

ICS 67.040
X 42

DB3403

安徽省蚌埠市地方标准

DB3403/T 02—2020

食品中合成着色剂的测定 固相萃取-高效液相色谱法

地方标准信息服务平台

2020-01-03 发布

2020-01-03 实施

蚌埠市市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由蚌埠市疾病预防控制中心提出。

本标准由蚌埠市卫生健康委员会归口。

本标准起草单位：蚌埠市疾病预防控制中心。

本标准参与起草单位：安徽省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、芜湖市疾病预防控制中心、广西壮族自治区疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：常洪、袁明珠、张世满。

地方标准信息服务平台

食品中合成着色剂的测定

固相萃取-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了食品中合成着色剂的固相萃取-高效液相色谱法测定的原理、试剂耗材、仪器设备、分析步骤、结果计算、精密度、检出限。

本标准适用于饮料、调味品、果汁、配制酒、糖果、蜜饯、果冻、罐头、杂粮面粉、肉制品、糕点等食品中合成着色剂的测定。

2 规范性引用文件

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

3.1

合成着色剂

人工合成的能够使食品着色，从而改善食品色调和色泽的可食用物质。本标准中是指常用的柠檬黄、苋菜红、酸性靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝和赤藓红等八种合成着色剂。

4 原理

食品中的合成着色剂用氨化甲醇溶液提取，弱阴离子固相萃取柱净化，经反相液相色谱分离，二极管阵列检测器或紫外检测器测定，保留时间定性和外标峰面积法定量。

5 试剂耗材

5.1 试剂：

5.1.1 甲醇 (CH_3OH) 色谱纯。

5.1.2 氨水 ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 25~28%。

5.1.3 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 。

5.1.4 乙酸锌 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 。

5.1.5 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 优级纯。

5.1.6 草酸钾 ($\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 。

5.1.7 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)。

5.1.8 石油醚 (沸程 $30^{\circ}C \sim 60^{\circ}C$)。

注：除特别注明外，本方法所用试剂均为分析纯，试验用水为符合 GB/T 6682-2008 规定的一级水。

5.2 试剂配制：

5.2.1 乙酸锌溶液 (1.0 mol/L)：称取 22 g 乙酸锌，用水溶解并定容至 100 mL，混匀。

5.2.2 草酸钾/磷酸氢二钾溶液：称取 3.0 g 草酸钾和 7.0 g 磷酸氢二钾，用水溶解并定容至 100 mL，混匀。

5.2.3 柠檬酸溶液：称取 20 g 柠檬酸，用水溶解并定容至 100 mL，混匀。

5.2.4 氨水溶液 (1+9)：取 10 mL 氨水加入 90 mL 水中，混匀。

5.2.5 pH4 水溶液：水加柠檬酸溶液调 pH 值至 4。

5.2.6 pH6 水溶液：水加柠檬酸溶液调 pH 值至 6。

5.2.7 氯化甲醇溶液 (3+97)：取 3 mL 氨水加入到 97 mL 甲醇中，混匀。

5.2.8 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)：称取 1.54 g 乙酸铵，用水溶解并定容至 1000 mL，混匀，过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜。

5.3 标准品

5.3.1 柠檬黄 (CAS: 1934-21-0)。

5.3.2 苋菜红 (CAS: 19168-23-1)。

5.3.3 胭脂红 (CAS: 15876-47-8)。

5.3.4 日落黄 (CAS: 2783-94-0)。

5.3.5 诱惑红 (CAS: 25956-17-6)。

5.3.6 亮蓝 (CAS: 6104-59-2)。

5.3.7 酸性靛蓝 (CAS: 860-22-0)。

5.3.8 赤藓红 (CAS: 12227-78-0)。

注：也可采用商品化标准溶液。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 合成着色剂标准贮备液 ($1000 \mu\text{g/mL}$)：准确称取按其纯度折算为 100% 质量的柠檬黄、苋菜红、酸性靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝和赤藓红各 0.1 g (精确至 0.0001 g)，置于 100 mL 容量瓶中，加水至刻度。

5.4.2 合成着色剂标准使用液：临用时将标准贮备液加水稀释 10 倍，配制成 $100 \mu\text{g/mL}$ 。

5.4.3 合成着色剂标准系列溶液：准确移取适量合成着色剂标准使用液，用水配制成 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 、

0.5 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg/mL、10 µg/mL 和 20 µg/mL 的标准系列。

5.5 耗材

5.5.1 固相萃取柱: 弱阴离子(N-乙基吡咯烷酮-二乙烯苯共聚物-三(亚甲胺))固相萃取柱(150 mg/6 mL) 或相当者。

5.5.2 0.45µm 微孔滤膜。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器或者紫外检测器;

6.2 天平: 感量 0.001 g 和 0.0001 g。

6.3 均质机。

6.4 漩涡混匀器。

6.5 超声波提取器。

6.6 氮吹仪。

6.7 恒温水浴锅。

6.8 固相萃取装置。

6.9 高速冷冻离心机, 转速不低于 10000 r/min。

6.10 移液管: 1mL、5mL。

6.11 玻璃烧杯: 50 mL。

6.12 容量瓶: 10 mL、25 mL、100mL。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 液体饮料、液体调味料和果汁等: 称取 2~5g 样品(精确至 0.001g), 于 50 mL 玻璃烧杯中, 加 5 mL 水, 用氨水溶液调 pH 至 6 左右, 用水定容至 10 mL, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液待净化。

注: 含二氧化碳的样品可超声波超声 15 min 除去二氧化碳; 高浓度果汁样品加 1 mL 乙酸锌溶液和 1 mL 草酸钾/磷酸氢二钾溶液, 充分漩涡混匀。

7.1.2 配制酒类: 称取 2~5g 样品(精确至 0.001g), 于 50 mL 玻璃烧杯中, 加热除去乙醇, 用氨水溶液调 pH 至 6 左右, 用水定容至 10 mL, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液待净化。

7.1.3 蜜饯、糖果、果冻和水果罐头等: 称取 2~5g(精确至 0.001g) 均质后样品, 于 50 mL 玻璃烧杯中, 加 20 mL 水, 加热溶解样品, 加 1 mL 乙酸锌溶液和 1 mL 草酸钾/磷酸氢二钾溶液, 充分漩涡混匀, 加水定容至 25 mL, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液待净化。

7.1.4 玉米粉、小米和小米粉等：称取 2~5g（精确至 0.001g）粉碎后样品，于 50 mL 玻璃烧杯中，加 10 mL 氨化甲醇溶液，漩涡混匀 1 min，超声提取 15 min，4000 r/min 离心 3min，上清液转移至蒸发皿中；试样残渣用氨化甲醇溶液重复提取至提取液无色，合并提取液于 60℃水浴蒸发近干，用水定容至 10 mL，10000 r/min 离心 3 min，上清液待净化。

7.1.5 番茄酱等调味品：称取 2~5g（精确至 0.001g）试样，于 50 mL 玻璃烧杯中，加 10 mL 氨化甲醇溶液，漩涡混匀 1 min，超声提取 15 min，4000 r/min 离心 3 min，上清液转移至蒸发皿中；试样残渣用氨化甲醇溶液重复提取至提取液无色，合并提取液于 60℃水浴蒸发近干，用水定容至 10 mL，10000 r/min 离心 3 min，上清液待净化。

7.1.6 肉制品：称取 2~5g（精确至 0.001g）均质后样品，于 50 mL 玻璃烧杯中，加 20 mL 石油醚，漩涡混匀 1 min，10000 r/min 离心 3 min，弃去石油醚层，残渣重复上述过程去脂 3 次；向试样残渣中加 10 mL 氨化甲醇溶液，漩涡混匀 1 min，4000 r/min 离心 3 min，上清液转移至蒸发皿中；试样残渣用氨化甲醇溶液重复提取至提取液无色，合并提取液于 60℃水浴蒸发近干，用水定容至 10 mL，10000 r/min 离心 3min，上清液待净化。

7.2 试样净化

7.2.1 预先用 6 mL 甲醇和 6 mL 水活化固相萃取柱；

7.2.2 取 5.0 mL 试样提取液，以 1 mL/min 的速度通过预先活化过的固相萃取柱。

7.2.3 分别用 6 mL pH4 水溶液、6 mL pH6 水溶液和 6 mL 甲醇淋洗固相萃取柱，将固相萃取柱吹干。

7.2.4 用 6 mL 氨化甲醇洗脱并收集，60℃恒温水浴氮气吹近干，加 1.0 mL 水复溶，混匀，若溶液浑浊，可用 10000 r/min 离心 5 min，上清液待上机测定。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 色谱柱： C_{18} （4.6 × 250 mm，5 μm）。

7.3.2 流动相：A：乙酸铵溶液；B：甲醇。

7.3.3 流动相梯度洗脱程序：见表 1。

7.3.4 流速：1.0 mL/min。

7.3.5 柱温：30℃。

7.3.6 进样量：20 μL。

7.3.7 检测器：二极管阵列检测器（PDA）或者紫外检测器（UV）。

7.3.8 检测波长：见表 2。

表1 梯度洗脱程序

	时间 (min)	A (%)	B (%)
1	0.0	80	20
2	5.0	65	35
3	12.0	20	80
4	16.0	20	80
5	17.0	80	20
6	20.0	80	20

表2 八种合成着色剂检测波长

着色剂	柠檬黄	苋菜红	酸性靛蓝	胭脂红	日落黄	诱惑红	亮 蓝	赤藓红
检测波长 (nm)	428	521	608	509	483	507	625	529

7.4 测定

将试样净化提取液和合成着色剂标准系列溶液分别注入高效液相色谱仪，根据保留时间定性，外标峰面积法定量。

8 结果计算

试样中，八种人工合成着色剂的含量 (g/kg)，按式 (1) 计算：

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：X —— 试样中目标化合物含量，单位为克每千克 (g/kg)；

c —— 由标准的线性方程得到的上机试样溶液中目标化合物含量，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

V —— 试样的最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

m —— 试样的质量，单位为克 (g)；

f —— 试样稀释倍数；

1000—— 换算系数。

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，结果保留两位有效数字（或小数点后两位）。

9 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 %。

10 检出限

本方法中柠檬黄、苋菜红、酸性靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝和赤藓红的检出限为：0.05 mg/kg，定量限为：0.15mg/kg。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
合成着色剂标准色谱图

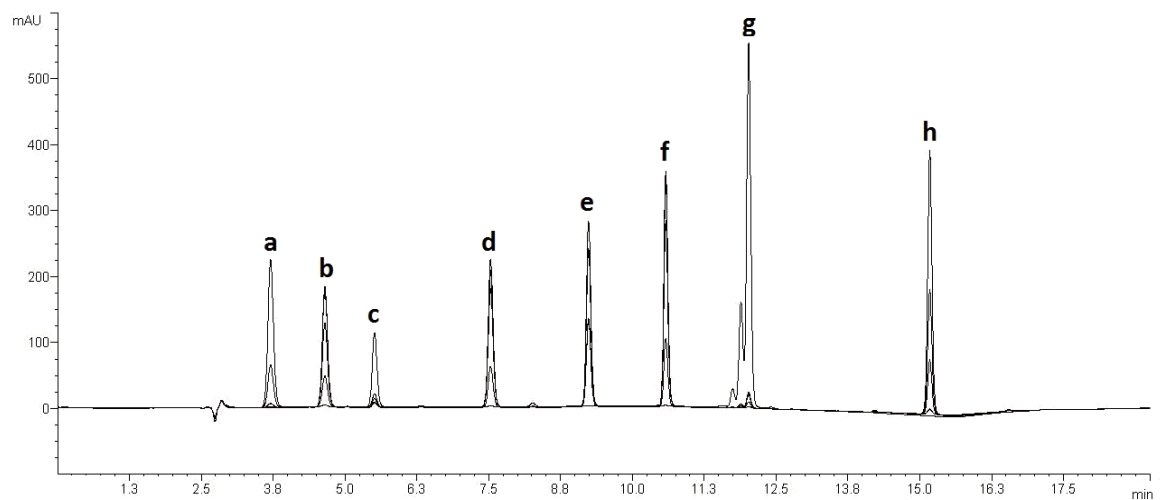


图 A.1 八种人工合成色素标准色谱图 (PDA 检测器多波长重叠色谱图)

a: 柠檬黄, b: 苋菜红, c: 酸性靛蓝, d: 胭脂红, e: 日落黄, f: 诱惑红, g: 亮蓝, h: 赤藓红

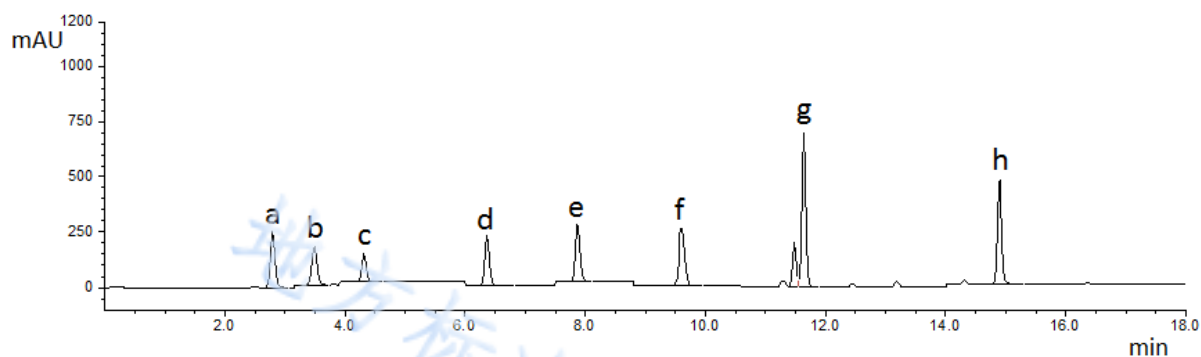


图 A.2 八种人工合成色素标准色谱图 (UV 检测器切换波长色谱图)

a: 柠檬黄, b: 苋菜红, c: 酸性靛蓝, d: 胭脂红, e: 日落黄, f: 诱惑红, g: 亮蓝, h: 赤藓红