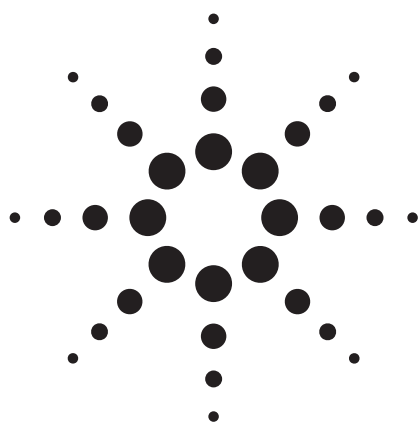


# 快速灵敏的 LC/MS/MS 方法用于咖喱粉和辣椒粉中苏丹红的分析



应用

食品安全

## 作者

Yanyan Fang  
Agilent Technologies, Inc.  
412 Ying Lun Road  
Pu Dong, Shanghai 200131  
China

Jeffrey Keever  
Agilent Technologies, Inc.  
200 Regency Forest Drive, Suite 330  
Cary, NC 27518-8695  
USA

Dustin Yaworsky and Jerry Zweigenbaum  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
USA

## 摘要

使用安捷伦 G6410 型三重串联四极杆质谱建立了不同基质（包括咖喱粉、红椒粉和辣椒制品）中苏丹红的分析方法。用四种不同基质对该方法的性能进行了评价，结果显示几乎没有基质效应。三个数量级的响应值呈线性 ( $r > 0.99$ )。另外，两种必需的子离子比值具有良好的重现性，符合欧盟关于结构确认所需的鉴定条件。

## 引言

一类叫做苏丹红染料的色泽添加剂由一系列的红色着色剂组成，包括苏丹红 I 至苏丹红 IV。这类着色剂与其它染料，如对位红，都属于合成偶氮染料。由于它们的降解产物被认为具有致癌和致畸作用，欧盟和美国不允许将这些着色剂用于食品添加剂。然而，在有些国家，这类染料仍偶有用于加强柿子椒和辣椒粉的颜色。

红色染料苏丹红 I、II、III、IV 是在皮革和纺织行业允许使用的脂溶性偶氮染料。世界卫生组织 (WHO) 的国际癌症研究机构 (IARC) 将苏丹红染料评估为第三类遗传毒性致癌物[1]。工业染料对位红的化学结构与苏丹红 I 相似，同样不允许在食品中使用。

欧盟发布的第 2003/460/EC 号决议要求所有进口的辣椒和辣椒产品均应做过苏丹红 I 检测，并将其作为允许进口的条件之一[2]。该决议在 2004 年 1 月进行了修订 (2004/92/EC)，补充了苏丹红 II、III 和 IV[3]。这一要求目前仍然具有效力。为满足检测要求，使用了高选择性和灵敏度的三重串联四极杆质谱 (QQQ)。



## 实验部分

### 试剂和材料

乙酸乙酯购自 Burdick and Jackson (Morristown, NJ)

HPLC 级甲醇购自 Burdick and Jackson

18M $\Omega$  纯水由 Millipore (Billerica, MA) 的 Milli-Q 合成系统制得

针筒过滤器(0.2  $\mu$ m, PTFE)来自安捷伦, 部件号 5185-5843

### 样品

1. 咖喱粉 (House of Spices [India] Inc.)
2. 红椒粉 (Korean Farm, Inc.)
3. 红椒粉 (Oriental Mascot, Summit Import Corp.)
4. 伍斯特郡辣酱油 (Lea & Perrins)

### 方法概述

#### 标准品制备

1. 标准溶液制备: 取对位红、苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III 和苏丹红 IV 各 10 mg, 分别用乙腈-水 (90:10) 溶解并稀释至 100.00 mL, 得到最终浓度为 100 ppm 的溶液。
2. 稀释液制备: 用乙腈稀释并制成浓度分别为 1 ppm, 0.1 ppm, 10 ppb, 5 ppb, 2 ppb 和 100 ppt 的溶液。

#### 样品制备

1. 咖喱粉取标准溶液 10  $\mu$ L, 加入 1 g 咖喱粉中, 用乙酸乙酯 5 mL 稀释, 超声处理 10 分钟。该溶液用 0.22  $\mu$ m 针筒过滤器滤过, 并在 40  $^{\circ}$ C 的氮气流中挥干 (下同)。残渣溶解于 1 mL 乙腈中, 在进样前再次滤过。样品溶液未进行其它的净化处理。获得的加标样品浓度为 1 ppm。重复上述加入标准溶液过程, 获得浓度水平为 100, 10, 1 和 0.1 ppb 的加标样品。

2. 两种红椒粉使用咖喱粉样品的制备方法制得加标样品。
3. 伍斯特郡辣酱油取标准溶液 10  $\mu$ L, 加入 1 mL 辣酱油中。辣酱油的 pH 值约为 3, 用乙酸乙酯 5 mL 稀释, 超声处理 10 分钟。取该溶液在 8000 rpm 离心 2 分钟, 移取上层溶液 (乙酸乙酯层) 至一干净试管中, 在 40  $^{\circ}$ C 的氮气流中挥干。残渣用 1 mL 乙腈重新溶解, 并超声 1 分钟。该溶液在进样前滤过。

### LC/MS/MS 条件

所有分析均在 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱仪上进行, 配有电喷雾离子源以正离子模式离子化。高效液相色谱仪是 Agilent 1200 液相色谱系统, 配备二元泵和多孔板自动进样器。LC 和 MS 条件见表 1。

质谱分析分为五个区段, 每个区段包含一个被分析物。对于该区段中洗脱的每种被分析物, 有其合适的解离电压和碰撞能量。区段 1 始于 0 min, 区段 2 始于 2.0 min, 区段 3 始于 2.8 min, 区段 4 始于 3.6 min, 区段 5 始于 4.2 min。

表 1. LC/MS 条件

<b>HPLC</b>	
色谱柱	ZORBAX XDB C18 2.1 mm x 100 mm, 1.8 $\mu$ m 安捷伦部件号: 928700-906
流速	0.4 mL/min
流动相	A: 0.1% 甲酸水溶液 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液
梯度	0.1–4 min, 70~98% B 4–5 min 98% B 5–7 min 70%
总运行时间	10 min (包括重新平衡)
温度	40 $^{\circ}$ C
进样量	5 $\mu$ L
<b>MS 离子源设置</b>	
离子源	ESI
离子极性	正离子模式
干燥气温度	350 $^{\circ}$ C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	45 psi
毛细管电压( $V_{cap}$ )	3500 V
MRM 参数	见表 2

## 结果与讨论

每种染料均以 LC/MS/MS 进行子离子扫描分析，并检查了谱图质量。选择了用于定量分析和结构确证的合适的裂解反应离子。各种化合物的结构式如下所示。偶氮键在碰撞诱导解离条件下裂解，并产生特征碎片离子。

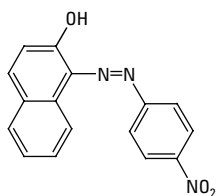
### MS 条件的优化

优化通常包括寻找能使母离子丰度最大的解离电压和使裂解反应离子丰度最大的碰撞能量。解离电压的优化是通过逐步调节电压值，同时记录峰强度来进行的，苏丹红 I 的解离电压优化如图 1 所示。其它化合物均以相同的步骤进行优化。图 2 显示了两种碰撞能量

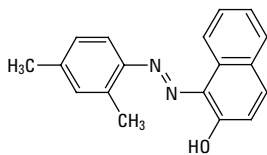
(CE) 条件下苏丹红 I 的裂解离子 MS/MS 谱图。从谱图中可见， $m/z$  156 的裂解离子在 15 V 时强度最大，而  $m/z$  93 的裂解离子在 25 V 时强度最大。一般情况下，选择丰度最大的离子用作定量以获得最小浓度水平下的最佳精密度和准确度，而选择丰度小一些的离子作为定性离子用于结构确证。然而，为了使得选择性最高，需要寻找特征裂解反应离子。例如苏丹红 I，裂解离子  $m/z$  93 是由于偶氮键和氢原子裂解而产生的苯胺自由基阳离子[4]。这一裂解反应同时产生裂解离子  $m/z$  156，这两种裂解离子都是特征离子。测定不同碰撞能量 (CE) 下所有化合物的两种最大丰度离子的强度，得到的电压值如表 2 所示。其他 MS 设置也包含在表 2 中。

### 染料结构式

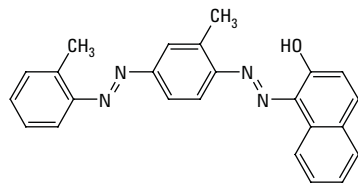
对位红



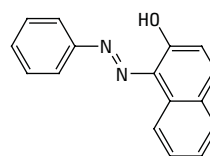
苏丹红 II



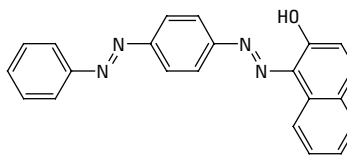
苏丹红 III



苏丹红 I



苏丹红 III



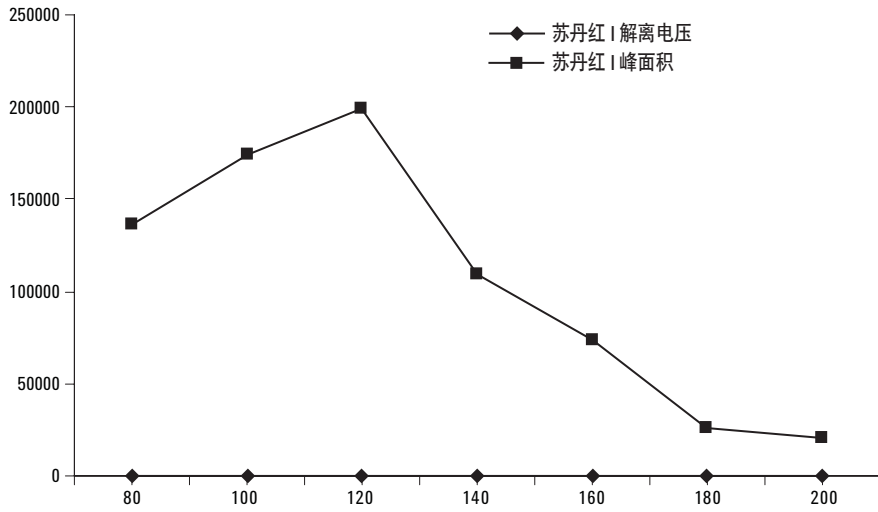


图 1. 苏丹红 I 号解离电压的优化

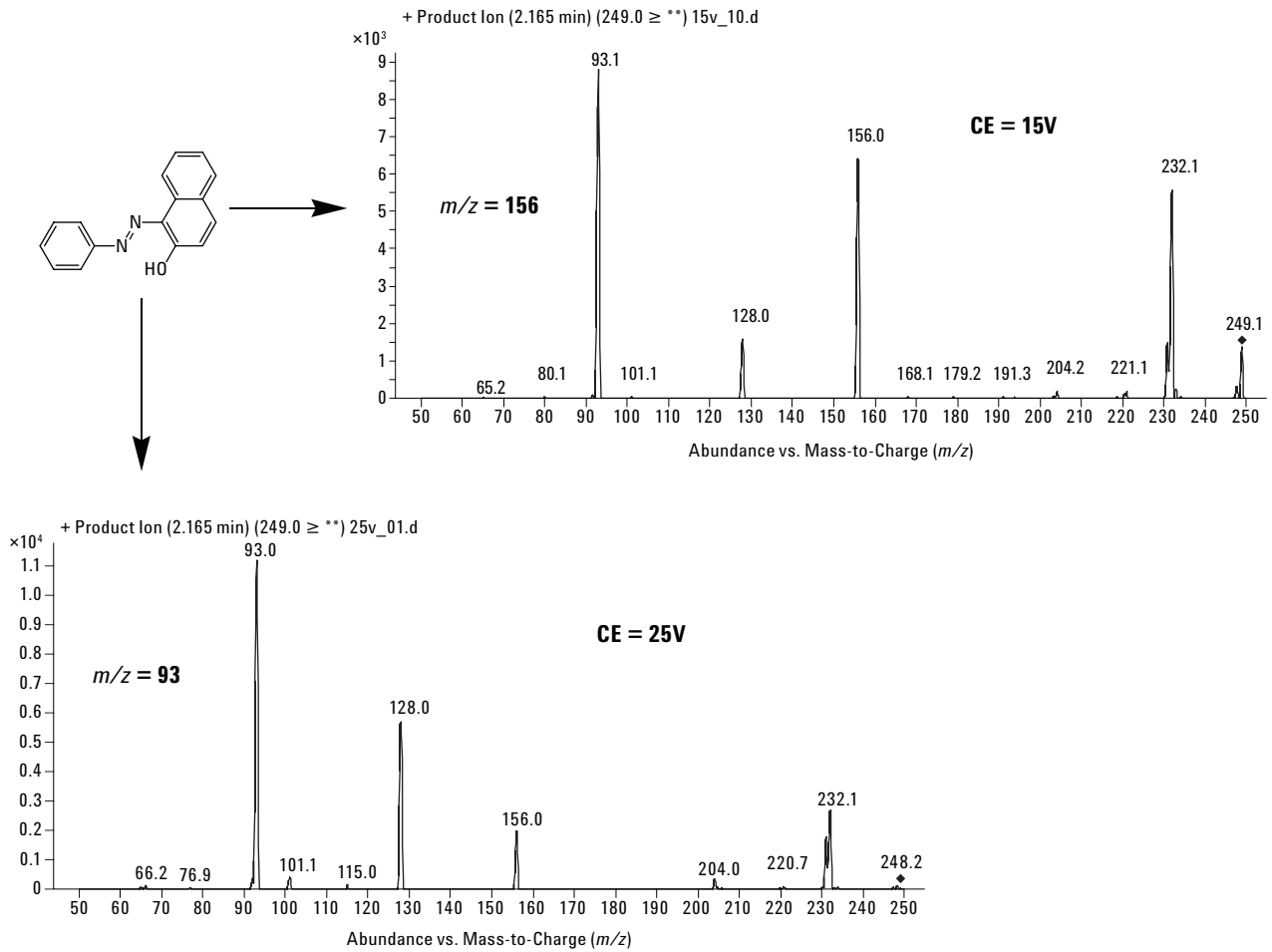


图 2. 碰撞能量 (CE) 为 15 V 和 25 V 条件下苏丹红 I 的 MS/MS 谱图

表 2. MRM MS/MS 参数

被分析物	裂解反应	驻留时间 (msec)	解离电压	碰撞能量	MS2 Res.	增益
对位红	294→156	200	120 V	15 V	Unit	1
	294→128	200	120 V	30 V	Unit	1
苏丹红 I	249→156	200	120 V	15 V	Unit	1
	249→93	200	120 V	25 V	Unit	1
苏丹红 II	277→156	200	100 V	10 V	Unit	1
	277→121	200	100 V	20 V	Unit	1
苏丹红 III	353→77	200	120 V	25 V	Unit	1
	353→197	200	120 V	20 V	Unit	1
苏丹红 IV	381→91	200	120 V	30 V	Unit	1
	381→225	200	120 V	15 V	Unit	1

### 色谱图 and 选择性

图 3 显示了色谱分离情况，可以分成各个区段，以进行不同 MS/MS 条件的设置。用 1 ppb 的辣椒粉加标

样品进行了方法选择性研究。辣椒粉空白样品见图 4，加标样品中所有 5 种被分析物的定量和定性离子裂解反应如图 5 所示。

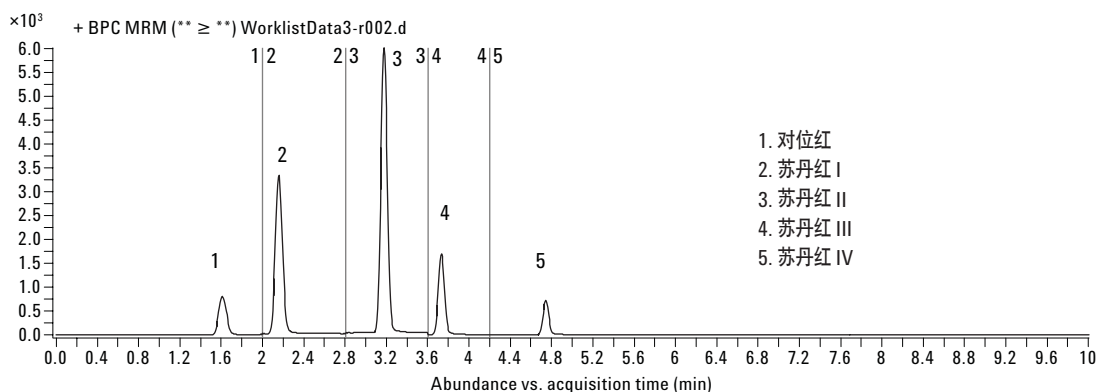


图 3. 苏丹红和对位红的 MRM 色谱图

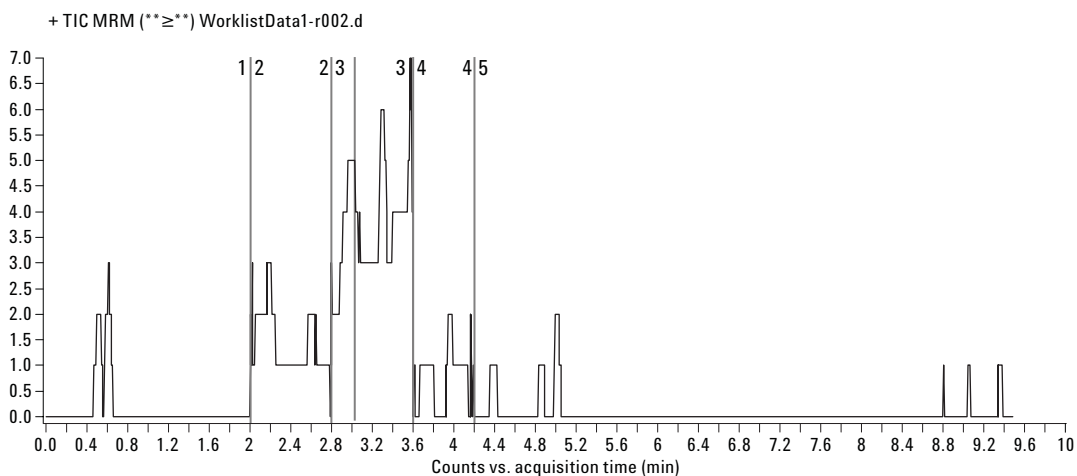


图 4. 空白辣椒粉提取物未见任何被分析物的响应

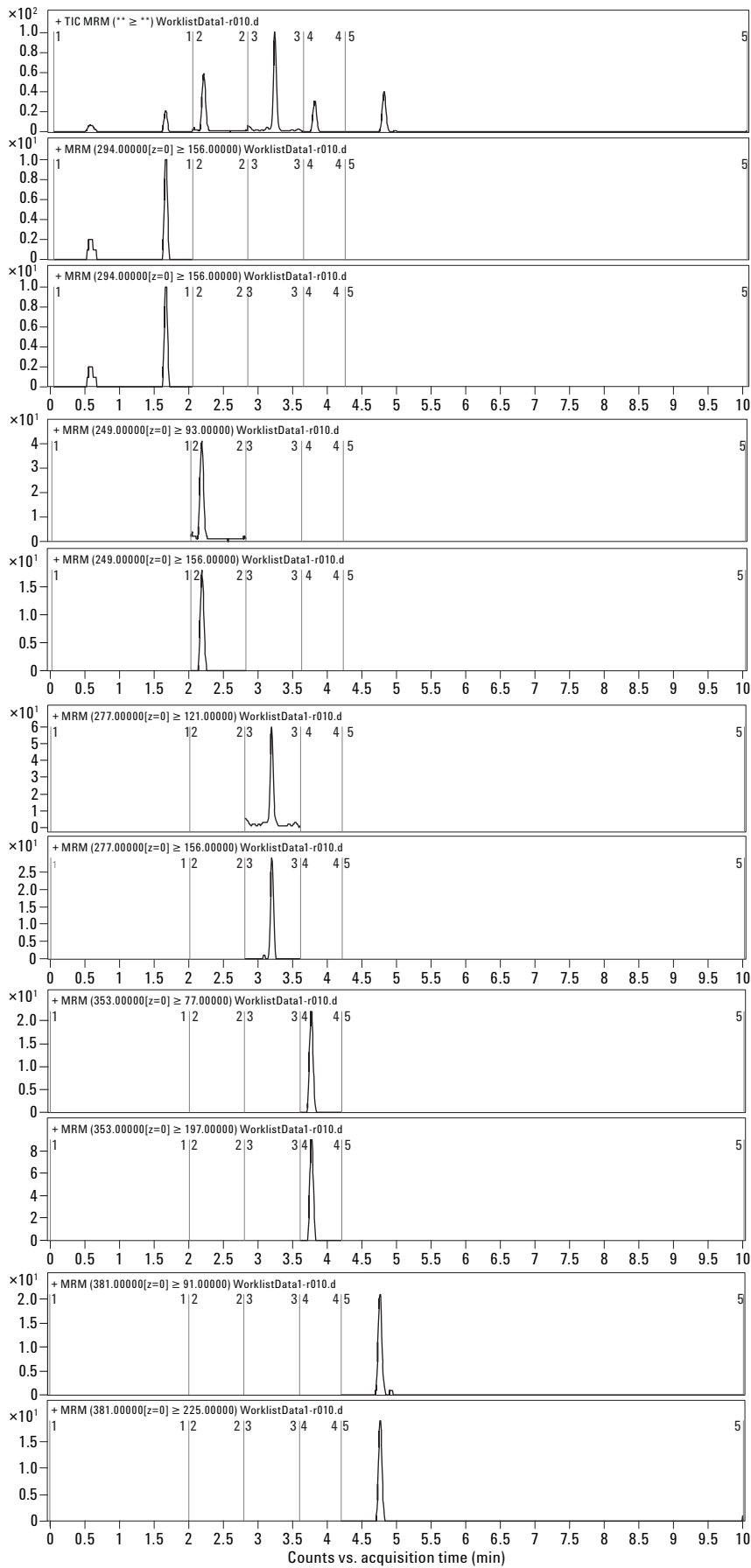


图5. 1 ppb 辣椒粉加标样品。最上方为总 MRM 色谱图，余下分别为 5 种被分析物的定量和定性裂解离子图

## 通过离子比值进行结构确证

欧盟的 2002/657/EC 号决议设定了结构确证条件，包括两种 MS/MS 裂解反应离子及其相对比值（丰度最大的两种离子）[5]。这些离子比值的限度标准根据其相对强度给定，如表 3 所示，可见相对比值越高，可接受的允差范围越小。

我们对溶剂和基质中被分析物的离子比值都进行了测定，发现基质对测得的比值几乎没有影响。以苏丹红 I 为例，两种离子的比值见表 4。另外，使用咖喱粉的 1 ppb 加标样品进行了方法的重复性测试。20 次重复测定的结果如表 5 所示，证明方法性能良好，在 25% 的允差范围内。所有用于验证研究的样品均满足有关确证标准的要求。

表 3. LC-MS<sup>n</sup> 相对离子强度的最大允许公差

两种裂解反应离子的相对强度 (相对于强度最大离子的 %)	LC-MS <sup>n</sup> 的公差 (%)
> 50	± 20
> 20-50	± 25
> 10-20	± 30
≤ 10	± 50

表 4. 被测基质的 100 ppb 加标样品中苏丹红 I 的定量与定性裂解离子比值

基质	比值
溶剂	46.8
咖喱粉 (Madras)	48.5
红椒粉 (Korean Farm)	46.5
红椒粉 (Oriental Mascot)	46.6
伍斯特郡辣酱油 (Lea & Perrins)	47.7

表 5. 咖喱粉中 1 ppb 苏丹红 I 离子比值的重复性

	定量离子 (249-93)	定性离子 (249-156)	比值
1	130	58	45.0
2	141	65	46.0
3	145	71	48.9
4	152	62	41.0
5	135	66	49.1
6	146	66	45.3
7	134	64	47.7
8	139	69	49.5
9	137	71	51.8
10	147	64	43.9
11	143	61	42.4
12	156	65	41.7
13	147	64	43.5
14	144	64	44.7
15	148	65	44.1
16	152	63	41.2
17	143	68	47.7
18	140	66	46.7
19	141	62	44.2
20	142	62	43.8
平均值	143.1	64.8	45.4
STD (%)	4.49	4.87	6.55

## 线性、灵敏度和回收率

使用皮尔逊相关系数 ( $R^2$ ) 作为对标准曲线线性的量度， $R^2$  值至少为 0.99 才被认为可以接受。各种食品基质中染料的线性均在 0.99 以上，只有 1 ppm 标准溶液例外，表现出饱和性，可能是电喷雾离子流达到了饱和。如果略去该浓度不计，所有基质中所有校正曲线的  $R^2 > 0.99$ 。其中一个例子见图 6，为红椒粉的苏丹红 I 加标样品。

通过分析浓度为 0.2 ppb 的各个染料标准溶液，对各种染料的检测限进行估计。总 MRM 色谱图如图 7 所示。由于每种信号的噪音都很小，难以准确地确定 3:1 的信噪比。提高电子倍增器的增益，则信号和噪音同时增大，并且使得测定更准确。因此，对于检测限接近这一浓度水平的估计是合理的。

最后，由于伍斯特郡辣酱油的样品制备过程是一种液液萃取，考察了该样品制备过程的回收率。对 100 ppb 和 1 ppb 两种浓度水平分别重复检测三次，回收率测定的结果见表 6，显示了合理的回收率水平。

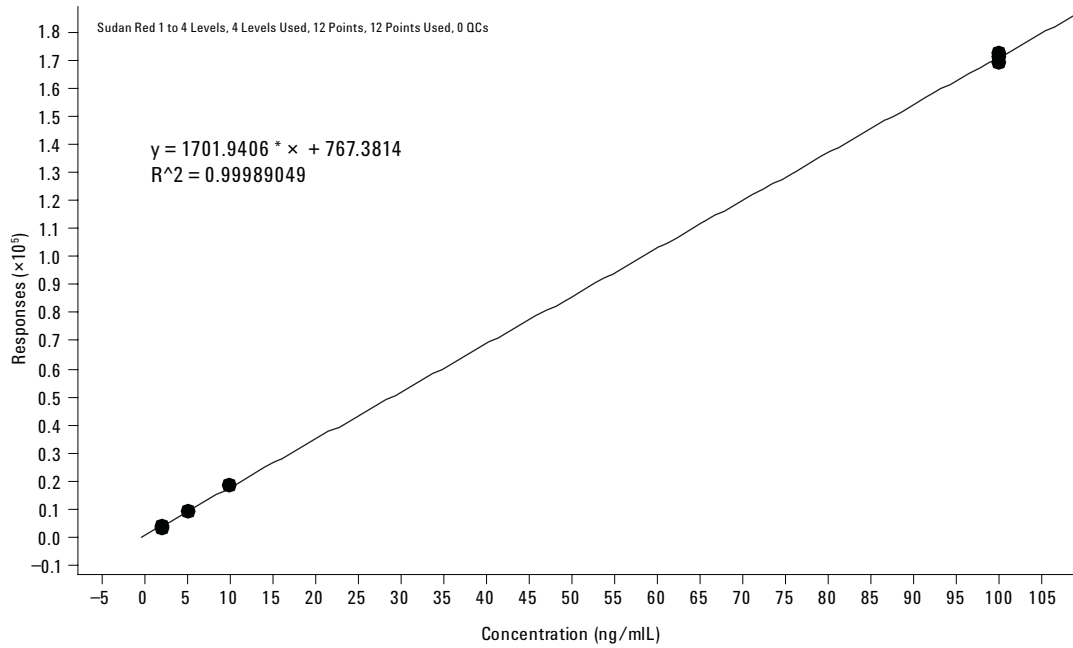


图 6. 辣椒粉中 1 ppb - 100 ppb 苏丹红 I 的标准曲线

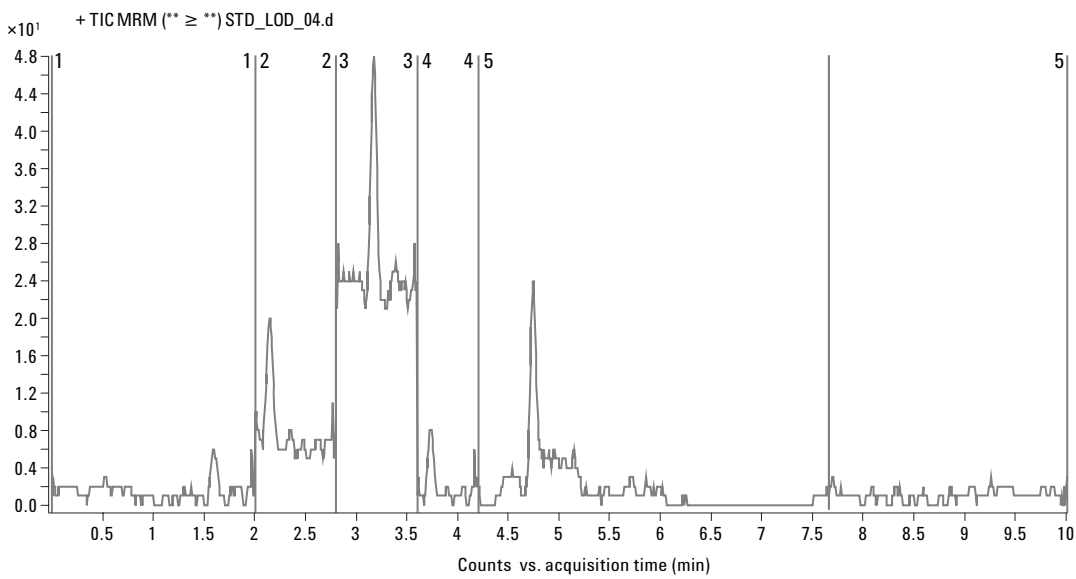


图 7. 溶剂中浓度为 0.2 ppb 的各种染料的 MRM 色谱图，代表接近检测限的响应值

表 6. 伍斯特郡辣酱油中 5 种染料的回收率

	对位红 (%)	苏丹红 I (%)	苏丹红 II (%)	苏丹红 III (%)	苏丹红 IV (%)
100 ppb 回收率 (n = 3)	57.8	71.0	63.4	62.1	70.2
1ppb 回收率 (n = 3)	54.5	66.2	50.1	54.1	51.2

## 结论

本文中阐述的对四种不同基质中苏丹红类化合物和对位红的分析方法是高效的，符合定量和结构确证的标准。方法优化简单，因为质谱仪的参数很少需要调整。另外，达到了方法确认的基本要求，包括灵敏度、重复性、线性和回收率。这显示 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱系统是用于分析食品调味品中苏丹红和其他偶氮染料的高效仪器。

## 参考文献

1. IARC *Summaries and Evaluations*; Sudan I; International Agency for Research on Cancer: 1975.
2. 2003/460/EC: Commission Decision of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chili and hot chili products (notified under document number C[2003] 1970) OJ L154/114 (21.6.2003).
3. 2004/92/EC: Commission Decision of 21 January 2004 on emergency measures regarding chili and chili products (notified under document number C[2004] 68) OJ L27/52 (30.1.2004).

4. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, "Accurate Mass Measurements for the Confirmation of Sudan Azo Dyes in Hot Chili Products by Capillary Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Quadrupole Orthogonal-Acceleration Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A* **2004**, 1058, (1-2), 127-135.
5. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C[2002] 3044), OJ L221/8 (17.8.2002) In 2002; Vol. L221, p 8.

## 更多信息

如需了解更多有关产品和服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

安捷伦公司对本材料中可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技，2007

中国印刷  
2007年9月27日  
5989-7308CHCN