

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5521—2023

进口麦卢卡蜂蜜中 5 种特征物质的测定
液相色谱-质谱/质谱法

Determination of five characteristic substances in import manuka
honey—Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2023-11-01 发布

2024-05-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国南京海关、中华人民共和国秦皇岛海关、中华人民共和国合肥海关、中华人民共和国深圳海关、中华人民共和国上海海关、中华人民共和国重庆海关。

本文件主要起草人：林宏、柳菡、张晓燕、丁涛、侯燕、李静静、刘芸、崔宗岩、韩芳、罗耀、张萍、韩燃、张普霞、俞玉莲、张文国、伊雄海、李贤良。

以正式出版文本为准

进口麦卢卡蜂蜜中 5 种特征物质的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了进口麦卢卡蜂蜜中 2'-甲氧基苯乙酮、2-甲氧基苯甲酸、3-苯基乳酸、4-羟基苯基乳酸和 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯-4-双葡萄糖糖苷的液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本文件适用于进口麦卢卡蜂蜜中 2'-甲氧基苯乙酮、2-甲氧基苯甲酸、3-苯基乳酸、4-羟基苯基乳酸和 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯-4-双葡萄糖糖苷的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法提要

试样用甲酸水溶液涡旋溶解后,采用固相萃取法进行前处理,液相色谱-质谱/质谱法进行定量检测。

5 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈:色谱纯。

5.1.2 甲酸:色谱纯。

5.1.3 甲醇:色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 1%甲酸水溶液:准确量取甲酸 1 mL,至 100 mL 容量瓶,加水定容至刻度。

5.2.2 乙腈-甲酸-水溶液(10+1+89,体积比):准确量取乙腈 10 mL 和甲酸 1 mL 至 100 mL 容量瓶,加水定容至刻度。

5.2.3 0.1%甲酸乙腈溶液:准确量取甲酸 1 mL 至 1 000 mL 容量瓶,加乙腈定容至刻度。

5.2.4 0.1%甲酸水溶液:准确量取甲酸 1 mL 至 1 000 mL 容量瓶,加水定容至刻度。

5.3 标准物质

5.3.1 2'-甲氧基苯乙酮标准品(2'-methoxyacetophenone,2'-MAP,C₉H₁₀O₂,CAS号:579-74-8):纯度大于97%。

5.3.2 2-甲氧基苯甲酸标准品(2-methoxybenzoic acid,2-MBA,C₈H₈O₃,CAS号:579-75-9):纯度大于98%。

5.3.3 3-苯基乳酸标准品(3-phenyllactic acid,3-PA,C₉H₁₀O₃,CAS号:20312-36-1):纯度大于98%。

5.3.4 4-羟基苯基乳酸标准品(4-hydroxyphenyllactic acid,4-HPA,C₇H₆O₃,CAS号:99-96-7):纯度大于98%。

5.3.5 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯-4-双葡萄糖糖苷标准品(leptosperin,C₂₂H₃₂O₁₅,CAS号:1431845-42-9):纯度大于99%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液

分别称取适量 2'-MAP,2-MBA,4-HPA 标准品,用甲醇配成 1.00 g/L 的标准储备液。分别称取适量 3-PA、leptosperin 标准品,用甲醇配成 10.0 g/L 的标准储备液。上述标准储备液均 4 ℃ 避光贮存,有效期 6 个月。

5.4.2 标准工作溶液

根据需要,移取适量各标准储备液,用乙腈-甲酸-水溶液逐级稀释成标准工作溶液,现用现配。

5.5 耗材

5.5.1 固相萃取柱:填料为键合有二乙烯基苯和 N-乙烯基吡咯烷酮的大孔聚合物,60 mg,3 mL。

5.5.2 微孔滤膜:0.45 μm,有机型。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配有电喷雾离子源。

6.2 固相萃取装置。

6.3 涡旋混合器。

6.4 超纯水仪。

6.5 分析天平:感量分别为 0.000 1 g 和 0.001 g。

7 样品的制备与保存

7.1 试样制备

对无结晶的蜂蜜样品,将其搅拌均匀。对有结晶析出的蜂蜜样品,在密闭情况下,将样品瓶置于不超过 60 ℃ 的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,迅速冷却至室温,在融化时应注意防止水分挥发。分出 500 g,装入洁净容器,密封,标明标记。在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

7.2 试样保存

试样于常温状态下保存。

8 测定步骤

8.1 样品前处理

准确称取 1 g(精确至 0.001 g)均质蜂蜜样品至 50 mL 带盖聚四氟乙烯离心管,取适量 1%甲酸水溶液涡旋溶解。转移溶液至 50 mL 容量瓶并定容(实际分析中根据蜂蜜中特征化合物含量稀释到标曲线性范围内)。准确移取 10 mL 上述溶液加入经 3 mL 甲醇活化,6 mL 水平衡后的固相萃取柱,3 mL 水淋洗,2 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液并用乙腈-甲酸-水溶液(10+1+89,体积比)定容至 10 mL,取 1 mL 过 0.45 μm 微孔滤膜至进样瓶,待仪器分析。

8.2 液相色谱条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} (50 mm \times 2.1 mm,1.9 μm)色谱柱,或相当者;
- 流动相:A相:0.1%甲酸水溶液;B相:0.1%甲酸乙腈溶液;
- 流速:0.2 mL/min;
- 梯度洗脱:洗脱程序参见表 A.1;
- 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样体积:2 μL 。

8.3 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 扫描方式:3-PA,4-HPA,leptosperin 采用电喷雾负离子扫描模式(ESI⁻);2'-MAP 和 2-MBA 采用电喷雾正离子扫描模式(ESI⁺);
- 检测方式:多重反应监测模式(MRM);
- 其他质谱条件参见附录 A。

8.4 液相色谱-质谱/质谱测定及确证

8.4.1 定性测定

被测目标化合物选择一个母离子,2个及以上子离子,在相同实验条件下,样品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;且样品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 1 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测目标化合物。5种化合物的MRM色谱图参见图 B.1。

表 1 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
允许的最大偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

8.4.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下将标准工作溶液进样,以峰面积为纵坐标,标准工作溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内(如果样品溶液中待测物的响应值超出线性范围,可相应调整标准工作溶液浓度,或对样品溶液进行适当稀释)。

8.5 平行试验

按以上步骤(8.1),对同一试样进行平行试验测定。

8.6 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤(8.1)进行。

9 结果计算和表述

结果按照公式(1)计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中目标物的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c —— 由标准曲线得到的目标物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- c_0 —— 由标准曲线得到的空白实验中目标物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V_1 —— 样品提取定容体积,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 经固相萃取柱净化的样品溶液体积,单位为毫升(mL);
- V_3 —— 样品最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 称样量,单位为克(g);
- 1 000 —— 换算系数。

计算结果应扣除空白值,以重复性条件下 2 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。

10 定量限、回收率和精密度

10.1 定量限

2'-MAP、2-MBA、4-HPA 的定量限为 0.500 mg/kg, 3-PA 和 leptosperin 的定量限为 5.00 mg/kg。

10.2 回收率和精密度

5 种特征物质在麦卢卡蜂蜜中的添加回收率和精密度参见附录 C。

附录 A

(资料性)

仪器条件

A.1 表 A.1 给出了高效液相色谱的洗脱程序。

表 A.1 高效液相色谱梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	0.1%甲酸水溶液 %	0.1%甲酸乙腈溶液 %
0	0.2	95	5
0.75	0.2	95	5
2.0	0.2	85	15
4.0	0.2	30	70
6.0	0.2	2	98
6.5	0.2	2	98
7.0	0.2	95	5
10.0	0.2	95	5

A.2 其他质谱条件如下：

- a) 毛细管温度:500 ℃；
- b) 气帘气压力:207 kPa；
- c) 雾化气压力:345 kPa；
- d) 辅助加热气压力:345 kPa；
- e) 离子化电压:5 500 V(正离子模式),-4 500 V(负离子模式)。

A.3 表 A.2 给出了 5 种目标化合物母离子、子离子和碰撞电压。

表 A.2 5 种目标化合物的质谱检测参数

化合物	极性	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压 V
2'-MAP	正	150.8	76.9	40
		150.8	103.1 ^a	30
2-MBA	正	152.9	77.0 ^a	30
		152.9	91.9	38
3-PA	负	164.9	103.2 ^a	-22
		164.9	73.0	-24
4-HPA	负	181.1	119.0	-30
		181.1	133.8 ^a	-22

表 A.2 (续)

化合物	极性	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压 V
Leptosperin	负	581.4	196.0	-35
		581.4	210.7 ^a	-35
^a 定量离子。				

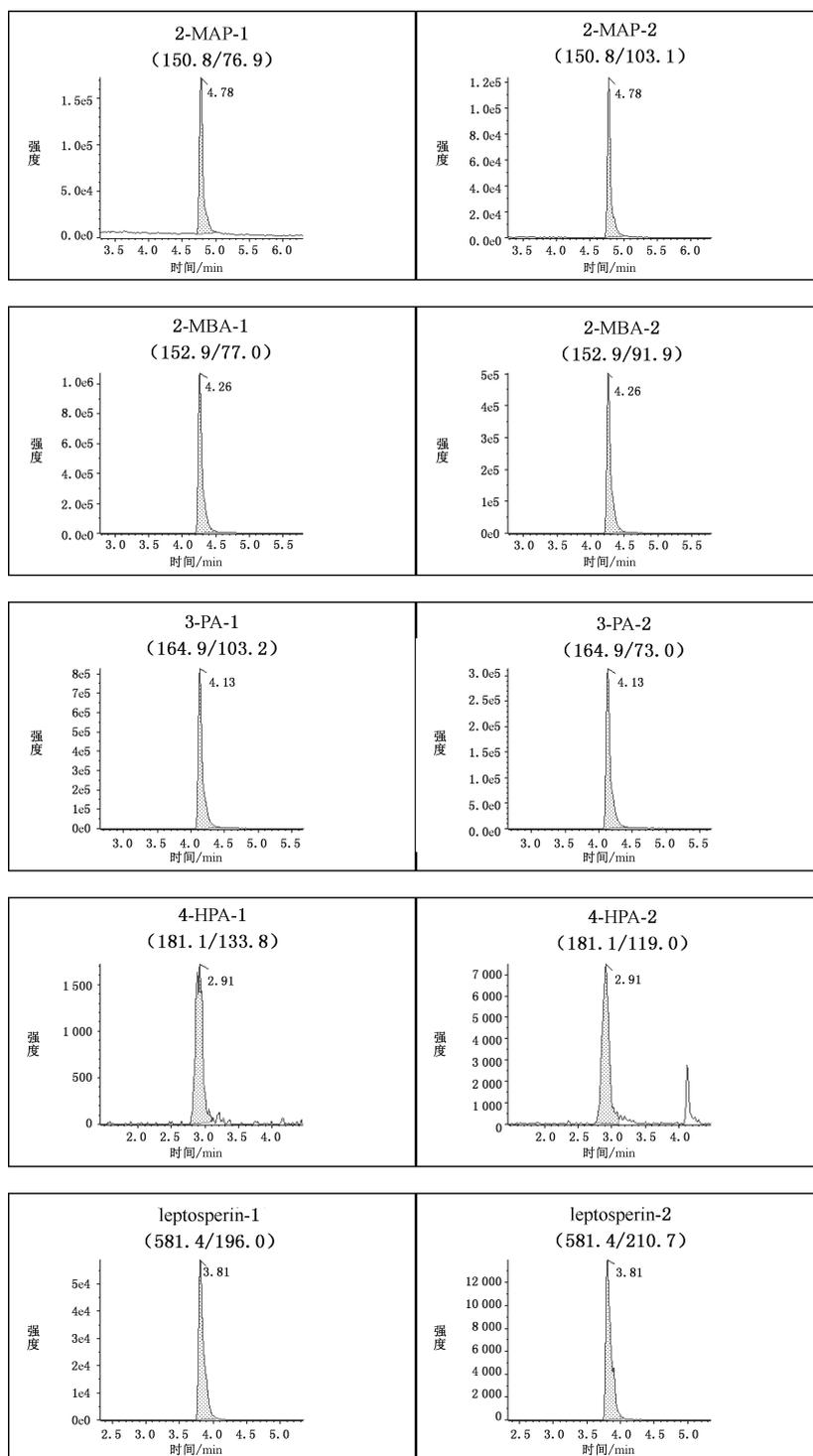
以正式出版文本为准

附录 B

(资料性)

5 种特征物质多反应监测离子色谱图

图 B.1 给出了 5 种化合物的多反应监测离子色谱图。

图 B.1 5 种化合物多反应监测色谱图(2'-MAP、2-MBA、4-HPA 为 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 3-PA、leptosperin 为 2.0 $\mu\text{g/mL}$)

附 录 C
(资料性)
回收率和精密度

表 C.1 给出了麦卢卡蜂蜜中 2'-MAP、2-MBA、4-HPA、3-PA 和 leptosperin 的回收率和精密度。

表 C.1 麦卢卡蜂蜜中 5 种特征物质的回收率和精密度($n=6$)

化合物	本底 mg/kg	添加水平 1 mg/kg	回收率 %	相对标准偏差 %	添加水平 2 mg/kg	回收率 %	相对标准偏差 %	添加水平 3 mg/kg	回收率 %	相对标准偏差 %
2'-MAP	1.14	1.0	89.0-107	6.8	5.0	92.6-105	4.2	10	93.6-104	3.7
2-MBA	1.44	1.0	87.0-102	5.5	5.0	91.8-104	4.6	10	92.6-102	4.3
3-PA	29.9	20	87.5-107	7.4	100	89.1-105	5.9	400	93.8-103	3.2
4-HPA	1.75	1.0	83.0-98.0	6.0	5.0	91.4-101	4.4	10	91.5-104	4.3
leptosperin	127	50	94.0-108	7.1	100	87.0-101	6.1	200	91.0-104	5.0