ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

|  |
| --- |
|       |

DB

陕 西 省 食 品 安 全 地方标准

DB XX/ XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|       |

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

Determination of 4-(5-)-methylimidazole and 2-methylimidazole in beverage by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |
| --- |
|  （报批稿） |
| （本稿完成日期：） |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

陕西省卫生和计划生育委员会   发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准的附录A、附录B均为资料性附录。

本标准由陕西省卫生和计划生育委员会发布并归口。

本标准由中华人民共和国陕西出入境检验检验局提出并起草。

本标准主要起草人：张璐、何强、邹阳、李莹、付骋宇、孔祥虹、李建华、吴双民

本标准为首次发布。

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

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-串联质谱（LC-MS/MS）的检测方法。

本标准适用于碳酸饮料、特殊用途饮料、茶饮料、咖啡饮料等中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是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所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，振荡后，阳离子固相萃取柱（MCX）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，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T6682中规定的一级水。

4.1 标准品：4-甲基咪唑（CAS：822-36-6， C4H6N2）和2-甲基咪唑（CAS：693-98-1， C4H6N2）含量均≥ 98.0 %。

4.2 内标物：氘代4-甲基咪唑标准品：含量≥ 99.0 %。

4.3 甲醇：色谱纯。

4.4 乙腈：色谱纯。

4.5 甲酸：色谱纯。

4.6 甲酸铵。

4.7 氨水。

4.8 MCX固相萃取柱：60 mg/3mL，或相当者。

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

4.10 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。

4.11 甲酸铵溶液（5 mmol/L）：准确称取0.0945 g甲酸铵溶解于300 mL水中，混合后备用。

4.12 乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（9:1, *V/V*）：准确量取90 mL乙腈和10 mL 5 mmol/L甲酸铵（4.11）,混合备用。

4.13 标准储备液（1 mg/mL）：分别准确称取4-甲基咪唑和2-甲基咪唑各10 mg，用甲醇溶解定容至10 mL，摇匀，0 ℃～4 ℃避光保存，有效期1年。

4.14 内标储备液（1 mg/mL）：准确称取氘代4-甲基咪唑10 mg，用甲醇溶解定容至10 mL，摇匀，0 ℃～4 ℃避光保存，有效期1年。

4.14 混合标准中间溶液（1 **g/mL）： 分别准确量取1 mg/mL 4-甲基咪唑和2-甲基咪唑标准储备液各0.025 mL，于25 mL容量瓶中，用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.12）溶解，定容于25 mL，0 ℃～4 ℃避光保存，有效期6个月。

4.15 氘代4-甲基咪唑标准中间溶液(1 **g/mL) ：准确量取1 mg/mL氘代4-甲基咪唑内标储备溶液0.025 mL，于25 mL容量瓶中，用甲醇溶液，定容于25 mL，0 ℃～4 ℃避光保存，有效期6个月。

4.16 混合标准使用溶液：根据需要，临时吸取一定量的混合标准中间溶液（4.14）和内标标准中间溶液（4.15），用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.12）稀释配制适当浓度的混合标准使用溶液，每毫升混合标准工作溶液中含有氘代4-甲基咪唑为0.01 **g。

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0.01 mg。

5.3 天平：感量0.01 g。

5.4 振荡器

5.5 涡旋混匀器

5.6 离心机

5.7 固相萃取装置

5.8 氮吹仪

5.9 聚四氟乙烯离心管：15 mL。

5.10 滤膜：0.22 **m。

6 试样制备与保存

取有代表性试样500 g，混合均匀，装入洁净容器中，密闭并标明标记，冷藏保存。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取试样3 g（精确至0.01 g），于15 mL离心管中，加入氘代4-甲基咪唑标准中间溶液（4.15）100 **L，用水溶解或稀释，定容至10 mL，振荡10 min。4500 r/min下离心5 min，待净化。

7.2 净化

MCX固相萃取柱依次用甲醇3 mL和水5 mL活化，取待净化液过柱，控制流速1滴/3～4 s，依次用2 %甲酸水溶液（4.9）5 mL和甲醇5 mL淋洗，再用5 %氨水甲醇溶液（4.10）9 mL洗脱，收集洗脱液，于40 ℃氮气吹干。用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.12）1 mL溶解残渣，涡旋混匀，滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱检测。

7.3 标准曲线的制备

准确量取1 **g/mL混合标准中间溶液和1 **g/mL氘代4-甲基咪唑标准中间溶液适量，用乙腈-5 mmol/L甲酸铵溶液（4.12）稀释，配制成9.0，15.0，50.0，100.0，500 .0 **g/L系列浓度的混合标准使用溶液，其中氘代4-甲基咪唑浓度为10 **g/L，供液相色谱-串联质谱测定。以目标化合物与内标物峰面积比值为纵坐标，对应标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

色谱柱：HILIC （2.1×100 mm，1.7 **m）, 或相当者；

柱温：40 ℃；

流速：0.3 mL/min；

进样量：2.0 **L;

流动相：乙腈+5 mmol/L甲酸铵溶液（9+1，*V/V*），等度洗脱；

7.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源;

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应检测；

电离电压：2.9 kV；

离子源温度： 115 ℃；

脱溶剂气温度：350 ℃；

脱溶剂气：600 L/h；

锥孔气：50 L/h；

定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞电压见表1

表1a 4-甲基咪唑和2-甲基咪唑定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞电压

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 定性离子对 | 定量离子 | 锥孔电压 | 碰撞电压 |
| 4-甲基咪唑（4-Mel） | 82.9/42.1 | 82.9/55.9 | 30 | 15 |
| 82.9/55.9 | 14 |
| 2-甲基咪唑（2-Mel） | 82.9/42.1 | 82.9/42.1 | 37 | 14 |
| 82.9/55.9 | 14 |
| 氘代4-甲基咪唑（4-Mel-*d6*） | 88.0/60.1 | 88.0/60.1 | 30 | 15 |

a对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

非商业性声明：表1所列参数是在Waters ACQUITY UPLC-Quattro Premier质谱仪完成的，此处列出的实验用仪器仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同型号的仪器。

7.4.3 测定法

按照7.4.1和7.4.2液相色谱-串联质谱条件测定试样和混合标准使用溶液（4.16），按内标法以峰面积比计算。混合标准使用溶液及试样溶液中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑和氘代4-甲基咪唑的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子对相对丰度与混合标准使用溶液的离子相对丰度比符合表2的要求。在上述色谱条件下4-甲基咪唑和2-甲基咪唑参考保留时间分别为1.96 min和2.63 min。标准溶液的离子流图参见附录A中图A.1。

表2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对丰度（%） | ＞50 | ＞ 20～50 | ＞10～20 | ≤10 |
| 允许偏差（%） | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

7.5 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表达

计算或峰面积比值，标准曲线校正。

其中：—4-甲基咪唑定量离子对峰面积；

 —2-甲基咪唑定量离子对峰面积；

—氘代4-甲基咪唑峰离子对面积；

由标准曲线方程：

求得和，则



试样中4-甲基咪唑或2-甲基咪唑残留量（**g/kg）：按下式计算：



式中：

—混合标准使用溶液中4-甲基咪唑或2-甲基咪唑的峰面积；

—混合标准使用溶液中内标氘代4-甲基咪唑的峰面积；

—混合标准使用溶液中内标氘代4-甲基咪唑的浓度，单位为微克每升，**g/L；

—混合标准使用溶液中4-甲基咪唑或2-甲基咪唑，单位为微克每升，**g/L；

—试样中4-甲基咪唑或2-甲基咪唑的浓度，单位为微克每升，**g/L；

—试样中4-甲基咪唑或2-甲基咪唑的峰面积；

—试样中内标氘代4-甲基咪唑的峰面积；

—试样中待分析物的残留量，单位为微克每千克（**g/kg）；

 **—溶解残余物的体积，单位为毫升，mL；

**—试样质量，单位为克，g。

注：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 定量限、回收率和精密度

9.1 定量限

本方法对4-甲基咪唑、2-甲基咪唑的定量限均为10.0 **g/kg。

9.2 回收率

碳酸饮料、特殊用途饮料、茶饮料、咖啡饮料中4-甲基咪唑、2-甲基咪唑的回收率试验数据见附录B.1，在10.0~75.0 **g/kg添加浓度水平上的回收率范围为88.8 %~119.9 %。

9.3 精密度

本方法的相对标准偏差≤10 %。

附 录 A
（资料性附录）

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*）的选择离子色谱图（10 **g/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数据

表B.1 碳酸饮料、特殊用途饮料、茶饮料、咖啡饮料中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 （g/kg） | 回收率（%） |
| 碳酸饮料 | 4-甲基咪唑 | 10 | 89.0~95.0 |
| 25 | 98.4~119.9 |
| 50 | 105.2~111.7 |
| 75 | 95.0~112.4 |
| 2-甲基咪唑 | 10 | 92.5~96.1 |
| 25 | 88.4~104.4 |
| 50 | 99.4~104.4 |
| 75 | 109.7~118.7 |
| 特殊用途饮料 | 4-甲基咪唑 | 10 | 96.6~100.1 |
| 25 | 97.6~103.6 |
| 50 | 98.1~102.5 |
| 2-甲基咪唑 | 10 | 96.7~98.7 |
| 25 | 99.3~100.9 |
| 50 | 98.1~102.5 |
| 茶饮料 | 4-甲基咪唑 | 10 | 88.9~92.3 |
| 25 | 99.2~104.4 |
| 50 | 97.8~102.8 |
| 2-甲基咪唑 | 10 | 98.8~100.4 |
| 25 | 96.9~98.8 |
| 50 | 97.8~102.2 |
| 咖啡饮料 | 4-甲基咪唑 | 10 | 94.0~99.0 |
| 25 | 98.5~110.4 |
| 50 | 91.9~98.8 |
| 2-甲基咪唑 | 10 | 93.0~97.0 |
| 25 | 102.3~107.5 |
| 50 | 88.8~104.7 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_