

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 编制说明

一、工作概况

（一）任务来源、起草单位、起草人

为满足粤港澳大湾区人民对高品质产品的需求，推动粤港澳大湾区质量水平的整体提升，以高标准引领行业高质量发展，广东省市场监督管理局筹建粤港澳大湾区标准化研究中心，下设食品工作组。食品工作组归口指导单位为省食品安全委员会办公室和香港、澳门相关食品安全监管部门，具体工作由广东省食品检验所牵头负责。广东省市场监督管理局组织专题研究（《关于首批食品“湾区标准”研制清单及经费分配的报告》（粤食检[2021]57号）），由广州海关技术中心牵头制订《粤港澳大湾区标准促进会团体标准 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》。

（二）起草单位、起草人

起草单位：广州海关技术中心、广东产品质量监督检验研究院、广东省科学院生物与医药工程研究所。（港澳参与机构待定）

起草人：

（三）简要起草过程

1. 2021 年 7 月 1 日启动标准研制，购置试剂、耗材和标准品。
2. 2021 年 8 月，开始方法研制。
3. 2021 年 8 月 28 日，提交标准文本和编制说明征求意见稿。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

（一）与现行法律、法规的关系

以《食品安全法》为依据，符合并满足相关的法规要求。

（二）与食品安全国家标准、国家标准、行业标准等现行标准的关系

国际上允许使用的合成着色剂已由过去的上百种降至二十余种，而这种下降趋势仍在继续。《GB 2760-2014 食品添加剂使用卫生标准》不允许使用亮黑、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、孟加拉玫瑰红，而国外有些国家允许使用，其中亮黑在中国香港和欧盟允许使用，荧光桃红、孟加拉玫瑰红在日本可用，专利蓝在中国香港、欧盟、俄罗斯可用，坚牢绿在中国澳门、美国、日本、国际食品添加剂法典委员会、加拿大允许使用。

（三）与香港规例、澳门行政法规的关系

香港《食物内染色料规例》规定，允许使用亮黑、专利蓝，澳门第 556/2009 号行政法规允许使用坚牢绿着色剂。

三、主要技术内容确定依据（如技术指标、试验方法、检验规则等的依据）

（一）标准编制原则

本标准依据 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中关于检测方法确认的要求，对本标准中方法参数进行了验证。标准文本按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则》及《食品安全国家标准制（修）订项目管理规定》的要求进行编写。

（二）主要技术内容确定的依据

以糖果、糕点、饮料、配制酒为研究基质，以食品中亮黑、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、

孟加拉玫瑰红为研究对象。研究检测样品前处理方法、液相色谱检测条件、方法的正确度、精密度和检出限、定量限。

(二) 方法研制、实验条件的确定、方法的性能检验考察

第一法 液相色谱法

1 液相色谱条件的选择

(1) 色谱柱的选择

本方法比较了Luna 5u C18柱(250x4.6mm, 5 μm), xBridge C18 柱(4.6x250mm, 5 μm) 和Ultimate HPLC C18柱(250mmx4.6mm id, 5 μm) 三种色谱柱,结果表明,相同条件下, Luna 5u C18柱和xBridge C18 柱的分离度和稳定性没有Ultimate HPLC C18柱好,所以选择Ultimate HPLC C18柱作为本方法的色谱柱。

(2) 流动相的选择

流动相的选择与分离度直接相关,虽然考虑到用不同波长定量,但是原则上,我们都确保每两种物质的分离度能达到1.5,即完全分离,这样,对于不常见而且扫描光图谱特征性不强的色素,就排除了重叠的干扰,减小了定性的难度。对于水溶性色素,我们首先考虑甲醇和乙酸铵,经过十九次调整,甲醇比例从26%升至40%,结果显示,26%-34%之间,柠檬黄和固黄很难分离;36%-40%之间,荧光素钠和胭脂红2R分离度很小,最终选择甲醇初始比例35%,依次根据需要调整梯度。得到如下表1的流动相梯度比例。

表1. 流动相梯度

Time(min)	甲醇 A(%)	0.02 mol/L 乙酸铵溶液 B(%)
0	35	65
10	70	30
15	78	22
20	90	10
23	99	1
28	35	65

(3) 波长的选择

本方法综合考虑各化合物的最大吸收波长,亮黑570nm、坚牢绿623nm、丽春红2R 507nm、荧光素钠491nm、丽春红3R510nm、专利蓝635nm、金黄粉485nm、荧光桃红547nm、孟加拉玫瑰红557nm,分别选择500nm、630nm作为定量检测波长。其中500nm用于定量丽春红2R、荧光素钠、丽春红3R、金黄粉、荧光桃红、孟加拉玫瑰红,630nm用于定量亮黑、坚牢绿、专利蓝。色谱图见图1。

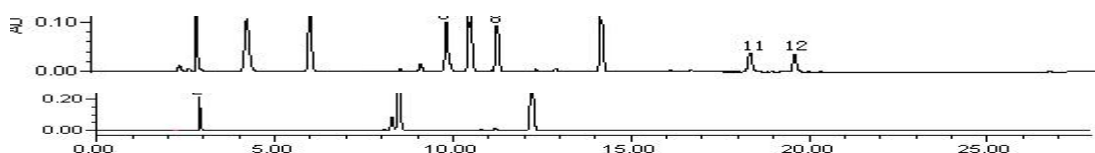


图1 9种合成食品色素标准品的色谱图

1-柠檬黄 2-亮黑 3-日落黄 4-诱惑红 5-坚牢绿 6-丽春红2R 7-荧光素钠 8-丽春红3R 9-专利蓝 10-金黄粉 11-荧光桃红 12-孟加拉玫瑰红

2. 样品前处理的选择

开始研发时我们自制聚酰胺小柱,选择14~30目聚酰胺粉1.0g、1.5g、2.0g作为填充内容物进行实验。结果表明,固定填充内容物为2.0g时,分别用5 ug、10 ug、20ug、30ug、40ug、50ug标准混标上样.实验证明,40ug回收率达到99%以上,50ug时明显偏低,10 ug以内结果也偏低。该数据表明,此填充柱可用的浓度范围比较窄。

鉴于以上自制填充柱的容量比较小,后来购置颗粒100-200目60cc的聚酰胺成品柱,发现标准品100ug添加量时的回收率都能达到98%,而且在绿茶和糖果中的回收率依然很好,结果见表3。故选择60cc的聚酰胺成品柱进行

样品前处理,达到提取、净化、浓缩的目的。经充分探索,确定样品的提取和净化步骤如下:

试样提取

提取:液体样品称取1.0-10.0g,用柠檬酸溶液调节pH至6,加热至60℃后直接上净化柱或用适量水稀释,调节pH至6后待净化。固体样品粉碎后称取2.0-10.0 g,加适量水,搅拌均匀,以4000rpm离心10min,取上清液,重复几次,直至提取液无色为止,合并上清液,用柠檬酸溶液调节pH至6,加热至60℃。

试样净化

净化:将上述提取液注入活化过的净化柱,控制流速每秒2-3滴。待吸附完全后,用pH4的60℃水冲洗小柱,至滤液无色,继续抽真空3min,然后用乙醇-氨水-水(7+2+1)解析液解吸附,控制流速每秒2-3滴,收集解吸液,水浴上挥去近干,用少许蒸馏水溶解,并定容(体积视颜色而定),经0.45 μm水系滤膜过滤,上机。

3. 方法的灵敏度、检出限、定量限和线性范围与回收率

方法的检出限和定量限:

色谱分析的定性检出限定义为响应值为三倍基线噪音时所需的样品量;

色谱分析的定量检出限定义为响应值为十倍基线噪音时所需的样品量。

计算公式:

$$LOD = \frac{3N}{S} = \frac{3h_{\text{噪音}}}{h_{\text{试样}}/c}; \quad LOQ = \frac{10N}{S} = \frac{10h_{\text{噪音}}}{h_{\text{试样}}/c}$$

式中 LOD——检出限, mg/kg;

LOQ——检出限，mg/kg；

N——基线噪音，pA；

S——仪器灵敏度，pA. kg/mg；

h 噪音——基线噪音的峰高，pA；

h 试样——试样的峰高，pA；

c——被检物质的含量，mg/kg。

按照检定条件进行加标实验，按前述优化条件下进样六次，分别获得六次进样的信噪比，以3倍信噪比对应的目标物的质量浓度为方法的检出限(LOD)，以10倍信噪比为对应目标物的质量浓度为方法的定量限(LOQ)。

在上述优化条件下，对9种色素标样进行测定，标样色谱图见图1。采用峰面积定量，以峰面积（积分值）对色素质量浓度（mg/L）求得线性回归方程。结果见表2。以3倍的信噪比考察了各种色素的最低检出限，亮黑、坚牢绿、丽春红2R、荧光素钠、丽春红3R、专利蓝、金黄粉、荧光桃红和孟加拉玫瑰红的最低检出限为1.0mg/kg。以10倍信噪比为确定目标物的质量浓度为方法的定量限（LOQ）为3.0mg/kg。

表2 9种色素的线性方程和相关系数

色素名称	线性范围 (ug/mL)	线性方程	相关系数 (R)
亮黑	0.1-30.0	A=13429C+17858	0.9998
坚牢绿	0.1-30.0	A=-11749C+28360	0.9993
丽春红2R	1.0-30.0	A=1713C+18017	0.9998
荧光素钠	0.5-30.0	A=4008C+59719	0.9996
丽春红3R	0.1-30.0	A=1996C+21927	0.9999
专利蓝	0.1-30.0	A=9095C+104211	0.9998
金黄粉	0.1-30.0	A=3667C+27976	0.9999
荧光桃红	0.1-30.0	A=1514C+10456	0.9999
孟加拉玫瑰红	2.0-30.0	A=759C+7734	0.9998

在绿茶、棒棒糖、糕点、液态奶、辣椒酱、配制酒样品中中加入 3 种不同浓度的各种色素,经提取后检测, 计算回收率和精密度(表 3)。试验表明, 3 种浓度下绿茶样品的提取回收率在 90.5% ~97.2% 之间,平均回收率 93.86%, RSD 在 1.9%~7.2%之间。3 种浓度下棒棒糖样品的提取回收率在 89.1% ~100.4% 之间,平均回收率 95.83%, RSD 在 1.8%~8.2%之间。糕点、液态奶、辣椒酱、配制酒回收率在**~**%之间,平均回收率**%, RSD 在**~**之间。

表 3-1. 绿茶和棒棒糖中 9 种色素的加标回收率结果 (n=6)

色素名称	绿茶			棒棒糖		
	加标水平 (mg/kg)	回收 率y/%	RSDs /%	加标水平 (mg/kg)	回收率/%	RSDs /%
亮黑	1	93.6	6.7	1	89.1	8.0
	2	94.9	3.4	2	97.2	5.5
	4	95.0	2.0	4	95.7	3.4
坚牢绿	1	93.9	6.5	1	95.8	5.2
	2	93.1	4.2	2	97.0	3.5
	4	97.1	2.7	4	98.3	3.0
丽春红2R	1	91.4	5.6	1	92.3	5.6
	2	90.5	5.1	2	94.4	3.8
	4	92.8	4.8	4	96.5	2.7
荧光素钠	1	95.4	6.1	1	93.7	4.9
	2	90.1	4.4	2	98.7	3.2
	4	95.1	1.9	4	99.1	1.8
丽春红3R	1	91.1	4.6	1	94.9	5.9
	2	92.1	4.4	2	96.5	3.9
	4	96.4	1.7	4	100.4	2.6
专利蓝	1	88.2	5.2	1	98.4	6.3
	2	91.0	3.1	2	97.4	2.2
	4	92.5	3.4	4	99.7	2.0
金黄粉	1	89.5	7.1	1	93.9	6.1
	2	91.2	2.1	2	98.6	3.5
	4	93.6	3.1	4	96.1	1.6
荧光桃红	10	92.3	5.7	10	95.3	7.8
	20	95.3	3.0	20	97.6	3.9
	40	96.3	2.2	40	97.3	3.8
孟加拉玫 瑰红	10	92.2	6.6	10	93.8	8.2
	20	95.3	3.5	20	96.5	3.4
	40	97.2	4.0	40	98.5	2.3

第二法 液相色谱-质谱/质谱法

1. 液相色谱参考条件

1.1 色谱柱：C18 柱，2.1×150 mm，1.8 μm，或相当者。

1.2 流动相：A：含20mmol/L 甲酸铵和0.1%的甲酸水溶液；乙腈，梯度洗脱。见表4。

表4 流动相条件

时间(min)	流速 (μL/min)	A	B
0.0	400	70	30
2.0	400	50	50
6.0	400	40	60
10.0	400	2	98
17.0	400	2	98
17.2	400	70	30
25.0	400	70	30

1.3 进样量：10 μL。

1.4 柱温：30 °C。

2 质谱/质谱参考条件

2.1 电离方式：电喷雾电离，正离子扫描/负离子扫描；

2.2 扫描方式：多反应监测(MRM)。

2.3 气帘气：15 L/min；GS1雾化气：60 L/min；GS2辅助加热气：70 L/min；CAD碰撞气：Medium；辅助加热气温度：500℃；喷雾电压：5000 v。

2.4 母离子、子离子参数

表 5 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	778.0	290.9	-120	-60
		184.9		-110
坚牢绿	763.2	170.0	-110	-92
		497.3		-70
丽春红2R	434.9	193.8	-65	-60
		301.9		-43
荧光素钠	333.4	202.2	95	80
		287.3		50
丽春红3R	442.9	129.1	35	50
		275.0		25
专利蓝	583.1	501.3	140	50
		164.5		55
金黄粉	326.9	170.9	-70	-34
		155.8		-43
荧光桃红	782.7	658.7	-80	-40
		702.6		-35
孟加拉玫	972.5	126.8	-80	-90
瑰红		674.7		-10

注：*号为定量离子。

3. 方法的线性范围

准确吸取适量混合标准工作液和混合内标工作液于 10mL 容量瓶中,用甲醇定容至 10mL。其 9 种待测化合物的浓度分别为 0.050 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L 和 5.00 mg/L, 9 种化合物内标均为 1.0 mg/L, 得到对应的标准工作溶液。在仪器最佳工作条件下, 对标准工作溶液进样。用标准工作曲线按内标法定量, 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。结果表明当待测物的浓度在 50ng/mL-5000ng/mL 范围内时, 线性关系良好。

4. 方法的检出限和定量限

按照检定条件进行加标实验，按前述优化条件下进样六次，分别获得六次进样的信噪比，以 3 倍信噪比对应的目标物的质量浓度为方法的检出限 (LOD)，以 10 倍信噪比为对应目标物的质量浓度为方法的定量限 (LOQ)，从而确定方法的检出限为 0.01 mg/kg，方法的定量限为 0.05 mg/kg。

5. 方法的准确度和精密度（重复性和再现性）

方法以糖果、糕点、液态奶、辣椒酱、饮料、配制酒为样品基质，采用标准添加法对添加样品分别进行回收率和精密度试验。实验验证在 0.05 mg/kg、0.1 mg/kg 和 0.5 mg/kg 加标水平下（分别是 LOQ、2LOQ 和 10LOQ），平均加标回收率为 81.7%–102%，相对标准偏差为 1.06%–13.9%，表 7 为回收率和精密度实验结果。

表 5-1 糖果加标回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

化合物	加标量 0.5 mg/kg		加标量 1.5mg/kg		加标量 5.0mg/kg	
	平均回收	RSD/	平均回收	RSD/	平均回收	RSD/
	率/%	%	率/%	%	率/%	%
亮黑	90.4	5.1	91.7	3.8	92.8	4.7
坚牢绿	89.5	3.2	92.4	4.8	91.7	5.0
丽春红 2R	90.8	3.9	89.7	5.2	93.7	6.1
荧光素 钠	92.7	5.0	93.4	4.7	90.5	3.9
丽春红 3R	93.4	4.8	90.8	5.2	94.7	4.2
专利蓝	96.4	3.9	94.8	5.1	95.0	5.8
金黄粉	97.1	5.4	95.2	6.7	95.1	3.7
荧光桃 红	92.5	3.7	93.5	4.0	98.4	5.2
孟加拉	82.7	2.84	83.8	2.97	90.7	3.47

化合物	加标量		加标量		加标量	
	0.5 mg/kg		1.5mg/kg		5.0mg/kg	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
玫瑰红						

表 5-2 饮料加标回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

化合物	加标量		加标量		加标量	
	0.5 mg/kg		1.5mg/kg		5.0mg/kg	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
亮黑	91.7	3.7	89.5	3.8	92.7	5.2
坚牢绿	89.7	4.9	88.2	6.4	91.3	5.0
丽春红 2R	86.9	6.4	89.4	5.7	90.2	4.5
荧光素钠	90.8	5.7	92.4	4.8	89.8	3.9
丽春红 3R	88.0	6.4	93.1	5.4	91.8	4.2
专利蓝	92.5	5.7	93.4	5.2	95.7	5.8
金黄粉	93.6	4.9	96.4	4.8	98.7	2.7
荧光桃红	90.2	6.0	94.1	5.1	93.4	4.2
孟加拉玫瑰红	93.4	5.6	89.7	2.8	92.4	3.8

三、标准可能带来的经济和社会影响评估

本标准所涉及的 9 种非法添加着色剂都是我国标准不允许使用的，广州海关曾在进口食品中检出专利蓝色素。本标准的建立，为政府部门监管执法提供技术支撑，有利于保护消费者权利。

五、征求意见的采纳情况

六、其他应予以说明的事项