

ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.35—2003
代替 GB/T 5009.35—1996

食品中合成着色剂的测定

Determination of synthetic colour in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

275

前 言

本标准代替 GB/T 5009.35—1996《食品中合成着色剂的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.35—1996 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中合成着色剂的测定》；

——按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改；

——增加了示波极谱法作为第三法。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由天津市食品卫生监督检验所、辽宁省食品卫生监督检验所、宁夏回族自治区卫生防疫站、西安市卫生防疫站负责起草。

本标准第二法由卫生部食品卫生监督检验所负责起草。

本标准第三法由卫生部食品卫生监督检验所负责起草。

本标准于 1985 年首次发布，于 1996 年第一次修订，本次为第二次修订。

食品中合成着色剂的测定

1 范围

本标准规定了食品中合成着色剂的测定方法。

本标准适用于食品中合成着色剂的测定。

本方法检出限:新红 5 ng、柠檬黄 4 ng、苋菜红 6 ng、胭脂红 8 ng、日落黄 7 ng、赤藓红 18 ng、亮蓝 26 ng,当进样量相当 0.025 g 时,检出浓度分别为 0.2 mg/kg;0.16 mg/kg;0.24 mg/kg;0.32 mg/kg;0.28 mg/kg;0.72 mg/kg;1.04 mg/kg。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

食品中人工合成着色剂用聚酰胺吸附法或液-液分配法提取,制成水溶液,注入高效液相色谱仪,经反相色谱分离,根据保留时间定性和与峰面积比较进行定量。

3 试剂

3.1 正己烷。

3.2 盐酸。

3.3 乙酸。

3.4 甲醇:经 0.5 μm 滤膜过滤。

3.5 聚酰胺粉(尼龙 6):过 200 目筛。

3.6 乙酸铵溶液(0.02 mol/L):称取 1.54 g 乙酸铵,加水至 1 000 mL,溶解,经 0.45 μm 滤膜过滤。

3.7 氨水:量取氨水 2 mL,加水至 100 mL,混匀。

3.8 氨水-乙酸铵溶液(0.02 mol/L):量取氨水 0.5 mL,加乙酸铵溶液(0.02 mol/L)至 1 000 mL,混匀。

3.9 甲醇-甲酸(6+4)溶液:量取甲醇 60 mL,甲酸 40 mL,混匀。

3.10 柠檬酸溶液:称取 20 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),加水至 100 mL,溶解混匀。

3.11 无水乙醇-氨水-水(7+2+1)溶液:量取无水乙醇 70 mL、氨水 20 mL、水 10 mL,混匀。

3.12 三正辛胺正丁醇溶液(5%):量取三正辛胺 5 mL,加正丁醇至 100 mL,混匀。

3.13 饱和硫酸钠溶液。

3.14 硫酸钠溶液(2 g/L)。

3.15 pH6 的水:水加柠檬酸溶液调 pH 值到 6。

3.16 合成着色剂标准溶液:准确称取按其纯度折算为 100%质量的柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、新红、赤藓红、亮蓝、靛蓝各 0.100 g,置 100 mL 容量瓶中,加 pH6 水到刻度,配成水溶液(1.00 mg/mL)。

3.17 合成着色剂标准使用液:临用时上述溶液(或将 3.16)加水稀释 20 倍,经 0.45 μm 滤膜过滤,配成每毫升相当于 50.0 μg 的合成着色剂。

4 仪器

高效液相色谱仪,带紫外检测器,254 nm 波长。

5 分析步骤

5.1 试样处理

5.1.1 桔子汁、果味水、果子露汽水等:称取 20.0 g~40.0 g,放入 100 mL 烧杯中,含二氧化碳试样加热驱除二氧化碳。

5.1.2 配制酒类:称取 20.0 g~40.0 g,放 100 mL 烧杯中,加小碎瓷片数片,加热驱除乙醇。

5.1.3 硬糖、蜜饯类、淀粉软糖等:称取 5.00 g~10.00 g 粉碎试样,放入 100 mL 小烧杯中,加水 30 mL,温热溶解,若试样溶液 pH 值较高,用柠檬酸溶液调 pH 值到 6 左右。

5.1.4 巧克力豆及着色糖衣制品:称取 5.00 g~10.00 g,放入 100 mL 小烧杯中,用水反复洗涤色素,到试样无色为止,合并色素漂洗液为试样溶液。

5.2 色素提取

5.2.1 聚酰胺吸附法:试样溶液加柠檬酸溶液调 pH 值到 6,加热至 60℃,将 1 g 聚酰胺粉加少许水调成粥状,倒入试样溶液中,搅拌片刻,以 G3 垂融漏斗抽滤,用 60℃ pH=4 的水洗涤 3 次~5 次,然后用甲醇-甲酸混合溶液洗涤 3 次~5 次(含赤藓红的试样用 5.2.2 法处理),再用水洗至中性,用乙醇-氨水-水混合溶液解吸 3 次~5 次,每次 5 mL,收集解吸液,加乙酸中和,蒸发至近干,加水溶解,定容至 5 mL。经 0.45 μm 滤膜过滤,取 10 μL 进高效液相色谱仪。

5.2.2 液-液分配法(适用于含赤藓红的试样):将制备好的试样溶液放入分液漏斗中,加 2 mL 盐酸、三正辛胺正丁醇溶液(5%)10 mL~20 mL,振摇提取,分取有机相,重复提取至有机相无色,合并有机相,用饱和硫酸钠溶液洗 2 次,每次 10 mL,分取有机相,放蒸发皿中,水浴加热浓缩至 10 mL,转移至分液漏斗中,加 60 mL 正己烷,混匀,加氨水提取 2 次~3 次,每次 5 mL,合并氨水溶液层(含水溶性酸性色素),用正己烷洗 2 次,氨水层加乙酸调成中性,水浴加热蒸发至近干,加水定容至 5 mL。经滤膜 0.45 μm 过滤,取 10 μL 进高效液相色谱仪。

5.3 高效液相色谱参考条件

5.3.1 柱:YWG-C₁₈ 10 μm 不锈钢柱 4.6 mm(i.d)×250 mm。

5.3.2 流动相:甲醇:乙酸铵溶液(pH=4,0.02 mol/L)。

5.3.3 梯度洗脱:甲醇:20%~35%,3%/min;35%~98%,9%/min;98%继续 6 min。

5.3.4 流速:1 mL/min。

5.3.5 紫外检测器,254 nm 波长。

5.4 测定

取相同体积样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。

5.5 结果计算

试样中着色剂的含量按式(1)进行计算。

$$X = \frac{A \times 1\,000}{m \times V_2 / V_1 \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——试样中着色剂的含量,单位为克每千克(g/kg);

A——样液中着色剂的质量,单位为微克(μg);

V₂——进样体积,单位为毫升(mL);

V₁——试样稀释总体积,单位为毫升(mL);

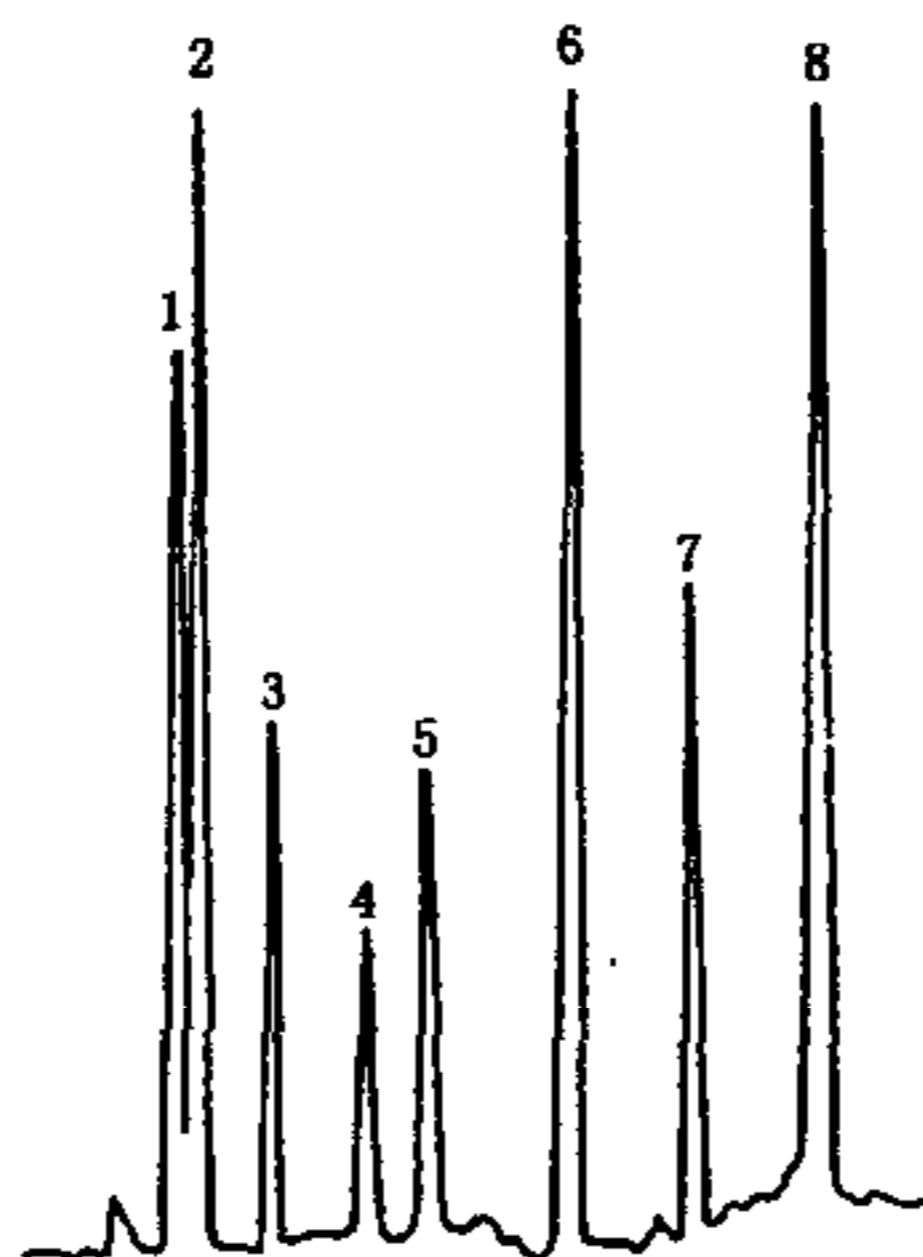
m——试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留两位有效数字。

5.6 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%。

5.7 其他



- 1—新红；
- 2—柠檬黄；
- 3—苋菜红；
- 4—靛蓝；
- 5—胭脂红；
- 6—日落黄；
- 7—亮蓝；
- 8—赤藓红。

图1 八种着色剂色谱分离图

第二法 薄层色谱法

6 原理

水溶性酸性合成着色剂在酸性条件下被聚酰胺吸附,而在碱性条件下解吸附,再用纸色谱法或薄层色谱法进行分离后,与标准比较定性、定量。

最低检出量为50 μg。点样量为1 μL时,检出浓度约为50 mg/kg。

7 试剂

- 7.1 石油醚:沸程60℃~90℃。
- 7.2 甲醇。
- 7.3 聚酰胺粉(尼龙6):200目。
- 7.4 硅胶G。
- 7.5 硫酸:(1+10)。
- 7.6 甲醇-甲酸溶液:(6+4)。
- 7.7 氢氧化钠溶液(50 g/L)。
- 7.8 海砂:先用盐酸(1+10)煮沸15 min,用水洗至中性,再用氢氧化钠溶液(50 g/L)煮沸15 min,用水洗至中性,再于105℃干燥,贮于具玻璃塞的瓶中,备用。
- 7.9 乙醇(50%)。
- 7.10 乙醇-氨溶液:取1 mL氨水,加乙醇(70%)至100 mL。

- 7.11 pH6 的水:用柠檬酸溶液(20%)调节至 pH6。
- 7.12 盐酸(1+10)。
- 7.13 柠檬酸溶液(200 g/L)。
- 7.14 钨酸钠溶液(100 g/L)。
- 7.15 碎瓷片:处理方法同 7.8。
- 7.16 展开剂如下:
 - 7.16.1 正丁醇-无水乙醇-氨水(1%)(6+2+3):供纸色谱用。
 - 7.16.2 正丁醇-吡啶-氨水(1%)(6+3+4):供纸色谱用。
 - 7.16.3 甲乙酮-丙酮-水(7+3+3):供纸色谱用。
 - 7.16.4 甲醇-乙二胺-氨水(10+3+2):供薄层色谱用。
 - 7.16.5 甲醇-氨水-乙醇(5+1+10):供薄层色谱用。
 - 7.16.6 柠檬酸钠溶液(25 g/L)-氨水-乙醇(8+1+2):供薄层色谱用。
- 7.17 合成着色剂标准溶液:按 3.16 方法,分别配制着色剂的标准溶液浓度为每毫升相当于 1.0 mg。
- 7.18 着色剂标准使用液:临用时吸取色素标准溶液各 5.0 mL,分别置于 50 mL 容量瓶中,加 pH6 的水稀释至刻度。此溶液每毫升相当于 0.10 mg 着色剂。

8 仪器

- 8.1 可见分光光度计。
- 8.2 微量注射器或血色素吸管。
- 8.3 展开槽,25 cm×6 cm×4 cm。
- 8.4 层析缸。
- 8.5 滤纸:中速滤纸,纸色谱用。
- 8.6 薄层板:5 cm×20 cm。
- 8.7 电吹风机。
- 8.8 水泵。

9 分析步骤

9.1 试样处理

- 9.1.1 果味水、果子露、汽水:称取 50.0 g 试样于 100 mL 烧杯中。汽水需加热驱除二氧化碳。
- 9.1.2 配制酒:称取 100.0 g 试样于 100 mL 烧杯中,加碎瓷片数块,加热驱除乙醇。
- 9.1.3 硬糖、蜜饯类、淀粉软糖:称取 5.00 g 或 10.0 g 粉碎的试样,加 30 mL 水,温热溶解,若样液 pH 值较高,用柠檬酸溶液(200 g/L)调至 pH4 左右。
- 9.1.4 奶糖:称取 10.0 g 粉碎均匀的试样,加 30 mL 乙醇-氨溶液溶解,置水浴上浓缩至约 20 mL,立即用硫酸溶液(1+10)调至微酸性,再加 1.0 mL 硫酸(1+10),加 1 mL 钨酸钠溶液(100 g/L),使蛋白质沉淀,过滤,用少量水洗涤,收集滤液。
- 9.1.5 蛋糕类:称取 10.0 g 粉碎均匀的试样,加海砂少许,混匀,用热风吹干用品(用手摸已干燥即可),加入 30 mL 石油醚搅拌。放置片刻,倾出石油醚,如此重复处理三次,以除去脂肪,吹干后研细,全部倒入 G3 垂融漏斗或普通漏斗中,用乙醇-氨溶液提取色素,直至着色剂全部提完,以下按 9.1.4 自“置水浴上浓缩至约 20 mL……”起依法操作。

9.2 吸附分离

将处理后所得的溶液加热至 70℃,加入 0.5 g~1.0 g 聚酰胺粉充分搅拌,用柠檬酸溶液(200 g/L)调 pH 至 4,使着色剂完全被吸附,如溶液还有颜色,可以再加一些聚酰胺粉。将吸附着色剂的聚酰胺全部转入 G3 垂融漏斗中过滤(如用 G3 垂融漏斗过滤可以用水泵慢慢地抽滤)。用 pH4 的 70℃水反复

洗涤,每次 20 mL,边洗边搅拌,若含有天然着色剂。再用甲醇-甲酸溶液洗涤 1 次~3 次,每次 20 mL,至洗液无色为止。再用 70℃ 水多次洗涤至流出的溶液为中性。洗涤过程中应充分搅拌。然后用乙醇-氨溶液分次解吸全部着色剂,收集全部解吸液,于水浴上驱氨。如果为单色,则用水准确稀释至 50 mL,用分光光度法进行测定。如果为多种着色剂混合液,则进行纸色谱或薄层色谱法分离后测定,即将上述溶液置水浴上浓缩至 2 mL 后移入 5 mL 容量瓶中,用 50% 乙醇洗涤容器,洗液并入容量瓶中并稀释至刻度。

9.3 定性

9.3.1 纸色谱

取色谱用纸,在距底边 2 cm 的起始线上分别点 3 μL~10 μL 试样溶液、1 μL~2 μL 着色剂标准溶液,挂于分别盛有 7.16.1、7.16.2 的展开剂的层析缸中,用上行法展开,待溶剂前沿展至 15 cm 处,将滤纸取出于空气中晾干,与标准斑比较定性。

也可取 0.5 mL 样液,在起始线上从左到右点成条状,纸的左边点着色剂标准溶液,依法展开,晾干后先定性后再供定量用。靛蓝在碱性条件下易褪色,可用 7.16.3 展开剂。

9.3.2 薄层色谱

9.3.2.1 薄层板的制备

称取 1.6 g 聚酰胺粉、0.4 g 可溶性淀粉及 2 g 硅胶 G,置于合适的研钵中,加 15 mL 水研匀后,立即置涂布器中铺成厚度为 0.3 mm 的板。在室温晾干后,于 80℃ 干燥 1 h,置干燥器中备用。

9.3.2.2 点样

离板底边 2 cm 处将 0.5 mL 样液从左到右点成与底边平行的条状,板的左边点 2 μL 色素标准溶液。

9.3.2.3 展开

苋菜红与胭脂红用 7.16.4 展开剂,靛蓝与亮蓝用 7.16.5 展开剂,柠檬黄与其他着色剂用 7.16.6 展开剂。取适量展开剂倒入展开槽中,将薄层板放入展开,待着色剂明显分开后取出,晾干,与标准斑比较,如 R_f 相同即为同一色素。

9.4 定量

9.4.1 试样测定

将纸色谱的条状色斑剪下,用少量热水洗涤数次,洗液移入 10 mL 比色管中,并加水稀释至刻度,作比色测定用。

将薄层色谱的条状色斑包括有扩散的部分,分别用刮刀刮下,移入漏斗中,用乙醇-氨溶液解吸着色剂,少量反复多次至解吸液于蒸发皿中,于水浴上挥去氨,移入 10 mL 比色管中,加水至刻度,作比色用。

9.4.2 标准曲线制备

分别吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 胭脂红、苋菜红、柠檬黄、日落黄色素标准使用溶液,或 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 亮蓝、靛蓝色素标准使用溶液,分别置于 10 mL 比色管中,各加水稀释至刻度。

上述试样与标准管分别用 1 cm 比色杯,以零管调节零点,于一定波长下(胭脂红 510 nm,苋菜红 520 nm,柠檬黄 430 nm,日落黄 482 nm,亮蓝 627 nm,靛蓝 620 nm),测定吸光度,分别绘制标准曲线比较或与标准系列目测比较。

9.5 结果计算

试样中着色剂的含量按式(2)进行计算。

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times V_2 / V_1 \times 1000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中着色剂的含量,单位为克每千克(g/kg);

A ——测定用样液中色素的质量,单位为毫克(mg);

m ——试样质量或体积,单位为克或毫升(g 或 mL);

V_1 ——试样解吸后总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——样液点板(纸)体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留两位有效数字。

第三法 示波极谱法

10 原理

食品中的合成着色剂,在特定的缓冲溶液中,在滴汞电极上可产生敏感的极谱波,波高与着色剂的浓度成正比。当食品中存在一种或两种以上互不影响测定的着色剂时,可用其进行定性定量分析。

11 试剂

11.1 底液 A:磷酸盐缓冲液(常用于红色和黄色复合色素),可作苋菜红、胭脂红、日落黄、柠檬黄以及靛蓝着色剂的测定底液。

称取 13.6 g 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4)和 14.1 g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)[或 35.6 g 含结晶水的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)]及 10.0 g 氯化钠,加水溶解后稀释至 1 L。

11.2 底液 B:乙酸盐缓冲液(常用于绿色和蓝色复合色素),可作靛蓝、亮蓝、柠檬黄、日落黄着色剂的测定底液。

量取 40.0 mL 冰乙酸,加水约 400 mL,加入 20.0 g 无水乙酸钠,溶解后加水稀释至 1 L。

11.3 柠檬酸溶液:200 g/L。

11.4 乙醇-氨溶液:取 1 mL 浓氨水,加乙醇(70%)至 100 mL。

11.5 着色剂标准溶液:准确称取按其纯度折算为 100%质量的人工合成着色剂 0.100 g,溶解后置于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度。此溶液 1 mL 含 1.00 mg 着色剂。

11.6 着色剂标准使用溶液:吸取着色剂标准溶液 1.00 mL,置于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度。此溶液 1 mL 含 10.0 μg 着色剂。

12 仪器

12.1 微机极谱仪。

12.2 常用玻璃仪器。

13 分析步骤

13.1 试样处理

13.1.1 饮料和酒类:取样 10.0 mL~25.0 mL,加热驱除二氧化碳和乙醇,冷却后用 200 g/L 氢氧化钠和盐酸(1+1)调至中性,然后加蒸馏水至原体积。

13.1.2 表层色素类:取样 5.0 g~10.0 g,用蒸馏水反复漂洗直至色素完全被洗脱。合并洗脱液并定容至一定体积。

13.1.3 水果糖和果冻类:取样 5.0 g,用水加热溶解,冷却后定容至 25.0 mL。

13.1.4 奶油类:取样 5.0 g 于 50 mL 离心管中,用石油醚洗涤三次,每次约 20 mL~30 mL,用玻璃棒搅匀,离心,弃上清液。低温挥去残留的石油醚后用乙醇-氨溶液溶解并定容至 25.0 mL,离心,取上清液一定量水浴蒸干,用适量的水加热溶解色素,用水洗入 10 mL 容量瓶并定容。

13.1.5 奶糖类:取样 5.0 g 溶于乙醇-氨溶液至 25.0 mL,离心。取上清液 20.0 mL,加水 20 mL,加热挥去约 20 mL,冷却,用 200 g/L 柠檬酸调至 pH4,加入 200 目聚酰胺粉 0.5 g~1.0 g,充分搅拌使色素完全吸附后,用 30 mL~40 mL 酸性水洗入 50 mL 离心管,离心,弃上层液体。沉淀物反复用酸性水洗 3 次~4 次后,用适量酸性水洗入含滤纸的漏斗中。用乙醇-氨溶液洗脱色素,将洗脱液水浴蒸干,用适量的水加热溶解色素,用水洗入 10 mL 容量瓶并定容。

13.2 测定

13.2.1 极谱条件:滴汞电极,一阶导数,三电极制,扫描速度 250 mV/s,底液 A 的初始扫描电位为 -0.2 V,终止扫描电位为 -0.9 V。参考峰电位为苋菜红 -0.42 V、日落黄 -0.50 V、柠檬黄 -0.56 V、胭脂红 -0.69 V、靛蓝 -0.29 V。底液 B 的初始扫描电位为 0.0 V,终止扫描电位为 -1.0 V。参考峰电位(溶液、底液偏酸使出峰电位正移,偏碱使出峰电位负移):靛蓝 -0.16 V、日落黄 -0.32 V、柠檬黄 -0.45 V、亮蓝 -0.80 V。

13.2.2 标准曲线:吸取着色剂标准使用溶液 0,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00 mL 分别于 10 mL 比色管中,加入 5.00 mL 底液,用水定容至 10.0 mL(浓度分别为 0,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$),混匀后于微机极谱仪上测定。0 为试剂空白溶液。

13.2.3 试样测定:取试样处理液 1.00 mL,或一定量(复合色素峰电位较近时,尽量取稀溶液),加底液 5.00 mL,加水至 10.00 mL,摇匀后与标准系列溶液同时测定。

14 计算

试样中着色剂的含量按式(3)进行计算。

$$X = \frac{c_x \times 10 \times 100}{m \times V_1 \times V_2 \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X——试样中着色剂的含量,单位为克每升或克每千克(g/L 或 g/kg);

c_x ——试样测定液中着色剂的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——试样取样质量或体积,单位为克或毫升(g 或 mL);

V_1 ——试样测定液中试样处理液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——试样稀释后的总体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留两位有效数字。

15 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%。