

# LC-MS/MS 法测定苹果汁中展青霉素含量作业指导书 (SOP)

标准号：GB 5009.185-2016

## ■ 参考标准

2016 年版《食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定》中规定的展青霉素测定方法。

## ■ 方法概述

### 2.1 方法编制说明

本方法参照《食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定》中规定的前处理方法，采用同位素稀释 - 液相色谱串联质谱法对苹果汁样品中的展青霉素残留量进行检测。

### 2.2 方法使用范围

本方法适用于采用液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定苹果汁中展青霉素残留量。

### 2.3 方法技术指标

本方法的定量限：10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

本方法标准溶液线性范围：5-250  $\text{ng}/\text{mL}$

## ■ 方法原理

果汁样品中的展青霉素经溶剂提取，展青霉素固相净化柱净化、浓缩后，经反相液相色谱柱分离，电喷雾离子源离子化，多反应离子监测检测，内标法定量。

## ■ 仪器设备及辅助设备

### 4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，ESI 离子源

### 4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AUW220D；

离心机：SHUKE TD-600；

涡旋仪：IKA MS3；

氮吹仪：TraceV-24S 24 位水浴氮吹仪 (TV-001)

移液枪：10 mL，1 mL，200  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{L}$

## ■ 标准品、试剂、耗材

展青霉素标准品和同位素内标溶液：购于上海安谱，浓度分别为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

乙腈：色谱级，购于上海安谱；

乙酸：色谱级，购于上海安谱；

乙酸溶液：取 10 mL 乙酸，加入 250 mL 水。

离心管：50 mL；

展青霉素固相净化柱：SHIMSEN 228 展青霉素净化柱，购自岛津（上海）实验器材有限公司；

无针注射器：5 mL

微孔过滤膜：WondaDisc 尼龙针头滤器 0.22  $\mu\text{m}$ ；

## ■ 操作步骤

### 6.1 标准工作曲线制作

#### 6.1.1 标准工作液配制 (1 µg/mL)

准确吸取 100 µL 购买的展青霉素标准品溶液 (100 µg/mL) 至 10 mL 容量瓶中, 用乙酸溶液定容至刻度。溶液转移至试剂瓶中后, 在 4°C 下避光保存, 有效期 3 个月。

#### 6.1.2 同位素内标工作液配制 (1 µg/mL)

准确移取展青霉素同位素内标 (25 µg/mL) 0.40 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用乙酸溶液定容。在 4°C 下避光保存, 3 个月内有效。

#### 6.1.3 标准系列工作溶液配制

按下表内容, 分别准确移取标准工作液适量至 10 mL 容量瓶中, 加入 500 µL 1.0 µg/mL 的同位素内标工作液, 用乙酸溶液定容至刻度, 配制展青霉素浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、250 ng/mL 系列标准溶液。

| No. | 标准工作液加入量 (µL) | 同位素内标加入量 (µL) | 乙酸溶液定容体积 (mL) | 最终浓度 (ng/mL) | 备注                               |
|-----|---------------|---------------|---------------|--------------|----------------------------------|
| 1   | 50            | 500           | 10            | 5            |                                  |
| 2   | 100           | 500           | 10            | 10           |                                  |
| 3   | 250           | 500           | 10            | 25           |                                  |
| 4   | 500           | 500           | 10            | 50           | 标准系列工作溶液, 在 4°C 下避光保存, 有效期 1 个月。 |
| 5   | 1000          | 500           | 10            | 100          |                                  |
| 6   | 1500          | 500           | 10            | 150          |                                  |
| 7   | 2000          | 500           | 10            | 200          |                                  |
| 8   | 2500          | 500           | 10            | 250          |                                  |

### 6.2 仪器条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 µm)

(P/N:227-32001-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相: A 相 - 纯水 B 相 - 乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 5 µL

柱温: 30°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 3%, 时间程序见表 1。

表 1 时间程序

| Time(min) | Module     | Command      | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 1.00      | Pumps      | Pump B Conc. | 3     |
| 4.00      | Pumps      | Pump B Conc. | 80    |
| 4.50      | Pumps      | Pump B Conc. | 80    |
| 4.51      | Pumps      | Pump B Conc. | 3     |
| 6.50      | Controller | Stop         |       |

### 质谱条件

|                  |              |
|------------------|--------------|
| 离子源：ESI (-)      | 脱溶剂管温度：250°C |
| 离子源接口电压：-3 kV    | 加热模块温度：400°C |
| 雾化气：氮气 3.0 L/min | 接口温度：300°C   |
| 干燥气：氮气 10 L/min  | 扫描模式：MRM     |
| 加热气：空气 10 L/min  | 驻留时间：100 ms  |
| 碰撞气：氩气           | MRM 参数：见表 2  |

表 2 MRM 优化参数

| 中文名                                | 监测离子对          | Q1 Pre (V) | CE | Q3 Pre (V) |
|------------------------------------|----------------|------------|----|------------|
| 展青霉素                               | 153.10>109.00* | 30         | 13 | 20         |
|                                    | 153.10>80.90   | 30         | 14 | 28         |
| <sup>13</sup> C <sub>7</sub> -展青霉素 | 160.10>115.05* | 32         | 11 | 40         |
|                                    | 160.10>86.05   | 30         | 15 | 30         |

注：\* 表示定量离子

### 6.3 样品前处理

- 1) 乙酸溶液配制：取 1 mL 乙酸加入 25 mL 水，混匀，即得。
- 2) 称样：称取 4 g 果汁样品，于 50 mL 聚苯乙烯聚塞离心管。
- 3) 加入 250 μL 同位素内标工作液，21 mL 乙腈，混合均匀，在 6000 r/min 下离心 5 min，取上清液作为样品提取液。
- 4) 净化：按照净化柱说明书进行操作：向试管中加入 10 mL 样品提取液，再加入 50 μL 乙酸。将净化柱橡胶头从试管顶端插入试管中，并向下压净化柱直至试管底部。将净化柱上部液体吸出至新的离心管中，作为净化提取液。
- 5) 吸取 5 mL 净化提取液，加入 20 μL 乙酸，氮吹至近干，加乙酸溶液定容至 1 mL，涡旋使样品溶解，过 0.22 μm 滤膜，取滤液待测。

### 6.4 加标试样

称取 4 g 果汁样品于 50 mL 离心管中，加入一定量展青霉素标准溶液及内标溶液，使展青霉素加标浓度分别为 10 ng/kg，50 ng/kg，200 ng/kg，涡旋混合均匀，以下同样品前处理方法。

### 6.5 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 5.0 μL，若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

### 6.6 计算和报告

#### 6.6.1 定性分析

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围在 ±2.5% 之内。每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表 3 规定的范围。

表 3 定性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% | ≤ 10% |
|--------|------|----------|----------|-------|
| 允许相对偏差 | ±20% | ±25%     | ±30%     | ±50%  |

### 6.6.2 定量分析

试样中展青霉素的含量按式 (1) 计算：

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

式中：

- X —— 试样中展青霉素的含量，单位为微克每千克或微克每升 (μg/kg 或 μg/L)；
- ρ —— 由标准曲线计算所得的试样溶液中展青霉素的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；
- V —— 最终定容体积，单位毫升 (mL)；
- m —— 试样的称样量，单位克 (g)；
- f —— 稀释倍数。

计算结果保留三位有效数字。

岛津应用云

