



中华人民共和国国家标准

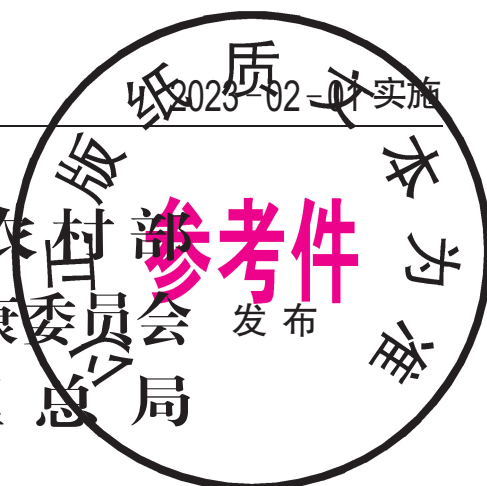
GB 31658.19—2022

食品安全国家标准 动物性食品中阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、 利多卡因、普鲁卡因残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of atropine, scopolamine, anisodamine,
lidocaine, procaine residues in animal derived food—Liquid
chromatography–tandem mass spectrometric method

2022-09-20 发布

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局



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。

本文件系首次发布。



食品安全国家标准

动物性食品中阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、利多卡因、普鲁卡因 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、利多卡因、普鲁卡因残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于猪、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、利多卡因、普鲁卡因单个或多个药物残留量的测定。

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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的待测物经磷酸盐缓冲液提取，PEP-2 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外，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 甲醇(CH₃OH): 色谱纯。
- 5.1.2 乙腈(CH₃CN): 色谱纯。
- 5.1.3 甲酸(HCOOH): 色谱纯。
- 5.1.4 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 5.1.5 磷酸氢二钾(K₂HPO₄·3H₂O)。
- 5.1.6 磷酸(H₃PO₄)。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.1 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液: 取磷酸二氢钾 13.6 g, 加水 900 mL 使溶解, 用磷酸调节 pH 至 4.0±0.05, 用水稀释至 1 000 mL, 混匀。
- 5.2.2 0.2 mol/L 磷酸氢二钾溶液: 取磷酸氢二钾 22.8 g, 加水溶解并稀释至 500 mL, 混匀。
- 5.2.3 5% 甲醇溶液: 取甲醇 5 mL, 加水稀释至 100 mL, 混匀。
- 5.2.4 30% 乙腈溶液: 取乙腈 30 mL, 加水稀释至 100 mL, 混匀。
- 5.2.5 0.1% 甲酸溶液: 取甲酸 0.5 mL, 加水稀释至 500 mL, 混匀。

5.3 标准品

阿托品(Atropine, $C_{17}H_{23}NO_3$, CAS号:51-55-8)、东莨菪碱(Scopolamine, $C_{17}H_{21}NO_4$, CAS号:51-34-3)、山莨菪碱(Anisodamine, $C_{17}H_{23}NO_4$, CAS号:55869-99-3)、利多卡因(Lidocaine $C_{14}H_{22}N_2O$, CAS号:137-58-6)、普鲁卡因(Procaine, $C_{13}H_{20}N_2O_2$, CAS号:59-46-1),含量均 $\geq 99\%$ 。标准品也可为相应的盐。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液:取阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、利多卡因、普鲁卡因标准品各适量(相当于各活性成分约10 mg),精密称定,加甲醇适量使溶解并稀释定容至10 mL容量瓶,配制成浓度为1 mg/mL的标准储备液。 -18°C 避光保存,有效期6个月。

5.4.2 混合标准中间液:准确量取标准储备液各1 mL,于100 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 -18°C 避光保存,有效期1个月。

5.4.3 系列标准工作液:准确量取混合标准中间液适量,用30%乙腈溶液稀释,配制成浓度分别为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL的系列标准溶液。现配现用。

5.5 材料

5.5.1 PEP-2固相萃取柱¹⁾:填料为官能化聚苯乙烯/二乙烯苯,60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜:0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量0.01g和0.000 01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 高速冷冻离心机:转速可达10 000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

6.7 组织匀浆机。

6.8 pH计。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

-18°C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料2 g(准确至 ± 0.05 g)于50 mL离心管中,准确加入0.1 mol/L磷酸二氢钾缓冲液20 mL(脂肪样品在 60°C 水浴加热10 min),涡旋1 min,振荡10 min, 4°C 下10 000 r/min离心10 min。准确移取10 mL上清液至另一离心管中,加入0.2 mol/L磷酸氢二钾溶液5 mL,混匀后备用。若溶液浑浊,10 000 r/min离心10 min,取上清液备用。

1) 此处列出PEP-2固相萃取柱仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的固相萃取柱。

8.2 净化

PEP-2 固相萃取柱分别用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化,移取全部备用液,过柱,用水 3 mL、5% 甲醇溶液 3 mL 淋洗,抽干,准确移取 30% 乙腈溶液 2 mL 洗脱,抽干,收集洗脱液,过微孔尼龙滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

准确移取系列标准工作液各 100 μ L,用经 8.1~8.2 步骤处理后的空白试样洗脱液稀释至 1 mL,配制成浓度为 0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 的系列基质匹配标准溶液,过微孔尼龙滤膜后,供液相色谱-串联质谱测定。以各药物特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,基质匹配标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m), 或相当者;
- 柱温: 35 $^{\circ}$ C;
- 进样量: 2 μ L;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液; B 为甲醇。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	90	10
0.5	90	10
3.0	5	95
3.9	5	95
4.0	90	10
6.0	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源: 电喷雾离子源;
- 扫描方式: 正离子扫描;
- 检测方式: 多反应监测;
- 喷雾电压: 1.0 kV;
- 鞘气: 30 Arb;
- 辅助气: 5 Arb;
- 离子迁移管温度: 325 $^{\circ}$ C;
- 雾化温度: 300 $^{\circ}$ C;
- 待测药物的保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值见表 2。

表 2 待测药物的保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值

药物	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
阿托品	2.97	290.3 > 124.2	290.3 > 124.2	89	24
		290.3 > 93.2			29
东莨菪碱	2.70	304.2 > 138.2	304.2 > 138.2	77	22
		304.2 > 156.2			17
山莨菪碱	3.07	306.2 > 140.2	306.2 > 140.2	94	24
		306.2 > 122.2			28
利多卡因	2.24	235.2 > 86.2	235.2 > 86.2	63	18
		235.2 > 58.2			31

表 2 (续)

药物	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
普鲁卡因	2.80	237.2>100.2	237.2>100.2	58	16
		237.2>164.1			17

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中待测物药物峰的保留时间与基质匹配标准溶液相应峰的保留时间相对偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表 3 要求。

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	允许偏差
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质匹配标准溶液,作单点或多点校准,按外标法以色谱峰面积定量。基质匹配标准工作液及试样溶液中待测物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,基质匹配标准溶液的特征离子质量色谱图见附录 A。

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用相同的测定步骤进行测定。

9 结果计算和表述

试样中待测物残留量按标准曲线或公式(1)计算:

$$X = \frac{C_s \times A \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中待测物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- C_s —— 基质标准溶液中待测物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A —— 试样溶液中待测物的峰面积;
- A_s —— 基质标准溶液中待测物的峰面积;
- V —— 洗脱液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 净化用提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 试样提取液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊的肌肉和脂肪组织中的检测限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;在猪、牛、羊的肾脏和肝脏组织中的检测限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在猪、牛、羊的肌肉和脂肪组织 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 60%~

120%；在猪、牛、羊的肾脏和肝脏组织 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 60%~120%。

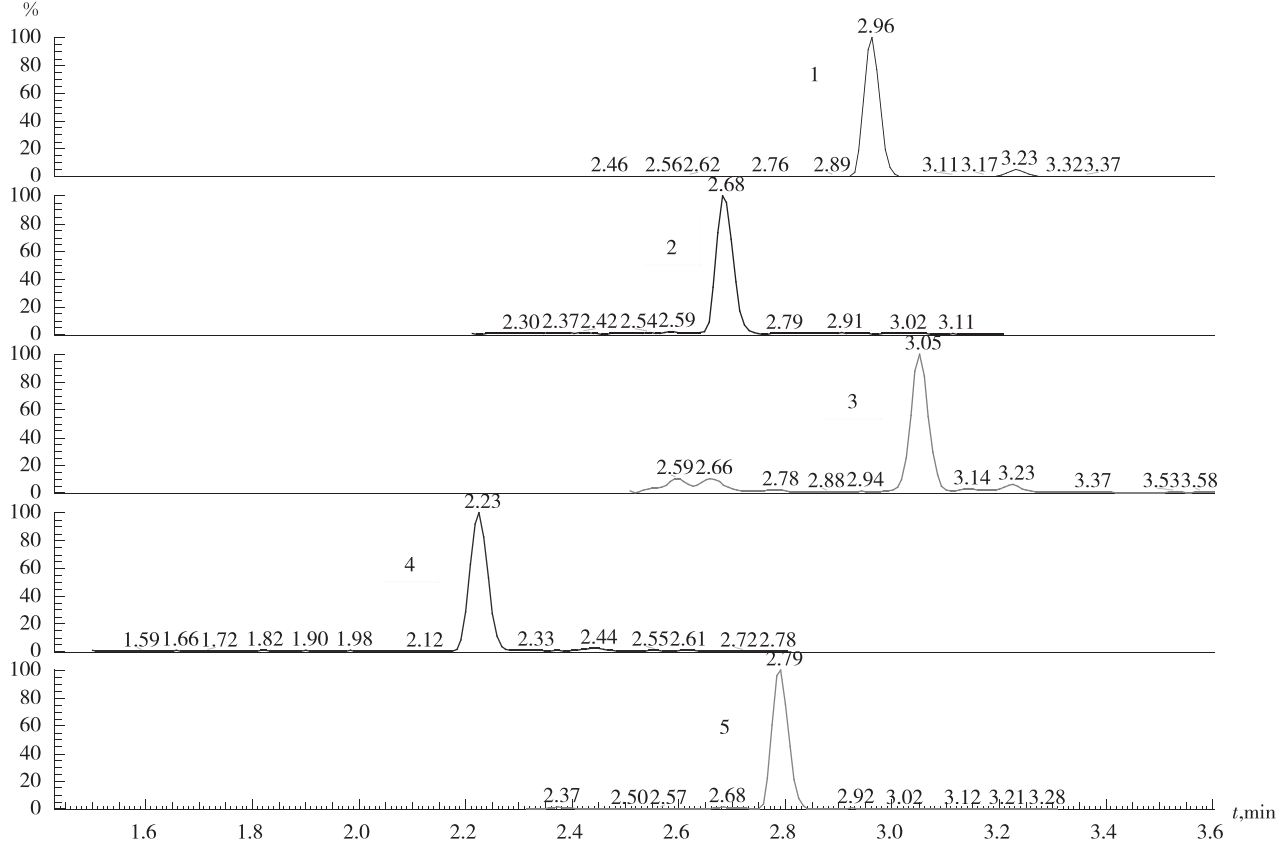
10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A
(资料性)

猪肝基质匹配标准溶液特征离子色谱图

猪肝基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1。



标序号说明：

- 1——阿托品特征离子质量色谱图(290.27>124.15)；
- 2——东莨菪碱特征离子质量色谱图(304.24>138.17)；
- 3——利多卡因特征离子质量色谱图(235.24>86.15)；
- 4——普鲁卡因特征离子质量色谱图(237.18>100.22)；
- 5——山莨菪碱特征离子质量色谱图(306.24>140.15)。

图 A.1 猪肝基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图(0.5 ng/mL)