

## 附件

# 食品中 15 种酚汀（酚丁）、酚酞及其酯类衍生物或类似物的执法检验方法

### 1 范围

本方法规定了食品中15种酚汀（酚丁）、酚酞及其酯类衍生物或类似物的液相色谱串联高分辨质谱定性测定方法。

本方法适用于饮料、糖果、果冻、蜜饯、咖啡、茶等食品及片剂、胶囊、口服液等剂型中酚酞、酚丁、双醋酚丁、双丙酚丁、双己酚丁、双庚酚丁、双辛酚丁、双环丙甲酰酚丁、双环己甲酰酚丁、三环丙甲酰酚丁、6-氟双丙酚丁、5-氯酚丁、5-氯双醋酚丁、双酚沙丁、双酚沙丁醋酸酯15种物质的定性测定。

### 2 原理

试样经甲醇超声提取、过滤后，滤液供液相色谱串联高分辨质谱测定，比较试样与标准品的保留时间、一级质谱图和二级质谱图，进行目标物定性测定。

### 3 试剂与材料

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

#### 3.1 试剂

3.1.1 乙腈（ $\text{CH}_3\text{CN}$ ）：色谱纯。

3.1.2 甲酸（ $\text{HCOOH}$ ）：色谱纯。

3.1.3 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ）：色谱纯。

3.1.4 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ）。

#### 3.2 试剂配制

3.2.1 0.1%甲酸水溶液：量取1 mL甲酸（3.1.2），用水稀释至1000 mL，用滤膜（3.5.1）过滤。

3.2.2 甲醇水溶液（1+1）：将甲醇（3.1.3）与水等体积混合。

#### 3.3 标准品

酚酞、酚丁（又名：酚汀）、双醋酚丁、双丙酚丁（又名：双丙酚汀）、双己酚丁、双庚酚丁、双辛酚丁、双环丙甲酰酚丁、双环己甲酰酚丁、三环丙甲酰酚丁、6-氟双丙酚丁、5-氯酚丁、5-氯双醋酚丁（又名：4-氯双醋酚丁）、双酚沙丁、双酚沙丁醋酸酯 15 种物质标准品纯度 $\geq 98\%$ ，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 号及分子式等信息见附录 A。

#### 3.4 标准溶液配制

#### 3.4.1 标准储备液的配制 (100 µg/mL)

分别准确称取15种标准品(3.3)各10 mg(精确至0.01 mg),用乙腈(3.1.1)溶解,转移到100 mL容量瓶中,用乙腈(3.1.1)定容至刻度,摇匀,配成浓度为100 µg/mL标准储备液,-18℃避光贮存,有效期3个月。

#### 3.4.2 混合标准工作液的配制 (1 µg/mL)

分别准确吸取标准储备液(3.4.1)各1 mL于100 mL容量瓶中,用甲醇水溶液(1+1)(3.2.2)定容至刻度,摇匀,配成浓度为1 µg/mL的混合标准工作液。或依仪器响应情况配制至适当浓度。现用现配。

### 3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜: 0.22 µm, 水相型。

3.5.2 微孔滤膜: 0.22 µm, 有机相型。

3.5.3 具塞离心管: 50 mL。

3.5.4 容量瓶: 50 mL、100 mL。

## 4 仪器和设备

4.1 液相色谱串联高分辨质谱仪,配有电喷雾(ESI)离子源,分辨率 $\geq 20\,000(m/z)$ 等于200,按半峰宽(FWHM)计。

4.2 分析天平:感量分别为0.01 mg和1 mg。

4.3 粉碎机。

4.4 匀浆机。

4.5 离心机:转速 $\geq 4\,000$  r/min。

4.6 超声波发生器:功率 $\geq 500$  W,频率 $\geq 37$  kHz。

## 5 分析步骤

### 5.1 试样制备

#### 5.1.1 固体饮料、糖果、蜜饯、咖啡、茶、片剂

取代表性样品20 g或全部试样(试样低于20 g时),使用粉碎机粉碎,充分混匀。

#### 5.1.2 果冻

取代表性样品20 g或全部试样(试样低于20 g时),使用匀浆机匀浆,充分混匀。

#### 5.1.3 胶囊

取代表性样品20 g或全部试样(试样低于20 g时),将胶囊壳与内容物分离,胶囊壳剪碎,与内容物充分混匀。

#### 5.1.4 液体饮料、口服液

取代表性样品20 g或全部试样(试样低于20 g时),充分混匀。

### 5.2 试样处理

准确称取1 g试样(精确至0.001 g)置于50 mL具塞离心管(3.5.3)中,加入40 mL甲醇(3.1.4),超声提取15 min,冷却至室温,于4 000 r/min离心5 min,上清液全部转移至50 mL容量瓶(3.5.4)中,用甲醇(3.1.4)定容至刻度,混匀。取适量上清液过微孔滤膜(3.5.2)过滤,根据实际浓度用甲醇水溶液(1+1)(3.2.2)适当稀释,待测定。

### 5.3 仪器参考条件

#### 5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub> 色谱柱，75 mm×3.0 mm（内径），2.7 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液（3.2.1），B 相为乙腈（3.1.1），梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
15	2	98
17	2	98
17.5	95	5
20	95	5

- c) 流速：0.4 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- e) 进样量：5 μL。

#### 5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离（ESI）；
- b) 检测方式：MS/MS 模式；
- c) 扫描方式：正离子模式；
- d) 毛细管电压：5 000 V；
- e) 干燥气温度：325 °C；
- f) 干燥气流量：12 L/min；
- g) 雾化气压力：345 kPa；
- h) 鞘气温度：375 °C；鞘气流量：12 L/min。

### 5.4 定性测定

#### 5.4.1 筛查

按照仪器参考条件（5.3）测定混合标准工作液（3.4.2）和试样溶液（5.2），记录各化合物的色谱峰保留时间及多级质谱图。当试样中检出的色谱峰（信噪比≥3），与混合标准工作液中相应化合物的色谱峰保留时间一致（相对偏差在±2.5%之内），并且准分子离子及至少 2 个主要碎片离子精确质荷比相对偏差不超过百万分之十（≤10 ppm），可认为筛查到疑似阳性结果，须进行确认。

或通过混合标准工作液（3.4.2）进样分析获得化合物的保留时间、母离子的精确质荷比、至少 2 个主要碎片离子的精确质荷比，从而建立目标化合物库。当试样中检出的色谱峰（信噪比≥3），与经验证的目标化合物库中相应化合物的色谱峰保留时间一致（相对偏差在±2.5%之内），并且准分子离子及至少 2 个主要碎片离子精确质荷比相对偏差不超过百万分之十（≤10 ppm），可认为筛查到疑似阳性结果，须进行确认。

#### 5.4.2 确认

取与试样基质基本相同或相近的空白试样，按 5.2 同法制备，制得空白基质溶液。吸取疑似目标物的标准储备液（3.4.1）适量，用空白基质溶液稀释并混匀，配成与样品中目标物浓度接近的空白基质匹配标准品溶液。

按照仪器参考条件（5.3）测定空白基质匹配标准品溶液和试样溶液，记录化合物的色谱峰保留时间及多级质谱图。当试样中检出的色谱峰（信噪比 $\geq 3$ ），与空白基质匹配标准品溶液中相应化合物的色谱峰比较，符合下列判定条件时，可确认为检出该化合物。

（1）保留时间：相对偏差应不大于 $\pm 2.5\%$ 。

（2）一级及二级质谱质量准确性：一级母离子及至少 2 个主要碎片离子精确质荷比相对偏差不超过百万分之五（ $\leq 5 \text{ ppm}$ ）；当  $m/z < 200$  时，其绝对偏差应  $< 1 \text{ mDa}$ 。

（3）同位素峰：同位素峰分布应一致，精确质荷比应符合上述质量准确性要求。

（4）碎片相对离子丰度比：至少 2 个主要碎片的相对离子丰度比偏差不超过表 2 规定的范围。

表 2 定性确认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	$\leq 10$
允许相对偏差/%	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

如有检出，酚酞可按照食品补充检验方法 BJS201701 定量测定，双醋酚丁可按照食品补充检验方法 BJS202209 定量测定，双丙酚丁可按照市监稽发〔2023〕95 号附件 1 定量测定。其余化合物可参照上述方法建立定量方法，并按照 GB 5009.295 进行方法确认。

推荐使用非靶向检测模式，如发现某化合物不是上述 15 种化合物，但部分碎片离子与表 3 中所列特征碎片离子一致，应考虑可能为酚丁、酚酞新型酯类衍生物或卤代类似物，建议进一步结构鉴定。

表 3 具有以下结构母核的化合物特征碎片离子

结构母核	特征碎片离子
酚酞	225.0546, 197.0597
酚丁	224.0706, 196.0757
卤代酚丁	氟代：242.0612, 214.0663 氯代：258.0316, 230.0373，并符合 Cl 同位素分布 溴代：301.9811, 273.9862，并符合 Br 同位素分布 碘代：349.9672, 321.9723
双酚沙丁	240.0655, 212.0706

## 5.5 空白试验

除不加试样外，完全按照上述操作步骤进行。

## 6 方法灵敏度、特异性

当取样量为 1 g，定容体积为 50 mL 时，饮料、糖果、果冻、蜜饯及茶等食品及片剂、胶囊、口服液等剂型基质中 15 种化合物的检出限为 1.0 mg/kg；咖啡基质中 15 种化合物的检出限为 2.0 mg/kg。

空白试验应无干扰。

附录 A

(规范性)

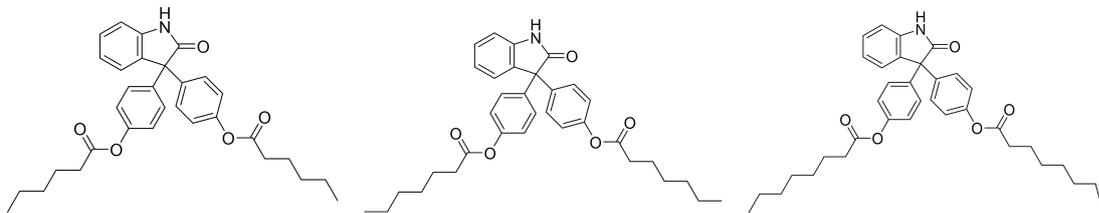
酚酞等 15 种标准品的基本信息

酚酞等 15 种标准品的中文名称、英文名称、分子式、CAS 号见表 A.1。

表 A.1 酚酞等 15 种标准品的基本信息

序号	中文名称	英文名称	分子式	CAS 号
1	酚酞	Phenolphthalein	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	77-09-8
2	酚丁	Oxyphenisatine	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	125-13-3
3	双醋酚丁	Oxyphenisatine diacetate	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	115-33-3
4	双丙酚丁	Oxyphenisatine dipropionate	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	2943075-86-1
5	双己酚丁	Oxyphenisatin dihexylester	C <sub>32</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	/
6	双庚酚丁	Oxyphenisatin dianthate	C <sub>34</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>	/
7	双辛酚丁	Oxyphenisatin dioctanoate	C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	/
8	双环丙甲酰酚丁	Oxyphenisatin dicyclopropanecarboxylate	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	2943075-87-2
9	双环己甲酰酚丁	Oxyphenisatin dicyclohexanecarboxylate	C <sub>34</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	/
10	三环丙甲酰酚丁	Oxyphenisatin tricyclopropanecarboxylate	C <sub>32</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	/
11	6-氟双丙酚丁	6-Fluoro-oxyphenisatin dipropionate	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> FNO <sub>5</sub>	/
12	5-氯酚丁	5-Chloro-oxyphenisatine	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>	861070-76-0
13	5-氯双醋酚丁	5-Chloro-oxyphenisatin diacetate	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>5</sub>	2910823-02-6
14	双酚沙丁	Bisoxatina	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	17692-24-9
15	双酚沙丁醋酸酯	Bisoxatina acetate	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	14008-48-1

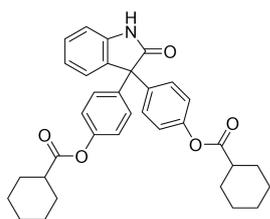
注:



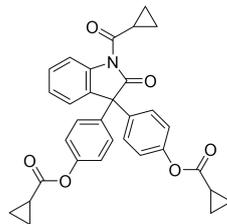
双己酚丁 C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>5</sub>

双庚酚丁 C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub>

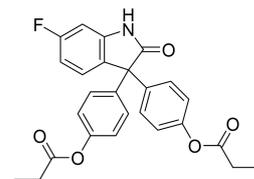
双辛酚丁 C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>5</sub>



双环己甲酰酚丁 C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>5</sub>



三环丙甲酰酚丁 C<sub>32</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>



6-氟双丙酚丁 C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>FNO<sub>5</sub>

## 附录 B

(资料性)

## 酚酞等 15 种化合物高分辨质谱参考信息

酚酞等 15 种化合物名称、分子式、准分子离子、保留时间、碰撞电压及主要碎片离子参考信息见表 B.1。

表B.1 酚酞等15种化合物高分辨质谱参考信息

序号	化合物	分子式	准分子离子 ( <i>m/z</i> )	保留时间 (min)	碰撞电压 (V)	主要碎片离子 ( <i>m/z</i> )
1	酚酞	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	319.0965	5.6	20	225.0546, 197.0597, 141.0704
2	酚丁	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	318.1125	5.1	20	224.0706, 196.0757, 168.0813
3	双醋酚丁	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	402.1336	7.0	40	224.0706, 196.0757, 168.0813
4	双丙酚丁	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	430.1649	8.0	40	224.0706, 196.0757, 168.0813
5	双己酚丁	C <sub>32</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	514.2588	10.3	40	224.0706, 196.0757, 318.1130
6	双庚酚丁	C <sub>34</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>	542.2901	10.8	40	224.0706, 196.0757, 318.1130
7	双辛酚丁	C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	570.3214	11.2	40	224.0706, 196.0757, 318.1130
8	双环丙甲酰酚丁	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	454.1649	8.1	20	224.0706, 196.0757, 292.0974
9	双环己甲酰酚丁	C <sub>34</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	538.2588	10.6	40	224.0706, 196.0757, 318.1130
10	三环丙甲酰酚丁	C <sub>32</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	522.1911	9.6	40	224.0706, 196.0757, 358.1438
11	6-氟双丙酚丁	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> FNO <sub>5</sub>	448.1555	8.0	40	242.0612, 214.0663, 186.0714
12	5-氯酚丁	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>	352.0735	5.6	20	258.0316, 230.0373, 223.0628
13	5-氯双醋酚丁	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>5</sub>	436.0946	7.5	40	258.0316, 230.0373, 223.0628
14	双酚沙丁	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	334.1074	5.3	20	240.0655, 212.0706
15	双酚沙丁醋酸酯	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	418.1285	7.2	40	240.0655, 212.0706

## 附录 C

(资料性)

### 液相色谱串联高分辨质谱提取离子色谱图及高分辨二级质谱图

15 种化合物标准溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 的液相色谱串联高分辨质谱提取离子色谱图见图 C.1。

15 种化合物标准溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 的高分辨二级质谱图见图 C.2。

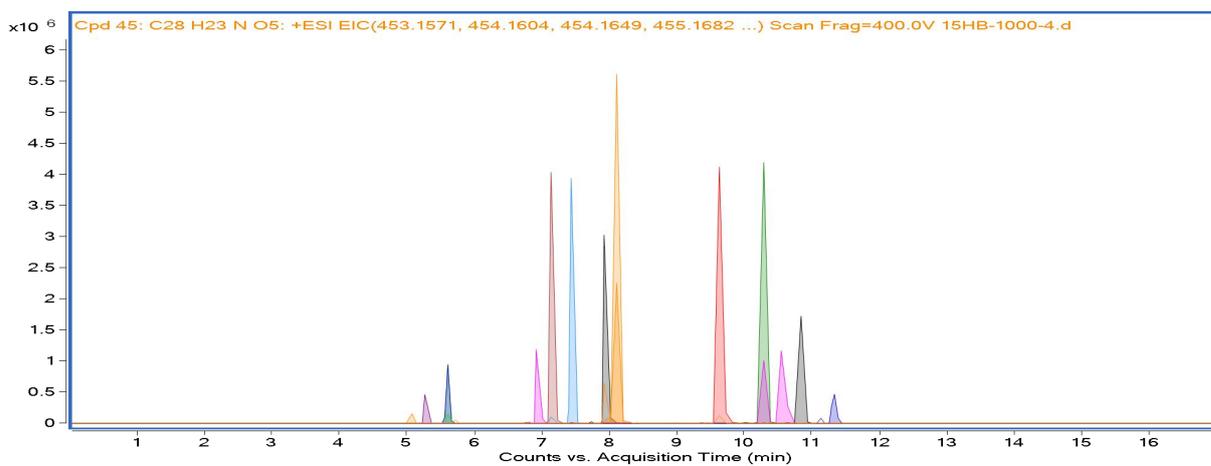
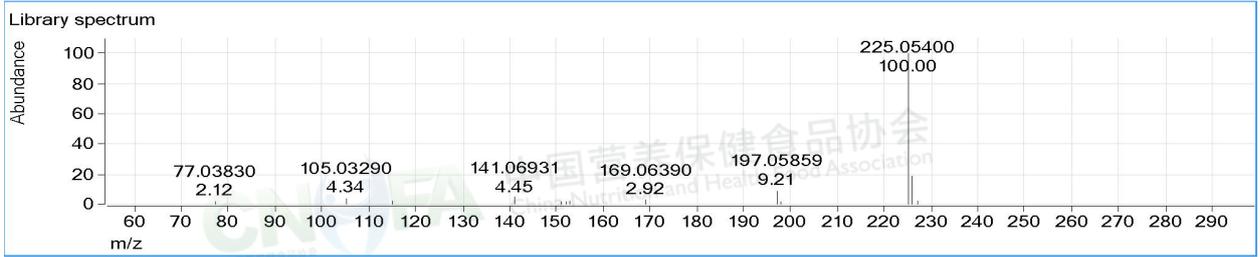
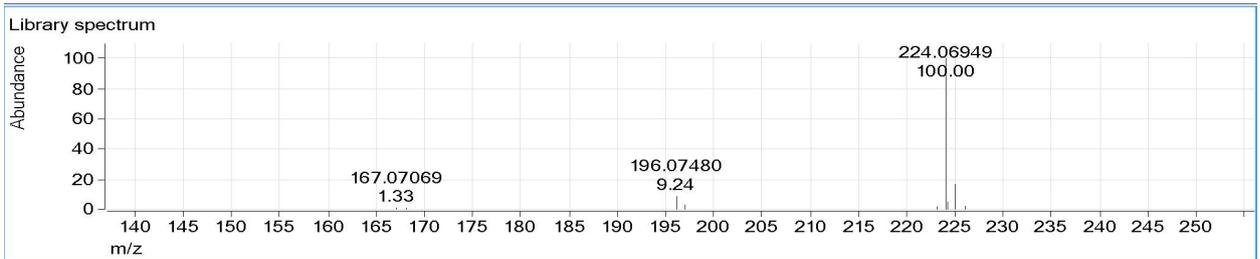


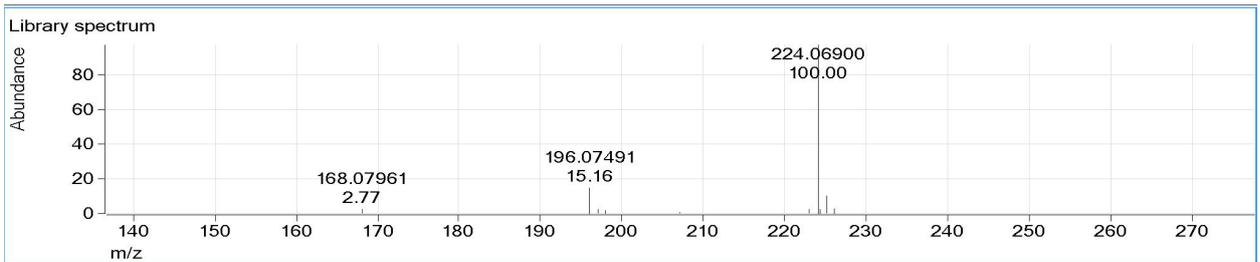
图 C.1 15 种化合物标准溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 的液相色谱串联高分辨质谱提取离子色谱图



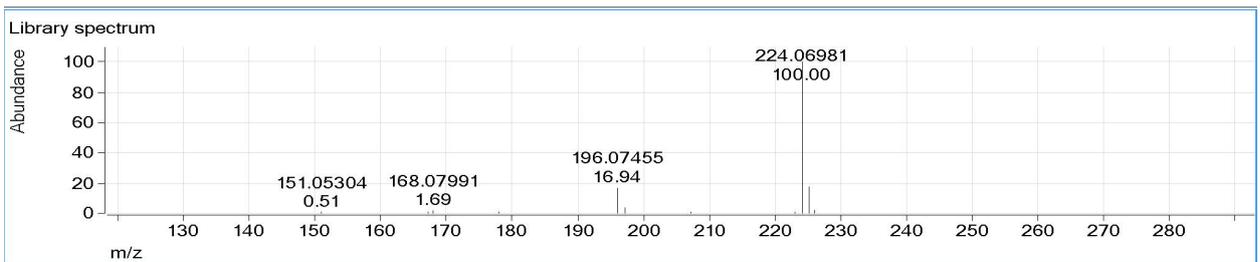
酚酞



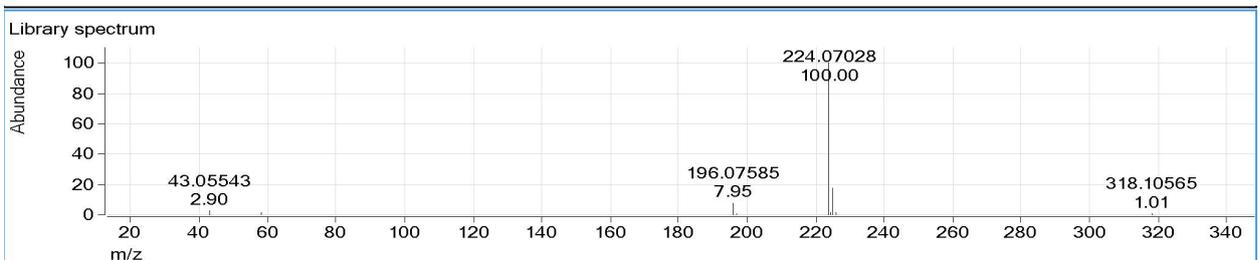
酚丁



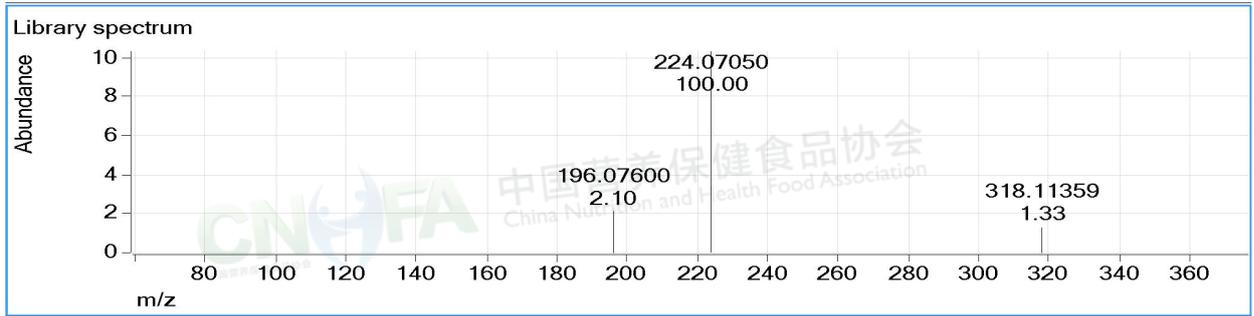
双醋酚丁



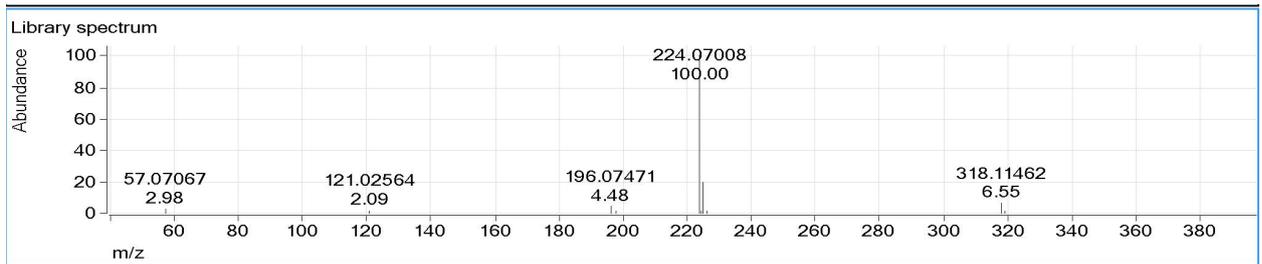
双丙酚丁



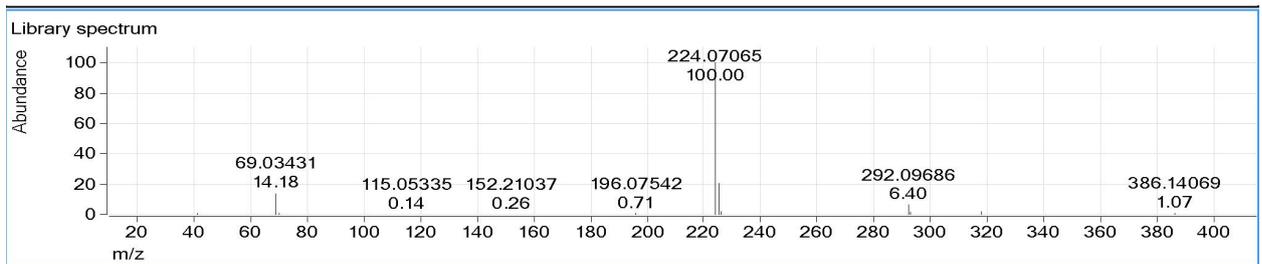
双己酚丁



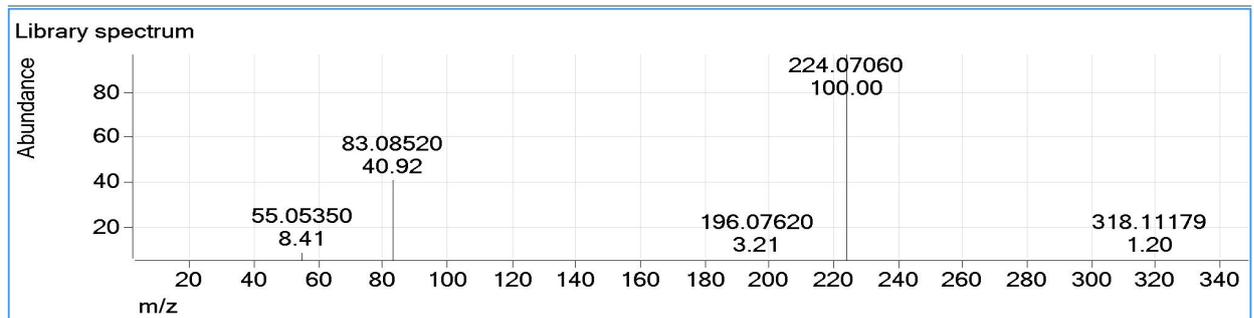
双庚酚丁



双辛酚丁



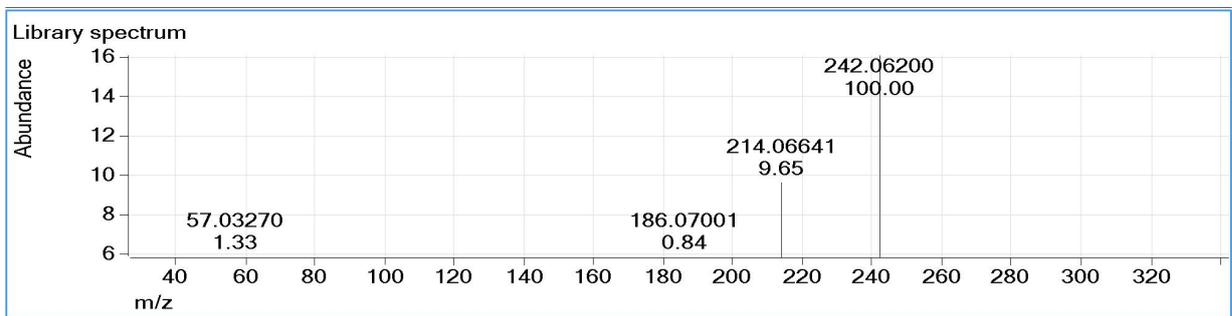
双环丙甲酰酚丁



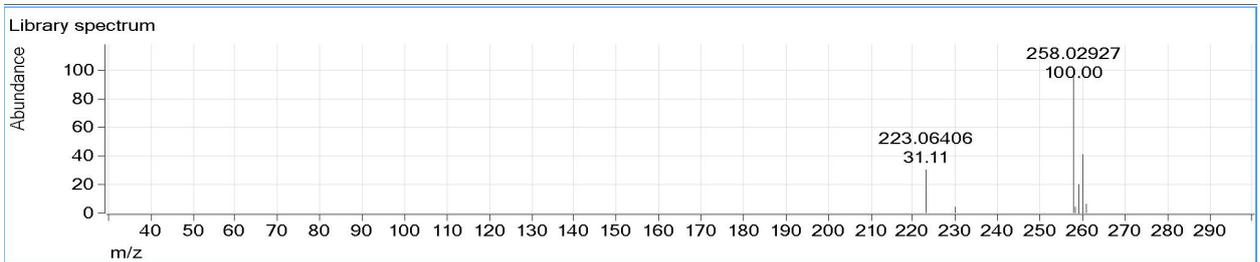
双环己甲酰酚丁



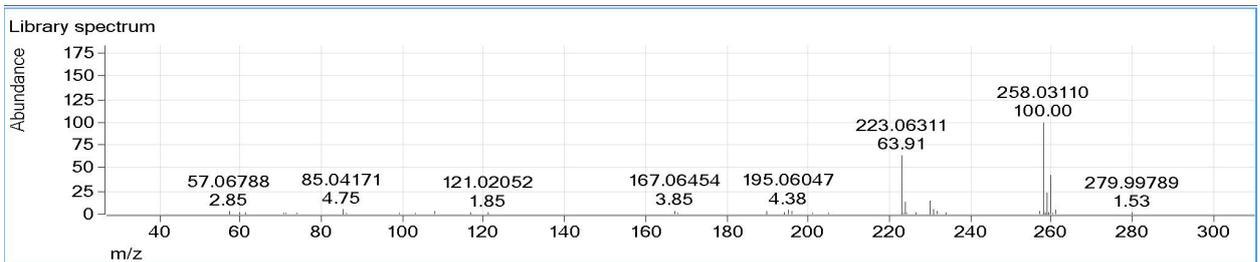
三环丙甲酰酚丁



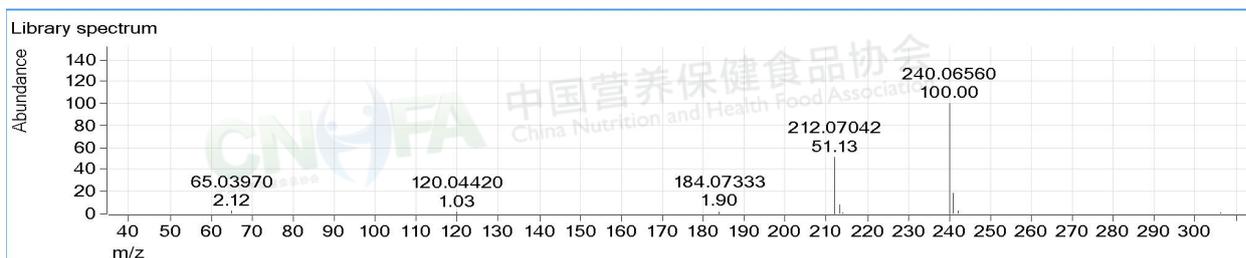
6-氟双丙酚丁



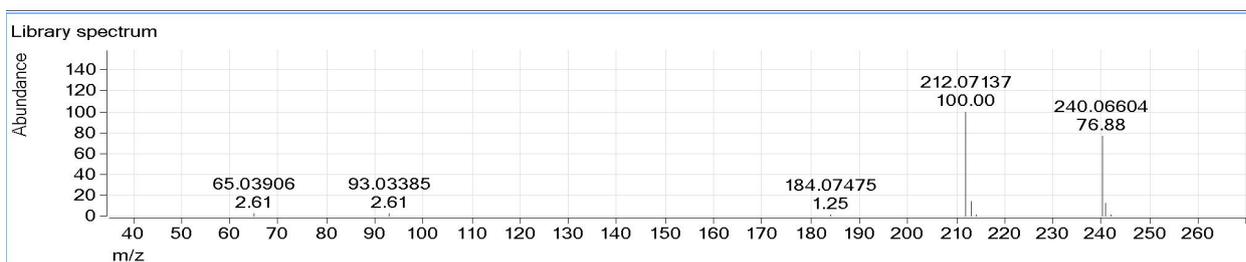
5-氯酚丁



5-氯双醋酚丁



双酚沙丁



双酚沙丁醋酸酯

图 C.2 15 种化合物标准溶液的高分辨二级质谱图

本方法起草单位：上海市食品药品检验研究院

本方法验证单位：中国检验检疫科学研究院、中国肉类食品综合研究中心、湖北省食品质量安全监督检验研究院、重庆市食品药品检验检测研究院、广州检验检测认证集团有限公司

主要起草人：孙健、冉莹瑛、胡青、于泓、张静娴、黄帆