

应用纪要

## 使用液相色谱-串联四极杆质谱法分析香料中的苏丹红及其他偶氮染料

---

Christelle Robert, Marijn Van Hulle, Simon Hird, Pierre-Yves Brasseur, Nathalie Gillard

CER Groupe, Waters Corporation



---

摘要

不法商家常使用偶氮染料（包括苏丹染料）掺假，改善香料和食品的表现颜色。监查机构需要基于可靠的检测方法实施稳定的监测计划，确保食品中不含这些有害色素。我们将ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-S micro MS/MS联用，开发出一种同时测定11种偶氮染料（包括7种苏丹染料、罗丹明、二甲基黄、对位红和橙色二号）的方法，色谱运行时间为14 min。该方法使用强有机溶剂进行简单萃取，以稳定同位素类似物作为内标，并且无需任何耗时的净化步骤。分析最低浓度(0.125 mg/kg)的基质匹配标准品表现出优异的灵敏度，表明该方法能够检测提取物中更低浓度的化合物，或者最终提取物可进一步稀释后再进行LC-MS分析。在实验室内重复性(0.8%~7.7%)和实验室内重现性(1.6%~7.7%)研究中，所有分析物的平均回收率在93.8%至115.2%的范围内，方法精密密度也令人满意。该方法的性能在辣椒粉分析中得到证明，因此认为其适用于可靠定量浓度远低于干预限值的分析物，该限值是欧洲及其他地区监测食品供应中潜在非法染料发生情况的浓度。

## 优势

- 通过一次分析检测多种偶氮染料，提高实验室效率
- 使用Xevo TQ-S micro进行高灵敏度检测和可靠定量
- 分析物测量浓度远低于经济利益驱动掺假监测的限值

---

## 简介

食用色素是一类食品添加剂，用于弥补因光照、空气、水分和温度变化而导致的色泽损失，增强食品天然颜色并上色（食品原本无色或为其他颜色）。苏丹染料在许多国家/地区（包括中国、澳大利亚、加拿大和欧洲）均未被批准用作食用色素。例如，欧盟规定，所有添加剂（包括色素）都必须经过授权，并且在法规(EC) 1333/2008及其后续修正案中包含的“阳性”清单中列出使用条件<sup>1</sup>。食品中存在工业染料即构成食品掺假，因为这些物质未经授权用作食用色素，通过食品摄入这些物质会危害健康。不法商家常使用偶氮染料掺假，改善香料和食品的表现颜色<sup>2</sup>。据估计，2005年英国召回受污染产品的总成本（包括销售额损失、销毁商品、品牌形象损失、管理时间和咨询费）超过2亿欧元。

过去十年来，关于苏丹红染料造假的报道明显减少，这可能是由于业界加大了对香料中这些化合物的监测力度。然而，此类掺假行为仍然是世界各地消费者、食品行业和监管机构关注的问题。欧洲食品生产商、经销商和零售商有责任确保其产品符合欧盟法规并证明自己在运营过程中恪尽职责。监查机构需要基于可靠的检测方法实施稳定的监测计划，确保食品中不含这些有害色素。文献中报道了各种用于测定食品和饮料中染料的分析方法<sup>3</sup>。这些方法应涵盖被频繁检出（例如RASFF）并纳入任何强制性进口检测控制、被EFSA科学小组视为危害健康以及业界报道过的染料。所有这些染料均可通过LC-MS/MS进行分析，但不能一次完成，因此强极性染料

往往会被漏检。研究人员在各种食品成分和成品中都已检出染料，不过通常优先考虑香料（例如干辣椒、辣椒产品和咖喱粉）和棕榈油，其官方控制要求也日益严格。这些化合物是被禁止使用，因此不存在最大允许限值。出于实用目的，一般会设置一个浓度，如果检出的掺假物浓度低于该浓度（例如由意外污染引起），则不采取任何措施。欧盟食品链及动物健康常设委员会(SCoFCAH)于2006年6月23日在布鲁塞尔举行的会议上决定，为了在整个欧洲采取一致的执法方法，统一使用0.5 mg/kg作为食品成分（例如香料和棕榈油）中非法染料的干预限值<sup>4</sup>。随后，该决定由各个成员国的主管部门（包括比利时联邦食品链安全局(FASFC)）实施。

液相色谱与串联质谱(LC-MS/MS)的结合提供了高灵敏度和出色的选择性，已广泛应用于食品领域的痕量分析。本文介绍了一种使用UPLC-MS/MS测定辣椒粉中非法染料的简单方法，该方法使用强有机溶剂对11种染料进行萃取，以稳定同位素类似物为内标，不含任何耗时的净化步骤。

---

## 实验

### 样品提取

添加内标苏丹红一号-d5和苏丹红四号-d6后，加入乙腈一起振摇，萃取辣椒粉（图1）。使用先前表现为空白的辣椒粉提取物制备基质匹配标准品，浓度如下：0.125 mg/kg、0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg和3.0 mg/kg。

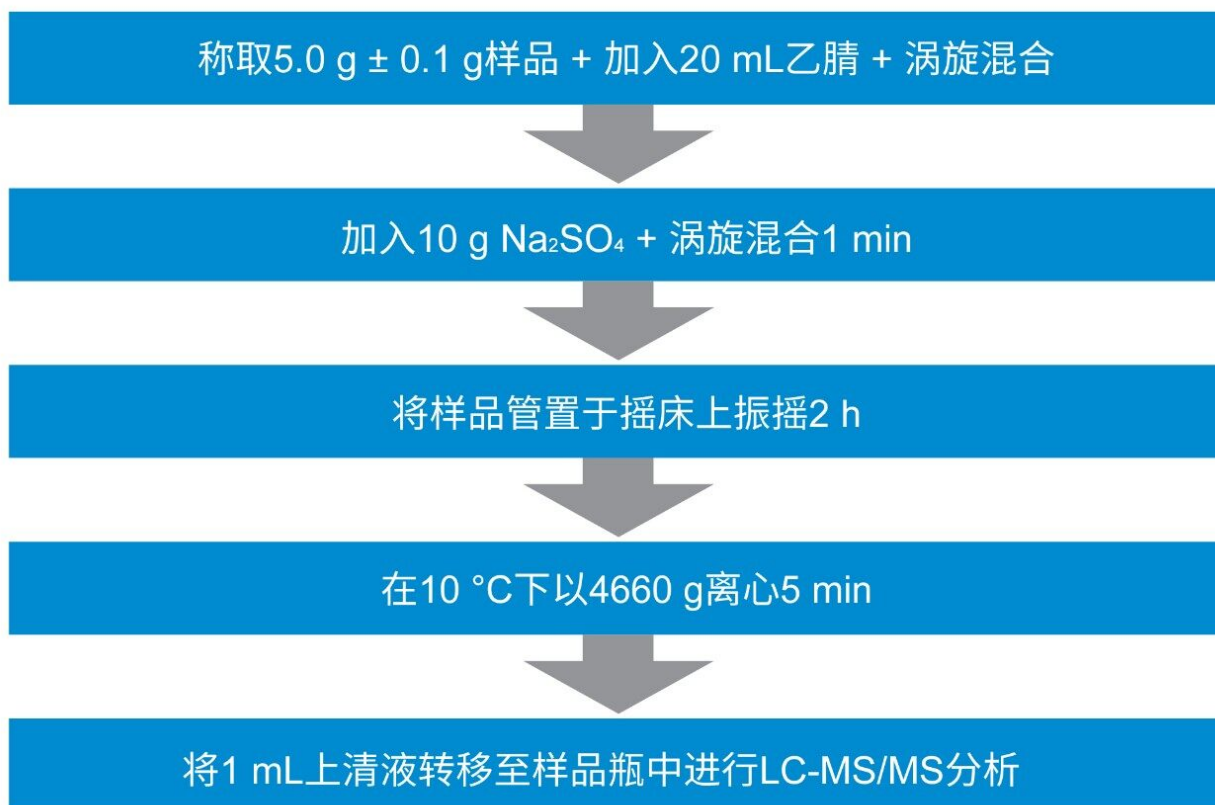


图1.样品前处理步骤概述

## UPLC参数

系统:	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> , 2.1 × 100 mm, 1.7 μm (部件号186002352)
柱温:	40 °C
样品温度:	20 °C
进样参数:	2.5 μL
流动相:	(A) 0.1%甲酸 + 5 mM HCOONH <sub>4</sub> 水溶液

(B) 0.1%甲酸的甲醇溶液

样品管理器清洗液:

25/25/25/25水/甲醇/异丙醇/乙腈, 含0.2%甲酸

## 梯度

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.45	75	25	
0.50	0.45	30	70	6
10.0	0.45	5	95	6
13.0	0.45	0	100	1
14.5	0.45	75	25	1

## 质谱参数

质谱系统: Xevo TQ-S micro

极性: ES+

毛细管电压(kV): 1.0

离子源温度(°C): 150 °C

脱溶剂气温度(°C): 650 °C

脱溶剂气流速(L/h): 1100 L/h

锥孔气流速(L/h): 50 L/h

每种化合物采用两个MRM通道。利用Autodwell功能自动设置驻留时间, 使每个峰至少包含12个数据点。利用MassLynx软件采集数据, 并用TargetLynx XS应用软件进行处理。表1总结了MRM通道和实际驻留时间设置。定量迹线以粗体显示。

化合物名称	保留时间 (min)	MRM 通道	锥孔电压 (V)	[V]	[eV]	内标
苏丹红一号	4.31	<b>249.1 &gt; 93.0</b>	30	30	25	苏丹红一号-d5
		249.1 > 156.0	30	30	12	
苏丹红二号	6.54	<b>277.1 &gt; 121.0</b>	30	30	20	苏丹红一号-d5
		277.1 > 156.0	30	30	13	
苏丹红三号	7.97	<b>353.1 &gt; 76.95</b>	30	30	25	苏丹红一号-d6
		353.1 > 92.0	30	30	35	
苏丹红四号	9.96	<b>381.2 &gt; 91.0</b>	40	40	30	苏丹红四号-d6
		381.2 > 106.0	40	40	35	
苏丹红7B	9.46	<b>380.2 &gt; 183.1</b>	30	30	13	苏丹红四号-d6
		380.2 > 115.0	30	30	45	
苏丹红B	9.80	<b>381.2 &gt; 91.0</b>	40	40	25	苏丹红四号-d6
		381.2 > 106.0	40	40	32	
二甲基黄	3.02	<b>226.2 &gt; 76.95</b>	30	30	17	苏丹红一号-d5
		226.2 > 120.0	30	30	30	
橙色二号	1.54	<b>329.1 &gt; 128.0</b>	30	30	30	苏丹红一号-d5
		329.1 > 156.0	30	30	15	
对位红	3.47	<b>294.1 &gt; 128.0</b>	30	30	30	苏丹红一号-d5
		294.1 > 156.0	30	30	15	
罗丹明	1.46	<b>443.25 &gt; 399.2</b>	50	50	40	苏丹红一号-d5
		443.25 > 355.2	50	50	55	
苏丹橙G	2.03	<b>215.1 &gt; 93.0</b>	30	30	20	苏丹红一号-d5
		215.0 > 122.0	30	30	13	
苏丹红一号-d5 (IS)	4.23	254.1 > 156.0	30	30	12	
苏丹红四号-d6 (IS)	9.88	387.2 > 224.0	40	40	18	

表1.所有染料及其内标的质谱方法参数

## 方法验证

根据2002/657/EC指南<sup>5</sup>使用加标空白样品进行方法验证，与SANTE/12682/2019<sup>6</sup>相反，这些验证包括多天测量。评估以下参数：鉴定结果、选择性、线性、正确度、实验室内重复性(RSD<sub>r</sub>)和实验室内重现性(RSD<sub>RL</sub>)。通过分别进样所有分析物和内标的标准溶液并检测辣椒粉来研究该方法的选择性，检查是否存在任何干扰物质在分析物保留时间处及其附近流出。对曲线的线性和各个残差进行检查。根据重复加标样品的数据得出正确度、RSD<sub>r</sub>和RSD<sub>RL</sub>，这些样品由同一分析人员在三天内进行分析。由于这些化合物在欧洲不存在最大允许限值，因此采用干预限值(0.5 mg/kg)的0.5倍、1倍和4倍进行评估。通过检查保留时间和离子丰度比评估鉴定结果。

## 结果与讨论

### 色谱分析

ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱为所有分析物提供了优异的保留和峰形，同分异构体苏丹红B和苏丹红四号实现基线分离，保留时间分别为9.82 min和9.98 min（图2）。梯度从25%有机溶剂B开始，以便将极性相对较强的化合物罗丹明、橙色二号、苏丹橙G、二甲基黄和对位红集中到色谱柱上，然后将该梯度迅速提高至70% B，随后通过缓梯度提高至95% B，以洗脱其他着色剂。总运行时间为14 min。

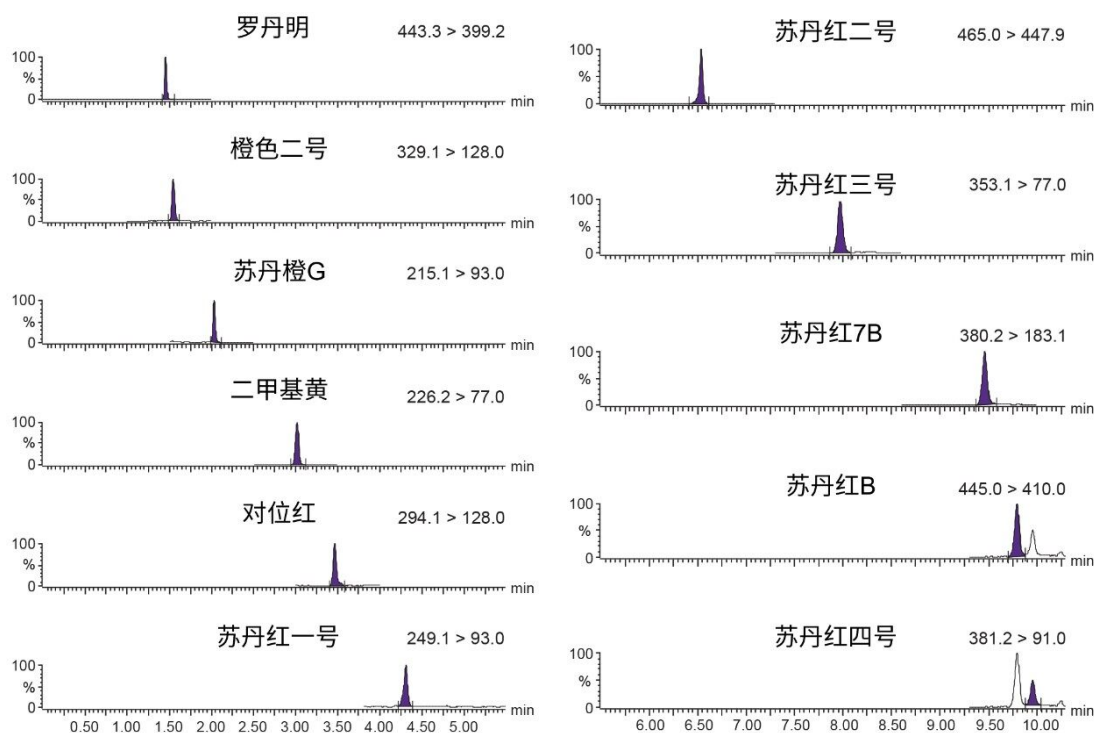


图2.所有化合物的基质匹配标准品(0.125 mg/kg)色谱图

## 灵敏度

基质匹配标准品曲线的分析结果表明，该方法具有出色的灵敏度。图2所示为分析最低浓度(0.125 mg/kg)的基质匹配标准品获得的着色剂的典型色谱图，表明该方法能够检测提取物中更低浓度的着色剂，或者最终提取物可进一步稀释后再进行LC-MS/MS分析。

## 特异性、选择性和线性

每3天制备7个样品，然后进行分析。在提取物中未检测到可能导致误报不合规样品的信号。罗丹明以痕量水平（小于最低浓度校准品的0.5%）在辣椒粉中检出。利用基质提取物绘制6点校准曲线，每天采集一次数据。除罗丹明采用1/x加权的二次拟合外，所有其他化合物均采用1/x线性拟合。基质验证曲线得到的所有决定系数( $R^2$ )值均高于0.996，各残差全都小于20%（大多数小于10%），证明所有染料的定量结果可靠。典型校准曲线的一些示例如图3所示。

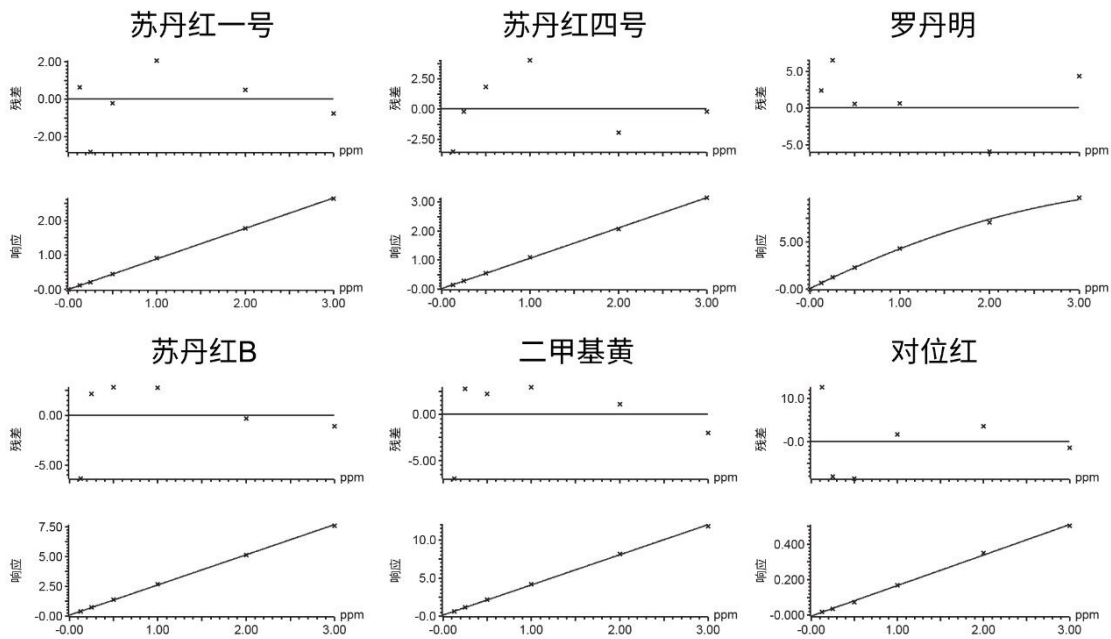


图3.本方法中所含一系列化合物的典型残差和校准曲线

### 正确度、重复性和重现性

使用三天内分析加标辣椒粉试样得到的数据评估正确度，以实测回收率表示。在3天内制备和分析三种浓度的样品，每种浓度七个加标样，所得的平均回收率在93.8%至115.2%的范围内，因此符合2002/657/EC文件中规定的标准。在 $RSD_r$  (0.8%~7.7%)和 $RSD_{RL}$  (1.6%~7.7%)研究中，该方法对所有分析物的精密度也令人满意。正确度和精密度如图4、图5和表2所示。



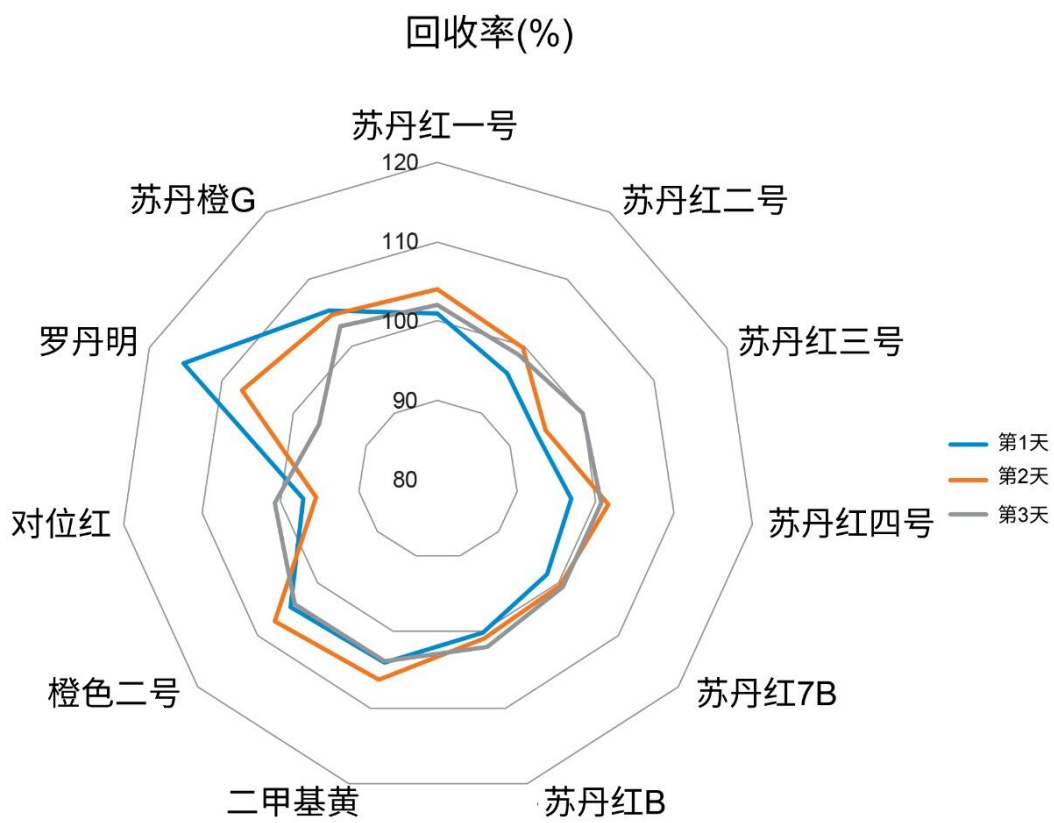


图4. 第1、2和3天分析加标样品得到的回收率(%)图

## 重复性与实验室内重现性(%RSD)

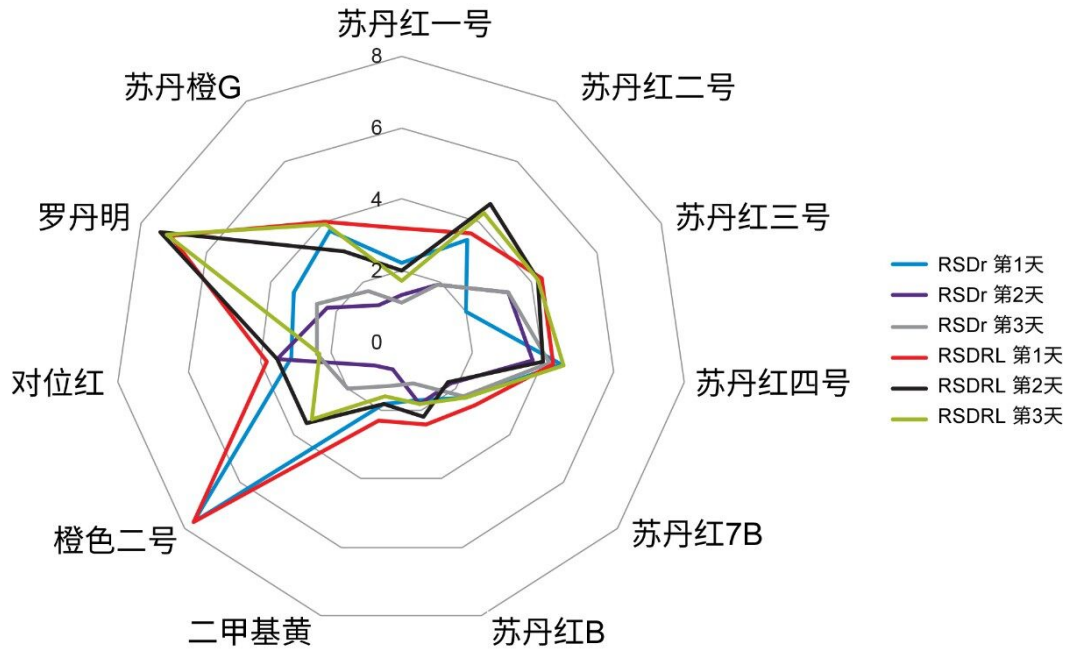


图5.第1、2和3天分析加标样品得到的重复性(% RSD<sub>r</sub>)和实验室内重现性(RSD<sub>RL</sub>)图。

化合物名称	正确度 /RSD <sub>r</sub> /RSD <sub>RL</sub> (%)		
	@ 0.25 mg/kg	@ 0.5 mg/kg	@ 2.0 mg/kg
苏丹红一号	101.0/2.2/3.2	104.4/1.3/2.0	102.1/1.1/1.7
苏丹红二号	96.1/3.4/3.6	99.8/1.9/4.6	98.8/1.9/4.3
苏丹红三号	93.8/2.0/4.3	94.9/3.3/4.2	100.1/3.3/4.2
苏丹红四号	97.0/4.5/4.3	101.7/3.7/4.0	100.7/4.2/4.6
苏丹红7B	98.2/2.4/2.7	100.4/1.8/1.7	100.7/2.3/2.4
苏丹红B	100.2/1.7/2.4	100.9/1.8/2.2	102.5/1.2/1.8
二甲基黄	104.0/1.8/2.3	106.3/0.8/1.8	103.8/1.3/1.6
橙色二号	104.5/7.7/7.7	107.2/1.0/3.5	104.1/2.0/3.3
对位红	97.2/3.1/3.8	95.6/3.5/3.5	100.8/2.4/2.3
罗丹明	115.2/3.3/7.1	107.2/2.3/7.4	96.5/2.6/7.2
苏丹橙G	105.4/3.7/4.0	104.6/1.2/3.0	102.9/1.7/3.9

表2.辣椒粉中偶氮染料测定的验证结果

---

## 结论

本应用纪要介绍了一种使用ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-S micro MS/MS联用系统同时测定一系列不同偶氮染料（包括7种苏丹染料、罗丹明、二甲基黄、对位红和橙色二号）的简单方法。该方法的性能在辣椒粉分析中得到证明，因此认为其适用于可靠定量浓度远低于干预限值的分析物，该限值是监测食品供应中潜在非法染料发生情况的浓度。

---

## 参考资料

1. Regulation (EC) 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives.OJ L 354, 31.12.2008, p.16–33.
2. Galvin-King, P *et al.*(2018).Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection.*Food Control*, 88:85–97.
3. Oplatomska-Stachowiak M and Elliott C (2017) Food colors: Existing and emerging food safety concerns, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(3):524–548.
4. Summary Record SANCO – D.1(06)D/411990 of the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com\\_toxic\\_summary21\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_summary21_en.pdf) <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com\\_toxic\\_summary21\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_summary21_en.pdf)> .
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.OJ L 221, 17.8.2002, p. 8–36.
6. Document No.SANTE/12682/2019.Guidance Document on Analytical Quality, Control, and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007138ZH, 2021年1月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.