



中华人民共和国国家标准

GB 1886.361—2022

食品安全国家标准 食品添加剂 叶绿素铜

2022-06-30 发布

2022-12-30 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品添加剂 叶绿素铜

1 范围

本标准适用于以蚕沙或草类(如高羊茅、紫花苜蓿、苜蓿等)、螺旋藻等植物为原料提取叶绿素,或者直接以叶绿素为原料,再经铜代反应制得食品添加剂叶绿素铜。使用溶剂为丙酮、二氯甲烷、甲醇、乙醇、异丙醇、正己烷和(或)石油醚(沸程为 90 °C~120 °C)。

2 分子式和相对分子质量

2.1 分子式

叶绿酸铜 a($C_{55}H_{72}CuN_4O_5$)

叶绿酸铜 b($C_{55}H_{70}CuN_4O_6$)

2.2 相对分子质量

叶绿酸铜 a:932.75(按 2018 年国际相对原子质量)

叶绿酸铜 b:946.73(按 2018 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	青绿色至深绿色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘中,在自然光线下观察其色泽和状态
状态	蜡状或胶状固体	

3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目	指标	检验方法
叶绿素含量, $w/\%$	\geq 10.0	附录 A 中 A.3
总铜(Cu), $w/\%$	\leq 8.0	附录 A 中 A.4

表 2 (续)

项 目	指 标	检 验 方 法
游离铜(Cu), w/%	≤ 0.02	附录 A 中 A.5
溶剂残留 ^a		
二氯甲烷/(mg/kg)	≤ 10	附录 A 中 A.6
甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷总和/(mg/kg)	≤ 100	
铅(Pb)/(mg/kg)	≤ 3.0	GB 5009.75 或 GB 5009.12
砷(As)/(mg/kg)	≤ 3.0	GB 5009.76 或 GB 5009.11
汞(Hg)/(mg/kg)	≤ 1.0	GB 5009.17
镉(Cd)/(mg/kg)	≤ 1.0	GB 5009.15
<p>注：商品化的叶绿素铜应以符合本标准的叶绿素铜为原料，可添加食用植物油、糊精、食用淀粉等食品辅料和/或符合食品添加剂质量规格要求的乳化剂、酸度调节剂等，其含量符合声称值，形态可以是粉末、蜡状或液体。</p>		
<p>^a 根据产品实际使用的溶剂，测定相应溶剂残留(使用石油醚测定正庚烷)。</p>		

附录 A

检验方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水在未注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 规定的三级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品在未注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.2 鉴别试验

A.2.1 最大吸收峰及吸光度比值范围

取 A.3.3.1 叶绿素含量测定中的试样溶液,在 $405\text{ nm}\pm 3\text{ nm}$ 和 $635\text{ nm}\pm 5\text{ nm}$ 的两个波长范围内均有最大吸收峰,且两处测得的吸光度比值在 3.2~4.0 之间。

A.2.2 铜离子试验

A.2.2.1 试剂和材料

A.2.2.1.1 硫酸。

A.2.2.1.2 盐酸溶液:1+3。

A.2.2.1.3 二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液:1 g/L。

A.2.2.2 分析步骤

取 1 g 试样,置于已在 $800\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灼烧至恒重的坩埚中,缓缓加热直至试样完全炭化。将炭化的试样冷却,用 0.5 mL~1 mL 硫酸润湿残渣,继续加热至硫酸蒸汽逸尽,并在 $800\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的高温炉中灼烧残渣至恒重。在残渣中加入 10 mL 盐酸溶液,在水浴上加热溶解,过滤后补充水至 10 mL。取 5 mL 上述溶液,加入 0.5 mL 二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液,产生红褐色沉淀。

A.3 叶绿素含量的测定

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 无水乙醚。

A.3.1.2 磷酸氢二钠溶液(0.15 mol/L):称取 53.7 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$),加水溶解,稀释定容至 1 000 mL。

A.3.1.3 磷酸二氢钾溶液(0.15 mol/L):称取 20.4 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加水溶解,稀释定容至 1 000 mL。

A.3.1.4 磷酸盐缓冲液(pH 7.5):分别量取磷酸氢二钠溶液(0.15 mol/L)与磷酸二氢钾溶液(0.15 mol/L)按体积比 21:4 混合。

A.3.1.5 A 液:氯化铜-甲醇溶液(5%)。

A.3.1.6 B 液:氢氧化钠-甲醇溶液(10%)。

A.3.2 仪器和设备

A.3.2.1 分光光度计。

A.3.2.2 恒温水浴。

A.3.2.3 分液漏斗(250 mL)。

A.3.3 分析步骤

A.3.3.1 试样溶液的制备

称取 1 g 试样,精确至 0.000 2 g,置于锥形瓶中,加 50 mL~60 mL 无水乙醚溶解。加入 A 液 1 mL,在 50 °C±2 °C 恒温水浴中加热回流 15 min,取下再加入 B 液 2 mL,摇匀,继续在 50 °C±2 °C 恒温水浴中加热回流 20 min,整个过程间断振摇,保证反应完全。反应后取下锥形瓶后冷却,加入少量水,摇匀,移入分液漏斗中,再用适量水分次洗涤锥形瓶,洗液一并移入分液漏斗中,充分振摇后至少静置 1 h。

分液漏斗中的液体分层后,将下层液体过滤,注意界面层留在分液漏斗中,不要过滤下来,以免堵塞滤纸。过滤完毕,用水冲洗上层乙醚层和界面,直至洗出的水层无色,洗液并入下层滤液,弃掉上层乙醚层和界面。滤纸用水洗涤数次至近乎无色,洗液并入下层滤液。全部滤液保留。

将滤液移入另一分液漏斗中,用 40 mL 无水乙醚振摇洗涤后,静置 15 min,将下层液体移入 250 mL 容量瓶中用水稀释定容,弃掉上层乙醚层。取 1 mL 上述溶液,用磷酸盐缓冲液(pH 7.5)稀释定容至 50 mL,摇匀。

A.3.3.2 测定

取试样溶液置于 1 cm 比色皿中,以磷酸盐缓冲液(pH 7.5)做空白对照,用分光光度计在 405 nm±3 nm 波长范围内的最大吸收波长处测定吸光度。

A.3.4 结果计算

叶绿素含量的质量分数 w_1 按式(A.1)计算。

$$w_1 = \frac{A \times 12\,500}{565 \times 100 \times m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

A ——试样溶液的吸光度值;

m ——试样的质量,单位为克(g);

12 500 ——体积换算系数;

565 ——1 cm 比色皿中浓度为 1%(100 mL 溶剂含 1 g 叶绿素)的溶液消光值;

100 ——浓度换算系数。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 5.0%。

A.4 总铜(Cu)的测定

A.4.1 试剂和材料

同 GB 5009.13。

A.4.2 仪器和设备

同 GB 5009.13。

A.4.3 试样处理

A.4.3.1 微波消解

称取 0.2 g~0.5 g,精确至 0.000 2 g,置于微波消解罐中,加入 5 mL 硝酸,按照微波消解的操作步骤消解试样,消解条件参考 B.1。冷却后取出消解罐,于 120 °C~140 °C 赶酸至 1 mL 左右。消解罐放冷后,将消化液转移至 25 mL 容量瓶中,用少量二级水洗涤消解罐 2 次~3 次,合并洗涤液于容量瓶中,用二级水定容至刻度,混匀备用。同时做试剂空白试验。

A.4.3.2 干法灰化

称取 0.1 g 试样,精确至 0.000 2 g,于坩埚中小火加热,炭化至无烟,转移至 550 °C 马弗炉中,灰化 3 h~4 h,冷却后取出。对于灰化不彻底的试样,加数滴硝酸,小火加热,小心蒸干,再转入 550 °C 马弗炉中,继续灰化 1 h~2 h,至试样呈白灰状,冷却后取出。用适量硝酸溶液(1+1)溶解并用水定容至 10 mL,混匀备用。同时做空白试验。

A.4.4 分析步骤

除试样处理外,其余步骤按 GB 5009.13 规定的方法测定。

A.5 游离铜(Cu)的测定

A.5.1 试剂和材料

同 GB 5009.13。

A.5.2 仪器和设备

同 GB 5009.13。

A.5.3 试样处理

称取 0.1 g 试样,精确至 0.000 2 g,置于锥形瓶中,加 20 mL 无水乙醚溶解,再加入 100 mL 水,盖塞,振摇 1 min,移入 125 mL 分液漏斗中,静置 30 min。将分液漏斗中的下层液体用双层滤纸过滤,如滤液有颜色,再次用双层滤纸过滤,直至滤液无色,滤液即为试样液。

A.5.4 分析步骤

除试样处理外,其余步骤按 GB 5009.13 规定的方法测定。

A.6 溶剂残留(二氯甲烷、甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷)的测定

A.6.1 试剂和材料

A.6.1.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

A.6.1.2 待测组分标准品:二氯甲烷、甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷,色谱纯。

A.6.1.3 内标物:3-甲基-2-戊酮,色谱纯。

A.6.1.4 *N*-甲基吡咯烷酮。

A.6.2 仪器和设备

气相色谱仪:配备氢火焰离子化检测器(FID)和顶空进样器。

A.6.3 参考色谱条件

A.6.3.1 色谱柱:石英毛细管柱(ϕ 0.53 mm \times 30 m),涂层为二甲基聚硅氧烷,厚度为 5 μ m,或同等性能的色谱柱。

A.6.3.2 载气:氮气。

A.6.3.3 载气流速:5 mL/min。

A.6.3.4 柱温:35 $^{\circ}$ C保持 5 min,以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 90 $^{\circ}$ C,保持 6 min。

A.6.3.5 进样口温度:140 $^{\circ}$ C。

A.6.3.6 检测器温度:300 $^{\circ}$ C。

A.6.3.7 进样量:1.0 mL。

A.6.4 参考顶空进样条件

A.6.4.1 试样加热温度:60 $^{\circ}$ C。

A.6.4.2 试样加热时间:10 min。

A.6.4.3 注射器温度:90 $^{\circ}$ C。

A.6.4.4 传质温度:100 $^{\circ}$ C。

A.6.5 分析步骤

A.6.5.1 内标溶液的制备

移取 50.0 mL 水至一个 50 mL 进样瓶中,称重进样瓶,精确至 0.000 1 g。移取 15 μ L 3-甲基-2-戊酮,将其注入进样瓶,混匀,再称重进样瓶,精确至 0.01 g。

A.6.5.2 空白溶液的制备

分别量取 5.0 mL 水和 1.0 mL 内标溶液,移入顶空瓶中,移取 20 μ L *N*-甲基吡咯烷酮,将其注入顶空瓶,封盖,60 $^{\circ}$ C加热 10 min 并剧烈振摇,混匀。

A.6.5.3 标准溶液的制备

分别量取 5.0 mL 水和 1.0 mL 内标溶液,移入顶空瓶中,称取 10 mg 待测组分标准品(对每个溶剂分别分析),用 *N*-甲基吡咯烷酮溶解稀释定容至 100 mL,移取 20 μ L 注入顶空瓶,封盖,60 $^{\circ}$ C加热 10 min 并剧烈振摇,混匀。

A.6.5.4 试样溶液的制备

称取 0.2 g 试样,精确至 0.000 1 g,置于顶空瓶中,加入 5.0 mL 水和 1.0 mL 内标溶液,移取 20 μ L *N*-甲基吡咯烷酮,将其注入顶空瓶,封盖,60 $^{\circ}$ C加热 10 min 并剧烈振摇,混匀。

A.6.5.5 测定

在 A.6.3 和 A.6.4 参考操作条件下,分别对空白溶液、标准溶液和试样溶液顶空处理后进行色谱分析。试样溶液中溶剂残留的参考气相色谱图见图 C.1。

A.6.6 结果计算

A.6.6.1 校准因子 f_i

校准因子 f_i 按式(A.2)计算。

$$f_i = \frac{m_i \times 50}{m_s \times (A_i - A_g)} \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

m_i ——标准溶液中待测组分的质量,单位为毫克(mg)；

50 ——质量换算系数；

m_s ——标准溶液中内标物的质量,单位为毫克(mg)；

A_i ——标准溶液色谱图中待测组分峰面积与内标物峰面积的比值；

A_g ——空白溶液色谱图中待测组分峰面积与内标物峰面积的比值。

A.6.6.2 待测组分含量

试样中待测组分(二氯甲烷、甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷)的含量 w_i ,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(A.3)计算。

$$w_i = \frac{A_i \times m_0 \times f_i \times 1\,000}{m \times 50} \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

A_i ——试样溶液色谱图中待测组分峰面积与内标物峰面积的比值；

m_0 ——内标溶液中内标物的质量,单位为毫克(mg)；

f_i ——校准因子；

1 000 ——质量换算系数；

m ——试样的质量,单位为克(g)；

50 ——体积换算系数。

由式(A.3)计算得到二氯甲烷的含量为 w_2 , 甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷的含量分别为 w_3 、 w_4 、 w_5 、 w_6 , 四者之和即为试样中甲醇、异丙醇、正己烷、正庚烷总和。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10.0%。

附 录 B
微波消解升温程序

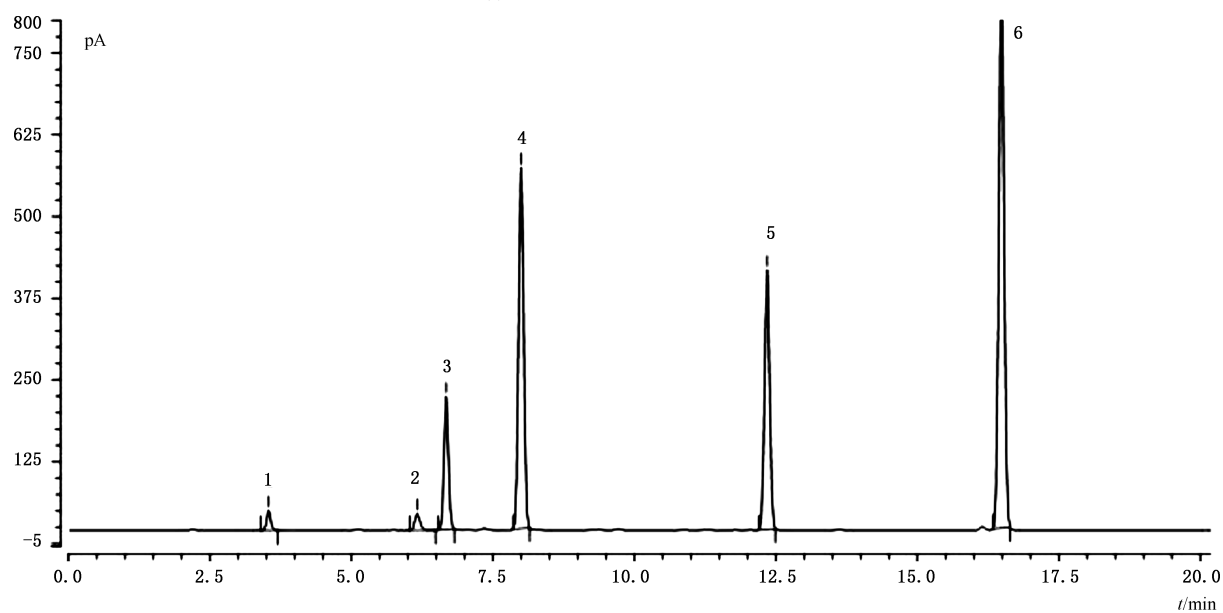
微波消解升温程序见表 B.1。

表 B.1 微波消解升温程序

步骤	设定温度/℃	升温时间/min	恒温时间/min
1	120	5	5
2	160	5	10
3	180	5	20

附录 C
试样溶液中溶剂残留的参考气相色谱图

试样溶液中溶剂残留的参考气相色谱图见图 C.1。



说明：

- 1——甲醇；
- 2——异丙醇；
- 3——二氯甲烷；
- 4——正己烷；
- 5——正庚烷；
- 6——内标物(3-甲基-2-戊酮)。

图 C.1 试样溶液中溶剂残留的参考气相色谱图