

BJS

食品补充检验方法

BJS 202103

蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

××××-××-××发布

国家市场监督管理总局

发布

蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本方法规定了蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的液相色谱-串联质谱测定方法。
本方法适用于蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的测定。

2 原理

采用含三氯乙酸的磷酸盐缓冲溶液提取试样中的链霉素和双氢链霉素,经离心和过滤后,HLB 固相萃取柱进行净化富集,用液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 3.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。
- 3.1.4 三氯乙酸(Cl_3CCOOH)。
- 3.1.5 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.6 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$):含量为 25%~28%。
- 3.1.7 氢氧化钠(NaOH)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 10 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 40 g 氢氧化钠(3.1.7),用水溶解,冷却至室温后,定容至 100 mL。
- 3.2.2 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 2 g 氢氧化钠(3.1.7),用水溶解,冷却至室温后,定容至 100 mL。
- 3.2.3 提取液(含 2%三氯乙酸的磷酸盐缓冲溶液):称取 20 g 三氯乙酸(3.1.4),加入约 400 mL 水溶解,再称取 6.80 g 磷酸二氢钾(3.1.5)加入至上述三氯乙酸溶液中,继续加入 400 mL 水溶解,混匀后,用氢氧化钠溶液(3.2.1 和 3.2.2)调节 pH 值至 6.8,加水定容至 1 000 mL,摇匀后备用。
- 3.2.4 洗脱溶液:分别准确移取 2.0 mL 甲酸(3.1.3)和 5.0 mL 乙腈(3.1.1)于 100 mL 容量瓶中,用水定容至 100 mL,摇匀后备用。临用前配制。
- 3.2.5 2%氨化乙腈:移取 2.0 mL 氨水(3.1.6)于 100 mL 容量瓶中,用乙腈(3.1.1)定容至 100 mL,摇匀后备用。临用前配制。
- 3.2.6 0.5%甲酸溶液:准确移取 2.50 mL 甲酸(3.1.3),用水定容至 500 mL,混匀。临用前配制。

3.3 标准品

3.3.1 硫酸链霉素标准品($C_{42}H_{84}N_{14}O_{36}S_3$, CAS号:3810-74-0, 相对分子质量 1457.38): 经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 硫酸双氢链霉素标准品($C_{42}H_{88}N_{14}O_{36}S_3$, CAS号:5490-27-7, 相对分子质量 1461.41): 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 硫酸链霉素标准储备液(1 mg/mL, 以链霉素计): 准确称取 62.6 mg 硫酸链霉素标准物质(精确至 0.01 mg)于小烧杯中, 用水溶解并转移至 50 mL 容量瓶, 最后用水定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, -18°C 避光保存, 有效期 6 个月。

注 1: 若采用其他形式的标准物质, 需进行相对分子质量折算后再进行标准品称量。

注 2: 若经常使用, 建议将标准储备液分装成小包装, 每次将小包装解冻使用。

3.4.2 硫酸双氢链霉素标准储备液(1 mg/mL, 以双氢链霉素计): 准确称取 62.6 mg 硫酸双氢链霉素标准物质(精确至 0.01 mg)于小烧杯中, 用水溶解并转移至 50 mL 容量瓶, 最后用水定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 1 mg/mL 标准储备液, -18°C 避光保存, 有效期 6 个月。

注 1: 若采用其他形式的标准物质, 需进行相对分子质量折算后再进行标准品称量。

注 2: 若经常使用, 建议将标准储备液分装成小包装, 每次将小包装解冻使用。

3.4.3 混合标准溶液: 准确移取 1.00 mL 链霉素标准储备液(3.4.1)、1.00 mL 双氢链霉素标准储备液(3.4.2), 置于同一 10 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液, $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 有效期 1 个月。

3.4.4 混合标准中间溶液: 将链霉素和双氢链霉素混合标准溶液(3.4.3), 用水逐级稀释成质量浓度分别为 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间溶液。临用现配。

3.5 材料

3.5.1 固相萃取柱(60 mg, 3 mL): *N*-乙基吡咯烷酮和二乙基苯亲水亲脂平衡型填料或相当者。

3.5.2 定量滤纸。

3.5.3 微孔滤膜: 有机相(尼龙), 孔径 0.22 μm 。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪: 配有电喷雾离子源(ESI源)。

4.2 电子天平: 感量分别为 0.01 mg 和 0.001 g。

4.3 涡漩振荡器。

4.4 超声波清洗器。

4.5 离心机: 转速不低于 8 000 r/min。

5 试样制备与保存

5.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品, 将其搅拌均匀。对有结晶的样品, 检验前, 在密闭情况下, 置于不超过 60°C 的水浴中温热, 振荡, 待样品全部融化后搅匀, 分出 0.5 kg 作为试样, 装入洁净容器中, 迅速冷却至室温, 密封并标记。

5.2 试样的保存

将试样于常温下保存。

6 分析步骤

6.1 提取

准确称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 提取液(3.2.3)涡漩混匀 1 min,超声提取 15 min,取出后,将溶液转移至 25 mL 容量瓶中,用适量提取液(3.2.3)洗涤上述离心管,合并洗涤液至容量瓶中,用提取液(3.2.3)定容至 25 mL 刻度,摇匀,转移至 50 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,上清液待用。若样品中有少量花粉,可用定量滤纸过滤,弃去最初的 5 mL 滤液,收集剩余滤液待净化。

6.2 净化

依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化固相萃取柱(3.5.1)。准确移取 5.0 mL 上清液或滤液(6.1),以不高于 1 mL/min 的流速全部通过固相萃取柱,弃去流出液;用水淋洗两次,每次 2 mL;将小柱抽干,准确加入 1.0 mL 洗脱溶液(3.2.4)进行洗脱,控制液体流速不超过 1 mL/min,收集全部洗脱液。用氨化乙腈(3.2.5)定容至 2.0 mL,混匀后,经微孔滤膜(3.5.3)过滤,供液相色谱-串联质谱仪分析。

6.3 基质混合标准溶液的制备

称取经质谱确认不含链霉素和双氢链霉素的阴性蜂蜜样品 5 份,每份 5 g(精确至 0.01 g),分别加入适量混合标准中间溶液(3.4.4),制成链霉素和双氢链霉素含量均为 5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基质样品,其余按 6.1 和 6.2 的步骤操作完成,对应测试液质量浓度分别为 2.50 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL,或者根据仪器响应与实际情况配制适当浓度范围的标准曲线。

6.4 测定条件

6.4.1 参考液相色谱条件

参考液相色谱条件如下:

- 色谱柱: SIELC Obelisc R 阳离子交换色谱柱(镶嵌羧酸类基团)(150 mm \times 2.1 mm, 5 μm),或性能相当者。
- 流动相: A 为乙腈(3.1.1), B 为 0.5% 甲酸溶液(3.2.6), 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	75	25
0.5	75	25
3.8	45	55
5.0	45	55
6.0	10	90

表 1 (续)

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
8.5	10	90
8.6	75	25
14.0	75	25

c) 流速:0.3 mL/min。

d) 柱温:40 °C。

e) 进样量:5 μ L。

6.4.2 参考质谱条件

参考质谱条件如下:

a) 离子源:电喷雾离子源(ESI 源)。

b) 检测方式:多反应监测(MRM)。

c) 扫描方式:正离子模式扫描。

d) 电喷雾电压:5 500 V。

e) 雾化器压力:344.7 kPa(50 psi)。

f) 气帘气压力:137.9 kPa(20 psi)。

g) 辅助气压力:344.7 kPa(50 psi)。

h) 碰撞气压力:55.2 kPa(8 psi)。

i) 离子源温度:550 °C。

j) 两个四极杆均采用单位质量分辨。

k) 雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。定性离子对、定量离子对、驻留时间、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2 链霉素和双氢链霉素的质谱参数

化合物	离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 V	驻留时间 ms	碰撞能 V
链霉素	582.0/263.0	582.0/263.0	220	100	49
	582.0/246.0				43
双氢链霉素	584.0/263.0	584.0/263.0	220	100	49
	584.0/246.0				41

注: 6.4.2 的质谱条件仅供参考,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。

6.4.3 标准工作曲线制作

在仪器最佳工作条件下,对链霉素和双氢链霉素的基质混合标准溶液(6.3)进行测定,以基质混合标准溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。链霉素和双氢链霉素的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

6.4.4 定性确证

按照 6.4.1 和 6.4.2 的条件测定试样和基质混合标准溶液。试样中目标化合物的色谱峰保留时间与基质混合标准溶液保留时间相比较,变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内。

试样中目标化合物的两个子离子应出现,对同一化合物,试样中目标化合物的两个子离子的相对丰度与浓度相当的混合基质标准校准溶液相比,其允许偏差不超过表 3 规定的范围,则可判断样品中存在对应的目标物。

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 $k/\%$	$k > 50$	$20 < k \leq 50$	$10 < k \leq 20$	$k \leq 10$
允许的相对偏差/ $\%$	± 20	± 25	± 30	± 50

6.4.5 定量测定

试样中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围内,若含量超出线性范围,需重新加标制作基质混合标准溶液,将试样与基质混合标准溶液同步稀释后上机测定。链霉素、双氢链霉素的添加浓度及平均回收率的实验数据参见附录 B 中表 B.1。

6.4.6 空白试验

除不加试样外,均按试样同法操作。

7 结果计算

样品中链霉素和双氢链霉素的残留量按式(1)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times f}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——试样中各待测组分 i ($i=1,2$) 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ_i ——从标准工作曲线得到的被测组分 i ($i=1,2$) 溶液质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试样制备过程中的稀释倍数;

m ——称样量,单位为克(g)。

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,结果保留三位有效数字。

计算结果应扣除空白值。

8 测定结果的表述

$$X = X_1 + X_2 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中链霉素与双氢链霉素总量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

X_1, X_2 ——试样中链霉素和双氢链霉素的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

本方法链霉素/双氢链霉素的残留量测定结果指链霉素和双氢链霉素残留量之和。

9 检测方法的灵敏度、准确度、精密度

9.1 灵敏度

当称样量为 5 g 时,本方法中链霉素和双氢链霉素的测定的检出限均为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,回收率为 80%~120%。

9.3 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%。

附录 A

(资料性)

链霉素和双氢链霉素特征离子色谱图

空白荆条蜂蜜中链霉素和双氢链霉素添加 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 MRM 色谱图见图 A.1。

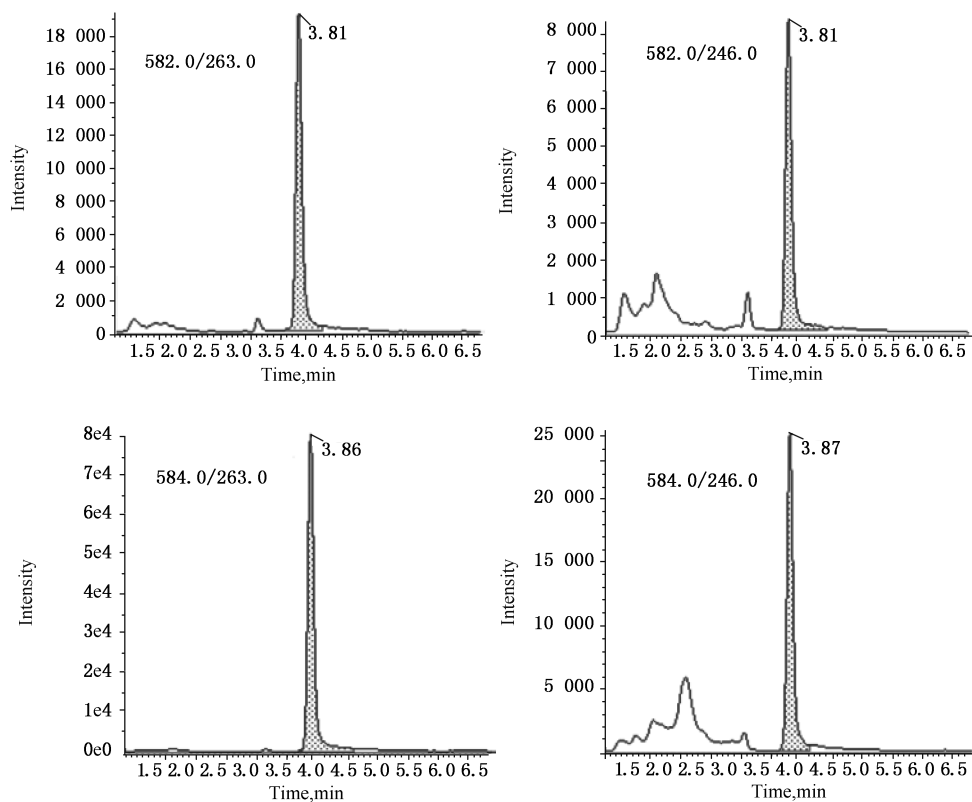


图 A.1 空白荆条蜂蜜中链霉素和双氢链霉素添加 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 MRM 色谱图

附录 B

(资料性)

回收率

洋槐蜂蜜、枣花蜂蜜和荆条蜂蜜中分别进行低、中、高三个浓度水平的加标回收率试验,每个浓度水平平行测定 6 次,回收率及相对标准偏差的试验数据见表 B.1。

表 B.1 链霉素和双氢链霉素的平均回收率及其相对标准偏差的试验数据

化合物	加标水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	洋槐蜂蜜		枣花蜂蜜		荆条蜂蜜	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
链霉素	5.00	90.2	5.68	86.9	1.67	92.2	5.18
	20.0	96.4	6.90	97.3	6.05	111.7	3.08
	100	108.2	6.52	109.1	4.79	110.5	3.39
双氢链霉素	5.00	94.0	4.86	93.3	2.88	97.5	2.34
	20.0	104.0	3.72	103.3	1.66	109.3	3.16
	100	113.2	2.13	113.0	1.23	111.3	3.24

本方法负责起草单位:山东省食品药品检验研究院。

本方法验证单位:北京市食品安全监控和风险评估中心、上海市质量监督检验技术研究院、四川省食品药品检验检测院、武汉食品化妆品检验所、上海市食品药品检验所。

本方法主要起草人:薛霞、魏莉莉、刘艳明、王骏、卢兰香、胡梅。