

## 使用配备Xevo TQD的ACQUITY UPLC H-Class系统对辣椒粉中的苏丹红及其他违禁染色剂进行快速分析

Dimple Shah,<sup>1</sup> Evelyn Goh,<sup>2</sup> Jennifer Burgess<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德)

<sup>2</sup> 沃特世亚太公司 (新加坡)

### 应用优势

- 在12分钟内完成所有列出染色剂的分离和检测。
- 使用QuEChERS简化的样品制备和快速检测方法进行高通量的常规应用。
- 使用ACQUITY UPLC® H-Class系统和Xevo® TQD降低定量限。
- TargetLynx™应用软件可以快速鉴定、定量并突出显示所有超过规定限值的样品。

### 沃特世解决方案

ACQUITY UPLC H-Class 系统

Xevo TQD MS 系统

ACQUITY UPLC BEH 色谱柱

DisQuE™ 分散型样品制备

MassLynx® 软件4.1版

### 关键词

苏丹红, 偶氮染色剂, 辣椒粉, 香料, QuEChERS

### 简介

苏丹红是塑料和其他合成材料着色常用的一种合成染色剂。由于色彩鲜艳, 这种染色剂曾被不法商人用来增强多种食品的颜色, 例如香料、香料混合物和酱料等。苏丹红和偶氮染色剂均被国际癌症研究机构(IARC)划分为潜在遗传毒性物质和/或致癌物质。它们的降解产物也被认为具有致癌性。因此, 欧盟(EU)委员会决议2003/460/EC强制要求对辣椒粉以及含有辣椒粉的产品进行苏丹红一号的检测。2004年, 这项决议扩展至包括苏丹红二号、三号和四号(2004/92/EC)。

尽管已经禁止使用苏丹红作为食品添加剂, RASFF(食品和饲料快速预警系统)在2011年和2012年仍然在不同食品中多次检出苏丹红阳性<sup>1</sup>。

这些染色剂的非法使用会产生公共健康风险, 因此开发出简单、灵敏、可靠的分析检测方法至关重要。根据欧洲食品检测实验室数据, 香料中苏丹红和偶氮染色剂的典型报告限值在10至50 µg/kg之间。

本应用纪要介绍了一种快速而灵敏的方法, 采用QuEChERS提取程序和配备MS/MS的UPLC®分离对11种苏丹红和偶氮染色剂进行检测和定量。

## 实验

### UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class		
流动相A:	水+ 0.1%甲酸		
流动相B:	甲醇+ 0.1%甲酸		
流动相C:	乙腈+ 0.1 %甲酸		
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 2.1 x 100 mm, 1.7 µm		
柱温:	45 °C		
进样体积:	5 µL		
流速:	0.4 mL/min		
总运行时间:	12.0 min		
清洗溶剂:	乙腈		
清除溶剂:	10%甲醇		
梯度:			
时间 (min)	%A	%B	%C
初始	80	10	10
0.5	40	30	30
5.0	0	50	50
9.0	0	50	50
9.1	80	10	10
12.0	80	10	10

### 质谱条件

MS系统:	Xevo TQD
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	1.5 kV
源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气:	1000 L/h
采集:	多反应监测 (MRM)

## 标准品

苏丹红一号、三号、四号, 苏丹红G, 苏丹红7B, 苏丹黑B, 二甲基黄和罗丹明B购自Sigma-Aldrich。苏丹橙G和对位红购自AccuStandard, 苏丹红二号购自Fisher Scientific。各染色剂的储液使用乙腈配制, 浓度为1 mg/mL。工作溶液也采用乙腈配制。

## 样品

本应用纪要中分析的样品包括受污染和未受污染的辣椒粉和咖喱粉。表1列出了14种样品各自的样品类型。

表1. 样品标识代码和样品描述。

样品编号	描述
样品 A	辣椒粉 1
样品 B	红辣椒 1
样品 C	红辣椒 2
样品 D	辣椒碎
样品 E	红辣椒 3
样品 F	辣椒粉 2
样品 G	辣椒粉 1
样品 H	咖喱粉
样品 I	姜黄粉 1
样品 J	姆马萨拉 2
样品 K	咖喱粉 3
样品 L	姆马萨拉 2
样品 M	辣椒粉 3
样品 N	辣椒粉 4

## 样品制备

使用Waters® DisQuE QuEChERS (CEN方法15662)<sup>2</sup>制备所有样品。首先, 称取2 g粉末(辣椒/咖喱/姜黄)放入离心管中。将样品与8 mL水混合, 涡旋混合30秒。用10 mL乙腈对混合物进行萃取, 然后加入QuEChERS CEN材料(4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl和1.5 g柠檬酸钠)。将所得混合物振摇一分钟。然后将试管在4000 rpm下离心五分钟。取上清液加入样品瓶中待分析。

## 采集和处理方法

所有化合物均从Quanpedia™数据库中选择两种MRM通道数据。

最强的通道用于定量(定量离子)，次强的通道用于确证(定性离子)。通道的驻留时间均经过自动优化，每个色谱峰至少12个点。所有化合物的MRM通道、锥孔电压和碰撞能量以及预期保留时间如表2所示。

采用MassLynx软件4.1版采集数据，并用TargetLynx™应用软件进行处理。

表2. 苏丹红和偶氮染色剂的MRM通道及保留时间列表。

名称	RT (min)	母离子 ( <i>m/z</i> )	锥孔 电压 (V)	产物 1 ( <i>m/z</i> )	碰撞 能量 1 (V)	产物 2 ( <i>m/z</i> )	碰撞 能量 2 (V)
二甲基黄	4.12	226.1	42	77.0	30	121.0	25
对位红	4.32	294.1	34	156.1	18	128.0	34
罗丹明 B	3.35	443.3	80	399.2	42	355.2	60
苏丹黑 B	6.53	457.1	56	246.3	26	142.1	38
苏丹红一号	4.71	249.1	30	128.0	28	156.0	20
苏丹红二号	5.64	277.1	30	121.0	20	156.0	20
苏丹红三号	6.07	353.2	50	197.1	19	156.0	25
苏丹红四号	6.74	381.2	50	106.1	44	224.0	22
苏丹橙 G	3.16	215.1	34	93.0	25	122.0	20
苏丹红 7B	6.54	380.15	34	183.1	20	169.0	30
苏丹红 G	4.65	279.0	28	123.0	18	108.0	34

## 结果与讨论

所有11种染色剂的化学结构如图1所示。采用ACQUITY UPLC H-Class系统，在12分钟内实现了这些染色剂的分离。图2显示了各染色剂在溶剂标准品中的MRM叠加谱图，除对位红浓度为10  $\mu\text{g/L}$  (相当于香料样品中50  $\mu\text{g/kg}$ ) 外，其余染色剂浓度均为2  $\mu\text{g/L}$  (相当于香料样品中10  $\mu\text{g/kg}$ )。

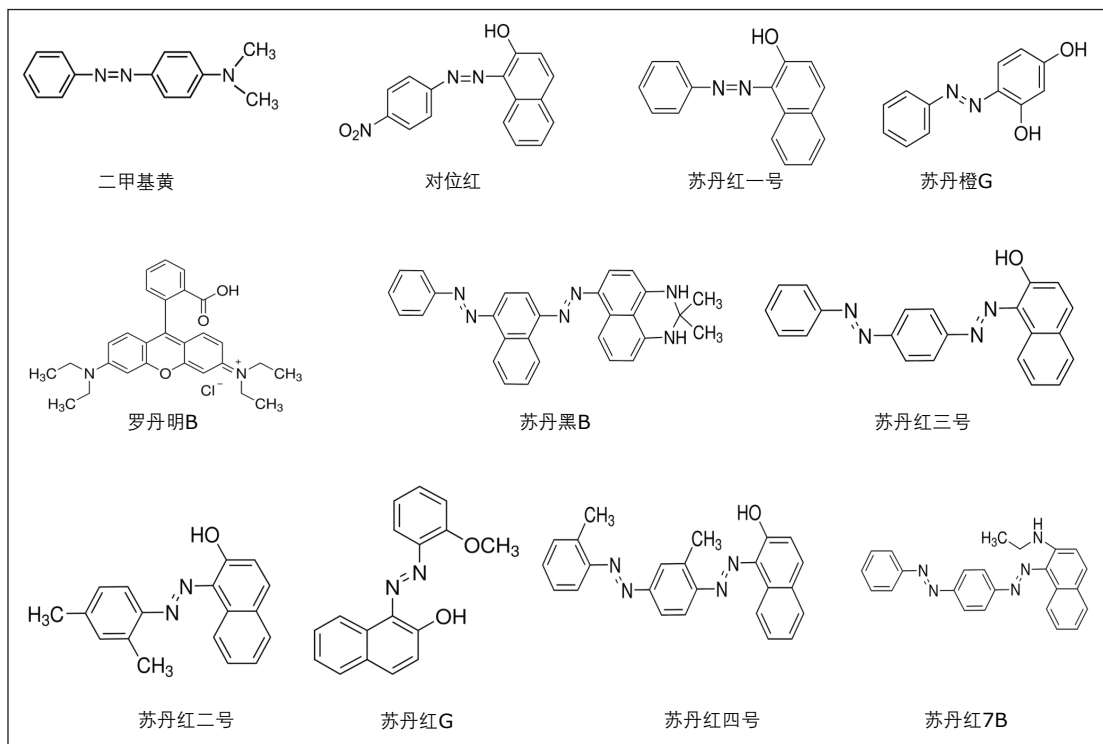


图1. 染色剂结构。

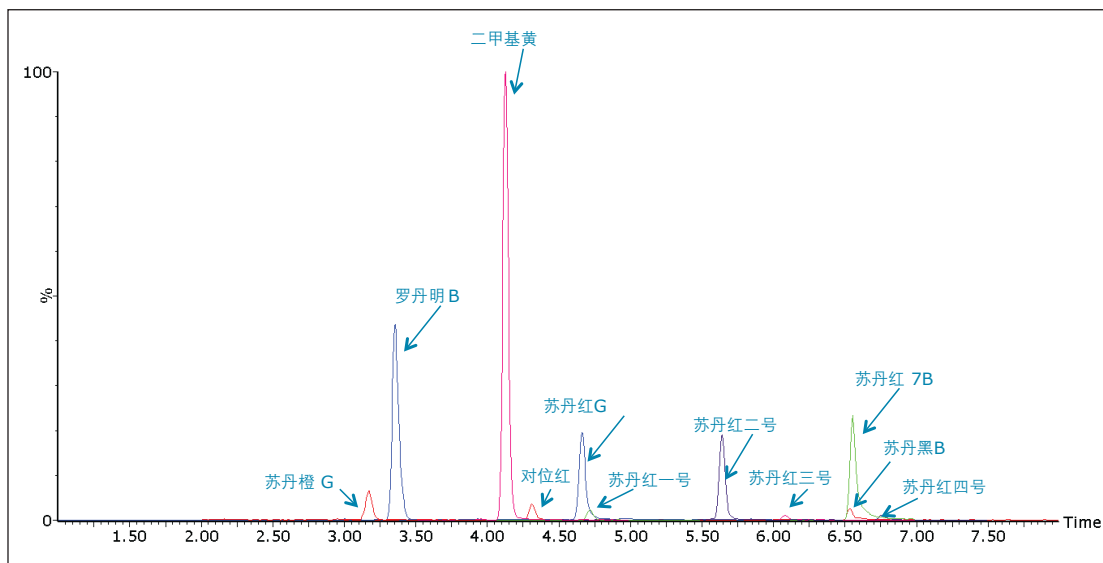


图2. 溶剂中10种染色剂在2  $\mu\text{g/L}$  浓度下 (相当于香料样品中10  $\mu\text{g/kg}$ ) 的MRM叠加谱图和对位红在10  $\mu\text{g/L}$  浓度下 (相当于香料样品中50  $\mu\text{g/kg}$ ) 的MRM叠加谱图。

## 线性

用辣椒粉3(样品M)对表2列出的所有染色剂进行了筛查, 结果不含这些染色剂。因此, 我们选择它来评估方法回收率。溶剂和基质加标校准(MMS)曲线用浓度为0.5、1、2、4、8、16、32、64和128  $\mu\text{g/L}$  (相当于香料样品中2.5至640  $\mu\text{g/kg}$ ) 的10种染色剂加标, 对位红加标比其他染色剂高五倍, 重复三次进样。通过计算校准曲线的决定系数( $r^2$ )检查线性, 结果是样品M中所有染色剂和溶剂的决定系数均在0.99以上。图3显示了样品M中苏丹红三号的MMS曲线示例。

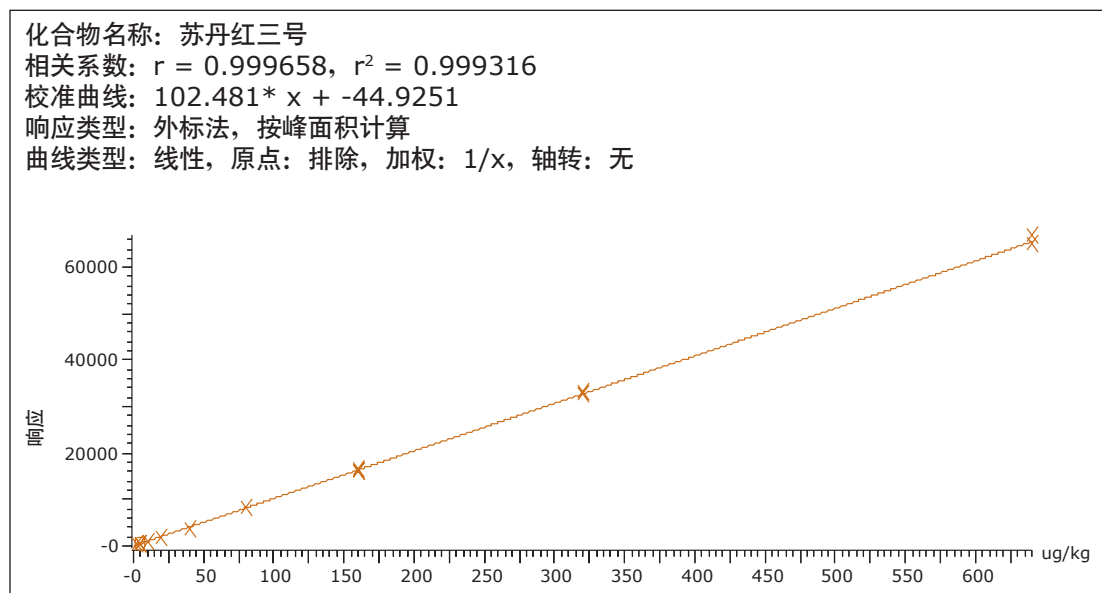


图3. 苏丹红三号的基质加标校准曲线, 浓度为0.5 ppb至128  $\mu\text{g/L}$  ppb (相当于样品M中2.5至640  $\mu\text{g/kg}$ )。

## 回收率

为了计算方法回收率, 对样品M预加标( $n=3$ ), 10种染色剂为10  $\mu\text{g/kg}$ , 对位红为50  $\mu\text{g/kg}$ , 然后进行上述同样的样品制备步骤。对照MMS曲线对预加标样品进行定量, 计算样品M中染色剂的回收率。回收率百分比如图4所示, 范围在60%至95%之间。考虑到基质的高度复杂性, 同时为了提高一些分析物的回收率, 可以为方法增加一个或多个内标。

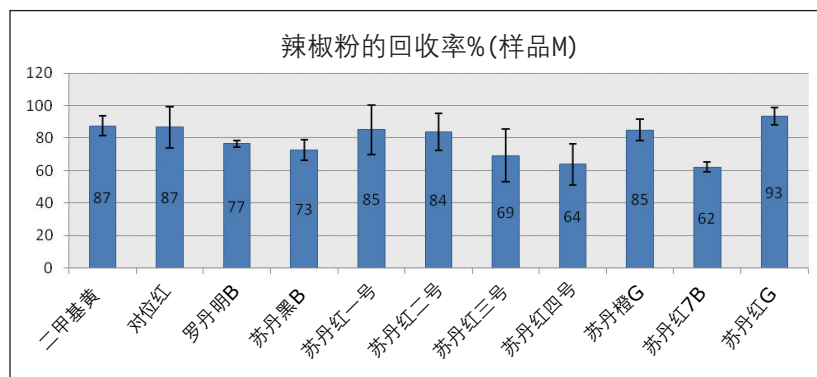


图4. 辣椒粉3(样品M)中10种染色剂在10  $\mu\text{g/kg}$ 下的回收率%和对位红在50  $\mu\text{g/kg}$ 下的回收率%。



样品分析

如前所述，对表2列出的14个不同香料样品进行萃取，然后重复分析三次。将所有样品对照样品M的基质加标校准曲线进行定量。表3显示了14个样品的浓度测量结果。

染色剂	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
二甲基黄	4.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0	ND	ND
对位红	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
罗丹明 B	13.9	ND	ND	ND	ND	1.0	ND	0.7	50.3	25.7	ND	24.8	ND	ND
苏丹黑 B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹红一号	4.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14.0	ND	ND
苏丹红二号	4.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹红三号	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹红四号	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹橙 G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	276	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹红 7B	2.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苏丹红 G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

表3. 14个样品中测得的染色剂浓度(浓度单位为µg/kg)。  
\*ND表示未检出

在14个样品中，有6个检出含有苏丹红和偶氮染色剂。样品A含有5种违禁染色剂，其中罗丹明B(13.9 µg/kg)超出规定限值。咖喱粉(样品H)中检出苏丹橙G含量偏高(276 µg/kg)。样品I、J和L中检出罗丹明B超出10 µg/kg的规定限值。样品A(4.6 µg/kg)和样品L(14.03 µg/kg)中检出苏丹红一号。以上检测结果表明，这种方法的灵敏性和选择性适用于测定各种香料中的违禁染色剂。因此，可对此方法进行进一步的准确定量验证。

图5显示了样品A中检出的所有化合物的色谱图。

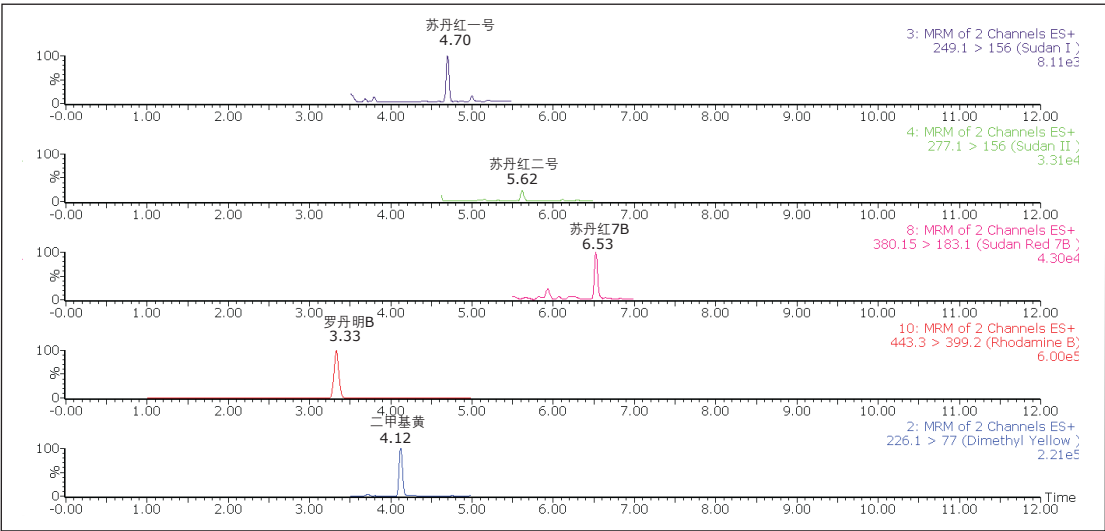


图5. 辣椒粉1(样品A)中检出的所有染色剂的色谱图。

在本研究中，使用了一种经检测不含任何目标染色剂的辣椒粉绘制基质加标校准曲线。但是应当指出，在一些样品中，不同基质的基质效应可能差异很大。在处理这些复杂基质时，为了确保定量，建议使用同位素标记的内标或标准品加入法。

TargetLynx应用软件可以快速鉴定出含有目标分析物的样品，也可以用于突出显示任何超出分析质量控制标准的参数。图6显示了样品I的结果，其中罗丹明B检测结果高于10 µg/kg。如图6所示，TargetLynx快速鉴别出了超出建议规定限值的化合物，并将浓度进行着重标记(图6红色框中所示)。除了定量结果之外，TargetLynx报告还显示了使用预期离子比率确证的化合物。如果样品的离子比率超出欧盟委员会指令2002/657/EC规定的容差限值，就会自动标记。

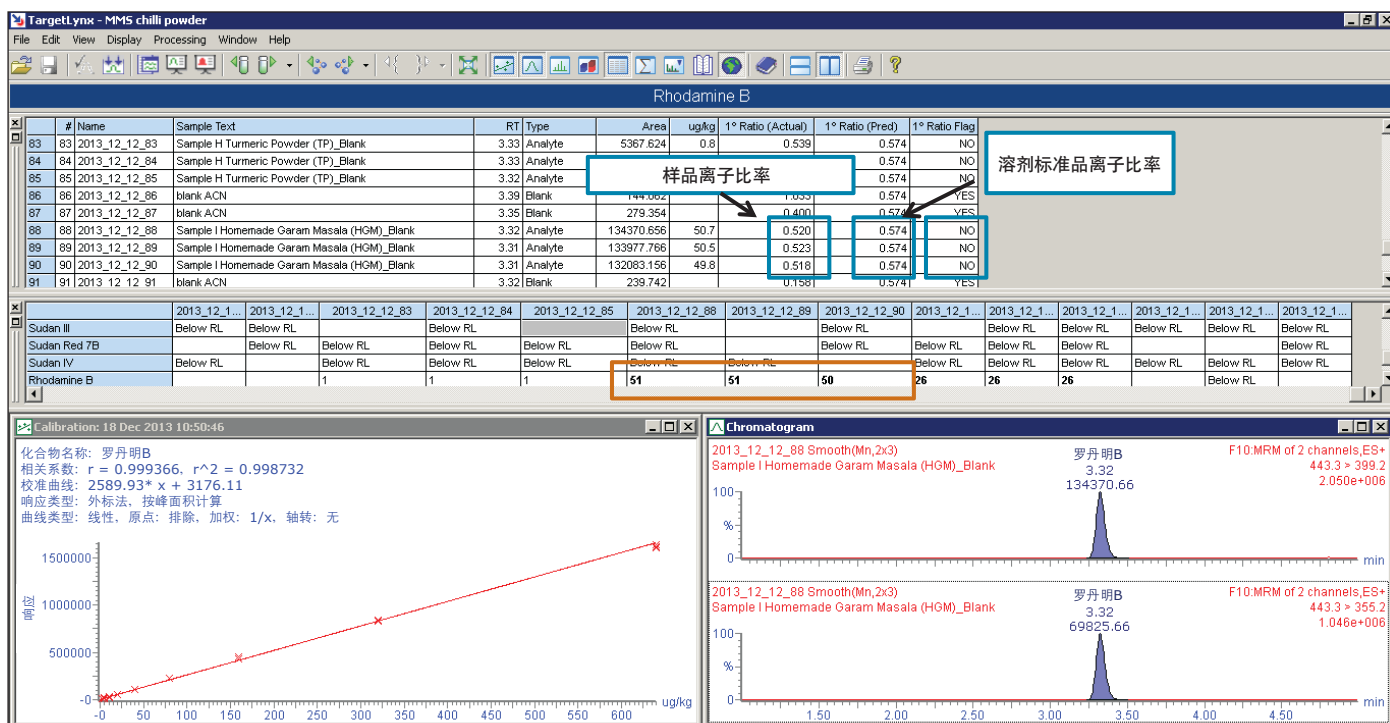


图6. TargetLynx鉴别出样品I中超出染色剂浓度规定限值的化合物。

## 基质效应

通过比较基质校准曲线的斜率与溶剂校准曲线的斜率，对基质效应进行了研究。表4显示了辣椒粉3(样品M)中的基质效应。斜率为1表示没有基质效应，基质因数小于1表示离子抑制，基质因数大于1表示离子增强。

染色剂	辣椒粉 斜率
二甲基黄	0.56
对位红	0.19
罗丹明B	1.01
苏丹黑B	2.63
苏丹红一号	0.84
苏丹红二号	0.61
苏丹红三号	1.62
苏丹红四号	0.99
苏丹橙G	0.57
苏丹红 7B	0.71
苏丹红 G	0.70

表4. 辣椒粉3(样品M)中的基质效应。

在样品M中，苏丹红一号、四号和罗丹明B表现出的基质效应极低或完全没有，而苏丹橙G、二甲基黄、苏丹红二号、苏丹红G、苏丹红7B和对位红观察到了离子抑制效应。苏丹黑B和苏丹红三号在样品M中表现出离子增强效应。尽管基质效应存在巨大差异，此方法仍可在不同测试香料样品中检出并定量以上列出的所有染色剂。为了进一步降低基质效应，可以采用额外的样品制备步骤。



## 结论

本方法将简便的QuEChERS样品制备程序和UPLC-MS/MS检测相结合，对不同香料中11种苏丹红和偶氮染色剂进行了分析。

虽然基质效应显著，但配备Xevo TQD的ACQUITY UPLC H-Class系统仍然提供了污染样品中苏丹红和偶氮染色剂所需的检测水平。

使用TargetLynx应用软件进行自动峰处理、定量和标记可以快速鉴别不合规样品。

## 参考文献

1. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>
2. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003048en.pdf>

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UPLC, MassLynx, Xevo和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。  
TargetLynx, Quanpedia和DisQuE是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自所有者所有。

©2014 沃特世公司。印制于中国。 2014年3月720004975ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司  
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866  
上海: 021 - 6156 2666  
广州: 020 - 2829 5999  
成都: 028 - 6578 4990  
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676  
[www.waters.com](http://www.waters.com)