

T/GXNS

团 体 标 准

T/GXNS XXXX—XXXX

烤制贝类中杂环胺类物质的检测技术规范

Determination of heterocyclic amines in baked shellfish

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广西农产品质量安全服务协会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由广西壮族自治区水产科学研究院提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区水产科学研究院。

本文件主要起草人：马华威、吴铁军、潘传燕、吕敏、罗旭、蒋光正、牙诗雅、梁正、闭显达、张文敏、高专。

烤制贝类中杂环胺类物质的检测技术规范

1 范围

本标准规定了烤制贝类中的2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉(IQ)、2-氨基-3,4-二甲基-咪唑并[4,5-f]喹啉(MeIQ)、2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶(PhIP)、2-氨基-3,8-二甲基-咪唑并[4,5-f]喹啉(8-MeIQx)、3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶(Trp-P-1)、3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶(Trp-P-2)、2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶(AαC)和2-氨基-3-甲基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶(MeAαC)共8种常见杂环胺的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于烤制贝类(牡蛎、扇贝等)中IQ、MeIQ、PhIP、8-MeIQx、Trp-P-1、Trp-P-2、AαC和MeAαC的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

试样采用氢氧化钠/甲醇溶液提取,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱检测,内标法定量。

4 试剂材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

试剂和材料

4.1 试剂要求

4.1.1 氢氧化钠:纯度>97%

4.1.2 乙酸铵:纯度≥98%。

4.1.3 甲醇:色谱纯。

4.1.4 氯化钠:纯度>97%。

4.1.5 乙腈:色谱纯。

4.1.6 乙酸:色谱纯。

4.1.7 甲酸铵:色谱级。

4.1.8 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

4.2 试剂配制

4.2.1 氢氧化钠溶液（40 g/L）：称取氢氧化钠 40.0 g，用水溶解并定容至 1 L。

4.2.2 氢氧化钠溶液（4 g/L）：量取 40 g/L 氢氧化钠溶液（3.2.1）50 mL，加入水 450 mL，混合均匀。

4.2.3 40 g/L 氢氧化钠-甲醇混合溶液（70+30，体积比）：量取 40 g/L 氢氧化钠溶液 70 mL，加入甲醇 30 mL，混合均匀。

4.2.4 4 g/L 氢氧化钠-甲醇混合溶液（45+55，体积比）：量取 4 g/L 氢氧化钠溶液 45 mL，加入甲醇 55 mL，混合均匀。

4.2.5 乙醇-二氯甲烷混合溶液（10+90，体积比）：量取乙醇 10 mL，加入二氯甲烷 90 mL，混合均匀。

4.2.6 5%乙腈：量取乙腈 5 mL，加入水 95 mL，混合均匀。

4.2.7 乙酸-乙酸铵缓冲液：称取乙酸铵 1.155 g，用水 450 mL 溶解，用乙酸调 pH 至 5.0 ± 0.5 ，加水定容至 500 mL。

4.2.8 乙酸缓冲液-乙腈混合溶液(50+50，体积分数)：量取乙酸-乙酸铵缓冲液（3.2.7）50 mL，加入乙腈 50 mL，混合均匀。

4.3 标准品：见附录 A

4.3.1 内标标准物质 norharman-d7、MeIQx-d3，纯度大于 97%。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 杂环胺标准储备液：将 IQ、MeIQ、PhIP、8-MeIQx、Trp-P-1、Trp-P-2，AαC 和 MeAαC，分别用甲醇（1000 μg/mL）配制成浓度为 1.0 mg/L 的标准储备液。-18℃避光保存，有效期 1 个月。

4.4.2 混合标准工作液：用流动相（含 0.05%甲酸/乙腈的 1 mmol/L 乙酸铵，95/5，v/v）新鲜制备浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100、200、500 μg/L 的混合标准工作溶液。所有混合标准工作溶液均含有 20 μg/L MeIQx-d3 和 norharman-d7 内标液，现配现用。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱串联四极杆质谱：配有电喷雾离子源。

5.2 电子天平：感量为 0.01 mg、1 mg。

5.3 pH 计：感量为 0.01。

5.4 高速离心机，转速不低于 10 000 r/min。

5.5 氮气浓缩仪。

5.6 固相萃取装置。

5.7 均质器。

5.8 旋涡振荡器。

5.9 0.22 μm 聚四氟乙烯（PTFE）过滤器。

5.10 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm × 2.1 mm，1.8 μm)。

注：此处列出的色谱柱仅供参考，不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同品牌不同厂家的色谱柱。

6 分析步骤

6.1 试样制备

新鲜贝类（牡蛎、扇贝等）经烤制后，取可食部分，捣碎混匀，标记后-18℃冷冻保存。

6.2 试样处理

准确称取2 g（精确到0.01 g）于50 mL带盖离心管中，加入适量内标工作液（4.4.2），加入40 g/L 氢氧化钠-甲醇混合溶液10 mL，均质混匀。将混匀的样品和均质器洗涤液转移至离心管中，于10 000 r/min离心15 min，收集上层溶液。

净化：固相萃取柱依次用甲醇3 mL、水3 mL活化。将提取液分批加入萃取柱内，弃去流出液后，用4 g/L氢氧化钠-甲醇混合溶液5 mL清洗柱子后抽干，最后用乙醇-二氯甲烷混合溶液2 mL洗脱，收集洗脱液，并在40℃水浴下氮气浓缩至干，后用乙酸缓冲液-乙腈混合溶液2 mL，混匀后用微孔滤膜过滤至进样瓶，待上机测定。

测定。

6.2.1 液相色谱条件

6.2.1.1 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm × 2.1 mm，1.8 μm)。

6.2.1.2 流动相：A：5 mmol/L 乙酸铵溶液；B：乙腈。

6.2.1.3 流速：0.2 mL/min。梯度洗脱程序见表 1。

6.2.1.4 柱温：35℃。

6.2.1.5 进样量：5 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A%	流动相 B%
0	35.0	65
22	10	90
25	0	100
32	0	100
33.03	35	65
38	10	90

6.2.2 质谱条件

6.2.2.1 电离方式：电喷雾电离正离子模式（ESI+）。

6.2.2.2 扫描方式：多反应监测 MRM。

6.2.2.3 其他质谱条件见附录 B。

鞘气温度和流速：250℃和11 L/min。
毛细管电压：4000 V。
脱溶剂气温度：300℃。
干燥气流量：10 L/min。
其他参数见附表B.1。

6.2.3 液相色谱-串联质谱测定

通过液相色谱将试样溶液进行分离后注入串联四极杆质谱仪中，得到相应的保留时间及信号响应值，根据标准曲线得到相应目标化合物的浓度。

进行样品测定时，如果检出的质量色谱峰保留时间与标准样品一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比，最大允许相对偏差不超过表2中规定的范围，则可判断样品中存在对应的待测物。在上述仪器条件下，标准溶液色谱图参见附录 C中图 C.1。

表 2 定性时相对离子丰度最大允许偏差值

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~0	<10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

以杂环胺混合标准工作液中杂环胺和内标的浓度比为横坐标，以峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线，按照内标法进行定量计算。待测样液中杂环胺的响应值应在标准曲线范围内，超过线性范围则应重新分析。

6.3 空白实验

试样中杂环胺含量按式(1)计算。计算结果需扣除空白值。

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

式中：

式中：

X ——试样中杂环胺含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

c ——根据标准曲线上计算得出的样液中杂环胺浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样液所代表的最终试样的质量，单位为克（g）。

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 回收率和精密度

本方法在0.1 μg/kg -100 μg/kg添加浓度的回收率为71.3%至114.8%，精密度范围为1.4%-7.2%。

8 其他

方法的检出限和定量限见表3。

表 3 检出限和定量限表

化合物	检出限 $\mu\text{g/kg}$	定量限 $\mu\text{g/kg}$
IQ	0.15	0.5
MeIQ	0.15	0.5
8-MeIQx	0.03	0.1
Trp-P-1	0.03	0.1
Trp-P-2	0.15	0.5
MeA α C	0.03	0.1
PhIP	0.03	0.1
A α C	0.03	0.1

附 录 A
(资料性)
8 种杂环胺的信息

8种杂环胺的信息见表 A.1。

表 A. 1 8 种杂环胺的信息

序号	英文名称	中文名称	CAS号	分子量, g/MOL
1	IQ	2-氨基-3-甲基咪唑-[4, 5- <i>f</i>]喹啉	76180-96-6	198
2	MeIQ	2-氨基-3, 4-二甲基咪唑-[4, 5- <i>f</i>]喹啉	77094-11-2	213
3	PhIP	2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑-[4, 5- <i>b</i>]吡啶	105650-23-5	224
4	8-MeIQx	2-氨基-3, 8-二甲基咪唑[4, 5- <i>f</i>]喹喔啉	77500-04-0	213
5	Trp-P-1	3-氨基-1, 4-二甲基-5H-吡啶并[4, 3- <i>b</i>]吡咯	62450-06-0	211
6	Trp-P-2	3-氨基-1-甲基-5H-吡啶[4, 3- <i>b</i>]吡咯	72254-58-1	197
7	AαC	2-氨基-9H-吡啶[2, 3- <i>b</i>]吡咯	26148-68-5	183
8	MeAαC	2-氨基-3-甲基-9H-吡啶[2, 3- <i>b</i>]吡咯	68006-83-7	197

附 录 B
(资料性)
质谱参考条件

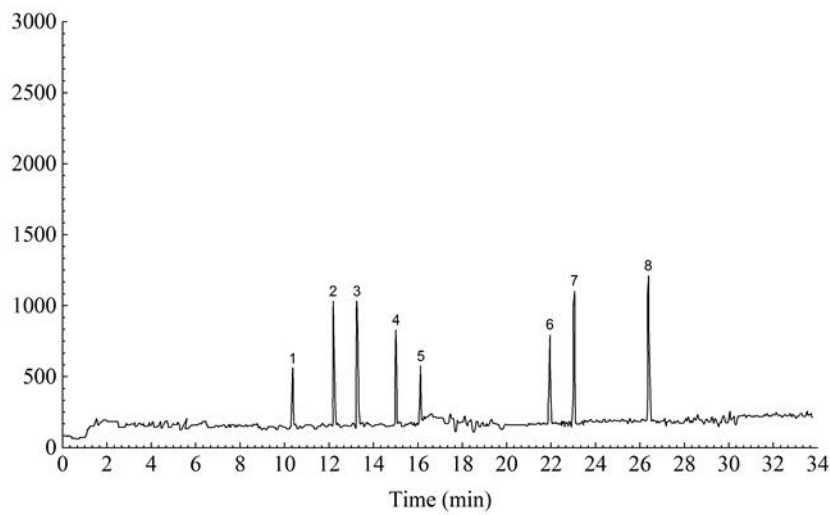
质谱参考条件见表 B.1。

表 B. 1 质谱参考条件

序号	化合物 (MW)	缩写	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	保留时间 (min)
1	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ (198)	IQ	199.0979	184.0745, 157.0636	10.36
2	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ (212)	MeIQ	213.1137	198.0903, 197.0824	12.25
3	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ (213)	8-MeIQx	214.1090	199.0855, 131.0481	13.32
4	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ (197)	Trp-P-2	198.1030	154.0655, 181.0764	15.01
5	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ (224)	PhIP	225.1140	210.0905, 140.0499	16.12
6	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ (211)	Trp-P-1	212.1187	195.0923, 168.0813	21.94
7	C ₁₁ H ₉ N ₃ (183)	AαC	184.0874	140.0499, 167.0608	23.02
8	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ (197)	MeAαC	198.1030	181.0764, 154.0655	26.42

附 录 C
(资料性)
标准溶液色谱图

标准溶液色谱图见图 C.1。



标引序号说明：
1：IQ； 2：MeIQ； 3：8-MeIQx； 4：Trp-P-2； 5：PhIP； 6：PhIP； 7：AαC； 8：MeAαC。

图 C.1 标准溶液色谱图