

DB35

福建省地方标准

DB35/T 897—2009

食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量的测定

2009-03-11 发布

2009-04-01 实施

福建省质量技术监督局 发布

前 言

本标准的附录 A、B 为资料性附录。

本标准由福建省质量技术监督局提出并归口。

本标准由福建省质量技术监督局批准。

本标准起草单位：福建省中心检验所。

本标准主要起草人：郑小严、黄红霞、林钦、戴明、黄永辉、梁敏、王征。

本标准系首次发布。

食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量的测定

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法测定食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量的方法。

本标准适用于蜜饯、水产品、豆制品、食用菌、炒货、坚果和固体调味品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量的测定。

本标准高效液相色谱法检出限为：碱性橙 0.02mg/kg；碱性嫩黄 O 0.03mg/kg；碱性桃红 T 0.004mg/kg；定量限为：碱性橙 0.06mg/kg；碱性嫩黄 O 0.1mg/kg；碱性桃红 T 0.02mg/kg。

本标准液相色谱-串联质谱法检出限为：碱性橙 0.6 μ g/kg；碱性嫩黄 O 0.3 μ g/kg；碱性桃红 T 0.7 μ g/kg；定量限为：碱性橙 2 μ g/kg；碱性嫩黄 O 1 μ g/kg；碱性桃红 T 2 μ g/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修改版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 第一法 高效液相色谱法

3.1 原理

试样通过碱化甲醇提取，二氯甲烷萃取，正己烷净化，高效液相色谱紫外检测器串联荧光检测器同时检测食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量，外标法定量。

3.2 试剂和材料

3.2.1 除另有说明外，所用试剂均为分析纯，试验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.2.2 甲醇：色谱纯。

3.2.3 甲酸：优级纯。

3.2.4 氨水：优级纯，含量为 25%。

3.2.5 磷酸：优级纯。

3.2.6 氯化钠。

3.2.7 二氯甲烷。

3.2.8 无水硫酸钠：650℃灼烧 4h，在干燥器内冷却到室温，贮于密封瓶中备用。

3.2.9 碱化甲醇：500mL 甲醇（3.2.2）+10mL 氨水（3.2.4）。

3.2.10 酸化甲醇：500mL 甲醇（3.2.2）+10mL 甲酸（3.2.3）。

3.2.11 甲醇饱和正己烷：正己烷加入少量甲醇，直至分层出现。

3.2.12 2%氨水（体积百分比）：取 2mL 氨水（3.2.4）用纯水稀释到 100mL。

3.2.13 0.05%磷酸（体积百分比）：取 0.5mL 磷酸（3.2.5）用纯水稀释到 1000mL。

- 3.2.14 碱性橙标准品 (Chrysoidine, Cas 532-82-1, $C_{12}H_{12}N_4 \cdot HCl$, 分子量 248.71, 纯度 $\geq 99\%$)。
- 3.2.15 碱性嫩黄O标准品 (Auramine O, Cas 2465-27-2, $C_{17}H_{21}N_3 \cdot HCl$, 分子量 303.83, 纯度 $\geq 98\%$)。
- 3.2.16 碱性桃红T标准品 (Safranin T, Cas 477-73-6, $C_{20}H_{19}N_4Cl$, 分子量 350.84, 纯度 $\geq 99\%$)。
- 3.2.17 碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 混合标准储备溶液: 准确称取 20.0mg 碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 标准品, 用甲醇 (3.2.2) 溶解定容到 100mL, 配制成 200 $\mu g/mL$ 的标准储备液。4 $^{\circ}C$ 冰箱放置, 3 个月内使用。
- 3.2.18 碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 混合标准溶液: 准确移取适量混合标准储备液 (3.2.17), 用酸化甲醇 (3.2.10) 稀释成 0.05 $\mu g/mL \sim 1\mu g/mL$ 的标准系列。4 $^{\circ}C$ 冰箱放置, 一周内使用。

3.3 仪器与设备

- 3.3.1 高效液相色谱仪: 配紫外和荧光检测器。
- 3.3.2 高速万能粉碎机。
- 3.3.3 涡旋混合器。
- 3.3.4 氮气吹干仪。
- 3.3.5 水循环真空泵。
- 3.3.6 旋转蒸发器。
- 3.3.7 超声波发生器 (40KHz/600W)。
- 3.3.8 冷冻高速离心机: 15000r/min。
- 3.3.9 分析天平 (感量 0.0001g 和 0.1g)。
- 3.3.10 高速匀浆机。

3.4 试样制备和保存

取有代表性样品 500 g, 用粉碎机或匀浆机粉碎, 混匀, 分成 2 份, 装入洁净容器内, 密封并标识。

3.5 分析步骤

3.5.1 试样的提取净化

称取 5g (精确到 1mg) 试样, 置于 50mL 离心管中, 准确加入 20.0mL 酸化甲醇 (3.2.9), 超声提取 30min; 于 4 $^{\circ}C$, 15000r/min 离心 5 分钟, 移取 5.0mL 上清液于 50mL 离心管中, 再加入 10mL 2% 氨水 (3.2.12) 和 2g 氯化钠 (3.2.6) 混匀, 加入二氯甲烷 (3.2.7) 涡旋萃取 3 次, 每次 10mL; 于 4 $^{\circ}C$, 15000r/min 离心 5 分钟, 吸出下层萃取液合并, 过无水硫酸钠 (3.2.8) 滤入 250mL 浓缩瓶中, 40 $^{\circ}C$, 真空旋转蒸发至约剩 1mL, 用二氯甲烷转入 10 mL 刻度试管中, 40 $^{\circ}C$ 氮气吹近干, 加入 3 mL 酸化甲醇 (3.2.10) 溶解残渣, 用甲醇饱和正己烷 (3.2.11) 萃取净化 3 次, 每次 2 mL, 吸出正己烷层弃去, 40 $^{\circ}C$ 氮气吹至 2 mL 以下, 用酸化甲醇 (3.2.10) 定容到 2.0mL, 混匀, 用 0.2 μm 滤膜过滤后检测。

3.5.2 高效液相色谱条件

- 色谱柱: C_{18} , 5 μm , 150 \times 4.6mm (内径) 或相当者;
- 柱温: 30 $^{\circ}C$;
- 紫外检测波长: 436nm (检测碱性橙和碱性嫩黄 O);
- 荧光检测波长: 激发波长为 271nm, 发射波长为 572nm (检测碱性桃红 T);
- 进样量: 20 μL ;
- 流动相 0.05% 磷酸 (3.2.13) 与甲醇 (3.2.2) 梯度见表 1。

表1 流动相及梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	0.05%磷酸 (%)	甲醇 (%)	曲线
0	1	75	25	/
8	1	50	50	6
15	1	75	25	11
20	1	75	25	11

(本方法条件为参考条件, 可根据不同仪器、色谱柱进行调整。)

3.5.3 定量测定

外标法定量: 以标准工作溶液浓度为横坐标, 以峰面积积分为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对试样进行定量, 标准工作溶液和试样溶液的响应值均应在仪器检测线性范围内。在上述色谱条件下, 标准品色谱图见附录 A 中图 A。

3.6 结果

3.6.1 计算

试样中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的含量按式 (1) 计算:

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

式中:

X ——试样中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

c ——试样溶液中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样提取液体积, 单位为毫升 (mL);

m ——试样的质量, 单位为克 (g);

k ——稀释因子。

结果保留 2 位有效数值。

3.6.2 重复性

在重复性条件下, 获得的碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

4 第二法 液相色谱-串联质谱法

4.1 原理

试样通过碱化甲醇提取, 二氯甲烷萃取, 正己烷净化, 液相色谱-串联质谱联用法同时检测食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含量, 外标法定量。

4.2 试剂和材料

4.2.1 0.4%甲酸 (体积百分比): 取 4.0mL 甲酸 (3.2.3) 用纯水稀释到 1000mL。

4.2.2 其它同 3.2。

4.3 仪器与设备

4.3.1 高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪：配有电喷雾（ESI）离子源。

4.3.2 其它同 3.3.2~3.3.10。

4.4 试样制备和保存

（同 3.4）

4.5 分析步骤

4.5.1 试样的提取净化

（同 3.5.1）

4.5.2 高效液相色谱条件

- a) 色谱柱： C_{18} ，1.7 μ m，100 \times 2.1mm（内径）或相当者；
- b) 柱温：40 $^{\circ}$ C；
- c) 进样量：3 μ L；
- d) 流动相 0.4%甲酸（4.2.1）与甲醇（3.2.2）梯度见表 2：

表2 流动相及梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	0.4%甲酸 (%)	甲醇 (%)	曲线
0	0.3	75	25	/
2	0.3	55	45	6
4	0.3	75	25	11
6	0.3	75	25	11

（本方法条件为参考条件，可根据不同仪器、色谱柱进行调整。）

4.5.3 质谱分析条件

- a) 电离源：电喷雾正离子模式；
- b) 毛细管电压：1.00kV；
- c) 源温度：100 $^{\circ}$ C；
- d) 脱溶剂气温度：350 $^{\circ}$ C；
- e) 脱溶剂气流量：700L/h；
- f) 碰撞室压力：3.1 $\times 10^{-3}$ mbar；
- g) 特征离子及参数见表 3：

表3 特征离子及参数

化合物	保留时间 (min)	母离子 (M+H) ⁺ (m/z)	锥孔电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
碱性橙	2.04	213.2	35	*77.2	20
			35	121.2	20
碱性桃红 T	2.69	315.2	75	*299.3	35
			75	238.3	35
碱性嫩黄 O	2.91	268.3	35	*147.2	30
			35	252.3	30

*定量离子

（本方法条件为参考条件，可根据不同仪器进行调整。）

4.5.4 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子，2 个子离子，在相同实验条件下，样品中待测物质的保留时间与标

准溶液中对应的组分保留时间偏差应在 2.5%之内；且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合标准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较，若偏差不超过表 4 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表4 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	>10	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

4.5.5 定量测定

外标法定量：以标准工作溶液浓度为横坐标，以峰面积积分为纵坐标，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对试样进行定量，标准工作溶液和试样溶液的响应值均应在仪器检测线性范围内。在上述色谱条件下，标准品色谱图见附 B 中图 B.1 和 B.2。

（注：碱性桃红 T 有 4 个同分异构体峰，计算时将 4 个峰面积相加。）

4.6 结果

4.6.1 计算

试样中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的含量按式 (2) 计算：

$$X = \frac{c \times V}{m} \times k \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

c ——试样溶液中碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

V ——试样提取液体积，单位为毫升 (mL)；

m ——试样的质量，单位为克 (g)；

k ——稀释因子。

结果保留 2 位有效数值。

4.6.2 重复性

在重复性条件下，获得的碱性橙、碱性嫩黄 O、碱性桃红 T 的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

附录 B
(资料性附录)

混合标准品总离子流图 and 选择离子监测图

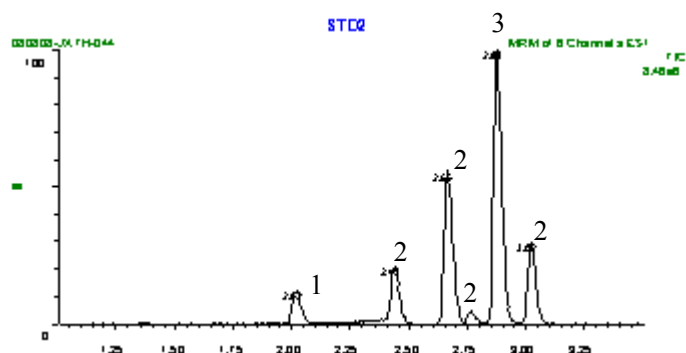


图 B.1 0.2µg/ml 混合标准品总离子流图

1. 碱性橙 2. 碱性桃红 T 3. 碱性嫩黄 O

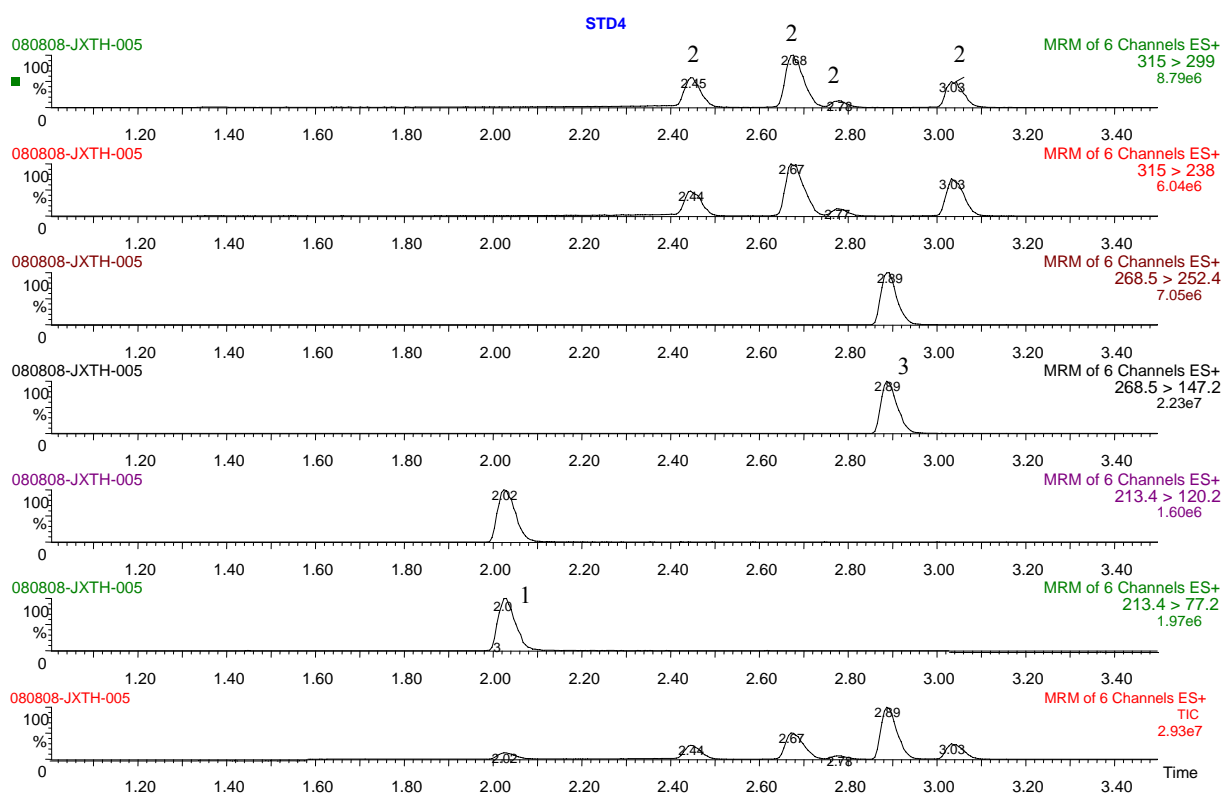


图 B.2 0.2µg/ml 混和标准溶液总离子流图 and 选择离子监测图

1. 碱性橙 2. 碱性桃红 T 3. 碱性嫩黄 O

福建省地方标准
食品中碱性橙、碱性嫩黄 O 和碱性桃红 T 含
量的测定

DB35/T 897—2009

*

2009 年 3 月第一版 2009 年 4 月第一次印刷