

DB52

贵 州 省 地 方 标 准

DBS52/ 006—2014

食品安全地方标准 食品中酸性橙 II 染料的测定

Local food safety standards—Determination of Acid Orange II in foods

2015 – 02 – 12 发布

2015 – 04 – 01 实施

贵州省卫生和计划生育委员会

发 布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 液相色谱-串联质谱法	1
3 高效液相色谱法	4
附录 A（资料性附录） 酸性橙 II 标准溶液的总离子流图（图 A.1）和质谱图（图 A.2）	7
附录 B（资料性附录） 酸性橙 II 标准溶液的高效液相色谱图（图 B.1）	8

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准附录A、附录B为资料性附录。

本标准由贵州省产品质量监督检验院提出。

本标准由贵州省卫生和计划生育委员会归口。

本标准起草单位：贵州省产品质量监督检验院（国家酒类及饮料质量监督检验中心）、贵州省产品质量监督检验院仁怀分院。

本标准主要起草人：梁桂娟、寻思颖、李红洲、杨波、龙四红、孙棣、肖洋、李凯、黄卫红、韩志平、肖日春、先春。

食品安全地方标准 食品中酸性橙 II 染料的测定

1 范围

本标准规定了食品中酸性橙 II 染料的高效液相色谱-质谱/质谱和高效液相色谱的测定方法。
本标准适用于辣椒制品、豆腐干、酱卤肉、饮料等食品中酸性橙 II 染料的测定和确证。

2 液相色谱-串联质谱法

2.1 原理

用甲醇提取试样中的酸性橙 II，经弱阴离子固相萃取小柱净化提取液，用高效液相色谱-质谱/质谱仪检测，外标法定量。

2.2 试剂和材料

2.2.1 甲醇 (CH_3OH)，色谱纯。

2.2.2 甲酸 (HCOOH)，色谱纯。

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

2.2.4 5%氨水甲醇溶液

移取2.2.3中的氨水5 mL，用甲醇定容至100 mL。

2.2.5 酸性橙 II 标准品，分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ ，CAS 号为 633-96-5，纯度大于 99.0%。

2.2.6 酸性橙 II 标准储备液

称取0.1 g（精确至0.0001 g）酸性橙 II 标准品，用少量水溶解后再用甲醇定容至100 mL，配制成1.0 mg/mL的标准储备溶液。此溶液于0℃~4℃保存。

2.2.7 空白样品提取液

采用空白样品，按照2.5.1和2.5.2进行提取和净化后得到的溶液。

2.2.8 标准工作溶液

根据需要用空白样品提取液将标准储备液稀释成2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL的系列标准工作溶液。置于0℃~4℃保存。

2.2.9 弱阴离子固相萃取小柱

60 mg/3 mL，或相当者。使用前用3 mL甲醇、3 mL水和3 mL pH=4.5的甲酸水溶液依次活化。

2.2.10 0.22 μm 微孔滤膜，有机系。

2.2.11 50 mL 具塞塑料离心管。

注：除特殊说明外，所有试剂均为分析纯，水为去离子水。

2.3 仪器与设备

2.3.1 高效液相色谱-质谱/质谱联用仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

2.3.2 电子天平，感量分别为 0.0001 g 和 0.01 g。

2.3.3 组织捣碎器。

2.3.4 旋涡混匀器。

2.3.5 振荡提取器。

2.3.6 固相萃取装置。

2.3.7 氮吹仪。

2.3.8 冷冻离心机（转速不低于 10,000 r/min）。

2.3.9 酸度计。

2.4 试样制备与保存

2.4.1 酱卤肉、辣椒制品和豆腐干：取有代表性样品约 500 g，用组织捣碎机捣碎，装入洁净容器中作为试样，密封并作好标识，于-18℃下保存。

2.4.2 果汁饮料，取有代表性样品约 500 mL，混匀后装入洁净容器内密封并做好标识，于 0℃~4℃下保存。

2.4.3 制样操作过程中应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

2.5 测定步骤

2.5.1 提取

称取5 g样品（精确至0.01 g），加入适量甲醇，在旋涡混匀器上充分混匀后振荡提取20 min，用甲酸调pH至4.5后，用甲醇定容至25 mL，混匀，在8000 r/min下离心5 min，上清液作待净化液。

2.5.2 净化

移取10 mL待净化液上活化过的弱阴离子固相萃取小柱，流速不超过1 mL/min。依次用3 mL pH=4.5的甲酸水溶液、3 mL水、3 mL甲醇淋洗，最后用4 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱。洗脱液在40℃氮吹至近干，用10%甲醇水溶液定容至1 mL，过0.22 μm微孔滤膜，供高效液相色谱-质谱/质谱仪测定。

2.5.3 测定

2.5.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱为 C18 柱，2.1 mm（内径）×100 mm，粒径 3 μm，或同等效能色谱柱；
- b) 流动相为甲醇-水，梯度洗脱条件见表 1；
- c) 流速为 300 μL/min；

- d) 柱温为 30 ℃；
e) 进样量为 10 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	甲醇 %	水 %
0	10	90
2.0	10	90
2.1	90	10
8.0	90	10
8.1	10	90
10.0	10	90

2.5.3.2 质谱条件

- a) 离子源为电喷雾离子源 (ESI)；
b) 扫描模式为负离子模式；
c) 检测方式为多反应监测 (SRM)；
d) 喷雾电压为 3000 V~2800 V；
e) 蒸发气温度为 350 ℃；
f) 离子传输毛细管温度为 270 ℃；
g) 鞘气压力为 45 bar；
h) 定性定量离子对及相对应的锥孔电压和碰撞电压见表 2。

表2 定性定量离子对和锥孔电压以及碰撞电压

化合物名称	定量离子对 (m/z)	定性离子对 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞电压 (V)
酸性橙 II	326.9/170.9	326.9/156.1	63	27
				29

2.5.3.3 液相色谱-质谱/质谱测定和确证

在 2.5.3.1 的色谱条件和 2.5.3.2 的质谱条件下对系列标准工作溶液及样品溶液进行测定, 保留时间及离子对进行定性, 外标法定量。其中, 在相同试验条件下, 标准工作溶液与样品溶液的保留时间偏差在 2.5% 以内。若样品溶液中均出现所选择的两个离子对时, 且同时与标准品的相对丰度允许偏差不超过表 3 的范围, 则可判断样品中存在被测物。样品中待测物含量应在标准曲线范围内, 若超出标准曲线范围应用空白样品溶液对样液进行适当稀释。标准溶液中酸性橙 II 的总离子流及质谱图见附录 A。

表3 高效液相色谱-质谱/质谱定性时相对离子丰度最大允许误差

相对丰度/%	相对离子丰度最大允许误差/%
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

2.5.3.4 空白实验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤对空白样品进行试验。

2.6 计算结果和表述

试样中酸性橙 II 的含量按下式进行计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{m \times d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X—试样中酸性橙 II 的含量，单位为微克每公斤（ $\mu\text{g/kg}$ ）；
- c—由标准曲线得到的样液中酸性橙 II 的的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- c_0 —由标准曲线得到的空白试验中酸性橙 II 的的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- V—样品最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；
- m—样品称样量，单位为克（ g ）；
- d—稀释比；

注：计算结果保留小数点后三位有效数字。

2.7 检出限、回收率及精密度

2.7.1 检出限

本方法的检出限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

2.7.2 回收率

本方法在 $10 \mu\text{g/kg} \sim 50 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平的回收率是75%~115%。

2.7.3 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%。

3 高效液相色谱法

3.1 原理

用甲醇提取试样中的酸性橙 II，经弱阴离子固相萃取小柱净化提取液，用高效液相色谱仪紫外检测器检测，外标法定量。

3.2 试剂和材料

3.2.1 同 2.2.1~2.2.4。

3.2.2 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ），色谱纯。

3.2.3 乙酸铵溶液（ 20 mmol/L ）

称取3.2.2中的乙酸铵1.54 g，用少量水溶解后定容至1000 mL。

3.2.4 酸性橙 II 标准品，同 2.2.5。

3.2.5 酸性橙 II 标准储备液，同 2.2.6。

3.2.6 标准工作溶液

用甲醇将标准储备液稀释成0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.5 μg/mL、5.0 μg/mL的系列标准工作溶液。置于0℃~4℃保存。

3.2.7 同2.2.9~2.2.11。

注：除特殊说明外，所有试剂均为分析纯，水为去离子水。

3.3 仪器与设备

3.3.1 高效液相色谱仪，带紫外或二极管阵列检测器。

3.3.2 同2.3.2~2.3.9。

3.4 试样制备与保存

同2.4。

3.5 测定步骤

3.5.1 提取

同2.5.1。

3.5.2 净化

至洗脱液在40℃氮吹至近干之前同2.5.2，用甲醇定容至1 mL，过0.22 μm微孔滤膜供高效液相色谱仪测定。

3.5.3 测定

3.5.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱为C18柱，4.6 mm（内径）×150 mm，粒径5 μm，或同等效能色谱柱；
- b) 流动相为20 mmol/L 乙酸铵：甲醇=67：34；
- c) 流速为1 mL/min；
- d) 柱温为30℃；
- e) 进样量为10 μL；
- f) 检测波长为500 nm。

3.5.3.2 高效液相法测定

在3.5.3.1中的高效液相色谱条件下，对系列标准溶液和按3.5.2处理好的样品溶液进行测定。保留时间定性，外标法定量。其中，标准溶液与待测溶液的保留时间偏差应在2.5%以内。样品中待测物含量应在标准曲线范围内，若超出标准曲线范围应对样液进行适当稀释。标准溶液图谱见附录B。

3.6 计算结果和表述

试样中酸性橙Ⅱ的含量按下式进行计算：

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

式中：

X—试样中酸性橙Ⅱ的含量，单位为毫克每公斤（mg/kg）；

c—由标准曲线得到的样液中酸性橙 II 的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V—样品最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m—样品称样量，单位为克（g）；

d—稀释比；

注：计算结果保留小数点后三位有效数字。

3.7 检出限、回收率及精密度

3.7.1 检出限

本方法的检出限为0.05 mg/kg。

3.7.2 回收率

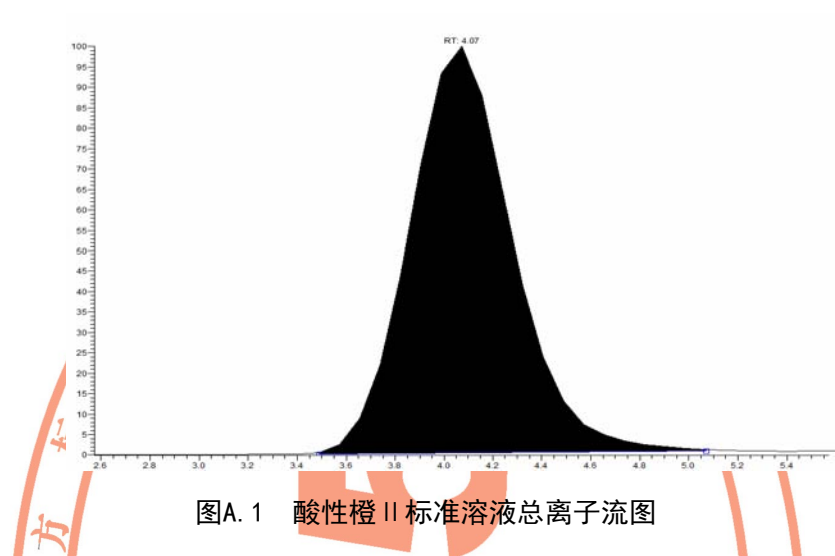
本方法在0.05 mg/kg~0.5 mg/kg添加浓度水平的回收率是80%~110%。

3.7.3 精密度

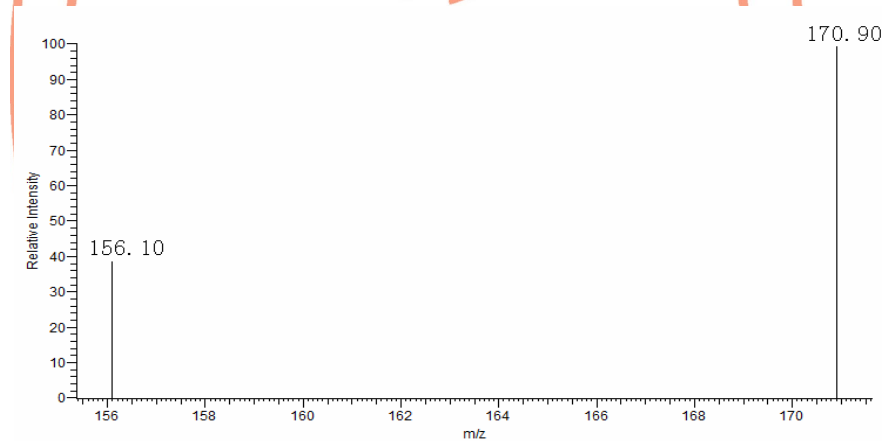
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附 录 A
(资料性附录)

酸性橙 II 标准溶液的总离子流图 (图 A. 1) 和质谱图 (图 A. 2)



图A.1 酸性橙 II 标准溶液总离子流图

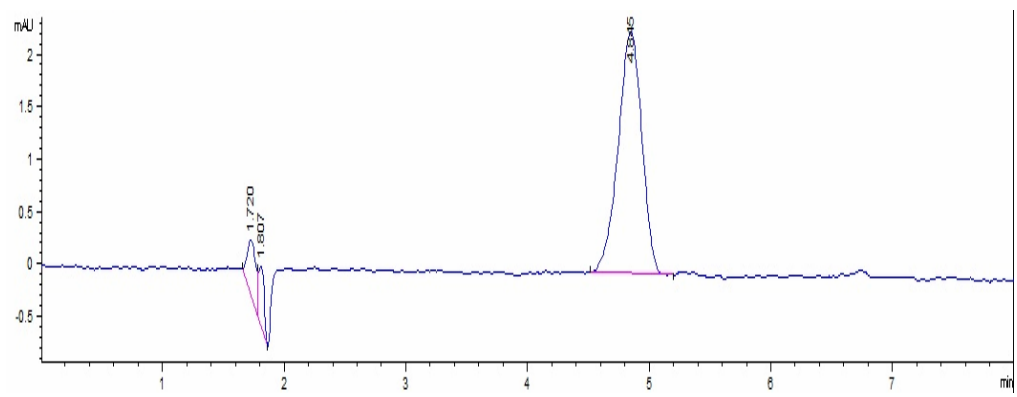


图A.2 酸性橙 II 的多反应监测 (SRM) 质谱图

附 录 B

(资料性附录)

酸性橙 II 标准溶液的高效液相色谱图 (图 B. 1)



图B. 1 酸性橙 II 标准溶液高效液相色谱图

