

BJS

食品补充检验方法

BJS 201705

食品中香兰素、甲基香兰素和 乙基香兰素的测定

2017-05-23 发布

国家食品药品监督管理总局 发布

食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定

1 范围

本方法规定了食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的高效液相色谱-串联质谱的测定方法。

本方法适用于液体乳、稀奶油、婴幼儿配方乳粉(不包括特殊医学用途的婴幼儿配方乳粉)、婴幼儿谷类辅助食品、谷物碾磨加工品、植物油脂等食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定。

2 原理

样品经乙腈提取后,再以正己烷除脂净化,高效液相色谱-串联质谱仪进行检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 甲醇(CH_4O):色谱纯。
- 3.1.2 乙腈($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$):色谱纯。
- 3.1.3 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。
- 3.1.4 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。
- 3.1.5 氯化钠(NaCl):在 550 °C 灼烧 4 h 后备用。
- 3.1.6 0.1% 甲酸水溶液:量取 10 mL 甲酸并加入水定容至 1 000 mL。

3.2 标准品

香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素标准品纯度 $\geq 98.0\%$,中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式等信息参见附录 A 中表 A.1。

3.3 标准溶液配制

- 3.3.1 标准储备液(1.00 mg/mL):分别称取香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素 0.1 g(精确至 0.000 1 g)标准物质于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,并定容至刻度。避光于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存,保存期为 6 个月。
- 3.3.2 混合标准储备溶液:分别吸取上述三种标准储备液 1.00 mL 于同一 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释到刻度配制成质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准储备溶液,避光于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,保存期为 1 个月。
- 3.3.3 空白基质溶液:按照 6.1 规定的前处理方法操作制备空白基质溶液。
- 3.3.4 基质混合标准系列工作溶液:分别准确吸取香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素混合标准储备溶液(3.3.2)适量,用空白基质溶液(3.3.3)将其稀释为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL 标准系列工作溶液,临用时配制。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 4.2 涡漩混合器。
- 4.3 超声波清洗器。
- 4.4 离心机:转速 $\geq 5\ 000$ r/min。
- 4.5 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5 试样制备

婴幼儿谷类辅助食品、谷物碾磨加工品需粉碎混匀,使其全部可以通过 425 μm 的标准网筛;其他样品无需特殊制备。

6 分析步骤

6.1 样品的制备与提取

6.1.1 婴幼儿配方乳粉、婴幼儿谷类辅助食品:称取 1 g 样品(精确至 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 3 mL 水,涡漩振荡 30 s,加入 7 mL 乙腈(3.1.2),涡漩振荡 30 s,超声处理 25 min,10 000 r/min 离心 5 min 后,取上层清液 2 mL 于 10 mL 玻璃离心管中,加入 1 mL 正己烷(3.1.4),涡漩混合 30 s,5 000 r/min 离心 3 min 后,取下层清液,过滤膜(0.22 μm ,有机相),待分析。

6.1.2 液体乳(巴氏杀菌乳、灭菌乳、发酵乳等)、稀奶油:称取 2 g 样品(精确至 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 20 mL 乙腈(3.1.2),涡漩振荡 30 s,超声处理 25 min,加入 1 g 氯化钠(3.1.5),10 000 r/min 离心 5 min 后,取上层清液 2 mL 于 10 mL 玻璃离心管中,加入 1 mL 正己烷(3.1.4),涡漩混合 30 s,5 000 r/min 离心 3 min 后,取下层清液,过滤膜(0.22 μm ,有机相),待分析。

6.1.3 谷物碾磨加工品(大米等):称取 1 g 样品(精确至 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 3 mL 水,涡漩振荡 30 s,加入 7 mL 乙腈(3.1.2),涡漩振荡 30 s,超声处理 25 min,10 000 r/min 离心 5 min 后,取上层清液过 0.22 μm 滤膜,待分析。

6.1.4 植物油脂:称取 1 g 样品(精确至 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 1 mL 水和 10 mL 乙腈(3.1.2),涡漩振荡 30 s,超声处理 25 min,加入 1 g 氯化钠(3.1.5),10 000 r/min 离心 5 min 后,取上层清液 2 mL 于 10 mL 玻璃离心管中,加入 1 mL 正己烷(3.1.4),涡漩混合 30 s,5 000 r/min 离心 3 min 后,取下层清液,过滤膜(0.22 μm ,有机相),待分析。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 色谱条件:

- a) 色谱柱:XDBC₁₈柱,4.6 mm \times 50 mm,1.8 μm ,或性能相当者;
- b) 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为甲醇,梯度洗脱条件见表 1;
- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:2 μL 。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	75	25
0.5	75	25
2	50	50
6	50	50
7	10	90
9	10	90
12	75	25

6.2.2 质谱条件：

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子扫描(ESI+)；
- 检测方式：多反应监测(MRM)；
- 离子化电压、雾化气、辅助气、气帘气压力、雾化温度应优化至最佳灵敏度，监测离子对和定量离子对及其他质谱参数参见附录 B 中表 B.1。

6.3 测定

6.3.1 标准曲线的制作

用混合标准系列工作溶液(3.3.4)分别按仪器参考条件(6.2)进行测定，得到相应的标准溶液的色谱峰面积，以混合标准工作液的质量浓度为横坐标，以色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

6.3.2 定性测定

在相同试验条件下测定样品和基质混合标准工作溶液，记录样品和标准工作溶液中目标物的保留时间。若样品中检出与基质混合标准工作溶液(3.3.4)中待测物保留时间一致的色谱峰，且其定性离子与浓度相当的标准溶液中相应的定性离子的相对丰度相比偏差超过表 2 规定的范围，则可以确定样品中检出相应的待测物。

表 2 定性确定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
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

6.3.3 定量测定

将样品溶液(6.1)按仪器参考条件(6.2)进行测定，得到相应的样品溶液的色谱峰面积，根据标准曲线查得待测液中各组分的质量浓度。样品中各待测组分的响应值应在标准曲线的线性响应范围内，如果含量超出线性范围，则重新取样分析，用乙腈稀释到适当质量浓度后测定。混合标准工作溶液的高效液相色谱-串联质谱 MRM 色谱图参见图 C.1~图 C.3。

7 结果计算

按式(1)计算样品中单种目标化合物的含量:

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

式中:

X —— 样品中待测组分的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ —— 从标准曲线中读出的测定液中各待测组分的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V —— 样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m —— 样品称取的质量,单位为克(g)。

计算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,结果保留至小数点后一位。

8 灵敏度

当液体乳称样量为 2 g,植物油脂、稀奶油、谷物碾磨加工品、婴幼儿配方乳粉、婴幼儿谷类辅助食品称样量 1 g 时,香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的检出限为 30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9 准确度

本方法婴幼儿配方乳粉、液体乳、植物油脂、稀奶油、谷物碾磨加工品、婴幼儿谷类辅助食品在 100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 000.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内回收率为 78.6%~118.4%。

10 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不得超过算数平均值的 10%。

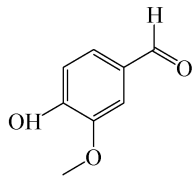
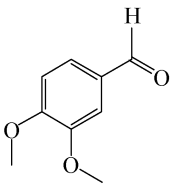
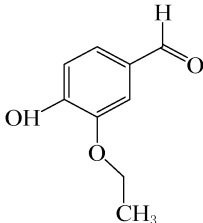
附录 A

(资料性)

香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素三种化合物相关信息

香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素三种化合物相关信息见表 A.1。

表 A.1 中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
香兰素	Vanillin	121-33-5	$C_8H_8O_3$	152.14	
甲基香兰素	Methylvanillin	120-14-9	$C_9H_{10}O_3$	166.17	
乙基香兰素	Ethylvanillin	121-32-4	$C_9H_{10}O_3$	166.17	

附录 B
(资料性)
参考质谱条件

附录 B 所列参考质谱条件仅供参考,当采用不同质谱仪器时,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。

具体条件如下所示:

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描(ESI+);
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 离子化电压(IS):5 500 V;
- e) 雾化气压力(Gas1):344.75 kPa(50 psi);
- f) 辅助气压力(Gas2):344.75 kPa(50 psi);
- g) 气帘气压力(CUR):241.325 kPa(35 psi);
- h) 雾化温度(TEM):500 °C;
- i) 定性离子对、定量离子对及其他质谱参数见表 B.1。

表 B.1 三种化合物的定性离子对、定量离子对和质谱分析参数

序号	分析物	离子对 m/z	去簇电压/V	碰撞能量/eV	入口电压/V	出口电压/V
1	香兰素	153.1/93.1 ^a	90	19	10	13
		153.1/125.0	90	14	10	13
2	甲基香兰素	167.2/139.0 ^a	100	17	10	13
		167.2/124.0	100	25	10	13
3	乙基香兰素	167.2/111.0 ^a	90	17	10	13
		167.2/93.0	90	23	10	13

^a 定量离子。

附录 C

(资料性)

香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的标准色谱图

香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的标准色谱图见图 C.1~图 C.3。

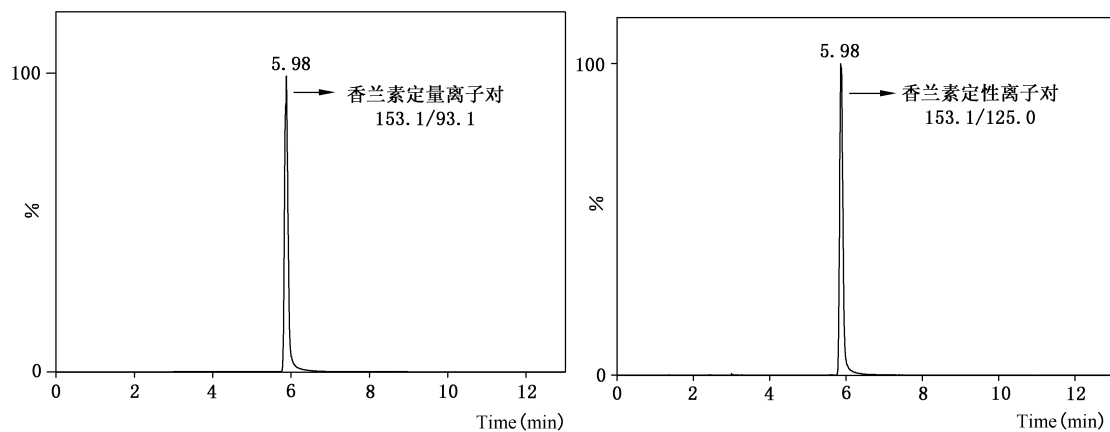


图 C.1 香兰素标准物质的 MRM 色谱图

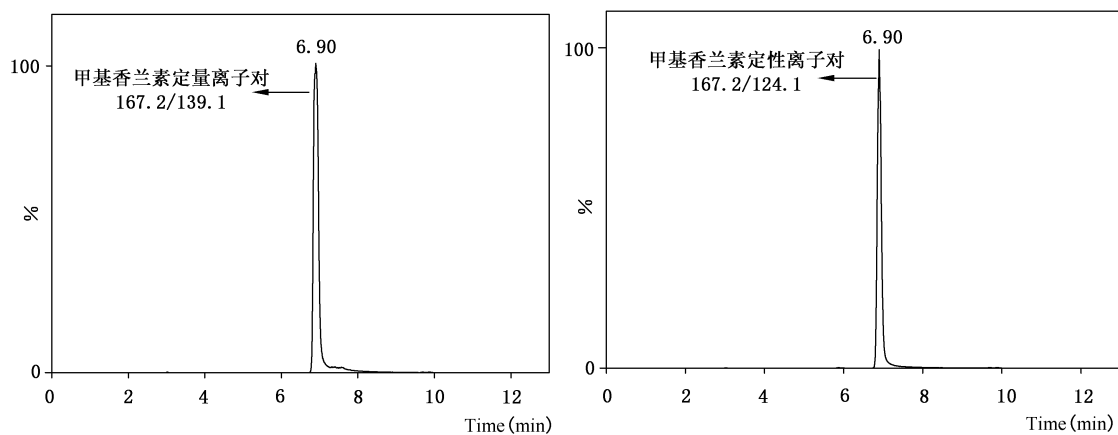


图 C.2 甲基香兰素标准物质的 MRM 色谱图

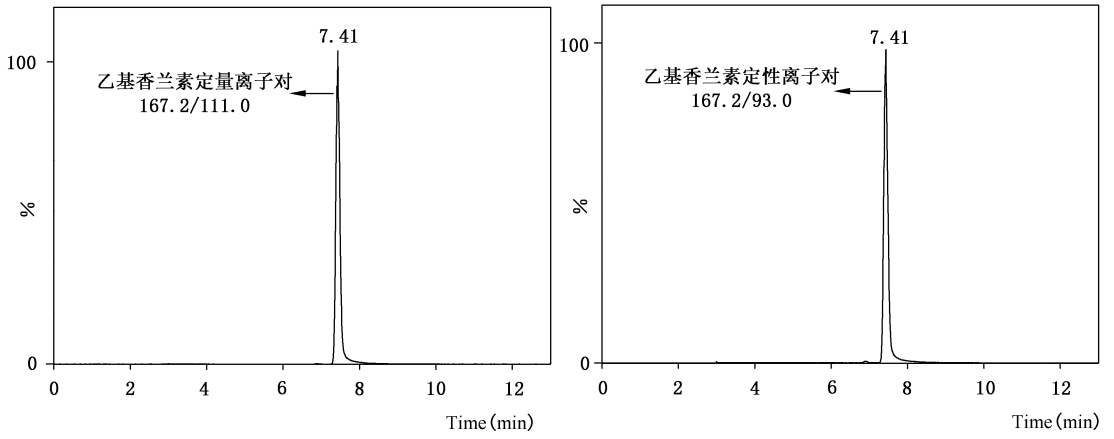


图 C.3 乙基香兰素标准物质的 MRM 色谱图

本方法负责起草单位:大连市食品检验所。

本方法参与验证单位:中国食品药品检定研究院、北京市食品安全监控和风险评估中心、上海食品药品检验所、深圳出入境检验检疫局检验检疫技术中心、辽宁出入境检验检疫局技术中心。

本方法主要起草人:曲宝成、张敬波、宁霄、王浩、迟秋池、张毅。

BJS 201705《食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定》 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 5 日批准,自批准之日起实施。

(修改事项)

- 一、将“1 范围”修改为“本方法适用于谷物碾磨加工品、植物油脂等食品中香兰素、甲基香兰素和乙基香兰素的测定”。
 - 二、将 3.1.6 修改为“0.1%甲酸水溶液:量取 1 mL 甲酸并加入水定容至 1 000 mL”。
 - 三、将“5 试样制备”中“婴幼儿谷类辅助食品、谷物碾磨加工品需粉碎混匀”修改为“谷物碾磨加工品需粉碎混匀”。
 - 四、删除“6 分析步骤”中 6.1.1 和 6.1.2。
 - 五、将“8.1 灵敏度”中“植物油脂、稀奶油、谷物碾磨加工品、婴幼儿配方乳粉、婴幼儿谷类辅助食品称样量 1 g 时”修改为“谷物碾磨加工品、植物油脂称样量 1 g 时”。
 - 六、将“8.2 准确度”中“本方法婴幼儿配方乳粉、液体乳、植物油脂、稀奶油、谷物碾磨加工品、婴幼儿谷类辅助食品在 100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 000.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内”修改为“本方法谷物碾磨加工品、植物油脂在 100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 000.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内”。
-