

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3876—2021

猪肉中卡拉胶的检测 液相色谱—串联质谱法

Determination of carrageenan in pork—Liquid
chromatography—tandem mass spectrometry method

2021-05-07 发布

2021-11-01 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国屠宰加工标准化技术委员会(SAC/TC 516)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、必维信诺(山东)检测技术有限公司。

本文件主要起草人：王君玮、王琳、邓书、丛睿、赵格、邵绪卿、江翠芸、高玉斌、宋时萍。

猪肉中卡拉胶的检测 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了猪肉中卡拉胶检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鲜、冻猪肉中卡拉胶的测定。

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)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经盐酸溶液处理后,其中的卡拉胶被降解生成特征性寡糖。用液相色谱-串联质谱仪检测寡糖含量,外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明,所有试剂均为分析纯。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):色谱纯。

5.1.3 浓盐酸(HCl):优级纯。

5.1.4 乙酸锌[(CH_3COO) $_2\text{Zn}$]。

5.1.5 亚铁氰化钾[$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]。

5.2 标准品

卡拉胶(CAS号:9000-07-1),纯度 $\geq 99\%$ 。

5.3 材料

5.3.1 滤膜:水相,0.22 μm 。

5.3.2 滤膜:有机相,0.22 μm 。

5.4 溶液配制

5.4.1 0.005 mol/L 乙酸铵水溶液:称取乙酸铵 0.39 g,用水溶解并定容至 1 000 mL,过 0.22 μm 水相滤膜。

5.4.2 190 g/L 乙酸锌溶液:称取乙酸锌 19 g,用水溶解并定容至 100 mL。

5.4.3 150 g/L 亚铁氰化钾溶液:称取亚铁氰化钾 15 g,用水溶解并定容至 100 mL。

5.4.4 标准储备液(1 000 mg/L):称取卡拉胶对照品 0.010 0 g,加入适量水,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴溶解。冷却至室温后,转移至 10 mL 容量瓶用水定容至刻度,即为 1 000 mg/L 储备液。临用现配。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子(ESI)源。

- 6.2 分析天平:感量为 0.000 1 g 和感量为 0.01 g。
- 6.3 低温高速离心机:转速 $\geq 8\,000$ r/min。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 组织捣碎机。
- 6.6 匀浆机。
- 6.7 恒温振荡水浴锅。

7 试样制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,用组织捣碎机绞碎并均质:
——取均质的供试样品,作为供试试样;
——取均质的空白样品,作为空白试样。

7.2 试样的保存

在-20℃以下保存。

8 试样处理

称取 5 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中。加入 20 mL 水,于 4℃ 10 000 r/min 匀浆 1 min。加入 2 mL 浓盐酸,涡旋 30 s,置于 80℃ 恒温振荡水浴锅振荡 2 h,取出后冷却至室温。依次加入 1.5 mL 190 g/L 的乙酸锌溶液、1.5 mL 150 g/L 的亚铁氰化钾溶液,涡旋 1 min 沉淀蛋白质。于 4℃ 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,过 0.22 μ m 有机相滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

9 测定

9.1 液相色谱参考条件

- 9.1.1 色谱柱:BEH Amide 柱(1.7 μ m,2.1 mm $\times$ 100 mm),或相当者。
- 9.1.2 进样量:1 μ L。
- 9.1.3 柱温:30℃。
- 9.1.4 流速:0.4 mL/min。
- 9.1.5 流动相:A 相:0.005 mol/L 乙酸铵水溶液;B 相:乙腈。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.00	50	50
2.00	50	50
2.01	25	75
4.00	25	75
4.01	50	50
6.00	50	50

9.2 质谱参考条件

- 9.2.1 离子源:电喷雾电离源(ESI)。
- 9.2.2 参考质谱条件如下:
 - a) 检测方式:多反应监测(MRM);

- b) 扫描模式:负离子扫描;
- c) 毛细管电压:−2.5 kV(ESI[−]);
- d) 干燥气温度:325 ℃;
- e) 干燥气流量:8 L/min;
- f) 雾化气压力:40 psi;
- g) 鞘气温度:350 ℃;
- h) 鞘气流量:10 L/min;
- i) 多反应监测条件见表 2。

表 2 卡拉胶降解产物的质谱参数

被测物名称	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	碎裂电压 V	碰撞能量 eV
特征性寡糖	403.0>97.0	403.0>241.0	190	34
		403.0>97.0	190	46

9.3 标准曲线的制作

取 5 个 50 mL 离心管,分别准确加入 1 000 mg/L 标准储备液 50 μ L、100 μ L、250 μ L、500 μ L、1 000 μ L。然后加入 23 mL 水,再加入 2 mL 浓盐酸,加盖后在涡旋混合器涡旋 30 s,置于 80 ℃ 恒温振荡水浴锅振荡 2 h。取出后冷却至室温,转移至 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,过 0.22 μ m 有机相滤膜,分别注入液相色谱-串联质谱仪中,即为 1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 工作液。以卡拉胶标准工作液浓度为横坐标、定量离子的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

9.4 定性测定

通过试样色谱图的保留时间与相应标准溶液的保留时间、色谱峰的特征离子与相应浓度标准溶液色谱峰的特征离子相对照定性。试样与标准溶液保留时间的相对偏差不大于 5%,试样特征离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不超过表 3 的规定,则可判断试样中存在相应的被测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

9.5 定量测定

取试样溶液和标准溶液,按外标法,以峰面积定量。标准溶液及试样溶液中的卡拉胶降解产物特征性寡糖响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,卡拉胶降解产物特征性寡糖的特征离子质量色谱图见附录 A。

9.6 空白试验

除不加试样外,采用完全相同的测定步骤进行测定。

10 结果计算

结果按公式(1)计算。

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

式中:

X —— 试样中卡拉胶的含量数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

c —— 由标准曲线计算出的样品溶液中卡拉胶的浓度数值,单位为毫克每升(mg/L);

V —— 试样溶液定容体积数值,单位为毫升(mL);

m ——试样称样量数值,单位为克(g)。

计算结果须扣除空白值。测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

11 检测方法灵敏度、准确度和精密度

11.1 灵敏度

本方法的检测限为 3 mg/kg,定量限为 10 mg/kg。

11.2 准确度

本方法在 10 mg/kg~100 mg/kg 添加浓度水平上的回收率为 70%~100%。

11.3 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附 录 A

(资料性)

卡拉胶降解产物特征离子质量色谱图

卡拉胶降解产物特征离子质量色谱图见图 A. 1。

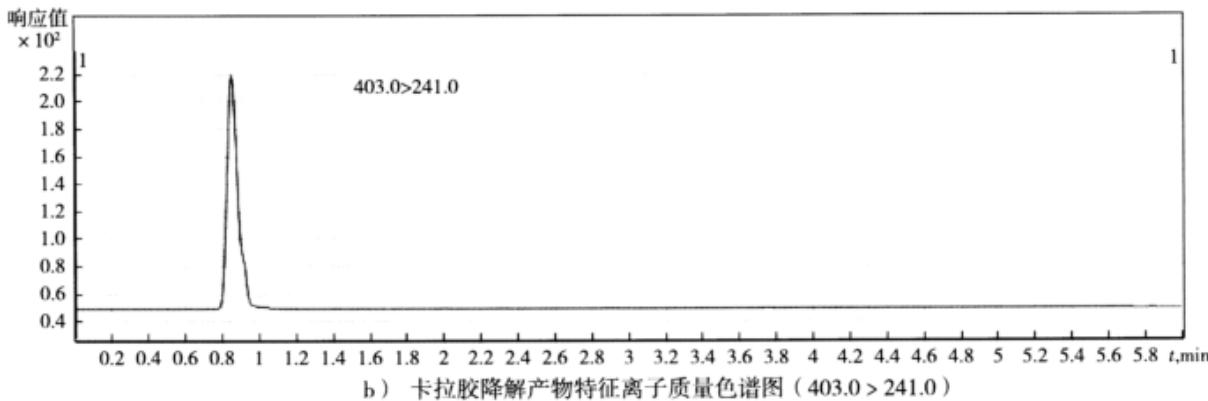
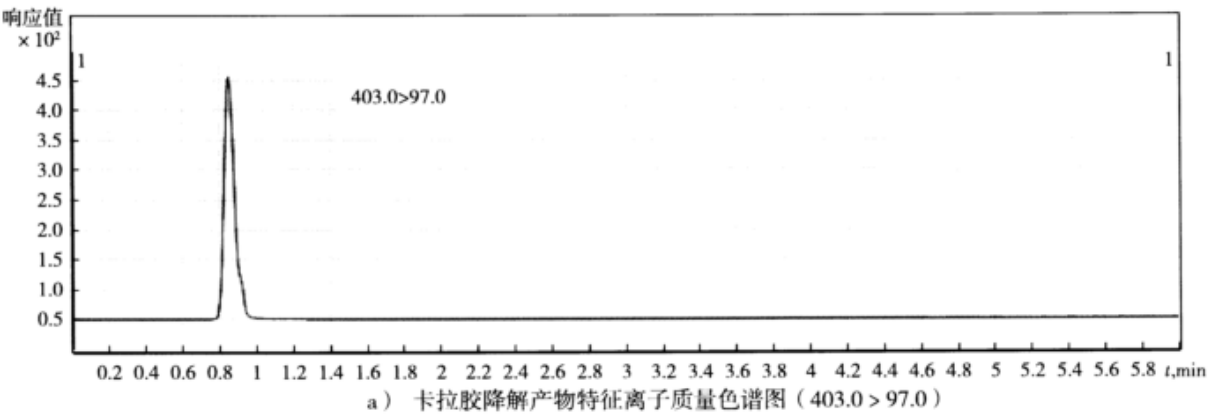


图 A. 1 卡拉胶降解产物特征离子质量色谱图