

BJS

食品补充检验方法

BJS 202109

畜肉及内脏中肾上腺素、3,4-二羟基
扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的测定

2021-07-28 发布

国家市场监督管理总局 发布

畜肉及内脏中肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的测定

1 范围

本方法规定了畜肉组织及内脏中肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸残留量的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于畜肉组织及内脏中肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的定性确证和定量测定。

2 原理

样品经甲酸-乙腈溶液提取,固相萃取柱净化。采用高效液相色谱-串联质谱仪检测,内标法定量。

3 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明外均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

3.1.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。

3.1.3 盐酸(HCl)。

3.1.4 乙腈(CH_3CN)。

3.2 试剂配制

3.2.1 0.2%甲酸溶液:移取甲酸(3.1.2)2 mL,加水稀释至1 000 mL,混匀。

3.2.2 甲酸-乙腈溶液(20+80,体积比):量取200 mL 0.2%甲酸溶液(3.2.1)和800 mL 乙腈(3.1.4),混匀。

3.2.3 乙腈溶液(80+20,体积比):量取80 mL 乙腈(3.1.4)和20 mL 水,混匀。

3.2.4 0.01%甲酸溶液:移取甲酸(3.1.2)0.1 mL 至1 000 mL 容量瓶中,用水定容,混匀。

3.2.5 0.1 mol/L 盐酸溶液:在烧杯中加入80 mL 水,移取0.85 mL 盐酸(3.1.3)于烧杯中,混匀稀释至100 mL。

3.3 标准品及内标

标准品肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸、肾上腺素-d₃、3,4-二羟基扁桃酸-d₃、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸-d₃的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量见附录A中表A.1,纯度均 $\geq 98\%$ 。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液

3.4.1.1 肾上腺素储备液:称取肾上腺素标准品(3.3)10 mg(精确至0.000 1 g),置于25 mL 烧杯中,加

入 0.5 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液(3.2.5)及 10 mL 乙腈溶液(3.2.3),溶解后转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.1.2 3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸储备液:分别称取 3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸标准品(3.3)10 mg(精确至 0.000 1 g),分别置于 25 mL 烧杯中,加入 10 mL 乙腈溶液(3.2.3)溶解,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 内标储备液

3.4.2.1 称取肾上腺素-d3 标准品(3.3)10 mg(精确至 0.000 1 g),置于 25 mL 烧杯中,加入 0.5 mL 0.1 mol/L 的盐酸溶液(3.2.5)及 10 mL 乙腈溶液(3.2.3),溶解后转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2.2 分别称取 3,4-二羟基扁桃酸-d3、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸-d3 标准品(3.3)10 mg(精确至 0.000 1 g),分别置于 25 mL 烧杯中,加入 10 mL 乙腈溶液(3.2.3)溶解,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.3 混合标准中间液

分别准确移取肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸标准储备液(3.4.1)1.00 mL、2.00 mL、0.500 mL 置 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液定容,摇匀,配制成质量浓度分别为 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 3 个月。

3.4.4 混合内标中间液

分别准确移取肾上腺素-d3、3,4-二羟基扁桃酸-d3、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸-d3 内标储备液(3.4.2)1.00 mL、5.00 mL、1.00 mL 置 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶液(3.2.3)定容,摇匀,配制成质量浓度分别为 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合内标中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 3 个月。

3.4.5 标准工作溶液

分别准确移取一定量的混合标准中间液(3.4.3)和混合内标中间液(3.4.4),用 0.01%甲酸溶液(3.2.4)稀释,肾上腺素质量浓度依次为:10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL;肾上腺素内标质量浓度为 20.0 ng/mL;3,4-二羟基扁桃酸质量浓度依次为:20.0 ng/mL、40.0 ng/mL、80.0 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL;3,4-二羟基扁桃酸内标质量浓度为 100 ng/mL;4-羟基-3-甲氧基扁桃酸质量浓度依次为:5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL;4-羟基-3-甲氧基扁桃酸内标质量浓度为 20.0 ng/mL。标准工作溶液现用现配。

注:可根据仪器的灵敏度及样品中肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的实际含量确定标准工作溶液的浓度。

3.5 耗材

3.5.1 固相萃取柱:填料为反相混合型 *N*-乙炔吡咯烷酮二乙炔基苯聚合物,500 mg/6 mL,或性能相当者。

3.5.2 微孔滤膜:有机相,0.22 μm 。

4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱-串联质谱仪: 配电喷雾离子源(ESI)。
- 4.2 高速冷冻离心机: 转速 $\geq 12\ 000$ r/min。
- 4.3 固相萃取装置。
- 4.4 涡漩混合器。
- 4.5 超声波清洗仪。
- 4.6 氮吹仪。
- 4.7 电子天平: 感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 4.8 组织粉碎机。

5 测定步骤

5.1 试样的制备与保存

取肌肉组织或内脏, 用组织粉碎机粉碎为糜状或浆状后得到试样, $-18\ ^\circ\text{C}$ 及以下保存。

5.2 试样的处理

5.2.1 提取

称取试样 2.5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 具盖离心管中, 加入 100.0 μL 混合内标中间液(3.4.4), 加入 9.5 mL 甲酸-乙腈溶液(3.2.2), 加盖后涡漩 1 min, 超声提取 20 min, 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 10 mL 比色管中, 用甲酸-乙腈溶液(3.2.2)定容至刻度, 待净化。

5.2.2 净化

取 5 mL 上清液过固相萃取柱(3.5.1), 收集滤液于接收管中, 准确移取 2.00 mL 滤液于另一接收管中, $40\ ^\circ\text{C}$ 条件下氮气吹至近干, 加入 0.01% 甲酸溶液(3.2.4)1.00 mL, 涡漩 0.5 min 溶解残渣, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜, 供测定。

5.3 高效液相色谱-串联质谱测定

5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: AQ C_{18} 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 或性能相当者;
- b) 流动相: A 为乙腈(3.1.1), B 为 0.01% 甲酸溶液(3.2.4), 梯度洗脱程序见表 1;

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	2.0	98.0
2.00	20.0	80.0
3.00	80.0	20.0
4.00	80.0	20.0
4.10	2.0	98.0
6.00	2.0	98.0

- c) 柱温:30 ℃;
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 进样量:2 μ L。

5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 扫描方式:正离子扫描/负离子扫描;
- b) 采集方式:多反应离子监测(MRM);
- c) 电离电压:4.5 kV/−4.5 kV;
- d) 脱溶剂温度:550 ℃;
- e) 定性离子对、定量离子和碰撞能量见表 2。

表 2 待测物质的母离子、子离子、碰撞能量和扫描方式

中文名称	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量/V	扫描方式
肾上腺素	184.1	107.1 ^a ;166.1	28;14	正离子
肾上腺素内标	187.1	107.1	28	正离子
3,4-二羟基扁桃酸	183.0	137.0 ^a ;183.0	−26;−10	负离子
3,4-二羟基扁桃酸内标	186.0	140.0	−26	负离子
4-羟基-3-甲氧基扁桃酸	197.0	137.1 ^a ;197.0	−30;−10	负离子
4-羟基-3-甲氧基扁桃酸内标	200.0	137.0	−30	负离子
^a 定量离子。				

5.4 标准曲线的制作

将标准工作溶液(3.4.5)由低到高进样检测,以被测组分浓度为横坐标,被测组分色谱峰面积与对应内标色谱峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程。

5.5 试样分析

5.5.1 定性测定

将试样溶液(5.2),按仪器参考条件(5.3)进行测定,试样中目标化合物保留时间与混合标准工作溶液中目标化合物保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内;所监测定性离子均存在($S/N \geq 3$),试样中所选择的监测离子对的相对丰度与浓度相当混合标准工作溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样中存在该组分。

表 3 定性确证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
允许的最大偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

5.5.2 定量测定

根据标准曲线得到试样测定溶液中待测组分的浓度,试样待测液响应值均应在仪器测定的线性范

围内。肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸及其内标肾上腺素-d3、3,4-二羟基扁桃酸-d3、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸-d3 标准品多反应监测(MRM)色谱图见附录 B 中图 B.1。

5.6 空白试验

除不加试样外,均按 5.2 步骤操作。

6 结果计算

试样中各待测组分的残留量按式(1)计算:

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times \frac{V_2}{V_1} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 试样测定溶液中各待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- ρ_0 —— 空白试样溶液中各待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的取样量,单位为克(g);
- V_2 —— 甲酸-乙腈溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 移取滤液体积,单位为毫升(mL);
- 1 000—— 换算系数。

计算结果需扣除空白值,测定结果以平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

7 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 15%。

8 其他

肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的检出限分别为:10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的定量限分别为:20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

肾上腺素在 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3,4-二羟基扁桃酸在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加浓度范围的回收率为 80.0%~120%。

附录 A

(资料性)

标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量

标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	肾上腺素	Epinephrine	51-43-4	$C_9H_{13}O_3N$	183.20
2	肾上腺素内标	Epinephrine-d3	1217733-17-9	$C_9H_{10}D_3O_3N$	186.22
3	3,4-二羟基扁桃酸	3,4-Dihydroxymandelic Acid	775-01-9	$C_8H_8O_5$	184.15
4	3,4-二羟基扁桃酸内标	3,4-Dihydroxymandelic Acid-d3	2124275-75-6	$C_8H_5D_3O_5$	187.16
5	4-羟基-3-甲氧基扁桃酸	4-Hydroxy-3-methoxymandelic Acid	55-10-7	$C_9H_{10}O_5$	198.17
6	4-羟基-3-甲氧基扁桃酸内标	4-Hydroxy-3-methoxymandelic Acid-d3	74495-70-8	$C_9H_7D_3O_5$	201.19

附录 B

(资料性)

标准品多反应监测(MRM)色谱图

标准品多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

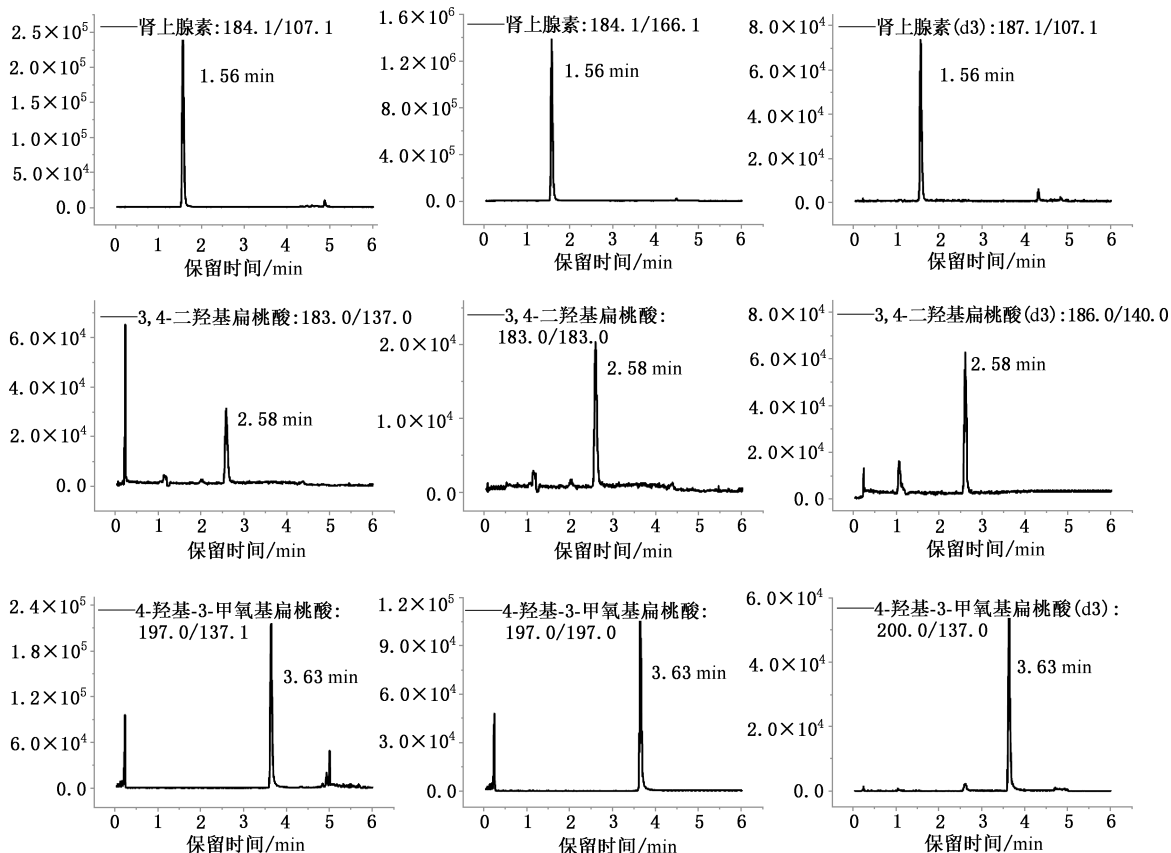


图 B.1 标准品多反应监测(MRM)色谱图

本方法负责起草单位:中国肉类食品综合研究中心。

本方法验证单位:北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所)、中国食品药品检定研究院、河北省食品检验研究院、成都市食品药品检验研究院、天津海关动植物与食品检测中心。

本方法主要起草人:王守伟、赵文涛、李石磊、李慧晨、郭文萍、李莹莹、王娟强、张杉、王聪、马俊美、李绍波、赵孔祥。