

## UPLC-MS 法测定花椒及花椒制品中罗丹明 B 的含量

梁伟龙<sup>1,2</sup>, 王斌<sup>1</sup>, 林钦贤<sup>1\*</sup>, 全玉锦<sup>1</sup>, 邓健辉<sup>1</sup>, 萧锡均<sup>1</sup>, 郝建新<sup>2</sup>

(1.广州市香雪制药股份有限公司, 广东广州 510663; 2.宁夏隆德县六盘山中药资源开发有限公司, 宁夏固原 756300)

**摘要** [目的]建立一种花椒及花椒制品中罗丹明 B 的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS)的测定方法。[方法]1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)溶液提取样品后,经固相萃取(SPE)柱净化,采用 Strata-X SPE 柱分离,以乙腈和乙酸铵水溶液(含体积分数为 0.1%的甲酸)为流动相进行梯度洗脱,电喷雾正离子多反应监测(MRM)模式下进行定量定性分析。[结果]罗丹明 B 在 0.5~50.0 ng/mL 与峰面积呈良好的线性关系,加标回收率为 96.60%~106.03%,相对标准偏差为 0.83%~3.37%。[结论]该方法具有处理简单、灵敏度高等特点,可用于花椒及花椒制品中罗丹明 B 的定性定量分析。

**关键词** 罗丹明 B; UPLC-MS; 花椒; 含量测定

中图分类号 TS 207.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)02-0210-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.061



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Determination of Rhodamine B in *Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum bungeanum* Products by UPLC-MS**LIANG Wei-long<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, LIN Qin-xian<sup>1</sup> et al (1. Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663; 2. Longde Liupanshan Chinese Medicine Resources Development Co., Ltd., Guyuan, Ningxia 756300)

**Abstract** [Objective] To establish a method for the determination of rhodamine B in *Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum bungeanum* products by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS). [Method] The method with 1% formic acid water solution:methanol (volume ratio 1:1) solution extraction samples, by solid phase extraction (SPE) column purification, using Strata-X solid phase extraction column, acetonitrile and ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) as mobile phase with gradient elution, electrospray ionization in positive ion multiple reaction monitoring (MRM) the quantitative and qualitative analysis of mode. [Result] Rhodamine B showed a good linear relationship with peak area at 0.5-50.0 ng/mL. The recovery rates were 96.60%-106.03%, and the relative standard deviations were 0.83%-3.37%. [Conclusion] The method has many characteristics, such as simple treatment, high sensitivity, etc. The rhodamine B in *Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum bungeanum* products will suitable for the qualitative and quantitative analysis.

**Key words** Rhodamine B; UPLC-MS; *Zanthoxylum bungeanum*; Content determination

花椒为芸香科植物青椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.)或花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)的干燥成熟果皮,其味辛,温,具有温中止痛、杀虫止痒的功效<sup>[1]</sup>。花椒在我国有着悠久的药用和食用历史,可作为多种食品的烹调加工调味品,为我国药食两用的原料之一<sup>[2]</sup>。但近年来关于花椒染色的报道层出不穷<sup>[3-8]</sup>,严重影响中药疗效及患者生命健康,让本就已经让人怀疑疗效的中药材以及中医行业更加“劣迹斑斑”。研究表明,罗丹明 B 是一种具有鲜桃红色的人工合成的染料<sup>[9]</sup>,与辣椒、花椒等调味品的天然颜色相似,且其染色能力较强、不易褪色、价格低廉,而使不法商贩们经常将其用于辣椒制品、花椒等产品的染色,以次充好。

目前,罗丹明 B 的检测方法有 UV-Vis、HPLC、LC-MS 等<sup>[10-13]</sup>,但存在定性能力不足、方法专属性强、抗干扰能力差、耗时较长、假阳性较高等问题,现有方法不能满足大批量样品的分析测试需要,因此笔者基于固相萃取前处理技术,采用 UPLC-MS 建立一种花椒及花椒制品中罗丹明 B 的检测方法。

**1 材料与方**

**1.1 仪器** TQ 型超高效液相色谱-串联质谱仪(Waters)、20-Port 型固相萃取装置(Waters)、3-18K 型高速冷冻离心

机(SIGMA)、UGC-24W 型氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司)、JP-C600 型超声波清洗机(广州市吉普超声波设备有限公司)、DT-500E 型电子天平(常熟市金羊砝码仪器有限公司)、PL203 型分析天平(梅特勒-托利多)、MS3 basic 型涡旋混合器(德国艾卡)、HWS26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 罗丹明 B(纯度 95.0%, Dr Ehrenstorfer); 正己烷(HPLC, TEDIA); 甲醇(HPLC, TEDIA); 乙腈(HPLC, TEDIA); 其他试剂均为分析纯;超纯水; Oasis MCX 固相萃取柱、Strata-X SPE 固相萃取柱、C<sub>18</sub> SPE 固相萃取柱,使用前全部依次用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水进行预处理;市售花椒及花椒制品共 20 份,经广州市香雪制药股份有限公司康志英高级工程师鉴定为芸香科植物青椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.)或花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)的干燥成熟果皮/果皮加工品。

**1.3 方法**

**1.3.1 色谱条件。** Waters BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈(A)和 5 mol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)(B);按表 1 中的规定进行梯度洗脱,流速 0.3 mL/min;柱温为 35 °C;进样量为 5 μL;离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;采集方式:多反应监测(MRM);脱溶剂气流速:800 L/h;脱溶剂气温度:500 °C;电离源电压:2.82 kV;气帘气流速:50 L/h。罗丹明 B 母离子 *m/z*:443.1;子离子对 *m/z*:443.1/355.0;定量离子 *m/z*:355.0;锥孔电压:70.0 eV;碰撞能量:60.0 eV。

**基金项目** 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2017BY079)。**作者简介** 梁伟龙(1992—),男,广东茂名人,中药师,从事中药研发及其质量评价研究。\*通信作者,中药师,硕士,从事中药研发及其质量评价研究。**收稿日期** 2019-08-20; **修回日期** 2019-09-26

表 1 梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient eluted program %

时间 Time//min	流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B
0	20	80
3.0	50	50
3.5	50	50
4.0	90	10
4.5	90	10
5.0	20	80

**1.3.2 标准储备液的制备。**取罗丹明 B 标准品适量,精密测定,加甲醇制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液,备用。

**1.3.3 标准工作液的制备。**精密量取“1.3.2”标准储备液,用甲醇制成分别含 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0  $\text{ng}/\text{L}$  的溶液,即得。

**1.3.4 供试品溶液的制备。**取本品粉末(过 3 号筛)约 2 g,精密测定,置 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)提取溶液,在涡旋混合器上涡旋混匀,超声提取 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 5 min(8 000 r/min),取上清液转移至另一 50 mL 聚丙烯离心管中,重复操作,合并上清液,混匀备用。将收集到的上清液经过预处理后的 Strata-X SPE 柱,柱中液体保持 2 mm 左右时进样,流速为 1 滴/s,

待样液完全流出后,用 3 mL 淋洗液、3 mL 水进行淋洗,再用 5 mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液,氮气吹至近干,用甲醇定容至 1 mL,涡旋混匀,即得。

**1.3.5 线性关系考察。**分别精密吸取“1.3.3”不同浓度的标准工作液 5  $\mu\text{L}$ ,按“1.3.1”的色谱条件进样分析,记录罗丹明 B 的峰面积,以进样量( $X$ )为横坐标峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。

**1.3.6 精密度考察。**取浓度为 10.0  $\text{ng}/\text{mL}$  的标准工作液,精密吸取 5  $\mu\text{L}$ ,按“1.3.1”的色谱条件进样分析,重复进样 6 次,分别记录罗丹明 B 的峰面积。

**1.3.7 加标回收率试验。**准确称取相同的空白阴性花椒试样 5 份,分别加入 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0  $\text{ng}/\text{mL}$  5 个不同水平浓度的罗丹明 B 标准溶液,平行测定 5 次,计算回收率。

**1.3.8 样品测定。**分别称取花椒及花椒制品的样品,按“1.3.4”方法制备供试品溶液,每个样品平行 3 次,进样测定,以均值为结果,计算样品中罗丹明 B 的含量。

## 2 结果与分析

**2.1 对照品与样品的 UPLC-MS 色谱图** 从图 1 可以看出,相同的分析条件下,样品溶液在对照品溶液相同出峰时间( $t=3.0$  min)中有一个峰出现,分离度良好,且空白无干扰,说明此条件适合罗丹明 B 的含量测定。

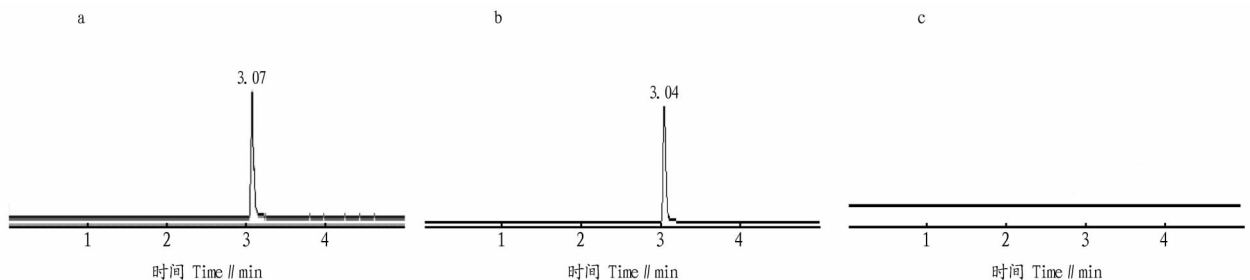


图 1 对照品(a)、供试品(b)和空白对照(c)的 UPLC-MS 色谱图

Fig.1 UPLC-MS chromatograms of reference substanc (a), test sample (b) and blank control (c)

**2.2 线性关系考察** 以进样量( $X$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得出罗丹明 B 的回归方程为  $Y=3\ 458X-42.939$  ( $R^2=0.999\ 7$ ),表明在 0.5~50.0  $\text{ng}/\text{mL}$  浓度范围内具有较好的线性关系。

**2.3 精密度考察** 按“1.3.6”的方法重复进样 6 次,记录罗丹明 B 的峰面积,结果发现罗丹明 B 峰面积的 RSD 为 1.93%,表明仪器的精密度良好。

**2.4 加标回收率试验** 按“1.3.7”方法进行的操作,分别加入不同水平浓度的罗丹明 B 标准溶液,平行测定 5 次,结果发现(表 2),罗丹明 B 的回收率为 96.60%~106.03%,RSD 为 0.83%~3.37%。表明该方法回收率良好。

**2.5 罗丹明 B 含量测定** 将不同批次的供试品溶液在“1.3.1”的色谱条件下进行分析,通过对比样品与标准品的保留时间和特征碎片离子,对样品进行定性。利用标准品的色谱峰面积和浓度关系,建立校正曲线,对样品进行定量分析。由分析结果可得,从市场购买的 20 批不同产地、不同规格的花椒及花椒制品中,仅检出 1 个阳性样品,含量为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,

整体产品质量状况良好。由于检测含量较低,人为添加的可能性较低,可能是由于花椒在生产过程中被污染而带入。

## 3 结论与讨论

该试验考察了超声提取、回流提取、液-液萃取的方法,超声提取操作简便,所需时间较短,提取后直接用离心的方式对提取液进行初步净化处理,与普通的过滤方法相比,不仅加快了过滤速度,而且减少了待测组分的损失,提高了回收率,因此该试验选择超声提取。提取溶剂考察了正己烷、乙腈和 1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)3 种提取试剂,正己烷的毒性相对较小,但其提取程度较低;乙腈和 1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)2 种溶液的提取程度相差不大,但乙腈的毒性强于甲醇,且有较强的特殊性气味,因此,选用 1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)溶液作为提取试剂较为合理、安全。另外,净化柱的选择上,不同的净化柱价格相差不大,但 Strata-X SPE 柱对 1%甲酸溶液-甲醇(体积比为 1:1)提取液中的目标化合物的保留程度较 Oasis MCX SPE 柱和  $\text{C}_{18}$  SPE 柱好,因此选择 Strata-X SPE 柱作为净化柱。

表2 回收率试验结果(n=5)

Table 2 Results of recovery tests (n=5)

加标量 Standard addition ng/mL	测得量 Measured amount ng/mL	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1.0	0.966 3	96.63	97.22	0.83
	0.967 2	96.72		
	0.971 3	97.13		
	0.986 7	98.67		
	0.969 4	96.94		
5.0	4.852 6	97.05	98.29	1.45
	4.899 5	97.99		
	4.841 5	96.83		
	5.001 7	100.03		
	4.977 3	99.55		
10.0	10.603 4	106.03	99.54	3.37
	9.988 3	98.78		
	9.893 2	98.93		
	9.785 4	97.85		
	9.813 6	96.13		
20.0	19.823 5	99.12	98.65	1.04
	19.574 5	97.87		
	19.480 1	97.40		
	20.003 4	100.02		
	19.766 9	98.83		
50.0	49.794 8	99.58	99.23	0.92
	48.995 3	97.99		
	49.276 7	98.55		
	50.028 4	100.05		
	50.000 9	100.00		

此次研究通过采用UPLC-MS法测定花椒及花椒制品中罗丹明B的含量,结果表明,该方法前处理简单快速、高灵敏度、准确性好、分析时间短及可操作性强,可用于大批次花椒及花椒制品中罗丹明B的定性定量分析。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:159.
- [2] 中华人民共和国卫生部.卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知:卫法监发[2002]51号[A].2002.
- [3] 佚名.利欲熏心 花椒也染色[J].广西质量监督导报,2012(11):10.
- [4] 郝凤桐.毒花椒:罗丹明B堪比苏丹红[J].健康必读,2011(7):33.
- [5] 宋晓响,张磊,姜杰.2013年大连市部分市售食品污染物监测结果[J].职业与健康,2014(22):3225-3228,3231.
- [6] 陈海燕,黄秋研,李锦清,等.顺德区市售辣椒类及调味品常规非食用色素添加的分析评价[J].农业机械,2013(35):70-73.
- [7] 佚名.染色花椒煮肉汤变“血水”[J].人人健康,2013(6):24.
- [8] 王艳春,刘晓峰,李博,等.北京市通州区调味品中工业染料监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2014,24(24):3584-3585,3588.
- [9] 徐声乐,王兴,刘金萍,等.罗丹明B及其在食品中检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(17):136-139.
- [10] 王传现,韩丽,方晓明,等.食品中罗丹明B的高效液相色谱荧光检测[J].分析仪器,2008(1):27-30.
- [11] 林长虹,胡书玉,黄达锴,等.辣椒及其制品中罗丹明B的超高效液相色谱荧光检测[J].广东化工,2011,38(4):140-141.
- [12] 胡侠,肖光,潘伟,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.
- [13] 胡慧,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.

(上接第206页)

于判别分析的共有特征峰,采用判别分析方法建立不同海拔岭头单枞茶的鉴别模型。对海拔不同的凤凰单枞茶的分析结果表明,对于海拔400 m以下、600 m左右和800~1 000 m的3类春茶,通过判别分析建立的鉴别模型鉴别准确率为100%。验证了基于化学指纹图谱的岭头单枞茶以产地海拔分级判别研究是可行的。

在茶叶成分复杂、品种鉴定的依据成分不完全明确的前提下,利用色谱指纹图谱来鉴别岭头单枞茶的品种是切实可行的,并为不同品种及不同产地样品之间的鉴别提供了科学依据<sup>[10]</sup>。该研究在此基础上利用指纹图谱技术和化学计量法软件对产地海拔岭头单枞的茶叶进行研究,获得21个判别用共有特征峰,进行判别分析,判别结果鉴别准确率为100%,一定程度上反映了该鉴别方法的应用前景,以改变人工感官评审的方法,使茶叶评审客观化、科学化和标准化<sup>[11-12]</sup>。该研究虽然只针对岭头单枞茶进行产地海拔的分类与鉴定,但仍然可以作为其他凤凰单枞茶研究的参考。

### 参考文献

- [1] 张佳.凤凰茶区考察报告[J].茶叶,2013,39(2):88-90,106.
- [2] 唐颖,唐劲驰,操君喜,等.凤凰单丛茶品质的海拔区间差异分析[J].中国农学通报,2015,31(34):143-151.
- [3] 欧阳石光.茶叶香气指纹图谱及特征识别的初步研究[D].泰安:山东农业大学,2011.
- [4] 李永玲.非线性化学指纹图谱结合模式识别方法在食品鉴别方面的应用研究[D].重庆:西南大学,2015.
- [5] 朱潘伟,刘东红,黄伟,等.指纹图谱技术在食品品质检测中的应用[J].粮油加工,2008(6):125-128.
- [6] 俞良莉,陆维盈,刘洁,等.食品非目标性检测技术[J].食品科学技术学报,2016,34(6):1-6.
- [7] 陈勤,陈汉林,黄亚辉.四个凤凰单丛茶品质特点与生化成分分析研究[J].广东茶业,2015(4):15-19.
- [8] 梅洪娟,马瑞君,庄东红.指纹图谱技术及其在植物种质资源中的应用[J].广东农业科学,2014,41(3):159-164.
- [9] 马瑞君,梅洪娟,庄东红,等.不同品种(系)凤凰单丛茶DNA指纹图谱的构建[J].茶叶科学,2014,34(5):515-524.
- [10] 贺巍.基于化学指纹图谱的茶叶产地、原料品种判别分析和生化成分预测[D].南京:南京农业大学,2011.
- [11] 晏婧好,赵超艺,罗军武.凤凰单丛代表样茶感官审评比较分析[J].广东茶业,2006(5):18-21.
- [12] 杨环,周春娟,石恩宇.基于科学实验与感官审评的鸭屎香凤凰单丛香型品质鉴定[J].韩山师范学院学报,2018,39(3):42-46,66.