间标准溶液：准确移取 0.5 mL 罗丹明 B 标准储备液（3.12）于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀，此溶液的浓度为 500 ng/mL 。置于 4°C 避光保存，有效期为 1 个月。

3.14 标准工作溶液：用含 0.1% 甲酸的乙腈水溶液（3.9）将中间标准溶液（3.13）稀释成 0.0 ng/mL 、0.5 ng/mL 、1.0 ng/mL 、2.0 ng/mL 、5.0 ng/mL 、10.0 ng/mL 、20.0 ng/mL 、50.0 ng/mL 的标准工作溶液。临用现配。

3.15 混合型阳离子固相萃取柱（60 mg/3mL）：基质为苯磺酸化的聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物，或相当者。使用前依次用 3 mL 甲醇，3 mL 水活化。

3.16 陶瓷均质子。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱仪：配荧光检测器。

4.2 液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI 源）。

4.3 旋涡混合器。

4.4 离心机：转速 ≥ 8000 r/min。

4.5 电子天平：感量分别为 0.0001 g 和 0.01 g。

4.6 具塞离心管：50 mL。

4.7 组织捣碎机。

4.8 固相萃取装置。

5 试样制备与保存

5.1 半固态调味料

取适量样品，捣碎，混匀，常温保存备用。

5.2 花椒及花椒粉

取适量样品，粉碎后过 40 目筛，常温保存备用。

5.3 花椒油

充分混匀，常温保存备用。

5.4 牛肉干

取适量样品，捣碎，混合均匀，冷藏保存备用。

5.5 蜜饯、水果干制品

取适量样品，捣碎，混合均匀，冷藏保存备用。

6 测定步骤

6.1 试样前处理

6.1.1 提取：准确称取 2 g（香辛料样品称取 1 g，精确至 0.01 g）试样置于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 10.0 mL 含 0.1% 甲酸的甲醇水溶液（3.7），混匀，加入陶瓷均质子两颗（调味油试样除外），于旋涡混匀器上涡旋 15 min，于 8000 r/min 离心 10 min，取 3 mL 提取液层溶液过 0.45 μm 有机相滤膜后待净化。

6.1.2 净化：准确移取 1.0 mL 提取液（6.1.1）至固相萃取柱（3.15）中，依次用 3 mL 0.1% 甲酸水溶液（3.5）、3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗固相萃取柱。用 6 mL 氨水甲醇溶液（3.10）洗脱目标物，并收集洗脱液，洗脱溶液在 45℃ 下，用氮气吹至近干，残渣用 1.0 mL 0.1% 含酸的乙腈水溶液（3.9）溶解（香辛料样液残渣用 0.5 mL 溶解），过 0.22 μm 有机相滤膜上机测定。

6.2 仪器参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，4.6 mm×100mm，粒径 3.5 μm，或性能相当者。
- b) 流动相：A 为 0.1% 甲酸水溶液（3.5），B 为乙腈（3.2），梯度洗脱程序见表 2。
- c) 流速：1.0 mL/min。
- d) 柱温：35℃。
- e) 进样量：10 μL。
- f) 激发波长：550 nm；发射波长：580 nm。

表 2 梯度洗脱程序

| 时间(min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|---------|-----------|-----------|
| Initial | 65 | 35 |
| 0.1 | 65 | 35 |
| 6.0 | 30 | 70 |
| 6.5 | 30 | 70 |
| 8.0 | 65 | 35 |
| 10.0 | 65 | 35 |

6.3 空白试验

除不加试样外，均按试样同法操作。

7 结果计算

试样中罗丹明 B 的含量按式（1）计算获得：

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \times f \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X — 试样中罗丹明B的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c — 试样中罗丹明B峰面积对应的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V — 试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m — 称样量，单位为克（g）；

f — 稀释因子。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

9 其他

当称样量为 2 g（香辛料样品称取 1 g）时，本方法中罗丹明 B 的检出限为 0.0025 mg/kg，定量限为 0.005 mg/kg；液相色谱质谱确证法的检出限为 0.0025 mg/kg，定量限为 0.005 mg/kg。

10 确证实验

当试样中检出罗丹明 B 时，可按附录 B 方法进行确证。

附录 A

罗丹明 B 液相色谱图

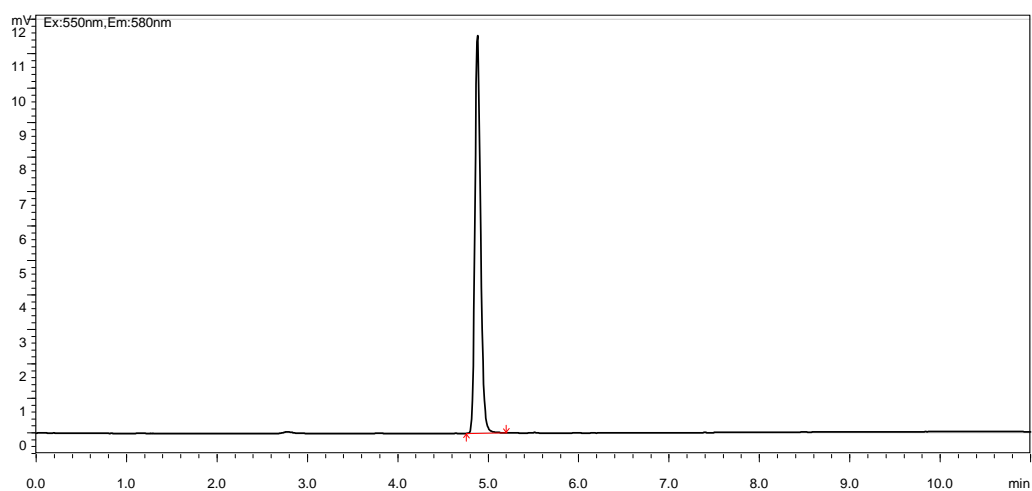


图 A.1 罗丹明 B 标准溶液色谱图 (浓度: 5 ng/mL)

附录 B

罗丹明 B 确证实验

B.1. 液相色谱-质谱/质谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱, 100×3.0 mm, 粒径 1.7 μm, 或性能相当者。
- b) 流动相: A 为含 0.1% 甲酸的水溶液 (3.8), B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (3.9)。梯度洗脱程序见表 B.1。
- c) 流速: 0.4 mL/min。
- d) 柱温: 40°C。
- e) 进样量: 1 μL。
- h) 质谱参考条件参见 B.2

表 B.1 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|----------|-----------|-----------|
| 0.00 | 80 | 20 |
| 1.5 | 80 | 20 |
| 2.5 | 5 | 95 |
| 3.5 | 5 | 95 |
| 4.5 | 80 | 20 |
| 5.5 | 80 | 20 |

B.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI 源)。
- b) 检测方式: 多反应监测 (MRM)。
- c) 扫描方式: 采用正离子模式扫描。
- d) 电喷雾电压: 5500 V。
- e) 离子源温度: 550°C。
- f) 雾化气压力: 60.0 psi。
- g) 辅助气压力: 50.0 psi
- h) 气帘气压力: 25.0 psi
- i) 定性离子对, 定量离子对, 去簇电压和碰撞能量见表 B.2。

表 B.2 罗丹明 B 质谱参数

| 分析物 | 离子对 m/z | 去簇电压 V | 碰撞能量 eV |
|-------|--------------|--------|---------|
| 罗丹明 B | 443.2/399.3* | 20 | 59 |
| | 443.2/355.1 | 20 | 81 |

*代表定量离子对。

注：附录 B 所列参考质谱条件仅供参考，当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

B.3.定性判定

按照 B.1 和 B.2 的条件测定试样和标准溶液。如果试样中质量色谱峰保留时间与标准溶液一致（变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内），试样中目标化合物的两个子离子的相对丰度与浓度和标准溶液的相对丰度和浓度一致，相对丰度偏差不超过表 B.3 规定的范围，则可判定试样中含有罗丹明 B。

表 B.3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

| | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|-----------|
| 相对离子丰度 (%) | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤ 10 |
| 允许的相对偏差 (%) | ± 20 | ± 25 | ± 30 | ± 50 |

罗丹明 B 的多反应监测 (MRM) 离子色谱图见图 B.1。

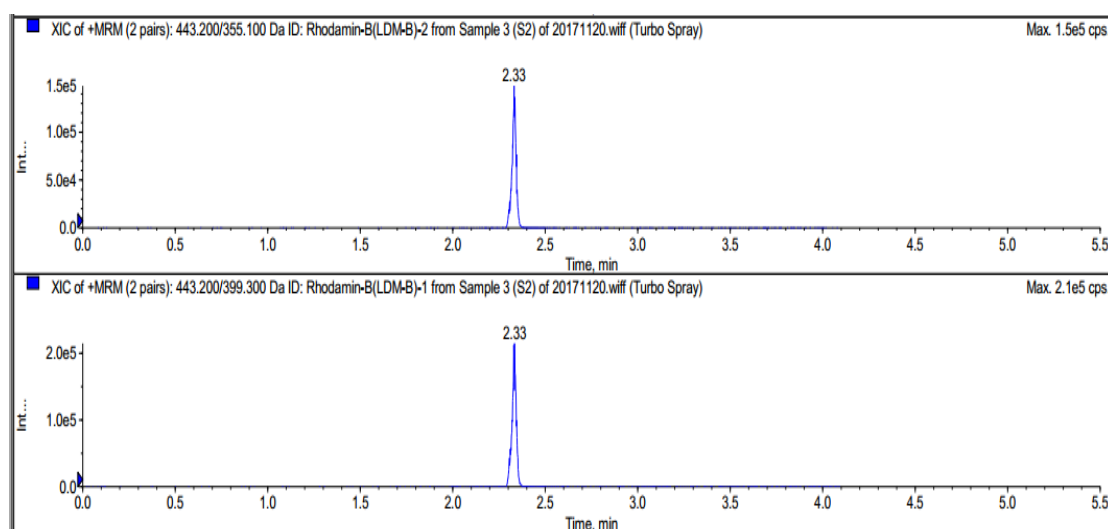


图 B.1 罗丹明 B 标准溶液多反应监测离子色谱图

本方法负责起草单位：成都市食品药品检验研究院。

验证单位：北京市疾病预防控制中心、山东省食品药品检验研究院、辽宁省食品检验检测院、山西省食品药品检验所、四川省食品药品检验检测院。

主要起草人：郭靓、李绍波、叶梅、肖全伟、乔秀明、林红