



中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准
食品添加剂 叶绿素铜

(征求意见稿)

201×-××-××发布

201×-××-××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、紫花苜蓿、苧麻、菠菜等植物为原料提取叶绿素，或者直接以叶绿素为原料，再与氯化铜反应制得的食品添加剂叶绿素铜。使用溶剂为丙酮、二氯甲烷、甲醇、乙醇、正己烷和（或）正庚烷。

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2016年国际相对原子质量)

叶绿酸铜b: 946.73 (按2016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	附录 A 中 A.3
总铜 (Cu), w/%	\leq 8.0	附录 A 中 A.4
游离铜 (Cu), w/%	\leq 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、正己烷、正庚烷/ (mg/kg) ≤	200		
铅 (Pb) / (mg/kg) ≤	5		GB 5009.75 或 GB 5009.12
砷 (As) / (mg/kg) ≤	3		GB 5009.76 或 GB 5009.11
<p>^a 根据产品实际使用的溶剂，测定相应溶剂残留。</p> <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，可添加葵花籽油等食品辅料，其含量符合声称值，形态可以是粉末或液体。</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 nm±3 nm和635 nm±5 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 °C±25 °C下灼烧至恒重的坩埚中，缓缓加热直至试样完全碳化。将碳化的试样冷却，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 °C±25 °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（Na₂HPO₄·12H₂O），加水溶解，稀释定容至1000 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（KH₂PO₄），加水溶解，稀释定容至1000 mL。

A.3.1.4 磷酸盐缓冲液（pH 7.5）：磷酸氢二钠溶液（0.15 mol/L）与磷酸二氢钾溶液（0.15 mol/L）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。

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0.0002 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：

$$w_1 = \frac{A \times 12500}{565 \times m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A——试样溶液的吸光度值；

m——试样的质量，单位为克（g）；

12500——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。

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2.0 %。

A. 4 总铜（Cu）的测定

A. 4.1 试样处理

称取0.1 g试样（精确至0.0002 g），置于硅皿中，在不超过500 °C下灼烧至无碳，用1滴~2滴硫酸湿润，再次灰化。用质量分数为10%的盐酸溶液分三次（每次5 mL）煮沸溶解灰分，过滤。冷却后用水定容至100 mL。

A. 4.2 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 试样处理

称取0.1 g试样（精确至0.0002 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过滤，直至滤液无色。

A. 5.2 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、正己烷、正庚烷）的测定

A. 6.1 试剂和材料

- A. 6.1.1 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、正己烷、正庚烷，色谱纯。
- A. 6.1.3 空白试样：含极少溶剂的试样。
- A. 6.1.4 内标物：3-甲基-2-戊酮，色谱纯。
- A. 6.1.5 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×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：氦气。
- 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：70 $^{\circ}$ C。
- A. 6.4.4 传质温度：80 $^{\circ}$ C。

A. 6.5 分析步骤

A. 6.5.1 内标溶液的制备

移取50.0 mL水到一个50 mL进样瓶中，封盖，称重进样瓶，精确至0.0001 g。移取15 μ L 3-甲基-2-戊酮，通过隔片将其注入进样瓶中，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

称取0.2 g空白试样（精确至0.0001 g），置于顶空瓶中，再加入5.0 mL水和1.0 mL内标溶液，移取20 μ L N-甲基吡咯烷酮，通过隔片将其注入顶空瓶中，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

称取0.2 g空白试样（精确至0.0001 g），置于顶空瓶中，加入5.0 mL水和1.0 mL内标溶液，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通过隔片注入顶空瓶中，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0.0001 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，通过隔片将其注入顶空瓶中，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。

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:

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

式中:

m_i ——标准溶液中待测组分 (注入顶空瓶中) 的质量, 单位为毫克 (mg);

m_s ——标准溶液中内标物的质量, 单位为毫克 (mg);

A_f ——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;

50——质量换算系数。

A. 6. 6. 2 待测组分含量

试样中待测组分 (二氯甲烷、甲醇、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:

$$w_i = \frac{A_i \times m_0 \times f_i \times 1000}{m \times 50} \dots\dots\dots (A.3)$$

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;

m ——试样的质量, 单位为克 (g);

1000——质量换算系数;

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、正己烷、正庚烷的含量分别为 w_3 、 w_4 、 w_5 , 三者之和即为试样中溶剂残留 (甲醇、正己烷、正庚烷) 的含量。

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2.0%。