

苏丹红 II 纯物质中有机杂质的定性和定量分析

邓超¹, 张伟², 黄挺², 张辉¹, 何雅娟², 陶红², 全灿², 李红梅²

(1. 浙江省计量科学研究院, 浙江 杭州 310018;

2. 中国计量科学研究院化学计量与分析科学研究所, 北京 100029)

摘要: 本实验对苏丹红 II 标准物质候选物中的主要有机杂质进行定性、定量分析, 采用高效液相色谱-离子阱-飞行时间串联质谱法 (HPLC-IT-TOF MS) 和液相色谱-三重四极杆串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 对有机杂质进行定性分析, 鉴别出杂质 1 和杂质 2 分别为苏丹红 I 和溶剂橙 2, 推导出杂质 3 和 4 的可能分子结构为苏丹红 II 的同分异构体。利用液相色谱外标法测定苏丹红 I 和溶剂橙 2 的含量分别为 0.017%、0.258%, 相对标准偏差分别为 1.6%、2.5%; 采用与主成分苏丹红 II 响应因子一致的方法定量分析杂质 3 和 4, 其含量分别为 0.012%、0.028%, 相对标准偏差分别为 7.0%、4.9%。本研究可为苏丹红 II 一级标准物质的研制奠定基础, 对苏丹红 II 的准确测定具有重要意义。

关键词: 苏丹红 II; 有机杂质; 高效液相色谱-离子阱-飞行时间/串联质谱法 (HPLC-IT-TOF MS); 定性; 定量

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2018)05-0615-08

doi: 10.7538/zpxb.2017.0183

Qualitative and Quantitative Analysis of the Organic Impurities in Sudan II

DENG Chao¹, ZHANG Wei², HUANG Ting², ZHANG Hui¹, HE Ya-juan²,
TAO Hong², QUAN Can², LI Hong-mei²

(1. Zhejiang Province Institute of Metrology, Hangzhou 310018, China;

2. Division of Chemical Metrology and Analytical Science,
National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

Abstract: Sudan II is one of synthetic organic azo-compounds, which is abundantly used in industry for coloring. A variety of foodstuffs contaminated with Sudan dyes have been detected throughout Europe and Asia. This issue has become one focal point for addressing food safety. Sudan II could produce aniline and its derivatives, which could attack the hepatocytes and lead to the toxic hepatic disease. For this reason, accurate and reliable determination of Sudan II in foodstuff is required for the assurance of consumer's healthiness. But the traceability of Sudan II has not been settled yet. Qualita-

收稿日期: 2017-11-27; 修回日期: 2018-02-06

基金项目: 国家标准物质资源共享服务平台项目 (21-APT1702-12); 浙江省质量技术监督系统科研项目 (20170214) 资助

作者简介: 邓超 (1989—), 女 (汉族), 浙江舟山人, 硕士, 从事化学计量分析工作。E-mail: dengchao_2008@126.com

通信作者: 张伟 (1974—), 男 (汉族), 北京人, 副研究员, 从事理化计量研究。E-mail: zhw@nim.ac.cn

网络出版时间: 2018-05-28; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180528.0854.004.html>

tive and quantitative analysis of the major organic impurities in pure Sudan II was performed in this work. The related organic impurities were qualitatively determined by high performance liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry (HPLC-IT-TOF MS) and high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Full scan of LC/MS in positive ion mode was firstly executed to obtain the m/z values of the molecules. Then LC-MS/MS was carried out on target compounds to obtain as much structural information as possible. According to the first and the second mass spectra, retention time of standard materials and published reports, the impurities in Sudan II were identified and their fragmentation pathways were concluded. Four unknown related organic impurities were observed in Sudan II. From analysis of possible structures and fragmentation pathways of fragments, impurities 1 and 2 were successfully identified as Sudan I and Solvent Orange 2, respectively. The results were verified by standards. The possible molecular structures of impurity 3 and 4 were derived as isomers of Sudan II. High performance liquid chromatography external standard method was used to determine the contents of the identified organic impurities. The results showed that there are 0.017% Sudan I with the RSD of 1.6% and 0.258% Solvent Orange 2 with the RSD of 2.5% in pure Sudan II substance. Impurities 3 and 4 were quantified in accordance with the Sudan II response factor under DAD detector. The contents of impurities 3 and 4 are 0.012% and 0.028% with the RSD of 7.0% and 4.9%, respectively. Moreover, this method has instructive significance to the qualitative and quantitative analysis of pure Sudan dyes and other pure organic substances. Also it will assure the accuracy of determination of Sudan II and lay the foundation for development of a national first grade certified reference material of Sudan II.

Key words: Sudan II; organic impurities; high performance liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry (HPLC-IT-TOF MS); qualitative; quantitative

苏丹红 II 作为苏丹红 I 的衍生物,是一种偶氮化合物类合成色素^[1],主要用于纺织品、橡胶、塑料、油漆等工业产品的着色^[2]。由于其含有芳香族结构,进入人体后会分解还原成芳香胺,芳香胺化合物再次被人体吸收^[3],对人体健康具有潜在的致癌性^[4]。中国和欧盟均禁止将苏丹红色素作为食品添加剂使用^[5-6],但因其成本低^[7]、着色性好,仍被很多商家非法使用^[8]。因此,食品中苏丹红色素的检测极为重要^[5,9]。

纯度标准物质是溶液和基体标准物质制备的基础,是基体中目标物准确测量的溯源源头^[10]。若纯物质的纯度或其中的杂质得不到准确定值,将会对整个国家化学成分测量的量值传递和测量结果产生极其严重的影响,因此,实现纯物质中杂质的准确定性和定量一直是分

析测试领域急需攻克的难题^[11]。苏丹红纯度标准物质的研制有利于提高检测水平与检测准确度,提高食品质量,有利于保护人民的身体健康,具有广泛的社会效益和一定的经济效益。但目前国内尚无苏丹红 II 纯度标准物质,也无苏丹红 II 中存在的有机杂质的报道。

本实验拟采用高效液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间高分辨质谱(HPLC-ESI-IT-TOF MS)法,通过优化液相色谱分离及质谱检测条件,对苏丹红 II 中主要的有机杂质进行分析鉴定,并利用液相色谱外标法准确定量,希望为苏丹红 II 一级标准物质的研制提供参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱-离子阱-飞行时间/串联质

谱仪(配有 ESI 源)、LC-20AD 液相色谱仪:均为日本 Shimadzu 公司产品;6410QQQ 液相色谱-三重四极杆质谱仪、1200 型高效液相色谱仪(配有二极管阵列(DAD)检测器):美国 Agilent 公司产品;XP205 型称量天平(0.01 mg):瑞士梅特勒-托利多公司产品;Inertsil ODS-SP 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm):日本 GL Science 公司产品。

苏丹红Ⅱ标准物质候选物原料:美国 Sigma 公司产品,经柱层析方法提纯后使用,经液相色谱比较确认无新杂质引入;苏丹红Ⅰ(GB W10056, 99.9%):由国家标准物质研究中心提供;溶剂橙 2:日本 TCI 公司产品;乙腈(色谱纯):德国 Merck 公司产品;甲酸(LC/MS 级):美国 Thermo 公司产品;流动相用水为二次去离子水。

1.2 样品溶液和标准溶液的配制

待测样品溶液和标准溶液均采用质量法配制,以乙腈为溶剂,所有样品及标准储备溶液均于 4℃下密封保存。

1.3 分析方法及实验条件

1.3.1 有机杂质定性分析 采用 HPLC-IT-TOF MS 法和 HPLC-MS/MS 法对主成分中的有机杂质进行定性分析,借助质谱仪的高分辨率和精确质量数优势,由杂质化合物各级质谱碎片的测量值、化学式和理论值,推测杂质的分子式和结构。

1) HPLC-IT-TOF MS 实验条件

液相色谱条件:Inertsil ODS-SP 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈(25:75, V/V);流速 0.6 mL/min;柱温 35℃;检测波长范围 190~600 nm;进样量 10 μL。

质谱条件:ESI 离子源,正离子模式;质量扫描范围 m/z 100~600;离子源温度 200℃;曲型脱溶剂管(CDL)温度 200℃;雾化气(N_2)流速 1.5 L/min;碰撞能量为 MS^1 50%, MS^2 70%;离子分离时间 50 ms;碰撞气及冷却气为高纯氦气。

2) HPLC-MS/MS 实验条件

液相色谱条件:流速 0.5 mL/min,进样量 20 μL,其他同 HPLC-IT-TOF MS 色谱条件。

质谱条件:ESI 离子源;全扫描模式和子离子监测模式,正离子扫描监测;出口电压 135 V,

杂质 1~4 和苏丹红Ⅱ的碰撞能依次为 16、15、10、10、10 eV;干燥气流速 8 L/min;干燥气温度 350℃;雾化气压力 3.45×10^5 Pa;碰撞气为高纯氮气。

1.3.2 杂质纯品纯度定值 HPLC 条件 杂质纯品作为对杂质定量的标准品,实验前需确定准确纯度。溶剂橙 2 因无相应的标准物质,故其标准品经液相色谱面积归一化法确定其准确纯度。对配制的 6 份溶剂橙 2 样品溶液进行液相色谱检测,积分得到其有机纯度值。

液相色谱条件:Inertsil ODS-SP 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);流动相为纯水-乙腈(30:70, V/V);流速 1 mL/min;检测波长范围 190~400 nm;进样量 10 μL。

1.3.3 有机杂质定量分析 采用液相色谱 HPLC 外标曲线法对苏丹红Ⅱ纯品中已确定的有机杂质进行定量分析。绘制苏丹红Ⅰ杂质标准曲线(0.01~2 mg/L)和溶剂橙 2 杂质标准曲线(0.19~4.652 mg/L),配制 6 份苏丹红Ⅱ溶液,分别进行 HPLC 检测,HPLC 实验条件同 HPLC-IT-TOF MS 中的液相色谱条件。

2 结果与讨论

2.1 苏丹红Ⅱ纯品中有机杂质的定性

通过选择合适的色谱柱对液相色谱流动相的组成、流速等条件进行优化,得到了分离苏丹红Ⅱ及杂质的最佳实验条件,见 1.3.1 节。苏丹红Ⅱ主成分及其杂质成分的色谱图和总离子流图分别示于图 1 和图 2。

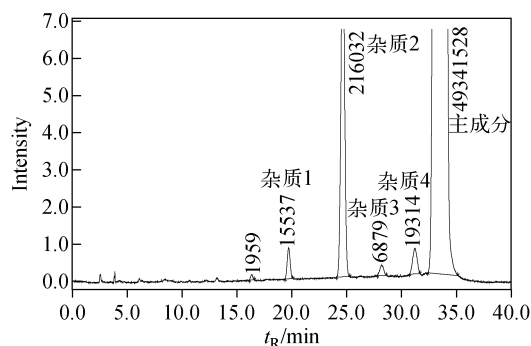
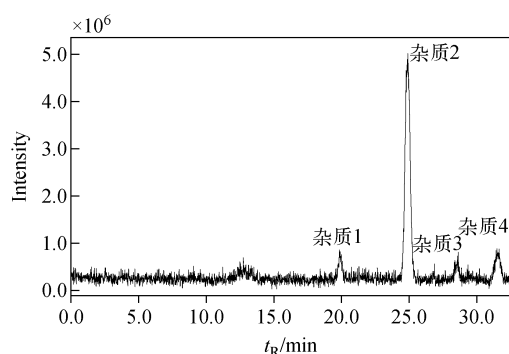


图1 苏丹红Ⅱ纯品中主成分和杂质分离的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of main component and impurities in Sudan II



注:为了防止高浓度的主成分苏丹红Ⅱ进入质谱仪而造成污染,且已无其他杂质出现,

32.5 min 后管路自动切至废液中,不进入质谱仪扫描

图2 苏丹红Ⅱ纯品中杂质分离的总离子流图

Fig. 2 TIC of impurities in Sudan II

分析图1中色谱归一化结果,只有杂质2的含量大于千分之一。通过 HPLC-IT-TOF MS 获得的苏丹红Ⅱ和4种杂质的母离子、子离子的精确分子质量列于表1。由于杂质含量较低,通过 HPLC-IT-TOF MS 获得的子离子数目较少,因此,采用 HPLC-MS/MS 法对苏丹红Ⅱ及其4种杂质进行二级质谱裂解,结果示于图3和图4。通过质谱裂解途径解析,预测未知杂质的分子式,并采用相应杂质的纯品进行验证。

表1 苏丹红Ⅱ及其杂质的母离子和子离子参数

Table 1 Parent ions and product ions of Sudan II and the impurities

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ions (<i>m/z</i>)
杂质1	19.895	249.117	232.097
杂质2	24.612	263.116	246.117, 156.050
杂质3	28.487	277.159	262.119
杂质4	31.418	277.126	260.104, 156.027
苏丹红Ⅱ	33.060	277.127	259.126, 232.171

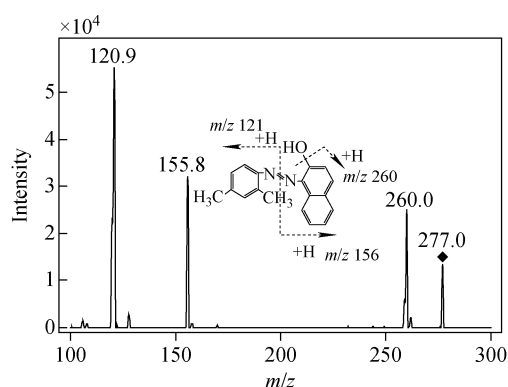


图3 苏丹红Ⅱ的碎片离子峰及质谱裂解途径

Fig. 3 Fragment ions and fragmentation pathways of Sudan II

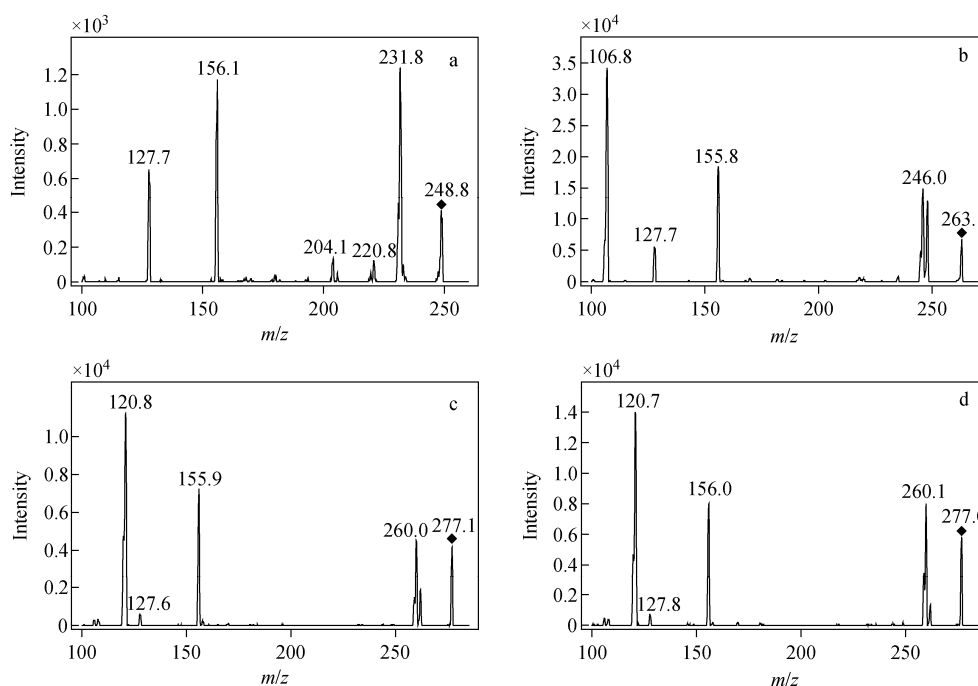


图4 杂质1(a)、2(b)、3(c)、4(d)的碎片离子峰

Fig. 4 Fragment ions of impurities 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d)

由图3和图4可知,杂质1、2和苏丹红Ⅱ均有 m/z 156 碎片峰,因此可通过苏丹红Ⅱ的已知结构对杂质1和2的结构式进行推导。杂质1的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 249,比苏丹红Ⅱ的分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 277 少28(即2个 $-CH_2$),杂质1的可能结构式示于图5a,可能的质谱裂解途径示于图6a。杂质2的分子离子峰 m/z 263,与苏丹红Ⅱ的分子离子峰 m/z 277 相差14($-CH_2$),结合苏丹红Ⅱ

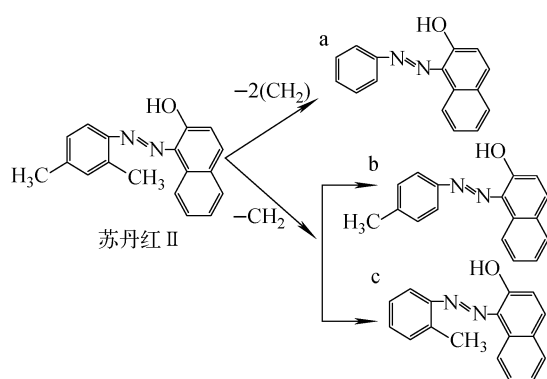


图5 杂质1(a)和2(b、c)的可能结构式

Fig. 5 Possible structures of impurities 1 (a) and 2 (b, c)

的结构式推导出杂质2可能的结构式示于图5b和5c,根据这两种结构式查找相关化合物,发现b并无CAS号,即可暂认定杂质2的可能结构式为c。推测其可能的质谱裂解途径示于图6b。

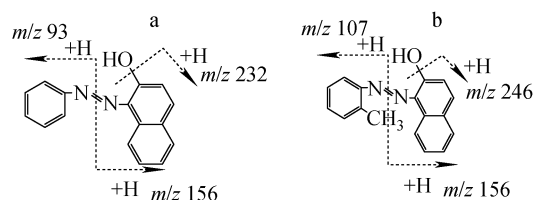


图6 杂质1(a)和2(b)的质谱裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathways of impurities 1 (a) and 2 (b)

结合文献^[12]、结构式分析和质谱裂解规律,初步推测杂质1为苏丹红Ⅰ,杂质2为溶剂橙2。

采用 HPLC-IT-TOF MS 法对苏丹红Ⅰ和溶剂橙2的纯品进行一级、二级碎片分析,得到的精确分子质量和碎片离子质荷比结果列于表2。

表2 苏丹红Ⅰ和溶剂橙2的母离子和子离子参数

Table 2 Parent ions and product ions of Sudan I and Solvent Orange 2

纯品 Pure compound	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular weight
苏丹红Ⅰ	249.095	232.112, 156.038	$C_{16}H_{12}N_2O$	248.28
溶剂橙2	263.113	246.112, 107.070	$C_{17}H_{14}N_2O$	262.31

向苏丹红Ⅱ样品中分别加入苏丹红Ⅰ和溶剂橙2进行 HPLC 测试,结果示于图7。可知,杂质1和2的峰高明显增加,保留时间完全一致,从而可以确定杂质1和杂质2分别为苏丹红Ⅰ和溶剂橙2。

通过比较苏丹红Ⅱ样品中杂质及纯品的保留时间、分子质量及碎片信息,发现杂质1与杂质2分别与苏丹红Ⅰ、溶剂橙2完全一致。因此,最终确认杂质1为苏丹红Ⅰ,杂质2为溶剂橙2。

杂质3和4的准分子离子峰均为 m/z

277,且裂解方式符合苏丹红Ⅱ的碎裂特征,推测是苏丹红Ⅱ的同分异构体,即分子式均为 $C_{18}H_{16}N_2O$,可能的结构式示于图8。由于市场上没有该物质的纯品,所以无法对该推测结果进行验证。

2.2 杂质纯品纯度定值

杂质苏丹红Ⅰ采用一级标准物质 GB W10056,纯度标准值为99.9%。

溶剂橙2的液相色谱面积归一法结果列于表3,溶剂橙2的纯度为99.13%,6次测量得到的相对标准偏差为0.042%。

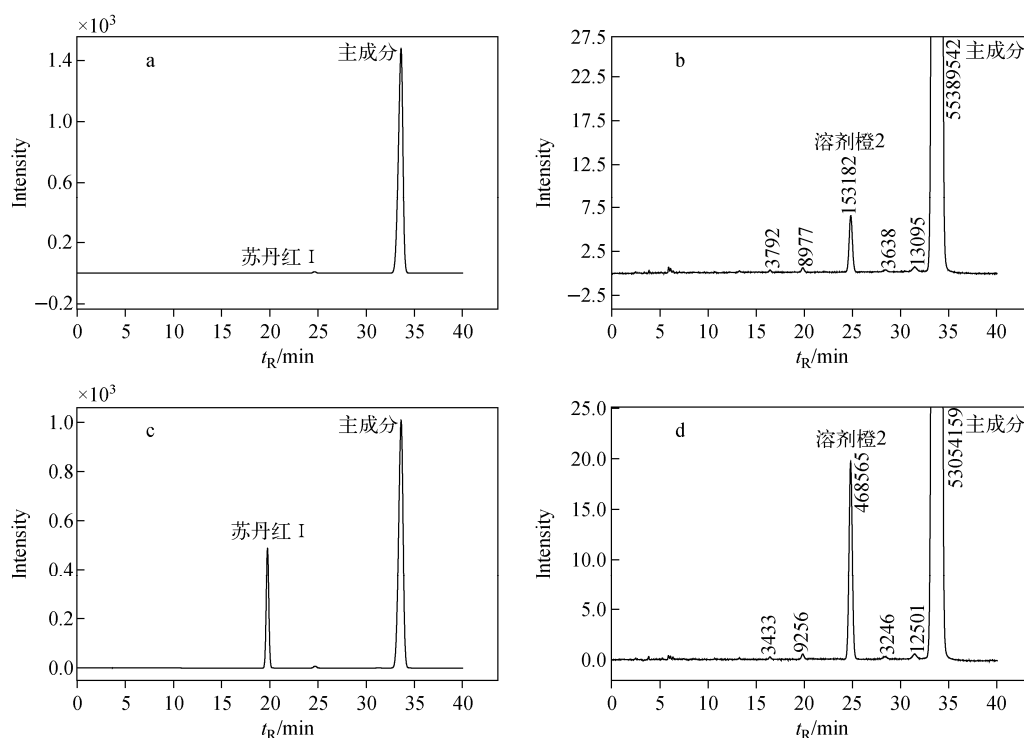


图7 添加苏丹红 I 前(a)、后(c)和溶剂橙 2 前(b)、后(d)的苏丹红 II 样品的色谱图

Fig. 7 Chromatograms of Sudan II samples before (a, b) and after (c, d) adding Sudan I and Solvent Orange 2

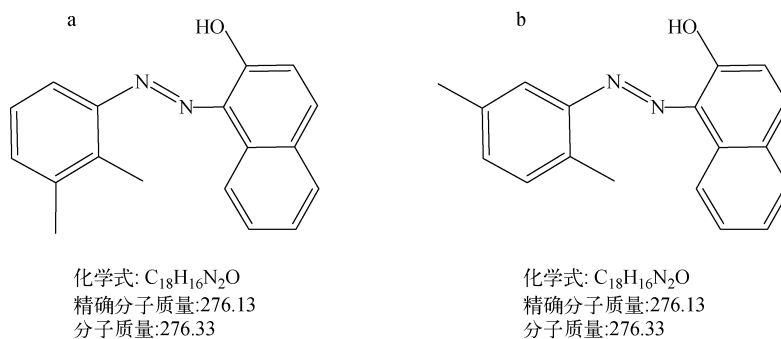


图8 杂质 3(a)和 4(b)的可能结构式

Fig. 8 Possible chemical structures of impurities 3 (a) and 4 (b)

表3 溶剂橙 2 的检测纯度

Table 3 Purity of Solvent Orange 2

样品 Sample	纯度 Purity/%
1	99.21
2	99.10
3	99.11
4	99.11
5	99.12
6	99.20
平均值	99.13
相对标准偏差/%	0.042

2.3 苏丹红 II 纯品中主要有有机杂质的定量

对杂质 1 和 2 定性后,选取相应纯品,采用外标工作曲线法对其进行定量测定。由于杂质 3 和 4 没有相应纯品,且其是苏丹红 II 的同分异构体,所以采用与主成分苏丹红 II 响应因子一致的方法对这 2 种杂质进行定量分析^[11, 13]。

苏丹红 I 的线性回归方程为 $y = 81.574x - 0.2886$, 相关系数 $R^2 = 1$ 。溶剂橙 2 的线性回归方程为 $y = 83.417x - 0.6554$, 相关系数 $R^2 = 1$ 。6 份苏丹红 II 样品中杂质 1~4 的测量结果列于表 4。

表 4 苏丹红Ⅱ中主要有机杂质的含量测定结果
Table 4 Contents of main organic impurities in Sudan Ⅱ

样品 Sample	杂质 1(苏丹红Ⅰ) Impurity 1 (Sudan I)/%	杂质 2(溶剂橙 2) Impurity 2 (Solvent Orange 2)/%	杂质 3 Impurity 3/%	杂质 4 Impurity 4/%
1	0.0169	0.258	0.013	0.027
2	0.0172	0.258	0.012	0.03
3	0.0169	0.266	0.011	0.028
4	0.0173	0.266	0.012	0.028
5	0.0167	0.251	0.011	0.026
6	0.0166	0.251	0.011	0.027
平均值	0.0170	0.258	0.012	0.028
RSD/%	1.6	2.5	7.0	4.9

3 结论

本实验采用 HPLC-IT-TOF MS 法和 LC-MS/MS 法对苏丹红Ⅱ中的有机杂质进行定性分析,采用 HPLC 外标法对已定性杂质进行定量分析,得到杂质苏丹红Ⅰ和溶剂橙 2 的含量分别为 0.017%、0.258%,相对标准偏差分别为 1.6%、2.5%。对未完全定性的杂质 3 和 4 采用与主成分苏丹红Ⅱ响应因子一致的方法进行定量分析,其含量分别为 0.012%、0.028%,相对标准偏差分别为 7.0%、4.9%。该实验可为苏丹红Ⅱ一级标准物质的研制奠定基础,对食品检验等领域中苏丹红Ⅱ的准确测定具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李娟,丁晓明,刘宏民,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定豆制品中 6 种违禁偶氮染料[J]. 质谱学报,2015,36(3):229-236.
LI Juan, DING Xiaoming, LIU Hongmin, et al. Simultaneous determination of six banned azo-dyes in soybean products by HPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2015, 36(3): 229-236(in Chinese).
- [2] 江晨舟,孙洁敏,张驰中,等. 食品中苏丹红检测方法的比较和优化[J]. 上海计量测试,2016,43(3):18-24.
JIANG Chenzhou, SUN Jiemin, ZHANG Chizhong, et al. Comparison and optimization of detection methods for Sudan red in foods[J]. Shanghai Measurement and Testing, 2016, 43(3): 18-24(in Chinese).
- [3] SRICHAROENA P, LIMCHOOWONGA N, SRIPAKDEE T, et al. Electrolyte-assisted microemulsion breaking in vortex-agitated solidified floating organic drop microextraction for preconcentration and analysis of Sudan dyes in Chili products[J]. Anal Methods, 2017, 9(25): 3810-3818.
- [4] 宁啸骏,王林,虞成华,等. UPLC-MS/MS 同位素内标法测定食品中对位红、苏丹红Ⅰ~Ⅳ的研究[J]. 质谱学报,2009,30(1):41-46.
NING Xiaojun, WANG Lin, YU Chenghua, et al. UPLC-MS/MS isotopic internal standard determination of parared and sudan I-IV in food[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(1): 41-46(in Chinese).
- [5] CHAILAPAKUL O, WONGSAWAT W, SIANGPROH W, et al. Analysis of Sudan I, Sudan II, Sudan III, and Sudan IV in food by HPLC with electrochemical detection: comparison of glassy carbon electrode with carbon nanotube-ionic liquid gel modified electrode[J]. Food Chem, 2008, 109(4): 876-882.
- [6] 喻凌寒,宋之光,苏流坤,等. 高效液相色谱-离子阱质谱联用测定食品中 7 种苏丹红类染料[J]. 质谱学报,2006,27(4):221-225.
YU Linghan, SONG Zhiguang, SU Liukun, et al. Determination of 7 kinds of sudan dye in food by HPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2006, 27(4): 221-225(in Chinese).

- [7] ZHANG C J, LI G K, ZHANG Z M, et al. A hydrazone covalent organic polymer based micro-solid phase extraction for online analysis of trace Sudan dyes in food samples[J]. *J Chromatogr A*, 2015, (1 419): 1-9.
- [8] 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 Wenrui, 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(in Chinese).
- [9] XIE X Y, CHEN L, PAN X Y, et al. Synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers by reversible addition fragmentation chain transfer strategy and its application in the Sudan dyes residue analysis[J]. *J Chromatogr A*, 2015, (1 405): 32-39.
- [10] WESTWOOD S, CHOTEAU T, DAIREAUX A, et al. Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(6): 3 118-3 126.
- [11] 暴海霞, 戴新华, 张伟, 等. 17 α -羟孕酮纯度及其杂质分析方法的研究[J]. *化学试剂*, 2014, 36(3): 226-230.
- BAO Haixia, DAI Xinhua, ZHANG Wei, et al. Analysis of the purity and impurities in 17 α -hydroxyprogesterone[J]. *Chemical Reagents*, 2014, 36(3): 226-230(in Chinese).
- [12] 赵贵平, 孟云, 仇雯荔, 等. 苏丹红 I 的 LC-MS/MS 分析[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(6): 290-291.
- ZHAO Guiping, MENG Yun, QIU Wenli, et al. Analysis method of Sudan I by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2005, 24(6): 290-291(in Chinese).
- [13] 王孜一, 戴新华, 张伟, 等. 皮质醇纯物质中杂质分析与定值[J]. *质谱学报*, 2014, 35(5): 413-419.
- WANG Ziyi, DAI Xinhua, ZHANG Wei, et al. Impurities analysis and purity determination of pure hydrocortisone[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2014, 35(5): 413-419(in Chinese).