

附件 4

食品中托拉塞米杂质 C 的执法检验方法

1 范围

本方法规定了食品中托拉塞米杂质 C 的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于压片糖果、固体饮料中托拉塞米杂质 C 的测定，其他食品可参照本方法检测。

2 原理

试样用 50% 甲醇溶液超声提取和离心后，10% 甲醇溶液定容，清液过膜后，经高效液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为色谱纯，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 甲醇（ CH_4O ）。

3.1.3 甲酸（ CH_2O_2 ）。

3.2 试剂配制

3.2.1 50% 甲醇溶液：量取 125 mL 甲醇（3.1.2），加水稀释至 250 mL，混匀备用。

3.2.2 10%甲醇溶液：量取 10 mL 甲醇（3.1.2），加水稀释至 100 mL，混匀备用。

3.2.3 甲酸水溶液：量取水 950 mL，用甲酸（3.1.3）调节 pH 为 5，加水稀释至 1000 mL，混匀备用。

3.3 标准品

托拉塞米杂质 C 标准品，纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。标准品中文名称、英文名称、CAS 号、化学结构式、分子式及相对分子质量等信息见附录 A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液（500 mg/L）：准确称取托拉塞米杂质 C 标准品 12.5 mg（精确至 0.1 mg），加乙腈（3.1.1）溶解，然后分别转移至 25 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，配制成质量浓度均为 500 mg/L 的标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存，有效期 3 个月。

3.4.2 标准中间溶液（2.0 mg/L）：准确移取上述标准储备液（3.4.1）0.10 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 50%甲醇溶液（3.2.1）稀释并定容，配制成质量浓度均为 2.0 mg/L 的混合标准中间溶液。于 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 1 个月。

3.4.3 标准中间溶液（0.2 mg/L）：准确移取标准中间溶液（2.0 mg/L）（3.4.2）1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用 50%甲醇溶液（3.2.1）稀释并定容，配制成质量浓度均为 0.2 mg/L 的标准中间溶液。现用现配。

3.4.4 标准系列工作溶液：分别移取 5.0 μL 、10.0 μL 、25.0 μL 标准中间溶液（0.2 mg/L）（3.4.3）和 5.0 μL 、10.0 μL 、25.0 μL 标准中间溶液（2.0 mg/L）（3.4.2），用空白基质提取液（5.2.2）分别稀释至 1 mL，配制成质量浓度为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 、2.00 $\mu\text{g/L}$ 、5.00 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 和 50.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液，现用现配。标准曲线系列工作溶液浓度可依据实际需要适当调整。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜：0.22 μm ，聚四氟乙烯滤膜。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱 - 串联质谱仪，带电喷雾离子源（ESI）。

4.2 分析天平：感量分别为 0.1 mg 和 1 mg。

4.3 超声波清洗仪：工作频率不低于 40 kHz。

4.4 离心机：转速不低于 4000 r/min。

4.5 涡旋混合器。

5 分析步骤

5.1 试样制备和保存

取 300 g 试样或所有试样（试样低于 300 g 时）充分搅碎、均质或粉碎混匀，制备好的试样于冰箱冷藏保存。

5.2 样品前处理

5.2.1 试样处理

准确称取 1.0 g（精确至 0.001 g）样品于 25 mL 具塞刻度离

心管中，加入 20 mL 50% 甲醇溶液（3.2.1），超声提取 10 min（超声过程中摇匀 2 次~3 次），冷却至室温，4000 r/min 离心 5 min，转移上清液至 50 mL 容量瓶中，用 10 % 甲醇溶液（3.2.2）稀释至刻度并摇匀，用微孔滤膜（3.5.1）过滤，待高效液相色谱-串联质谱仪测定。

5.2.2 空白基质提取液

选取阴性基质样品，按照 5.2.1 操作步骤进行基质提取液的制备。

阴性基质样品中托拉塞米杂质 C 含量应在方法检出限以下。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 色谱参考条件

a) 色谱柱：C18 柱，3 μ m，100 mm $\times$ 2.1 mm（内径），或性能相当者；

b) 流动相：A 为甲酸水溶液（pH5）（3.2.3），B 为乙腈溶液（3.1.1），参考梯度洗脱程序见表 1；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：30 $^{\circ}$ C；

e) 进样量：5 μ L。

表 1 梯度洗脱程序表

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	90	10
1.0	90	10

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
2.5	10	90
4.0	10	90
4.1	90	10
6.0	90	10

5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 检测方式：多反应模式（MRM）；
- c) 扫描方式：正离子模式；
- d) 喷雾电压：3500 V；
- e) 离子传输管温度：325 ℃；
- f) 鞘气压力：40 Arb；
- g) 辅助气压力：10 Arb；
- h) 离子化模式、母离子、子离子、锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 托拉塞米杂质 C 定性、定量离子和质谱分析参数

化合物名称	扫描方式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 / V	碰撞能量 /V
托拉塞米 杂质 C	ESI ⁺	335.06	264.05*	120	16
			168.11	120	43
			290.04	120	12
注：带*为定量离子					

5.4 定性测定

按照高效液相色谱-串联质谱条件（5.3）在相同的试验条件下测定试样溶液和标准工作溶液，记录试样和标准溶液中托拉塞

米杂质 C 的色谱保留时间和定量离子与定性离子的相对离子丰度。当试样中化合物色谱峰保留时间与标准溶液的保留时间相对偏差不大于 2.5%，且定量离子与定性离子的相对离子丰度与浓度相当标准溶液中相对离子丰度（ k ）偏差不超过表 3 规定的范围，则可确定试样中检出相应化合物。

表 3 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 $k/\%$	$k>50$	$20<k\leq 50$	$10<k\leq 20$	$k\leq 10$
最大允许偏差/ $\%$	± 20	± 25	± 30	± 50

5.5 定量测定

5.5.1 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液（3.4.4）按仪器参考条件（5.3）进行测定。以标准系列工作溶液中托拉塞米杂质 C 的质量浓度为横坐标，以对应托拉塞米杂质 C 色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程。

5.5.2 试样溶液的测定

将试样溶液（5.2）按仪器参考条件（5.3）进行测定，得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测物托拉塞米杂质 C 的浓度。试样溶液中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围之内，超出线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释，同时用同等稀释倍数的空白基质配制标准曲线后再测定。

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

试样中托拉塞米杂质 C 的含量按下式计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V}{m \times 1000} \times f$$

式中：

X——试样中托拉塞米杂质 C 的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中托拉塞米杂质 C 的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ_0 ——由标准曲线得到空白溶液中托拉塞米杂质 C 的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V——定容的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样称取的质量，单位为克（g）；

f——稀释倍数；

1000——换算系数。

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，计算结果保留 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应超过算术平均值的 15%。

8 其他

当取样量为 1.0g，定容至 50 mL 时，托拉塞米杂质 C 的检出限为 0.030 mg/kg，定量限为 0.10 mg/kg。

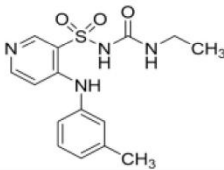
附录 A

(规范性)

托拉塞米杂质 C 标准品的基本信息

托拉塞米杂质 C 标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、化学结构式、分子式和相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 托拉塞米杂质 C 标准品的基本信息

中文名称	英文名称	CAS 号	化学结构式	分子式	相对分子质量
托拉塞米杂质 C	Torsemid Impurity C	58155-35-4		$C_{15}H_{18}N_4O_3$ S	334.39

附录 B
(资料性)
标准溶液色谱图

标准溶液多反应监测 (MRM) 色谱图 B.1。

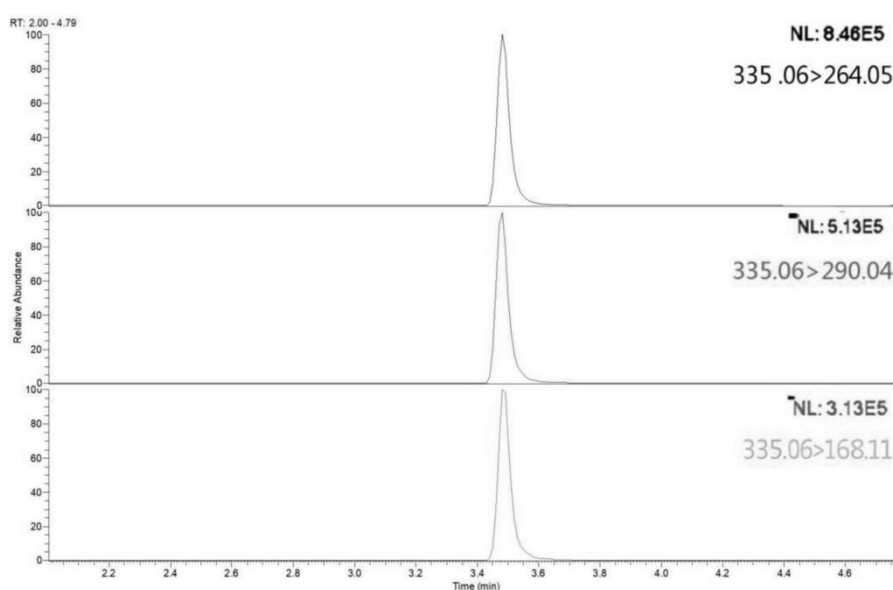


图 B.1 标准溶液多反应监测 (MRM) 色谱图 (20 $\mu\text{g/L}$)

本方法起草单位：湖南省产商品质量检验研究院、广东省食品检验所。

本方法验证单位：中国检验认证集团湖南有限公司、湖南省疾病预防控制中心（湖南省预防医学科学院）、长沙海关技术中心、广电计量检测（湖南）有限公司、长沙市食品药品检验所。

标准主要起草人：肖泳、刘小芳、赵红清、袁列江、吴海智、梁锋、张丽萍、张婉梨。