

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/GBAS

粤港澳大湾区标准促进会团体标准

T/GBAS 2203—2021

食品中 9 种非法添加色素的测定 高效液相色谱法和液质联用法

Determination of 9 kinds of illegally added pigments in food
high performance liquid chromatography and liquid mass spectrometry methods

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省粤港澳大湾区标准促进会

发 布

目录

前 言.....	II
食品中 9 种非法添加色素的测定 高效液相色谱法和液质联用法.....	1
第一法 高效液相色谱法.....	1
1 范围.....	1
2 原理.....	1
3 试剂和材料.....	1
4 仪器和设备.....	2
5 分析步骤.....	2
6 分析结果的表述.....	5
7 精密度.....	6
8 其他.....	5
第二法 液相色谱-质谱/质谱法.....	5
9 原理.....	5
10 试剂和材料.....	5
11 仪器和设备.....	5
12 分析步骤.....	6
13 分析结果的表述.....	7
14 精密度.....	7
15 其他.....	8
附录 A.....	9
附录 B.....	10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东省粤港澳大湾区标准促进会提出并归口。

本文件起草单位：广东产品质量监督检验研究院、广东省科学院与医学工程研究所。（港澳参与机构待定）

本文件主要起草人：

粤港澳大湾区高品质食品标准
(征求意见稿)

食品中 9 种非法添加色素的测定 高效液相色谱法和液质联用法

第一法 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了食品中亮黑、坚牢绿、丽春红 2R、荧光素钠、丽春红 3R、专利蓝、金黄粉、荧光桃红 B、孟加拉玫瑰红测定方法。

本文件适用于糖果、蜜饯、糕点、巧克力、薯片、辣椒酱、液态奶、饮料、配制酒中亮黑、坚牢绿、丽春红 2R、荧光素钠、丽春红 3R、专利蓝、金黄粉、荧光桃红 B、孟加拉玫瑰红测定。

2 原理

样品用聚酰胺吸附法提取色素，制成水溶液，注入高效液相色谱仪，经反相色谱分离，根据保留时间定性和与峰面积比较进行定量。

3 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇：色谱纯。

3.1.2 乙腈：色谱纯。

3.1.3 柠檬酸。

3.1.4 无水乙醇。

3.1.5 甲醇。

3.1.6 乙酸铵。

3.1.7 氨水。

3.1.8 甲酸。

3.2 试剂配制

3.2.1 柠檬酸溶液水溶液：称取20g柠檬酸，溶于100 mL水中。

3.2.2 无水乙醇-氨水-水解吸液(7+2+1):量取700 mL无水乙醇、200mL氨水和100mL水至1 L烧杯中,混匀。

3.2.3 甲醇-甲酸混合溶液(6+4,体积比):量取甲醇(3.1.5) 60mL,甲酸 40mL,混匀。

3.3 标准品

3.3.1 亮黑(60%)。

3.3.2 坚牢绿(95%)。

3.3.3 丽春红2R(96%)。

3.3.4 荧光素钠(99%)。

3.3.5 丽春红3R(98%)。

3.3.6 专利蓝(86%)。

3.3.7 金黄粉(94%)。

3.3.8 荧光桃红B(99%)。

3.3.9 孟加拉玫瑰红(99%)。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备(100mg/L):精密称取各标准品(按纯度折算),用少量蒸馏水溶解,用水定容至刻度,混匀,得相应标准储备液。4℃冰箱保存,有效期为12个月。

3.4.2 混合标准系列工作液:根据需要准确移取相应标准储备液,用蒸馏水稀释配制成0.3、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0、20.0、30.0mg/L系列工作溶液。4℃冰箱保存。有效期为1个月。

3.5 材料

3.5.1 聚酰胺粉(100-200目)。

3.5.2 层析柱:20×2.5cm(内径)层析管,柱底填一层薄脱脂棉,备用。

3.5.3 刻度玻璃管或刻度离心管:10ml。

3.5.4 针筒过滤器, PVDF(聚偏氟乙烯)或 PTFE(聚四氟乙烯)滤膜,孔径 0.45μm。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱仪:配有二极管阵列检测器。

4.2 涡旋混合器。

4.3 离心机:转速≥7500 r/min。

4.4 超声清洗机。

4.5 分析天平:感量为 0.001 g。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 果汁饮料及果汁、果味碳酸饮料等：称取试样 5g~20g（精确至 0.001g），含二氧化碳样品加热或超声驱除二氧化碳。

5.1.2 液态奶、水制辣椒酱：称取试样 5g~20g（精确至 0.001g），放入 100mL 烧杯中。加水 25mL。

5.1.3 配制酒类：称取 5g~20g（精确至 0.001g），放入 100mL 烧杯中，加沸石数粒，加热驱除乙醇。

5.1.4 糖果、蜜饯类等：称取 5g~10g（精确至 0.001g）加适量水，搅拌均匀，以 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，重复几次，直至提取液无色为止，合并上清液。

5.1.5 含油量较大的试样（糕点、巧克力、薯片、油制辣椒酱等）：准确称取试样 2g~5g（精确至 0.001g），置于 50 mL 具塞离心管中，加 20 mL 石油醚，涡旋 1 min，超声或振摇（速率≥250 转/分钟）提取 10 min，8000 转/分钟 离心 5 min，弃去上清液，除尽石油醚溶剂，加入 25 mL 乙醇氨水溶液（3.2.2）至除油试样中，涡旋 1 min，50℃超声或振摇（速率≥250 转/分钟）提取 20 min，8000 转/分钟离心 5 min（若 8000 转/分钟 离心后提取液仍然浑浊，可转入高速离心机专用管，15000 转/分钟 离心 5 min），取上清液置于 100 mL 烧杯中，加入 15 mL 乙醇氨水溶液（3.2.2）重复提取 1 次，离心后合并上清液，用柠檬酸溶液调 pH 到 6 左右，水浴蒸发至 2 mL 左右，加入 10 mL 水溶液溶解，作为色素提取液。

5.2 色素提取

经 5.1 预处理的样品溶液置于 200 mL 烧杯中，加柠檬酸溶液调 pH 到 6，水浴加热至 60℃，将 1g 聚酰胺粉加少许水调成粥状，倒入样品溶液中，搅拌片刻，恒温 20min，中途搅拌数次。将样品溶液边搅拌边倒入保持垂直的层析管中，用 200 mL 烧杯承接流出液，如有聚酰胺粉流出，将流出聚酰胺粉再次注入层析管，使酰胺粉在柱内分布均匀。用 60℃ pH 为 4 的水洗涤 1 次~2 次。用解吸液（3.2.2）解吸，直至色素完全解吸，收集解吸液，加柠檬酸中和，水浴上蒸发至近干，加水溶解，转移至刻度玻璃管并定容（体积视颜色而定），经 0.45μm 微孔滤膜过滤（如果过滤困难，可以先经 15000 转/分钟 离心 5 min 后取清液再过滤），取 10μL 注入高效液相色谱仪分析。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱：Ultimate HPLC C18 柱（250mmx4.6mm id，5 μm），或相当者。

5.2.2 柱温：30℃。

5.2.3 进样量：10 μL。

5.2.4 检测波长：亮黑、坚牢绿和专利蓝 630nm；丽春红 2R、丽春红 3R、金黄粉、荧光素钠、荧光桃红 B、孟加拉玫瑰红 500nm。（或按每种色素最大吸收波长进行定量：坚牢绿 623nm、丽春红 2R 507nm、荧光素钠 491nm、丽春红 3R 510nm、专利蓝 635nm、金黄粉 485nm、荧光桃红 B 547nm、孟加拉玫瑰红 557nm、亮黑 570 nm。）

5.2.5 流速：1.0 mL/min。

5.2.6 流动相：甲醇（A）- 0.02 mol/L 乙酸铵溶液（B），梯度见表1。

将制备好的肌肉、内脏、鱼、虾、贝类试样置于-18℃条件下避光保存；将制备好的蛋和奶试样置于4℃条件下避光保存。

表1. 流动相梯度

Time (min)	A (%)	B (%)
0	35	65
10	70	30
15	78	22
20	90	10
23	99	1
28	35	65

5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中各待测物的浓度为横坐标，以相应的峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。标准品液相色谱图参见附录 A。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到各待测物的峰面积，用标准工作曲线对待测样品进行外标法定量，得到待测液中各待测物的浓度。

5.5 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

6 分析结果的表述

1.1 试样中各待测物的含量按公式（1）计算：

$$X_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X_i —— 试样中待测化合物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- ρ_i —— 由标准曲线得到的试样溶液中待测化合物的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- V —— 试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的取样量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果保留 4 位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

8 其他

在称样 2.0g，试样最终定容体积为 2ml 时，检出限为 1.0 mg/kg，定量限为 3.0 mg/kg。

第二法 液相色谱-质谱/质谱法

9 原理

样品用聚酰胺吸附法提取色素，制成水溶液，液相色谱-质谱/质谱测定，外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 试剂

同 3.1。

10.2 试剂配制

同3.2。

10.3 标准品

同3.3。

10.4 标准溶液配制

同3.4

10.5 材料

同3.5。

11 仪器和设备

11.1 液相色谱串联四极杆质谱仪：配电喷雾离子源。

其余同4.2~4.7。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

同 5.1。

12.2 仪器参考条件

由于测试结果取决于所使用的仪器，因此不能给出色谱分析的普遍参数，用下列参数已被证明对测试是合适的：

12.2.1 液相色谱参考条件

12.2.1.1 色谱柱：C18 柱，3.0×150 mm，3.5 μm，或相当者。

12.2.1.2 流动相：A：含20mmol/L 甲酸铵和0.1%的甲酸水溶液；B乙腈，梯度洗脱。见表2。

表2 流动相条件

时间(min)	流速 (μL/min)	A	B
0.0	400	60	40
2.0	400	50	50
4.0	400	25	75
7.0	400	10	90
9.5	400	2	98
11.0	400	2	98
13.0	400	60	40
15.0	400	60	40

12.2.1.3 进样量：5 μL。

12.2.1.4 柱温：40 °C。

12.2.2 质谱/质谱参考条件

12.2.2.1 电离方式：电喷雾电离，正离子扫描/负离子扫描；

12.2.2.2 扫描方式：多反应监测(MRM)。

12.2.2.3 气帘气：20 L/min；GS1雾化气：55 L/min；GS2辅助加热气：55 L/min；CAD碰撞气：Medium；辅助加热气温度：550°C；喷雾电压：4500 v。

12.3 标准曲线的制作

分别吸取一定量的混合标准工作液。在仪器最佳工作条件下，按浓度由小到大的顺序，依次对标准工作溶液进样。以各待测物峰面积为纵坐标，以系列标准溶液中各组分含量（mg/L）为横坐标，绘制标准曲线。

12.4 定性测定

在相同条件下进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现，而且所选择的离子偏差不超过表3规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	≥ 50%	20%~50%	10%~20%	≤ 10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

12.5 定量测定

在仪器最佳工作条件下，对标准工作溶液进样。用标准工作曲线按外标法定量，样品溶液中被测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下着色剂标准品多反应检测(MRM)色谱图参见附录B。

12.6 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

13 分析结果的表述

1.3 试样中待测化合物的含量按公式（2）计算：

$$X_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_i ——试样中待测化合物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中待测化合物的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的取样量，单位为克（g）。

计算结果应扣除空白值，以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果大于等于 1.0 mg/kg 时，保留三位有效数字；结果小于 1.0 mg/kg 时，保留两位有效数字。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

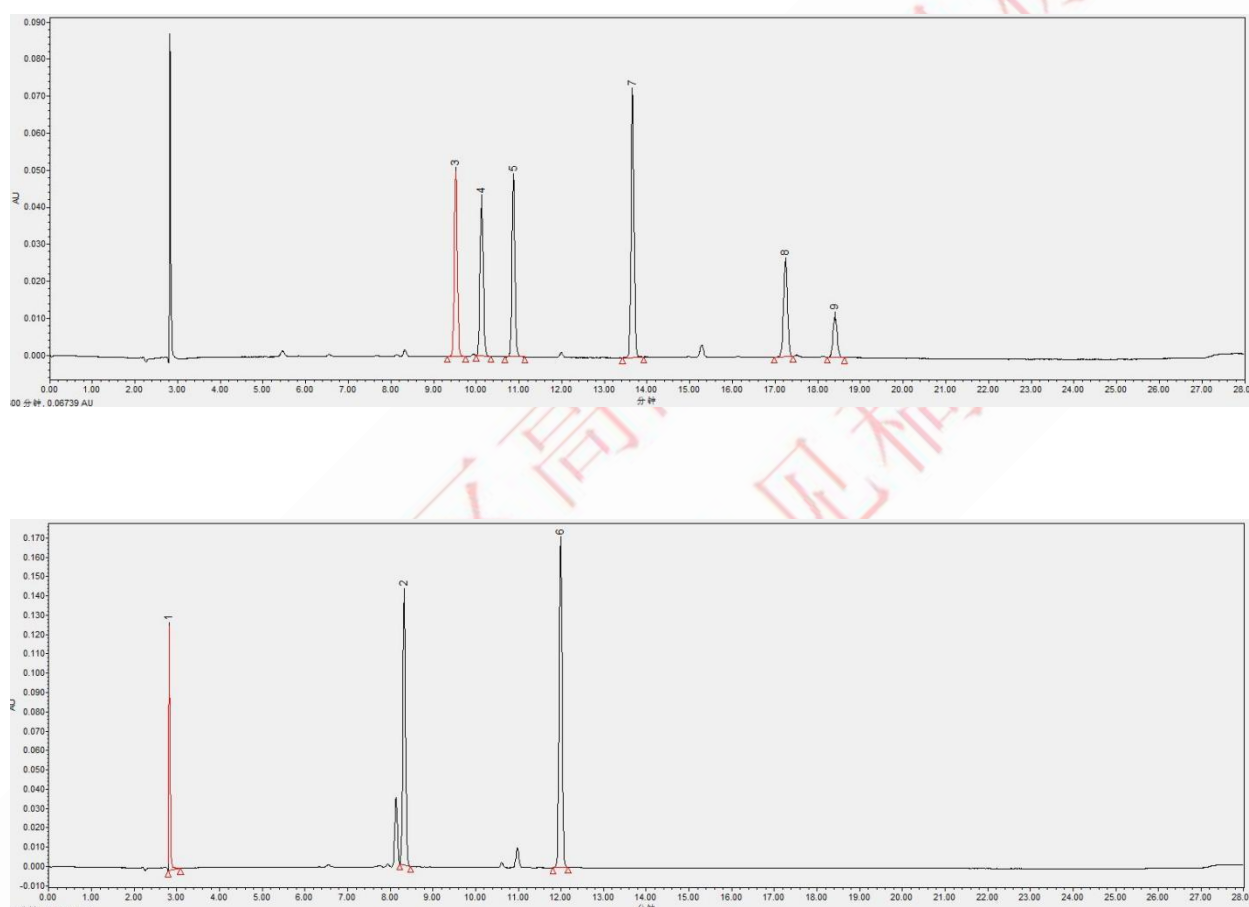
15 其他

当取样量为1.0 g时，最终定容体积为2ml时，检出限均为0.5 mg/kg，定量限均为1.5 mg/kg。

粤港澳大湾区高品质食品标准
(征求意见稿)

附录 A

液相色谱参考图



图A.1 9种合成食品色素标准品的色谱图

1-亮黑 2-坚牢绿 3-丽春红2R 4-荧光素钠 5-丽春红3R 6-专利蓝 7-金黄粉 8-荧光桃红B 9-孟加拉玫瑰红

附录 B

参考质谱条件

(1) 质谱参数

离子源：鞘双流电喷雾电离（ESI）源，正离子模式；干燥气温度 300°；干燥气流 8L/min，鞘气温度 350°；鞘气流速 10L/min。

(2) 母离子、子离子参数

表 4 9 种目标化合物的母离子、子离子

色素名称	Q1 (母离子 m/z)	Q3 (子离子 m/z)	DP (去簇电 压)	CE (碰撞能 量)
亮黑	410.6	291.1* 398.9	-70.5	-32.3 -33.0
坚牢绿	380.9	170.1* 80.0	-70.0	-45.8 -90.5
丽春红2R	217.0	136.3* 79.8	-50.0	-25.2 -51.4
荧光素钠	332.9	202.0* 287.2	95	80.8 52.2
丽春红3R	224.1	80.0* 141.9	-46.2	-55.0 -41.1
专利蓝	559.1	435.0* 479.2	-137.5	-61.3 -44.2
金黄粉	327.0	171.1* 156.1	-70.0	-38.3 -48.3
荧光桃红	702.8	595.8* 514.7	-100	-60.5 -75.6
孟加拉玫 瑰红	800.6	645.7* 126.9	-50.4	-42.7 -86.8

注：*号为定量离子。

粤港澳大湾区高品质食品标准
(征求意见稿)