

附件1

食品中二甲双胍等非食品用化学物质的测定

BJS 201901

1 范围

本标准规定了食品（含特殊食品）中二甲双胍、苯乙双胍、丁二胍、伏格列波糖、阿卡波糖、维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、达格列净、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、卡格列净、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、曲格列酮、格列喹酮、莫格他唑、GW501516、环格列酮等 27 种非食品用化学物质的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于茶叶、奶粉、饼干、酒、饮料等食品（包括上述类似基质的片剂、胶囊剂等形式的特殊食品）中二甲双胍等27种非食品用化学物质的测定。

2 原理

试样粉碎后经甲醇超声提取，过滤后，上清液供高效液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，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 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

3.1.3 甲酸铵（ HCOONH_4 ）：色谱纯。

3.1.4 甲醇（ CH_3OH ）：分析纯。

3.2 溶液配制

3.2.1 0.1%甲酸水溶液：量取甲酸（3.1.2）1 mL，用水稀释至 1000 mL，用滤膜（4.2）过滤后备用。

3.2.2 5 mmol/L 甲酸铵水溶液：称取甲酸铵（3.1.3）0.315 g，用水稀释至 1000 mL，用滤膜（4.2）过滤后备用。

3.2.3 5 mmol/L 甲酸铵乙腈溶液：称取甲酸铵（3.1.3）0.315 g，加水 50 mL 溶解后，用乙腈稀释至 1000 mL，用滤膜（4.2）过滤后备用。

3.3 标准品

苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍、伏格列波糖、阿卡波糖、维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、达格列净、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、卡格列净、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、曲格列酮、格列喹酮、莫格他唑、GW501516、环格列酮标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量详见附录 A 中的表 A.1，各标准品纯度均 $\geq 95\%$ 。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 标准储备液 (5 mg/mL): 准确称取伏格列波糖、阿卡波糖、达格列净、卡格列净、曲格列酮、环格列酮各标准品 (3.3) 50.0 mg (精确至 0.0001 g), 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 5 mg/mL 标准储备液 A, -20℃ 保存, 有效期 3 个月。

3.4.2 标准储备液 (100 µg/mL): 准确称取苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍、维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、格列喹酮、莫格他唑、GW501516 各标准品 (3.3) 10.0 mg (精确至 0.0001 g), 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 100 µg/mL 标准储备液 B, -20 °C 保存, 有效期 3 个月。

3.4.3 混合标准中间液 A: 分别准确吸取伏格列波糖和阿卡波糖的标准储备液 (3.4.1) 及苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍的标准储备液 (3.4.2) 各 1 mL, 置于同一 100mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 稀释至刻度, 摇匀, 制成混合标准中间液 (A), 其中伏格列波糖和阿卡波糖浓度为 50 µg/mL, 苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍浓度为 1 µg/mL。

3.4.4 混合标准中间液 B: 分别准确吸取达格列净、卡格列净、曲格列酮、环格列酮的标准储备液 (3.4.1) 各 1 mL 及维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、格列喹酮、莫格他唑、GW501516 的标准储备液 (3.4.2) 各 1 mL, 置于同一 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 稀释至刻度, 摇匀, 制成混合标准中间液 B, 其中达格列净、卡格列净、曲格列酮、环格列酮浓度为 50 µg/mL, 维达列汀等 18 个化合物浓度为 1 µg/mL。

3.4.5 混合标准工作溶液 A: 分别准确吸取混合标准中间液 A(3.4.3) 各 0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL、2.0 mL, 置于 20 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标准工作溶液 S1~S5, 伏格列波糖和阿卡波糖的浓度均依次为 0.25 µg/mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.5 µg/mL、5.0 µg/mL; 苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍的浓度均依次为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

3.4.6 混合标准工作溶液 B: 分别准确吸取混合标准中间液 B(3.4.4) 各 0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL、2.0 mL, 置于 20 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.4) 稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标准工作溶液 S(1)~S(5), 达格列净、卡格列净、曲格列酮、环格列酮 4 个化合物的浓度均依次为 0.25 µg/mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.5 µg/mL、5.0 µg/mL; 维达列汀等 18 个化合物浓度均依次为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪, 配有电喷雾 (ESI) 离子源。

4.2 分析天平: 感量 0.0001g。

4.3 超声波水浴。

5 分析步骤

5.1 试样的制备

5.1.1 茶叶、奶粉、饼干、片剂、胶囊

取适量研细，称取粉末 1 g (精确至 0.0001 g) 置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇 (3.1.4) 45 mL，振摇，超声提取 10 min，放冷，加甲醇 (3.1.4) 定容至刻度，摇匀，用滤膜 (0.22 μm，有机相型) 过滤，取续滤液，可根据实际浓度适当稀释至线性范围内，供液相色谱-质谱联用仪分析。

5.1.2 饮料、口服液

准确吸取 1 mL，置 50 mL 量瓶中，加入甲醇 (3.1.4) 45 mL，振摇，超声提取 10 min，放冷，加甲醇 (3.1.4) 定容至刻度，摇匀，用滤膜 (0.22 μm，有机相型) 过滤，取续滤液，可根据实际浓度适当稀释至线性范围内，供液相色谱-质谱联用仪分析。

5.1.3 酒

准确吸取 1 mL，置蒸发皿中，水浴蒸至无醇味，用适量甲醇 (3.1.4) 溶解并转移至 50 mL 量瓶中，振摇，超声提取 10 min，放冷，加甲醇 (3.1.4) 定容至刻度，摇匀，用滤膜 (0.22 μm，有机相型) 过滤，取续滤液，可根据实际浓度适当稀释至线性范围内，供液相色谱-质谱联用仪分析。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱条件

5.2.1.1 系统 1 (测定苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍、伏格列波糖、阿卡波糖)

- a) 色谱柱：酰胺基键合杂化颗粒色谱柱 (2.1×100 mm， 3.5 μm)，或性能相当者；
- b) 流动相：A 为含 5 mmol/L 的甲酸铵溶液 (3.2.2)，B 为 5 mmol/L 甲酸铵乙腈溶液 (3.2.3)，梯度洗脱程序见表 2；
- c) 流速：300 μL/min；
- d) 柱温：70℃；
- e) 进样量：1 μL。

表 2 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	5	95
1.5	10	90
3.5	10	90
5.0	30	70
8.0	30	70
8.01	5	95
10.0	5	95

5.2.1.2 系统 2 (测定维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、达格列净、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、卡格列净、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、曲格列酮、格列喹酮、莫格他唑、GW501516、环格列酮)

- a) 色谱柱：亲水三键键合相实心核颗粒色谱柱 (2.1×100 mm, 2.7 μm), 或性能相当者;
- b) 流动相：A 为含 0.1% 甲酸水溶液 (3.2.1), B 为乙腈 (3.1.1), 梯度洗脱程序见表 3;
- c) 流速：300 μL/min;
- d) 柱温：30℃;
- e) 进样量：1 μL。

表 3 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
5	95	5
22	2	98
27	2	98
27.5	95	5
32	95	5

5.2.2 质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源 (ESI 源)。
- b) 检测方式：多反应监测 (MRM)。
- c) 扫描模式：正离子模式或负离子模式。
- d) 干燥气、雾化气、鞘气、碰撞气等均为高纯氮气或其他合适气体, 使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求, 毛细管电压、干燥气温度、鞘气温度、鞘气流量、喷嘴电压、碰撞能量、碎裂电压等参数应优化至最佳灵敏度, 监测离子对和定量离子对等信息详见附录 A。

5.3 定性测定

按照高效液相色谱-串联质谱条件测定试样和标准工作溶液, 记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间, 以相对于最强离子丰度的百分比作为定性离子对的相对丰度, 记录浓度相当的试样与标准工作溶液中相应成分的相对离子丰度。当试样中检出与 27 种化合物中某标准品色谱峰保留时间一致的色谱峰 (变化范围在 ±2.5% 之内), 并且相对离子丰度允许偏差不超过表 4 规定的范围, 可以确定试样中检出相应化合物。

表 4 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对丰度 (%)	最大允许偏差 (%)
$k > 50\%$	±20
$50\% \geq k > 20\%$	±25
$20\% \geq k > 10\%$	±30
$k \leq 10\%$	±50

5.4 定量测定

5.4.1 标准曲线的制作

将混合标准工作溶液 A (3.4.5) 分别按仪器参考条件 (5.2.1.1 和 5.2.2) 进行测定, 将混合标准工作溶液 B (3.4.6) 分别按仪器参考条件 (5.2.1.2 和 5.2.2) 进行测定, 得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的浓度为横坐标, 以色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

5.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液 (5.1) 按仪器参考条件 (5.2) 进行测定, 得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度, 平行测定次数不少于两次。

6 空白试验

除不加试样外, 均按试样同法操作。

7 结果计算

将液相色谱-质谱测得浓度代入下式计算含量:

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \times K \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X — 试样中各待测物的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

c — 从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V — 样液最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m — 试样溶液所代表的质量, 单位为克 (g);

K — 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, 结果保留三位有效数字。

8 检测方法的灵敏度、精密度、专属性

8.1 灵敏度

固体和液体取样量为 1 g 或 1 mL, 定容体积为 50 mL 时, 伏格列波糖、阿卡波糖、达格列净、卡格列净、曲格列酮、环格列酮的定量限为 12.5 mg/kg 或 12.5 mg/L; 苯乙双胍、丁二胍、二甲双胍、维达列汀、罗格列酮、西他列汀、吡格列酮、氯磺丙脲、达格列净、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、妥拉磺脲、瑞格列奈、卡格列净、格列齐特、格列波脲、格列本脲、那格列奈、格列美脲、曲格列酮、格列喹酮、莫格他唑、GW501516、环格列酮的定量限为 0.25 mg/kg 或 0.25 mg/L。

8.2 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术平均值的 15%。

8.3 专属性

空白试验应无干扰。

附录 A

化合物相关信息

表A.1 化合物中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	分子量
1	苯乙双胍	Phenformin	114-86-3	C ₁₀ H ₁₅ N ₅	205.26
2	丁二胍	Buformin	692-13-7	C ₆ H ₁₅ N ₅	157.22
3	二甲双胍	Metformin	657-24-9	C ₄ H ₁₁ N ₅	129.17
4	伏格列波糖	Voglibose	83480-29-9	C ₁₀ H ₂₁ NO ₇	267.28
5	阿卡波糖	Acarbose	56180-94-0	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	645.61
6	维达列汀	Vildagliptin	274901-16-5	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₂	303.41
7	罗格列酮	Rosiglitazone	122320-73-4	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	357.43
8	西他列汀	Sitagliptin	486460-32-6	C ₁₆ H ₁₅ F ₆ N ₅ O	407.32
9	吡格列酮	Pioglitazone	111025-46-8	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	356.44
10	氯磺丙脲	Chlorpropamide	94-20-2	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	276.74
11	达格列净	Dapagliflozin	461432-26-8	C ₂₁ H ₂₅ ClO ₆	408.88
12	格列吡嗪	Glipizide	29094-61-9	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S	445.54
13	甲苯磺丁脲	Tolbutamide	64-77-7	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	270.35
14	醋磺己脲	Acetohexamide	968-81-0	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	324.40
15	妥拉磺脲	Tolazamide	1156-19-0	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	311.4
16	瑞格列奈	Repaglinide	135062-02-1	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄	452.6
17	卡格列净	Canagliflozin	842133-18-0	C ₂₄ H ₂₅ FO ₅ S	444.52
18	格列齐特	Gliclazide	21187-98-4	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	323.41
19	格列波脲	Glibornuride	26944-48-9	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	366.48
20	格列本脲	Glibenclamide	10238-21-8	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	494.00
21	那格列奈	Nateglinide	105816-04-4	C ₁₉ H ₂₇ NO ₃	317.43
22	格列美脲	Glimepiride	93479-97-1	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	490.62
23	曲格列酮	Troglitazone	97322-87-7	C ₂₄ H ₂₇ NO ₅ S	441.54
24	格列喹酮	Gliquidone	33342-05-1	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₆ S	527.64
25	莫格他唑	Muraglitazar	331741-94-7	C ₂₉ H ₂₈ N ₂ O ₇	516.55
26	GW501516	GW501516	317318-70-0	C ₂₁ H ₁₈ F ₃ NO ₃ S ₂	453.49
27	环格列酮	Ciglitazone	74772-77-3	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃ S	333.45

附录 B

质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
- b) 检测方式：多反应监测 (MRM)；
- c) 扫描方式：正离子模式和负离子模式；
- d) 毛细管电压：正离子模式：4000V；负离子模式：3500V；
- e) 离子源温度：200℃；
- f) 干燥气流量：12L/min；
- g) 雾化气压力：25psi；
- h) 鞘气温度：250℃；鞘气 (N₂) 流量：10L/min；
- i) 喷嘴电压：正离子模式：500V；负离子模式：2000V；
- j) 其他质谱参数见表 B.1

表 B.1 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

编号	中文名	电离方式	母离子	子离子	碰撞能量(V)	保留时间 (min)
1	苯乙双胍	ESI+	206.1	60.0*	21	2.487
				104.9	29	
2	丁二胍	ESI+	158.1	60.0*	13	2.593
				116	17	
3	二甲双胍	ESI+	130.1	60.1*	13	3.164
				71	25	
4	伏格列波糖	ESI+	268.1	91.9*	25	6.631
				74.1	29	
5	阿卡波糖	ESI+	646.3	304.1*	41	7.743
				145.8	25	
6	维达列汀	ESI+	304.2	154.0*	13	4.644
				97.1	37	
7	罗格列酮	ESI+	358.1	134.9*	29	9.949
				119	57	
8	西他列汀	ESI+	408.1	235.0*	17	10.093
				193	29	
9	吡格列酮	ESI+	357.1	134.0*	37	10.644
				118.9	57	
10	氯磺丙脲	ESI+	277	110.9*	37	12.651
				174.9	21	
11	达格列净	ESI+	426.2 (+NH ₄)	135.0*	21	12.954
				166.8	29	

12	格列吡嗪	ESI+	446.2	102.8*	53	13.183
				166.9	29	
13	甲苯磺丁脲	ESI+	271.1	90.9*	33	13.254
				73.9	13	
14	醋磺己脲	ESI+	325.1	118.8*	33	13.258
				242.9	9	
15	妥拉磺脲	ESI+	312.1	114.9*	17	13.492
				91	37	
16	瑞格列奈	ESI+	453.3	230.1*	33	13.671
				86	29	
17	卡格列净	ESI+	462.2 (+NH ₄)	147.0*	37	14.077
				190.9	57	
18	格列齐特	ESI+	324.1	126.9*	17	14.264
				109.9	45	
19	格列波脲	ESI+	367.2	152.2*	21	14.878
				170.2	17	
20	格列本脲	ESI+	494.2	168.7*	45	15.499
				369	13	
21	那格列奈	ESI+	318.2	166.0*	9	15.536
				119.9	29	
22	格列美脲	ESI+	491.2	126.0*	33	15.798
				352	13	
23	曲格列酮	ESI+	442.2	164.9*	25	16.445
				219.1	9	
24	格列喹酮	ESI+	528.2	403.1*	17	16.834
				386.1	21	
25	莫格他唑	ESI+	517.2	186.0*	29	16.843
				292.1	13	
26	GW501516	ESI+	454.1	256.9*	37	18.007
				187.9	57	
27	环格列酮	ESI-	332.1	289.1*	21	18.419
				149.9	37	

* 定量离子对。

注：（1）方法提供的监测离子对等测定条件为推荐条件，各实验室可根据所配置仪器的具体情况作出适当调整；在样品基质有测定干扰的情况下，可选用其他监测离子对。

（2）为提高检测灵敏度，可根据保留时间分段监测各化合物。

附录 C

标准物质色谱图

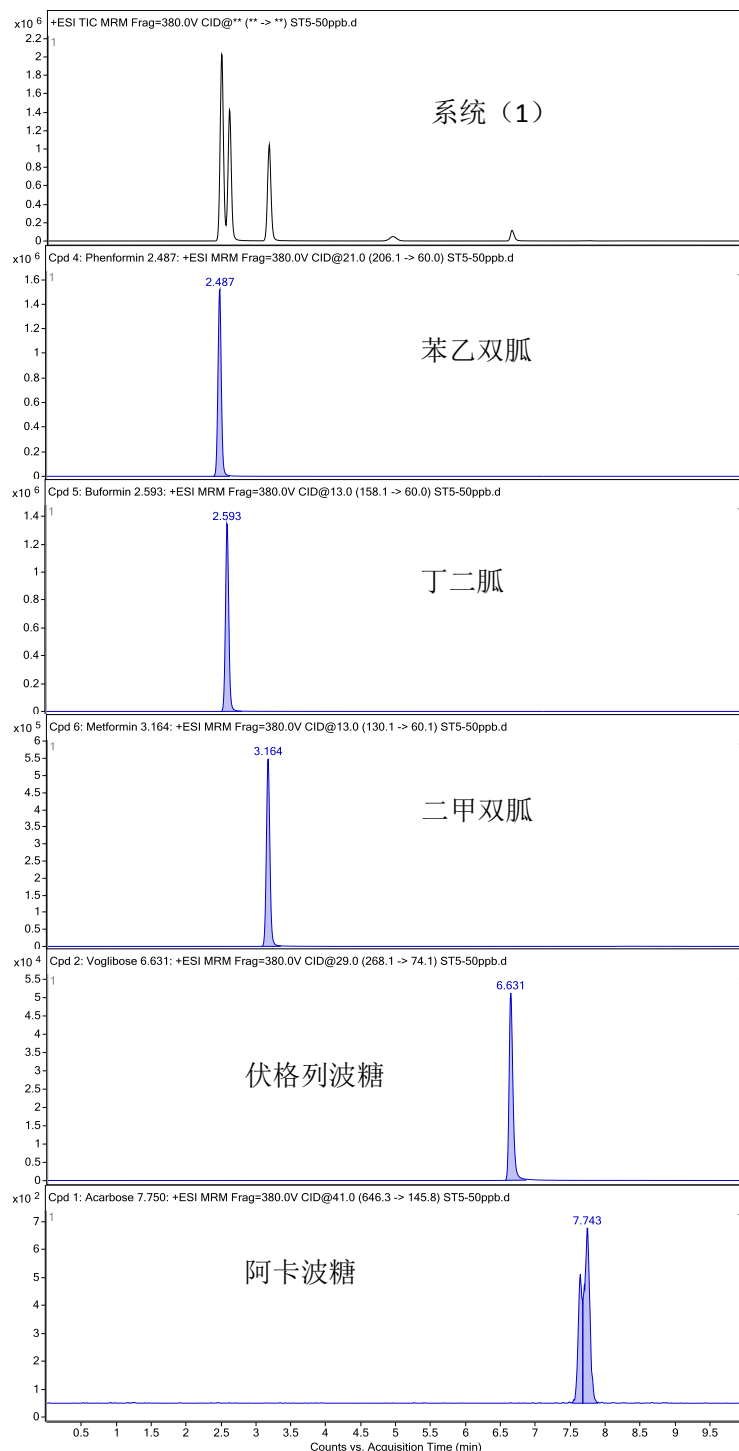
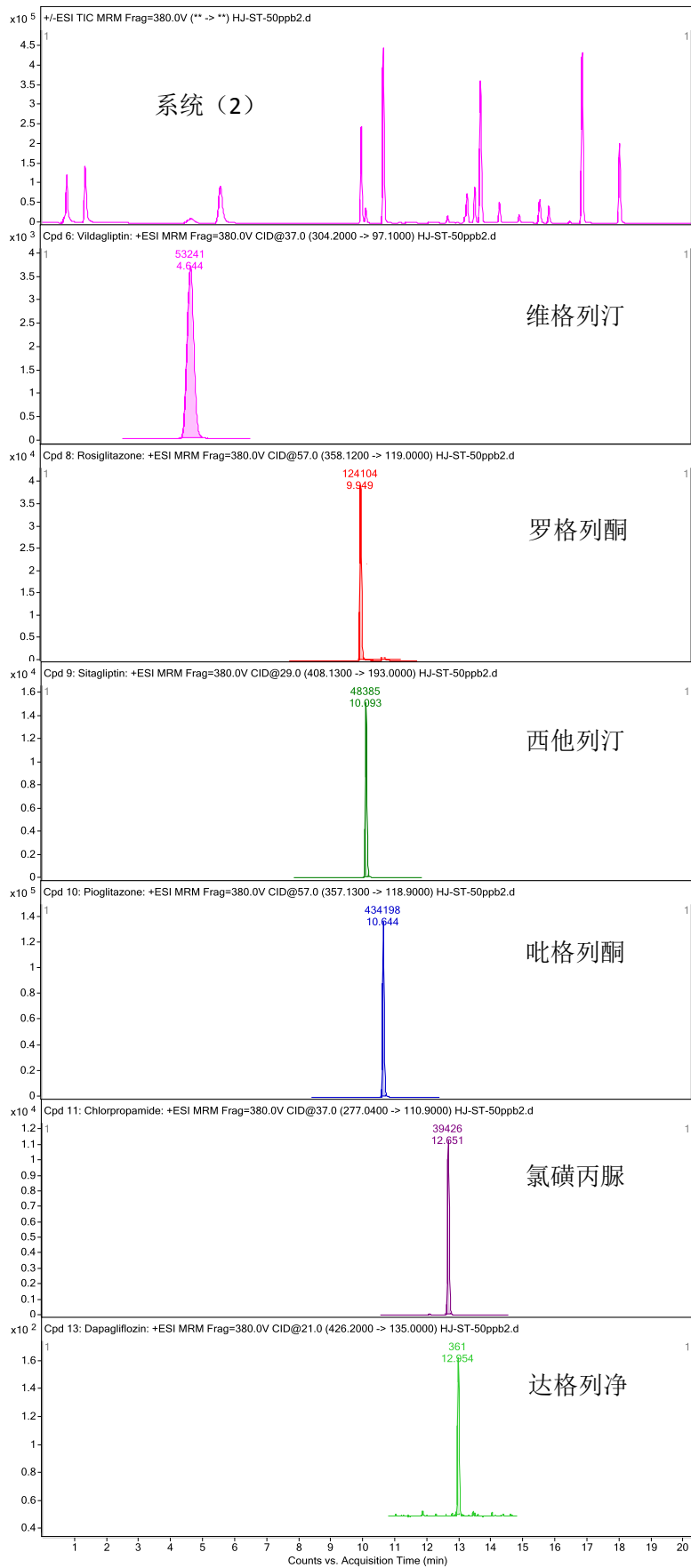
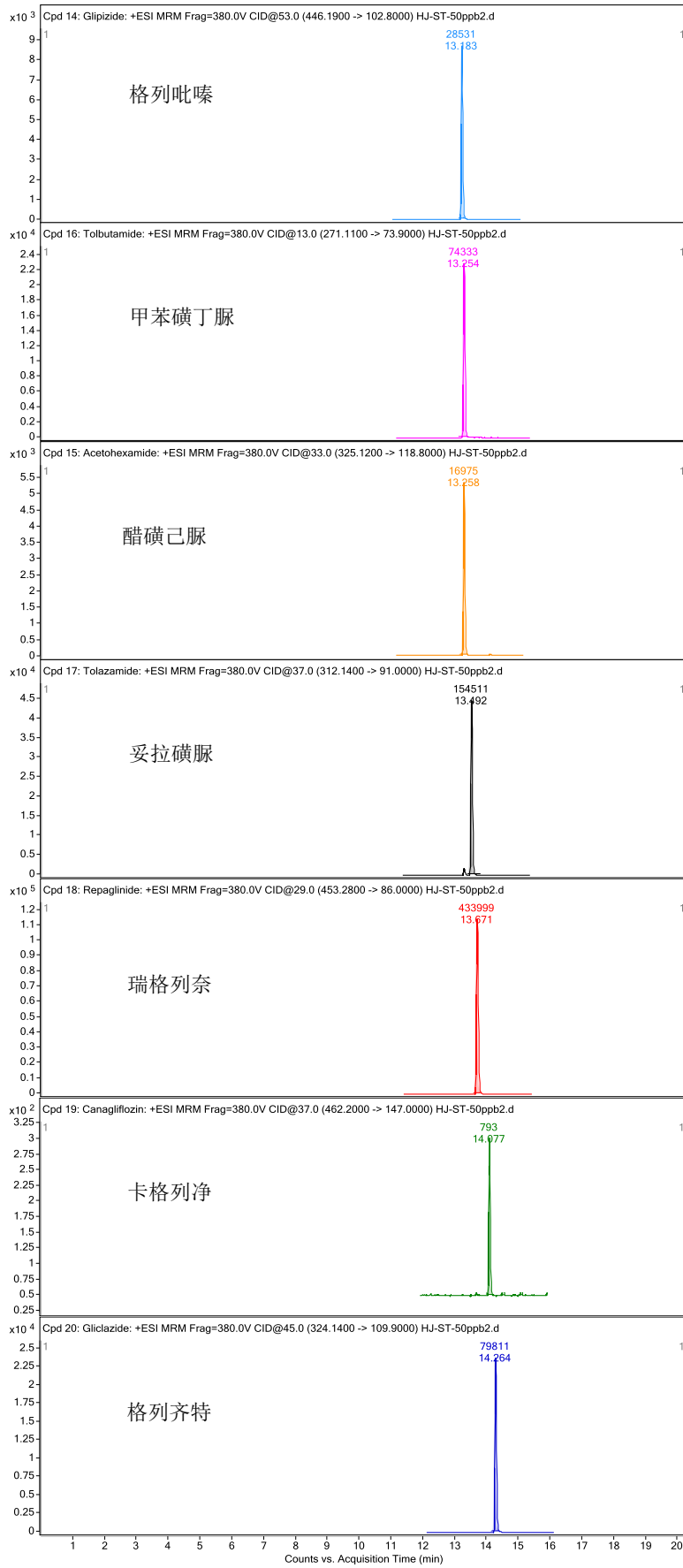
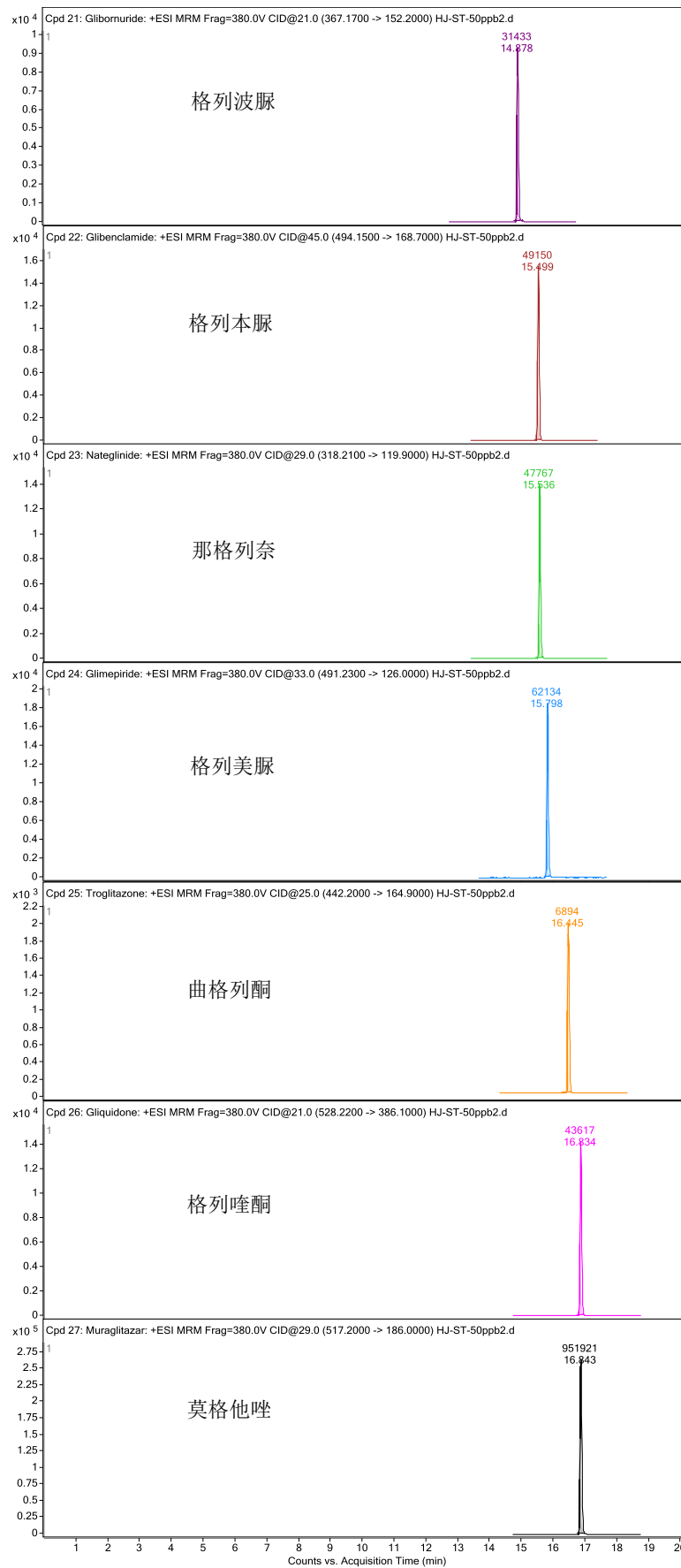


图 C.1 系统 (1) 中标准品的提取离子(定量)色谱图

注：阿卡波糖为双峰，定量时需合并峰面积计算。







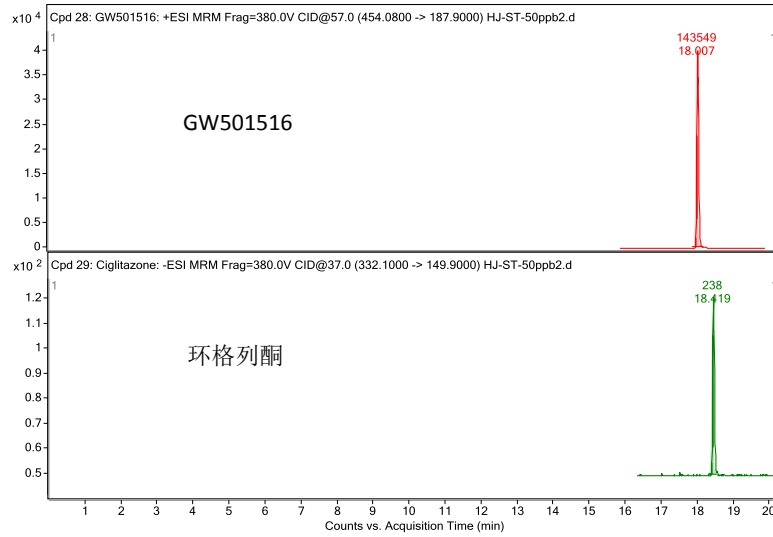


图 C.2 系统（2）中标准品的提取离子(定量)色谱图

本方法负责起草单位：上海市食品药品检验所。

验证单位：陕西省食品药品监督检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、河北省药品检验研究院、大连市食品检验所、上海市松江食品药品检验所。

主要起草人：张甦、胡青、孙健、冯睿、于泓、付丽莎