

食品中蘇丹色素之檢驗方法
Method of Test for Sudan Dyes in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽類之肌肉、全蛋及蛋黃中蘇丹一號(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. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及丙酮均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；EMR-Lipid萃取粉劑、檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉、無水硫酸鎂及氯化鈉均採用分析級；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。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)^(註1)：採用Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9312，或同級品。
 - 2.3.4. 萃取出粉劑^(註2)：含檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二鈉0.5 g、無水硫酸鎂4 g及氯化鈉1 g。
 - 2.3.5. 淨化用離心管I^(註2)：含EMR-Lipid萃取粉劑1 g，或同級品。
 - 2.3.6. 淨化用離心管II^(註2)：含無水硫酸鎂1.6 g及氯化鈉0.4 g。
 - 2.3.7. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。

註1：陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。

註2：可依需求自行評估使用市售各種萃取及淨化用套組。

2.4. 移動相溶液之調製：

2.4.1. 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。

2.4.2. 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。

2.5. 標準溶液之配製：

取蘇丹色素對照用標準品各約100 mg，精確稱定，分別以丙酮溶解並定容至100 mL，作為標準原液，於4°C貯存。

2.5.1. 取適量各標準原液混合，以乙腈稀釋後^(註)，供作2.7.節檢量線製作用標準溶液。

註：肌肉及全蛋基質之配製濃度為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號0.16~2 µg/mL，蘇丹四號0.4~5 µg/mL；蛋黃基質之配製濃度為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號0.04~1 µg/mL，蘇丹四號0.1~2.5 µg/mL。

2.5.2. 取適量各標準原液混合，以乙腈稀釋後^(註)，供作2.8.2.節標準品添加法用標準溶液。

註：肌肉及全蛋基質之配製濃度為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號2~8 µg/mL，蘇丹四號5~20 µg/mL；蛋黃基質之配製濃度為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號0.5~2 µg/mL，蘇丹四號1.25~5 µg/mL。

2.6. 檢液之調製：

2.6.1. 肌肉：

將檢體均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入去離子水8 mL及乙腈10 mL，再加入萃取用粉劑及陶瓷均質石1顆，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘。取上清液0.5 mL，加入乙腈0.5 mL，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.6.2. 全蛋：

檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混合均勻，取約2 g，精確稱

定，置於離心管中，加入去離子水8 mL及乙腈10 mL，再加入萃取用粉劑及陶瓷均質石1顆，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘。取上清液5 mL，置於預先以去離子水5 mL活化之淨化用離心管I，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於5000 ×g離心5分鐘。取上清液置於淨化用離心管II，蓋上離心管蓋，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於5000 ×g離心5分鐘。取上清液0.5 mL，加入乙腈0.5 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.6.3. 蛋黃：

將檢體均質後，取約0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入丙酮5 mL及陶瓷均質石1顆，振盪萃取10分鐘，於5000 ×g離心5分鐘。取上清液置於預先以去離子水2 mL活化之淨化用離心管I，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於5000 ×g離心5分鐘。取上清液置於淨化用離心管II，蓋上離心管蓋，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於5000 ×g離心5分鐘。取上清液1 mL，經氮氣吹乾，以乙腈1 mL溶解，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.7. 檢量線之製作：

精確量取2.5.1.節標準溶液各50 μL，添加於空白檢體中，依2.6.節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各蘇丹色素之波峰面積，與對應之添加量，分別製作檢量線^(註)。

註：肌肉及全蛋基質檢量線含量範圍為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號8~100 ng，蘇丹四號20~250 ng；蛋黃基質檢量線含量範圍為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號2~50 ng，蘇丹四號5~125 ng。

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 × 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 → 1.0 | 60 → 60 | 40 → 40 |
| 1.0 → 5.0 | 60 → 15 | 40 → 85 |
| 5.0 → 10.0 | 15 → 15 | 85 → 85 |
| 10.0 → 11.0 | 15 → 0 | 85 → 100 |
| 11.0 → 15.0 | 0 → 0 | 100 → 100 |
| 15.0 → 15.1 | 0 → 60 | 100 → 40 |
| 15.1 → 20.0 | 60 → 60 | 40 → 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) | | |
| 蘇丹一號 | 249 > 156* | 30 | 28 |
| | 249 > 128 | 30 | 14 |
| 蘇丹二號 | 277 > 121* | 30 | 24 |
| | 277 > 156 | 30 | 20 |
| 蘇丹三號 | 353 > 197* | 50 | 25 |
| | 353 > 156 | 50 | 19 |
| 蘇丹四號 | 381 > 91* | 50 | 24 |
| | 381 > 244 | 50 | 22 |

*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。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

2.8.1. 檢量線法：

精確量取檢液及標準溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.7.節條件進行分析。就檢液與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鑑別之^(註)，並依下列計算式求出檢體中各蘇丹色素之含量(ppb)：

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

C：由檢量線求得檢液中各蘇丹色素之含量(ng)

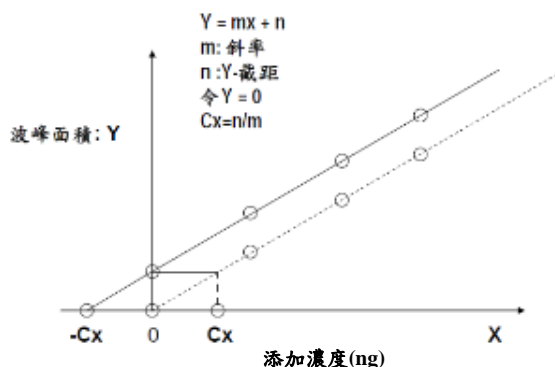
M：取樣分析檢體之重量(g)

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 |

2.8.2. 標準品添加法：

精確量取2.5.2.節標準溶液各100 μL，添加於檢體中^(註)，依2.6.節調製檢液。分別量取檢液100 μL，加入乙腈使體積為1 mL，依2.7.節條件進行分析，就各蘇丹色素之波峰面積，與對應之添加量製作線性迴歸曲線 $y = mx + n$ (如下圖)，並依下列計算式求出檢體中各蘇丹色素之含量(ppb)：



圖、標準品添加法線性迴歸曲線

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

C：由 n/m 求得檢液中各蘇丹色素之含量(ng)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：肌肉及全蛋基質之添加量為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號 0~800 ng，蘇丹四號 0~2000 ng；蛋黃基質之添加量為蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號 0~200 ng，蘇丹四號 0~500 ng。

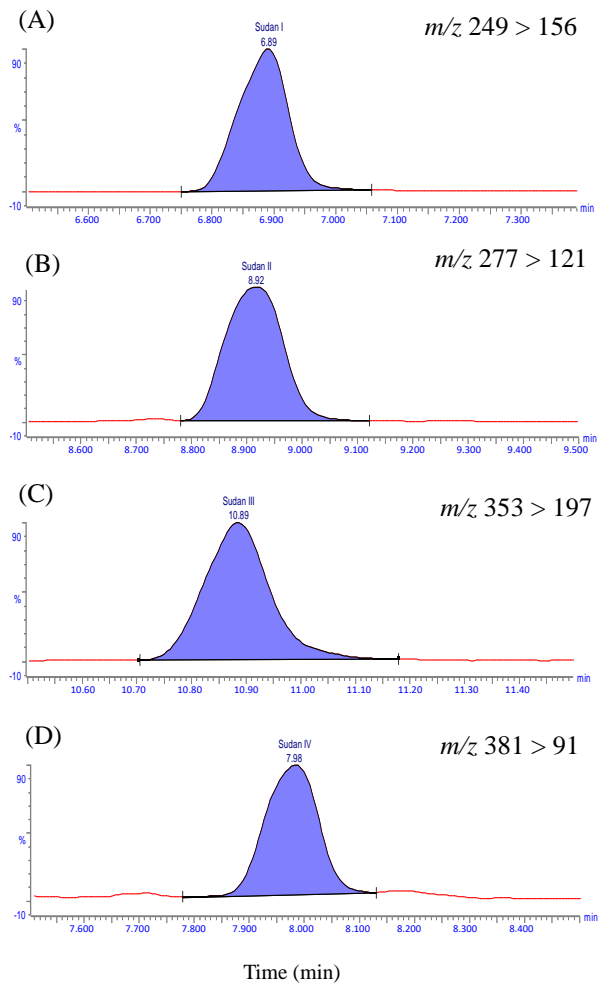
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號均為4 ppb，蘇丹四號為10 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Piątkowska, M., Jedziniak, P. and Żmudzki, J. 2014. Determination of illegal dyes in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Bull. Vet. Inst. Pulawy 58: 247-253.

參考層析圖譜



圖、以 LC/MS/MS 分析蘇丹一號(A)、蘇丹二號(B)、蘇丹三號(C)及蘇丹四號(D)標準品之 MRM 圖譜