

食品中脂溶性色素的测定 超高效液相色谱串联质谱法

Determination of Lipid-soluble pigments in Foods

Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

2019-01-28 发布

2019-03-01 实施

深圳市市场和质量监督管理委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 试剂和材料	1
4.1 试剂及试剂的配制	1
4.2 标准品及标准溶液的配制	2
5 仪器和设备	2
6 分析步骤	2
6.1 试样的制备与保存	2
6.2 提取	3
6.3 过柱净化	3
6.4 标准工作曲线制备	3
6.5 仪器参考条件	3
6.6 测定	4
7 结果计算	5
8 精密度	5
9 其他	5
附录 A	6
附录 B	7

前 言

本文件依据GB/T 1.1-2009规则编制。

本文件由深圳市食品药品监督管理局归口。

本文件起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

本文件主要起草人：张协光，肖伟敏，刘文丽，杨国武，兰全学，郑彦婕，朱丽，罗伟，彭祖茂，邓梦雅。

本文件为首次发布。

食品中脂溶性色素的测定 超高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件规定了食品中禁用脂溶性色素苏丹橙G、二甲基黄、苏丹黑B的测定方法。

本文件适用于腊肉、腊鱼、香肠、饼干、调味品、鸡蛋中的苏丹橙G、二甲基黄、苏丹黑B含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用丙酮-乙醇溶液提取样品中的脂溶性色素，提取液经阴离子交换固相萃取小柱净化后，用超高效液相色谱串联质谱仪检测和确证，外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 试剂及试剂的配制

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1.1 水，GB/T 6682 规定，一级。

4.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.3 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.1.4 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

4.1.5 甲基叔丁基醚[CH₃OCC(CH₃)₃，MTBE]：色谱纯。

4.1.6 氢氧化钾（KOH）。

4.1.7 丙酮（CH₃COCH₃）。

4.1.8 乙醇（CH₃CH₂OH）。

4.1.9 0.1%甲酸水溶液：准确量取 1 mL 甲酸（4.1.3）于 1 L 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

4.1.10 丙酮-乙醇（9/1，v/v）：准确量取 90 mL 丙酮（4.1.7）和 10 mL 乙醇（4.1.8），混匀，作为提取溶剂。

4.1.11 1 mol/L 氢氧化钾溶液：称取 5.6 g 氢氧化钾（4.1.6），加水溶解稀释至 100 mL。

4.1.12 丙酮-1 mol/L 氢氧化钾溶液 (1/9, v/v)：量取 90 mL 1 mol/L 氢氧化钾溶液 (4.1.11) 与 10 mL 丙酮 (4.1.7) 混合，摇匀，作为淋洗液。

4.1.13 甲基叔丁基醚-甲醇-甲酸 (90/8/2, v/v)：量取 90 mL 甲基叔丁基醚 (4.1.5)、8 mL 甲醇 (4.1.3) 和 2 mL 甲酸 (4.1.4)，混匀，作为洗脱液。

4.2 标准品及标准溶液的配制

4.2.1 苏丹橙 G (C₁₂H₁₀N₂O₂)：纯度 ≥98.0 %。

4.2.2 二甲基黄 (C₁₄H₁₅N₃)：纯度 ≥98.0 %。

4.2.3 苏丹黑 B (C₂₉H₂₄N₆)：纯度 ≥98.0 %。

注：苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 的 CAS 号、相对分子质量和结构式参见附录 A 中表 A.1。

4.2.4 苏丹橙 G 标准储备液 (100 mg/L)：准确称取苏丹橙 G (4.2.1) 标准品 0.01 g (精确至 0.1 mg)，用乙腈定容至 100 mL。储备液于 0 °C~4 °C 下保存三个月。

4.2.5 二甲基黄标准储备液 (100 mg/L)：准确称取二甲基黄 (4.2.2) 标准品 0.01 g (精确至 0.1 mg)，用乙腈定容至 100 mL。储备液于 0 °C~4 °C 下保存三个月。

4.2.6 苏丹黑 B 标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取苏丹黑 B (4.2.3) 标准品 0.1 g (精确至 0.1 mg)，用乙腈定容至 100 mL。储备液于 0 °C~4 °C 下保存三个月。

4.2.7 苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 混合标准中间液：分别吸取苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 标准储备液 1.00 mL，用乙腈定容至 100 mL。标准中间液苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 的浓度分别为 1.0 mg/L、1.0 mg/L、10 mg/L。

5 仪器和设备

5.1 超高效液相色谱-质谱联用仪 (Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS)：配置电喷雾电离源 (Electrospray Ionization, ESI)。

5.2 电子天平 (感量 0.0001 g)。

5.3 超声波提取仪。

5.4 氮气吹干仪。

5.5 旋涡振荡器。

5.6 离心机：转速不低于 4000 r/min。

5.7 固相萃取装置。

5.8 强阴离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL，上样前用 3 mL 甲醇 (4.1.3)、3 mL 水和 3 mL 1 mol/L 氢氧化钾溶液 (4.1.11) 活化。

5.9 一次性微孔滤头：带 0.45 μm 微孔滤膜，有机系。

6 分析步骤

6.1 试样的制备与保存

6.1.1 腊肉、腊鱼、香肠、饼干：取有代表性样约 500 g，用组织捣碎机捣碎，装入洁净容器作为试样，密封并做好标识，于-18℃下保存。

6.1.2 调味品：取有代表性样约 500 g，搅拌均匀后装入洁净容器内密封并做好标识，于 0℃~4℃下保存。

6.1.3 鸡蛋：取有代表性样约 500 g，煮熟，取蛋黄，用组织捣碎机捣碎，装入洁净容器作为试样，密封并做好标识，于 0℃~4℃下保存。

6.2 提取

称取 2 g 样品（精确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 样品提取液（4.1.10），在旋涡震荡器上震荡 1 min，再超声提取 30 min。然后以不低于 4000 r/min 离心 5 min，取上清液，待净化。

6.3 过柱净化

将 2.0 mL 样品提取液，与 10 mL 1 mol/L 氢氧化钾水溶液（4.1.11）混合，过固相萃取柱（5.8），用 2 mL 淋洗液（4.1.12）、2 mL 水淋洗，5 mL 洗脱液（4.1.13）洗脱，收集洗脱液于 40℃水浴中氮气吹干，再用 1 mL 甲醇（4.1.3）溶解定容，溶液经 0.45 μm 滤膜（5.9）过滤，供超高效液相色谱串联质谱仪测定。

6.4 标准工作曲线制备

分别准确量取 3 种色素混合标准中间液（4.2.7），添加到 2 g 空白试样中，制得苏丹橙 G、二甲基黄添加量为 2.5 μg/kg、5.0 μg/kg、20 μg/kg、40 μg/kg、200 μg/kg、250 μg/kg，苏丹黑 B 添加量为 25 μg/kg、50 μg/kg、200 μg/kg、400 μg/kg、2000 μg/kg、2500 μg/kg 的系列空白添加试样，按 6.1~6.3 步骤操作，制得苏丹橙 G、二甲基黄浓度为 1.0 μg/L、2.0 μg/L、8.0 μg/L、16 μg/L、80 μg/L、100 μg/L，苏丹黑 B 浓度为 10 μg/L、20 μg/L、80 μg/L、160 μg/L、800 μg/L、1000 μg/L 的系列标准工作溶液，浓度由低到高进样检测，以定量离子的峰面积为纵坐标，与其对应的浓度为横坐标作图，绘制标准工作曲线。

6.5 仪器参考条件

6.5.1 超高效液相色谱操作参考条件

- a) 色谱柱：C18，2.1 mm×100 mm，1.9 μm 或性能相当者；
- b) 柱温：30℃；
- c) 流速：0.30 mL/min；
- d) 淋洗梯度参见表 1；
- e) 进样量：5 μL。

表 1 超高效液相色谱淋洗梯度

时间/min	0.1%甲酸水溶液	乙腈
0.00	60	40
2.00	10	90
7.00	10	90

7.50	60	40
9.00	60	40

6.5.2 质谱操作参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方法：选择反应监测；
- d) 喷雾电压：3000 V；
- e) 加热气温度：400 °C；
- f) 鞘气压力：30 bar；
- g) 反吹气压力：0 bar；
- h) 辅助气压力：10 bar；
- i) 离子传输毛细管温度：320 °C；
- j) 去簇电压：0 V；
- k) 主要参考质谱参数见表 2。

表 2 苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 的质谱参数

监测化合物	保留时间/min	母离子/ (m/z)	子离子/ (m/z)	S-lens 电压/V	碰撞能量/V
苏丹橙 G	2.82	215.160	198.223	63	14
			93.212*		28
二甲基黄	3.66	226.214	120.218	75	30
			77.205*		21
苏丹黑 B	4.96	457.329	211.232	135	49
			193.200*		25

注：带*为定量离子

6.6 测定

6.6.1 定性测定

按照 UPLC-MS/MS 条件测定样品和标准工作液,如果检测的质量色谱峰保留时间与标准品的一致,允许偏差小于±2.5 %;定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准工作液的相对丰度一致,相对丰度允许偏差不超过表 3 规定的范围,则可判断样品中存在响应的被测物。

表 3 定性确证相对离子丰度的最大允许偏差

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

6.6.2 定量测定

按照外标法进行定量计算。待测样品中待测物的响应值应在标准曲线线性范围之内,超出标准曲线线性范围的,则应用空白样品提取液适当稀释后测定。在该条件下,苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B

的 UPLC-MS/MS 谱图参见附录 B 中图 B.1、图 B.2、图 B.3。

6.6.3 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

7 结果计算

按式（1）计算各目标化合物的含量：

$$\omega = \frac{C \times V \times d}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω ——试样中目标物质的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C ——由标准曲线计算得到的试液中各组分的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V ——试样定容后的总体积，单位为毫升（ mL ）；

d ——稀释倍数；

m ——试样质量，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，计算结果保留两位有效数字。

8 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20%。

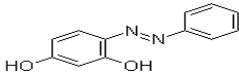
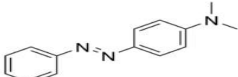
9 其他

本方法检出限为：苏丹橙G 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，二甲基黄1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，苏丹黑B 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；定量限为：苏丹橙G 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，二甲基黄2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，苏丹黑B 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附 录 A
(资料性附录)

苏丹橙 G 、二甲基黄、苏丹黑 B 的 CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

表 A.1 苏丹橙 G 、二甲基黄、苏丹黑 B 的 CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

中文名 (英文名)	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
苏丹橙 G (Sudan Orange G)	2051-85-6	$C_{12}H_{10}N_2O_2$	214.22	
二甲基黄 (Dimethyl yellow)	60-11-7	$C_{14}H_{15}N_3$	225.29	
苏丹黑 B (Sudan black B)	4197-25-5	$C_{29}H_{24}N_6$	456.54	

附录 B
(资料性附录)

苏丹橙 G、二甲基黄、苏丹黑 B 标准溶液的超高效液相串联质谱图

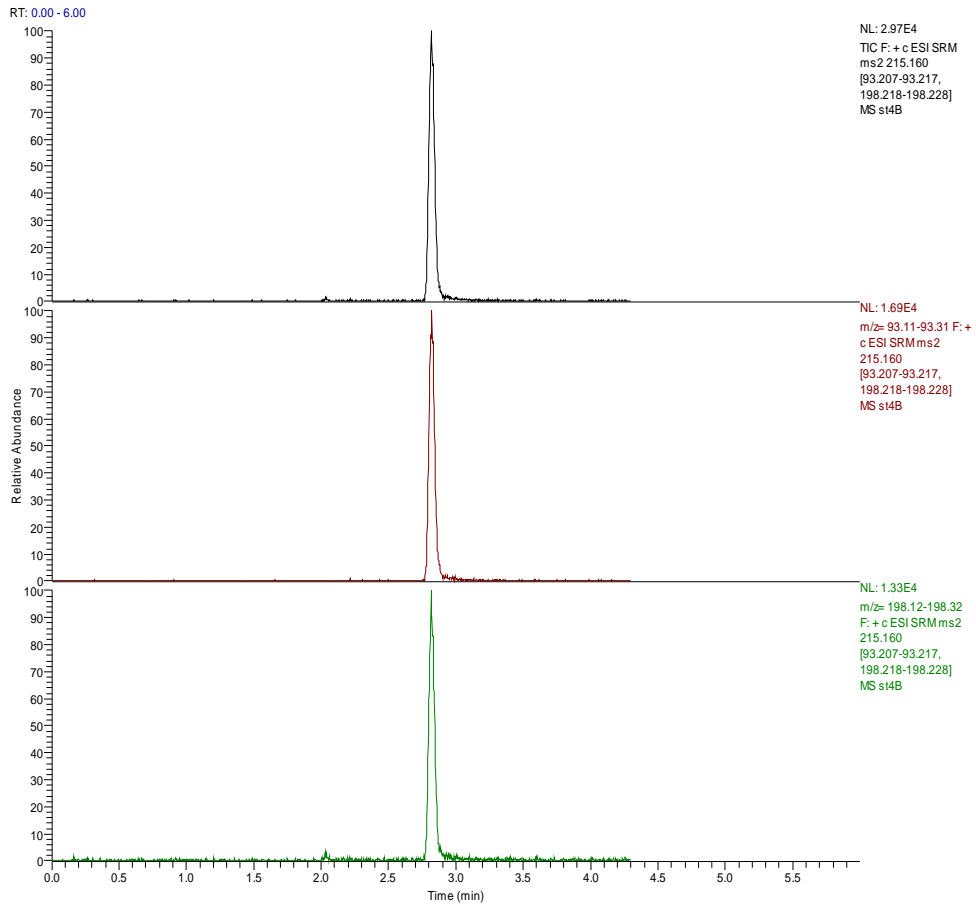


图 B.1 苏丹橙 G 标准溶液的超高效液相串联质谱图

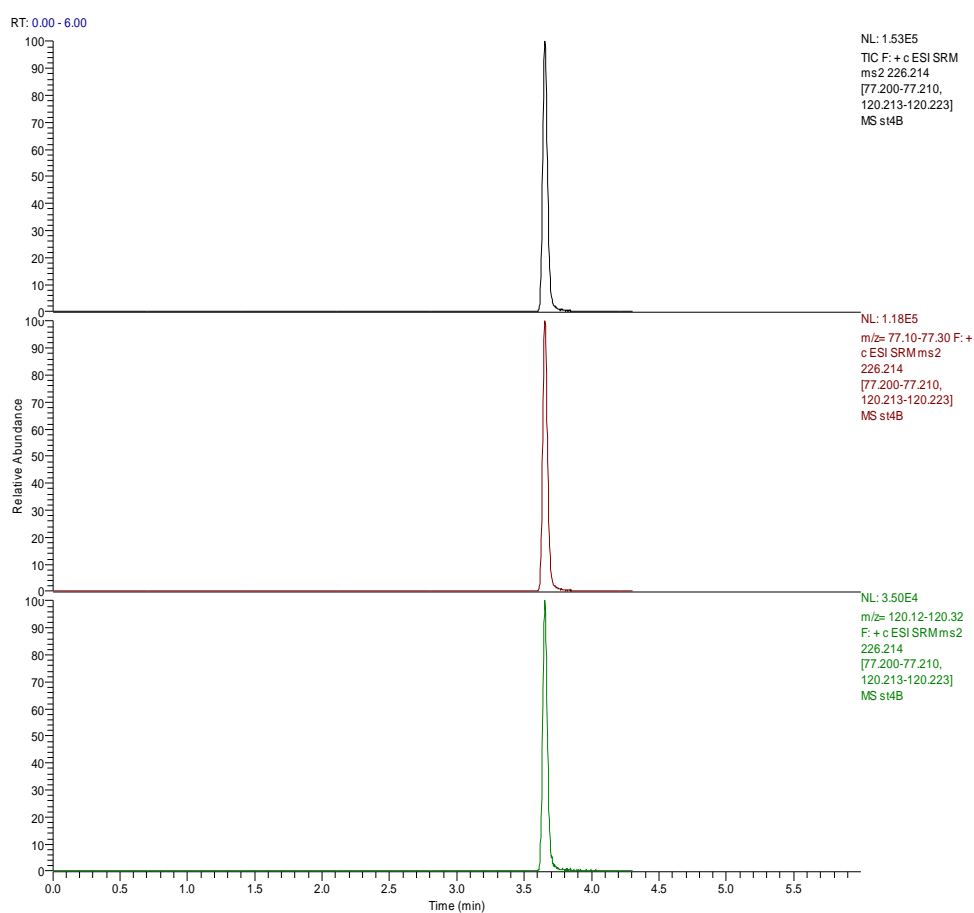


图 B.2 二甲基黄标准溶液的超高效液相串联质谱图

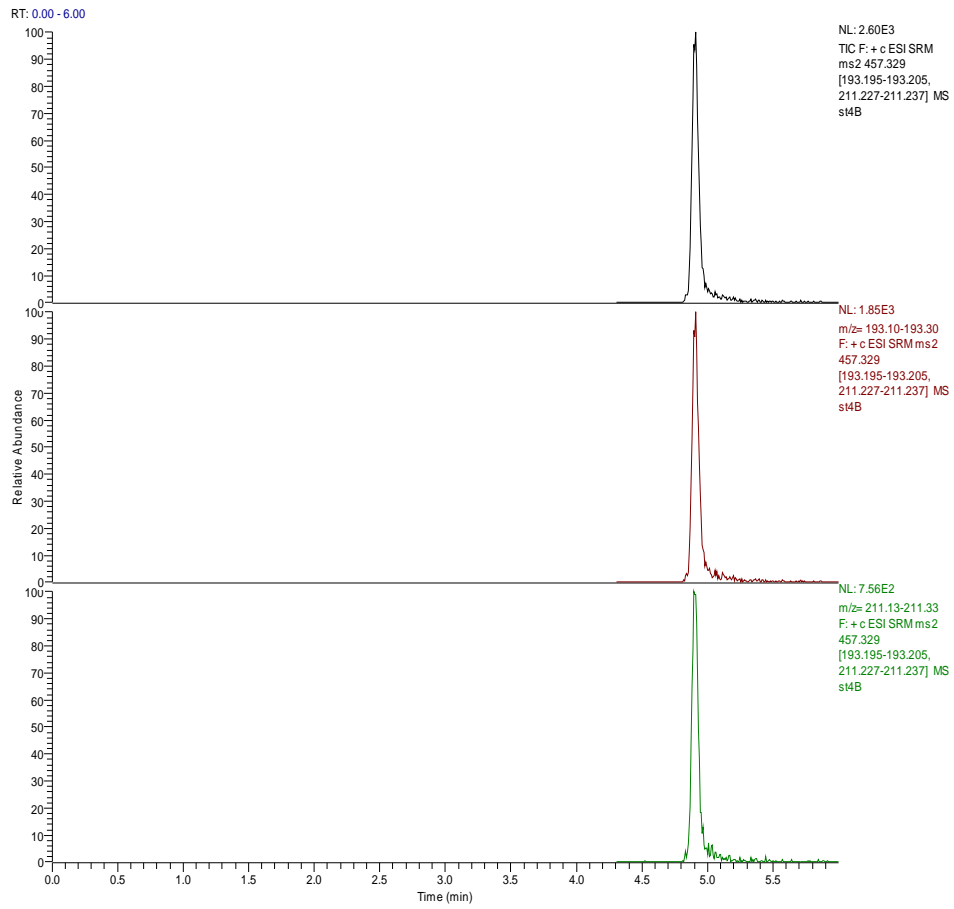


图 B.3 苏丹黑 B 标准溶液的超高效液相串联质谱图