

辣椒制品中罗丹明 B 的基质固相分散提取条件优化

韦娜^{1,2}, 王煜³, 张孝芳¹, 冯叙桥², 齐小花¹, 邹明强^{*1}

(1. 中国检验检疫科学研究院 装备技术研究所, 北京 100123; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161;

3. 国家认可中心, 北京 100062)

摘要: 采用改进的基质固相分散提取技术提取辣椒制品中的罗丹明 B, 对提取工艺进行优化。选择分散剂种类、分散剂与样品质量比、洗脱剂组成及洗脱剂用量作为研究因素, 以提取液中罗丹明 B 的含量为考察指标, 运用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验优选出了辣椒面中提取罗丹明 B 的最优工艺条件: 分散剂硅胶, 分散剂与样品质量比例 1:1; 洗脱剂为质量分数 80% 乙腈水溶液, 洗脱剂用量 20 mL。辣椒油中提取罗丹明 B 最优工艺条件是: 分散剂中性氧化铝, 分散剂与样品质量比例 2:1; 洗脱剂为体积分数 80% 甲醇水溶液, 洗脱剂用量 20 mL。辣椒酱中提取罗丹明 B 最优工艺条件是: 分散剂中性氧化铝, 分散剂与样品质量比例 3:1; 洗脱剂为质量分数 80% 乙腈水溶液, 洗脱剂用量 5 mL。该提取方法萃取工艺简单, 操作时间短, 所需有机溶剂种类少, 属环境友好型萃取方式。

关键词: 罗丹明 B; 正交试验; 基质固相分散萃取

中图分类号: O 657.7 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)03—0275—07

Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction Conditions of Rhodamine B from Chili Products

WEI Na^{1,2}, WANG Yu³, ZHANG Xiaofang¹, FENG Xuqiao², QI Xiaohua¹, ZOU Mingqiang^{*1}

(1. Detection Technology and Equipment Research Institute, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 3. China Recognized Center, Beijing 100062, China)

Abstract: with the Rhodamine B content in extract as index, the optimum parameters, including dispersant type, the ratio of dispersing agent and sample, composition of the eluent and elute volume, of extracting Rhodamine B from chili were investigated by using orthogonal design $L_{16}(4^5)$. The optimum conditions for extracting Rhodamine B from chili powder are as follows: dispersant type is silica gel, the ratio of dispersing agent and sample is 1:1, composition of the eluent is 80% of acetonitrile, elute volume is 20 mL. The optimum conditions for extracting Rhodamine B from pepper oil are as follows: dispersant type is neutral aluminum oxide, the ratio of dispersing agent and sample is 2:1, composition of the eluent is 80% of methanol, elute volume is 20 mL. The optimum conditions for extracting Rhodamine B from chili paste are as follows: dispersant type is

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK25B01, 2012BAK08B06-1)。

* 通信作者: 邹明强(1964—), 男, 吉林长春人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品安全与质量控制研究。E-mail: mingqiangz@sina.com

neutral aluminum oxide, the ratio of dispersing agent and sample is 3:1, composition of the eluent is 80% of acetonitrile, elute volume is 5 mL. The extraction method is simple, convenient, less material consumption and less organic solvent.

Keywords: rhodamine B, orthogonal experiment, matrix solid-phase dispersion extraction

罗丹明 B (Rhodamine B), 又称四乙基罗丹明, 碱性玫瑰精, 玫瑰红 B, 俗称花粉红, 是一种具有鲜桃红色的人工合成的染料, 属于咕吨系列的衍生物^[1]。缩写为 RhB, 分子式为 $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, 相对分子质量为 479.017 5, 其结构式见图 1。罗丹明 B 易溶于水和乙醇等有机溶剂, 呈玫瑰红色溶液, 稀释后有强烈的荧光产生, 微溶于盐酸和氢氧化钠溶液。因其颜色鲜亮, 价格便宜, 许多不法商贩将其加入到辣椒面和辣椒油等辣椒制品中以达到颜色的效果。中国卫生部将罗丹明 B 列入《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, 禁止在食品中使用^[2]。

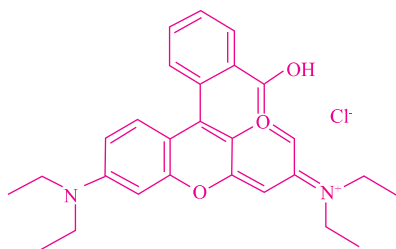


图 1 罗丹明 B 的结构

Fig. 1 Structure of rhodamine B

目前, 检测辣椒制品中罗丹明 B 的国家标准尚未出台, 而只有一些地方标准和行业标准^[3]。据文献报道, 检测罗丹明 B 所采用的样品前处理方式也多为液液萃取或固相萃取^[4-5], 所需的有机溶剂种类多、调配复杂, 实验所需耗材多、成本高。本实验中采用改进后的基质固相分散萃取技术, 针对具有代表性的 3 种辣椒制品即辣椒面、辣椒油和辣椒酱进行正交试验, 选用分散剂种类、分散剂与样品质量比、洗脱剂组成及洗脱剂用量作为优化因素^[6-9], 确定前处理过程中的最佳条件, 利用高效液相色谱法进行罗丹明 B 测定。

1 材料与方法

1.1 标准品与试剂

标准物质罗丹明 B, Sigma 公司产品, 纯度

99.5%; 乙腈, 国药北京化学试剂有限公司产品, 色谱纯; 甲醇, 国药北京化学试剂有限公司产品, 色谱纯; 甲酸, 国药北京化学试剂有限公司产品, 分析纯; C_{18} 填料, 国药北京化学试剂有限公司产品; 弗罗里硅土, 国药北京化学试剂有限公司产品; 中性氧化铝, 国药北京化学试剂有限公司产品; 硅胶, 国药北京化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

BS224S 电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司制造; MS1 涡旋振荡器, 德国 IKA 公司制造; KQ-2500E 超声清洗机, 昆山市超声仪器有限公司制造; 3K30 型离心机, 北京赛多利斯仪器系统有限公司制造; MTN-2800D 氮吹仪, 天津安特赛恩斯仪器有限公司制造; 玻璃研钵和杵, 北京市宏捷成生物科技有限公司提供。

1.3 提取工艺

对传统的基质固相分散萃取技术进行改进, 将 1 g 加有罗丹明 B 标准品的辣椒制品置于玻璃研钵中, 混合均匀, 加入分散剂, 用研棒充分研磨, 研磨后移入试管中, 加入洗脱剂, 振摇均匀, 超声 10 min 进行充分洗脱, 取提取液于 45 °C 下氮吹浓缩至干, 用乙腈将其复溶定容至 1 mL, 过 0.22 μ m 有机滤膜。

1.4 标准曲线的制作

配制罗丹明 B 的标准溶液, 质量浓度为 0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.2 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL 和 10 μ g/mL, 以相对应的质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 制作标准曲线。

1.5 罗丹明 B 含量的测定条件

采用高效液相色谱法测定溶液中罗丹明 B 的含量。色谱柱: SB C18 4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μ m; 检测波长 550 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μ L; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相: 乙腈/质量分数 0.2% 甲酸溶液 (体积比 65:35)。

1.6 正交试验设计

选择分散剂种类、分散剂与样品质量比、洗脱剂组成及洗脱剂用量作为研究因素, 其中分散剂与

洗脱剂的选用原则主要是相似相溶原理,在尽可能提取出样品中目标物的同时尽量保留样品中其他成分,避免这些成分对目标物检测产生干扰。实验最终以提取液中的罗丹明B萃取率为考察指标,通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,选出最佳的辣椒制品中罗丹明B的提取条件,因素水平表见表1。

表1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal design

因素	水平			
	1	2	3	4
A 分散剂	C18	佛罗里硅土	中性氧化铝	硅胶
B 分散剂用量/g	2	3	1	4
C 洗脱剂体积/mL	15	20	10	5
D 洗脱剂	乙腈	甲醇	质量分数 80% 乙腈水溶液	体积分数 80% 甲醇水溶液

2 结果与分析

2.1 标准曲线

根据溶液中罗丹明B浓度与峰面积相对应的关系,绘制的标准曲线如图2所示,得出的回归方程为: $y=116.2524x+0.6601$,在0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数为0.9999。

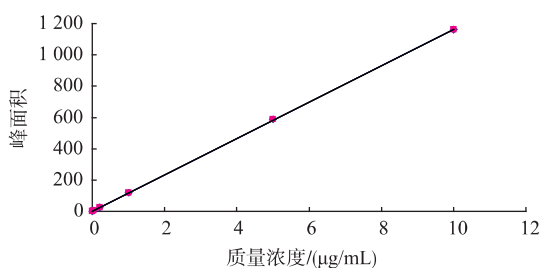


图2 罗丹明B标准品溶液标准曲线

Fig. 2 Rhodamine B standard curve

2.2 正交试验结果与讨论

本实验中考察了4个因素和4个水平,选择 $L_{16}(4^5)$ 正交表,其中一列为空列。正交实验设计及各个辣椒制品的实验结果见表2—4。

由表2、表3和表4中对罗丹明B提取率的 R 值进行的分析,可以得出影响罗丹明B提取率的因素大小关系为: $D>A>B>C$,洗脱剂的选择影响作用最大,分散剂的选择影响作用次之,洗脱剂的用量

影响作用最小。根据各表中 K 值比较,确定辣椒面最佳的提取工艺条件为 $D_3A_4B_3C_2$,即洗脱剂为质量分数80%的乙腈水溶液,分散剂硅胶,分散剂与样品质量比例1:1,洗脱剂体积20 mL;辣椒油最佳的提取工艺条件为 $D_4A_3B_1C_2$,洗脱剂为体积分数80%的甲醇水溶液,分散剂中性氧化铝,分散剂与样品质量比例2:1,洗脱剂体积20 mL;辣椒酱最佳提取工艺条件为 $D_3A_3B_2C_4$,洗脱剂为质量分数80%的乙腈水溶液,分散剂为中性氧化铝,分散剂与样品质量比例3:1,洗脱剂体积5 mL。前两种辣椒制品的最佳洗脱剂体积均为考察范围内的最大值20 mL,通过进一步研究,增加洗脱剂体积对罗丹明B的萃取没有更大贡献,所以考虑到实验成本及环保,最终选择20 mL最宜。

表5、表6和表7更深入地分析了4个因素对实验结果的影响程度,从3个表中可以看出,洗脱剂和分散剂的选择对实验结果影响显著,其次分散剂与样品质量比例的影响较前两者弱,洗脱剂的用量对实验结果影响最不显著,各因素对实验结果的影响显著性依次为:因素 D (洗脱剂组成) $>$ 因素 A (分散剂种类) $>$ 因素 B (分散剂与样品质量比例) $>$ 因素 C (洗脱剂用量),此方差分析结果与极差分析结果一致。

2.3 实验结果验证与讨论

通过对正交试验结果的极差与方差分析确定的辣椒面的最佳组合为 $A_4B_3C_2D_3$,即分散剂硅胶,分散剂与样品质量比例1:1,洗脱剂用量20 mL,洗脱剂选择质量分数80%的乙腈水溶液;辣椒油的最佳组合为 $A_3B_1C_2D_4$,即分散剂为中性氧化铝,分散剂与样品质量比例2:1,洗脱剂用量20 mL,洗脱剂为体积分数80%的甲醇水溶液;辣椒酱的最佳组合是 $A_3B_2C_4D_3$,即分散剂为中性氧化铝,分散剂与样品质量比例3:1,洗脱剂用量5 mL,洗脱剂用质量分数80%的乙腈水溶液。将这3种代表性的辣椒制品的空白样中分别添加质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的罗丹明B标准溶液,使样品中目标物质的质量浓度分别为0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和5 $\mu\text{g/mL}$,按照分别的前处理最优条件对每个样品的每一质量浓度进行5次检测,最后取平均值,经由标准曲线计算得到各溶液中罗丹明B的浓度。经计算目标物回收率在80.6%~100.8%(见表8),可以达到痕量分析的要求。

表 2 辣椒面样品正交实验表及结果
Table 2 Orthogonal results of Chili Powder

实验序号	因素					萃取率/%
	A 分散剂	B 分散剂用量/g	C 洗脱剂体积/mL	D 洗脱剂	E 空列	
1	1	1	1	1	1	18.117
2	1	2	2	2	2	82.016
3	1	3	3	3	3	91.691
4	1	4	4	4	4	53.139
5	2	1	2	3	4	67.307
6	2	2	1	4	3	28.633
7	2	3	4	1	2	20.084
8	2	4	3	2	1	25.225
9	3	1	3	4	2	51.475
10	3	2	4	3	1	97.857
11	3	3	1	2	4	87.648
12	3	4	2	1	3	35.793
13	4	1	4	2	3	66.991
14	4	2	3	1	4	41.051
15	4	3	2	4	1	105.641
16	4	4	1	3	2	95.116
K_1	244.963	203.890	229.514	115.045	246.840	
K_2	141.249	249.557	290.757	261.880	248.691	
K_3	272.773	305.064	209.442	351.971	223.108	
K_4	308.799	209.273	238.071	238.888	249.145	
k_1	61.241	50.973	57.379	28.761	61.710	
k_2	35.312	62.389	72.689	65.470	62.172	
k_3	68.193	76.266	52.361	87.993	55.777	
k_4	77.200	52.318	59.518	59.722	62.286	
极差 R	41.888	25.293	20.328	59.232	6.509	

表 3 辣椒油样品正交实验表及结果
Table 3 Orthogonal results of Pepper Oil

实验序号	因素					萃取率/%
	A 分散剂	B 分散剂用量/g	C 洗脱剂体积/mL	D 洗脱剂	E 空列	
1	1	1	1	1	1	68.392
2	1	2	2	2	2	100.363
3	1	3	3	3	3	81.592
4	1	4	4	4	4	73.244
5	2	1	2	3	4	97.276
6	2	2	1	4	3	81.819
7	2	3	4	1	2	51.436
8	2	4	3	2	1	65.624
9	3	1	3	4	2	107.904

续表 3

实验序号	因素					萃取率/%
	A 分散剂	B 分散剂用量/g	C 洗脱剂体积/mL	D 洗脱剂	E 空列	
10	3	2	4	3	1	87.041
11	3	3	1	2	4	97.355
12	3	4	2	1	3	70.682
13	4	1	4	2	3	76.725
14	4	2	3	1	4	41.917
15	4	3	2	4	1	85.264
16	4	4	1	3	2	62.617
K_1	323.591	350.297	310.183	232.427	306.321	
K_2	296.155	311.140	353.585	325.959	322.320	
K_3	362.982	315.647	297.037	328.526	310.818	
K_4	266.523	272.167	288.446	348.231	309.792	
k_1	80.898	87.574	77.546	58.107	76.580	
k_2	74.038	77.785	88.396	81.490	80.580	
k_3	90.746	78.912	74.259	82.132	77.705	
k_4	66.631	68.042	72.112	87.058	77.448	
极差 R	24.115	19.532	16.284	28.951	4	

表 4 辣椒酱样品正交实验表及结果

Table 4 Orthogonal results of Chili Paste

实验序号	因素					萃取率/%
	A 分散剂	B 分散剂用量/g	C 洗脱剂体积/mL	D 洗脱剂	E 空列	
1	1	1	1	1	1	25.469
2	1	2	2	2	2	11.812
3	1	3	3	3	3	71.690
4	1	4	4	4	4	35.585
5	2	1	2	3	4	92.501
6	2	2	1	4	3	65.287
7	2	3	4	1	2	71.010
8	2	4	3	2	1	22.354
9	3	1	3	4	2	79.526
10	3	2	4	3	1	108.983
11	3	3	1	2	4	30.572
12	3	4	2	1	3	45.496
13	4	1	4	2	3	46.816
14	4	2	3	1	4	70.918
15	4	3	2	4	1	63.472
16	4	4	1	3	2	82.545
K_1	144.556	244.312	203.873	212.894	220.278	
K_2	251.152	257.000	213.281	111.554	244.893	
K_3	264.577	236.744	244.488	355.720	229.291	
K_4	263.752	185.981	262.395	243.870	229.576	
k_1	36.139	61.078	50.968	53.224	55.070	
k_2	62.788	64.250	53.320	27.889	61.223	

续表 4

实验序号	因素					萃取率/%
	A 分散剂	B 分散剂用量/g	C 洗脱剂体积/mL	D 洗脱剂	E 空列	
k_3	66.144	59.186	61.122	88.930	57.323	
k_4	65.938	46.495	65.599	60.968	57.394	
极差 R	30.005	17.755	14.631	61.041	6.153	

表 5 辣椒面样品正交实验方差分析

Table 5 Orthogonal analysis of variance of Chili Powder

因素	偏差平方和	自由度	偏差平方均值	F 值	P 值	显著性
A 分散剂	3 892.154	3	1 297.385	32.697	$P<0.01$	极显著
B 分散剂与样品质量比例	1 639.398	3	546.466	13.772	$P<0.05$	显著
C 洗脱剂体积/mL	902.148	3	300.716	7.579	$P<0.1$	较显著
D 洗脱剂	7 154.020	3	2 384.673	60.100	$P<0.01$	极显著
误差	119.036	3	39.679			

表 6 辣椒油样品正交实验方差分析

Table 6 Orthogonal analysis of variance of Pepper Oil

因素	偏差平方和	自由度	偏差平方均值	F 值	P 值	显著性
A 分散剂	1 263.086	3	421.029	34.932	$P<0.01$	极显著
B 分散剂与样品质量比例	766.744	3	255.581	21.205	$P<0.05$	显著
C 洗脱剂体积/mL	627.726	3	209.242	17.360	$P<0.5$	显著
D 洗脱剂	2 017.796	3	672.599	55.804	$P<0.01$	极显著
误差	36.159	3	12.053			

表 7 辣椒酱样品正交实验方差分析

Table 7 Orthogonal analysis of variance of Chili Paste

因素	偏差平方和	自由度	偏差平方均值	F 值	P 值	显著性
A 分散剂	2 519.672	3	839.891	32.208	$P<0.01$	极显著
B 分散剂与样品质量比例	728.242	3	242.747	9.309	$P<0.05$	显著
C 洗脱剂体积/mL	554.345	3	184.782	7.086	$P<0.1$	较显著
D 洗脱剂	7 578.991	3	2 526.330	96.879	$P<0.01$	极显著
误差	78.231	3	26.077			

表 8 辣椒样品中罗丹明 B 回收率

Table 8 Recovery of Rhodamine B in Chili sample

样品	加入量/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
辣椒面	0.2	85.9	3.6
	1	96.6	2.6
	5	100.8	1.4
辣椒油	0.2	81.6	3.4
	1	97.5	2.2
	5	99.7	1.9
辣椒酱	0.2	80.6	4.0
	1	94.3	2.9
	5	98.3	2.0

3 结 语

利用改进后的基质固相分散技术的正交试验,

进行辣椒制品中罗丹明B的提取工艺的研究,并对实验结果进行极差和方差分析,得到最优提取工艺条件,如表9所示。

表9 辣椒样品中罗丹明B最优提取条件

Table 9 Optimal extraction conditions of Rhodamine B in Chili sample

样品	洗脱剂	分散剂	分散剂与样品质量比例	分散剂用量/mL
辣椒面	质量分数 80%乙腈水溶液	硅胶	1:1	20
辣椒油	体积分数 80%甲醇水溶液	中性氧化铝	2:1	20
辣椒酱	质量分数 80%乙腈水溶液	中性氧化铝	3:1	5

同时对实验结果进行验证,确定在各自的最优条件下,3种辣椒产品中罗丹明B的最高提取率分别为:辣椒面 100.8%,辣椒油 99.7%,辣椒酱 98.3%。

实验操作简单,有机溶剂种类少,只用到了乙

腈和甲醇,改进后省去了固相萃取小柱,避免了在液液萃取或固相萃取过程中,可能由于所用有机溶剂复杂,或萃取小柱批次不同而导致的实验结果不稳定,或目标物残留在柱上等会影响目标物回收率的情况产生,并且节省了实验成本。

参考文献:

[1] 胡侠,肖光,潘炜,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定辣椒粉及辣椒油中的7种罗丹明染料[J]. 色谱,2010,28(6):590-595.
HU Xia,XIAO Guang,PAN Wei,et al. Simultaneous determination of 7 rhodamine dyes in hot chili products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **Chinese Journal of Chromatography**,2010,28(6):590-595.(in Chinese)

[2] 谯路,郭振华,莫佳琳,等. 超高效液相色谱荧光法检测调味品中罗丹明B残留量[J]. 广州化学,2011,36(3):17-21.
MIAO Lu,GUO Zhenhua,MO Jialin,et al. Determination of rhodamine B in condiment by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detector[J]. **Guangzhou Chemistry**,2011,36(3):17-21.(in Chinese)

[3] SN/T 2430-2010,中华人民共和国出入境检验检疫行业标准[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[4] 程慧,李兵,占春瑞. 腊肠中罗丹明B的高效液相色谱串联质谱检测方法[J]. 食品科学,2010,31(4):223-225.
CHENG Hui,LI Bing,ZHAN Chunrui. HPLC-MS/MS determination of rhodamine B residue in chinese preserved sausages[J]. **Food Science**,2010,31(4):223-225.(in Chinese)

[5] 张贞理,梅英杰,张全美,等. 固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定调味品中的罗丹明B[J]. 分析实验室,2012,31(4):15-19.
ZHANG Zhenli,MEI Yingjie,ZHANG Quanmei,et al. Determination of rhodamine B in flavourings by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**,2012,31(4):15-19.(in Chinese)

[6] 张倩,王明林,杜海云,等. 基质固相分散-气相色谱法测定蔬菜中的甲胺磷[J]. 食品科学,2007,28(6):265-268.
ZHANG Qian,WANG Minglin,DU Haiyun,et al. Determination of vegetables methamidophos by matrix solid-phase disperse and gas chromatography[J]. **Food Science**,2007,28(6):265-268.(in Chinese)

[7] 陈美瑜,孙若男,林竹光. 基质固相分散-气相色谱-离子阱串联质谱法分析牛奶中有机磷农药[J]. 分析实验室,2010,29(9):65-69.
CHEN Meiyu,SUN Ruonan,LIN Zhuguang. Determination of 13 organophosphorus pesticides in milk by matrix solid phase dispersion and gas chromatography-iontrap tandem mass spectrometry [J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**,2010,29(9):65-69.(in Chinese)

[8] Barker S A. Matrix solid phase dispersion(MSPD)[J]. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**,2007,70(2):151-162.

[9] 金永日,时晓磊,李绪文,等. 基质固相分散提取桃儿七根中鬼臼毒苷和异鬼臼苦酮[J]. 高等学校化学学报,2011,32(5):1054-1057.
JIN Yongri,SHI Xiaolei,LI Xuwen,et al. Matrix solid phase dispersion for the extraction of podophyllotoxin glucoside and isopropodophyllone from roots of sinopodophyllum emodi(Wall.)[J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**,2011,32(5):1054-1057.(in Chinese)