

BJS

食品补充检验方法

BJS 202203

饮料中香豆素类化合物的检测

2022-02-07 发布

国家市场监督管理总局 发布

饮料中香豆素类化合物的检测

1 范围

本方法规定了饮料中香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)等8种香豆素类化合物的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于饮料中香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)等8种香豆素类化合物的测定。

2 原理

试样经乙腈超声提取,离心,提取液过膜后采用液相色谱-串联质谱仪检测,采用多反应离子监测(MRM)模式,以保留时间和定性离子碎片的丰度比定性,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定,本方法所用试剂为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(C_2H_3N)。

3.1.2 甲酸($HCOOH$)。

3.1.3 氯化钠($NaCl$):分析纯。

3.1.4 无水硫酸钠(Na_2SO_4):分析纯。

3.2 试剂配制

3.2.1 甲酸-水溶液(0.1%):量取甲酸(3.1.2)1 mL,稀释并定容至 1 000 mL,混合均匀。

3.3 标准品

香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素),其中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见附录 A。纯度均不小于 99.0%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液(100 mg/L)

准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg)标准品(3.3),用乙腈(3.1.1)溶解,分别转移至 50 mL 容量瓶中定容,混匀,配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液。4 °C 避光保存,保存期 3 个月。

3.4.2 混合标准中间液(1 mg/L)

分别吸取 1 mL 的标准储备液(3.4.1)于 100 mL 容量瓶中,用乙腈(3.1.1)稀释至刻度,混匀,配制

成质量浓度为 1 mg/L 的混合标准中间液。4 °C 避光保存,保存期 1 个月。

3.4.3 标准系列工作液

吸取混合标准中间液(3.4.2)适量,用乙腈(3.1.1)配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的标准系列工作液,现用现配。或依仪器响应和实际情况配制适当浓度的标准系列工作液。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。(所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象,方可使用)

3.5.2 聚丙烯离心管:50 mL。

4 仪器与设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)。

4.2 分析天平:感量分别为 0.000 01 g 和 0.001 g。

4.3 涡漩混合器。

4.4 组织捣碎机。

4.5 超声波水浴锅。

4.6 高速冷冻离心机。

5 分析步骤

5.1 试样制备和保存

5.1.1 液体样品

采样量需要大于 0.25 kg;均匀性液体样品直接混匀,非均匀性液体样品充分搅拌均匀;称取分析试样后,其余部分储存于样品瓶中密封并标记(>100 g),按样品标识的保存条件保存备用。

5.1.2 固体样品

采样量需要大于 0.25 kg,用组织捣碎机粉碎并搅拌均匀;称取分析试样后,其余部分储存于样品瓶中密封并标记(>100 g),按样品标识的保存条件保存备用。

5.2 样品前处理

5.2.1 液体试样

准确称取制备好的试样 5 g(精确值 0.001 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈(3.1.1),涡漩振荡 30 s,加入 3 g 氯化钠(3.1.3),超声提取 10 min 后,10 000 r/min、4 °C 离心 3 min,取适量上清液过 0.22 μm 有机微孔滤膜供高效液相色谱-串联质谱测定。

5.2.2 固体试样

准确称取制备好的试样 1 g(精确值 0.001 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈(3.1.1),涡漩振荡 30 s,加入 3 g 无水硫酸钠(3.1.4),超声提取 10 min 后,10 000 r/min、4 °C 离心 3 min,取适量上清液过 0.22 μm 有机微孔滤膜供高效液相色谱-串联质谱测定。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下：

- 色谱柱： C_{18} 柱， $3.5\ \mu\text{m}$ ， $150\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$ （内径），或同等性能的色谱柱；
- 流动相：A 为 0.1% 甲酸水溶液（3.2.1），B 为乙腈（3.1.1）；
- 流动相流速： $0.4\ \text{mL}/\text{min}$ ；
- 柱温： $40\ ^\circ\text{C}$ ；
- 进样量： $10\ \mu\text{L}$ ；
- 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0.00 | 70 | 30 |
| 2.00 | 70 | 30 |
| 13.00 | 10 | 90 |
| 13.01 | 70 | 30 |
| 15.00 | 70 | 30 |

5.3.2 质谱条件

质谱条件如下：

- 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- 扫描方式：正离子模式；
- 监测方式：多反应离子监测（MRM）；
- 干燥气、雾化气、鞘气、碰撞气等均为高纯氮气或其他合适气体，使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求，喷雾电压、离子源温度、干燥气温度、鞘气温度、鞘气流量等参数应优化至最佳灵敏度；
- 定性离子、定量离子及碰撞能量见表 2。

表 2 香豆素等 8 种化合物的质谱参数

| 化合物名称 | 保留时间/min | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 碰撞能量/eV | 去簇电压/V |
|--------------------|----------|--------------|----------------------------|---------|--------|
| 香豆素 | 4.38 | 147.3 | 102.9 ^a , 91.0 | 20;30 | 50 |
| 7-甲氧基香豆素 | 5.16 | 177.1 | 121.0 ^a , 134.1 | 30;40 | 50 |
| 二氢香豆素 | 5.37 | 149.1 | 107.0 ^a , 121.0 | 20;20 | 50 |
| 7-甲基香豆素 | 5.84 | 161.1 | 105.0 ^a , 115.1 | 30;30 | 50 |
| 7-乙氧基-4-甲基香豆素 | 7.25 | 205.1 | 177.2 ^a , 105.0 | 25;30 | 50 |
| 醋硝香豆素 | 7.96 | 354.1 | 249.1 ^a , 163.0 | 45;20 | 50 |
| 环香豆素 | 10.56 | 323.1 | 251.0 ^a , 173.1 | 25;40 | 50 |
| 3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素) | 11.31 | 461.0 | 244.0 ^a , 446.3 | 25;35 | 50 |
| ^a 定量离子。 | | | | | |

本方法提供的质谱条件为推荐质谱方法条件。可根据实际情况,选择响应信号强且无干扰的离子对进行监测,质谱参数亦可根据实际可达到对应灵敏度的条件进行设定。

5.4 试样测定

5.4.1 定性测定

将标准系列工作液和试样溶液分别注入高效液相色谱-串联质谱仪中测定。根据保留时间和相对离子对丰度比定性,外标峰面积定量。相对离子丰度的允许偏差应符合表 3 要求。香豆素等 8 种化合物 MRM 色谱图参见附录 B。

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 |

5.4.2 定量测定

取标准系列工作液做多点校准,化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应用乙腈稀释后再进样分析。

6 空白实验

除不称取试样外,均按照第 5 章中分析步骤进行。

本方法中使用到的有机试剂及试验器皿在使用前应进行空白实验。如本底值高于检出限,应对有机试剂进行重蒸,或更换试验器皿,直至本底值低于检出限。

7 结果计算

试样中香豆素等 8 种化合物的含量按式(1)计算:

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

式中:

- X —— 试样中待测组分的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- ρ —— 从标准曲线中读出的测定液中待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 试样提取液体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样称取的质量,单位为克(g);
- 1 000—— 换算系数。

测定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,结果保留两位有效数字。

8 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%。

9 其他

本方法在液体饮料中定量限为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出限为 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在固体饮料中定量限为 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出限为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。空白试验应无干扰。

附 录 A
(资料性)
化合物相关信息

香豆素等 8 种化合物中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 香豆素等 8 种化合物中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量

| 中文名称 | 英文名称 | CAS 号 | 分子式 | 相对分子质量 |
|--------------------|--|------------|---|--------|
| 香豆素 | coumarin | 91-64-5 | C ₉ H ₆ O ₂ | 146.15 |
| 7-甲氧基香豆素 | 7-methoxycoumarin | 531-59-9 | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 176.17 |
| 二氢香豆素 | dihydrocoumarin | 119-84-6 | C ₉ H ₈ O ₂ | 148.16 |
| 7-甲基香豆素 | 7-methylcoumarin | 2445-83-2 | C ₁₀ H ₈ O ₂ | 160.17 |
| 7-乙氧基-4-甲基香豆素 | 7-ethoxy-4-methylcoumarin | 87-05-8 | C ₁₂ H ₁₂ O ₃ | 204.22 |
| 醋硝香豆素 | acenocoumarol | 152-72-7 | C ₁₉ H ₁₅ NO ₆ | 353.32 |
| 环香豆素 | pyranocoumarin | 518-20-7 | C ₂₀ H ₁₈ O ₄ | 322.35 |
| 3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素) | 3,3'-carbonylbis(7-diethylaminocoumarin) | 63226-13-1 | C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₅ | 460.52 |

附录 B

(资料性)

香豆素等 8 种化合物标准谱图

香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)特征离子提取离子流图见图 B.1。

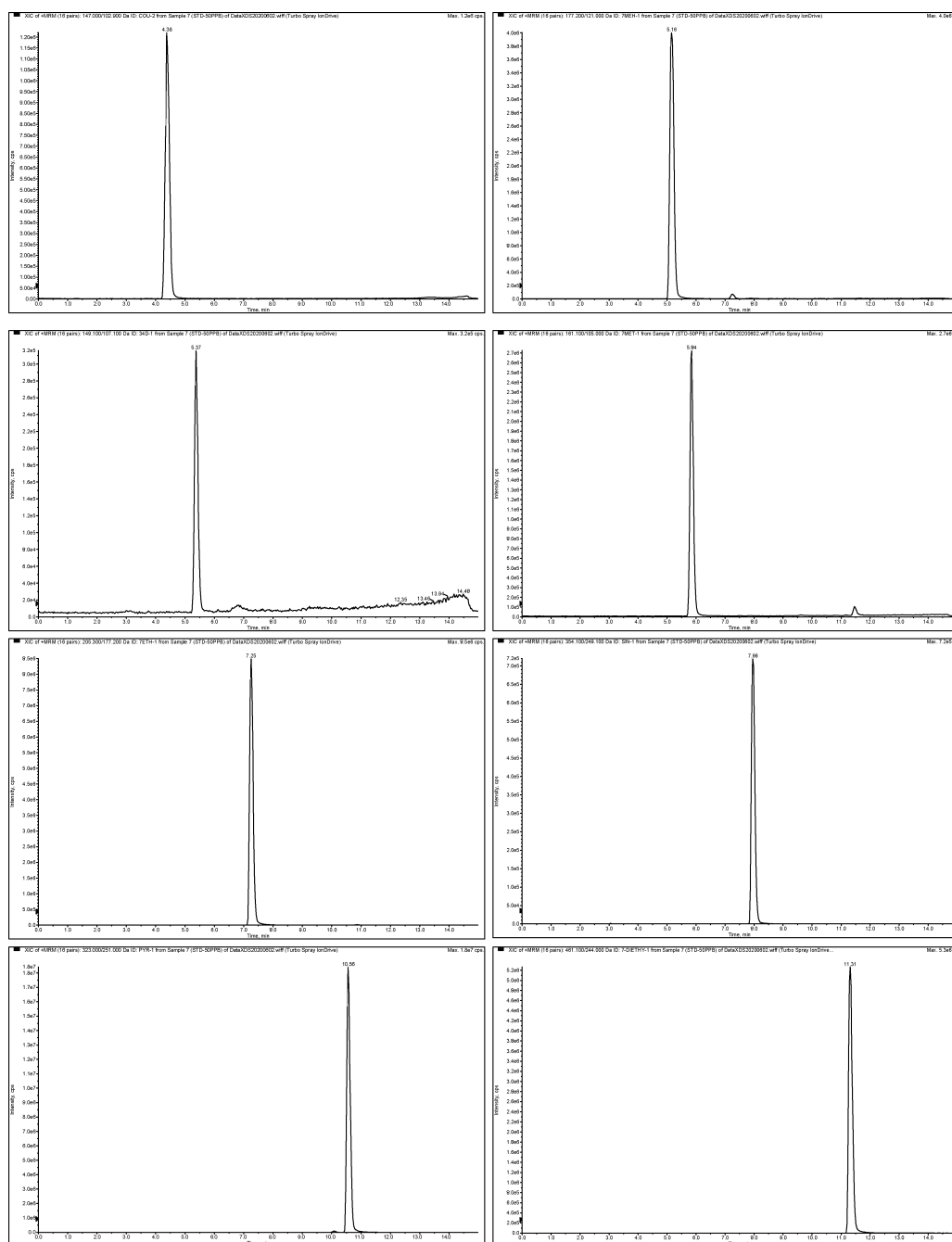


图 B.1 香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)特征离子提取离子流图

BJS 202203

本方法负责起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本方法参与验证单位:北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所)、山东省食品药品检验研究院、重庆市计量质量检测研究院、中国海关科学技术研究中心(原北京海关技术中心)、湖北省食品质量监督检验研究院、江西省食品检验检测研究院。

本方法主要起草人:张峰、聂雪梅、许博舟、刘通、许秀丽。

BJS 202203《饮料中香豆素类化合物的检测》 第 1 号修改单

本修改单经国家市场监督管理总局于 2022 年 12 月 05 日批准,自批准之日起实施。

(修改事项)

一、将“1 范围”修改为“本方法规定了饮料中 7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)等 7 种香豆素类化合物的高效液相色谱-串联质谱测定方法”及“本方法适用于饮料中 7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)等 7 种香豆素类化合物的测定”。

二、将“3.3 标准品”修改为“7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)”。

三、将“5.3.2 质谱条件”修改为：

表 2 香豆素等 8 种化合物的质谱参数

| 化合物名称 | 保留时间/min | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 碰撞能/eV | 去簇电压/V |
|------------------------|----------|--------------|----------------------------|--------|--------|
| 7-甲氧基香豆素 | 5.16 | 177.1 | 121.0 ^a , 134.1 | 30; 40 | 50 |
| 二氢香豆素 | 5.37 | 149.1 | 107.0 ^a , 121.0 | 20; 20 | 50 |
| 7-甲基香豆素 | 5.84 | 161.1 | 105.0 ^a , 115.1 | 30; 30 | 50 |
| 7-乙氧基-4-甲基香豆素 | 7.25 | 205.1 | 177.2 ^a , 105.0 | 25; 30 | 50 |
| 醋硝香豆素 | 7.96 | 354.1 | 249.1 ^a , 163.0 | 45; 20 | 50 |
| 环香豆素 | 10.56 | 323.1 | 251.0 ^a , 173.1 | 25; 40 | 50 |
| 3,3'-羰基双 (7-二乙胺香豆素) | 11.31 | 461.0 | 244.0 ^a , 446.3 | 25; 35 | 50 |
| ^a 定量离子。 | | | | | |

四、将“5.4.1 定性测定”中“香豆素等 8 种化合物 MRM 色谱图参见附录 B”修改为“7-甲氧基香豆素等 7 种化合物 MRM 色谱图参见附录 B”。

五、将“7 结果计算”中“试样中香豆素等 8 种化合物的含量按式(1)计算”修改为“试样中 7-甲氧基香豆素等 7 种化合物的含量按式(1)计算”。

六、将“附录 A”修改为：

7-甲氧基香豆素等 7 种化合物名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 7-甲氧基香豆素等 7 种化合物名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量

| 化合物 | 英文名称 | CAS 号 | 分子式 | 相对分子质量 |
|----------|-------------------|----------|---|--------|
| 7-甲氧基香豆素 | 7-Methoxycoumarin | 531-59-9 | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 176.17 |

表 A.1 7-甲氧基香豆素等 7 种化合物名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子质量 (续)

| 化合物 | 英文名称 | CAS 号 | 分子式 | 相对分子质量 |
|------------------------|--|------------|---|--------|
| 二氢香豆素 | Dihydrocoumarin | 119-84-6 | C ₉ H ₈ O ₂ | 148.16 |
| 7-甲基香豆素 | 7-Methylcoumarin | 2445-83-2 | C ₁₀ H ₈ O ₂ | 160.17 |
| 7-乙氧基-4-甲基香豆素 | 7-Ethoxy-4-methylcoumarin | 87-05-8 | C ₁₂ H ₁₂ O ₃ | 204.22 |
| 醋硝香豆素 | Acenocoumarol | 152-72-7 | C ₁₉ H ₁₅ NO ₆ | 353.32 |
| 环香豆素 | Pyranocoumarin | 518-20-7 | C ₂₀ H ₁₈ O ₄ | 322.35 |
| 3,3'-羰基双 (7-二乙胺香豆素) | 3,3'-Carbonylbis (7-diethylaminocoumarin) | 63226-13-1 | C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₅ | 460.52 |

七、将“附录 B”修改为：

7-甲氧基香豆素等 7 种化合物标准谱图

7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)标准提取离子流图见图 B.1。

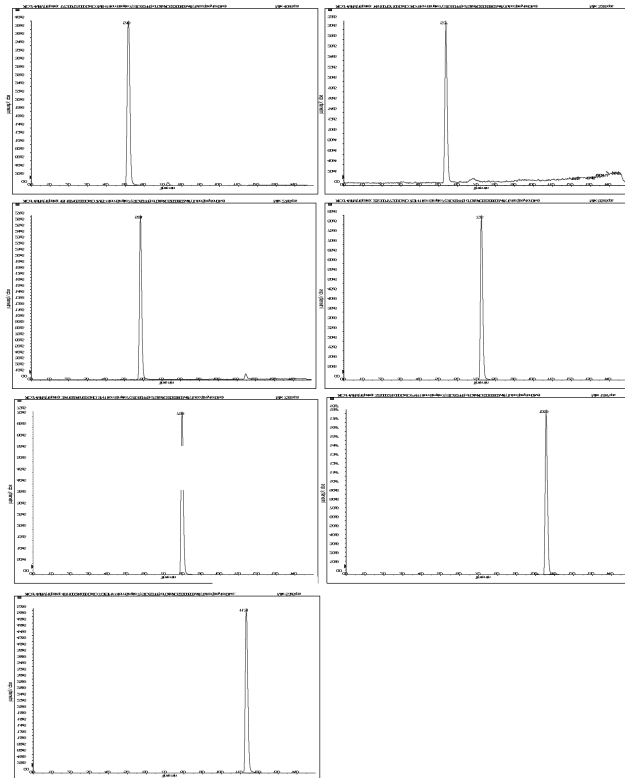


图 B.1 7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、醋硝香豆素、环香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙胺香豆素)标准提取离子流图