

TB

团 体 标 准

T/ NAIA 026—2021

粮食加工品及其制品中的合成着色 剂的测定 碳酸氢钠辅助提取-高效 液相色谱法

Determination of synthetic colorants in grain processed products by high
performance liquid chromatography with sodium bicarbonate assisted
extraction

2021-01-15 发布

2021-01-31 实施

宁夏化学分析测试协会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定编写。

本标准由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本标准起草单位：宁夏回族自治区粮油产品质量检测中心、江苏安舜技术服务有限公司、宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所、宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏化学分析测试协会。

本标准主要起草人：张春娥、廖若宇、刘新保、孙悦、胡海祥、孙华、郭雨、袁海静、王芳、高晖、梁瑞、赵静、张小飞。

本标准为首次发布。

粮食加工品及其制品中的合成着色剂的测定 碳酸氢钠辅助提取-高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了玉米渣、玉米片、黑米、颜色挂面、小米、玉米糝、发糕、彩色馒头、糙米、燕麦（片）、高粱米、黍米、紫米、玉米粉、小米粉、玉米自发粉、米粉及其制品、方便面、饼干、驴打滚、发酵面制品、年糕、威化等食品中的合成着色剂的碳酸氢钠辅助提取-高效液相色谱测定方法。

本文件适用于粮食加工品、方便食品、饼干、速冻食品、薯类和膨化食品、糕点、淀粉及淀粉制品及其他食物中的合成着色剂的测定。

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 5009.35 《食品安全国家标准 食品中合成着色剂的测定》

GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》

GB/T 27404 《实验室质量控制规范 食品理化检测》

3 术语和定义

3.1 粮食加工品：包括小麦粉（通用小麦粉、专用小麦粉），大米（大米、糙米类产品、特殊大米、其他），挂面（普通挂面、花色挂面、手工面），其他粮食加工品（谷物加工品、谷物碾磨加工品、谷物粉类制成品）。

3.2 方便食品：包括方便面（油炸方便面、热风干燥方便面、其他方便面），其他方便食品（主食类：方便米粉、方便粥、方便米粉、方便米线、方便粉丝、方便湿米粉、方便豆花、方便湿面、凉粉，其他：冲调类：麦片、黑芝麻糊、红枣羹、油茶、即食谷物粉、其他）。

4 原理

试样在碱性溶液体系提取离心后，经阴离子交换柱净化，采用氨水-甲醇（25+75，体积比）洗脱，制成水溶液，注入高效液相色谱仪，经反相色谱分离，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 材料

5.1.1 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 50 mL 塑料离心管。

5.1.3 0.22 μm 亲水相滤膜。

5.1.4 10 mL 玻璃试管。

5.1.5 注射器。

5.1.6 固相萃取柱：离子交换型固相萃取柱，参考型号：Cleanert PWAX 150 mg/6mL，Strata-X-AW 33 μm Polymeric Weak Anion 60 mg/3mL。

5.1.7 100 μL 、200 μL 、500 μL 、1 mL 和 5 mL 移液枪。

5.1.8 5 mL 的棕色容量瓶（带螺旋盖）。

5.1.9 0.45 μm 水相微孔滤膜和 0.45 μm 有机相微孔滤膜。

5.2 试剂

5.2.1 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。

5.2.2 氨水($\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$)：优级纯，含量 25.0%~28.0%。

5.2.3 碳酸氢钠(NaHCO_3)：优级纯。

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

5.2.5 甲酸(HCOOH)：优级纯。

5.3 试剂配制

5.3.1 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)：称取 1.54 g 乙酸铵，加水至 1000 mL，溶解，经 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤后使用。

5.3.2 氨水-甲醇溶液 (25+75，体积比)：准确量取 25 mL 氨水，甲醇 75 mL，混匀。

5.3.3 甲酸-水溶液 (2+98，体积比)：准确量取 2 mL 甲酸，水 98 mL，混匀。

5.3.4 甲醇-水溶液 (4+6，体积比)：准确量取 40 mL 甲醇，水 60 mL，混匀，作为提取液。

5.4 标准品

5.4.1 柠檬黄 (CAS: 1934-21-0)。

5.4.2 苋菜红 (CAS: 915-67-3)。

5.4.3 新胭脂红 (CAS: 2611-82-7)。

5.4.4 日落黄 (CAS: 2783-94-0)。

5.4.5 诱惑红 (CAS: 25956-17-6)。

5.4.6 亮蓝 (CAS: 3844-45-9)。

5.4.7 胭脂红 (CAS: 15876-47-8)。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 合成着色剂标准贮备液 (0.5 mg/L) :购买经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.5.2 合成着色剂标准使用液 (10 µg/mL) :临用时将标准贮备液加水稀释 50 倍, 经 0.45 µm 水相微孔滤膜过滤。配成每毫升相当 10.0 µg 的合成着色剂。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪: 带二极管阵列或紫外检测器。

6.2 涡旋混合器。

6.3 分析天平: 感量 0.01 g。

6.4 离心机: 转速不得低于 4000 r/min。

6.5 氮吹仪。

6.6 高速粉碎机。

6.7 筛网: 1 mm~2 mm 试验筛孔径。

6.8 固相萃取装置 (带真空泵)。

6.9 匀浆机。

7 分析步骤

7.1 样品制备

7.1.1 干基样品: 采样量大于 1 kg, 用高速粉碎机将其粉碎, 过筛, 使其粒径小于 2 mm 孔径试验筛, 混合均匀后缩分至 100 g, 储存于样品瓶中, 密封保存, 供检测用。

7.1.2 湿基样品: 取 50 g (精确至 0.01 g) 样品, 用刀切成碎块, 粘稠状固体可以采用匀浆机研磨或直接切碎, 混匀, 作为试样; 其他湿基食物可以采用冷冻法或 105 °C 烘箱法烘干, 置高速粉碎机粉碎, 混匀, 作为试样。

7.2 样品提取

准确称取 5 g (精确至 0.01 g) 样品于 50 mL 塑料离心管中, 准确添加 0.8 g (精确至 0.01g) 优级纯碳酸氢钠作为辅助提取剂, 加入 20 mL 甲醇-水溶液 (4+6, 体积比), 涡旋混合提取 5 min, 在 4000 r/min 条件下常温离心 5 分钟, 取上层清液于另一离心管中, 残留物用 20 mL 甲醇-水溶液 (4+6, 体积比) 重复提取 2 次, 合并提取液备用。

7.3 样品净化

固相萃取柱的活化参照厂家提供的说明, 离子型交换固相萃取柱净化工艺参考条件:

- 1) 活化: 用 3~6 mL 甲醇、6 mL 水活化, 用 3 mL 甲酸-水溶液 (2+98) 平衡, 弃去滤液;
- 2) 上样: 准确移取 1 mL 待测样品上清液加入固相萃取柱, 弃去滤液;
- 3) 淋洗: 用 3~5 mL 甲酸-水溶液 (2+98) 淋洗固相萃取柱, 弃去滤液, 将小柱抽干;
- 4) 洗脱: 准确移取 1 mL 氨水-甲醇溶液 (25+75) 洗脱固相萃取柱, 收集洗脱液;
- 5) 氮吹: 在 50 °C 条件下, 将收集的洗脱液加热并采用氮吹方式吹干;
- 6) 复容: 准确移取 1mL 的纯水复容, 涡旋混合 1 min, 待样品充分溶解, 将样品溶液过 0.22 μm 亲水滤膜过滤, 待上机分析。

7.4 仪器参考条件

根据所用仪器型号将仪器调至最佳状态。仪器测定参考条件如下:

7.4.1 色谱柱: C_{18} 柱 (柱长 250 mm, 柱内径 4.6 mm; 填料粒径 5 μm), 或相当者;

7.4.2 进样量: 10 μL 。

7.4.3 柱温: 35 °C。

7.4.4 二极管阵列检测器波长范围: 400 nm~800 nm (参考条件: 柠檬黄: 427 nm; 苋菜红: 520 nm; 胭脂红: 508 nm; 日落黄 482 nm; 诱惑红: 507 nm; 亮蓝 624 nm); 或紫外检测器检测波长: 254 nm。

7.4.5 流速 1.0 mL/min。梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱表

时间 (min)	流速 (mL/min)	0.02mol/L 乙酸铵溶液 (%)	甲醇 (%)
0	1.0	95.0	5.0
4	1.0	80.0	20.0
8	1.0	63.0	37.0
15	1.0	63.0	37.0
20	1.0	95.0	5.0
22	1.0	95.0	5.0

7.5 测定

将分析待测样品溶液和合成着色剂标准使用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 分析结果的表述

试样中合成着色剂含量按以下公式进行计算：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \times f$$

- X 一试样中着色剂的含量，单位为克每千克(g/kg)；
- c 一进样液中着色剂的浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；
- V 一试样复溶后总体积，单位为毫升(mL)；
- m 一试样质量，单位为克(g)；
- f 一稀释因子，提取液总体积与上样液体积之比。

1000 一换算系数。

计算结果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。

9 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过其算术平均值的10%。

10 其他

方法检出限：柠檬黄、新红、苋菜红、胭脂红、日落黄均为 0.5 mg/kg, 亮蓝、赤藓红均为 0.2 mg/kg (检测波长 254 nm 时亮蓝检出限为 1.0 mg/kg, 赤藓红检出限为 0.5 mg/kg)。

附录 A

着色剂标准色谱图

A.1 着色剂标准色谱图(λ :254 nm)

着色剂标准色谱图(λ :254 nm)见图 A.1。

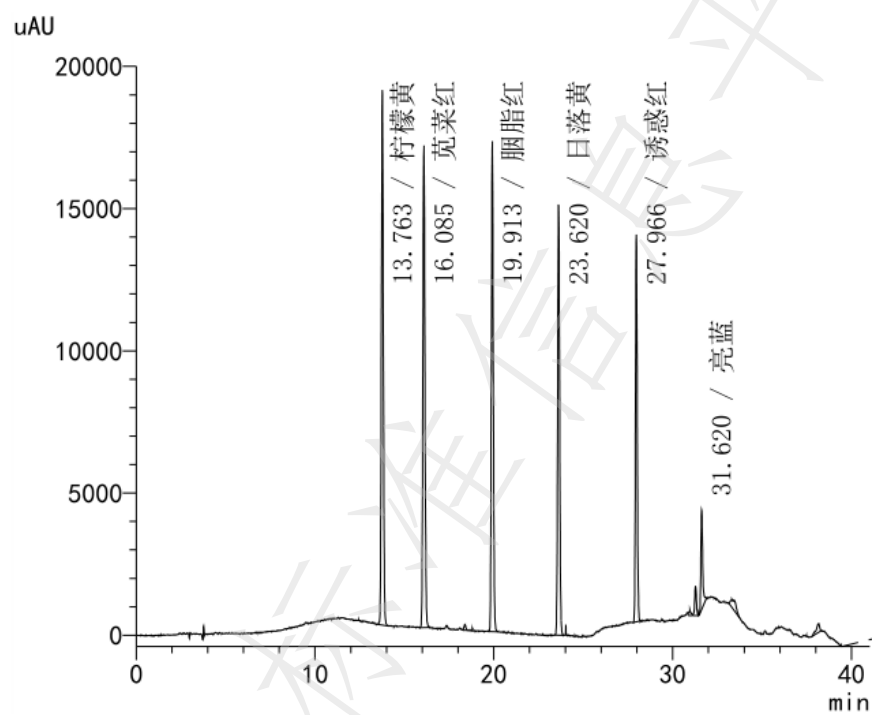


图 A.1 着色剂标准色谱图(λ :254 nm)

图 A.2 着色剂标准色谱图(λ :400 nm~800 nm 最大值图)

着色剂标准色谱图(λ :400 nm~800 nm 最大值图)见图 A.2。

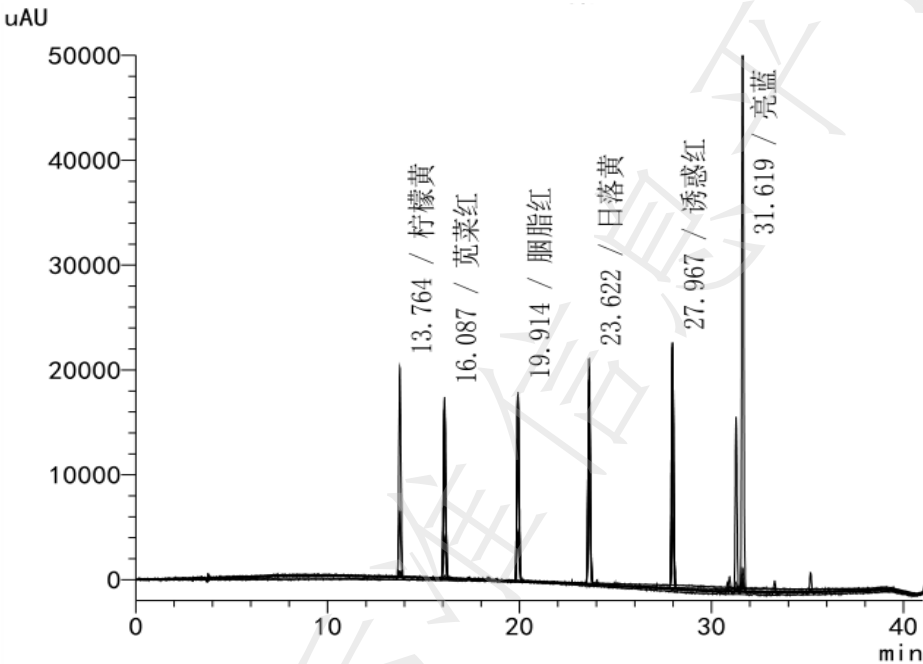


图 A.2 着色剂标准色谱图(λ : 400 nm~800 nm 最大值图)