

食品中蘇丹色素之檢驗方法(二)

Method of Test for Sudan Dyes in Foods (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於辣椒製品及食用玫瑰花瓣中蘇丹一號(Sudan I)、蘇丹二號(Sudan II)、蘇丹三號(Sudan III)及蘇丹四號(Sudan IV)等 4 項蘇丹色素之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：CORTECS C18，1.6 μm ，內徑2.1 mm \times 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上。
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；甲酸、含25%甲醇鈉之甲醇溶液、四氫呋喃、正己烷及乙醚均採用試藥特級；檸檬酸氫二鈉採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；蘇丹一號、蘇丹二號、蘇丹三號及蘇丹四號對照用標準品；蘇丹一號-d₅ (Sudan I-d₅)、蘇丹二號-d₆ (Sudan II-d₆)、蘇丹三號-d₆ (Sudan III-d₆)及蘇丹四號-d₆ (Sudan IV-d₆)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Sep-Pak[®] silica，1 g，6 mL，或同級品。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF 材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 四氫呋喃：甲醇(4:1, v/v)溶液：
取四氫呋喃與甲醇以4：1 (v/v)之比例混勻。
 - 2.4.2. 含5% 甲醇鈉之甲醇溶液：

取含25% 甲醇鈉之甲醇溶液100 mL，加入甲醇使成500 mL。

2.4.3. 15% 檸檬酸氫二鈉溶液：

取檸檬酸氫二鈉75 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.4. 正己烷：乙醚(9:1, v/v)溶液：

取正己烷與乙醚以9：1 (v/v)之比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL與去離子水1000 mL混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸1 mL與乙腈1000 mL混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取蘇丹一號-d₅、蘇丹二號-d₆、蘇丹三號-d₆及蘇丹四號-d₆同位素內部標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至100 mL，作為內部標準原液，於4°C貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以乙腈稀釋至0.1 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取蘇丹一號、蘇丹二號、蘇丹三號及蘇丹四號對照用標準品各約10 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至100 mL，作為標準原液，於4°C貯存。臨用時取各標準原液混合，以乙腈稀釋至蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號0.1 µg/mL，蘇丹四號0.25 µg/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

取檢體約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入內部標準溶液0.1 mL及四氫呋喃：甲醇(4:1, v/v)溶液5 mL，混勻後加入含5% 甲醇鈉之甲醇溶液5 mL，振盪萃取5分鐘，加入正己烷5 mL混勻，振盪萃取5分鐘，加入15% 檸檬酸氫二鈉溶液5 mL混勻後，於5000 ×g離心5分鐘，收集上層液至15 mL離心管中，於40°C下以氮氣吹乾後，殘留物以正己烷2 mL溶解，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取2.7.1.節供淨化用溶液，注入預先以正己烷10 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液，以正己烷10 mL清洗固相萃取匣，棄

流出液。再以正己烷：乙醚(9:1, v/v)溶液10 mL沖提，收集沖提液，於40°C下以氮氣吹至微乾，殘留物加入四氫呋喃0.2 mL，旋渦混合溶解，再加入乙腈0.8 mL混勻，以濾膜過濾後，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.8.節調製未添加內部標準溶液之沖提液，於40°C下以氮氣吹至微乾，殘留物以四氫呋喃0.2 mL溶解後，分別加入標準溶液0.04~0.5 mL及內部標準溶液0.1 mL，再加入乙腈使體積為1 mL，混合均勻，以濾膜過濾後，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各蘇丹色素與內部標準品波峰面積比，與對應之各蘇丹色素濃度，分別製作蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號4~50 ng/mL，蘇丹四號10~125 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：CORTECS C18，1.6 μm ，內徑2.1 mm \times 15 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 \rightarrow 1.0	60 \rightarrow 60	40 \rightarrow 40
1.0 \rightarrow 5.0	60 \rightarrow 15	40 \rightarrow 85
5.0 \rightarrow 10.0	15 \rightarrow 15	85 \rightarrow 85
10.0 \rightarrow 11.0	15 \rightarrow 5	85 \rightarrow 95
11.0 \rightarrow 23.0	5 \rightarrow 5	95 \rightarrow 95
23.0 \rightarrow 23.1	5 \rightarrow 60	95 \rightarrow 40
23.1 \rightarrow 30.0	60 \rightarrow 60	40 \rightarrow 40

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：5 μL 。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：2.2 kV。

離子化模式：ESI⁺。

離子源溫度(Ion source temperature)：120°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：850 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)及碰撞能量(collision energy)如下表

分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Sudan I	249 > 156*	30	14
	249 > 128	30	28
Sudan II	277 > 260*	30	20
	277 > 156	30	24
Sudan III	353 > 197*	50	19
	353 > 156	50	25
Sudan IV	381 > 224*	50	22
	381 > 91	50	24
Sudan I- d ₅ (I.S.)	254 > 156*	30	15
Sudan II-d ₆ (I.S.)	283 > 121*	30	11
Sudan III-d ₆ (I.S.)	359 > 162*	50	20
Sudan IV-d ₆ (I.S.)	387 > 225*	50	20

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.節條件進行分析，就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各蘇丹色素之含量(ppb)：

$$\text{檢體中各蘇丹色素之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各蘇丹色素之含量(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25

> 10~20	± 30
---------	------

≤ 10	± 50
------	------

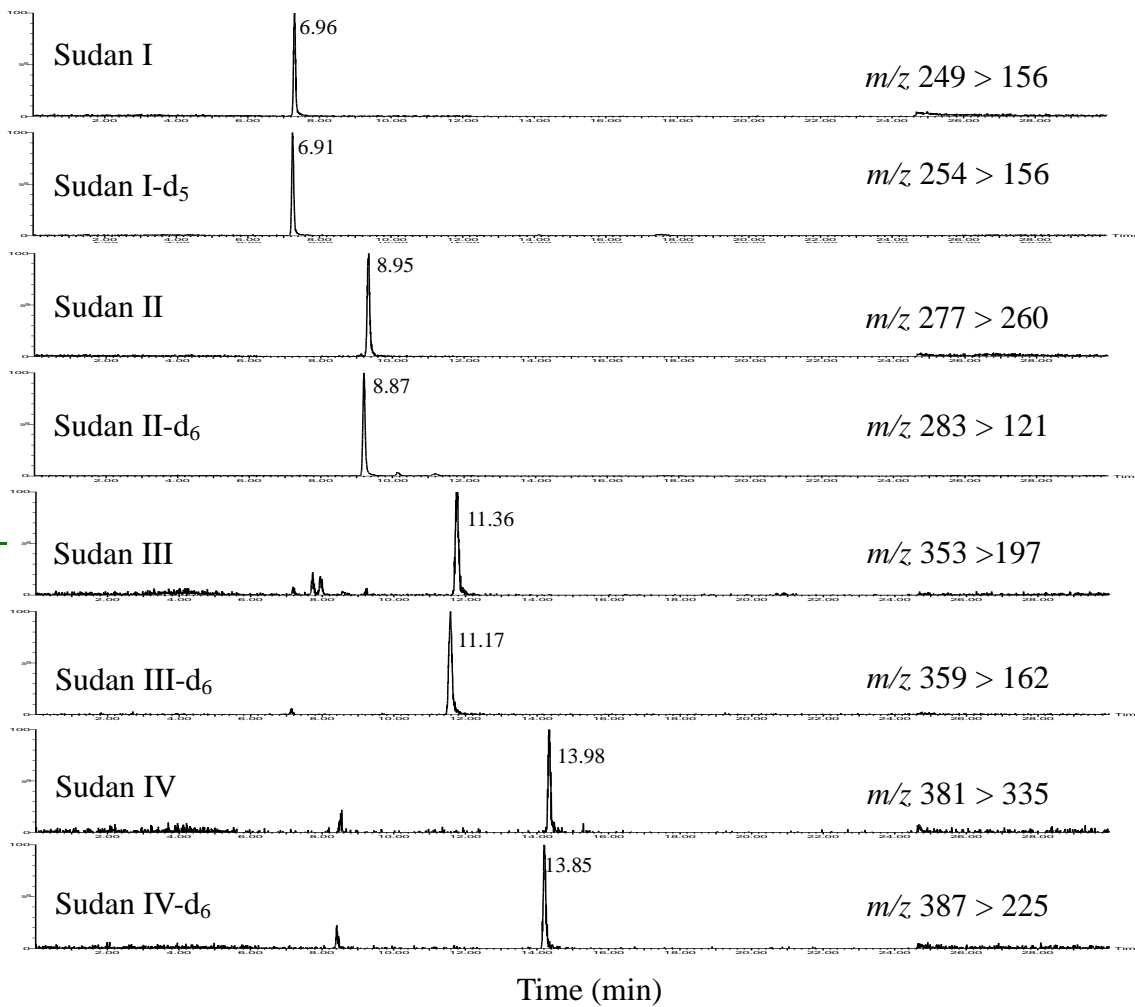
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號均為4 ppb，蘇丹四號為10 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Uematsu, Y., Ogimoto, M., Kabashima, J., Suzuki, K. and Ito, K. 2007. Fast cleanup method for the analysis of sudan I-IV and para red in various foods and paprika color (oleoresin) by high-performance liquid chromatography/diode array detection: focus on removal of fat and oil as fatty acid methyl esters prepared by transesterification of acylglycerols. *J. AOAC Int.* 90: 437-445.

參考層析圖譜



圖、以 LC/MS/MS 分析各蘇丹色素標準品及其內部標準品之 MRM 圖譜