超高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定辣椒制品中的 4 种苏丹红

郝家勇，陈霞，李红敏，方婷婷

（新疆农垦科学院，农业部食品质量监督检验测试中心，新疆石河子 832000）

摘要：本文采用与苏丹红染料作用更强的碱性氧化铝柱为固相萃取小柱，建立了超高效液相色谱-质谱法测定辣椒制品中 4 种苏丹红的测定方法。分别对提取溶剂、固相萃取小柱淋洗液、洗脱液及液相色谱条件进行了优化。10 mL 乙腈-二氯甲烷（3:2，*V/V*）混合溶液作为提取液，依次用 10 mL 正己烷、4 mL 乙酸乙酯-正己烷（1:1，*V/V*）混合溶液作为淋洗液，12 mL 的 5%酸化甲醇-乙酸乙酯（1:1，*V/V*）混合溶液作为洗脱液。采用 ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(2.1×100 mm，1.7 μm)，以 0.3%甲酸乙腈溶液，0.3%甲酸水溶液为流动相，等度洗脱。4 种苏丹红基质添加标准曲线在 10~500 μg/L 的浓度范围内有良好的线性关系，线性相关系数均大于 0.995。苏丹Ⅰ~Ⅳ的检出限分别为 5.0、5.0、4.0、4.0 μg/kg。在 10~150μg/kg 浓度范围做空白样品添加实验，平均回收率在 71.4~104.2%之间，相对标准偏差（RSD, n=6）在 4.6~8.9%之间。应用本方法测试 380 份样品，其中阳性样品 36 份，阳性样品检出组分主要为苏丹Ⅳ。

关键词：辣椒制品；苏丹红；超高效液相色谱-串联四级杆质谱；碱性氧化铝固相萃取柱

文章篇号：1673-9078(2014)11-235-239 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.041

Determination of Four Sudan Dyes in Chili Products Using Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem Quadrupole Mass Spectrometry

HAO Jia-yong, CHEN Xia, LI Hong-min, FANG Ting-ting

(Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Science, Food Quality Supervision and Testing Center of Ministry of Agriculture, Shihezi 832000, China)

Abstract: Using a basic alumina column, which has stronger reaction with sudan dye, as a solid phase extraction (SPE) column, an ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS) method was developed for the determination of four sudan dyes in chili products. The extraction solvent, washing liquid for the SPE column, eluent solvent, and liquid chromatography conditions were optimized separately. The sudans were extracted by using 10 mL mixed acetonitrile and dichloromethane solution (3:2, *V/V*) was used to extract the Ten milliliters of n-hexane and 4 mL mixed ethyl acetate and n-hexane (1:1, *V/V*) were used as washing liquids. Twelve milliliters of a mixed 5% acidified methanol and ethyl acetate solution (1:1, *V/V*) was used for elution. An ACQUITY BEH C_{18} chromatography column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) was used with mobile phases composed of 0.3% formic acid acetonitrile solution and 0.3 % formic acid water solution. The substrate spiked standard curves of the four sudan dyes had good linear correlations in the range 10~500 μg/L, with all correlation coefficients above 0.995. The limits of detection (LOD) of the four sudan dyes were 5.0, 5.0, 4.0, and 4.0 μg/kg. The recovery experiment, performed by adding samples, was carried out with blank samples at concentrations between 10-150 μg/kg. The average recovery ratio was 71.4%~104.2%, and the relative standard deviation (RSD, n = 6) was 4.6%~8.9%. Three hundred and eighty samples were examined using this method, and 36 samples were positive for sudans, and the component was primarily sudan IV.

Key words: chili products; sudan dyes; ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry; basic alumina solid phase extraction column

常见的苏丹红染料包括苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ，是一类人工合成偶氮类化工染料，具有亲脂性，广泛应用于溶剂、纺织、皮革等化工领域，具有色泽稳定、价格低廉等优点，但一些不法商家将其作为食品着色剂添加到辣椒粉、辣椒油、香肠、腊肉、咸鸭蛋等食

收稿日期：2014-04-11

作者简介：郝家勇（1977-），男，高级实验师，主要从事食品安全检测研究工作

品中。已有研究表明，苏丹红具有致突变性和致癌性，因此，国际癌症研究机构将苏丹红Ⅰ~Ⅳ归为致癌物[1]，我国也禁止其作为食品添加剂在食品行业内使用。目前测定苏丹红Ⅰ~Ⅳ的仪器方法主要有液相色谱法[2~7]和液相色谱-质谱法[8~10]。辣椒制品由于基质复杂、天然色素影响严重，因此在测定辣椒制品中苏丹红Ⅰ~Ⅳ过程中前处理是关键，目前测定辣椒制品中苏丹红Ⅰ~Ⅳ的前处理主要采用有机溶剂提取，提取液直接上机和固相萃取这两种方式。提取液直接上机的方法使用的为未经过净化的提取液，会对仪器测定苏丹红Ⅰ~Ⅳ产生很大的干扰，对于液相色谱仪的检测，过高的干扰影响了检测痕量样品定性和定量的准确性，而对液相色谱-质谱仪来说，未经净化的提取液会产生严重的基质效应，并且会污染仪器。固相萃取方式目前主要采用中性氧化铝层析柱法[11]和基质固相分散萃取法[12]。在使用氧化铝层析柱时，氧化铝的粒径、活度等不确定因素会严重影响回收率和重现性，而且氧化铝在使用前要经过活化、灭活等步骤，费时、费力，并且在使用过程中消耗大量的有机试剂。基质固相萃取法是一种比较新的样品前处理技术，将样品与固相萃取材料充分混合研磨、装柱，选择合适的溶剂洗脱待测组分，该方法具有简便、溶剂用量少的优点，但操作较复杂不适合测定大批量样品。

本文根据苏丹红的化学性质采用市售成品碱性氧化铝小柱作为固相萃取柱，碱性氧化铝柱的 pH 值约为 8.5，具有很高的活性，主要用于吸附极性化合物。以特异性好、灵敏度高的液相色谱-串接质谱作为定性、定量手段，建立了一种回收率高、快捷、灵敏、稳定的检测方法，为辣椒制品高通量筛查和检测提供参考方法和依据。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

超高效液相色谱-质谱联用仪，ACQUITY UPLC-Xevo TQ；色谱柱，ACQUITY BEH C_{18}(2.1×100 mm，1.7 μm)均为美国 Waters 公司；超声仪，KQ-600DE，昆山市超声波仪器有限公司；涡旋振荡器，IKA MS3，德国；旋转蒸发仪，BUCHI，瑞士；离心机，Sigma 3-30K，德国。

1.2 材料与试剂

苏丹红Ⅰ~Ⅳ标准对照品，苏丹Ⅰ纯度 90.5%，苏丹Ⅱ纯度 88.7%，苏丹Ⅲ纯度 96.5%，苏丹Ⅳ纯度 94.0%，购于上海安谱科学仪器有限公司；丙酮、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、甲酸均为国产分析纯试剂，购于天津科密欧化学试剂有限公司；水为去离子水。固相萃取小柱，Al_2O_3-b，美国 Waters 公司，1.0 g/6 mL；干辣椒、辣椒面、辣椒油、辣椒酱等为新疆食品药品质量监督管理局所抽样取得的新疆各地样品。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取 25.0 mg 4 种苏丹红染料于 250 mL 容量瓶中，用少量二氯甲烷溶解，乙腈定容至刻度线，配制成 100.0 mg/L 的标准储备液，冷冻保存。另取 50 μL 混合标准储备液，用甲醇稀释至 5.0 mL，配制成 1.0 μg/mL 的标准中间液。取空白样品，按照样品前处理过程处理，定容前加入适量的标准中间液，用甲醇定容至 2.0 mL，配制成系列空白基质添加标准工作液。

1.3.2 仪器条件

流动相：0.3%甲酸乙腈溶液+0.3%甲酸水溶液(90+10)等度洗脱；流速：0.4 mL/min；柱温：40 ℃；离子化模式：ESI，正离子；扫描模式：MRM(多反应监测)；毛细管电压：3.50 kV；去溶剂气温度：600 ℃；去溶剂气流量：1000 L/h；锥孔反吹气流量 50 L/h。母离子、子离子、二级锥孔电压及碰撞能优化结果如表 1 所示。

表 1 质谱条件优化结果

Table 1 Optimized Results of Mass

	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	驻留时间/s	二级锥孔电压/V	碰撞能/V
苏丹Ⅰ	249.2	93.1*	0.10	22	14
	249.2	128.1	0.10	22	22
苏丹Ⅱ	277.2	156.0*	0.10	22	12
	277.2	120.0	0.10	22	20
苏丹Ⅲ	353.2	156.0*	0.10	38	22
	353.2	197.1	0.10	38	24
苏丹Ⅳ	381.2	224.2*	0.10	38	20
	381.2	90.8	0.10	38	22

注：*为定量离子。

1.3.3 样品提取

固体辣椒制品：将样品绞碎混匀，称取 1 g 样品于 50 mL 塑料离心试管中，加入 2g 无水 Na_2SO_4 振荡 1 min，加入 10 mL 乙腈-二氯甲烷（3:2，*V*/*V*）混合溶液，涡旋振荡 5 min，超声 10 min，10000 r/min 离心 5 min；取 5.0 mL 上清液移入 50 mL 鸡心瓶，旋转蒸发至干，加入 2 mL 正己烷溶解残渣，待净化。

液体样品：将样品混匀，称取 1 g 样品于 50 mL 塑料离心管中，乙腈-二氯甲烷体积（3:2，*V*/*V*）混合

溶液溶解定容至 10 mL，涡旋振荡 5 min，超声 10 min 后，取 5 mL 提取液移入 50 mL 鸡心瓶中，旋转蒸发至干，加入 2 mL 正己烷溶解残渣，待净化。

1.3.4 净化

取碱性 Al_2O_3 (1 g，6 cc)柱，依次用 4 mL 甲醇、4 mL 乙酸乙酯、6 mL 正己烷活化，待液面接近固相萃取柱筛板时加入提取液，用 2 mL 正己烷洗涤鸡心瓶后加入固相萃取柱，用 10 mL 正己烷淋洗固相萃取柱至流出液无色，用 4 mL 乙酸乙酯、正己烷（1:1，*V*/*V*）混合溶液淋洗固相萃取柱，最后用 12 mL 5%甲酸甲醇、乙酸乙酯（1:1，*V*/*V*）混合溶液洗脱待测组分至鸡心瓶中，将鸡心瓶在 45 ℃下旋转蒸发至干，用甲醇定容至 1.0 mL，过 0.22 μm 滤膜，待上机用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

本文比较了等度洗脱和梯度洗脱对 4 种苏丹红染料的影响，结果表明：等度洗脱时，苏丹Ⅰ、Ⅱ有较好响应，并且具有更好的峰型，而且采用等度洗脱有效地减少了样品分析时间。

在等度洗脱条件下，随着乙腈比例增大，苏丹Ⅰ、Ⅱ的响应增强，当乙腈比例超过 90%后，随着乙腈比例增加，苏丹Ⅰ、Ⅱ响应开始减弱，可能是乙腈比例过大影响待测组分的离子化效率。所以最终以 0.3%乙腈甲酸溶液-0.3%甲酸水溶液（90+10）作为流动相，在最佳流动相比例条件下,浓度为 50 μg/L 时，4 种苏丹红标准溶液 MRM 定量离子色谱图如图 1 所示。从图中可以看到 4 种苏丹红具有良好的峰型及响应。图 C、D 中苏丹Ⅲ、Ⅳ分别出现 2 个峰，根据文献报道[13]前一个峰为苏丹Ⅲ、Ⅳ的同分异构体。

2.2 样品前处理方法的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

考虑到苏丹Ⅰ~Ⅳ在不同溶剂中的溶解度及待测组分所处的基质环境，选择合适的提取溶剂也尤为重要，实验证明复合溶剂比单一溶剂有更好的提取效率，尤其是对苏丹Ⅲ、Ⅳ。本文分别以正己烷、丙酮、乙腈、乙腈+二氯甲烷为研究对象，结果见图 2。从图中可以看到，以乙腈+二氯甲烷混合溶液作为提取溶剂，对苏丹Ⅲ、Ⅳ具有较好的提取效果。

2.2.2 固相萃取柱的选择

根据苏丹红Ⅰ~Ⅳ的结构和化学性质，4 种苏丹红的分子结构中有羟基，其 pKa 值为 11.65，均为弱酸。在液相的 pH 值范围内苏丹Ⅰ~Ⅳ可以认为是呈现中性分子状态[13]，辣椒制品类主要干扰组分为油脂、脂肪等，所以优先考虑具有极性作用力的固相萃取柱。因为样品基质大多为非水环境，本文将氧化铝柱作为研究对象，为了防止样品中水分对氧化铝柱的影响，在样品前处理中加入无水 Na_2SO_4，除去样品中的水分。

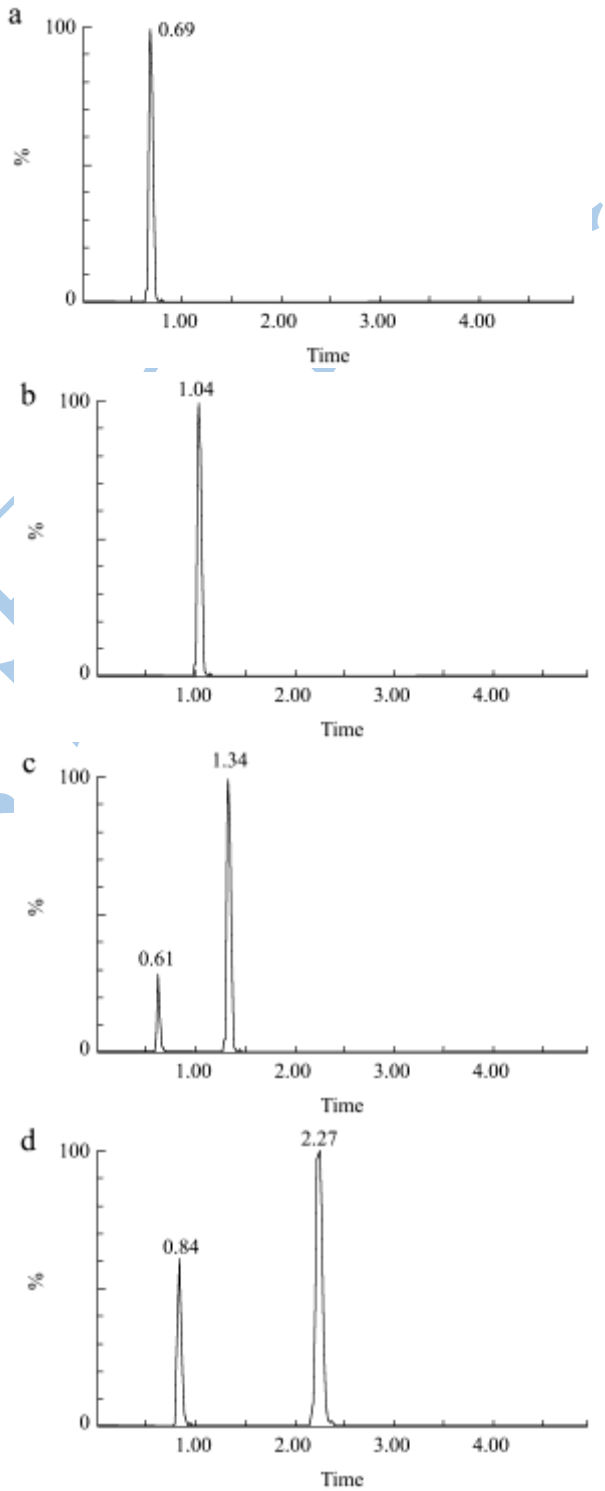


图 1 苏丹Ⅰ~Ⅳ定量离子色谱图

Fig.1 The quantitative chromatograms of sudan I-IV

注：a: Sudan Ⅰ定量离子色谱图，b: Sudan Ⅱ定量离子色

谱图，c: Sudan Ⅲ定量离子色谱图，d: Sudan Ⅳ定量离子色谱图。

本文对比了中性氧化铝层析柱与碱性氧化铝柱的净化效果，中性氧化铝层析柱的前处理方法采用GB/T 19681-2005，空白基质添加标准对照品总离子流图如图 4 所示。从图 4 中我们可以看到采用碱性氧化铝柱净化效果明显比中性氧化铝柱净化效果好，主要是因为苏丹Ⅰ~Ⅳ具有弱酸性，待测组分与碱性氧化铝柱作用力更强，可以选择洗脱能力更强的溶剂进一步洗脱杂质。

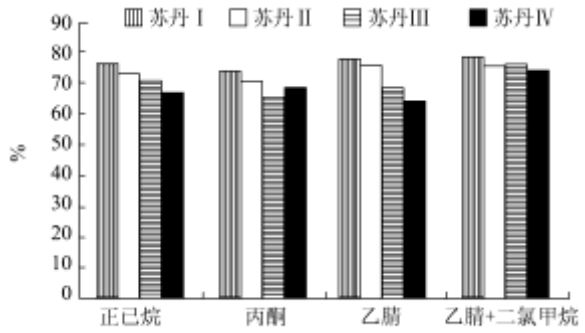


图 2 不同溶剂的提取效果

Fig.2 The results of extraction by different solvents

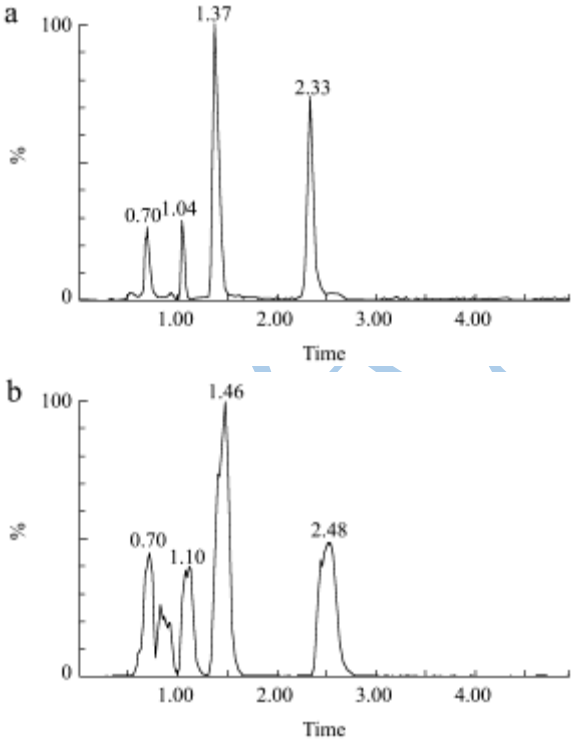


图 4 不同固相萃取柱的净化效果

Fig.4 The effects of purification with different SPE columns

注：A：Al_2O_3-b 净化后基质添加标准品总离子流图 B：Al_2O_3-N 净化后基质添加标准品总离子流图。

2.2.3 固相萃取过程中淋洗液及洗脱液的选择

淋洗液及洗脱液的选择，分别从溶剂的极性和洗脱强度这两个方面考虑，本文选用的淋洗液及洗脱液的极性指数、洗脱强度等参数见表 2。

表 2 所用溶剂参数

Table 2 The parameters of the used solvents

溶剂	极性指数 P′	洗脱强度 ε^0（硅胶）	选择性分类
正己烷	0.0	0	-
二氯甲烷	3.4	0.32	V
乙腈	6.2	0.50	VIa
丙酮	5.4	0.43	VIa
乙酸乙酯	4.3	0.45	VIa
甲醇	6.6	＞0.73	II
甲醇:乙酸乙酯(1:1)	5.4	-	-

淋洗液的选择：第一步淋洗选择正己烷作为淋洗液，用于除去基质环境中的非极性组分，本文使用 1.5 倍左右的柱体积的正己烷作为第一步淋洗液。

在第二步淋洗过程中，本文以二氯甲烷、乙腈、丙酮、乙酸乙酯和正己烷为研究对象。参考表 2 中所用溶剂的极性指数及洗脱强度，通过优化最终确定 4 mL，乙酸乙酯-正己烷（1:1，*V*/*V*）的混合溶液具有较好的淋洗效果，既能洗脱大部分极性杂质，同时又能很好的保留待测组分。

洗脱液的选择：本文以甲醇和乙酸乙酯的混合溶剂为研究对象，4 种苏丹红，除了苏丹Ⅳ，其余 3 种的回收率均在 70%以上，苏丹Ⅳ的回收率在 50~65%之间。取出固相萃取柱填料后用 5%酸化甲醇提取上机，发现有未被洗脱的苏丹Ⅳ，经过优化，洗脱液最终选取 5%甲酸甲醇-乙酸乙酯（1:1，*V*/*V*）的混合溶液作为洗脱液，甲酸的加入破坏了碱性氧化铝与苏丹Ⅳ的作用，有效地提高了苏丹Ⅳ的回收率。

2.2.4 标准曲线、线性范围、检出限（LOD）和方法定量限（LOQ）

配制 4 种苏丹红染料的浓度为 10、20、50、100、200、400、500 μg/L 混合基质添加标准工作液，以待测组分定量离子的积 Y 对应浓度 X 作图，绘制标准曲线，结果见表 3。4 种苏丹红在 10~500 μg/L 的浓度范围内有良好的线性关系，线性相关系数均大于 0.995。配制低浓度基质标准对照品，以信噪比（*S*/*N*=3）计算四种苏丹红的检出限，苏丹Ⅰ~Ⅳ检出限分别为 5.0、5.0、4.0、4.0 μg/kg，方法定量限分别为 15.0、15.0、10.0、10.0 μg/kg。

2.3 加标回收率和相对标准偏差

在 1.00 g 空白辣椒面样品中添加 1、2、10 倍定量限的 4 种苏丹红标准溶液，计算平均加标回收率。以

10 倍定量限添加做 6 份平行计算相对标准偏差，结果如表 3 所示。从表中可以看到 4 种苏丹红均有较好的回收率，平均回收率在 71.4~104.2%之间，相对标准偏差在 4.0~8.9%之间。

表 3 4 种苏丹红的线性范围、回归方程、相关系数及检出限、方法定量限

Table 3 Linear ranges, regression formula, correlation coefficients, limits of detection, and quantitation of the four sudan dyes

苏丹红染料	线性范围/(ng/mL)	回归方程	线性相关系数	检出限/(μg/kg)	方法定量限/(μg/kg)
苏丹Ⅰ	10-500	Y=13.96X-63.60	0.997	5.0	15.0
苏丹Ⅱ	10-500	Y=7.79X+7.76	0.998	5.0	15.0
苏丹Ⅲ	10-500	Y=97.27X+190.19	0.996	4.0	10.0
苏丹Ⅳ	10-500	Y=143.31X-500.93	0.996	4.0	10.0

表 4 4 种苏丹红的平均加标回收率、相对标准偏差

Table 4 Average recovery rate and relative standard deviation of the four sudan dyes

苏丹红染料	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差 RSD /(%, n=6)
苏丹Ⅰ	15.0	78.5	7.0
	30.0	85.6	
	150.0	87.7	
苏丹Ⅱ	15.0	80.2	4.6
	30.0	101.4	
	150.0	96.7	
苏丹Ⅲ	10.0	82.5	5.0
	20.0	79.6	
	100.0	104.2	
苏丹Ⅳ	10.0	71.4	8.9
	20.0	94.7	
	100.0	89.3	

2.4 实际样品的测定

采用该前处理方法对新疆食品药品监督管理局送检的辣椒制品中的苏丹红进行检测，共检测样品 380 份，其中检出阳性样品 36 份，阳性样品主要为辣椒面，阳性样品检出组分主要为苏丹Ⅳ，而且含量较高，均在 mg/kg 级以上，说明在阳性样品中添加的苏丹红染料主要为苏丹Ⅳ。

3 结论

本文采用与苏丹红作用更强的市售成品碱性氧化铝柱为固相萃取柱，通过对前处理方法、色谱条件的优化建立了辣椒制品中苏丹红的检测方法，该方法相对于目前国标方法的中性氧化铝层析柱来说，具有试剂用量少、快速、适用性强等特点，对于高通量辣椒制品筛查和检测具有一定的参考价值。

参考文献

[1] Stiborova M, Martinek V, Rydlova H, et al. Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers [J]. Cancer Letters, 2005, 220: 145-154

[2] Jindong Qiao, Hongyuan Yan, Hui Wang, et al. Simultaneous determination of four sudan dyes in egg yolks by molecularly imprinted SPE coupled with LC-UC detection [J]. Chromatographia, 2011, 73: 227-233

[3] Hanwen Sun, Na Sun, Hui Li, et al. Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorrants in meat by microwave-assisted extraction-solid-phase extraction-reversed-phase ultrahigh performance liquid chromatography [J]. Food Anal Methods, 2013, 6: 1291-1299

[4] 范文锐,吴青,劳扬,等.高效液相色谱法同时测定食品中 7 种非食用色素[J].分析化学,2012,40(2):292-297
FAN Wen-rui, WU Qing, LAO Yang ,et al. Determination of seven inedible pigments in food using high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(2): 292-297

[5] 刘珺,弓振斌.高效液相色谱-柱后在线光化学衍生荧光检测法测定辣椒油中 4 种苏丹红染料[J].色谱,2012, 30(6):624-629
LIU Jun, GONG Zhen-bin. Determination of four sudan dyes in chili oil by high performance liquid chromatography with on-line photochemical derivation and fluorescence detection [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(6): 624-629

[6] Cun Li, Ting Yang, Yan Zhang, et al. Determination of sudan dyes and para red in duck muscle and egg by UPLC [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 70: 319-322

[7] Yuangpeng Wang, Ying Sun, Yun Wang, et al. Determination of sudan dyes in environmental water by magnetic mesoporous microsphere-based solid phase extraction ultra fast liquid chromatography [J]. Anal Method, 2013, 5: 1399-1406

[8] Dongmei Chen, Xueqin Li, Yanfei Tao, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of sudan dyes and their metabolites in the edible tissues and eggs of food-producing animals [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 939: 45-50

[9] Mingming Zheng, Jianhong Wu, Yuqi Feng, et al. Rapid and sensitive determination of sudan dyes in hot chilli products by solid-phase extraction directly combined with time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal. Method, 2011, 3: 1851-1858

[10] MRVS Murty, N Sridhara Chary, S Prabhakar, et al. Simultaneous quantitative determination of sudan dyes using liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 1556-1562

[11] 食品中苏丹红染料的检测方法-高效液相色谱法[S].中华人民共和国国家标准.GB/T 19681-2005
The method for the tetermination of sudan dyes in food-High performance liquid chromatography [S]. The State Standard of People's Republic of China. GB/T 19681-2005

[12] 侯晓林,孙英健,吴国娟,等.基质固相分散术-UPLC 法检测禽蛋中对位红和苏丹红[J].食品科学,2010,31(24): 285-288
HOU Xiao-lin, SUN Ying-jian, WU Guo-juan, et al. Use of matrix solid-phase dispersion and ultra performance liquid chromatography for determination of para red and sudan Ⅰ-Ⅳ in egg yolk [J]. Food Science, 2010, 31(24): 285-288

[13] Riin Rebane, Ivo Leito, Sergei Yurchenko, et al. A review of analytical techniques for determination of sudan Ⅰ-Ⅳ dyes in food natrixes [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 2747-2757

现代食品科技