

附件 3

食品中沃诺雷生、苏沃雷生、赛托雷生、 莱博雷生、莱博雷生杂质 27、达利雷生、 去甲基达利雷生的执法检验方法

1 范围

方法规定了食品（含保健食品）中沃诺雷生、苏沃雷生、赛托雷生、莱博雷生、莱博雷生杂质 27、达利雷生和去甲基达利雷生的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于糖果、饮料（含固体饮料）、代用茶、果冻、糕点、酒类等食品（包括上述类似基质的片剂、胶囊剂等形式的保健食品）中沃诺雷生、苏沃雷生、赛托雷生、莱博雷生、莱博雷生杂质 27、达利雷生和去甲基达利雷生的定性和定量测定。

2 原理

试样经甲醇或乙腈超声提取、用 50% 甲醇水溶液稀释过滤后，滤液供高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪测定，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分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

3.1.2 乙酸乙酯（ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ）：色谱纯。

3.1.3 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

3.1.4 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

3.2 试剂配制

3.2.1 0.1% 甲酸水溶液：量取甲酸（3.1.3）1.0 mL，用水稀释至 1 000 mL，用滤膜（3.5.2）过滤后备用。

3.2.2 甲醇-水溶液（1+1）：将甲醇（3.1.1）与水等体积混合。

3.3 标准品

莱博雷生、苏沃雷生、沃诺雷生、达利雷生、赛托雷生、莱博雷生杂质 27 和去甲基达利雷生标准品，纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。7 种标准品的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式、相对分子量见附录 A 表 A.1。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液（1.0 mg/mL）：分别准确称取莱博雷生、苏沃雷生、沃诺雷生、达利雷生、赛托雷生、莱博雷生杂质 27 和去甲基达利雷生（3.3）0.01g（精确至 0.0001 g）至小烧杯中，加入甲醇（3.1.1）溶解后，溶液转移至 10 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液。 -18°C 避光贮存，有效期 6 个月。

3.4.2 混合标准中间溶液 I（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确移取莱博雷生、苏沃雷生、沃诺雷生、达利雷生、赛托雷生、莱博雷生杂质 27 和去甲基达利雷生标准储备液（3.4.1）0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，配制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液。 -18°C 避光贮存，有效期 3 个月。

3.4.3 混合标准中间溶液 II（1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取混合标准中间溶液 I（3.4.2）1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，配制成 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液，临用现配。

3.4.4 标准工作溶液的配制

分别准确移取 10、20、50、100、200、500 μL 标准中间溶液（3.4.3）于 10 mL 容量瓶中，用空白基质溶液（5.2.4）稀释并定容，配制成浓度为 1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL 的系列标准工作溶液，或依仪器响应情况配制适当浓度的标准工作溶液，现配现用。

3.5 材料

3.5.1 聚四氟乙烯离心管：50 mL。

3.5.2 微孔滤膜：0.22 μm ，水系。

3.5.3 微孔滤膜：0.22 μm ，有机系。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

4.2 天平：感量分别为 0.001 g 和 0.0001g。

4.3 捣碎机。

4.4 涡旋混合器。

4.5 高速离心机：最大转速 ≥ 8000 r/min。

4.6 超声波发生器。

4.7 恒温水浴锅。

5 分析步骤

5.1 试样制备与保存

5.1.1 液体试样

取代表性样品 20 g 或全部样品（试样低于 20 g 时），充分混匀（含二氧化碳的试样，超声除去气泡后摇匀），分别装入洁净容器内。

5.1.2 其他半固体或固体试样

取代表性样品 20 g 或全部样品（试样低于 20 g 时），用捣碎机充分捣碎，搅拌均匀，装入洁净容器中密封并标记。

5.1.3 胶囊、软胶囊型试样

取代表性样品 20 g 或全部样品（试样低于 20 g 时），将胶囊壳与内容物分离，内容物充分混匀，装入洁净容器中密封并标记。

5.1.4 软糖试样

取代表性样品 20 g 或全部样品（试样低于 20 g 时），剪碎至 3 mm 以下，充分混匀。

5.2 样品前处理

5.2.1 液体试样和固体试样（固体饮料、压片糖果、代用茶、糕点等食品及上述基质相同的保健食品及片剂、硬胶囊等剂型）

称取1.0 g混合均匀的试样（精确至0.001 g）置于50 mL具盖离心管中，加入20 mL甲醇（3.1.1），超声提取30 min，放冷至室温后，于6000 r/min离心5 min（液体试样如提取液澄清，可不离心直接转移至容量瓶），上清液全部转移至25 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释定容至刻度，混匀。取0.5 mL上清液，用甲醇-水溶液（3.2.2）稀释至1.0mL，经滤膜（3.5.3）过滤，取续滤液，备用。

5.2.2 软胶囊

称取1.0 g混合均匀的试样（精确至0.001 g）于50mL具盖离心管中，加入2 mL乙酸乙酯（3.1.2），加盖后振摇，使其分散，加入20 mL乙腈（3.1.4），超声提取30 min，放冷至室温后，于6000 r/min离心5 min，上清液全部转移至25 mL容量瓶中，用乙腈（3.1.4）稀释定容至刻度，混匀。取0.5 mL上清液，用甲醇-水溶液（3.2.2）稀释至1.0mL，经滤膜（3.5.3）过滤，取续滤液，备用。

5.2.3 果冻、软糖

称取1.0 g混合均匀的试样（精确至0.001 g）于50 mL具盖离心管中，加入5 mL水，于80℃水浴至样品溶解，过程中注意摇散，取出放冷至室温，加入15 mL甲醇（3.1.1），超声提取30 min，放冷至室温后，于6000 r/min离心5 min，上清液全部转移至25 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释定容至刻度，混匀。取0.5 mL上清液，用甲醇-水溶液（3.2.2）稀释至1.0 mL，经滤膜（3.5.3）过滤，取续滤液，备用。

5.2.4 空白样品基质提取液

称取空白试样适量，与试样同法处理，制得空白基质提取液。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C18 色谱柱（50 mm×3.0 mm（i.d）；2.7 μm），或性能相当者；
- b) 流动相：A 为 0.1%甲酸水溶液（3.2.1），B 为乙腈（3.1.4），梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：40℃；
- e) 进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间（min）	流动相A（%）	流动相B（%）
0	70	30
2	70	30
2.5	5	95
6.0	5	95
7	70	30
9	70	30

5.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）。

其他质谱参考条件见附录 B。

5.4 定性测定

按照上述条件测定标准工作液和试样溶液，记录标准工作溶液和试样溶液中各化合物的保留时间，在相同条件下，试样溶液与标准溶液中待测组分的色谱峰相对保留时间偏差在±2.5%以内，并

且试样色谱图中所选择的监测离子对的相对丰度比与浓度相当的标准溶液的离子相对丰度比（*k*）的偏差不超过表2规定的范围，则可判定试样中检出对应的被测化合物。标准溶液的选择离子色谱图参见附录C。

表 2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度（%）	<i>k</i> >50	50≥ <i>k</i> >20	20≥ <i>k</i> >10	<i>k</i> ≤10
允许相对偏差（%）	±20	±25	±30	±50

5.5 定量测定

5.5.1 标准曲线的制作

将标准系列工作液（3.4.4）按仪器参考条件（5.3）进行测定，以被测组分浓度为横坐标，被测组分色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程。

5.5.2 试样溶液的测定

将试样溶液按仪器参考条件（5.3）进行测定，外标法定量，计算样品中待测物的含量。待测样液中被测组分的量应在标准曲线范围之内，如果超出标准曲线范围，用空白基质溶液（5.2.4）稀释至适合的浓度再进行测定。

5.6 空白试验

除不加试样外，均按试样同法操作。

6 结果计算

试样中待测组分的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中待测组分的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- C——由标准曲线得到的试样溶液中待测组分的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- V——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；
- m——试样的称样量，单位为克（g）；
- f——稀释因子。
- 1000——换算系数。

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，结果保留三位有效数字。

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20%。

8 其他

当称样量为 1 g（精确至 0.001 g），定容体积为 25 mL 时，本方法中莱博雷生、苏沃雷生、沃诺雷生、达利雷生、赛托雷生、莱博雷生杂质 27 和去甲基达利雷生检出限为 0.015mg/kg，定量限为 0.05 mg/kg。

附录 A

(资料性)

标准品的中文名称、英文名称、CAS编号、分子式和相对分子质量

表 A.1 标准品的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式和相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS编号	分子式	相对分子质量
1	莱博雷生	Lemborexant	1369764-02-2	C ₂₂ H ₂₀ F ₂ N ₄ O ₂	410.42
2	苏沃雷生	Suvorexant	1030377-33-3	C ₂₃ H ₂₃ ClN ₆ O ₂	450.92
3	沃诺雷生（福诺雷生）	Vornorexant	1517965-94-4	C ₂₃ H ₂₂ FN ₇ O ₂	447.46
4	达利雷生（奈莫雷生）	Nemorexant	1505484-82-1	C ₂₃ H ₂₃ ClN ₆ O ₂	450.92
5	赛托雷生	Seltorexant	1293281-49-8	C ₂₁ H ₂₂ FN ₇ O	407.44
6	莱博雷生杂质 27（莱博雷生杂质 04）	Lemborexant Impurity 27	1369765-96-7	C ₂₂ H ₂₀ F ₂ N ₄ O ₃	426.42
7	去甲基达利雷生（奈莫雷生杂质 6）	Daridorexant Impurity 6	2901043-05-6	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₆ O ₂	436.89

附录 B
(资料性)
质谱参考条件

附录 B 所列质谱条件仅供参考，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。

质谱参考条件如下：

- a) 扫描方式：正离子扫描；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 气帘气（CUR）：241.3 kPa（20 psi）；
- d) 雾化气（GS1）：344.7 kPa（55 psi）；
- e) 辅助加热气（GS2）：413.6 kPa（60 psi）；
- f) 碰撞气（CAD）：62.1 kPa（9 psi）；
- g) 电喷雾电压（IS）：4500 V；
- h) 离子源温度（TEM）：500 °C；
- i) 定性离子对、定量离子、碰撞能量、去簇电压见表 A.1

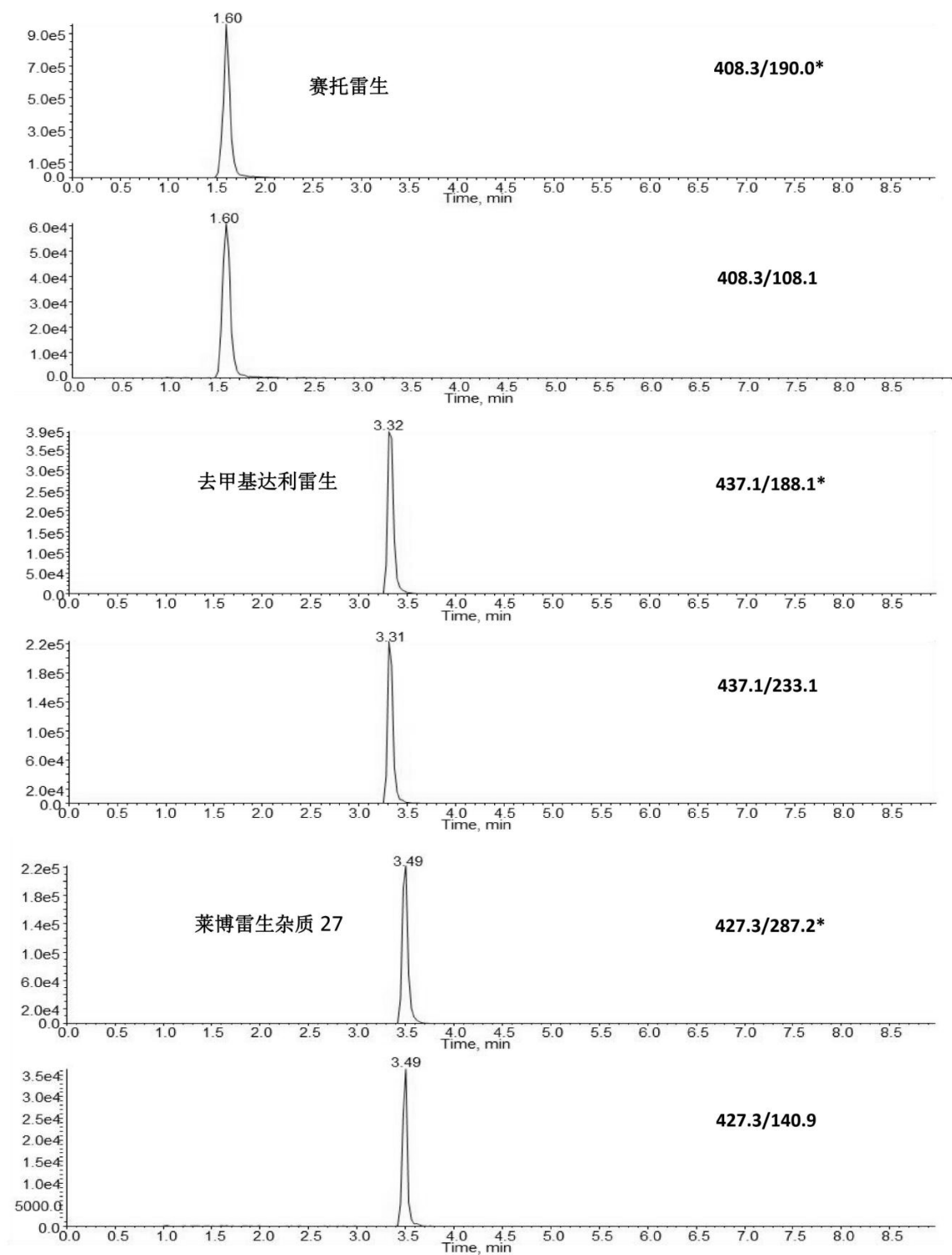
表 B.1 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
莱博雷生	411.0	287.0*	100	98	23
		125.1	100		56
苏沃雷生	451.2	186.1*	100	96	28
		104.2	100		70
沃诺雷生（福诺雷生）	448.3	285.3*	100	90	29
		186.2	100		40
达利雷生（奈莫雷生）	451.2	202.1*	100	100	40
		233.1	100		38
赛托雷生	408.3	190.0*	100	117	36
		108.1	100		48
莱博雷生杂质 27 （莱博雷生杂质 04）	427.3	287.2*	100	94	19
		140.9	100		25
去甲基达利雷生 （奈莫雷生杂质 6）	437.1	188.1*	100	98	38
		233.1	100		37
*定量离子对					

附录 C

(资料性)

7 种化合物标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



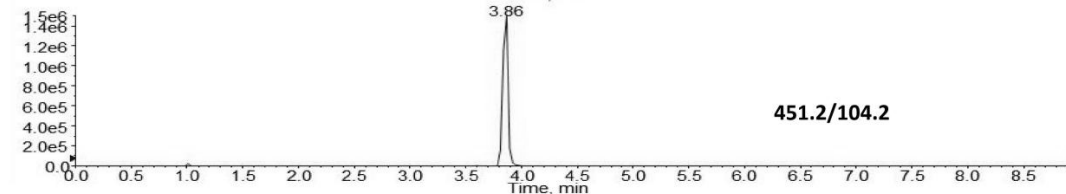
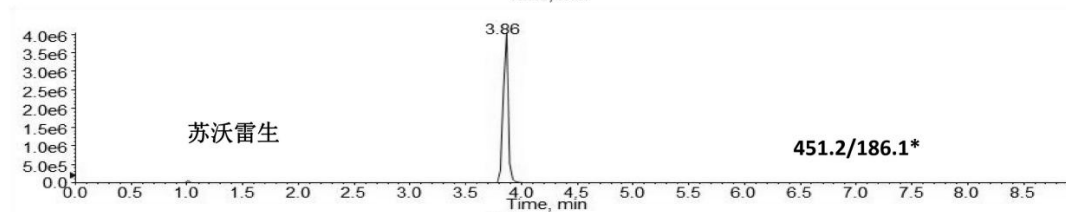
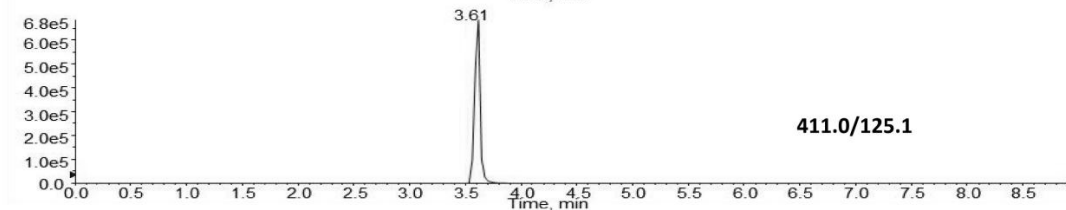
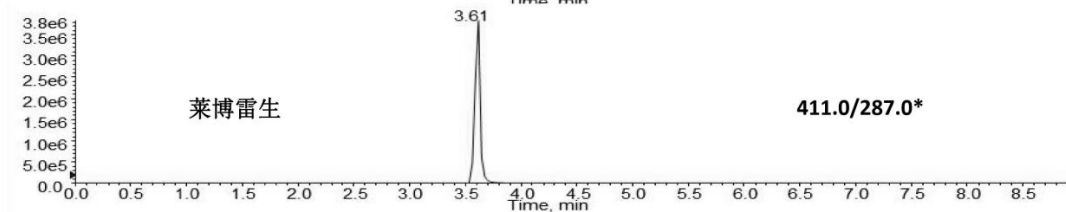
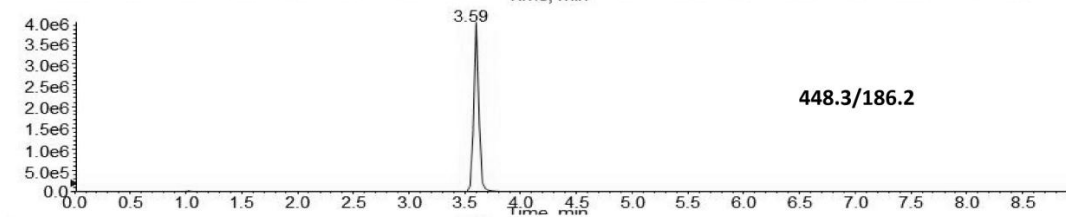
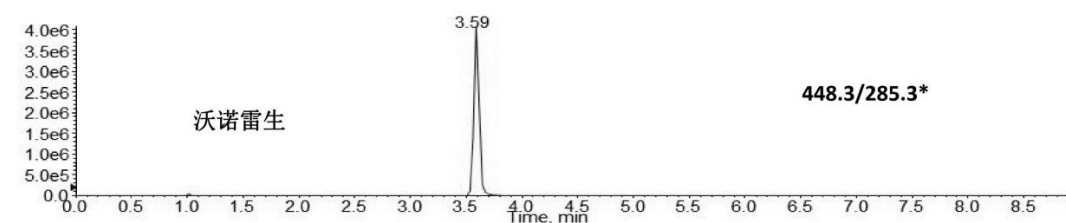
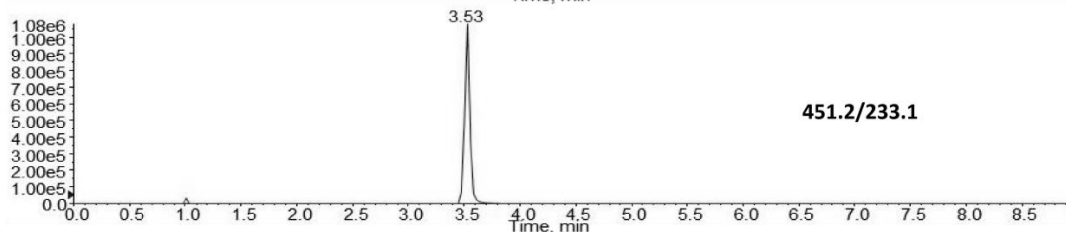
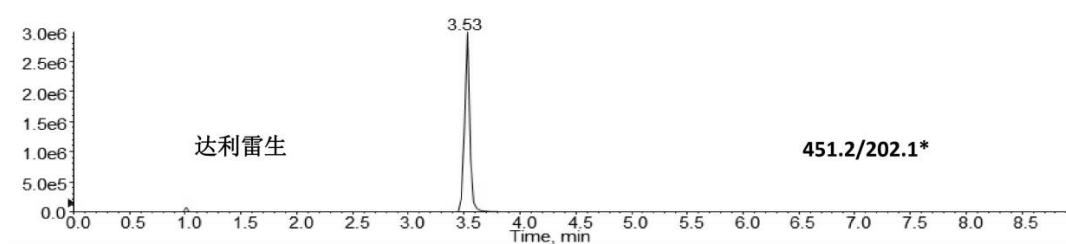


图 C.17 种化合物标准溶液 (5 ng/mL) 的多反应监测 (MRM) 色谱图

本方法负责起草单位：中国检验认证集团湖南有限公司。

本方法验证单位：长沙市食品药品检验所、湖南疾病预防控制中心、长沙海关技术中心、湖南省商品质量监督检验研究院、国检测试控股集团（湖南）华中科技大学有限公司。

本方法主要起草人：王美玲、刘向荣、杨春华、刘卉丹、王林、李光胜、钟菲菲、汪辉、陈东洋、成静、梁锋、方静、刘江花、梁香、张凤杰、欧阳丽、左家信、万杏元、王秀。