

DBS22

吉 林 省 地 方 标 准

DBS22/006—2012

食品安全地方标准
食品中酸性橙、碱性橙 2 和碱性嫩黄的测定
液相色谱-串联质谱法

2012 - 12 - 10 发布

2013 - 01 - 01 实施

吉林省卫生厅 发布

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准起草单位：吉林省疾病预防控制中心。

本标准起草人：刘思洁、范明、李青、张冠英、杨大鹏。

食品安全标准

食品中酸性橙、碱性橙 2 和碱性嫩黄的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了食品中酸性橙、碱性橙2和碱性嫩黄的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于腐竹、腐皮、豆腐干、海鱼、辣椒及其制品、花椒及其制品中酸性橙、碱性橙2和碱性嫩黄的测定。

本标准方法的检出限：酸性橙7.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；碱性橙2 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；碱性嫩黄5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 原理

以含50%甲醇、1%甲酸和50 mmol/L乙酸铵水溶液作为提取溶液，用固相萃取柱对样品进行净化，液相色谱-串联质谱仪测定酸性橙、碱性橙2、碱性嫩黄的含量。

3 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 甲酸：色谱纯。

3.2 甲醇：色谱纯。

3.3 乙酸铵。

3.4 氨水：优级纯。

3.5 提取溶液：50 mmol/L 乙酸铵溶液+甲醇+甲酸(49+50+1, v/v)。

3.6 固相萃取柱平衡溶液：50 mmol/L 乙酸铵溶液+甲酸(99+1, v/v)。

3.7 淋洗溶液：50 mmol/L 乙酸铵溶液+甲醇+甲酸(94+5+1, v/v)。

3.8 洗脱溶液：氨水-甲醇溶液(5+95, v/v)。

3.9 样品稀释液：5 mmol/L 乙酸铵溶液+甲醇+甲酸(49.9+50+0.1, v/v)。

3.10 标准品：酸性橙(Orange II, CAS:633-96-5)标准品、碱性橙 2 (Chrysoidine, CAS: 532-82-1)标准品、碱性嫩黄(Auramine O, CAS:2465-27-2)。纯度均 $\geq 99\%$ 。

3.11 标准储备液：准确称取 0.0100 g 酸性橙、碱性橙 2 和碱性嫩黄标准品，用 50%甲醇水溶液溶解并定容至 10.0mL。-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

3.12 标准工作液：配制酸性橙、碱性橙 2 和碱性嫩黄混合标准系列，浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为：0.4、0.8、2.0、3.2、4.0。

3.13 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相。

3.14 WAX 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)或其他等效柱。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱-质谱/质谱联用仪。
 4.2 电子分析天平：感量 0.1 mg。
 4.3 高速离心机（15000 r/min）。
 4.4 振荡器。
 4.5 氮吹仪。
 4.6 固相萃取装置。

5 分析步骤

5.1 试样制备与保存

取混合均匀后的供试样品，作为供试试样，取混合均匀后的空白样品，作为空白试样。

5.2 提取

称取1.0 g试样于50 mL 离心管中，加入10.0 mL提取溶液（4.5），超声提取30 min，10000 rpm 离心10 min，上清液转移至另一离心管中；残渣中加入10.0 mL提取溶液再次提取，合并两次提取溶液。

5.3 净化

取5.0 mL 样品提取液，用固相萃取柱平衡溶液（4.6）稀释定容至50.0 mL，过WAX固相萃取柱（3mL 甲醇、3mL 水、3mL 固相萃取柱平衡溶液活化），用2 mL淋洗液（4.7）、2 mL水淋洗，5 mL洗脱液（4.8）洗脱，收集洗脱液，氮气吹至近干，用样品稀释液（4.9）定容至1.0 mL，过0.22 μm 滤膜后液相色谱-串联质谱测定。

5.4 基质加标工作曲线的制备

称取1.0g空白样品基质于50mL 离心管中，称取6 份，分别加入标准系列溶液100 μL，按6.2和6.3 进行操作，制备基质加标标准工作曲线，酸性橙、碱性橙2和碱性嫩黄浓度（ng/mL）为：0、10.0、20.0、50.0、80.0、100.0。

5.5 测定

5.5.1 色谱参考条件

色谱柱：C₁₈（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）或相当者。

柱温：40℃。

流动相：A 相：含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液；

B 相：乙腈。

梯度洗脱情况见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相A	流动相B
0.0	90	10
5.0	10	90
6.0	10	90

6.5	90	10
10.0	90	10

进样量：5 μ L。

流速：0.3 mL/min。

5.5.2 质谱参考条件

离子化方式：碱性橙 2、碱性嫩黄，ESI (+)；酸性橙 ESI (-)；扫描方式：多反应监测 MRM；毛细管电压：3.5 kV；源温度：110 $^{\circ}$ C；脱溶剂气温度：350 $^{\circ}$ C；脱溶剂气流量 650 L/h。质谱分析优化参数见表 2。

表2 酸性橙、碱性橙 2、碱性嫩黄保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量。

化合物	锥孔电压 (v)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
酸性橙	20	329.1	127.8*	35
			155.9	20
碱性橙2	22	213.1	121.1*	20
			77	18
碱性嫩黄	25	269.1	148.1*	25
			122.0	25

* 为定性离子

5.5.3 测定

在上述仪器条件下测定基质加标标准溶液及样品溶液。各检测目标化合物以保留时间和特征离子与定量离子所对应的液相色谱-串联质谱色谱峰面积相对丰度进行定性。要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物保留时间的相对偏差小于 20%；样品特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表 3 的规定，则可判断样品中存在相应的被测物。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	20%—50%	10%—20%	<10%
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

5.5.4 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

5.5.5 色谱图

色谱图参见附录A中图A.1。

6 结果计算

以标准溶液浓度对定量离子峰面积绘制标准曲线，外标法定量。
按下列公式计算

$$X = \frac{C \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 样品中目标化合物含量，单位为毫克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C —— 测定浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V —— 定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —— 最终样液代表的试样量，单位为克（ g ）。

注：计算结果需将空白值扣除。

7 准确度和精密度

7.1 准确度

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%。

在重现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%。

7.2 精密度

本方法添加浓度为 $20\mu\text{g}/\text{kg} \sim 320\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，加标回收率为：酸性橙 88.0%~111.0%；碱性橙2

附录 A
(资料性附录)

碱性橙 2、碱性嫩黄、酸性橙标准溶液的色谱图

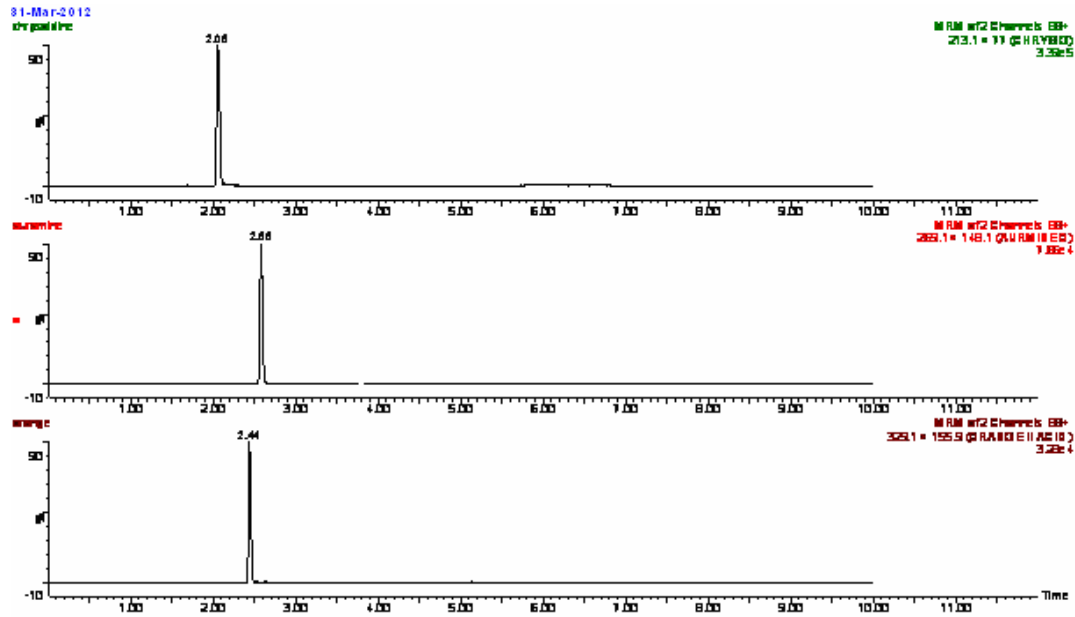


图 A.1 碱性橙 2、碱性嫩黄、酸性橙标准溶液的色谱图