

水产品及水中丁香酚类化合物的测定

BJS 201908

1 范围

本方法规定了水产品及水中丁香酚类化合物的气相色谱-质谱测定方法。

本方法适用于淡水虾、淡水鱼、海水虾、海水鱼等水产品及水中丁香酚类化合物的测定。

2 原理

用乙腈提取试样中的丁香酚类化合物后，经乙腈饱和正己烷除脂净化或过滤净化（水样），采用气相色谱-质谱联用仪检测，外标峰面积法定量。

3 试剂和材料

除非另有规定外，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 试剂与材料

3.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

3.1.2 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。

3.1.3 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

3.1.4 无水硫酸镁（MgSO₄）。

3.1.5 二甲亚砜（C₂H₆OS，英文缩写：DMSO）。

3.1.6 乙腈饱和正己烷溶液：量取200 mL正己烷(3.1.2)于250mL分液漏斗中，加入适量乙腈(3.1.1)，剧烈振摇数分钟，静置分层，弃去下层乙腈。

3.1.7 陶瓷均质子：50mL tubes。

3.2 丁香酚类化合物标准品：6种标准品的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量见表1，纯度均≥95%。

表1 丁香酚类化合物标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

序号	中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量
1	丁香酚	Eugenol	97-53-0	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20
2	甲基丁香酚	Methyleugenol	93-15-2	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.23
3	异丁香酚	Isoeugenol	97-54-1	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20
4	顺式-甲基异丁香酚	Methyl Isoeugenol	93-16-3	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.23
5	乙酸丁香酚酯	Eugenyl Acetate	93-28-7	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206.24

6	乙酰基异丁香酚	Acetyl Isoeugenol	93-29-8	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206.24
---	---------	-------------------	---------	--	--------

3.3 标准溶液配制

3.3.1 丁香酚类化合物标准储备溶液：分别准确称取 6 种丁香酚类化合物标准品（3.2）100.0 mg（精确至 0.000 1 g），用乙腈溶解并定容至 100 mL，此溶液浓度均为 1 mg/mL。4℃避光密封保存，有效期 3 个月。

3.3.2 丁香酚类化合物标准中间溶液：将 6 种丁香酚类化合物标准储备溶液（3.3.1）用乙腈稀释成 10 µg/mL 的混合标准中间溶液，4℃避光密封保存，有效期 1 个月。

3.3.3 空白基质溶液：称取空白试样，按照 5.1 规定的样品预处理方法操作制备。

3.3.4 标准系列工作溶液：用空白基质溶液（3.3.3）将标准中间溶液（3.3.2）稀释成最终浓度为 40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的标准系列工作溶液，临用时配制。

4 仪器和设备

4.1 气相色谱-质谱联用仪：配有电子轰击电离源（EI）。

4.2 涡旋振荡器。

4.3 超声波清洗器。

4.4 台式均质仪。

4.5 分析天平：感量分别为 0.1 mg 和 0.01 g。

4.6 离心机：转速≥5000 r/min。

4.7 聚丙烯离心管：15 mL 和 50 mL。

4.8 移液器：200 µL 和 10 mL。

5 分析步骤

5.1 试样的制备与保存

淡水鱼、淡水虾、海水鱼及海水虾：取样本，先将鱼体、虾体表面杂质洗净，鱼去鳞、去皮，取肌肉部分；虾去壳、头，取可食部分；试样经均质混匀，-18℃以下冷冻保存，备用。

水样：取样本，充分混匀，-18℃以下冷冻保存，备用。

5.2 试样前处理

5.2.1 水产品(淡水鱼、淡水虾、海水鱼及海水虾)

取试样，常温自然解冻后，称取 2.0 g 试样（精确至 0.01g）于 50 mL 离心管中，加入 5 g 无水硫酸钠，适当搅拌混匀，加入一颗陶瓷均质子和 10 mL 乙腈，涡旋混匀 1 min，超声提取 15 min，5000 r/min 离心 5 min，上清液转至另一 50 mL 离心管中；残渣中再加入 10 mL 乙腈重复提取一次，

合并所有上清液；再加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷，涡旋振荡 1 min，5000 r/min 离心 5 min，弃去正己烷层；乙腈层加入 50 μ L 的 DMSO，40 $^{\circ}$ C 氮吹至近干，用乙腈定容至 1 mL，混匀，过 0.45 μ m 微孔滤膜，供气相色谱-质谱联用仪分析。

5.2.2 水样

取水样，常温自然解冻后，称取 5.0 g 试样（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 5 min，再加入 5.0 g 无水 $MgSO_4$ 和一颗陶瓷均质子，涡旋振荡 5 min，5000r/min 离心 5 min，准确移取上清液 4 mL，加入 50 μ L 的 DMSO，40 $^{\circ}$ C 氮吹至近干，用乙腈定容至 1 mL，混匀，过 0.45 μ m 微孔滤膜，供气相色谱-质谱联用仪分析。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 气相色谱参考条件

- a) 色谱柱：DB-1701 30.0 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m 或性能相当者；
- b) 升温程序：初始温度 100 $^{\circ}$ C，保持 1 min，以 6 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C，再以 25 $^{\circ}$ C/min 升温至 260 $^{\circ}$ C，保持 5 min；
- c) 进样口温度：230 $^{\circ}$ C；
- d) 载气：氮气，纯度 \geq 99.999%，流速 1.0 mL/min；
- e) 进样方式为不分流进样；
- f) 进样量：1 μ L。

5.3.2 质谱参考条件

- a) 电离方式：电子轰击电离源(EI)
- b) 电离能量：70eV；
- c) 传输线温度：280 $^{\circ}$ C；
- d) 离子源温度：230 $^{\circ}$ C；
- e) 溶剂延迟时间：6.00 min；
- f) 测定方式：选择离子监控(SIM)，各化合物定量及定性离子见表 2。

表 2 6 种丁香酚类化合物参考保留时间及定性、定量离子

名称	保留时间 (min)	定量离子 (m/z)	定性离子 1 (m/z)	定性离子 2 (m/z)	定性离子 3 (m/z)
丁香酚	10.56	164	149	131	103
甲基丁香酚	10.97	178	163	147	103
异丁香酚	12.65	164	149	131	103
顺式-甲基异丁香酚	13.04	178	163	107	91
乙酸丁香酚酯	14.08	164	149	206	131

乙酰基异丁香酚	15.92	164	149	206	131
---------	-------	-----	-----	-----	-----

5.4 定性确证

在5.3仪器条件下，试样待测液和标准工作溶液的目标化合物在相同保留时间处(变化范围在±0.5%内)出现，并且对应质谱碎片离子的质荷比与标准工作溶液的质谱图一致，其丰度比与标准工作溶液相比应符合表3，可定性目标化合物。6种丁香酚类化合物总离子流图见附录A。

表3 气相色谱-质谱定性确证相对离子丰度最大容许误差

相对离子丰度 (%)	k>50%	50%≥k>20%	20%≥k>10%	k≤10%
允许的相对偏差 (%)	±10	±15	±20	±50

5.5 定量测定

5.5.1 标准曲线的制作

将6种丁香酚类化合物标准系列工作溶液（3.3.4）按仪器参考条件（5.3）进行测定，得到相应的标准系列工作溶液的定量离子色谱峰面积。以标准系列工作溶液的质量浓度为横坐标，以定量离子色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

5.5.2 试样溶液的测定

将试样溶液（5.1）按仪器参考条件（5.3）进行测定，得到相应的试样溶液的质量色谱峰面积。根据标准曲线得到试样溶液中丁香酚类化合物的浓度。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液中待测物的浓度超出标准曲线范围时，应对样品溶液作相应稀释后再进行测定。

6 结果计算

试样中各种丁香酚类化合物含量按式（1）计算：

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

式中：

X_i —试样中丁香酚类化合物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c —从标准曲线查出的试样溶液中丁香酚类化合物的质量浓度，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）；

f —稀释倍数；

计算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，结果保留两位有效数字。

7 方法精密度

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数平均值的 20%。

8 方法准确度

本方法对淡水虾、海水虾、淡水鱼、海水鱼及水中 6 种丁香酚类化合物加标浓度为 0.02 mg/kg~0.10 mg/kg 时，回收率在 60%~120%之间。

9 方法检出限和定量限

当淡水虾、海水虾、淡水鱼及海水鱼取样量为 2.0 g，水取样量为 5.0 g，定容体积为 1 mL 时，本方法中 6 种丁香酚类化合物检出限均为 0.01 mg/kg，定量限均为 0.02 mg/kg。

附录 A

丁香酚类化合物的色谱及质谱图

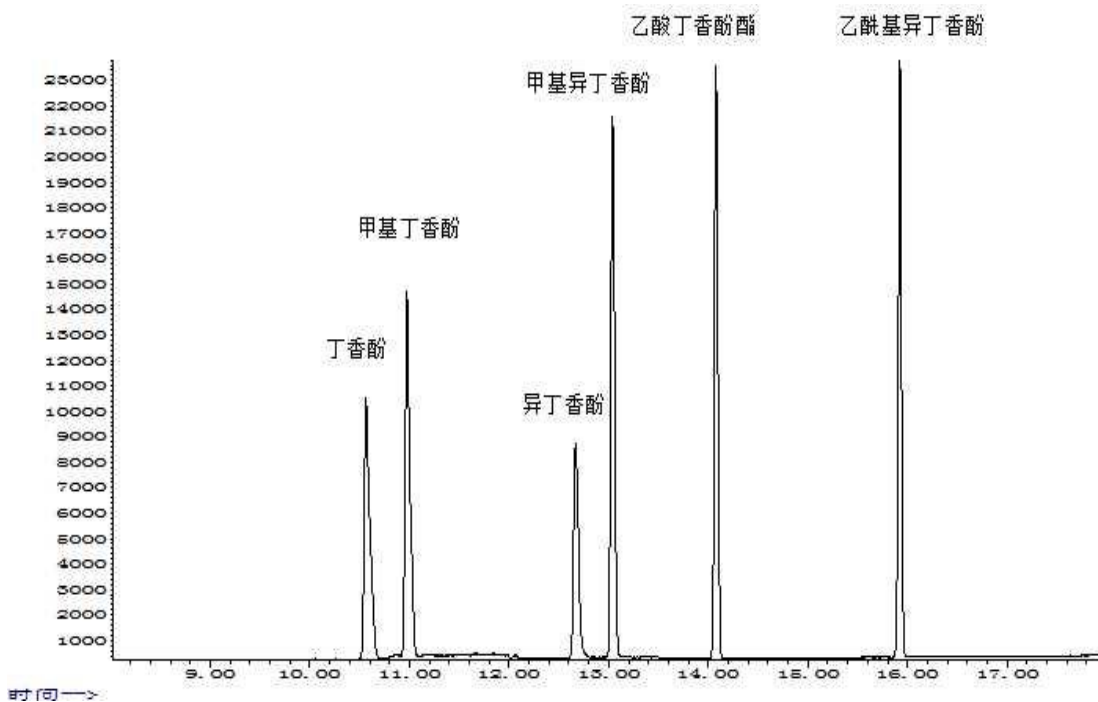


图 A.1 6 种丁香酚类化合物气质联用总离子流图

本方法负责起草单位：四川省食品药品检验检测院、宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心

验证单位：上海市食品药品检验所、陕西省食品药品监督检验研究院、广东省食品检验所、广东省药品检验所、湛江市食品药品检验所。

主要起草人：余晓琴，方科益，邵曼，陈树兵，高平，曾思瑜。