

食品中蘇丹色素之鑑別方法
Method of Identification for Sudan Dyes in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於乾燥植物類及調味醬料類等食品中蘇丹一號(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：檢體採用 QuEChERS 方法(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)前處理後，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. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，控制溫度可達10 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.4. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及丙酮均採用液相層析級；甲酸及四氫呋喃均採用試藥特級；primary secondary amine (PSA)、octadecylsilane, end-capped (C18EC)、EMR-Lipid粉劑、無水檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)、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：10 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL及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. 萃取用粉劑^(註2)：含無水檸檬酸鈉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PSA 150 mg、C18EC 150 mg及無水硫酸

鎂900 mg。

2.3.6. 淨化用離心管II^(註2)：含EMR-Lipid粉劑1 g，或同級品。

2.3.7. 淨化用離心管III^(註2)：含無水硫酸鎂1.6 g及氯化鈉0.4 g。

2.3.8. 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. 乙腈：四氫呋喃(4:1, v/v)溶液之調製：

取乙腈與四氫呋喃以4：1 (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，加去離子水使成1000 mL，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，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取蘇丹色素對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷藏貯存。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100 ng/mL，蘇丹四號250 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 乾燥植物類：

2.7.1.1. 萃取：

將檢體均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入冷藏預冷之去離子水10 mL，旋渦混合，加入乙腈10 mL，再依序加入陶瓷均質石1顆及萃取用粉劑，蓋上離心管蓋，隨即以手激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪5分鐘後，於10°C以5000 ×g離心5分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.1.2. 淨化：

將2.7.1.1節供淨化用之上清液^(註3)置於淨化用離心管I，蓋上離心管蓋，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於10°C以5000 ×g離心5分鐘。取上清液5 mL，置於15 mL離心管中，於40°C以氮氣吹至剛乾後，殘留物加入乙腈：四氫呋喃(4:1,

v/v)溶液1 mL，旋渦混合溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

註3：當檢體具顯著基質干擾時，可調整增加淨化步驟如下：
將2.7.1.1節供淨化用之上清液置於預先以去離子水2 mL活化之淨化用離心管II，蓋上離心管蓋，隨即以手激烈振盪數次，防止結塊，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於10°C以5000 ×g離心5分鐘。取上清液置於淨化用離心管I，以下同2.7.1.2節淨化步驟。

2.7.2. 調味醬料類：

2.7.2.1. 萃取：

將檢體均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入丙酮5 mL、乙腈5 mL及陶瓷均質石1顆，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪10分鐘後，於10°C以5000 ×g離心5分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.2.2. 淨化：

將2.7.2.1節供淨化用之上清液置於預先以去離子水2 mL活化之淨化用離心管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10°C以5000 ×g離心5分鐘。取上清液置於淨化用離心管III，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10°C以5000 ×g離心5分鐘。取上清液5 mL，置於15 mL離心管中，於40°C下以氮氣吹至剛乾後，殘留物加入乙腈：四氫呋喃(4:1, v/v)溶液1 mL，旋渦混合溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 標準品比對檢液之調製：

取空白檢體約2 g，添加標準溶液80 µL，依2.7節調製檢液，供作標準品比對檢液。

2.9. 鑑別試驗：

精確量取檢液及標準品比對檢液各5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準品比對檢液所得波峰之滯留時間、波峰面積及多重反應偵測相對離子強度^(註4)鑑別之。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註5)：

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 → 5	85 → 95
11.0 → 23.0	5 → 5	95 → 95
23.0 → 23.1	5 → 60	95 → 40
23.1 → 30.0	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正離子。

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^(註6)。

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 > 93	15	30
	249 > 156	15	14
	249 > 128	15	28
	249 > 232	15	8
蘇丹二號	277 > 156	20	20
	277 > 128	20	24
	277 > 106	20	26
	277 > 260	20	20
蘇丹三號	353 > 197	30	17
	353 > 156	30	21
	353 > 196	30	17
	353 > 128	30	30

	381 > 224	30	22
蘇丹四號	381 > 276	30	20
	381 > 106	30	22
	381 > 244	30	22

註4：相對離子強度由2對離子對之波峰面積比而得($\leq 100\%$)，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

註5：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。

註6：偵測離子對可視基質情況選擇適合之至少2對離子對。

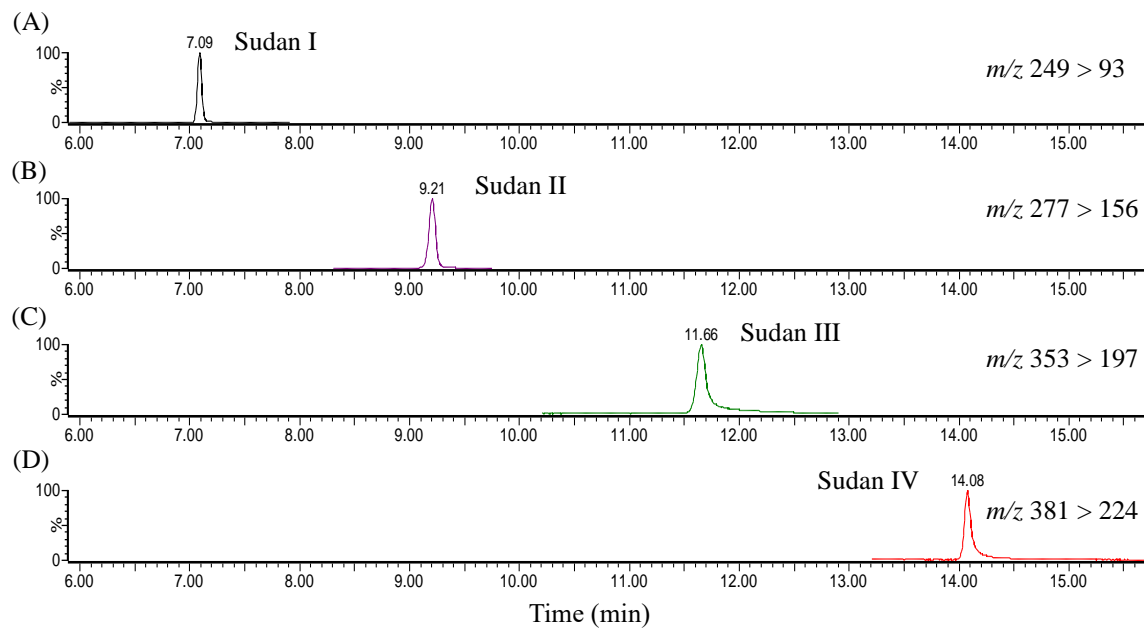
附註：1. 本檢驗方法之偵測極限，蘇丹一號、蘇丹二號及蘇丹三號均為4 ppb，蘇丹四號為10 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. 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.
2. Adjei, J. K., Ahormegah, V., Boateng, A. K., Megbenu, H. K. and Owusu, S. 2020. Fast, easy, cheap, robust and safe method of analysis of Sudan dyes in chilli pepper powder. Heliyon 6: e05243.

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