

DBS61

陕西省食品安全地方标准

DBS61/xxxx—xxxx

食品安全地方标准
饮料中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的测定
液相色谱-质谱/质谱法

xxxx - xx-xx 发布

xxxx -xx -xx 实施

陕西省卫生健康委员会发布

前言

本标准按照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。

本标准代替DBS61/0007-2015《饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的测定液相色谱-串联质谱法》。

本标准与DBS61/0007-2015相比，主要变化如下：

- 标准名称修改为“食品安全地方标准饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的测定液相色谱-质谱/质谱法”；
- 扩充了第一法的适用范围；
- 对计算公式进行了修订；
- 增加对果蔬汁饮料的验证；
- 增加了检出限的验证；
- 修改了原标准的结构。

请注意本文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。

本文的附录A、附录B均为资料性附录。

本文由陕西省卫生健康委员会发布并归口。

本文由中华人民共和国西安海关技术中心提出并起草。

本文主要起草人：张璐，张亚莉，何强，施妍婧，孔祥虹，李子豪，李莹，邹阳，郝甜甜

本次为第一次修订。

食品安全地方标准饮料中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的测定液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的液相色谱-质谱/质谱的检测方法。
本标准适用于饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

试样中的 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑经水溶解或稀释，振荡提取后，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 甲醇（ CH_3OH , CAS: 67-56-1）：色谱纯。

4.1.2 乙腈（ CH_3CN , CAS: 75-05-8）：色谱纯。

4.1.3 甲酸（ CH_2O_2 , CAS: 64-48-6）：色谱纯。

4.1.4 甲酸铵（ NH_4CHO_2 , CAS: 208-753-9）。

4.1.5 氨水（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CAS: 1336-21-6）。

4.2 溶液配制

4.2.1 甲酸水溶液（2%）：准确量取 2 mL 甲酸和 98 mL 水，混合后备用。

4.2.2 氨水甲醇溶液（5%）：准确量取 5 mL 氨水和 95 mL 甲醇，混合后备用。

4.2.3 甲酸铵溶液（5mmol/L）：称取 0.0945 g 甲酸铵溶解于适量水中，用水定容至 300 mL。

4.2.4 乙腈-5 mmol/L 甲酸铵溶液（9+1，体积比）：准确量取 90 mL 乙腈和 10 mL 5 mmol/L 甲酸铵溶液（4.2.3），混合。

4.3 标准品

4.3.1 4-甲基咪唑（4-Methylimidazole, C₄H₆N₂, CAS: 822-36-6）、2-甲基咪唑（2-Methylimidazole, C₄H₆N₂, CAS: 693-98-1），纯度均≥ 98.0 %。

4.3.2 内标物:4-甲基咪唑-D₆（4-Methylimidazole-D₆,C₄D₆N₂, CAS: 1219804-79-1）：纯度≥99.0 %。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备液（1.0 mg/mL）：称取4-甲基咪唑和2-甲基咪唑各10.0mg（精确至0.01mg），于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，摇匀，配制成浓度为1.0mg/mL的4-甲基咪唑、2-甲基咪唑标准储备液，-20 °C避光保存，可保存6个月。

4.4.2 内标储备液（1.0 mg/mL）：称取4-甲基咪唑-D₆10.0 mg（精确至0.01mg），于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，摇匀，配制成浓度为1.0mg/mL的4-甲基咪唑-D₆储备液，-20 °C避光保存，可保存6个月。

4.4.3 混合标准工作溶液（1.0 μg/mL）：精密量取4-甲基咪唑和2-甲基咪唑标准储备液各0.25 mL，于25 mL容量瓶中，用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.2.4）稀释至刻度，配制成浓度均为10.0 μg/mL混合标准溶液中间液，再量取该中间液1.0 mL于10 mL容量瓶中，摇匀，得1.0 μg/mL混合标准工作液，0 °C~4 °C避光保存，可保存3个月。

4.4.4 内标工作溶液（1.0 μg/mL）：精密量取4-甲基咪唑-D₆内标储备液0.25 mL，于25 mL容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为10.0μg/mL的内标标准工作溶液，再量取该中间液1.0 mL于10 mL容量瓶中，摇匀，得1.0 μg/mL内标工作溶液。0 °C~4 °C避光保存，可保存3个月。

4.4.5 标准曲线的制备：精密量取适量混合标准工作溶液及内标标准工作溶液，用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.2.4）稀释配制成3.0、15.0、50.0、100.0、500.0 ng/mL系列标准溶液（内标物浓度均为10.0 ng/mL）。以标准溶液中被测组分峰面积和4-甲基咪唑-D₆峰面积的比值为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

注：在实际样品测定中，可根据样品浓度调整标准曲线范围和内标浓度。

4.5 材料

MCX 固相萃取柱：60mg/3mL，或相当者，使用前依次用 3 mL 甲醇和 5 mL 水活化。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01g。

5.3 振荡器。

5.4 涡旋混匀器：转速 3000 r/min。

5.5 离心机：转速 5000 r/min。

5.6 固相萃取装置。

5.7 氮吹仪。

5.8 容量瓶：10 mL。

5.9 移液枪：100 μ L、1.0 mL 和 10.0 mL。

5.10 有机系滤膜：0.22 μ m。

6 试样制备与保存

6.1 透明液体样品

将试样充分混匀后用于测定。

6.2 半粘稠制品

将试样充分混匀，用四层纱布挤出滤液，弃去最初几滴，收集滤液用于测定。

6.3 含悬浮物制品

将待测样品至于捣碎机中捣碎，用四层纱布挤出滤液，弃去最初几滴，收集滤液用于测定。

6.4 固体饮料制品

将试样按说明书中冲调方式冲调，充分混匀后用于测定。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样3g（精确至0.01g）于10 mL容量瓶中，加入内标工作溶液（4.4.4）100 μ L，用水定容至10.0 mL，振荡10 min，4500r/min下离心5min，取上层清液备用。

7.2 净化

取提取液（7.1）以 1.5mL 的速度上样于活化过的 MCX 固相萃取柱（4.5）过，待样液全部过柱后，依次用 2%甲酸水溶液（4.2.1）和甲醇各 5 mL 淋洗，再用 5%氨水甲醇溶液（4.2.2）9 mL 洗脱，洗脱液于 40 $^{\circ}$ C 氮气吹近干。用乙腈-5 mmol/L 甲酸铵溶液（4.2.4）1.0 mL 溶解残渣，涡旋混匀，滤膜（4.5.2）过滤，待测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：HILIC（2.1 \times 100 mm，1.7 μ m），或相当者；
- b) 柱温：40 $^{\circ}$ C；

- c) 流速：0.3 mL/min；
 d) 进样量：5.0 μ L；
 e) 流动相：乙腈+5 mmol/L甲酸铵溶液（9+1，V/V），等度洗脱；

7.4.2 质谱参考条件

- 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) 喷雾电压：3.5 kV；
 e) 离子传输管温度：320 $^{\circ}$ C；
 f) 喷雾气温度：300 $^{\circ}$ C；
 g) 鞘气：35.0 Arb；
 h) 辅助气：5 Arb；
 i) 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞电压见表1。

表14-甲基咪唑和2-甲基咪唑的质谱参考参数参考质谱参数

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子 (m/z)	透镜电压 (RF Lens) (V)	碰撞能量 (V)
4-甲基咪唑 (4-Mel)	83.2/56.3	83.2/56.3	54	17
	83.2/68.2			32
2-甲基咪唑 (2-Mel)	83.2/56.3	83.2/56.3	54	17
	83.2/68.2			32
氘代4-甲基咪唑 (4-Mel-D ₆)	83.2/45.4	61.3	89	30
	83.2/61.3			20

7.4.3 测定方法

7.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试样中目标化合物的保留时间与标准工作溶液中目标化合物的保留时间相比，偏差在 $\pm 5\%$ 以内，且检测到的离子相对丰度，应当与浓度相当的标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表2要求。

表2定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对丰度，%	允许偏差，%
>50	± 20
> 20~50	± 25
>10~20	± 30
≤ 10	± 50

7.4.3.2 定量测定

取试样溶液和标准溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积比计算。对照溶液及试样溶液中4-甲基咪唑、2-甲基咪唑和4-甲基咪唑-d₆的响应值均在仪器检测的线性范围之内，定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片，4-甲基咪唑、2-甲基咪唑和4-甲基咪唑-d₆多反应监测（MRM）特征离子质量色谱图见附录A。

7.5 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

8 结果计算和表达

试样中待测物的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{A \times A'_{is} \times C_S \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_S \times C'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X — 试样中待分析物的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

A — 试样溶液中被测物质的峰面积；

A_{is} — 试样溶液中内标的峰面积；

A'_{is} — 标准工作溶液中内标的峰面积；

A_S — 标准工作溶液中待测物的峰面积；

C_S — 标准工作溶液中待测物的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C'_{is} — 标准工作溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C_{is} — 试样溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V — 试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m — 试样质量，单位为克（ g ）。

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，保留三位有效数字。

9 方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

4-甲基咪唑检出限为 $3.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，2-甲基咪唑的检出限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；4-甲基咪唑和2-甲基咪唑定量限均为 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

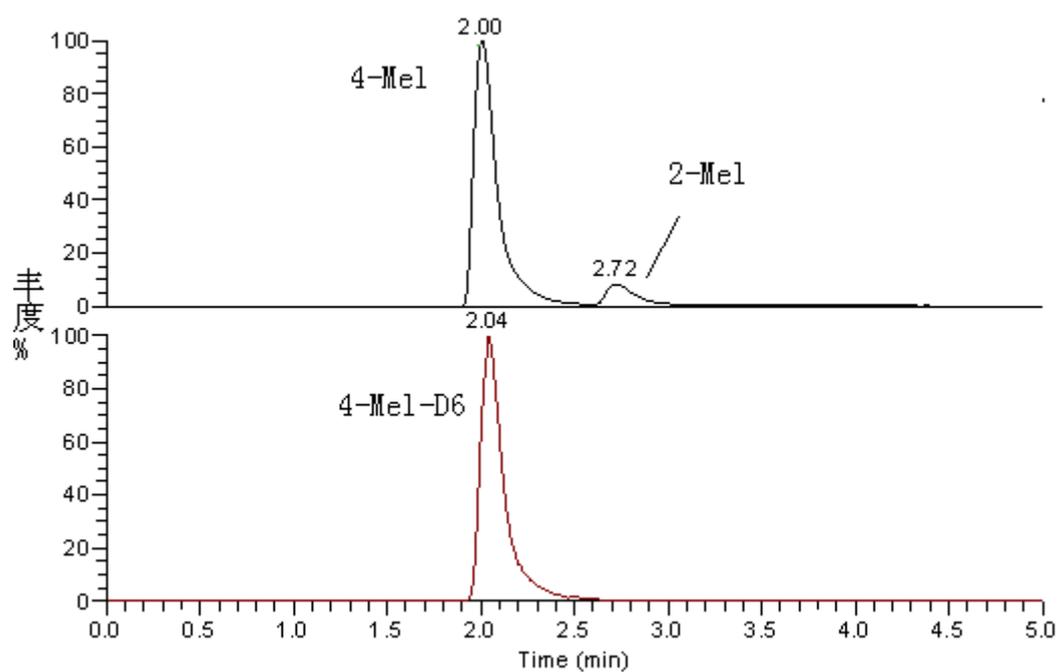
4-甲基咪唑在3.0~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上的回收率范围为80.0%~113.3%；2-甲基咪唑在5.0~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率范围为82.8%~120.0%。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液特征离子质量色谱图

标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1



图A.1 4-甲基咪唑 (4-Mel)、2-甲基咪唑 (2-Mel) 和氘代4-甲基咪唑 (4-Mel-D₆) 的特征离子质量色谱 (10 μg/kg)

附录 B
(资料性附录)

4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑残留检测的添加回收率及精密度数据

表B.1碳酸饮料、特殊用途饮料、茶饮料、咖啡饮料及果蔬汁饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑添加浓度及回收率 (n=5)

样品	化合物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	RSD (%)
碳酸饮料	4-甲基咪唑	10	89.0~95.0	0.5
		25	98.4~119.9	2.1
		50	105.2~111.7	1.0
		75	95.0~112.4	2.7
	2-甲基咪唑	10	92.5~96.1	1.6
		25	88.4~104.4	7.0
		50	99.4~104.4	4.2
		75	109.7~118.7	2.9
特殊用途饮料	4-甲基咪唑	10	96.6~100.1	1.5
		25	97.6~103.6	2.6
		50	98.1~102.5	1.8
	2-甲基咪唑	10	96.7~98.7	0.8
		25	99.3~100.9	0.8
		50	98.1~102.5	2.0
茶饮料	4-甲基咪唑	10	88.9~92.3	1.4
		25	99.2~104.4	2.2
		50	97.8~102.8	1.9
	2-甲基咪唑	10	98.8~100.4	0.8
		25	96.9~98.8	0.8
		50	97.8~102.2	2.0
咖啡饮料	4-甲基咪唑	10	94.0~99.0	2.0
		25	98.5~110.4	4.1
		50	91.9~98.8	2.7
	2-甲基咪唑	10	93.0~97.0	1.6
		25	102.3~107.5	2.1
		50	88.8~104.7	5.9

样品	化合物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	RSD (%)
果蔬汁饮料	4-甲基咪唑	3	80.0~116.7	3.1
		10	94.0~111.0	1.6
		25	80.8~110.8	3.2
		50	96.2~103.4	2.6
	2-甲基咪唑	5	84.0~110.0	5.5
		10	84.0~120.0	6.9
		25	82.8~115.2	3.3
		50	85.2~109.6	6.0