

BJS

食品补充检验方法

BJS 202212

植物源性食品中去甲乌药碱和 曲托喹酚的测定

2022-09-10 发布

植物源性食品中去甲乌药碱和 曲托喹酚的测定

1 范围

本方法规定了植物源性食品中去甲乌药碱和曲托喹酚的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于番荔枝、莲藕、莲子、莲子心、调味料及调味料制品中去甲乌药碱和曲托喹酚的定性和定量检测。

2 原理

试样用盐酸溶液提取,提取液经固相萃取柱净化后,采用液相色谱-串联质谱仪检测,内标法定量。

3 试剂与材料

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_4O)。
- 3.1.2 盐酸(HCl):质量分数 36%~38%。
- 3.1.3 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$):质量分数 25%~28%。
- 3.1.4 甲醇(CH_4O):色谱纯。
- 3.1.5 乙腈($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$):色谱纯。
- 3.1.6 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 70%甲醇溶液:量取甲醇(3.1.1)700 mL,加入 300 mL 水,混匀备用。
- 3.2.2 30%乙腈溶液:量取乙腈(3.1.5)300 mL,加入 700 mL 水,混匀备用。
- 3.2.3 0.1%甲酸水溶液:量取 1 mL 甲酸(3.1.6),溶于水并稀释至 1 000 mL。
- 3.2.4 5%氨化甲醇溶液:量取 5 mL 氨水(3.1.3),溶于甲醇(3.1.4)并稀释至 100 mL。
- 3.2.5 0.1 mol/L 盐酸溶液:量取 8.3 mL 盐酸(3.1.2),溶于水并稀释至 1 000 mL。

3.3 标准品

去甲乌药碱、盐酸曲托喹酚、去甲乌药碱- D_4 、盐酸曲托喹酚- D_9 标准品纯度 $\geq 96\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。标准品及内标英文名称、CAS 号及分子式等信息参见附录 A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液的配制(1.0 mg/mL)

分别准确称取去甲乌药碱标准品 10.00 mg、盐酸曲托喹酚标准品 11.06 mg,用甲醇(3.1.4)溶解,转

移到 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.1.4)定容至刻度,配成质量浓度为 1.0 mg/mL(分别以去甲乌药碱、曲托喹酚计)标准储备液,−18 °C 以下保存,保存期 6 个月。

3.4.2 同位素内标储备液的配制(1.0 mg/mL)

分别准确称取去甲乌药碱-D₄ 标准品 10.00 mg、盐酸曲托喹酚-D₉ 标准品 11.03 mg,用甲醇(3.1.4)溶解,转移到 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.1.4)定容至刻度,配成质量浓度为 1.0 mg/mL(分别以去甲乌药碱-D₄、曲托喹酚-D₉ 计)内标储备液,−18 °C 以下保存,保存期 6 个月。

3.4.3 混合标准中间液的配制(10 μg/mL)

分别吸取 1.0 mL 标准储备液(3.4.1)于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.1.4)定容至刻度,配成质量浓度为 10 μg/mL 的混合标准中间液,该溶液在−18 °C 以下保存,保存期 3 个月。

3.4.4 混合内标中间液的配制溶液(10 μg/mL)

分别吸取 1.0 mL 内标储备液(3.4.2)于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.1.4)定容至刻度,配成质量浓度为 10 μg/mL 的混合内标中间液,该溶液在−18 °C 以下保存,保存期 3 个月。

3.4.5 系列标准工作液

分别吸取 5 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、200 μL、400 μL 混合标准中间液(3.4.3),以及 50 μL 混合内标中间液(3.4.4),置于一组 10 mL 容量瓶中,用 30%乙腈溶液(3.2.2)定容,配制成 5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL 的系列标准工作液,其中内标质量浓度为 50.0 ng/mL,现用现配。

3.5 材料

3.5.1 混合型阳离子交换固相萃取柱(6 mL,150 mg),或性能相当者。

3.5.2 微孔滤膜:0.22 μm,有机相。

3.5.3 离心管:PS 聚乙烯,50 mL。

4 仪器与设备

4.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪:配有电喷雾电离源(ESI)。

4.2 分析天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 01 g。

4.3 组织捣碎机。

4.4 超声波清洗器。

4.5 涡漩混合器。

4.6 正压固相萃取仪。

4.7 离心机:≥10 000 r/min。

4.8 氮吹仪。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 番荔枝、莲藕、莲子、莲子心类样品

取样品的可食部分 500 g,经高速组织捣碎机均匀捣碎,将其搅拌均匀,加封后标明标记,制备好的

试样-18℃以下避光保存。

5.1.2 调味料及调味料制品类样品

经高速组织捣碎机制成粉末,过40目(孔径0.45 mm)筛,将其搅拌均匀,加封后标明标记,制备好的试样常温避光保存。

5.2 试样处理

5.2.1 提取

准确称取2 g试样(精确至0.01 g)置于50 mL塑料离心管中,加入10 μL的10 μg/mL混合内标中间液(3.4.4),加入15 mL 0.1 mol/L盐酸溶液(3.2.5),涡漩混匀1 min,超声提取20 min。于4℃条件下9 000 r/min离心5 min,取全部上清液过滤,待净化。

5.2.2 净化

混合型阳离子固相萃取柱,使用前依次用5 mL甲醇(3.1.1)、5 mL水、5 mL 0.1 mol/L盐酸溶液(3.2.5)活化固相萃取柱,将5.2.1中所得提取溶液以不大于1 mL/min的速度通过固相萃取柱,依次用5 mL 0.1 mol/L盐酸溶液(3.2.5)、5 mL水、5 mL 70%甲醇溶液(3.2.1)淋洗柱子,弃去淋洗液,真空抽干2 min。用5 mL的5%氨化甲醇溶液(3.2.4)进行洗脱,将收集的样液于40℃氮吹至近干,加入2 mL 30%乙腈溶液(3.2.2),过0.22 μm的微孔滤膜(3.5.2),滤液待测定。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:C₁₈色谱柱,1.7 μm,100 mm×3.0 mm(i.d.),或性能相当者;
- 流动相:A相为0.1%甲酸水溶液(3.2.3),B相为乙腈(3.1.5),梯度洗脱条件见表1;

表1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
2	40	60
3	1	99
4	1	99
4.1	90	10
5.5	90	10

- 流速:0.35 mL/min;
- 柱温:40℃;
- 进样量:2 μL。

5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 电离方式:电喷雾电离(ESI+);

- b) 离子化电压:5 500 V;
 c) 干燥气: N_2 ;干燥气温度:550 °C;气帘气压力:152 kPa;
 d) 检测方式:多反应监测(MRM);
 e) 喷雾气:氮气,压力 379 kPa;辅助加热气:氮气,压力 414 kPa;
 f) 其他参考质谱参数见表 2。

表 2 其他参考质谱参数

化合物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
去甲乌药碱	272.1	107.0 ^a	100	30
	272.1	161.0	100	24
曲托喹酚	346.2	164.1 ^a	100	20
	346.2	137.1	100	57
去甲乌药碱- D_4	276.1	108.1	100	30
曲托喹酚- D_9	355.0	164.1	100	20

^a 为定量离子。

5.4 标准曲线的制作

将质量浓度为 5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL 的系列标准工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪中,测定相应的峰面积,以系列标准工作液中目标化合物的浓度为横坐标,以峰面积的响应值与内标峰面积的响应值的比值为纵坐标,绘制标准曲线。去甲乌药碱、曲托喹酚及其内标标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图参见附录 B。

5.5 试样溶液的测定

5.5.1 定性测定

在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内;且试样中被测组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

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
允许相对偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

5.5.2 定量测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中,得到相应的峰面积,根据标准曲线得到待测液中去甲乌药碱、曲托喹酚的浓度。

用标准工作曲线对试样进行定量,应使试样溶液被测物质的响应值在仪器测定的线性范围内,若被测物质含量超出标准曲线的测定范围,则应重新处理试样,适量减少称样量或提高试样的定容体积,并相应调整内标添加量,使最终上样溶液中内标浓度与标准溶液中内标浓度保持一致,使其上机浓度在线性范围内再进行定量。

5.6 空白试验

除不加试样外,完全按照上述操作步骤进行。

6 结果计算

试样中被测组分含量按式(1)计算:

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

式中:

- X —— 试样中被测组分含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- ρ —— 试样测定液中被测物质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 试样测定液定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样取样量,单位为克(g);
- 1 000—— 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,计算结果保留三位有效数字。

7 精密度

在重复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

当取样量为 2 g 时,去甲乌药碱、曲托啉酚的检出限为 5 μg/kg,定量限为 10 μg/kg。

附 录 A

(资料性)

去甲乌药碱和盐酸曲托喹酚标准品及内标的基本信息

去甲乌药碱和盐酸曲托喹酚标准品及内标的中文名称、英文名称、分子式、CAS 号及相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 去甲乌药碱和盐酸曲托喹酚标准品及内标的基本信息

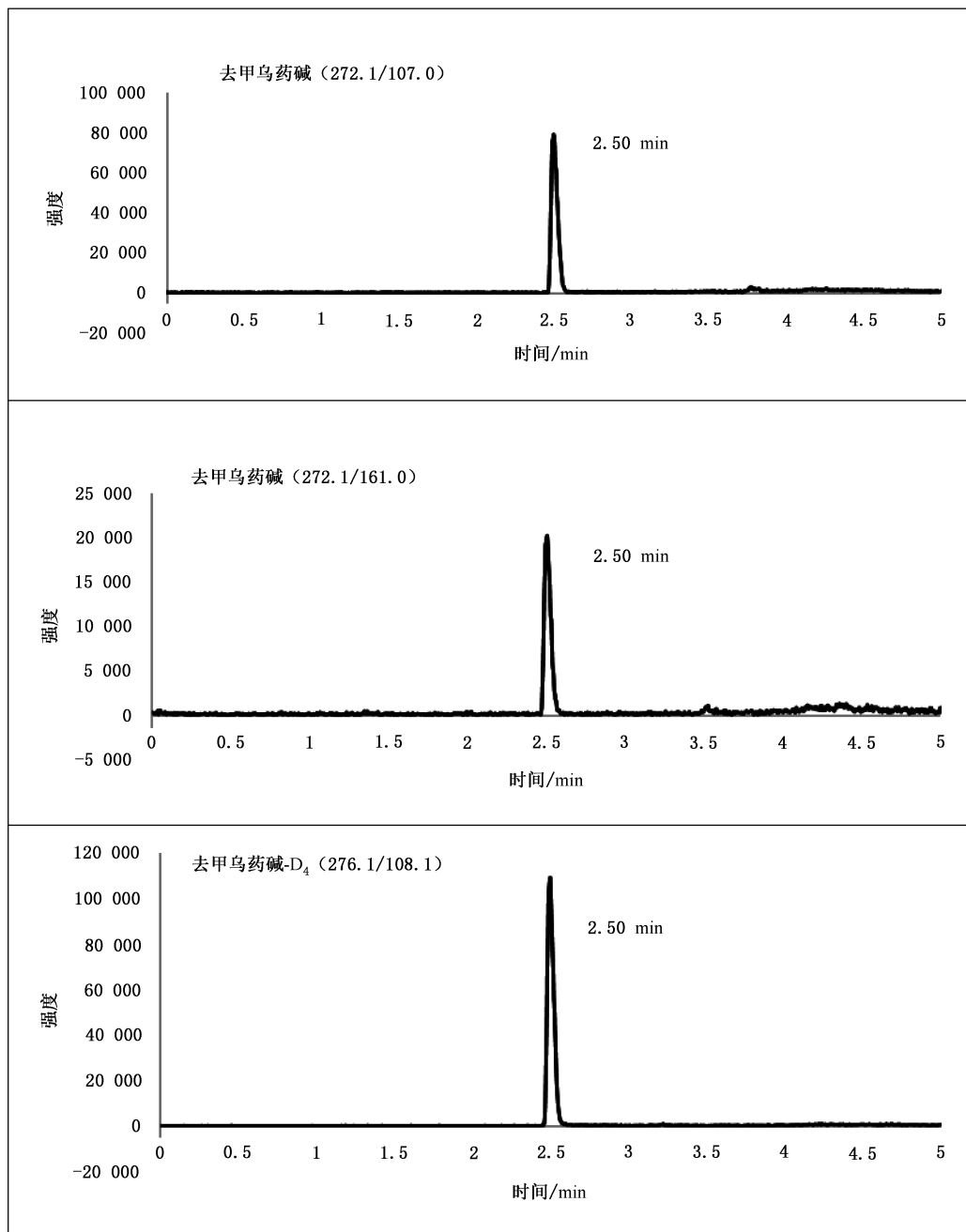
中文名称	英文名称	分子式	CAS 号	相对分子质量
去甲乌药碱	Higenamine	$C_{16}H_{17}NO_3$	5843-65-2	271.37
盐酸曲托喹酚	Tretoquinol · HCl	$C_{19}H_{24}ClNO_5$	18559-59-6	381.85
去甲乌药碱-D ₄	Higenamine -D ₄	$C_{16}H_{13}D_4NO_3$	—	275.34
盐酸曲托喹酚-D ₉	Tretoquinol-D ₉ · HCl	$C_{19}H_{15}D_9ClNO_5$	—	390.91

附录 B

(资料性)

去甲乌药碱、曲托唑酚及其内标标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

B.1 去甲乌药碱及其内标标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图见图 B.1。

图 B.1 去甲乌药碱、去甲乌药碱-D₄ 标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

B.2 曲托唑酚及其内标标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图见图 B.2。

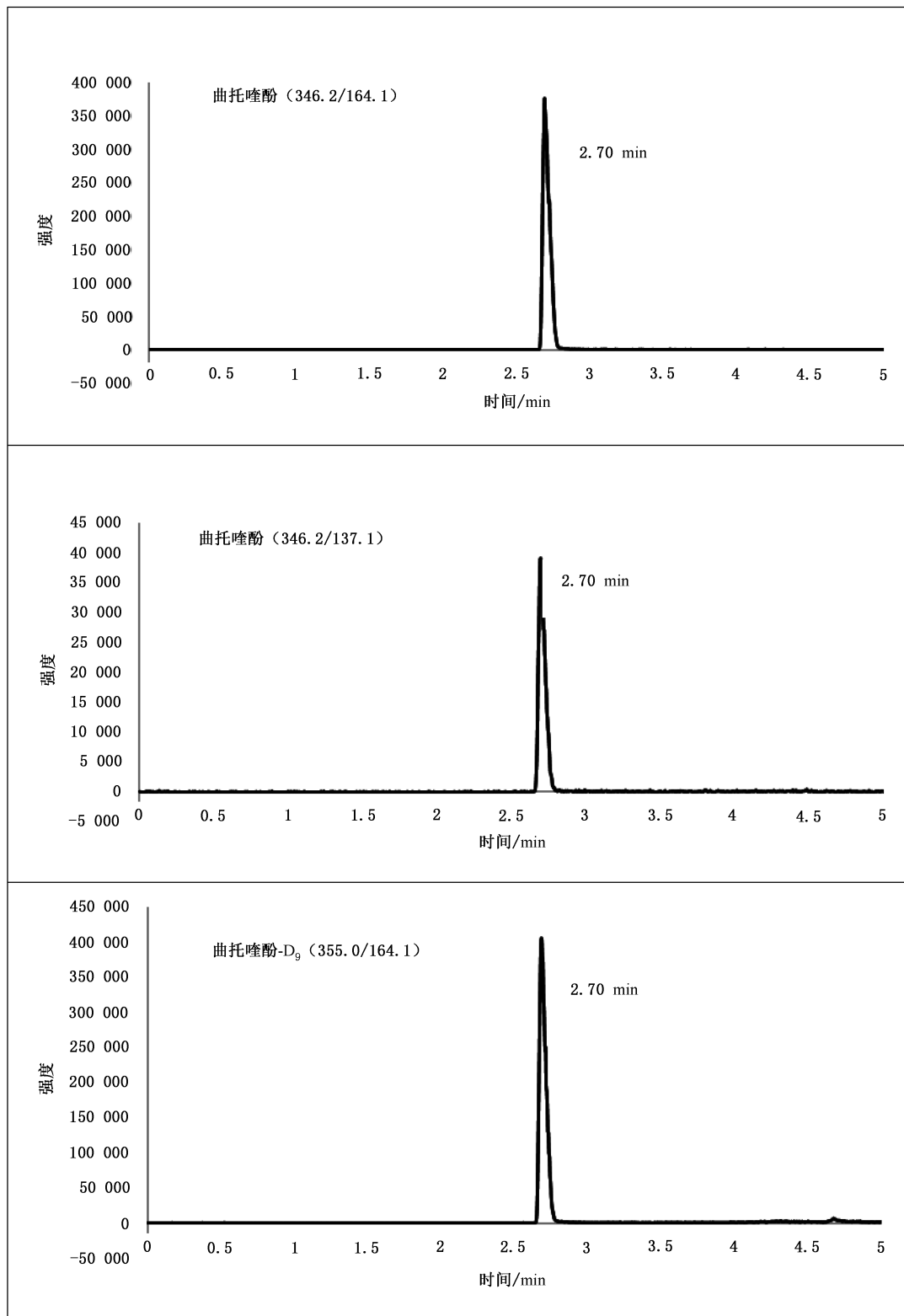


图 B.2 曲托嗹酚、曲托嗹酚-D₉ 标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

本方法负责起草单位:北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所)。

本方法参与验证单位:中国检验检疫科学研究院、上海市食品药品检验研究院、武汉食品化妆品检验所、中国食品药品检定研究院、天津市食品安全检测技术研究院。

本方法主要起草人:林立、姜洁、穆同娜、赵文霞、裴帆、刘琪、史海良、王奕寒。