

BJS

食品补充检验方法

BJS 202301

动物源性食品中瓜尔胶的测定

2023-06-13 发布

国家市场监督管理总局 发布

动物源性食品中瓜尔胶的测定

1 范围

本方法规定了猪肉、牛肉、羊肉中瓜尔胶的液相色谱-串联质谱测定方法。
本方法适用于猪肉、牛肉、羊肉中瓜尔胶的测定。

2 原理

样品及标准品经 β -甘露聚糖酶酶解,加入乙腈沉淀蛋白后离心,上清液经过中性氧化铝柱净化,用液相色谱-串联质谱仪检测酶解产物特征寡糖,外标法测定瓜尔胶含量。

3 试剂和材料

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。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

3.1.2 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

3.1.3 一水合柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

3.1.4 β -甘露聚糖酶(CAS:37288-54-3): $\geq 98\%$,酶活力 10 000 U/g。

3.2 试剂配制

3.2.1 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取 14.2 g 磷酸氢二钠(3.1.2),用水溶解并稀释至 500 mL。

3.2.2 柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取 21.0 g 一水合柠檬酸(3.1.3),用水溶解并稀释至 1 000 mL。

3.2.3 McIlvaine 缓冲溶液:量取 678 mL 柠檬酸溶液(3.2.2)于 1 000 mL 烧杯中,加入 322 mL 磷酸氢二钠溶液(3.2.1),混匀。

3.2.4 β -甘露聚糖酶溶液(0.2 mg/mL):称取 0.01 g β -甘露聚糖酶(3.1.4)于具塞试管中,加入 50 mL McIlvaine 缓冲溶液(3.2.3),混匀。临用现配。

3.3 标准品

瓜尔胶:纯度 $\geq 98.5\%$ 。瓜尔胶的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和结构式见附录 A。

3.4 标准溶液配制

标准溶液(1.0 mg/mL):准确称取瓜尔胶标准品(3.3)0.1 g(精确至 0.000 1 g),用水溶解并定容至 100 mL,混匀。临用现配,使用时再次摇匀。

3.5 材料

3.5.1 固相萃取柱:中性氧化铝柱,500 mg/6 mL,或性能相当者。

3.5.2 微孔滤膜:有机滤膜,孔径 0.22 μm 。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源(ESI)。
- 4.2 多管涡旋混合仪。
- 4.3 高速冷冻离心机: 转速 $\geq 12\ 000$ r/min。
- 4.4 恒温水浴振荡器。
- 4.5 电子天平: 感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 4.6 组织粉碎机。
- 4.7 固相萃取装置。

5 分析步骤

5.1 试样的制备与保存

空白或供试样品, 约 200 g, 取瘦肉部分, 用组织粉碎机(4.6)均质, 得到糜状试样, $-18\ ^\circ\text{C}$ 及以下保存。

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。

5.2 试样的处理

5.2.1 酶解

称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 依次加入 8 mL McIlvaine 缓冲溶液(3.2.3)和 0.5 mL β -甘露聚糖酶溶液(3.2.4), 加盖后涡旋 10 min, 放入 $55\ ^\circ\text{C} \pm 5\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡器中酶解 7 h~16 h, 取出冷却后于 $4\ ^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移至玻璃试管中, 在沸水浴中加热 10 min, 冷却后转移至 10 mL 比色管中, 加水至刻度线, 混匀后取 1.00 mL 于离心管中, 加入 1.00 mL 乙腈(3.1.1)混匀, 4 500 r/min 离心 2 min, 取上清液待净化。

5.2.2 净化

取 1.00 mL 待净化液, 通过中性氧化铝柱(3.5.1, 无需活化), 用刻度管接收流出液, 再用 2 mL 水洗脱, 合并接收液。将接收液用乙腈(3.1.1)补足至 4 mL, 混匀后过 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜(3.5.2), 供测定。

5.3 基质加标标准工作曲线的制备

分别精确移取标准溶液(3.4)适量, 用水稀释, 配制成质量浓度分别为 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液。称取 5 份空白试样(5.1), 每份 2 g, 分别加入标准系列溶液 1.00 mL, 按照 5.2 操作, 与样品同时进行酶解和净化, 即试样中加入瓜尔胶的质量分别为 $20\ \mu\text{g}$ 、 $50\ \mu\text{g}$ 、 $200\ \mu\text{g}$ 、 $400\ \mu\text{g}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{g}$ 。

注: 可根据仪器的灵敏度及试样中待测物的实际含量确定标准系列曲线浓度。

5.4 液相色谱-串联质谱测定

5.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- a) 色谱柱: 填料为亚乙基桥杂化颗粒-三键键合的酰胺基键合相的色谱柱, $2.1\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$, 粒

径 1.7 μm , 或性能相当者。

b) 流动相: A 相为水, B 相为乙腈(3.1.1), 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	5	95
13.0	50	50
14.0	50	50
14.1	5	95
15.0	5	95

c) 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

d) 流速: 0.4 mL/min。

e) 进样量: 5 μL 。

5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

a) 离子源: 电喷雾离子源(ESI)。

b) 采集方式: 正离子扫描。

c) 监测方式: 多反应监测(MRM)。

d) 电离电压: 5.5 kV。

e) 离子源温度: 600 $^{\circ}\text{C}$ 。

f) 雾化气压力: 55 psi(1 psi=6.895 kPa)。

g) 辅助气压力: 65 psi。

h) 质谱分析参数见表 2。

表 2 瓜尔胶酶解产物特征寡糖的质谱分析参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压/V
瓜尔胶酶解产物特征寡糖	527.1	365.2*	47	100
		203.2	52	100
* 定量离子。				

上述仪器参数仅供参考, 当采用不同仪器时, 仪器参数可能存在差异, 测定前应将仪器参数优化到最佳。

5.5 定性测定

按照上述条件测定试样和基质加标标准工作溶液, 试样中的目标化合物保留时间与基质加标标准工作溶液中的目标化合物保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内; 所监测定性离子均存在($S/N \geq 3$), 且试样中定性离子的相对离子丰度与浓度相当基质加标标准工作溶液的相对离子丰度进行比较, 偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为试样中存在该组分。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.6 定量测定

5.6.1 标准曲线的制作

将基质加标标准工作溶液(5.3),分别按仪器参考条件(5.4)进行测定,得到相应的峰面积。以基质加标标准工作溶液中瓜尔胶质量为横坐标,以瓜尔胶酶解产物特征寡糖定量离子峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

5.6.2 试样溶液的测定

将试样溶液(5.2),按仪器参考条件(5.4)进行测定,得到相应试样溶液的瓜尔胶酶解产物特征寡糖定量离子峰面积。根据标准曲线得到试样中瓜尔胶的质量。

瓜尔胶酶解产物特征寡糖多反应监测(MRM)色谱图见附录 B。用于质谱 MRM 检测的瓜尔胶酶解产物特征寡糖的分子式及结构信息见附录 C。

5.7 空白试验

除不加试样外,均按上述步骤(5.2)操作。

6 结果计算与表述

试样中瓜尔胶的含量按式(1)计算:

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

式中:

X —— 试样中瓜尔胶的含量,单位为毫克每千克(mg/kg),以瓜尔胶计;

M —— 由标准曲线得到的试样中瓜尔胶的质量,单位为微克(μg);

m —— 试样的称样量,单位为克(g);

1 000 —— 换算系数。

计算结果应扣除空白值,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,保留 3 位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下,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

本方法的检出限为 3.00 mg/kg,定量限为 10.0 mg/kg。

若样本中检出瓜尔胶酶解产物特征寡糖,来源可能为瓜尔胶,也可能是瓜尔胶结构相近的胶,如田菁胶、刺槐豆胶、葫芦巴胶、刺云豆胶等。

附录 A

(资料性)

瓜尔胶中文名称、英文名称、CAS 号、分子式和结构式

瓜尔胶的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式见表 A.1。

表 A.1 瓜尔胶的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式
瓜尔胶	Guar gum	9000-30-0	$\text{H}(\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_{15})_n\text{OH}$

瓜尔胶的结构式见图 A.1。

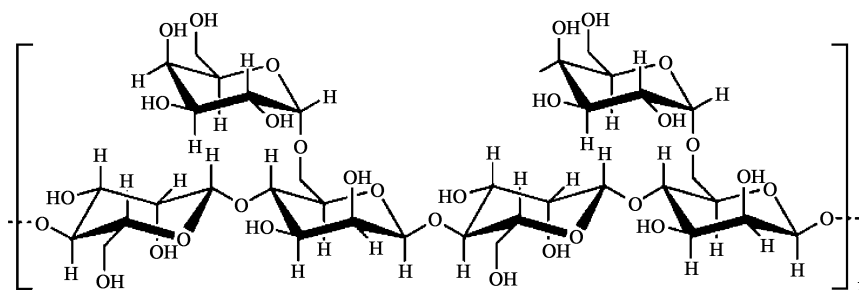


图 A.1 瓜尔胶的结构式

附录 B
(资料性)

瓜尔胶酶解产物特征寡糖多反应监测(MRM)色谱图

牛肉中添加瓜尔胶(100 mg/kg)的酶解产物特征寡糖多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

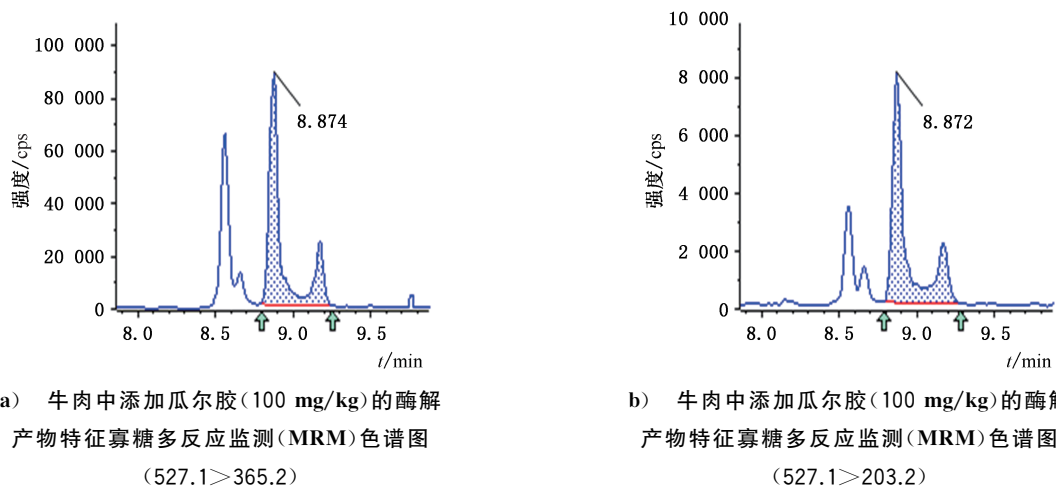


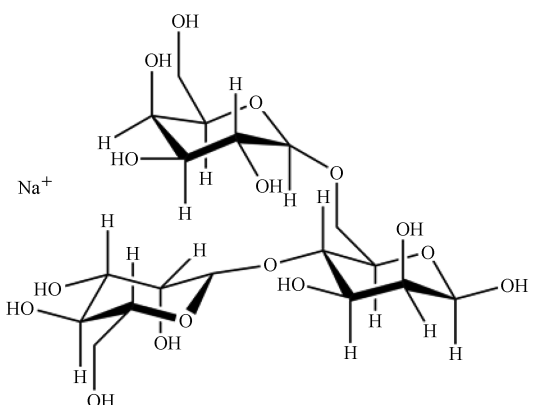
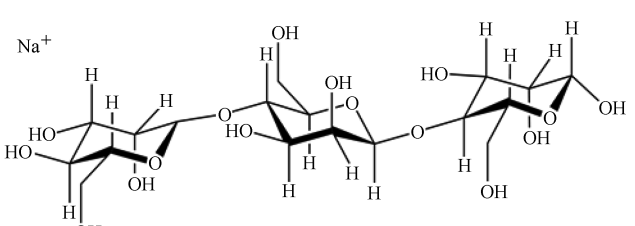
图 B.1 牛肉中添加瓜尔胶(100 mg/kg)的酶解产物特征寡糖多反应监测(MRM)色谱图

附录 C

(资料性)

用于质谱检测的瓜尔胶酶解产物特征寡糖相关信息

表 C.1 用于质谱 MRM 检测的瓜尔胶酶解产物特征寡糖的分子式及结构信息

分子式	m/z	结构信息
$C_{18}H_{32}NaO_{16}^+$	527.1	
$C_{18}H_{32}NaO_{16}^+$	527.1	

本方法起草单位：中国肉类食品综合研究中心、中国检验检疫科学研究院。

本方法验证单位：成都市食品检验研究院、上海市食品药品检验研究院、北京市食品安全监控和风险评估中心（北京市食品检验所）、中检科（北京）测试有限公司、中轻检验认证有限公司。

本方法主要起草人：王守伟、张峰、郭文萍、李莹莹、赵文涛、郭超、陈超、杨敏莉、陈相峰、贺木易、叶梅、潘颖、林立。