

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3904—2021

肉及肉制品中杂环胺检测 液相色谱-串联质谱法

Determination of heterocyclic amines in meat and meat products
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2021-05-07 发布

2021-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部乡村产业发展司提出。

本文件由农业农村部农产品加工标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农产品加工研究所、河南双汇投资发展股份有限公司、唐人神集团股份有限公司、新希望六和股份有限公司、东北农业大学、中粮集团营养健康研究院、湖北安井食品有限公司。

本文件主要起草人：张德权、惠腾、王振宇、孔保华、孟少华、刘欢、丁晓倩、单吉浩、张晓琳、潘腾、刘志斌、胡忠良。

肉及肉制品中杂环胺检测 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了附录 A 给定的肉及肉制品中 13 种杂环胺的液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于附录 A 给定的肉及肉制品中 13 种杂环胺的测定。

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 原理

试样采用乙腈提取,分散固相萃取净化,液相色谱-串联四极杆质谱仪检测,外标法定量。

4 试剂和材料

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

4.1 试剂

- 4.1.1 乙酸(CH_3COOH):色谱纯。
- 4.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 4.1.3 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.1.4 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 4.1.5 硫酸镁(MgSO_4):优级纯。
- 4.1.6 无水醋酸钠(CH_3COONa):优级纯。

4.2 材料

- 4.2.1 陶瓷均质子:适用于 50 mL 萃取管。
- 4.2.2 N-丙基乙二胺(PSA):粒径 $40\ \mu\text{m}\sim 60\ \mu\text{m}$ 。
- 4.2.3 封尾 C_{18} 固相萃取填料:粒径 $40\ \mu\text{m}\sim 63\ \mu\text{m}$ 。
- 4.2.4 有机相型微孔滤膜: $0.22\ \mu\text{m}$ 。

4.3 试剂配制

- 4.3.1 1%乙酸-乙腈溶液:量取 1.0 mL 乙酸(4.1.1)至 100 mL 容量瓶中,用乙腈(4.1.2)稀释并定容至刻度,摇匀。
- 4.3.2 乙酸-乙酸铵缓冲液:准确称取 0.770 8 g 乙酸铵(4.1.3),溶于 100 mL 水中,用乙酸(4.1.1)调 pH 至 2.90,转入 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

4.4 标准品

杂环胺标准品:应满足附录 A 的要求。

4.5 标准溶液配制

- 4.5.1 杂环胺标准储备液:分别称取 10.0 mg Glu-P-2、IQx、MeIQ、Glu-P-1、8-MeIQx、Norharman、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、Harman、4,7,8-TriMeIQx、PhIP、AαC、Trp-P-1(4.4)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1.4)配制成浓度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液;吸取 10.0 mL 储备液到 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1.4)稀释为 $10.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, $-18\ ^\circ\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。

4.5.2 混合标准工作液:分别吸取 0.01 mL、0.02 mL、0.05 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL 杂环胺标准储备液(4.5.1)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1.4)稀释,得到杂环胺浓度分别为 1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L 的混合标准溶液,现用现配。

5 仪器设备

- 5.1 液相色谱串联四极杆质谱:配有电喷雾离子源。
- 5.2 电子天平:感量 0.000 1 g 和 0.01 g。
- 5.3 离心机:转速≥10 000 r/min。
- 5.4 pH 计:感量 0.01。
- 5.5 氮气浓缩仪。
- 5.6 涡旋振荡器。
- 5.7 均质器。
- 5.8 色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)。

注:非商业声明,此处列出的色谱柱仅供参考,不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家的色谱柱。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取试样肉及肉制品中可食部分,捣碎混匀,标识后-18℃冷冻保存。

6.2 试样处理

6.2.1 提取

称取捣碎试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 1 块陶瓷均质子(4.2.1)和 10 mL 水,振荡 20 min;加入 10 mL 1%乙酸-乙腈溶液(4.3.1),振荡 15 min;加入 4.0 g 硫酸镁(4.1.5)和 1.0 g 无水醋酸钠(4.1.6),涡旋混合 1 min。试样提取液在 4℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,分为上、中、下 3 层,上层为含杂环胺的有机溶液,中层为肉泥,下层为水和陶瓷均质子,取上层有机溶液 6 mL 供净化使用。

6.2.2 净化

向离心后的 6 mL 待净化有机溶液中加入 0.9 g 硫酸镁(4.1.5)、0.3 g N-丙基乙二胺(PSA)(4.2.2)和封尾 0.3 g C₁₈固相萃取填料(4.2.3),在 1 000 r/min 条件下均质 1 min,然后在 4℃、10 000 r/min 的条件下离心 5 min;离心后取 1.0 mL 上清液在 30℃条件下氮气浓缩至近干,加入 0.50 mL 甲醇(4.1.4)溶液复溶得试样溶液,涡旋混匀,将试样溶液经微孔滤膜(4.2.4)过滤至进样瓶,待上机测定。

6.3 测定条件

6.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm);
- b) 流动相:A 为乙酸-乙酸钠缓冲液(4.3.2),B 为乙腈(4.1.2),梯度洗脱程序参见表 1;
- c) 流速:0.4 mL/min;
- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:2.0 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.0	95.0	5.0
0.5	95.0	5.0
5.0	85.0	15.0

表 1（续）

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
7.0	73.0	27.0
8.0	45.0	55.0
8.5	73.0	27.0
9.0	95.0	5.0
10.0	95.0	5.0

6.3.2 质谱参考条件

- a) 电离方式:电喷雾电离正离子模式(ESI+);
- b) 扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 干燥气温度:200 ℃;
- d) 干燥气流量:10 L/min;
- e) 雾化气压力:40 V;
- f) 鞘气温度:260 ℃;
- g) 鞘气流量:11 L/min;
- h) 毛细管电压:正电压4 000 V;
- i) 喷嘴电压:正电压0 V;
- j) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 13 种杂环胺的参考质谱参数

序号	标准物质	保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
1	Glu-P-2	1.066	185.10	78.05 ^a 158.10	120	37 25
2	IQx	1.588	200.08	185.12 ^a 132.14	120	30 30
3	MeIQ	1.862	213.11	198.09 ^a 145.15	120	27 29
4	Glu-P-1	2.189	199.10	92.10 ^a 172.14	120	36 30
5	8-MeIQx	2.942	214.10	131.07 ^a 173.18	120	41 25
6	Norharman	3.912	169.06	115.09 ^a 89.05	120	33 48
7	4,8-DiMeIQx	4.015	228.10	213.09 ^a 187.09	120	30 30
8	7,8-DiMeIQx	4.015	228.10	131.13 ^a 187.15	120	40 30
9	Harman	4.659	183.09	115.15 ^a 89.09	120	34 49
10	4,7,8-TriMeIQx	5.133	242.13	145.09 ^a 201.21	120	42 26
11	PhIP	5.742	225.10	210.05 ^a 140.08	120	30 30
12	AaC	6.283	184.07	140.13 ^a 167.07	120	33 24
13	Trp-P-1	6.382	212.12	195.14 ^a 168.09	120	30 25

^a 为定量离子。

6.4 液相色谱-串联质谱测定

6.4.1 定性测定

通过液相色谱将试样溶液进行分离后注入串联四极杆质谱仪中,得到相应的保留时间及信号响应值。试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在±2.5%之内。每种化合物的质谱定性离子必须出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检测批次,同一化合物,样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比,其允许偏差不超过表3规定的范围。

表3 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

6.4.2 定量测定

以杂环胺混合标准工作液中杂环胺的浓度为纵坐标,以峰面积(响应值)为横坐标,绘制标准曲线,按照外标法进行定量。通过液相色谱将试样溶液进行分离后注入串联四极杆质谱仪中,得到相应的响应值,根据标准曲线得到目标化合物的浓度。待测试样溶液中杂环胺的响应值应在标准曲线范围内,超过线性范围则应重新分析。重新分析时,根据超出线性范围倍数估算稀释倍数,用甲醇稀释使试样溶液浓度尽量处于线性范围中部。杂环胺标准溶液的液相色谱图见附录B,特征离子质量色谱图见附录C。

6.5 空白试验

除不加试样外,采用6.2的步骤进行平行操作。

7 结果计算和表述

试样中杂环胺含量按公式(1)计算。

$$X = 10 \times n \times \frac{c \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中杂环胺含量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- n —— 待测试样溶液稀释倍数;
- c —— 根据标准曲线上计算得出的试样溶液中杂环胺浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- V —— 复溶后的试样溶液体积的数值,单位为升(L);
- m —— 试样质量的数值,单位为千克(kg)。

计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留3位有效数字。

8 回收率和精密度

在3 μg/kg~30 μg/kg添加浓度范围内的回收率为65%~100%,批内相对标准偏差≤15%,批间相对标准偏差≤15%。

9 检出限和定量限

检出限和定量限见表4。

表4 检出限和定量限

化合物	检出限 μg/kg	定量限 μg/kg
GIu-P-2	0.1	0.5
IQx	1.0	3.0

表 4 (续)

化合物	检出限 $\mu\text{g}/\text{kg}$	定量限 $\mu\text{g}/\text{kg}$
MeIQ	0.1	0.5
GIu-P-1	0.1	0.5
8-MeIQx	0.3	1.0
Norharman	0.3	1.0
4,8-DiMeIQx	0.1	0.5
7,8-DiMeIQx	0.3	1.0
Harman	0.1	0.5
4,7,8-TriMeIQx	0.3	1.0
PhIP	0.1	0.5
A α C	1.0	3.0
Trp-P-1	0.1	1.0

附 录 A
(规范性)
13 种杂环胺的信息

13 种杂环胺的信息见表 A.1。

表 A.1 13 种杂环胺的信息

序号	英文名称	中文名称	CAS 号	分子量,g/mol
1	GIu-P-2	2-氨基-二吡啶[1,2-a;3',2'-d]咪唑	67730-10-3	220.7
2	IQx	2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]喹啉	108354-47-8	199.2
3	MeIQ	2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉	77094-11-2	212.3
4	GIu-P-1	2-氨基-6-甲基-二吡啶[1,2-a;3',2'-d]咪唑	67730-11-4	252.7
5	8-MeIQx	2-氨基-3,8-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉	77500-04-0	213.2
6	Norharman	9H-吡啶[3,4-b]呋喃	244-63-3	168.2
7	4,8-DiMeIQx	2-氨基-3,4,8-3H-三甲基咪唑[4,5-f]喹啉	95896-78-9	227.3
8	7,8-DiMeIQx	2-氨基-3,7,8-3H-三甲基咪唑[4,5-f]喹啉	92180-79-5	227.3
9	Harman	1-甲基-9H-吡啶[3,4-b]呋喃	486-84-0	182.2
10	1,7,8-TriMeIQx	2-氨基-1,7,8-四甲基-3H-咪唑[4,5-f]喹啉	132898-07-8	241.3
11	PhIP	2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-b]吡啶	105650-23-5	224.3
12	AaC	2-氨基-9H-吡啶[2,3-b]呋喃	26148-68-5	183.2
13	Trp-P-1	3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶[4,3-b]呋喃	68806-54-8	271.3

附录 B

(资料性)

13 种杂环胺标准溶液的液相色谱图

13 种杂环胺标准溶液的液相色谱图见图 B. 1。

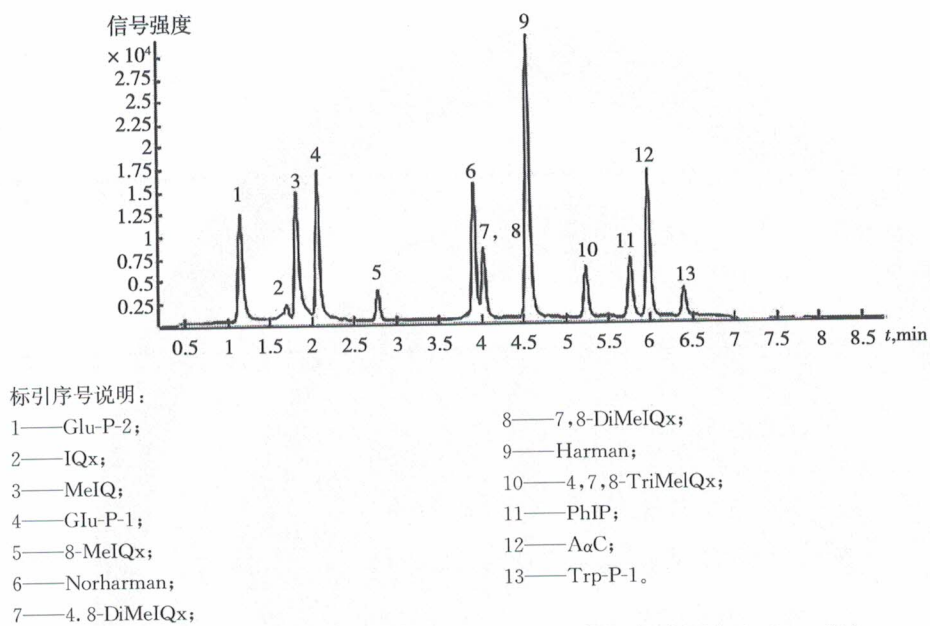


图 B. 1 13 种杂环胺标准溶液的液相色谱图 (50.0 μg/L)

附录 C

(资料性)

13 种杂环胺标准溶液的特征离子色谱图

13 种杂环胺标准溶液的特征离子色谱图见图 C.1。

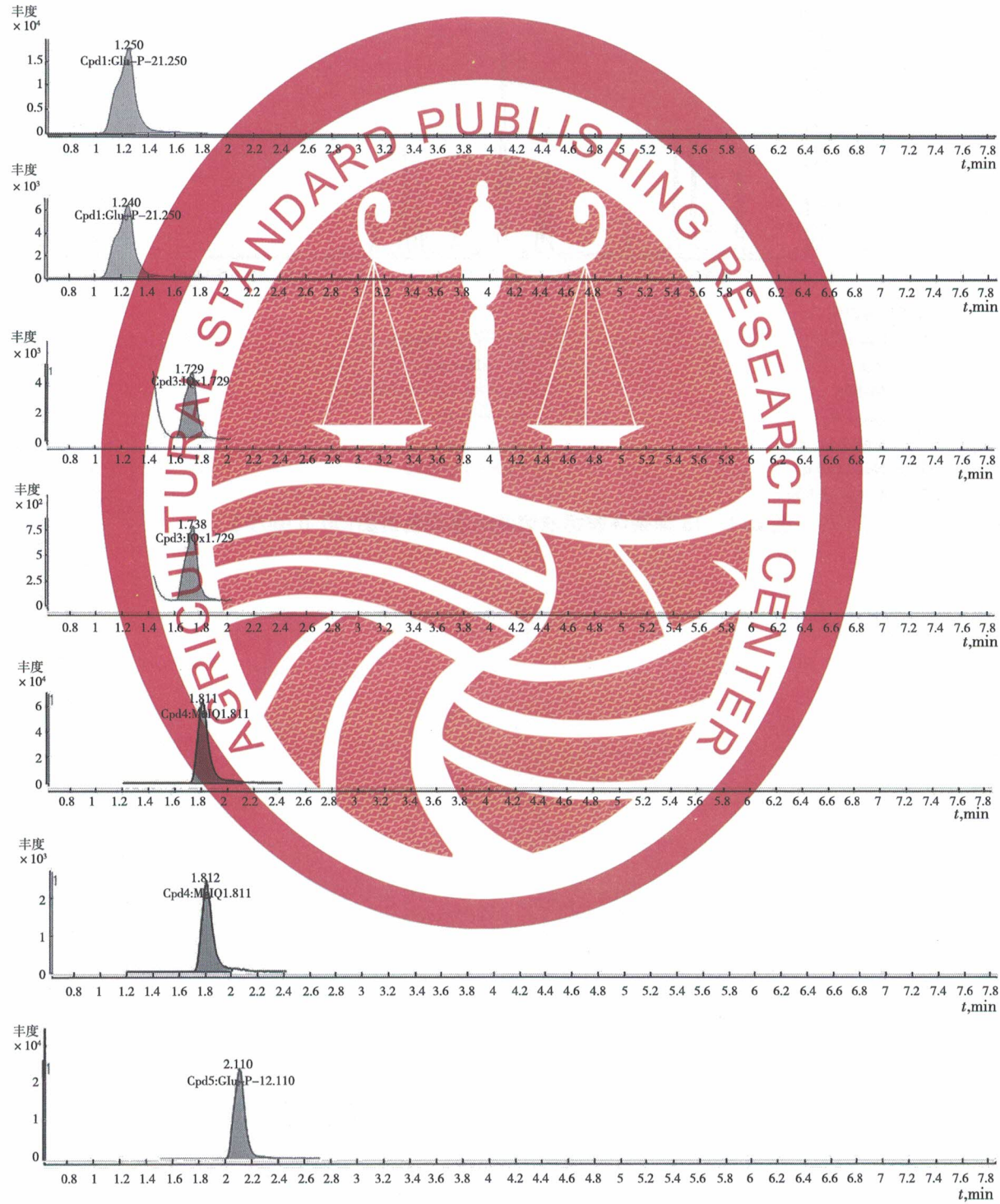


图 C.1 13 种杂环胺标准溶液的特征离子色谱图(50.0 μg/L)

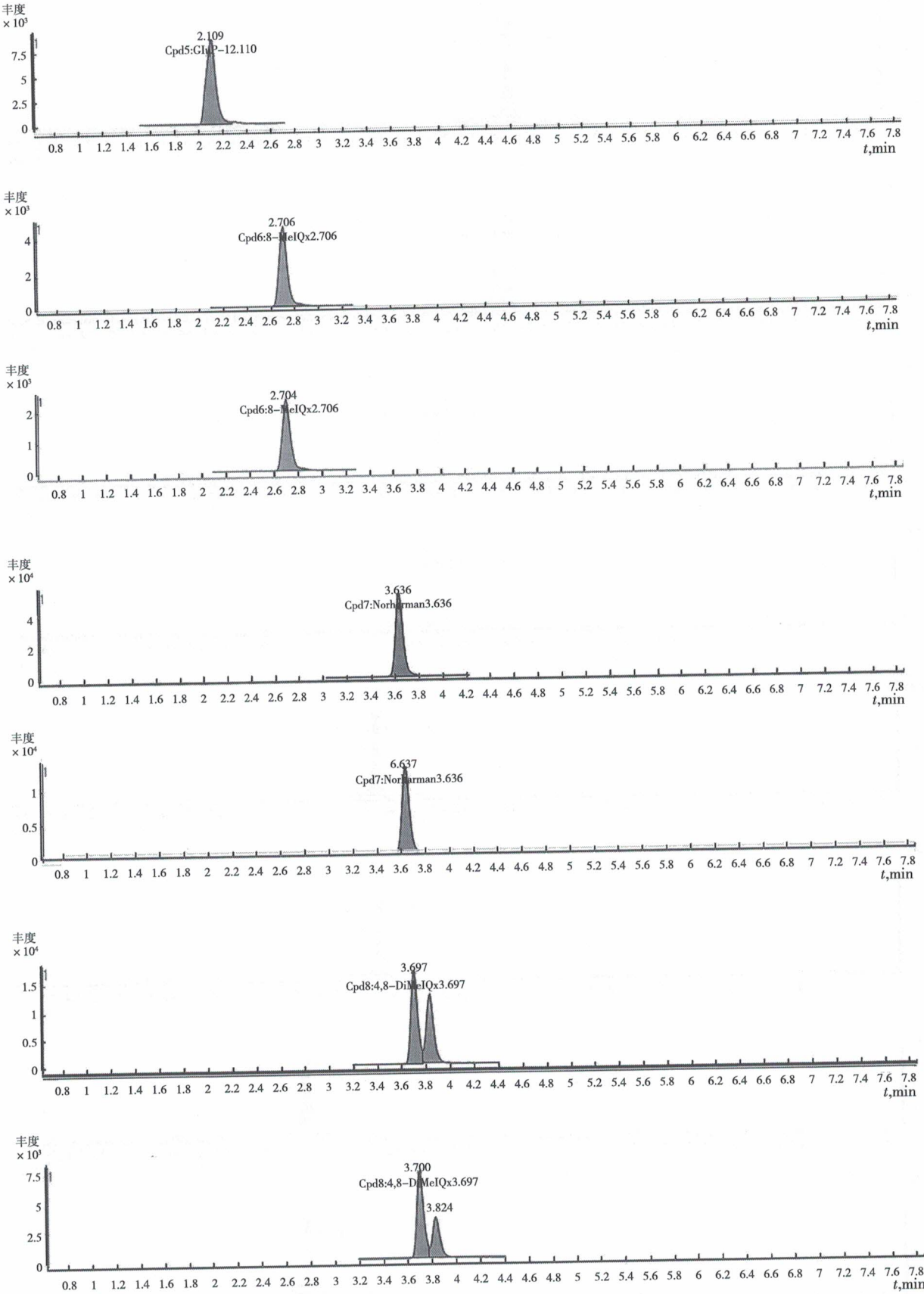


图 C. 1 (续)

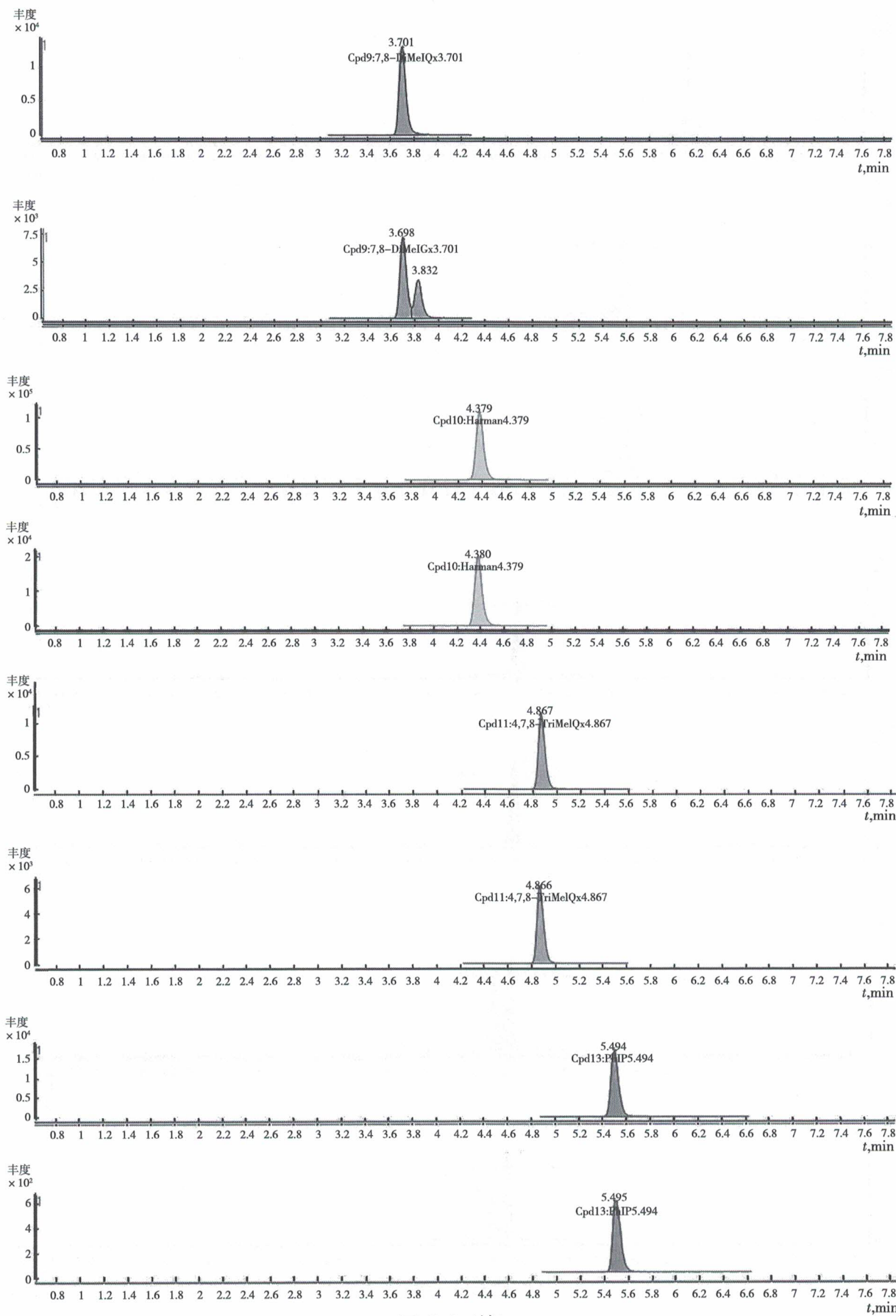


图 C. 1 (续)

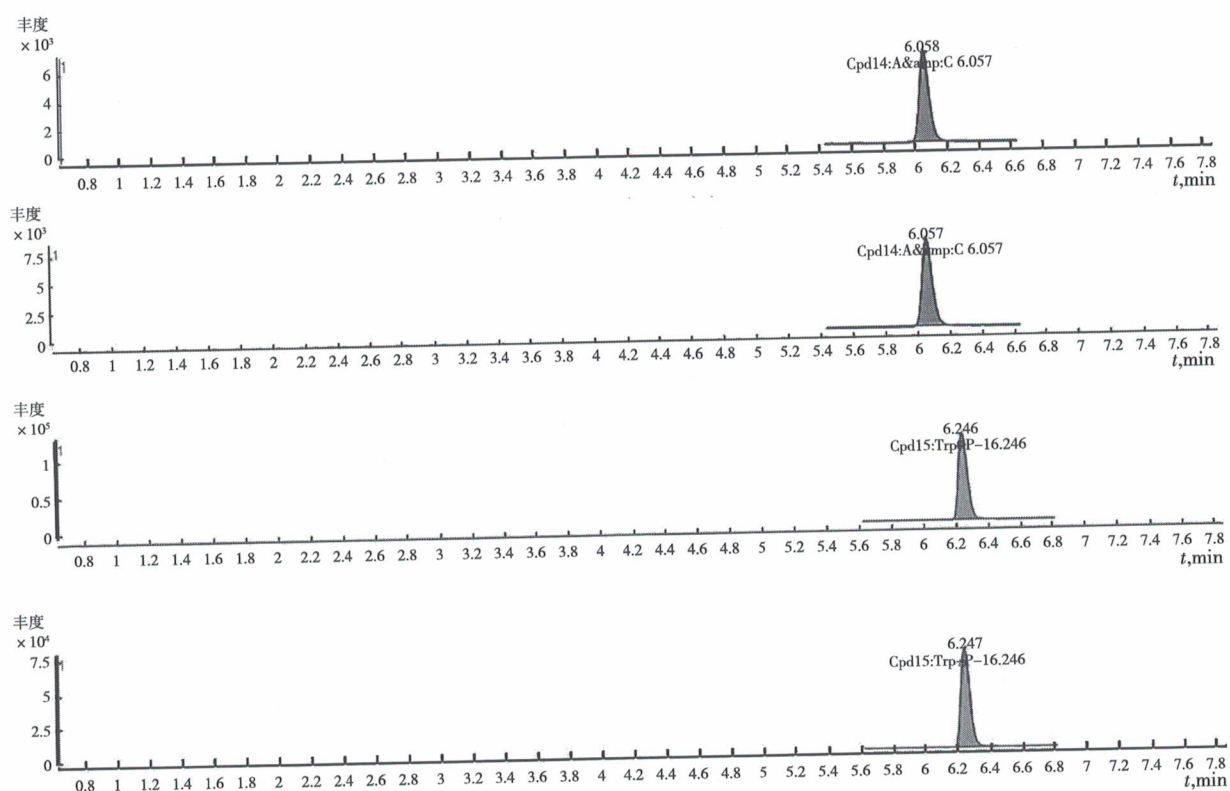


图 C.1 (续)

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
肉及肉制品中杂环胺检测
液相色谱-串联质谱法

NY/T 3904—2021

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

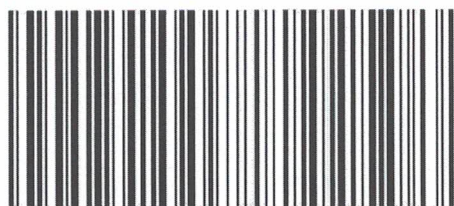
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2021 年 10 月第 1 版 2021 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 • 8586

定价: 32.00 元



NY/T 3904—2021

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261