

DBS

江 苏 省 地 方 标 准

DBS 32/012—2016

食品安全地方标准
食品中喹啉黄的检测 高效液相色谱法、液
相色谱-质谱/质谱法

2016 - 12 - 23 发布

2017 - 02 - 01 实施

江苏省卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准系首次发布。

食品安全地方标准

食品中喹啉黄的检测 高效液相色谱法、液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了食品中喹啉黄的两种测定方法—高效液相色谱法和液相色谱-质谱/质谱法。
本标准适用于糖果、酒、巧克力制品中喹啉黄含量的测定。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

用提取液提取试样中的喹啉黄，经固相萃取柱净化后，用高效液相色谱紫外检测器测定，根据保留时间定性、以峰面积定量。

3 试剂和材料

3.1 总则

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.2 试剂

- 3.2.1 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。
- 3.2.2 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。
- 3.2.3 氨水 ($\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$)：含量 20%~25%。
- 3.2.4 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)。
- 3.2.5 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$)。

3.3 试剂配制

- 3.3.1 氨水-甲醇溶液 (1+9, 体积比)：量取氨水 10mL、甲醇 90mL，混匀。
- 3.3.2 甲醇-水溶液 (7+3, 体积比)：量取甲醇 70mL、水 30mL，混匀。
- 3.3.3 甲醇-甲酸-水溶液 (2+2+6, 体积比)：量取甲醇 20mL、甲酸 20mL、水 60mL，混匀。
- 3.3.4 柠檬酸溶液 (20g/L)：称取 2.0g 柠檬酸，加水溶解并定容 100mL。
- 3.3.5 乙酸铵溶液 (0.02mol/L)：称取 1.54g 乙酸铵，加水溶解并定容至 1000mL，经 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤。
- 3.3.6 初始流动相：量取 20mL 甲醇、80mL 乙酸铵溶液 (0.02mol/L) (3.3.5)，混匀。

- 3.4 喹啉黄标准品：纯度大于 97%。

喹啉黄标准品是以QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II为主的混合物。喹啉黄标准品详细信息及各组分含量的测定见附录A。

3.5 标准溶液配制

3.5.1 喹啉黄储备液（1.0mg/mL）：准确称取喹啉黄标准品（3.4）100.0mg，用水溶解并定容至100mL，室温保存。

3.5.2 喹啉黄标准曲线工作液：吸取标准储备液用水稀释，得到喹啉黄浓度为5.0μg/mL、10.0μg/mL、20.0μg/mL、50.0μg/mL、100.0μg/mL的标准溶液。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

4.2 氮气吹干仪。

4.3 离心机：转速≥5000r/min。

4.4 天平：感量为0.001g和0.0001g。

4.5 具塞塑料离心管：50mL。

4.6 涡旋混合器。

4.7 固相萃取装置。

4.8 聚酰胺固相萃取柱（500mg，3mL）或性能相当者。使用前先依次用3mL甲醇、3mL水活化。

4.9 水相微孔滤膜：0.45μm。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 提取

5.1.1.1 酒

移取2.0mL试样于50mL具塞塑料离心管中，加入10mL水混匀后，待净化。

5.1.1.2 糖果

称取2g（精确至0.01g）已粉碎样品于50mL具塞塑料离心管中，加水10mL，温热溶解，离心5min（5000r/min），转移上清液至另一离心管中，残渣用5mL水重复提取一次，合并提取液待净化。

5.1.1.3 巧克力

称取2g（精确至0.01g）已粉碎样品于50mL具塞塑料离心管中，加入10mL甲醇-水溶液（3.3.2），涡旋混匀5min，离心5min（5000r/min），转移上清液至另一离心管中，残渣用5mL甲醇-水溶液（3.3.2）重复提取一次，合并提取液待净化。

5.1.2 净化

测定提取液的pH值，若提取液pH值>6，需用柠檬酸溶液（3.2.4）调pH值到4.0±0.2。将提取液转移至已活化的固相萃取柱（4.8）中，再用1mL甲醇-甲酸-水溶液（3.3.3）充分洗涤离心管，全部转移至固相萃取柱中，弃去流出液；然后依次用3mL甲醇-甲酸-水溶液（3.3.3）和3mL水淋洗固相萃取柱，弃去每

次淋洗液。真空减压抽至近干（至少抽1min）后用5mL氨水-甲醇溶液（3.3.1）洗脱，控制洗脱流速小于1mL/min，收集洗脱液并在60℃水浴下用氮气吹干，残留物用1.0mL初始流动相（3.3.6）定容，涡旋溶解，最后用水相微孔滤膜（0.45μm）过滤，待上机分析测定。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱：C₁₈柱或具相同性能的其他色谱柱，4.6mm×150mm，5μm。

5.2.2 进样量：20.0μL。

5.2.3 检测波长：415nm。

5.2.4 流动相：A-0.02mol/L 乙酸铵溶液，B-甲醇。梯度洗脱表见表 1：

表 1 梯度洗脱表

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	1.0	80.0	20.0
5.0	1.0	80.0	20.0
20.0	1.0	10.0	90.0
23.0	1.0	80.0	20.0
25.0	1.0	80.0	20.0

5.3 标准曲线的制作

将标准曲线工作液按照浓度由低到高进样检测，以喹啉黄标准工作液中的各组分的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，分别绘制QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II的标准曲线。

注1：喹啉黄标准工作液中各组分的浓度= 喹啉黄标准曲线工作液浓度× 喹啉黄标准品中各组分的含量(w_i)。

注2：喹啉黄标准品各组分的色谱图见附录 C。

5.4 空白实验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

5.5 定量测定

外标法定量。待测样液中喹啉黄各组分的响应值应在标准曲线范围内。

6 分析结果的表述

试样中喹啉黄各组分的含量由色谱数据处理软件或按式（1）计算获得。计算结果需扣除空白值。

$$X_i = \frac{(C_i - C_0) \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i——试样中喹啉黄各组分的含量，mg/kg（或mg/L）；

C_i——试样中喹啉黄各组分峰面积对应的浓度，μg/mL；

C₀——空白试样中喹啉黄各组分峰面积对应的浓度，μg/mL；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样量, g(或mL);

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, 保留三位有效数字。

喹啉黄总量以QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II的总和计。

7 方法定量限和回收率

7.1 方法定量限

以信噪比不小于10 ($S/N \geq 10$) 确定喹啉黄的定量限: 2.5mg/kg (或mg/L)

7.2 回收率

在添加浓度 2.5mg/kg (或mg/L) ~100.0mg/kg (或mg/L) 浓度范围内, 回收率在80%~110%之间。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对偏差不得超过算术平均值的10%。

第二法 液相色谱-质谱/质谱法

9 原理

用提取液提取试样中的喹啉黄, 经固相萃取柱净化后, 样品溶液通过色谱分离, 由流动相将目标化合物送入电喷雾离子源, 经过脱溶剂和离子化等过程, 转化为带电离子, 串联质谱多反应监测, 通过测量质谱的信号强度来测定试样溶液的目标化合物浓度, 外标法定量。

10 试剂和材料

10.1 总则

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。

10.2 试剂

同3.2

10.3 试剂配制

10.3.1 乙酸铵溶液 (0.01mol/L): 称取 0.77g 乙酸铵, 加水溶解并定容至 1000mL, 经 0.45 μ m 水相微孔滤膜过滤。

10.3.2 初始流动相: 量取 20mL 甲醇、80mL 乙酸铵溶液 (0.01mol/L) (10.3.1), 混匀。

10.3.3 其他试剂配制同 3.3。

10.4 标准品

同3.4。

10.5 标准溶液配制

10.5.1 喹啉黄储备液：同 3.5.1。

10.5.2 喹啉黄标准曲线工作液：分别取空白样品按照 12.1 处理。用所得的样品溶液将喹啉黄标准储备液逐级稀释，得到喹啉黄浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

11 仪器和设备

11.1 液相色谱-质谱/质谱（LC-MS/MS）仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

11.2 其他仪器和设备同 4.2~4.9。

12 分析步骤

12.1 试样制备

12.1.1 提取

同 5.1.1。

12.1.2 净化

同 5.1.2 操作至收集洗脱液并在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下用氮气吹干步骤结束。残留物用 1.0mL 初始流动相（10.3.2）定容，涡旋溶解，最后用水相微孔滤膜（0.45 μm ）过滤，待上机分析测定。

12.2 液相色谱-质谱/质谱测定

12.2.1 色谱参考条件

12.2.1.1 色谱柱：C₁₈ 柱或具相同性能的其他色谱柱，4.6mm \times 150mm，5 μm 。

12.2.1.2 进样量：10.0 μL 。

12.2.1.3 流动相：A-0.01mol/L 乙酸铵溶液，B-甲醇。梯度洗脱表见表 2：

表 2 梯度洗脱表

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	0.3	80.0	20.0
1.0	0.3	80.0	20.0
20.0	0.3	10.0	90.0
22.0	0.3	80.0	20.0
25.0	0.3	80.0	20.0

12.2.2 质谱条件

参见附录 B。

12.3 标准曲线的建立

将标准曲线工作液按照浓度由低到高进样检测，以喹啉黄标准工作液中的各组分的浓度为横坐标，以特征离子峰面积为纵坐标，分别绘制 QYN_{a2} I、QYN_{a2} II、QYNa I、QYNa II 的标准曲线。

注3：喹啉黄标准工作液中各组分的浓度= 喹啉黄标准曲线工作液浓度× 喹啉黄储备液中各组分的含量(w_i)。

注4：喹啉黄标准品各组分的选择离子流色谱图（MRM 图）见附录 C。

12.4 试样溶液的测定

通过液相色谱将试样溶液进行分离后注入串联四级杆质谱仪中，得到相应的保留时间及信号响应值，根据标准曲线得到相应目标化合物的浓度，平行次数不少于两次。

12.5 定性判定

进行样品测定时，如果检出的质量色谱峰保留时间与标准溶液一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比，最大允许相对偏差不超过表3中规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表 3 定性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/%	±20	±25	±30	±50

12.6 定量测定

外标法定量。待测样液中喹啉黄各组分的响应值应在标准曲线范围内。对标准工作液和样液等体积交替进样测定。

12.7 空白实验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

13 分析结果的表述

同6。

14 方法定量限和回收率

14.1 方法定量限

以信噪比不小于10 ($S/N \geq 10$) 确定喹啉黄的定量限：2.5mg/kg（或mg/L）。

14.2 回收率

在添加浓度2.5mg/kg（或mg/L）~100mg/kg（或mg/L）浓度范围内，回收率在80%~110%之间。

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%。

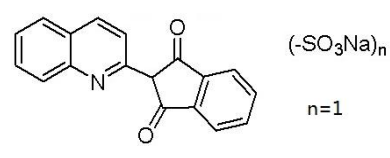
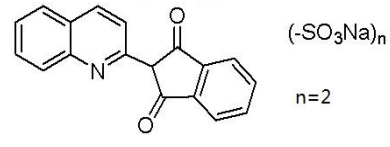
附 录 A
(规范性附录)

喹啉黄标准品及标准品各组分含量的测定

A.1 喹啉黄标准品说明

喹啉黄为2-(2-喹啉基)-茛满基-1,3-二酮单磺酸钠盐(QYNa)和2-(2-喹啉基)-茛满基-1,3-二酮二磺酸二钠盐(QYNa₂)的混合物。QYNa、QYNa₂各存在两个同分异构体,按保留时间的前后分别定义为:QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II。喹啉黄中英文名称、分子式、化学结构式、CAS号、相对分子量见表A.1。

表A.1 喹啉黄中英文名称、分子式、化学结构式、CAS号、相对分子量

序号	英文名称/中文名称/简称/分子式	化学结构式	CAS号	相对分子量
1	Sodium 2-(2-quinolylyl)-indan-1,3-dionemonosulfonates 2-(2-喹啉基)-茛满基-1,3-二酮单磺酸钠盐(QYNa) C ₁₈ H ₁₀ NNaO ₅ S		8004-92-0	375
2	Disodium 2-(2-quinolylyl)-indan-1,3-dionemonosulfonates 2-(2-喹啉基)-茛满基-1,3-二酮二磺酸二钠盐(QYNa ₂) C ₁₈ H ₉ NNa ₂ O ₈ S ₂			477

A.2 标准品中各组分含量的测定

A.2.1 方法提要

采用高效液相色谱仪对喹啉黄不同组分进行分离,峰面积归一化法进行测定。

A.2.2 液相色谱参考条件

同5.2。

A.2.3 分析步骤

开启色谱仪。待仪器各项操作条件稳定后,将喹啉黄储备液注入到液相色谱仪中,测定相应的峰面积,用色谱工作站或积分仪进行结果处理。

A.2.4 结果计算

喹啉黄储备液各组分的含量以 w_i 计,数值以%表示,按式(A.1)计算:

$$w_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A_i ——试样中各组分*i*的峰面积；

$\sum A_i$ ——试样中各组分*i*的峰面积之和。

计算结果保留三位有效数字。

平行测定结果的绝对差值不大于1.0%，取其算术平均值作为测定结果。

附 录 B

(资料性附录)

液相色谱-质谱/质谱测定参考条件

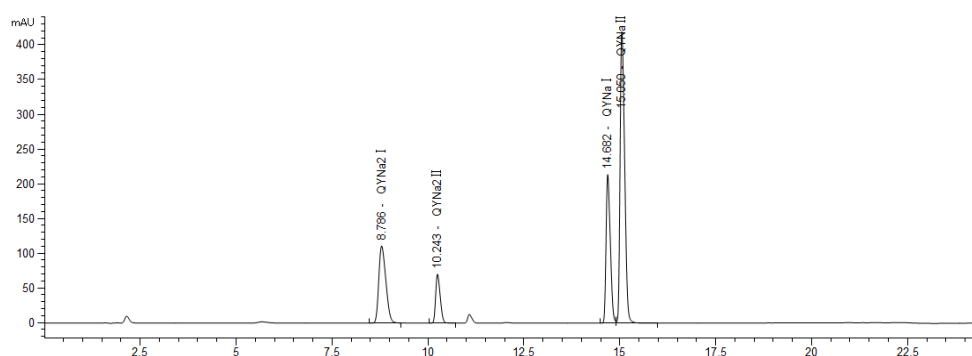
B.1 液相色谱-质谱/质谱测定参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源
- b) 扫描方式：负离子扫描
- c) 检测方式：多反应监测
- d) 毛细管电压：-4000 V
- e) 干燥气温度：300℃
- f) 干燥气流速：5 L/min
- g) 雾化气压力：45 psi
- h) 鞘气温度：250℃
- i) 鞘气流速：11 L/min
- j) 定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量，见表 B.1。

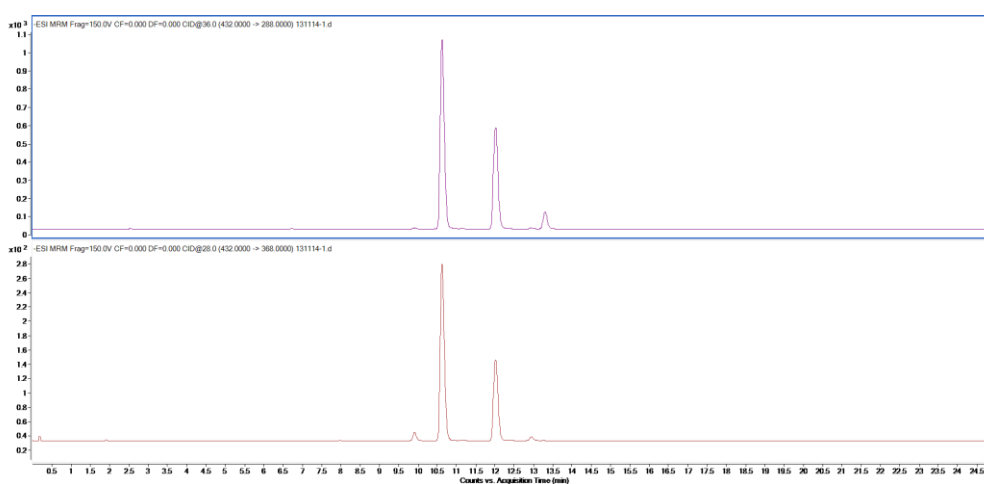
表A.2 QYNa₂ I、QYNa₂ II、QYNa I、QYNa II的定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量

名称	定性离子对 (m/z) (母离子/子离子)	定量离子对 (m/z) (母离子/子离子)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
QYNa ₂ I、QYNa ₂ II	432.0/288.0	432.0/288.0	150	36
	432.0/368.0		150	28
QYNa I、QYNa II	352.0/287.9	352.0/287.9	150	30
	352.0/244.2		150	32

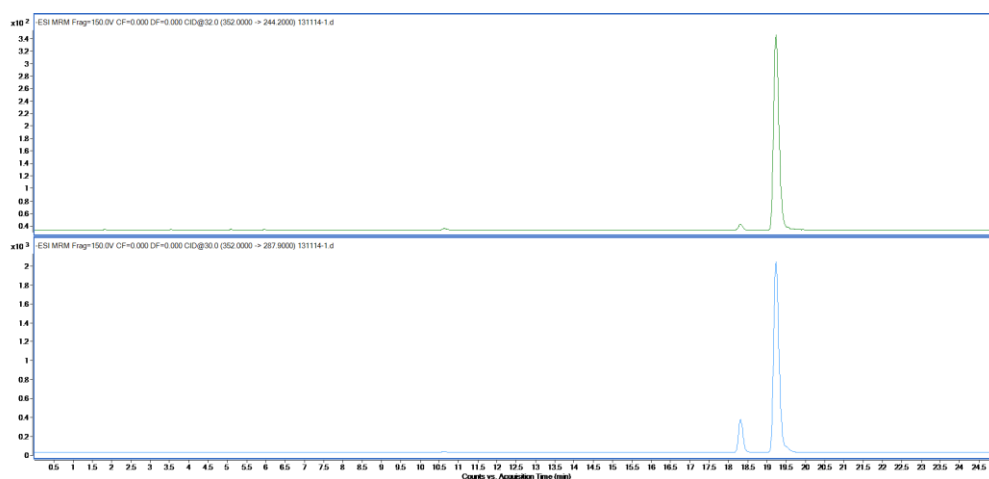
附录 C
(资料性附录)
喹啉黄标准品色谱图



图A.1 喹啉黄标准品的 HPLC 色谱图
(QYNa₂ I : 8.8 min; QYNa₂ II : 10.5 min; QYNa I : 15.1 min; QYNa II : 15.7 min)



图A.2 QYNa₂ I、QYNa₂ II 的特征离子质量色谱图
(QYNa₂ I : 10.6 min, QYNa₂ II : 12.0 min 定性离子对: 432.0/288.0, 432.0/368.0)



图A.3 QYNa I、QYNa II的特征离子质量色谱图
(QYNa I :18.3 min, QYNa II :19.2 min 定性离子对: 352.0/287.9, 352.0/244.2)