

附件

食品中 4-氯双异丁酚丁的执法检验方法

1 范围

本方法规定了食品中 4-氯双异丁酚丁的高效液相色谱—串联质谱测定方法。

本方法适用于蜜饯、果冻、糖果、果蔬粉、饼干、代用茶、液体饮料、果酒和配制酒中 4-氯双异丁酚丁的测定。

2 原理

试样经甲醇提取，采用高效液相色谱—串联质谱仪检测，外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法中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 甲醇 (CH_3OH)：色谱级。

3.1.2 甲酸 (HCOOH)：色谱级。

3.2 试剂配制

3.2.1 50%甲醇溶液：量取甲醇 (3.1.1) 500 mL，加水稀释至 1000 mL，混匀备用。

3.2.2 0.05%甲酸水溶液：量取甲酸 (3.1.2) 0.5 mL，加水稀释至 1000 mL，混匀备用。

3.3 标准品

4-氯双异丁酚丁[化学名称为 (5-氯-2-氧代吡啶-3,3-二基) 双 (4,1-亚苯基) 二异丁酸酯，又名 4-氯双异丁酚汀]标准品，纯度 $\geq 94\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和相对分子量等信息见附录 A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取 4-氯双异丁酚丁标准品适量 (相当于有效成分 10 mg，精确至 0.01 mg)，加甲醇 (3.1.1) 溶解，然后转移至 10 mL 容量瓶中，用甲醇 (3.1.1) 定容至刻度，配制质量浓度为 1000 mg/L 的标准储备液。-18℃及以下避光贮存，有效期 3 个月。

3.4.2 标准中间溶液 (10.0 mg/L): 准确移取 1000 mg/L 的标准储备液 (3.4.1) 0.50 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度, 摇匀, 配制成标准中间溶液, 质量浓度为 10.0 mg/L。0~4 °C 避光保存, 有效期 1 个月。

3.4.3 标准系列工作溶液: 准确吸取标准中间溶液 (3.4.2) 适量, 用 50% 甲醇溶液 (3.2.1) 配制成标准系列工作溶液, 质量浓度为 2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL, 或依仪器响应情况配制适当浓度的标准工作液。若样品基质效应较强, 可采用空白基质提取液配制适当浓度的基质标准系列工作溶液, 临用现配。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜: 0.22 μm, 聚四氟乙烯滤膜。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱—串联质谱仪, 带电喷雾离子源 (ESI)。

4.2 天平: 感量分别为 0.01 mg 和 1 mg。

4.3 超声波清洗器。

4.4 恒温水浴锅。

4.5 离心机: 转速 ≥ 4000 r/min。

4.6 涡旋混合器。

5 分析步骤

5.1 试样制备和保存

取 50 g 试样或所有试样 (低于 50 g 时), 糖果 (除胶质糖果)、果蔬粉、饼干、代用茶样品研磨或粉碎混匀, 蜜饯取可食部分剪碎至 2 mm 以下, 胶质糖果加热融化后混匀, 果冻样品充分搅碎至浆状, 含二氧化碳的液体样品通过加热或超声去除二氧化碳。制备好的试样根据样品储存条件进行存储。

5.2 样品前处理

称取 1.0 g (精确至 0.001 g) 样品于 25 mL 具塞刻度离心管中, 加入 20 mL 甲醇 (3.1.1), 超声提取 10 min (超声过程中摇匀 2~3 次), 涡旋振荡 10 min, 冷却至室温, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度并摇匀。取 5 mL 溶液经 4000 r/min 离心 5 min, 精确吸取 1.0 mL 离心后上清液, 用水稀释至 2 mL, 涡旋混匀后用微孔滤膜 (3.5.1) 过滤, 待高效液相色谱—串联质谱仪测定。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱, 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 或性能相当的色谱柱。
- b) 流动相: A 为 0.05%甲酸水溶液 (3.2.2), B 为甲醇 (3.1.1), 梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速: 0.3 mL/min。
- d) 柱温: 30 ℃。
- e) 进样量: 5 μL。

表 1 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	90	10
0.5	90	10
1.5	30	70
3.5	5	95
8.0	5	95
8.1	90	10
10.0	90	10

5.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI)。
- b) 检测方式: 多反应监测 (MRM)。
- c) 扫描方式: 正离子模式。
- d) 干燥气、雾化器、鞘气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体, 使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求, 喷雾电压、干燥气温度、鞘气温度、鞘气流量等参数使用前应优化至最佳灵敏度, 定量离子对和定性离子对等信息见附录 B。

5.4 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液 (3.4.3) 分别注入高效液相色谱—串联质谱仪中, 测定相应的峰面积, 以标准系列工作溶液中目标化合物的质量浓度为横坐标, 以目标化合物的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。标准溶液的色谱图参见附录 C。

5.5 试样溶液的测定

5.5.1 定性测定

按照高效液相色谱—串联质谱条件 (5.3) 测定试样溶液和标准工作溶液, 记录试样和标准溶液中目标化合物的色谱保留时间和定量离子与定性离子的相对离子丰度。当试样中化合物色谱峰保留时间与标准溶液的色谱保留时间相对偏差不大于 2.5%, 且定量离子与定性离子的相对离子丰度与浓度相当标准溶液中相对离子丰度比 (k) 偏差不超过表 2 规定的范围, 则可确定试样中存在对应待测物。

表 2 相对离子丰度的最大允许偏差

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

5.5.2 定量测定

将试样溶液（5.2）按仪器参考条件（5.3）进行测定，得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测物的浓度。试样溶液中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围之内，超出标准曲线范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释。

6 空白试验

除不加试样外，其他操作与试样操作一致。

7 结果计算

试样中待测物的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times V_2}{m \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中 4-氯双异丁酚丁的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c ——试样溶液中 4-氯双异丁酚丁的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——移取离心后上清液稀释后的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样称取的质量，单位为克（g）；

V_1 ——移取离心后上清液的体积，单位为毫升（mL）；

1000——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。

8 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应超过算术平均值的 15%。

9 其他

当取样量为 1.0 g，定容体积为 25 mL 时，移取体积 1.0 mL 并稀释至 2 mL，4-氯双异丁酚丁的检出限为 0.03 mg/kg，定量限为 0.10 mg/kg。

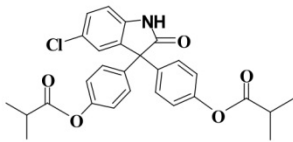
空白试验应无干扰。

附录A

(资料性)

4-氯双异丁酚丁的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量、结构式见表A.1。

表A. 1 4-氯双异丁酚丁的基本信息

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	相对分子质量	结构式
4-氯双异丁酚丁	4-Chloro-oxyphenisatin diisobutyrate	/	C ₂₈ H ₂₆ ClNO ₅	491.15	

附录B

(资料性)

质谱参考条件

以下所列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，各实验室可根据所配置仪器的具体情况作出适当调整。

- a) 离子源：电喷雾离子源 (ESI)。
- b) 检测方式：MRM。
- c) 扫描方式：正离子模式。
- d) 干燥气温度：300 °C。
- e) 鞘气温度：300 °C。
- f) 鞘气流量：11.0 L/min。
- g) 毛细管电压：3500 V。
- h) 干燥器流量：5.0 L/min。
- i) 喷嘴电压：500 V。
- j) 雾化器压力：45.0 psi。
- k) 离子模式、母离子、子离子、碰撞能见表 B.1。

表 B.1 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物名	扫描方式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 (eV)
4-氯双异丁酚丁	ESI ⁺	492.2	258.0*	20
			223.0	65

附录 C

(资料性)

标准溶液色谱图

标准溶液的提取离子色谱图见图C.1。

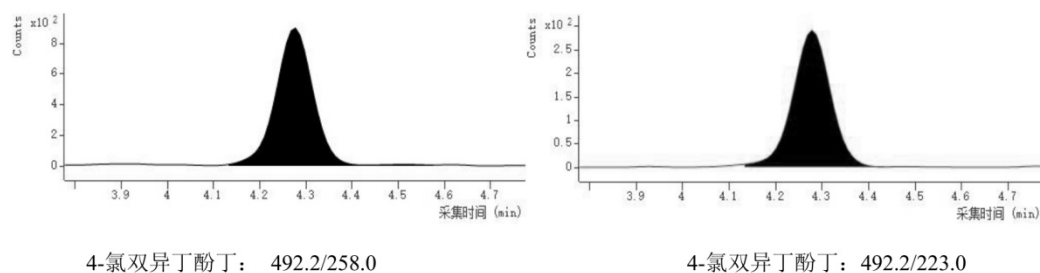


图 C.1 4-氯双异丁酚丁提取离子色谱图 (10 ng/mL)

本方法起草单位：南阳市产品质量检验检测中心、河南省食品和盐业检验技术研究院（河南省粮油饲料产品质量监督检验中心）

本方法验证单位：中国质量检验检测科学研究院、中国计量科学研究院、广东省食品检验所（广东省酒类检测中心）、重庆市食品药品检验检测研究院、四川省食品检验研究院

主要起草人：陈林、袁利杰、赵培敬、刘霞丽、安晓敏、刘颖、韩青松、蒋静、赵光升、姚晓洁、宁亚萍、凡猛、李宝丽、马琳琳、王祥、曲凌玄、李中俄