

ICS 67.050
B20

团体标准

T/ NAIA XXX—2022

贺兰山东麓葡萄酒中多种非食用着色剂 的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of various illegal pigment in Helan Mountain wine

—LC-MS-MS

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 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》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：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏工商职业技术学院、宁夏回族自治区食品质量监督检验二站、宁夏化学分析测试协会

本标准主要起草人：汤丽华、马雪梅、吴明、汪洪、吕毅、马桂娟、张瑶、辛世华、赵瑞、张小飞。

本标准于 2022 年 XX 月 XX 日首次发布。

贺兰山东麓葡萄酒中多种非食用着色剂的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了贺兰山东麓葡萄酒中碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、柑橘红 2 号 5 种非食用着色剂的液相色谱质谱检测方法。

本标准适用贺兰山东麓葡萄酒（包括白葡萄酒、红葡萄酒）中碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、柑橘红 2 号的测定和确证。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 23496-2009 食品中禁用物质的检测 碱性橙染料 高效液相色谱法

SN/T 4523-2016 出口葡萄酒中多种非法着色剂的测定 液相色谱-质谱/质谱法

3 方法提要

液体试样经乙腈提取后，用无水硫酸镁、乙二胺-N-丙基硅烷（PSA）净化后，氮吹至干，定容后经 C₁₈ 色谱柱分离，供液相色谱-质谱仪测定和确证，外标法定量。

4 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈：色谱纯。

4.1.2 甲醇：色谱纯。

4.1.3 甲酸：优级纯。

4.1.4 0.1%甲酸水溶液：1mL 甲酸用水定容到 1000mL。

4.1.5 无水硫酸镁：优级纯。

4.1.6 氯化钠：分析纯。

4.1.7 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA):40~60 μ m。

4.2 标准品

4.2.1 标准品：碱性橙 2 (Basic Orange 2, CAS 号 532-82-1, C₁₂H₁₃CLN₄)、碱性嫩黄 O (Auramine O, CAS 号, 2465-27-2, C₁₇H₂₂CLN₃)、碱性橙 21 (Astrazon Orange G, CAS 号 3056-93-7, C₂₂H₂₃CLN₂)、罗丹明 B (Rhodamine B, CAS 号 81-88-9, C₂₈H₃₁CLN₂O₃)、碱性橙 22 (Astrazon Orange R, CAS

号 4657-00-5, $C_{28}H_{27}CLN_2$)、柑橘红 2 号(Citrus red 2, CAS 号: 6358-53-8, $C_{28}H_{16}N_2O_3$), 纯度均 $\geq 98\%$ 。

4.2.2 标准储备液: 准确称取适量的标准品, 用乙腈配制成浓度为 $100.0 \mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液, -18°C 保存, 有效期三个月。

4.2.3 标准工作液: 根据需要, 用空白样品基质溶液配制适当浓度的标准工作液, 现用现配。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪: 配备电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平: 感量 0.1mg 和 0.01g 。

5.3 涡旋混合器。

5.4 离心机: 最大转速 10000r/min 。

5.5 氮吹仪: 可温控。

5.6 超声波发生器。

6 分析步骤

6.1 试样制备

将所取原始样品 1kg 在瓷混样桶内充分混匀, 将混匀样品置于洁净容器内密封, 作为试样, 并标明标记。

6.2 试样的提取

称取试样 10.0g (精确到 0.01g) 于 50mL 聚四氟乙烯离心管中, 加入 3g 无水硫酸镁、 1.5g 氯化钠, 再加入 10mL 乙腈, 涡旋混匀 1min , 超声提取 10min , 8000r/min 离心 5min , 吸取上清液, 残渣再用 10mL 乙腈重复提取 1 次, 合并上清液, 混匀, 8000r/min 离心 5min , 上清液待净化。吸取 8mL 上述混合提取液加入内含 900mg 无水硫酸镁、 150mg 乙二胺-N-丙基硅烷 (PSA) 的 15mL 塑料离心管中净化, 涡旋混匀 1min , 8000r/min 离心 5min , 取 1mL 净化液, 用小流速氮气吹至近干, 加入 1mL 初始流动相, 涡旋混匀, 过 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 用于测定。

6.3 仪器参考条件

6.3.1 液相色谱参考条件

6.3.1.1 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C18, $50\text{mm} \times 2.1\text{mm}$, 粒径 $1.8\mu\text{m}$ 或性能相当者。

6.3.1.2 柱温: 40°C 。

6.3.1.3 流动相: A: 0.1% 甲酸水, B: 乙腈; 梯度洗脱见表 1。

6.3.1.4 流速: 0.30mL/min 。

6.3.1.5 进样量: $2\mu\text{L}$ 。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/ (mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.30	90	10
0.50	0.30	90	10
2.50	0.30	45	55
8.50	0.30	10	90

10.00	0.30	0	100
11.00	0.30	90	10
15.00	0.30	90	10

6.3.2 质谱参考条件

6.3.2.1 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

6.3.2.2 扫描方式：正离子扫描。

6.3.2.3 检测方式：多反应监测（MRM）。

6.3.2.4 离子源温度：325℃。

6.3.2.5 气体流速：6L/min。

6.3.2.6 雾化器压力：45psi。

6.3.2.7 鞘气温度：350℃。

6.3.2.8 鞘气流速：11L/min。

6.3.2.9 毛细管电压：3500V。

6.3.2.10 喷嘴电压：500V。

6.3.2.11 定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见附录 A。

6.4 定量测定

根据样液中被测物含量情况，选定浓度相近的基质混合标准工作溶液，基质混合标准工作溶液和待测样液中 5 种非食用着色剂的响应值均应在仪器检测的线性范围内。基质混合标准工作溶液与样液等体积进样测定。标准溶液及样液均按 6.3.1 和 6.3.2 规定的条件进行测定，如果样液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证，碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、柑橘红 2 号的参考保留时间见表 2。碱性橙 2、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、柑橘红 2 号标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用基质溶液标准曲线外标法定量。

表 2 参考保留时间

被测物名称	保留时间/（min）
碱性橙 2	2.361
碱性嫩黄 O	2.818
碱性橙 21	3.018
碱性橙 22	3.548
柑橘红 2 号	6.146

6.5 定性测定

经确证分析被测物质量色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准样物质相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 3），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 3 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%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

6.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

7 分析结果的表述

试样中 5 种非食用着色剂含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times v \times 1000}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X —— 样本中各种非食用着色剂含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C —— 测定溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

C_0 —— 空白基质溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V —— 样本溶液提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量，单位为克（g）。

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留两位有效数字。

8 测定低限

本方法的碱性橙 2、柑橘红 2 号测定低限为 0.002mg/kg，碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 22、测定低限为 0.001mg/kg。

附录 A
(资料性附录)

表 A.1 5 种非食用着色剂的质谱参数

被测物名称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
碱性橙 2	213.0	77.0*	120	30
		120.8	120	15
碱性嫩黄 O	268.2	147.1*	133	34
		252.1	133	30
碱性橙 21	315.3	300.2*	145	22
		270.2	145	40
碱性橙 22	391.3	376.3*	160	25
		361.3	160	42
柑橘红 2 号	309.1	153.0*	135	40
		278.0	135	12

附录 B
(资料性附录)

图 B.1 5 种非食用着色剂的多反应监测 (MRM) 总离子流图

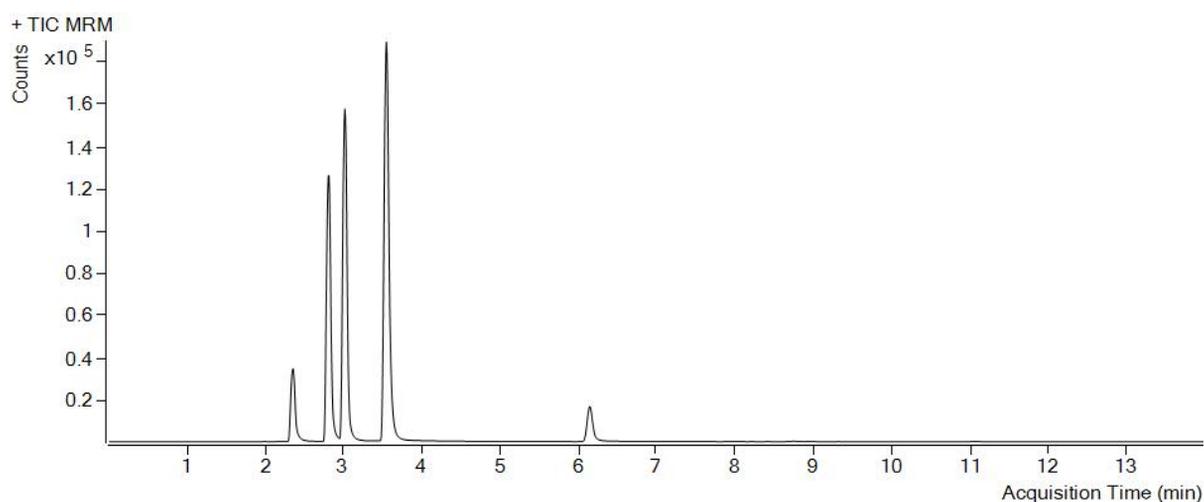
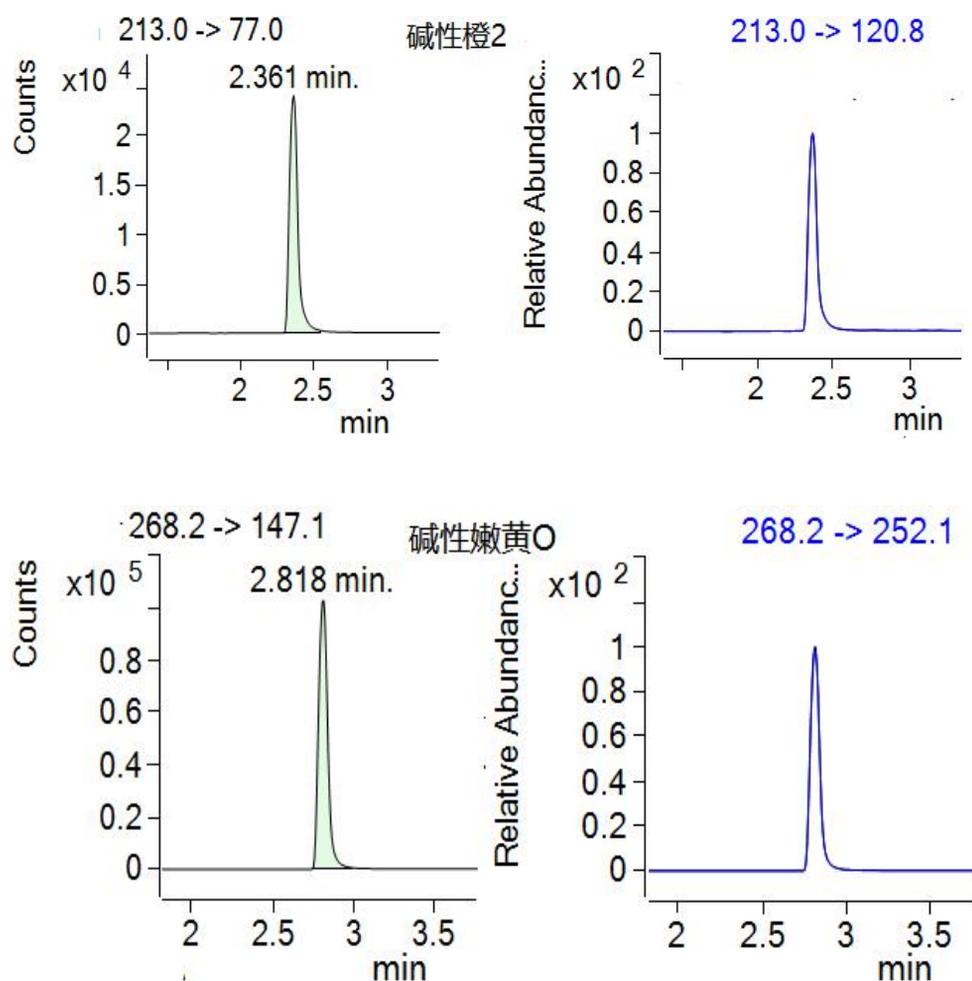


图 B.2 5 种非食用着色剂的多反应监测 (MRM) 色谱图



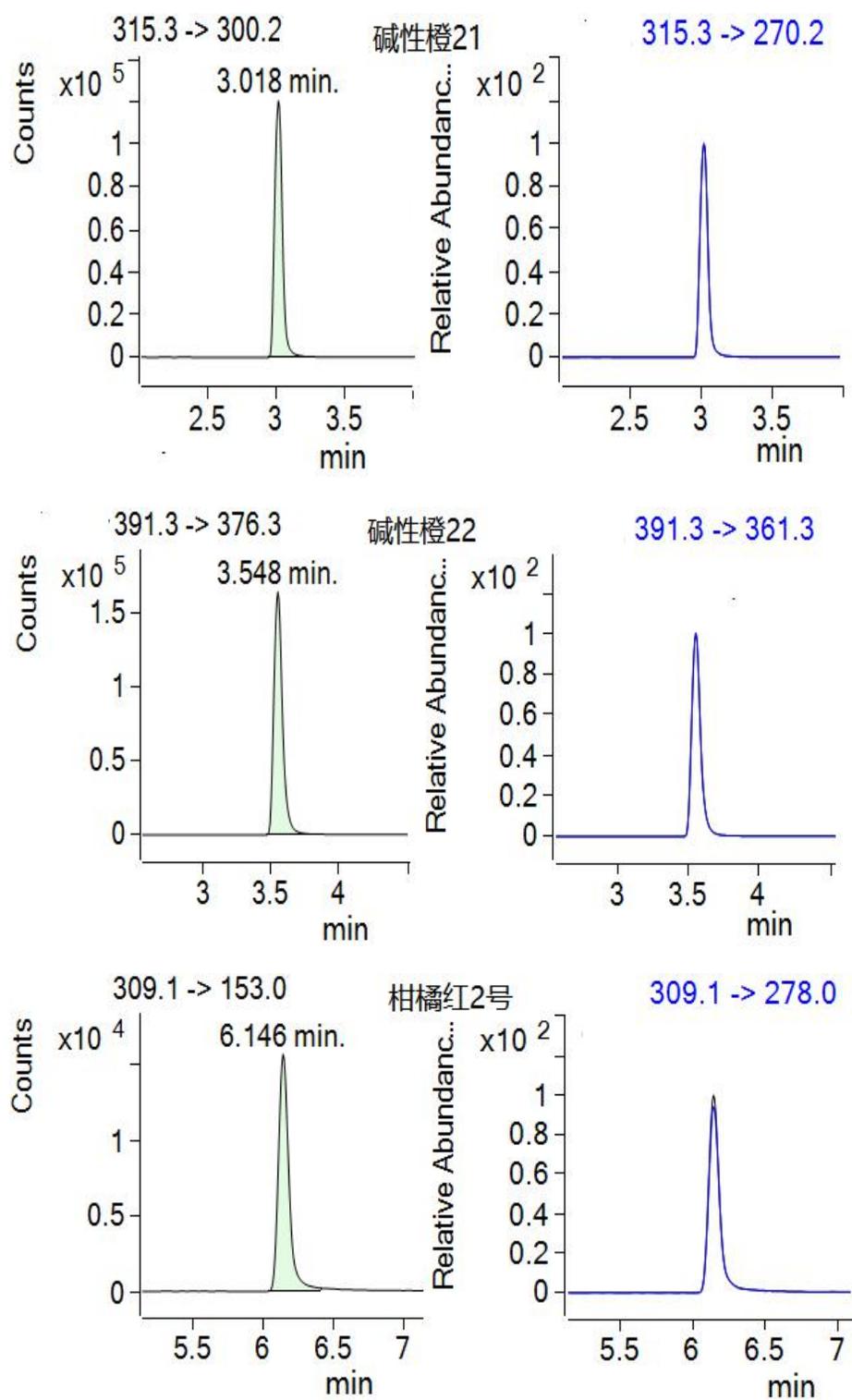


图 B.1 (续)