**《**超高效液相-质谱/质谱法测定食品中胭脂红酸的含量**》团体标准**

**编制说明**

**安徽省食品科学技术学会**

**2024年04月**

**一、制定本文件的背景及任务来源**

**（一）制定本文件的背景**

着色剂(色素)分为天然着色剂和人工着色剂，作为食品添加剂被广泛运用于食品工业中，几乎市面上大部分的食品都有添加。胭脂虫红作为一种天然着色剂，具有耐热性、抗光性、染色能力强、无毒等良好的性质，不仅是化妆品的高级着色剂，而且在食品加工业中同样发挥举足轻重的作用。胭脂虫红虽然是天然着色剂，但是近些年有报道称胭脂虫红可能引起哮喘患者出现过敏反应，还可能导致儿童多动症的风险，因此对于胭脂虫红的安全性要重新引起重视。在中国，《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014)规定了胭脂虫红在食品中的使用限量和使用范围，但国家标准《食品安全国家标准 食品中胭脂虫红的测定》(GB 5009.288-2023)作为新出台的检测标准，虽然填补了检测胭脂虫红标准的空白，但其前处理过程复杂，耗时过长，使用磷酸-甲醇作为洗脱液，容易造成目标物在氮气吹干过程中分解，导致回收率低，不适用于日常的检验工作，因此需要建立一套操作简单，耗时少，检测准确、灵敏的方法。目前检测胭脂红酸主要使用HPLC-DAD，但HPLC-DAD对于复杂基质的样品，检验周期长、容易误判且灵敏度不够。而UPLC-MS/MS作为技术手段不仅灵敏度高而且对于复杂基质样品有着很好得选择性，保证结果的准确性。为了加强市场监管和保障百姓食品安全，建立一套依靠UPLC-MS/MS作为技术手段，准确检验食品中胭脂红酸含量的方法具有重要意义。

**（二）任务来源**

安徽省市场监督管理局科技计划项目(编号：2023MK022)

**二、主要工作过程**

2024年3月，马鞍山市食品药品检验和药品不良反应监测中心联合安徽工业大学、纳谱分析技术（苏州）有限公司、岛津企业管理(中国)有限公司向安徽省食品科学技术学会申请进行安徽省《超高效液相-质谱/质谱法测定食品中洋红酸的技术研究及应用》立项。

2024年3月，成立了标准制定核心小组（简称制标组），由马鞍山市食品药品检验和药品不良反应监测中心刘燕主任、汪强工程师，安徽工业大学王双寿，纳谱分析技术（苏州）有限公司张勇高级工程师、岛津企业管理(中国)有限公司陈建立工程师组成，其中马鞍山市食品药品检验和不良反应监测中心刘燕主任任组长。

2024年3月-4月，制标组成员分头行动，广泛收集、整理和分析国内外胭脂红酸密切相关的标准及相关资料。

2024年4月，制标组经过多次内部统稿和修改，形成标准初稿。

2024年4月-5月，制标组召开网上研讨会，标准起草人和起草单位对形成的标准初稿进行逐字逐句研讨、修改，形成征求意见稿。

**三、制标原则**

该标准的制订坚持科学性、准确性、先进性和可操作性原则，通过该标准制定后的颁布，不仅能够帮助企业在食品加工过程中对胭脂虫红添加量的把控而且能够对日常监管起到技术支持。

**坚持科学性。**坚持在概念、定义和要求等内容的描述清楚，充分吸纳了国内外文献、标准中关于胭脂红酸的前处理方法和检测手段使得检测过程同步世界领先技术。

**坚持准确性。**既注重内容的准确，又注重文字的准确以及精炼，使该标准真正能够成为“标准”。只有坚持科学性与准确性，才能发挥标准的引领作用，促进胭脂红酸检测快速向好发展。

**坚持先进性。**目前检测胭脂红酸主要使用HPLC-DAD，但HPLC-DAD对于复杂基质的样品，检验周期长、容易误判且灵敏度不够。而UPLC-MS/MS作为技术手段不仅灵敏度高而且对于复杂基质样品有着很好得选择性，保证结果的准确性。为了加强市场监管和保障百姓食品安全，建立一套依靠UPLC-MS/MS作为技术手段，准确检验食品中胭脂红酸含量的方法具有重要意义

**坚持可操作性。**立足于实际的具体情况，增强可操作性，提高标准制订后的适用性。因此标准文本从前处理方法的筛选、色谱条件的选择、质谱参数的优化等技术参数考量，制定具体制标原则如下：

**（一）标准文本应符合现有法律法规和行业政策原则**

本规范按照GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第1部分： 标准的结构和编写规则》的要求编写。编制遵循“先进性、实用性、统一性”的原则，尽可能与国家标准接轨，注重了标准的可操作性，确保本规程能在全省乃至全国实施。

本标准严格执行、引用的强制性标准有：

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

**（二）关注检测中重要技术要求的原则**

本检测方法对于前处理中SPE小柱的选择，色谱分离优化、质谱条件的选择上是其需要关注的重点。因此，标准中应对检测技术层面有具体关键点的要求。

**（三）明确适用范围原则**

《超高效液相-质谱/质谱法测定食品中胭脂红酸的含量》适用于食品中胭脂红酸含量的测定。

**四、标准内容说明**

本文件由范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、测定、平行试验、空白试验、分析结果的表述、精密度、其它组成。

**1、范围**

本文件规定了食品中胭脂红酸的超高效液相色谱-质谱/质谱的测定方法。

本文件适用于烘焙食品、肉制品、果冻中胭脂红酸含量的测定。

**2、规范性引用文件**

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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试验方法

**3、术语和定义**

本文件没有需要界定的术语和定义。

1. **试验（或验证）情况**

**5.1分析步骤：**

1、提取

准确称取2g均质后的样品(精确至0.0001g)于50mL离心管中，加入10mL石油醚，涡旋3min，10000r•min-1 离心10min，弃去上清液，加入20mL，2mol•L-1盐酸水溶液涡旋混匀后，在沸水浴中加热30min，每隔5min振摇一下。加热完成后取出冷却至室温，涡旋混匀5min，超声提取10min，10000r•min-1 离心10min，将上清液移入100mL容量瓶中。再加入20mL，2mol•L-1盐酸水溶液至上述离心后的固体试样中，涡旋混匀5min，超声提取10min，10000r•min-1 离心10min，将上清液合并到上述100mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。

2、净化

准确移取10mL提取液，至活化后的HLB固相萃取柱中，再用12mL水淋洗，最后用9mL甲醇洗脱。洗脱液在40℃水浴中氮气吹干，使用1.0mL，2%甲酸水溶液-甲醇(1+1，v/v)进行复溶，复溶液经过10000r•min-1离心5min后，供UPLC-MS/MS上机测定。

5.2色谱条件

色谱柱：C18，150mm×3.0mm，粒径3μm；柱温：35℃；流速：0.5mL•min-1；进样体积：10μL；流动相A：0.3%甲酸水溶液；流动相B：甲醇；梯度洗脱程序见表1

表1 梯度洗脱程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间t/min | 流动相A/% | 流动相B/% |
| 0.0 | 90 | 10 |
| 8.00 | 5 | 95 |
| 13.00 | 5 | 95 |
| 13.01 | 90 | 10 |
| 16.00 | 90 | 10 |

5.3质谱条件

表2 MS/MS设置参数

|  |  |
| --- | --- |
| 扫描模式 | 负离子模式 |
| 监测模式 | MRM |
| 电喷雾电压 | -4500V |
| 离子源温度 | 650℃ |
| 雾化气压 | 55psi |
| 辅助气压 | 55psi |
| 气帘气压力 | 40psi |
| 碰撞气压力 | 9psi |

表3 胭脂红酸的质谱参数

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 保留时间(min) | 母离子m/z | 子离子m/z | DP(V) | CE(eV) |
| 胭脂红酸 | 4.73 | 491.1 | 447.1  357.1 | -98 | -29.91  -38.21 |

表4 胭脂红酸的回收实验结果(n=6)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品名称 | 加标量  (ng•g-1) | 测定值  -1(ng•g-1) | 测定值-2(ng•g-1) | 测定值-3(ng•g-1) | 测定值-4(ng•g-1) | 测定值-5(ng•g-1) | 测定值-6(ng•g-1) | 相对标准偏差(%) | 平均测定值(ng•g-1) | 回收率  (%) |
| 桂花糕 | 100.0 | 90.5 | 91.3 | 91.5 | 91.9 | 90.1 | 91.1 | 0.7 | 91.1 | 91.1 |
| 250.0 | 227.5 | 239.2 | 243.0 | 241.5 | 239.8 | 242.5 | 2.4 | 238.9 | 95.6 |
| 蛋糕 | 100.0 | 92.1 | 91.4 | 90.9 | 92.3 | 91.5 | 92.4 | 0.6 | 91.8 | 91.8 |
| 250.0 | 243.8 | 239.5 | 240.8 | 242.8 | 238.0 | 244.0 | 1.0 | 241.5 | 96.6 |
| 绿豆糕 | 100.0 | 93.1 | 94.5 | 93.5 | 95.3 | 94.1 | 94.2 | 0.8 | 94.1 | 94.1 |
| 250.0 | 245.2 | 243.8 | 245.8 | 242.8 | 246.5 | 244.2 | 0.6 | 244.7 | 97.9 |
| 桃酥 | 100.0 | 94.4 | 95.2 | 94.2 | 95.6 | 95.1 | 96.1 | 0.8 | 95.1 | 95.1 |
| 250.0 | 244.2 | 246.2 | 242.8 | 245.5 | 247.0 | 243.5 | 0.7 | 244.9 | 98.0 |
| 香肠 | 100.0 | 92.1 | 91.5 | 92.5 | 91.1 | 92.7 | 91.3 | 0.7 | 91.9 | 91.9 |
| 250.0 | 240.5 | 241.8 | 239.5 | 241.5 | 240.5 | 240.0 | 0.4 | 240.6 | 96.2 |
| 果冻 | 100.0 | 94.2 | 95.7 | 94.5 | 95.3 | 95.9 | 94.8 | 0.71 | 95.1 | 95.1 |
| 250.0 | 243.7 | 245.2 | 243.0 | 246.8 | 247.2 | 246.5 | 0.70 | 245.4 | 98.2 |

**五、预期达到的经济和社会效果**

本文件的实施将大大提高胭脂红酸的检出，弥补《食品安全国家标准 食品中胭脂虫红的测定》(GB 5009.288-2023)中前处理方法中的不足，保证结果的准确性，降低假阳性的存在。帮助企业在食品加工过程中对胭脂虫红添加量的把控，而且能够加强日常监管，为消费者提供安全放心的产品，从而保护消费者利益。

**六、与国内对比情况**

《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014)规定了胭脂虫红在食品食品中的使用限量，目前《食品安全国家标准 食品中胭脂虫红的测定》(GB 5009.288-2023)作为新出台的检测标准，虽然填补了检测胭脂虫红标准的空白，但其前处理过程复杂，耗时过长，使用磷酸-甲醇作为洗脱液，容易造成目标物在氮气吹干过程中分解，导致回收率低，不适用于日常的检验工作。目前国内外检测洋红酸主要依靠HPLC-DAD作为技术手段。HPLC-DAD对于复杂基质的样品，容易误判且灵敏度不够。因此开发灵敏度高且选择性好的UPLC-MS/MS作为新的检测手段，进行食品中的检测。不仅填补我国对于食品中洋红酸检测标准的空白，同时也加强了市场监管，保障了百姓的食品安全。

**七、与现行相关法律法规和强制性标准的关系**

本文件符合中国现行相关法律、法规，不违背我国现行强制性标准要求。对比《食品安全国家标准 食品中胭脂虫红的测定》(GB 5009.288-2023)，团体标准在试剂种类、操作流程、检出限、定量限要求方面均达到或优于国家相关标准的要求。

**八、分歧意见的处理经过和依据**

无

**九、贯彻标准的要求和措施建议**

本文件经批准发布后即开始实施，由安徽工业大学、纳谱分析技术（苏州）有限公司、岛津企业管理(中国)有限公司安向相关厂家和检测单位发放电子版和纸质版标准文本，重点贯彻标准内容。通过对标准的贯彻，让广大检测单位和厂家普遍悉知该标准的主要内容，熟练掌握了标准中规定的检测方法，并应用到实际中。

**十、其它应予说明的事项**

无