

附件 1

食品中非布司他异丙基替代物的执法检验方法

1 范围

本方法规定了食品中非布司他异丙基替代物的液相色谱-串联质谱测定方法。
本方法适用于糖果、饮料、酒类、茶叶及相关制品中非布司他异丙基替代物的定性和定量测定。

2 原理

试样经甲醇超声提取、过滤后，滤液供液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

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 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

3.1.2 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

3.1.3 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。

3.2 试剂配制

0.1% 甲酸水溶液：量取 1 mL 甲酸 (3.1.2)，用水稀释至 1 000 mL，混匀。

3.3 标准品

非布司他异丙基替代物标准品 (Febuxostat isopropyl isomer, C₁₅H₁₄N₂O₃S, CAS 号：144060-52-6)，纯度 ≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液的配制 (100 μg/mL)

准确称取非布司他异丙基替代物标准品 (3.3) 5 mg (精确至 0.01 mg)，用甲醇 (3.1.1) 溶解，转移到 50 mL 容量瓶中，用甲醇 (3.1.1) 定容，摇匀，配制成质量浓度为 100 μg/mL 的标准储备液，-18 °C 以下保存，有效期 3 个月。

3.4.2 标准中间液的配制 (1 μg/mL)

准确吸取标准储备液（3.4.1）1 mL 至 100 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）定容，摇匀，配制质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间液，现用现配。

3.4.3 系列标准工作液的配制

分别准确吸取 10 μL 、20 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 标准中间液（3.4.2），置于一组 10 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）定容，配制成 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作液，或依仪器响应情况配制适当浓度的标准工作液。必要时，可采用空白基质提取液（5.2.4）配制基质匹配标准工作液。现用现配。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相。

3.5.2 具塞离心管：50 mL。

3.5.3 容量瓶：10 mL、50 mL。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪，配备电喷雾离子源（ESI）。

4.2 分析天平：感量分别为 0.01 mg 和 1 mg。

4.3 离心机：转速 $\geq 4\ 000$ r/min。

4.4 超声波清洗器：功率 ≥ 500 W，频率 ≥ 37 kHz。

4.5 恒温水浴锅：水浴温度不低于 80 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.6 涡旋混合器。

5 分析步骤

5.1 试样制备

取适量有代表性的样品，液态样品直接摇匀，其他样品需匀浆或粉碎均匀。

5.2 试样处理

5.2.1 压片糖果、固体饮料、茶叶及相关制品

准确称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加入 40 mL 甲醇（3.1.1），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（3.5.3）中，用甲醇（3.1.1）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，取续滤液，待测定。

5.2.2 其他糖果

准确称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加入 10 mL 水，80°C 水浴 15 min（水浴过程中注意摇散），取出，冷却至室温，加入 30 mL 甲醇（3.1.1），涡旋混匀，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（3.5.3）中，用甲醇（3.1.1）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，取续滤液，待测定。

除特殊固体组成（如胶基糖果中的胶基等）无法溶解外，应全部溶解。

5.2.3 液体饮料和酒类

准确称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加 40 mL 甲醇（3.1.1），超声提取 15 min，冷却至室温，转移至 50 mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，取续滤液，待测定。

5.2.4 空白基质提取液

称取空白试样适量，与试样同法处理，制得空白基质提取液。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，100 mm×2.1 mm（内径），1.7 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液（3.2），B 相为乙腈（3.1.3），梯度洗脱程序见表 1；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：35 °C；
- e) 进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	80	20
2.00	80	20
4.00	10	90
8.00	10	90
8.10	80	20
10.00	80	20

5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；

b) 检测方式：多反应离子监测（MRM）；

c) 扫描方式：正离子模式；

d) 毛细管电压：3.00 kV；

e) 脱溶剂气温度：350 °C；

f) 脱溶剂气流量：650 L/hr；

g) 锥孔流量：150 L/hr。

碰撞气为高纯氮气，干燥气、雾化气、鞘气等均为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，毛细管电压、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量、锥孔流量、碰撞能量、锥孔电压等参数应优化至最佳灵敏度，参考监测离子对和其他质谱参数见表 2。

表 2 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
非布司他异丙基替代物	303.2	261.0*	34	14
		217.0		30

*定量离子。

注：本方法提供质谱条件为推荐条件，可根据实际情况，选择其他响应信号强且无干扰的离子对（如 303.2→145.0）进行检测。

5.4 标准曲线的制作

将质量浓度为1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L的系列标准工作液（3.4.3）分别注入液相色谱-串联质谱仪中，测定相应的峰面积，以系列标准工作溶液中目标化合物的浓度为横坐标，以定量离子色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图参见附录A。

5.5 试样溶液的测定

5.5.1 定性测定

在相同试验条件下，试样中被测组分的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且试样中被测组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表 3 规定的范围，可判定试样中检出非布司他异丙基替代物。

表 3 定性确证时相对离子丰度比的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

5.5.2 定量测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中，得到相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中待测物的浓度。平行测定次数不少于两次。

用标准工作曲线对试样进行定量，应使试样溶液被测组分的响应值在仪器测定的线性范围内，若被测物质含量超出标准曲线的测定范围，应根据测定浓度进行适当倍数稀释。如使用基质匹配标准工作曲线定量，应同时用同等稀释倍数的空白基质提取液配制基质匹配标准工作液后测定。

5.6 空白试验

除不加试样外，完全按照上述操作步骤进行。

6 结果计算

试样中待测组分的含量按式（1）计算：

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

式中：

X ——试样中待测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c ——试样溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V ——试样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样取样的质量，单位为克（g）；

1000 ——换算系数；

f ——稀释倍数。

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，结果保留 3 位有效数字。

7 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得超过算术平均值的 15%。

8 其他

当取样量为1 g，定容体积为50 mL时，非布司他异丙基替代物的检出限为0.015 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

空白试验应无干扰。



附录 A

(资料性)

非布司他异丙基替代物标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

非布司他异丙基替代物标准溶液 (10 $\mu\text{g/L}$) 的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图见图 A.1。

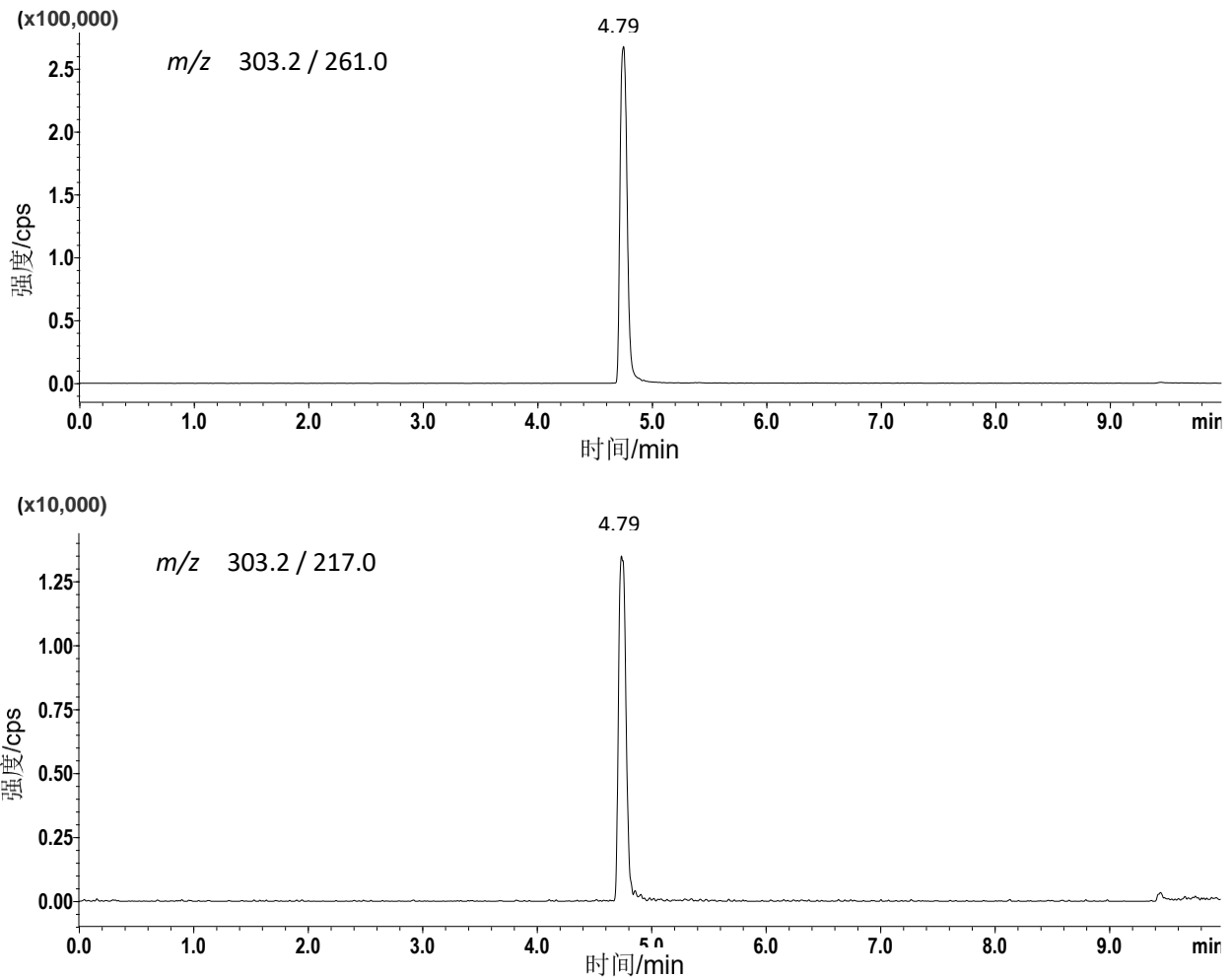


图 A.1 非布司他异丙基替代物标准溶液 (10 $\mu\text{g/L}$) 的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

本方法起草单位：浙江省食品药品检验研究院

本方法验证单位：上海市食品药品检验研究院、广东省食品检验所（广东省酒类检测中心）、浙江省检验检疫科学技术研究院、浙江省疾病预防控制中心、杭州市食品药品检验科学研究院

主要起草人：梁晶晶、徐潇颖、陈碧莲、张文萍、金绍强