

BJS

食品补充检验方法

BJS 202205

甘蔗及甘蔗汁中 3-硝基丙酸的测定

2022-02-07 发布

国家市场监督管理总局 发布

甘蔗及甘蔗汁中 3-硝基丙酸的测定

1 范围

本方法规定了甘蔗及甘蔗汁中 3-硝基丙酸高效液相色谱法的测定方法。

本方法适用于甘蔗及甘蔗汁中 3-硝基丙酸的测定。当样品中检出 3-硝基丙酸时,可用高效液相色谱-串联质谱联用法进行确证。

2 原理

用水提取甘蔗及甘蔗汁中的 3-硝基丙酸,提取液调 pH 后经乙酸乙酯萃取,经反相高效液相色谱测定,外标法定量。

3 试剂和材料

注:除另有规定外,本方法中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(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.2 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)。
- 3.1.3 磷酸(H_3PO_4)。
- 3.1.4 磷酸氢二铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ 。
- 3.1.5 甲酸(HCOOH):色谱纯。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 磷酸溶液(1+9):量取 10 mL 磷酸(3.1.3),加水 90 mL,混匀。
- 3.2.2 磷酸氢二铵溶液(pH2.0):称取磷酸氢二铵 1.5 g(3.1.4),用水溶解,加水稀释至 1 000 mL,用磷酸溶液(3.2.1)调 pH 为 2.0 ± 0.1 ,混匀。
- 3.2.3 0.1%甲酸水溶液:取 1 mL 甲酸(3.1.5),加水稀释至 1 000 mL,混匀。
- 3.2.4 磷酸水溶液(pH2.0):取 100 mL 水,用磷酸溶液(3.2.1)调 pH 为 2.0 ± 0.1 ,混匀。

3.3 标准品

3-硝基丙酸的名称、CAS 号、分子式、相对分子质量、结构式见附录 A 中表 A.1,纯度 $\geq 97\%$,或采用国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 标准储备液(1 mg/mL):准确称取 50 mg(精确至 0.1mg)标准品,置于 50 mL 容量瓶中,加适量的水溶解,并用水稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。4 °C 避光保存,有效期 6 个月。
- 3.4.2 标准中间液(0.1 mg/mL):吸取标准储备液(3.4.1)10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻

度,摇匀,制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准中间液。4 °C 避光保存,有效期 3 个月。

3.4.3 标准工作液:吸取标准中间液(3.4.2)2.0 mL、3.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、20.0 mL、40.0 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,得 3-硝基丙酸标准溶液的最终质量浓度分别为 2.0 μg/mL、3.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、40.0 μg/mL 的标准系列工作溶液。各实验室可在实际应用时根据情况调整标准系列工作溶液浓度。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜:0.45 μm,有机相。

3.5.2 微孔滤膜:0.22 μm,有机相。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪:配有二极管阵列检测器。

4.2 超声波水浴。

4.3 高速离心机:转速 \geq 10 000 r/min。

4.4 涡漩混合器。

4.5 组织捣碎机。

4.6 pH 计:精确至 0.1。

4.7 电子天平:感量分别为 0.001 g 和 0.1 mg。

4.8 氮吹仪。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 甘蔗

取不少于 20 g 的去皮甘蔗样品,将其切成若干段,再切成小于 0.5 cm 的块后放入组织捣碎机中搅碎,混匀后置于洁净的容器中密封备用,备样于-20 °C 贮存。

样品应及时测定,临用现制。

5.1.2 甘蔗汁

充分混匀,直接取用;若不能及时测定,应于-20 °C 储存。

5.2 试样前处理

称取试样 2 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加水 10 mL,超声提取 10 min,用磷酸溶液(3.2.1)调 pH 至 2.0 \pm 0.1,加入 10 mL 乙酸乙酯(3.1.2),涡漩 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移到另一 50 mL 离心管中,用 10 mL 乙酸乙酯(3.1.2)重复提取一次,合并上清液。在乙酸乙酯萃取液中加磷酸水溶液(pH2.0)(3.2.4)10 mL,涡漩 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液。于 45 °C 氮气吹至近干,加入水 1.0 mL 溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,上机测定。

5.3 仪器参考条件

仪器参考条件如下。

a) 色谱柱:Agela Venusil MP C₁₈柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),或性能相当者。

- b) 流动相:磷酸氢二铵溶液(pH2.0)(3.2.2)与甲醇(3.1.1)的体积比为 96 : 4。
- c) 流速:1.0 mL/min。
- d) 检测波长:210 nm。
- e) 柱温:30 °C。
- f) 进样量:20 μ L。

5.4 测定

5.4.1 定性测定

按照 5.2 的条件测定试样和标准工作液,试样中待测物与标准品溶液色谱峰保留时间的相对偏差不大于 2.5%,且与相近质量浓度标准品溶液的色谱图最大吸收处的光谱图一致,则可初步判定试样中存在 3-硝基丙酸,可按附录 B 方法进行确证。3-硝基丙酸标准溶液的色谱图参见附录 C 中图 C.1。

5.4.2 定量测定

将待测试样液注入高效液相色谱仪中,得到 3-硝基丙酸的峰面积,根据标准曲线计算得到试样液中 3-硝基丙酸的质量浓度。试样溶液中 3-硝基丙酸的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

5.5 空白试验

除不加试样外,均按试样同法操作。

6 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中 3-硝基丙酸的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ —— 试样测定溶液中 3-硝基丙酸的质量浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);
- V —— 定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的质量,单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值,测定结果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 10%。

8 其他

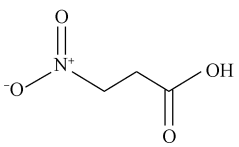
当取样量为 2 g 时,本方法检出限为 0.3 mg/kg,定量限为 1.0 mg/kg。

附录 A
(资料性)

3-硝基丙酸的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

3-硝基丙酸的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式见表 A.1。

表 A.1 3-硝基丙酸的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
3-硝基丙酸	3-nitropropionic acid	504-88-1	$C_3H_5NO_4$	119.08	

附录 B

(资料性)

3-硝基丙酸液相色谱-质谱/质谱确证

B.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm), 或其他等效柱。
- 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液(3.2.3), B 为甲醇(3.1.1), 梯度洗脱条件见表 B.1。
- 流速: 0.2 mL/min。
- 柱温: 30 °C。
- 进样量: 5 μL。

表 B.1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95	5
3.0	95	5
4.0	60	40
4.1	95	5
5.0	95	5

B.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下。

- 离子源: 电喷雾离子源(ESI)。
- 检测方式: 多反应监测(MRM)。
- 扫描方式: 负离子模式扫描。
- 电喷雾电压: -2.5 kV。
- 脱溶剂温度: 450 °C。
- 定性/定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 B.2。

表 B.2 待测物质的定性/定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

中文名称	检测方式	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
3-硝基丙酸	MRM	118.0	46.0	30	12

B.2 所列仪器条件仅供参考, 采用不同质谱仪器时, 仪器参数可能存在差异, 测定前应将质谱参数优化到最佳, 并根据仪器灵敏度调整浓度。

B.3 定性判定

按照 B.1 和 B.2 的条件测定试样和标准溶液。试样和浓度接近的标准溶液同时进样分析, 试样中被测物质的多反应监测(MRM)色谱峰保留时间与标准品的保留时间偏差在±2.5%之内, 且有相同的

定性离子,可以确定试样中检出相应化合物。

3-硝基丙酸多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

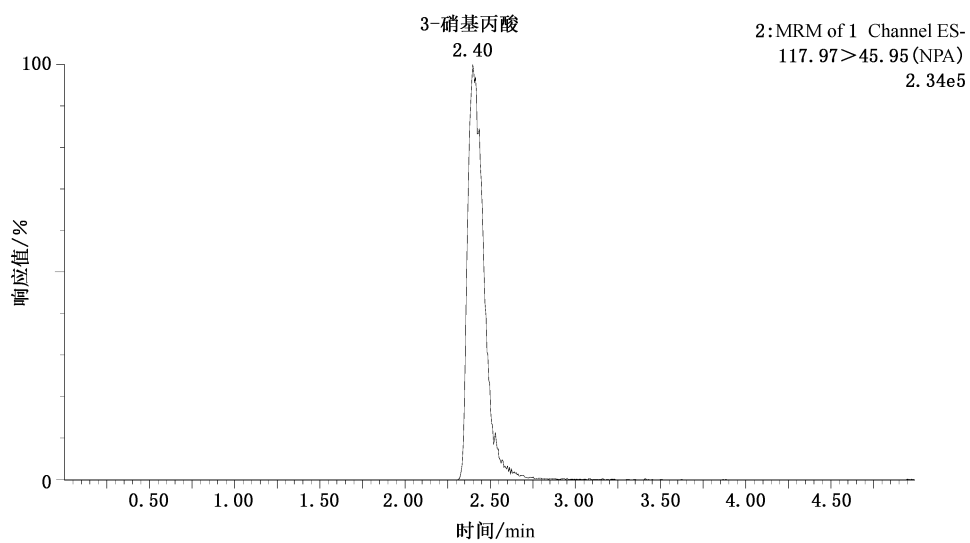


图 B.1 标准品多反应监测(MRM)色谱图

附录 C
(资料性)

3-硝基丙酸标准溶液液相色谱图

3-硝基丙酸标准溶液液相色谱图见图 C.1。

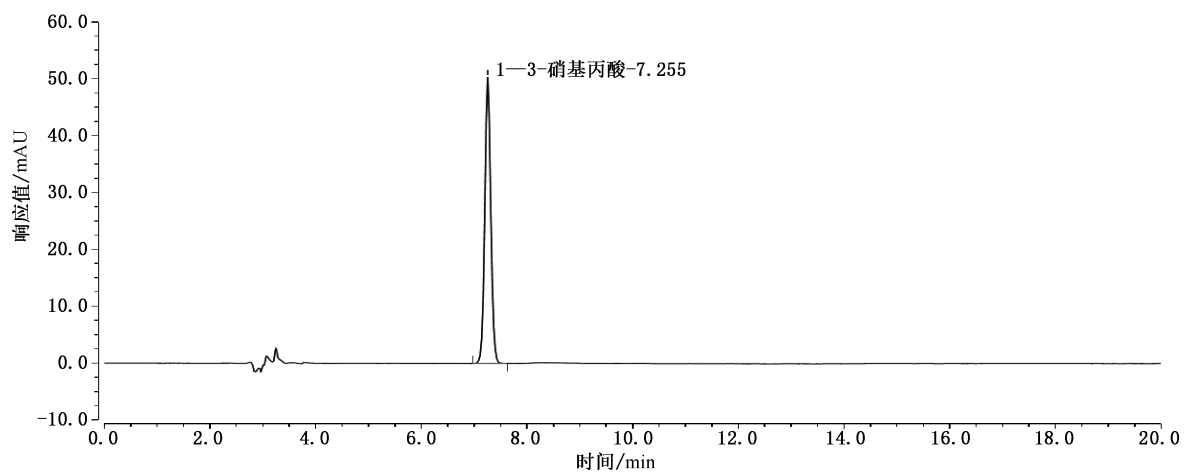


图 C.1 3-硝基丙酸标准高效液相色谱图(保留时间 7.255 min)

本方法负责起草单位:黑龙江省药品检验研究院。

本方法验证单位:山东省食品药品检验研究院、山西省食品药品检验所、哈尔滨市产品质量监督检验院、四平市食品药品检验所、黑龙江省华测检测技术有限公司。

本方法主要起草人:姜连阁、王晰锐、王子谛、多凯、庄舒翔、朱琳、谭慧、马占峰。