



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4318—2015

出口食品中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素含量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

**Determination of coumarin,6-methylcoumarin, dihydrocoumarin,
7-methoxycoumarin, acenocoumarol, 7-ethoxy-4-methylcoumarin residues in
foods for export—LC/MS/MS method**

2015-09-02 发布

2016-04-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

前 言

本标准按照GB/T1.1—2009、GB/T 20001.4—2001和 SN/T 0001—1995给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵晓亚、付晓芳、张剑锋、王鹏、李晶、叶诚、尚吟竹、胡小钟。

出口食品中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素含量的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了出口食品中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于出口饼干、饮料(包括含酒精饮料)冰淇淋和口香糖中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定及确证。

2 方法提要

饼干、饮料(包括含酒精饮料)、冰淇淋样品中的香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素用无水乙醇提取、口香糖样品中的香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素用甲醇和水提取；固相萃取小柱净化后，用液相色谱串联质谱法进行测定，外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为超纯水。

- 3.1 甲醇：色谱纯。
- 3.2 无水乙醇。
- 3.3 乙腈：色谱纯。
- 3.4 无水硫酸钠。
- 3.5 甲醇-水(1+9, 体积比): 10 mL 甲醇，用水定容至100 mL。
- 3.6 甲醇-水(1+1, 体积比): 50 mL 甲醇，用水定容至100 mL。
- 3.7 0.005 mol/L 醋酸铵溶液：称取0.3854 g 醋酸铵，以水溶解定容至1000 mL。
- 3.8 0.1%甲酸的0.005 mol/L 醋酸铵溶液：取0.1 mL 甲酸，以0.005 mol/L 醋酸铵溶液定容至100 mL。
- 3.9 香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素标准物质：纯度大于或等于95%，其他信息参见附录A。

- 3.10 标准储备液：准确称取适量标准品(精确至0.0001 g)，用甲醇溶解配制浓度为1.0 mg/mL 的标准储备液，保存于一18℃冰箱内。
- 3.11 中间标准溶液：移取1.0 mL 标准储备液于10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，配成100.0pg/mL，保存于4℃冰箱内。
- 3.12 基质标准工作液：临用前根据需要，移取适量的中间标准溶液，用空白基质溶液稀释至适当浓度。
- 3.13 HLB 固相萃取柱(3 mL,60mg) 或相当者：使用前用5 mL 甲醇、5 mL 水淋洗活化。

3.14 微孔滤膜: 0.22 μm , 有机相型。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI)。

4.2 振荡器。

4.3 离心机, 8000 r/min。

4.4 快速溶剂浓缩仪。

4.5 分析天平, 感量为0.1 mg、0.01 g。

4.6 涡旋混合器。

5 试样制备和保存

取有代表性样品50 g, 混合混匀, 分成2份, 分别装入洁净容器内, 密封并标识, 将试样存放于4℃冰箱内。

在制样过程中, 应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6 测定步骤

6.1 提取

6.1.1 饼干、饮料(包括含酒精饮料)、冰淇淋样品的提取

准确称取样品1.00g 于50mL 离心管内, 加入5g 无水硫酸钠和10mL 无水乙醇, 振荡10 min, 在8000r/min 下离心5 min, 取上层于另一50 mL 离心管中, 残渣再分别加入10mL 无水乙醇重复提取2次, 合并上清液, 45℃快速溶剂浓缩仪减压浓缩近干, 用1mL 甲醇溶解残渣, 再加8mL 水涡旋混匀, 8000 r/min离心5 min, 上清液用水定容至10 mL, 待净化。

6.1.2 口香糖样品的提取

准确称取样品0.5 g(精确至0.01 g) 于15 mL 离心管中, 加入2 mL 甲醇提取, 涡旋提取2 min, 10000r/min 离心5 min, 上清液转移至另一15 mL 离心管中, 残渣分别用2 mL 甲醇-水(1+1, 体积比)重复提取2次, 合并提取液。提取液经氮气吹干浓缩近2mL, 加入7mL 水, 涡旋混匀, 8000 r/min离心5 min, 上清液用水定容至25 mL, 待净化。

6.2 净化

将上述溶液取5 mL 过预淋洗好的 HLB 固相萃取柱, 用5 mL 甲醇-水(1+9, 体积比)淋洗柱子。待淋洗液全部流出后, 减压抽干3min。用 8mL 甲醇洗脱, 接取全部洗脱液。在40℃下, 洗脱液用氮气吹干, 再以2.5 mL 甲醇溶解残渣, 混匀, 过微孔滤膜, 滤液供液相色谱串联质谱测定。

6.3 测定

6.3.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下，

- a) 色谱柱: C₁ 柱, 150 mm×2.1mm (内径), 粒径3.5 μm, 或相当者;
- b) 流动相1[适用于饼干、饮料(包括含酒精饮料)、冰淇淋中香豆素类化合物测定]: 含0.1%甲酸

的0.005 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈-甲醇(20+10+70, 体积比);流动相2(适用于口香糖中香豆素类化合物测定):含0.1%甲酸的0.005 mol/L 醋酸铵溶液-甲醇-乙腈(48+50+2, 体积比);

- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 进样量: 5 μ L;
- e) 柱温: 35 $^{\circ}$ C。

6.3.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测(MRM);
- d) 其他参考质谱条件参见附录B。

6.3.3 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质标准溶液进样。用基质标准工作曲线按外标法定量,基质标准工作溶液和样品溶液中被测物的响应值均应在仪器检测线性响应范围内。根据试样中被测样液的含量情况,选取响应值相近的基质标准工作液进行色谱分析。对基质标准溶液和样液等体积参插进样测定。在上述色谱条件下香豆素标准溶液多反应监测(MRM) 色谱图参见附录C。

6.3.4 定性测定

在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间,与基质标准溶液的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内;每种化合物的质谱定性离子至少应包括一个母离子和两个子离子,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质混合标准工作溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不得超过表1规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 1 定性测定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

6.4 空白试验

除不加试样外,均按上述操作步骤进行。

7 结果计算和表述

用色谱数据处理软件或按式(1)计算试样中被测物含量，计算结果需将空白值扣除：

$$X_i = \frac{A_i \times c_i \times V \times 1\,000}{A_s \times m_i \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i；—— 试样中被测物含量，单位为微克每千克(μg/kg)；

A_i；—— 样液中被测物的峰面积；

c_i；—— 标准工作溶液中被测物的浓度，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)；
A_s—— 标准工作溶液中被测物的峰面积；
m:—— 最终样液所代表的试样量，单位为克(g)。

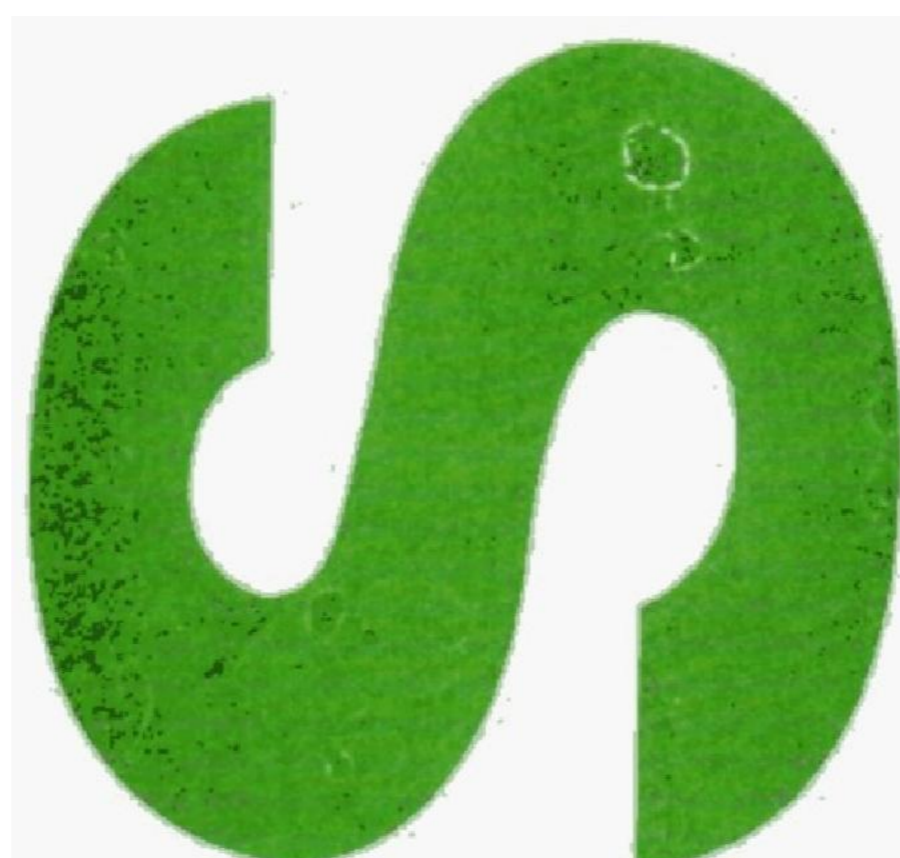
8 测定低限、回收率

8.1 测定低限

本方法饼干、饮料(包括含酒精饮料)、冰淇淋中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定低限均为50.0 μg/kg。口香糖中香豆素、6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定低限均为250.0 μg/kg。

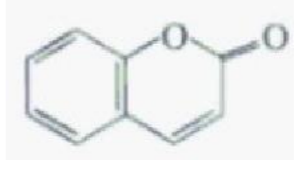
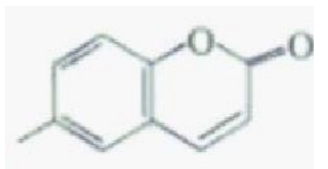
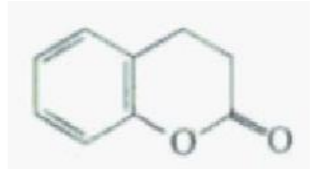
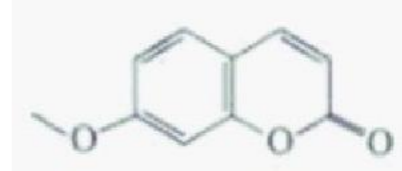
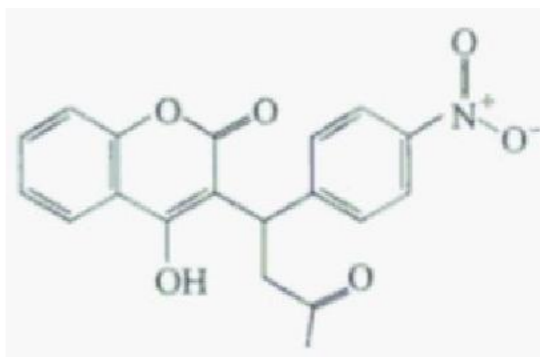
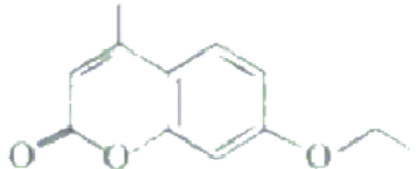
8.2 回收率

回收率数据参见附录D。



附 录 A
(资料性附录)
标准物质基本信息

表 A.1 标准物质基本信息

英文名称	中文名称	CAS号	分子式	相对分子质量	结构式
coumarin	香豆素	91-64-5	$C_9H_6O_2$	146.15	
6-methylcoumarin	6-甲基香豆素	92-48-8	$C_{10}H_8O_2$	160.17	
dihydrocoumarin	二氢香豆素	119-84-6	$C_9H_8O_2$	148.16	
7-methoxycoumarin	7-甲氧基香豆素	531-59-9	$C_{10}H_8O_3$	176.17	
acenocoumarol	醋硝香豆素	152-72-7	$C_{20}H_{15}NO$	353.32	
7-ethoxy-4-methylcoumarin	7-乙氧基-4-甲基香豆素		$C_{12}H_{14}O_3$	204.22	

附录 B
(资料性附录)
参考质谱条件!

参考质谱条件:

- a) 电喷雾电压(IS):5 500 V;
- b) 雾化气压力(GS1,kPa):414 (氮气);
- c) 气帘气压力(CUR,kPa):172 (氮气);
- d) 辅助气流速(GS2,kPa):414 (氮气);
- e) 离子源温度(TEM):550 °C;
- f) 碰撞电压(CE)、去簇电压(DP)、碰撞室入口电压(EP) 和碰撞室出口电压(CXP) 见表 B.1。

表 B.1 主要参考质谱参数

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 V	碰撞电压 V	碰撞室入口电压 V	碰撞室出口电压 V
香豆素	147	103*	80	25	10	10
		91		31		
6-甲基香豆素	161	105'	85	31	10	10
		115.1		29		
二氢香豆素	149	107*	85	23	10	10
		103		30		
7-甲氧基香豆素	177	121.1*	110	30	10	10
		77		43		
醋硝香豆素	354.3	163.1*	100	23	10	10
		296.1*		25		
7-乙氧基-4-甲 基香豆素	205	177.1*	100	25	10	10
		102.9		42		
表示定量离子对。						

- 1) 非商业性声明：附录B所列参数是在AP14000Q 质谱完成，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号仪器。

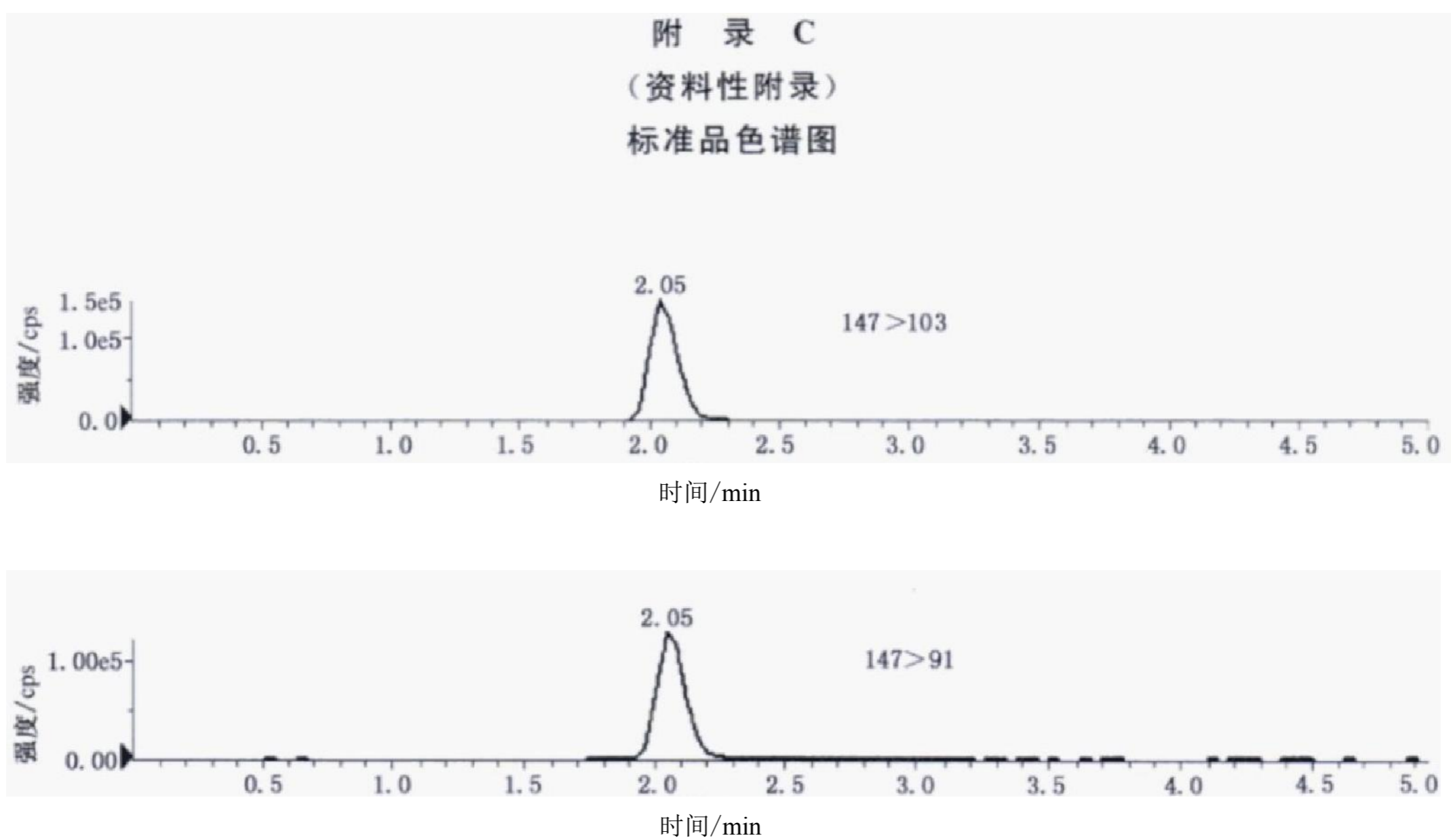


图 C.1 流动相1条件下香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

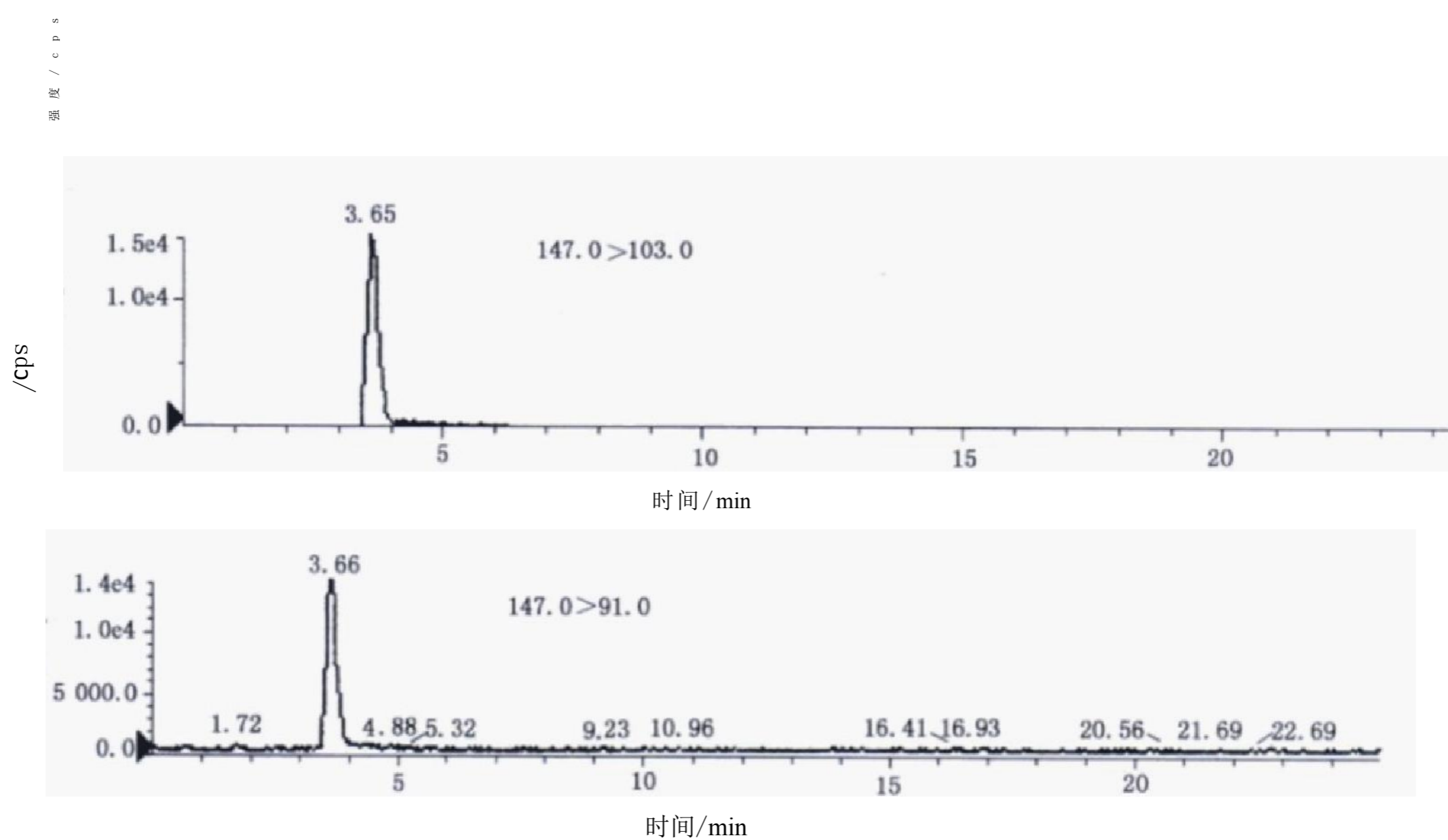


图 C.2 流动相2条件下香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

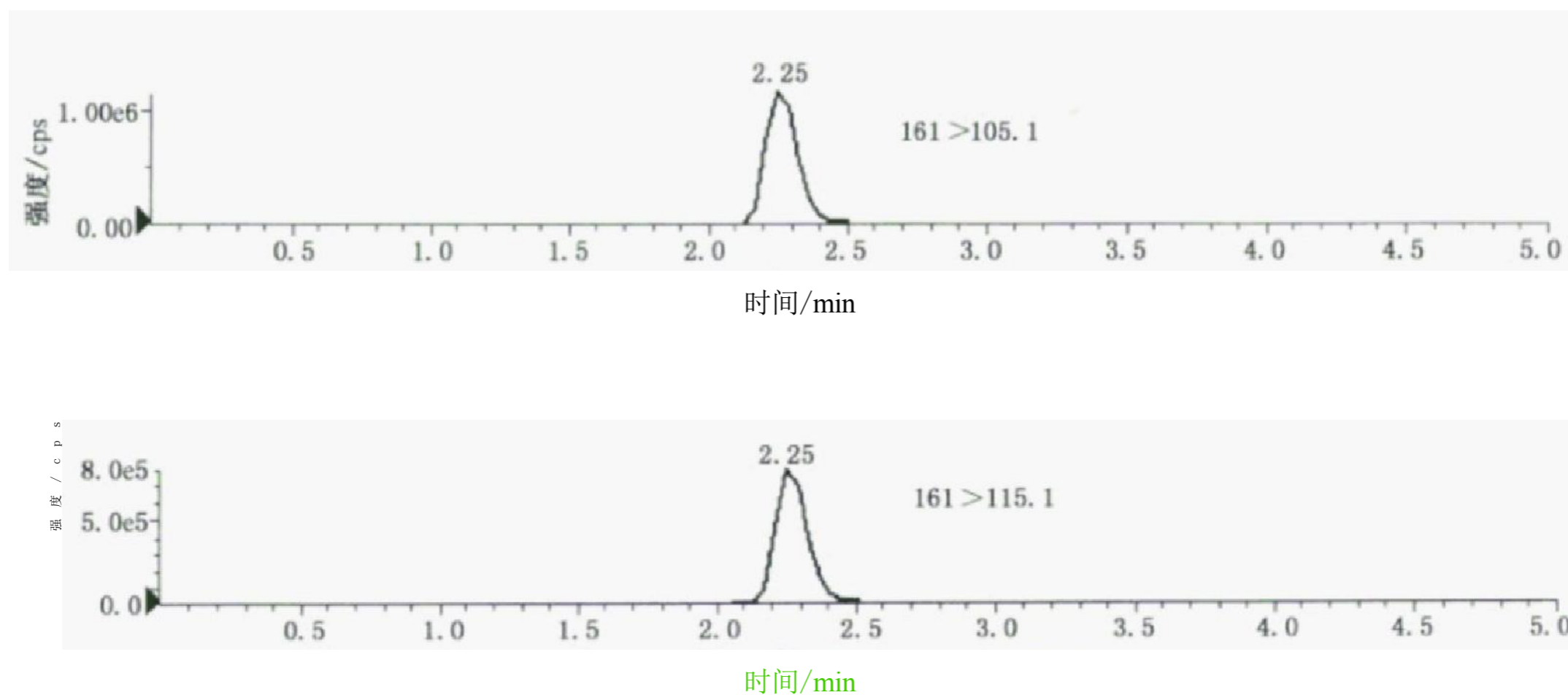
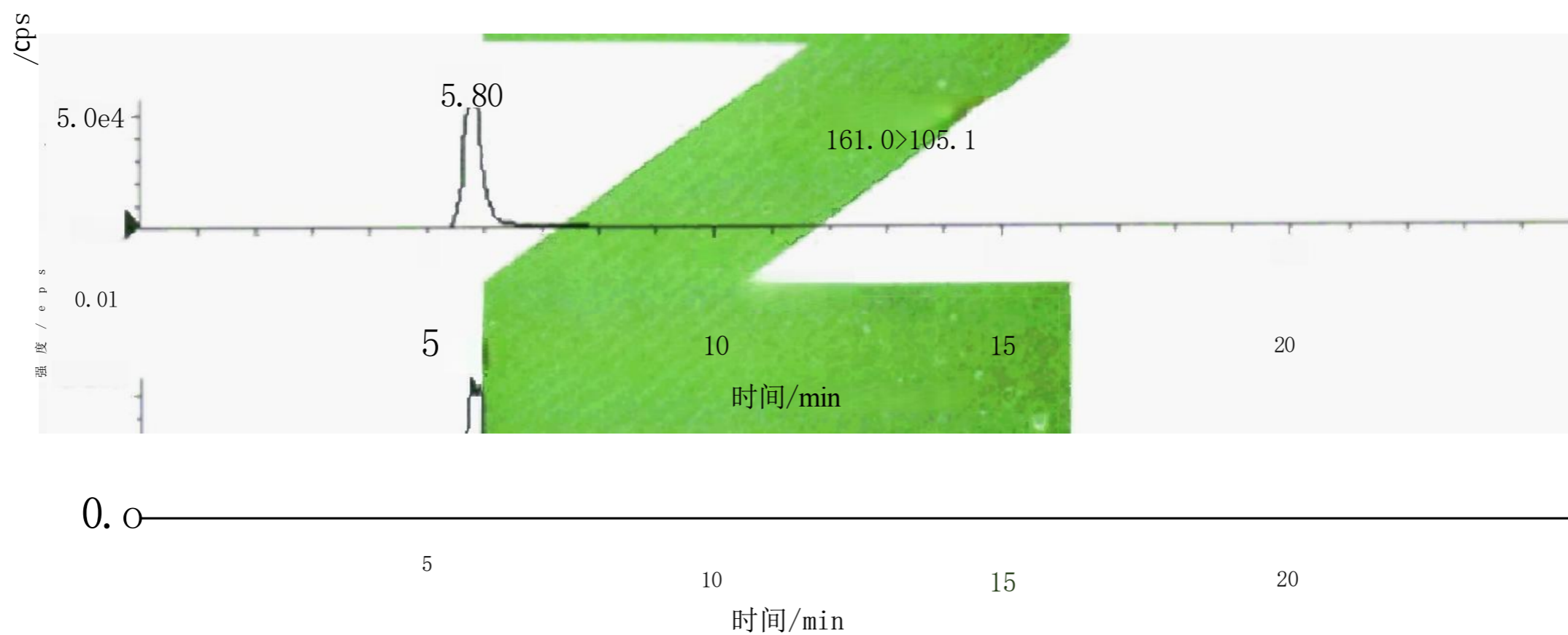


图 C.3 流动相1条件下6-甲基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图



图C.4 流动相2条件下6-甲基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

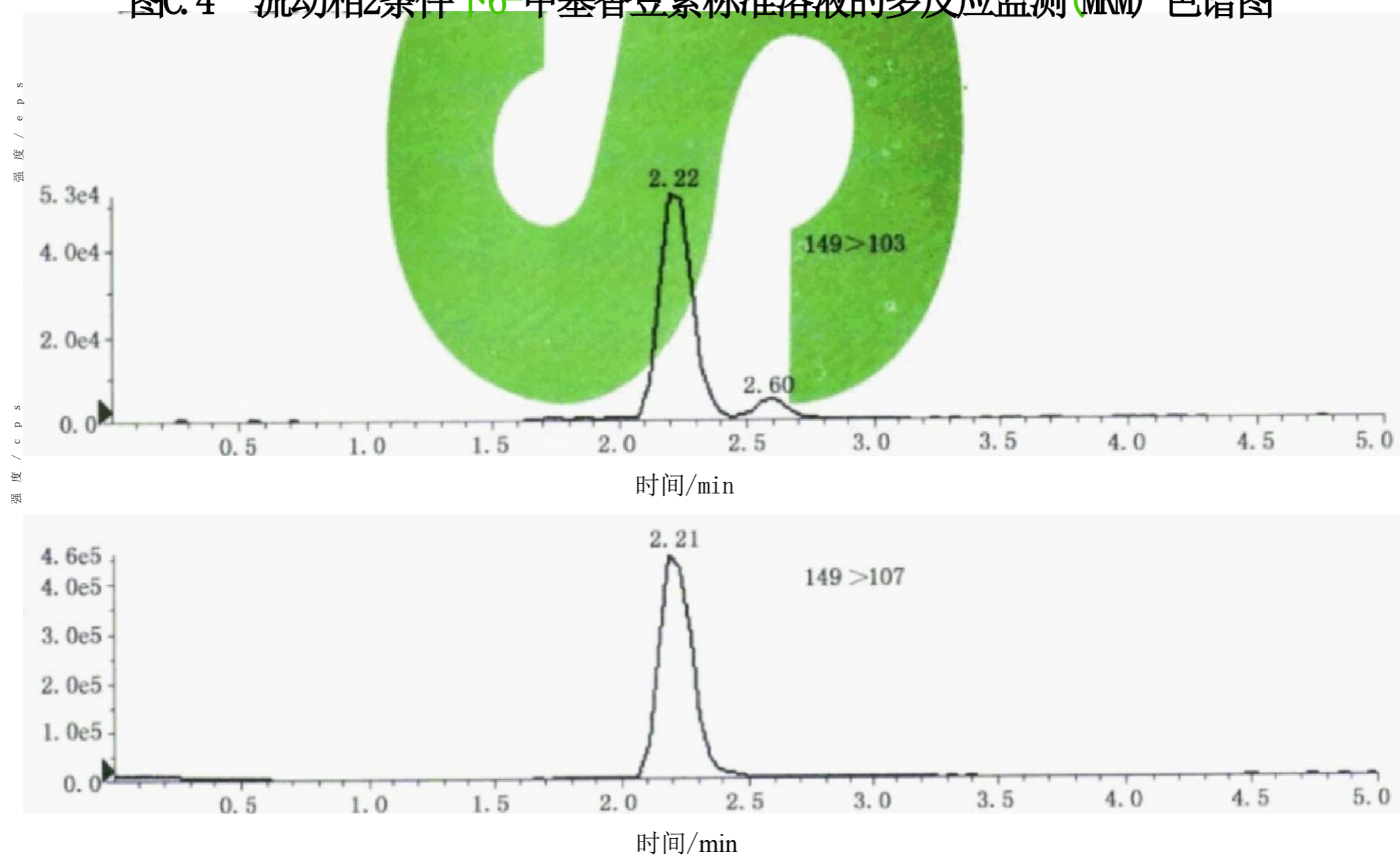


图 C.5 流动相1条件下二氢香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

强度 / cps

强度 / cps

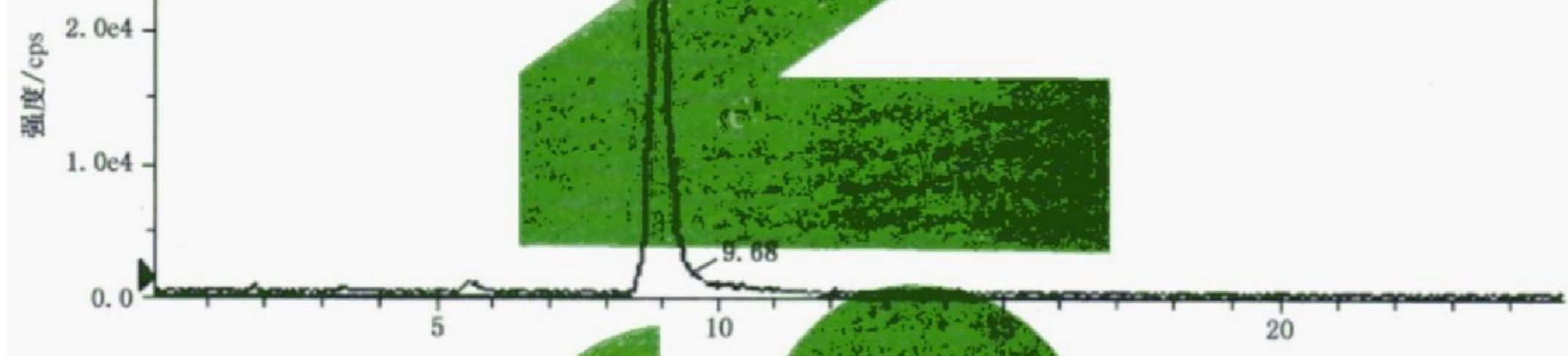


图 C.6 流动相 2 条件下二氢香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

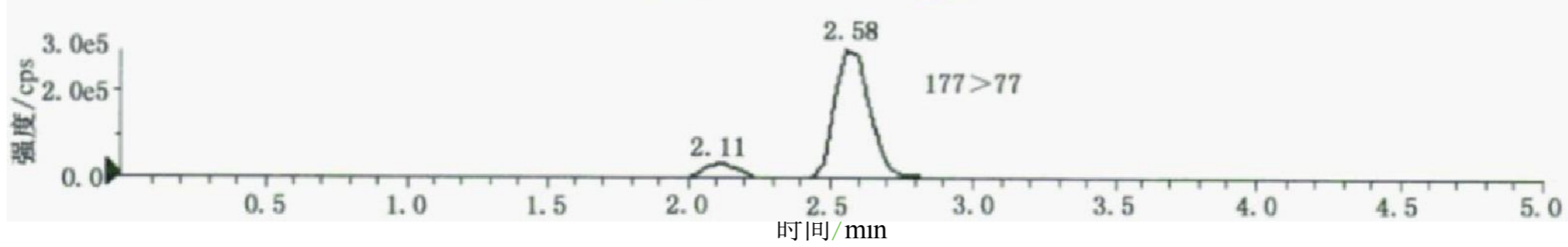
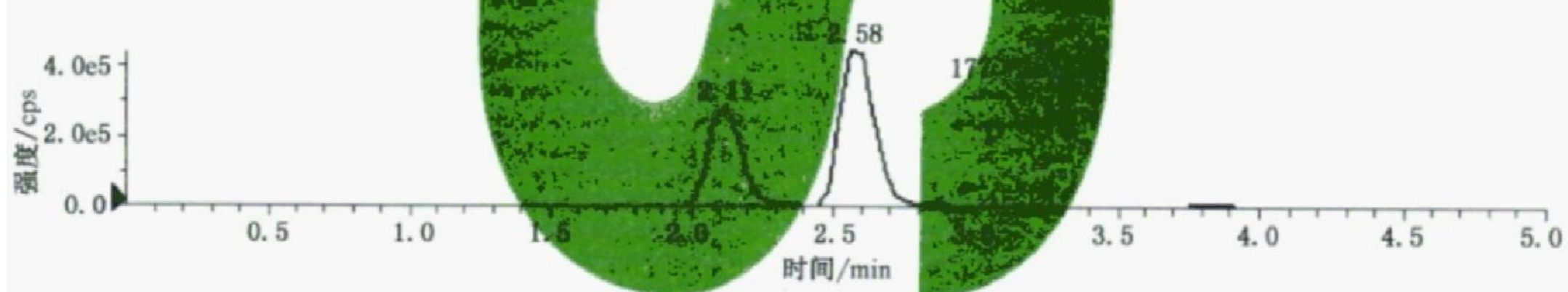


图 C.7 流动相1条件下7-甲氧基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

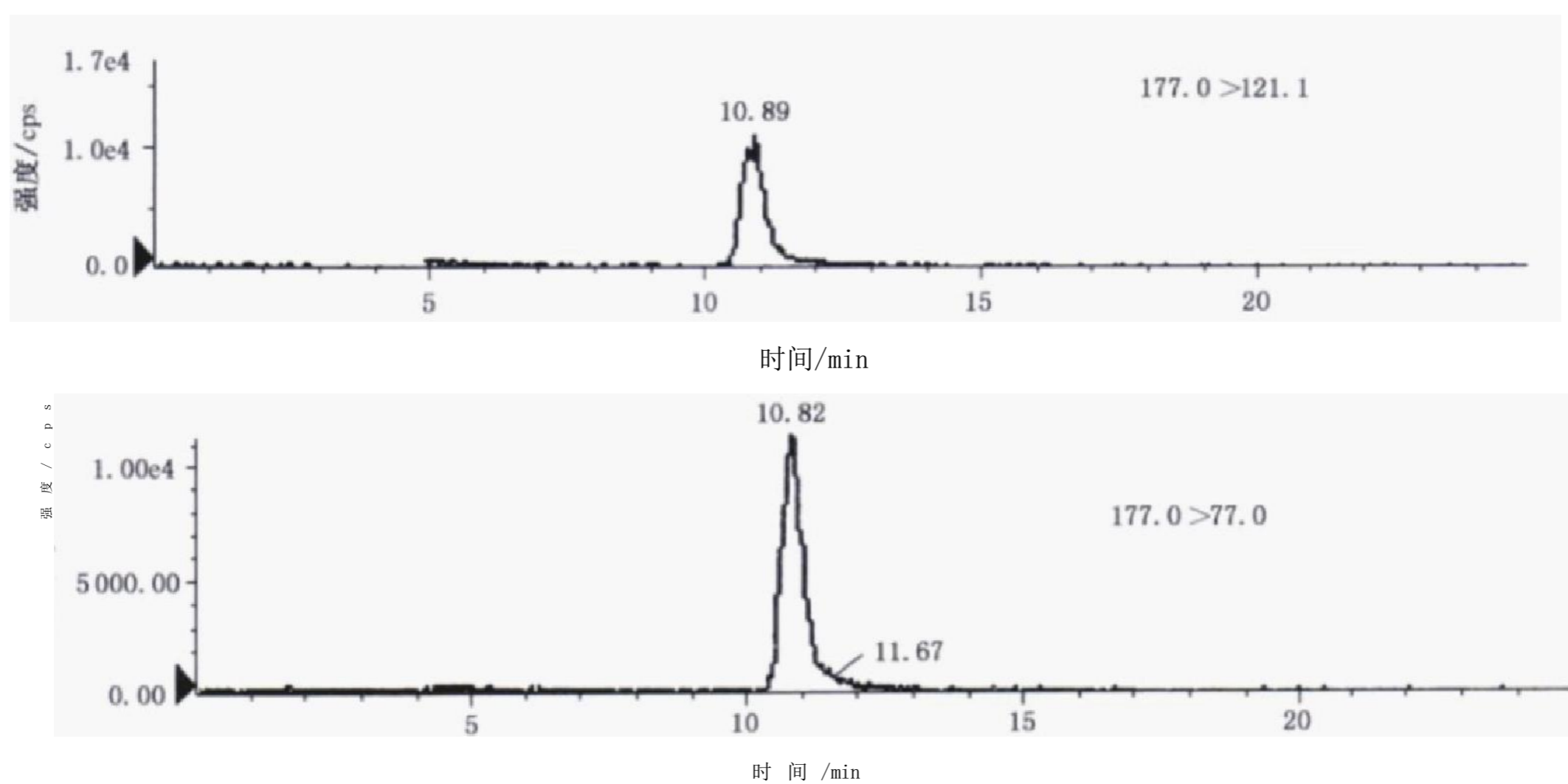


图 C.8 流动相2条件下7-甲氧基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

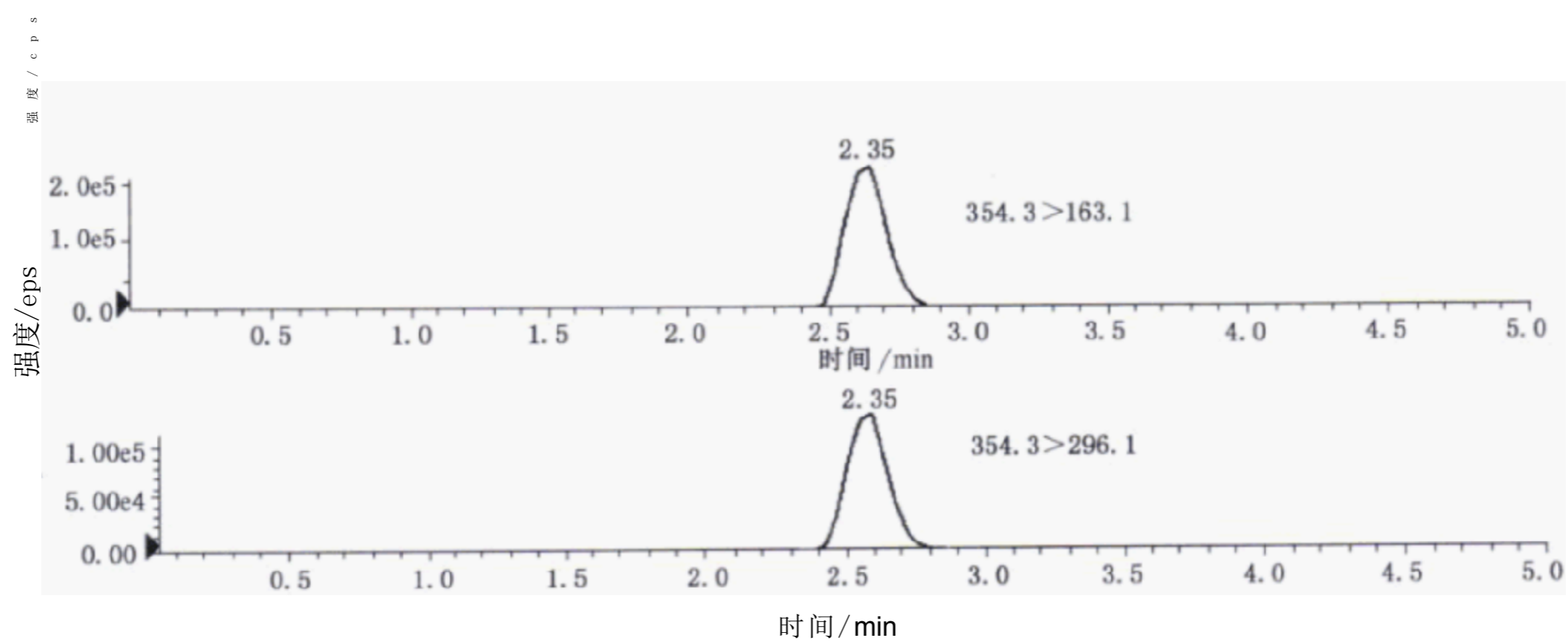


图 C.9 流动相1条件下醋硝豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

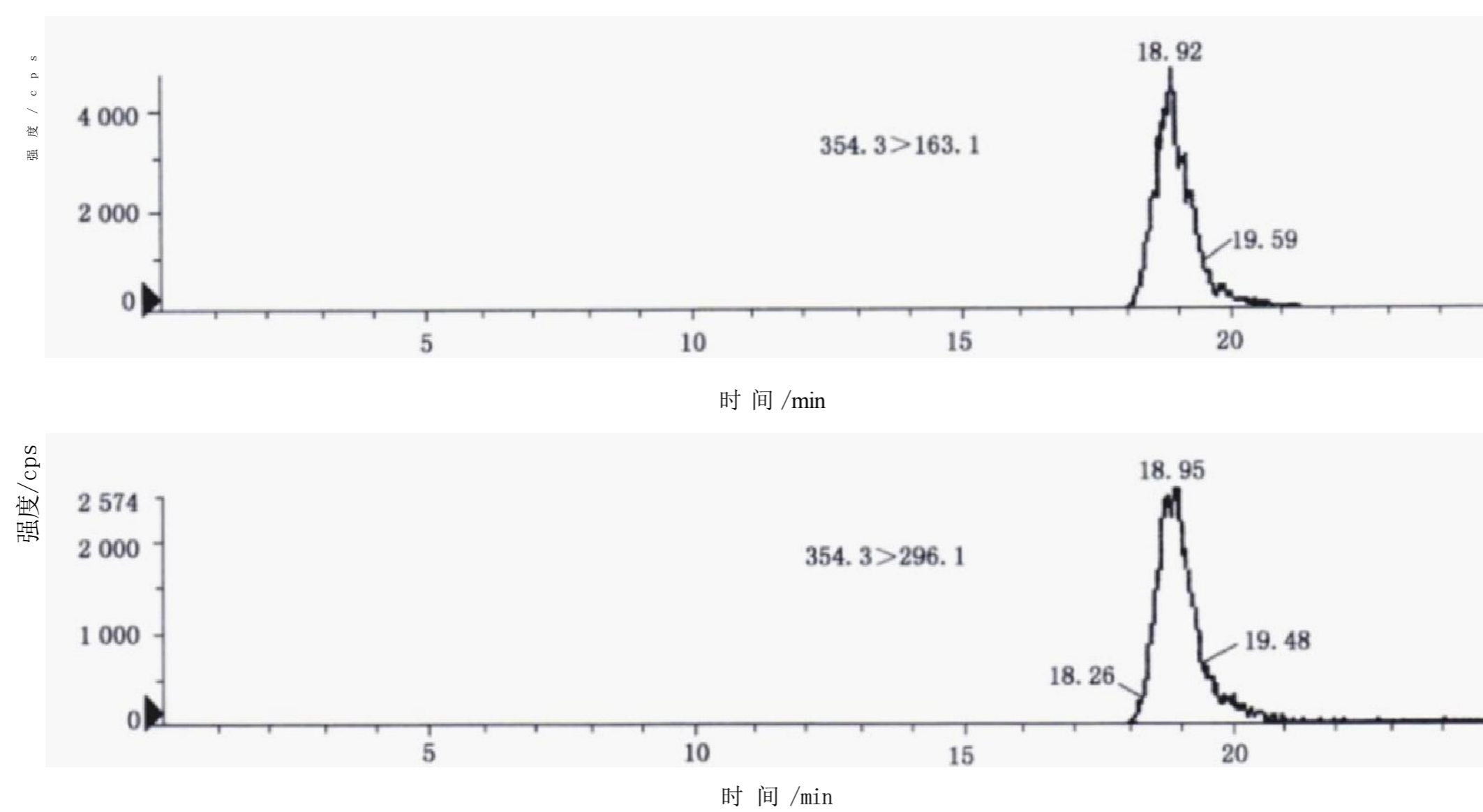


图 C.10 流动相2条件下醋硝豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图

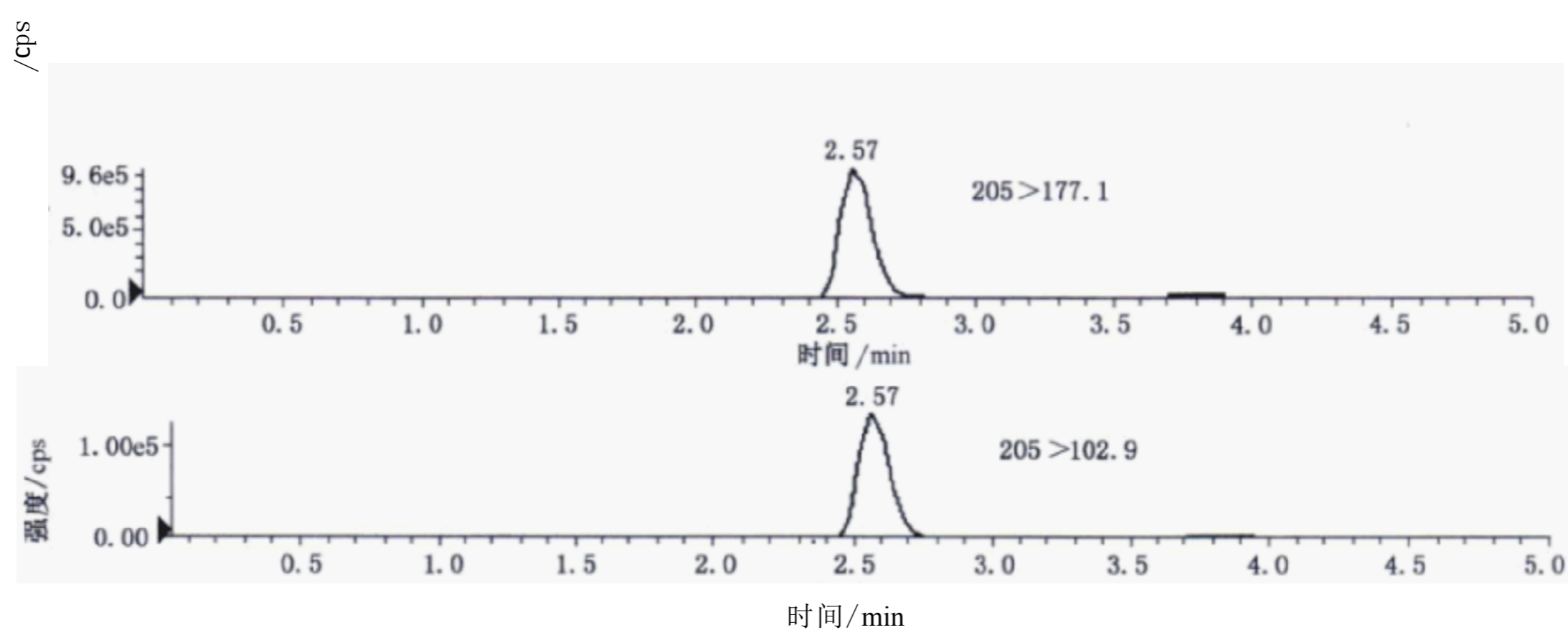
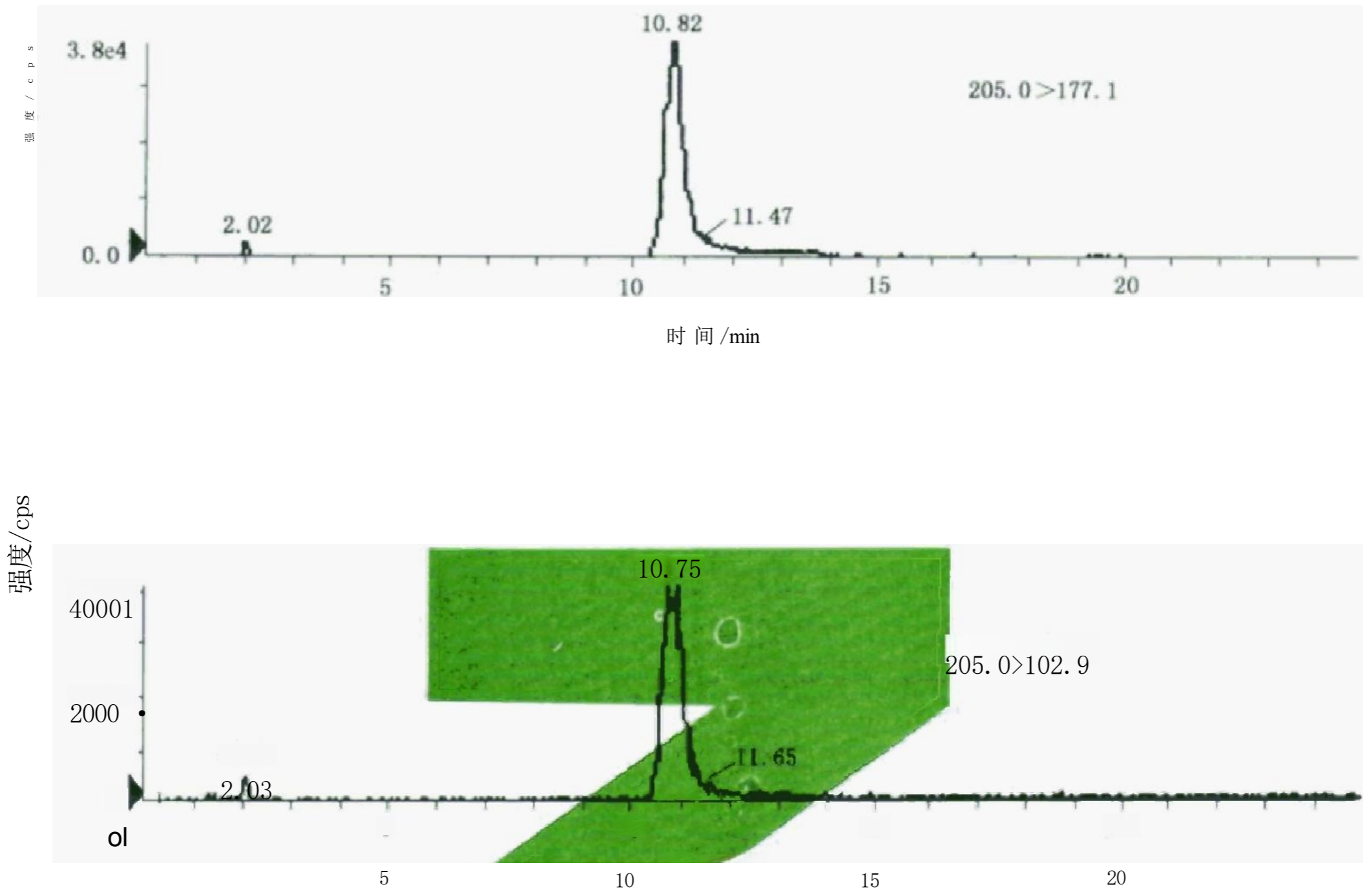
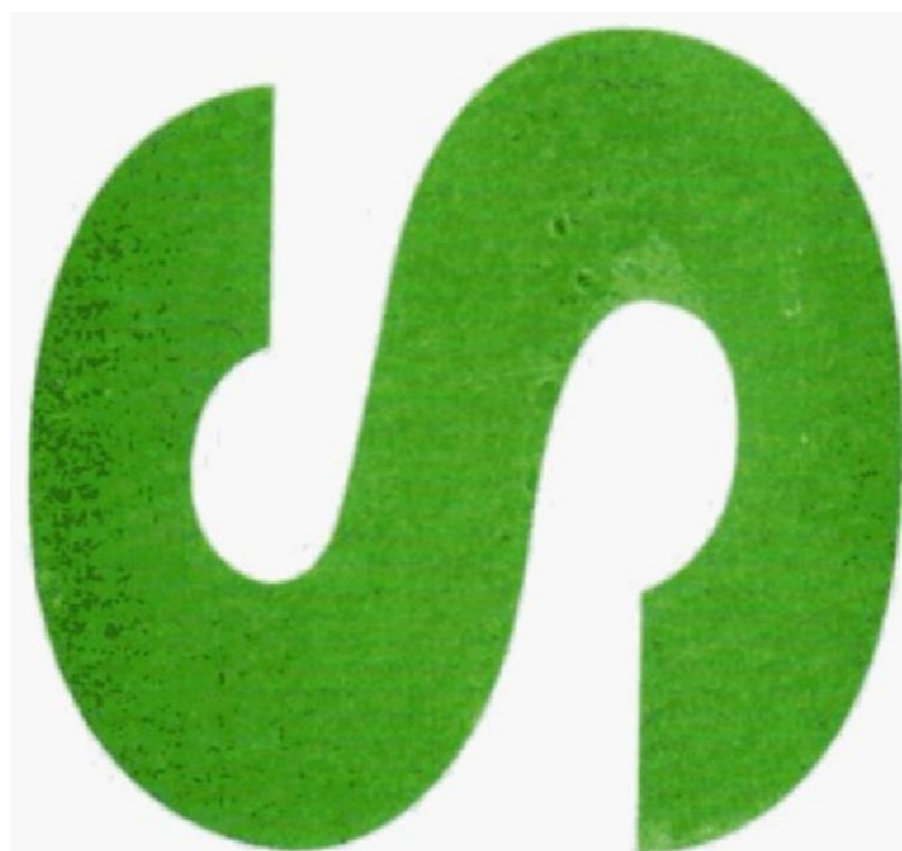


图 C.11 流动相1条件下7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM) 色谱图



图C.12 流动相2条件下有乙黑基-4-甲基香豆素标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图



附 录 D
(资料性附录)

回收率数据

表 D.1 不同基质中回收率数据

基质	化合物	添加浓度 μg/kg	回收率 %	相对标准偏差 RSD/%	
饼干	香豆素	50	70.6, 85.0, 79.5, 83.1, 92.1, 109.0	13.1	
		500	100.2, 82.3, 100.6, 84.3, 104.7, 85.8	9.9	
		2000	104.0, 81.8, 86.5, 108.5, 102.1, 104.3	10.9	
	6-甲基香豆素	50	83.8, 75.2, 98.0, 72.5, 106.5, 91.5	13.2	
		500	102.6, 94.3, 102.6, 108.6, 107.5, 89.4	7.5	
		2000	89.7, 107.6, 82.4, 102.5, 81.2, 104.8	11.7	
	二氢香豆素	50	74.4, 102.6, 83.2, 84.5, 97.2, 76.5	11.3	
		500	88.4, 91.4, 80.5, 109.8, 86.5, 85.3	10.2	
		2000	100.5, 84.7, 109.2, 87.1, 96.6, 105.0	9.7	
	7-甲氧基香豆素	50	78.4, 76.1, 75.7, 103.0, 108.2, 108.8	16.5	
		500	109.8, 92.2, 82.4, 94.6, 107.3, 91.7	10.4	
		2000	82.8, 101.0, 108.6, 87.0, 99.7, 94.1	9.5	
	醋硝香豆素	50	90.3, 81.1, 106.2, 89.0, 84.2, 104.5	10.5	
		500	99.0, 85.2, 107.2, 80.8, 83.0, 82.1	10.9	
		2000	105.7, 104.5, 87.2, 84.5, 85.1, 89.1	9.7	
	7-乙氧基-4-甲基香豆素	50	101.4, 107.5, 92.6, 96.4, 77.2, 82.4	11.4	
		500	81.1, 109.3, 84.0, 83.8, 104.6, 87.8	12.0	
		2000	94.2, 92.8, 105.2, 95.7, 108.5, 81.1	9.8	
		香豆素	50	78.7, 81.8, 104.6, 76.3, 85.7, 95.1	10.8

饮料		500	106.4, 109.1, 80.6, 104.0, 99.4, 81.6	12.6
		2000	81.2, 80.5, 86.4, 109.7, 102.1, 96.6	11.9
	6-甲基香豆素	50	89.6, 81.1, 108.5, 71.2, 78.0, 101.1	14.3
		500	99.8, 108.6, 82.4, 83.3, 95.7, 83.3	10.9
		2000	107.6, 99.8, 85.4, 84.6, 109.8, 81.1	12.6
	二氢香豆素	50	80.6, 84.8, 72.3, 109.1, 109.3, 94.0	15.2
		500	86.8, 85.1, 109.5, 107.4, 101.0, 80.2	12.5
		2000	95.8, 105.4, 106.7, 81.8, 108.8, 105.4	10.3
	7-甲氧基香豆素	50	101.1, 77.2, 109.6, 100.2, 88.2, 108.8	12.6
		500	88.2, 92.4, 108.3, 108.0, 80.6, 100.1	11.2

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/268142002143006050>