

BJS

食品补充检验方法

BJS 202005

畜肉及内脏中异丙嗪的测定

2020-11-19 发布

国家市场监督管理总局 发布

畜肉及内脏中异丙嗪的测定

1 范围

本方法规定了畜肉及内脏中异丙嗪残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。
本方法适用于猪、牛、羊肌肉组织及内脏中异丙嗪的定性确证和定量测定。

2 原理

用酸化乙腈提取畜类肌肉组织和内脏中的异丙嗪,提取液经涡漩、超声、离心、净化后用液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外,本方法中所用试剂均为分析纯,水应为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

3.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

3.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

3.1.4 无水乙醚($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)。

3.1.5 异丙醇($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)。

3.1.6 乙腈(CH_3CN)。

3.2 试剂的配制

3.2.1 酸化乙腈溶液(0.1+99.9)(体积比):移取甲酸(3.1.3)1 mL,加乙腈(3.1.6)稀释至 1 000 mL,混匀。

3.2.2 甲酸溶液(0.1+99.9)(体积比):移取甲酸(3.1.3)1 mL,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

3.2.3 甲醇甲酸溶液(5+95)(体积比):移取甲醇(3.1.1)5 mL,加甲酸溶液(3.2.2)95 mL,定容 100 mL,混匀。

3.3 标准品

盐酸异丙嗪标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及结构式参见附录 A 中表 A.1,纯度 $\geq 98\%$ 。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取标准品(3.3),折算成异丙嗪 10 mg(精确至 0.000 1 g),置于 25 mL 烧杯中,用适量的甲醇(3.1.1)溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,并用甲醇定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。置 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冰箱中保存,有效期 6 个月。

3.4.2 标准中间液(1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$):移取标准储备液(3.4.1)1.00 mL,置 100 mL 容量瓶中,用甲醇

(3.1.1) 定容,摇匀,配制成质量浓度为 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准中间液。置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

3.4.3 标准工作液(100 ng/mL):移取标准中间液(3.4.2)10.00 mL,置 100 mL 容量瓶中,用甲醇

(3.1.1) 定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 ng/mL 标准工作液。置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

3.5 材料

3.5.1 SPE 小柱:Oasis HLB 柱,60 mg/3 mL,或性能相当者。

3.5.2 滤器:0.22 μm 滤膜。

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 超声波清洗器。

4.3 高速冷冻离心机:转速 $\geq 10\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

4.4 旋转蒸发器。

4.5 固相萃取装置。

4.6 涡漩混合器。

4.7 氮气吹干仪。

4.8 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

4.9 组织研磨仪。

5 测定步骤

5.1 试样的制备与保存

取供试肌肉或内脏组织,研磨、混匀得到试样, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

5.2 试样的处理

5.2.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入酸化乙腈溶液(3.2.1)10 mL,加盖后涡漩 2 min,超声提取 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下 10 000 r/min 离心 5 min,上清液倒入鸡心瓶中。残渣中再加入酸化乙腈溶液(3.2.1)10 mL,重复提取一次,合并上清液,加 5 mL 异丙醇(3.1.5)于鸡心瓶中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压旋蒸至近干,加 5 mL 水复溶,3 mL 无水乙醚(3.1.4),除脂,涡漩,弃去上层有机溶液,待净化。

5.2.2 净化

净化柱使用前依次用 3 mL 甲醇(3.1.1)和 3 mL 水活化,保持柱体湿润。取 2.5 mL 上述待净化溶液于 SPE 小柱(3.5.1)中,流速控制在 1 mL/min 内,用 3 mL 水淋洗小柱,弃去全部流出液,最后用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液。洗脱液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下氮气吹至干,加入甲醇甲酸溶液(3.2.3)1.00 mL,涡漩 0.5 min,过 0.22 μm 滤膜,供测定。

5.3 标准工作溶液的制备

称取阴性试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,分别吸取异丙嗪标准工作液(3.4.3)10.0 μL 、20.0 μL 、40.0 μL 、100 μL 、200 μL 、400 μL 于对应离心管中,按 5.2 步骤处理试样,使其上机浓度为 0.500 ng/mL 、1.00 ng/mL 、2.00 ng/mL 、5.00 ng/mL 、10.0 ng/mL 、20.0 ng/mL ,供液相色谱-串联质谱

测定。

注：可根据仪器的灵敏度及样品中待测物的实际含量确定标准系列溶液中异丙嗪的质量浓度。

5.4 液相色谱-串联质谱测定

5.4.1 液相色谱参考条件：

- 色谱柱： C_{18} 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μ m), 或性能相当者。
- 流动相：A: 甲酸溶液(3.2.2), B: 乙腈(3.1.2), 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
0.5	90	10
2.3	20	80
3.0	20	80
3.1	90	10
4.0	90	10

- 柱温：30 $^{\circ}$ C。
- 流速：0.4 mL/min。
- 进样量：5 μ L。

5.4.2 质谱参考条件：

- 扫描方式：正离子扫描。
- 采集方式：多反应离子监测(MRM)。
- 电离电压：3.5 kV。
- 辅助气温度：350 $^{\circ}$ C。
- 鞘气温度：300 $^{\circ}$ C。
- 干燥气流量：7 L/min。
- 离子源：ESI。
- 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 待测物质的定性离子、定量离子和碰撞能量

中文名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/eV	碎裂电压/V
异丙嗪	285.1	198.0 ^a	33	88
异丙嗪	285.1	240.0	12	88

^a 为定量离子。

5.5 标准曲线的制作

将标准工作溶液(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。

5.6 试样分析

将试样溶液(5.2),按仪器参考条件(5.4)进行测定,得到相应的样品溶液的保留时间及色谱峰面积。

5.6.1 定性测定

试样中异丙嗪峰保留时间与标准工作液中异丙嗪峰保留时间偏差在±2.5%之内;试样中所选择的监测离子对的相对离子丰度与浓度相当标准工作溶液的相对离子丰度一致,相对离子丰度(k)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/%	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
允许的最大偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

5.6.2 定量测定

根据标准曲线得到试样测定溶液中待测组分的浓度,平行测定次数不少于两次;试样待测液响应值均在仪器测定的线性范围内。异丙嗪标准品多反应监测(MRM)色谱图参见附录B中图B.1。

5.7 空白试验

除不加试样外,均按上述步骤操作。

6 结果计算

试样中被测目标物以质量分数 w 计,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按公式(1)计算。

$$w = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

ρ ——试样测定溶液中待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的取样量,单位为克(g);

f ——样品的稀释倍数。

计算结果需扣除空白值,测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留3位有效数字。

7 检测方法灵敏度、准确度、精密度

7.1 灵敏度

本方法在畜肉及内脏中的检出限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$;定量限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

7.2 准确度

本方法在 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加水平上的回收率范围为 $76.5\% \sim 116.4\%$ 。

7.3 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 20%。

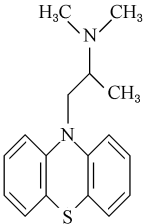
附 录 A

(资料性)

化合物中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量、结构式

盐酸异丙嗪标准品的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量及结构式见表 A.1。

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、结构式

序号	中文名称	英文名称	CAS号	分子式	相对分子质量	结构式
1	盐酸异丙嗪	Promethazine hydrochloride	58-33-3	$C_{17}H_{20}N_2S \cdot HCl$	320.89	 HCl

附录 B

(资料性)

异丙嗪标准品多反应监测(MRM)色谱图

异丙嗪标准品多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

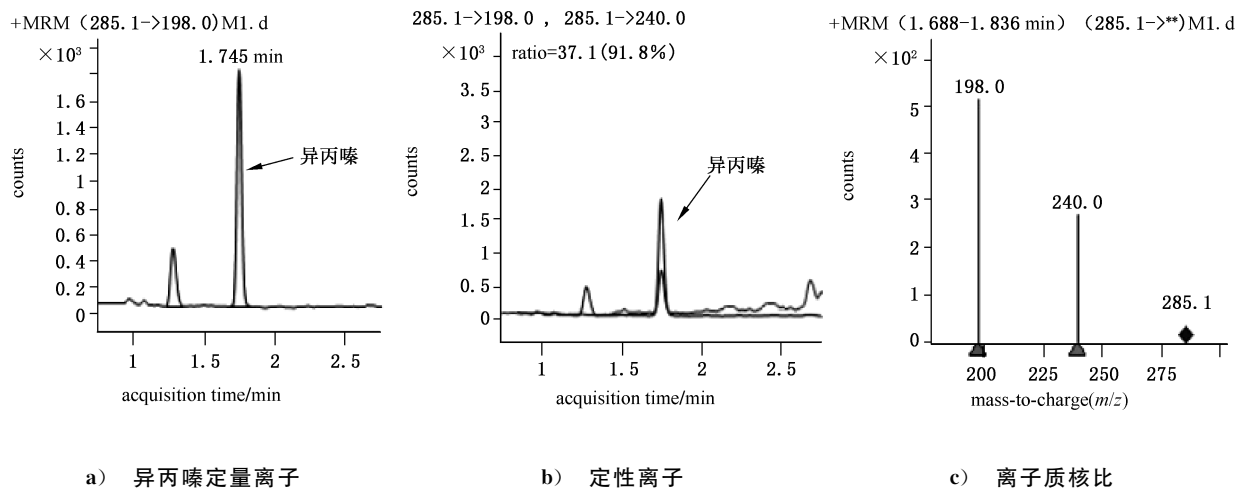


图 B.1 异丙嗪标准品多反应监测(MRM)色谱图

本方法负责起草单位:中国肉类食品综合研究中心。

本方法参与验证单位:中国检验检疫科学研究院综合测试中心、北京市食品安全监控和风险评估中心、成都市食品药品检验研究院、河北省食品检验研究院、中国食品药品检定研究院。

本方法主要起草人:王守伟、郭文萍、李莹莹、赵文涛、李志刚、周婷、杨红梅、李绍波、范素芳、宁霄。