

中华人民共和国国家标准

GB/T 22993—2008

牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of eight tranquillizers residues
in bovine milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：宋文斌、李一尘、李军、隋凯、董振霖、李百舸、王旭、赵守成、庞国芳。

牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中乙酰丙嗪(cetopromazine)、氯丙嗪(chlorpromazin)、氟哌啶醇(haloperidol)、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪(propionylpromazine)、甲苯噻嗪(xylazine)、阿扎哌隆(azaperone)及其代谢物阿扎哌醇(azaperol)和 β -阻断剂卡唑心安(carazolol)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、卡唑心安残留量的测定。

本标准方法检出限:牛奶中乙酰丙嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、卡唑心安均为 $0.5 \mu\text{g/L}$,甲苯噻嗪为 $0.25 \mu\text{g/L}$,阿扎哌隆为 $0.2 \mu\text{g/L}$,阿扎哌醇为 $0.15 \mu\text{g/L}$,氟哌啶醇为 $0.1 \mu\text{g/L}$,奶粉中乙酰丙嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、卡唑心安均为 $4.0 \mu\text{g/kg}$,甲苯噻嗪为 $2.0 \mu\text{g/kg}$,阿扎哌隆为 $1.6 \mu\text{g/kg}$,阿扎哌醇为 $1.2 \mu\text{g/kg}$,氟哌啶醇为 $0.8 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

样品在碱性条件下用特丁基甲醚提取,提取液用磷酸盐缓冲液调成酸性,弃去有机相,水相再调成碱性用特丁基甲醚净反萃后浓缩定容,进行液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 无水乙醇:色谱纯。

4.4 盐酸:优级纯。

4.5 特丁基甲醚。

4.6 氢氧化钠。

4.7 氢氧化钠溶液: 5 mol/L 。称取 50.0 g 氢氧化钠(4.6)用水溶解,定容到 250 mL 。

4.8 磷酸二氢钾。

4.9 磷酸二氢钾溶液: 1 mol/L , $\text{pH}=3.0$,称取 68.045 g 磷酸二氢钾(4.8)用水溶解,用盐酸(4.4)将

溶液的 pH 值调至 3.0,定容到 500 mL。

4.10 甲酸铵。

4.11 甲酸:色谱纯。

4.12 甲酸铵缓冲液:0.1 mol/L, pH=4.0,称取 6.306 g 甲酸铵(4.10)用水溶解,用甲酸(4.11)将 pH 值调至 4.0,定容至 1 000 mL。

4.13 甲酸铵缓冲液:0.01 mol/L, pH=4.0,取甲酸铵缓冲液(4.12)100 mL 用水稀释定容到 1 000 mL。

4.14 流动相 A:0.01 mol/L 甲酸铵缓冲液, pH=4.0(4.13),通过 0.2 μm 过滤器过滤。

4.15 流动相 B:乙腈(4.1)通过 0.2 μm 过滤器过滤。

4.16 流动相 C:甲醇(4.2)通过 0.2 μm 过滤器过滤。

4.17 混合流动相:将 70 mL 流动相 A,15 mL 流动相 B 以及 15 mL 流动相 C 混合。

4.18 镇定剂及其代谢物和 β-阻断剂的标准物质:乙酰丙嗪·马来酸,纯度大于等于 99%;阿扎哌隆,纯度大于等于 99%;咪唑心安,纯度:99%;氯丙嗪·盐酸,纯度:99%;氟哌啶醇,纯度大于等于 99%;丙酰二甲氨基丙吩噻嗪·盐酸,纯度:98%;甲苯噻嗪·盐酸,纯度:99%;阿扎哌醇,浓度 10.0 μg/mL (甲醇)。

4.19 八种镇定剂标准储备溶液

4.19.1 乙酰丙嗪、阿扎哌隆、咪唑心安、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪标准储备溶液:0.10 mg/mL。称取适量的上述标准物质(4.18),分别用无水乙醇(4.3),配成 0.10 mg/mL 的标准储备液。储备液避光在 2 °C~4 °C 条件下贮存。每年配制一次。

4.19.2 阿扎哌醇标准储备溶液:1.0 μg/mL。准确移取 1.0 mL 阿扎哌醇标准液(4.18)于 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇(4.3)定容至刻度,混匀,配成 1.0 μg/mL 的标准储备液。储备液避光在 2 °C~4 °C 条件下贮存。每年配制一次。

4.20 八种镇定剂混合标准储备溶液:量取适量的 6 种镇定剂及其代谢物标准储备溶液(4.19.1 和 4.19.2),用乙腈配制成混合标准储备溶液。在 2 °C~4 °C 条件下贮存。

4.21 八种镇定剂混合标准工作溶液:根据每种镇定剂及其代谢物的灵敏度和仪器线性范围用空白样品提取液配成不同浓度的混合标准工作溶液。在 2 °C~4 °C 条件下避光贮存。

注:称取标准物的质量是按纯度和含盐量修正过的质量。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪:配有电喷雾的离子源。

5.2 电子天平:感量 0.1 mg 和 0.1 g。

5.3 离心机:最大转速为 10 000 r/min。

5.4 离心管:锥形底玻璃离心管,15 mL 和 10 mL 具塞;锥形底聚丙烯离心管,50 mL,具螺旋盖。

5.5 过滤器:聚四氟乙烯过滤器,0.2 μm×13 mm;尼龙薄膜过滤器,0.2 μm×47 mm。

5.6 液体分配器:1 mL~10 mL 和 5 mL~50 mL。

5.7 微量移吸器:10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL。

5.8 流动相过滤装置。

5.9 氮气浓缩仪。

5.10 高速涡流混合器。

5.11 振荡器。

5.12 一次性移液管。

5.13 酸度计:测量精度为±0.02。

5.14 超声波仪。

5.15 一次性注射器:1 mL。

5.16 试样瓶:2.0 mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将牛奶和奶粉样品分别混合均匀。各自分出 0.5 kg 作为试样,将分出的试样密封,并打上标记。

6.2 试样保存

将试样置于 4 °C 条件下贮存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶样品

称取牛奶试样 2.00 mL 精确到 0.01 mL,放入 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 200 μ L 乙腈进行涡流混合,混合后加入 400 μ L 5 mol/L 氢氧化钠溶液,并进行涡流混合 30 s。在 80 °C \pm 5 °C 水浴中放置 1 h。在此期间,要对每个测定样品进行两次涡流混合。1 h 后,将样品从水浴中取出并冷却至室温。加入 12 mL 特丁基甲醚,置于振荡器上高速振荡 15 min,离心 15 min(转速为 5 000 r/min)。吸出上清液,将特丁基甲醚定量转移到干净的 15 mL 的玻璃离心管内,待净化。

7.1.2 奶粉样品

称取奶粉样品 0.25 g(精确到 0.01 g),放入 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 1.75 g 水超声溶解得到复原乳,加入 200 μ L 乙腈,以下步骤同 7.1.1。

7.2 净化

在上述 15 mL 离心管中加入 1 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH=3.0)3 mL,振荡 10 min,离心 10 min(5 000 r/min)。将特丁基甲醚层吸出弃去。在磷酸盐溶液中加入 2 mL 特丁基甲醚,振荡 5 min,离心 5 min(5 000 r/min),吸出特丁基甲醚层弃去。然后再在磷酸盐缓冲溶液中加入 2 mL 特丁基甲醚重复上述步骤。加入 1 mL 5 mol/L 氢氧化钠溶液摇匀后加入 10 mL 特丁基甲醚,振荡 15 min,离心 5 min(5 000 r/min)。定量吸取特丁基甲醚转移到一个干净的 10 mL 的离心管中。在 40 °C 条件下用氮吹仪蒸发至干。在浓缩至干的提取物中加入 1 000 μ L 流动相溶液(4.17),进行涡流混合,超声处理 10 min。用 0.2 μ m \times 13 mm 的聚四氟乙烯注射式过滤器过滤样液,将样液转移到试样瓶中,供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:Inertsil ODS-3,5 μ m,150 mm \times 2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温:35 °C;
- 进样量:20 μ L;
- 色谱柱总流量:200 μ L/min;
- 流动相及梯度见表 1。

表 1 流动相及梯度

步 骤	运行时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	0.00	70	15	15
1	4.00	70	15	15
2	9.00	40	15	45

表 1 (续)

步 骤	运行时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
3	25.00	35	15	50
4	28.00	20	30	50
5	30.00	70	15	15
6	60.00	70	15	15

7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应检测(MRM);
- d) 电喷雾电压(IS):5 000 V;
- e) 雾化气压力(CAS1):482.6 kPa;
- f) 气帘气压力(CUR):68.9 kPa;
- g) 辅助气压力(CAS2):482.6kPa;
- h) 离子源温度(TEM):700 °C;
- i) 接口加热(ihe):ON;
- j) 定性离子对、定量离子对、采集时间(Dwell)、去簇电压(DP)、碰撞气能量(CE)、入口电压(EP)及碰撞室出口电压(CXP)见表 2。

表 2 八种镇定剂的质谱参数

化合物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	采集时间/ ms	去簇电压/ V	碰撞气 能量/V	入口电压/ V	出口电压/ V
乙酰丙嗪 acetopromazine	327.40/58.20	327.40/58.20	200	61.00	68.00	5.00	10.00
	327.40/86.20	327.40/86.20	200	61.00	68.00	5.00	15.60
氯丙嗪 chlorpromazine	319.30/58.20	319.30/58.20	200	60.00	66.00	10.00	10.00
	319.30/86.20	319.30/86.20	200	60.00	30.00	10.00	7.00
氟哌啶醇 haloperidol	376.40/165.40	376.40/165.40	200	70.00	35.00	11.00	11.00
	376.40/122.90	376.40/122.90	200	70.00	57.00	11.00	11.00
丙酰二甲氨 propionylpromazine	341.20/58.20	341.20/58.20	200	64.00	59.80	10.60	9.70
	341.20/86.30	341.20/86.30	200	64.00	30.00	10.60	15.00
甲苯噻嗪 xylazine	221.30/90.10	221.30/90.10	200	85.00	33.00	11.00	8.00
	221.30/164.40	221.30/164.40	200	85.00	38.00	11.00	13.00
阿扎哌隆 azaperone	328.40/121.00	328.40/121.00	200	60.00	30.00	11.00	10.00
	328.4/147.10	328.4/147.10	200	60.00	30.00	11.00	10.00
阿扎哌醇 azaperol	330.30/121.00	330.30/121.00	200	60.00	35.00	11.00	12.00
	330.30/149.10	330.30/149.10	200	60.00	40.00	11.00	12.00
	330.30/312.20	330.30/312.20	200	60.00	25.00	11.00	10.00
咪唑心安 carazolol	299.50/116.20	299.50/116.20	200	83.00	30.00	11.00	11.00
	299.50/222.40	299.50/222.40	200	83.00	30.00	11.00	6.00

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

按照液相色谱-串联质谱测定条件进行样品溶液测定。如果检出的色谱峰的保留时间与基质标准中物质相一致,并且所选择的离子均出现,选择1个母离子和2个以上子离子,样品谱图中定性离子的相对丰度与浓度接近的基质标准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

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	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.3.2 定量测定

用混合标准溶液(4.21)分别进样,以峰面积为纵坐标,工作溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中镇定剂及其代谢产物和 β -阻断剂的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述的色谱条件和质谱条件下,八种镇定剂的参考保留时间见表4。八种镇定剂的标准物质总离子流图参见附录A中的图A.1。八种镇定剂的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录B中的表B.1、表B.2。

表4 八种镇定剂参考保留时间

化合物名称	保留时间/min	化合物名称	保留时间/min
甲苯噻嗪	5.12	氟哌啶醇	15.90
阿扎哌醇	9.21	乙酰丙嗪	16.56
咪唑心安	11.38	丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	18.84
阿扎哌隆	13.01	氯丙嗪	19.74

7.4 平行试验

按照以上步骤,对同一试样进行平行试验。

7.5 回收率试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中每种镇定剂及其代谢物和 β -阻断剂残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X ——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- c ——从标准曲线上得到被测组分溶液的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性限和再现性限的值是以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,牛奶和奶粉中六种镇定剂及其代谢物的添加浓度范围及重复性方程见表 5。

表 5 牛奶和奶粉中八种镇定剂的添加浓度范围及重复性限
和再现性限方程

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
乙酰丙嗪	0.50~4.00	$\lg r=0.749 \lg m-1.113$	$\lg R=0.662 \lg m+0.436$
氯丙嗪	0.50~4.00	$\lg r=0.597 1 \lg m-1.066 3$	$\lg R=0.768 2 \lg m+0.435 5$
氟哌啶醇	0.10~0.80	$\lg r=0.971 53 \lg m-1.393 65$	$\lg R=0.922 56 \lg m+0.447 11$
丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	0.50~4.00	$\lg r=1.018 8 \lg m-1.432 3$	$\lg R=1.591 6 \lg m+2.207 5$
甲苯噻嗪	0.25~2.00	$\lg r=2.444 8-3.918 7 \lg m$	$\lg R=3.436 5+6.085 9 \lg m$
阿扎哌隆	0.20~1.60	$\lg r=0.670 6 \lg m-0.109 5$	$\lg R=0.699 7 \lg m+0.354 6$
阿扎哌醇	0.15~1.20	$\lg r=1.034 79 \lg m-1.099 9$	$\lg R=1.106 \lg m-2.131 2$
咪唑心安	0.50~4.00	$\lg r=0.372 6 \lg m-0.630 2$	$\lg R=0.462 2 \lg m+0.440 1$

注： m 为两次测定结果的算术平均值。

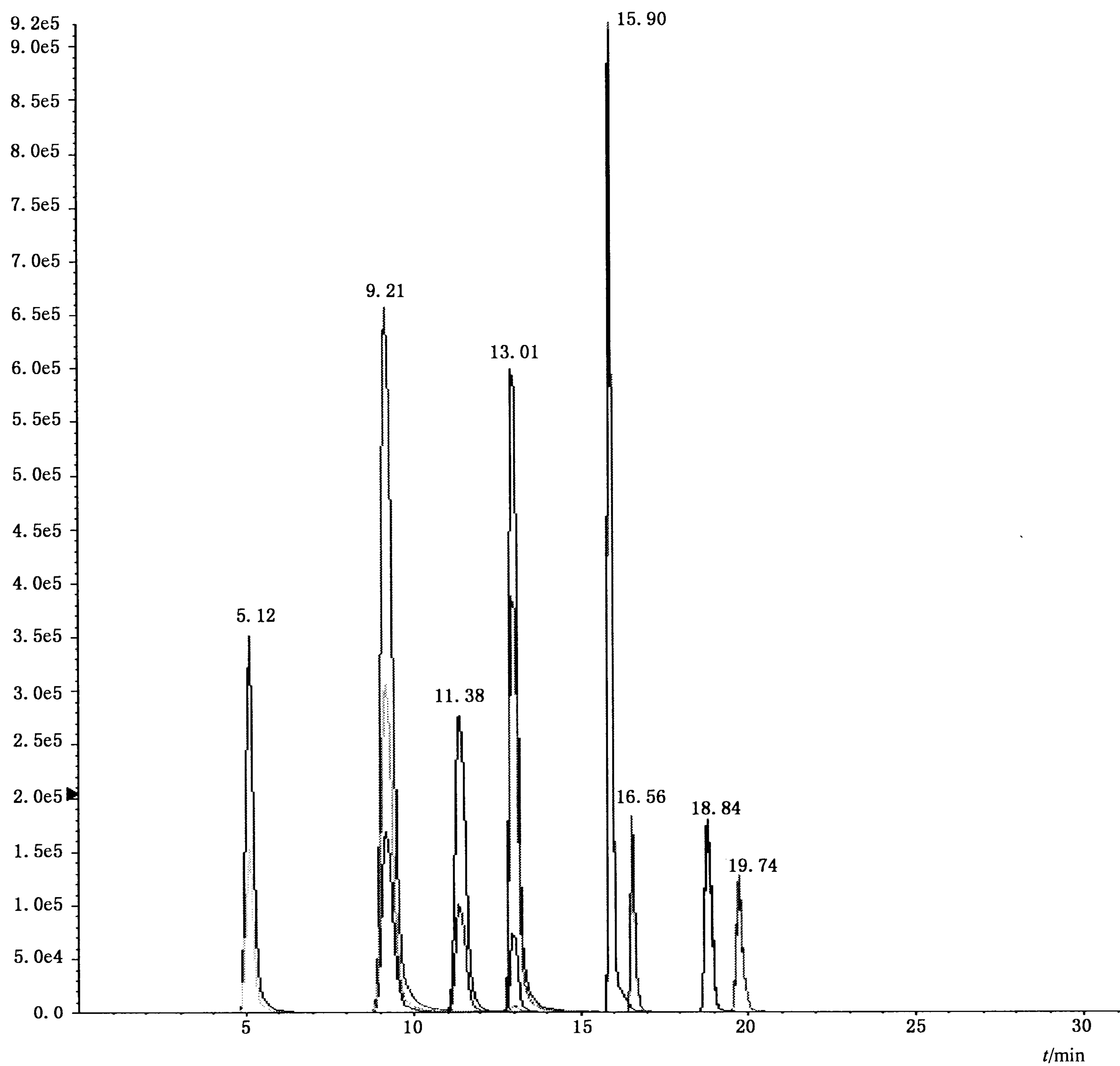
如果差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,牛奶和奶粉中六种镇定剂及其代谢物的添加浓度范围及再现性方程见表 5。

附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图

八种镇定剂标准物质总离子流图,见图 A.1



甲苯噻嗪 5.12 min, 阿扎哌醇 9.21 min, 唑啞心安 11.38 min,
阿扎哌隆 13.01 min, 氟哌啶醇 15.90 min, 乙酰丙嗪 16.56 min,
丙酰二甲氨基丙吩噻嗪 18.84 min, 氯丙嗪 19.74 min

图 A.1 八种镇定剂标准物质总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

八种镇定剂添加浓度及其平均试验数据,见表 B.1、表 B.2。

表 B.1 牛奶中八种镇定剂添加浓度及其平均试验数据

化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	平均回收率/%
乙酰丙嗪	0.50	88.10
	1.00	89.20
	2.00	89.93
	4.00	91.94
氯丙嗪	0.50	89.61
	1.00	86.29
	2.00	89.39
	4.00	90.29
氟哌啶醇	0.10	87.60
	0.20	89.28
	0.40	86.90
	0.80	90.72
丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	0.50	88.52
	1.00	91.39
	2.00	92.37
	4.00	90.38
甲苯噻嗪	0.25	89.90
	0.50	91.38
	1.00	92.12
	2.00	90.59
阿扎哌隆	0.20	89.35
	0.400	88.15
	0.80	90.07
	1.60	90.26
阿扎哌醇	0.15	91.44
	0.30	91.45
	0.60	87.11
	1.20	87.42
咪唑心安	0.50	89.72
	1.00	88.58
	2.00	92.49
	4.00	90.39

表 B.2 奶粉中八种镇定剂添加浓度及其平均回收率试验数据

化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
乙酰丙嗪	4.0	92.85
	8.0	91.68
	12.0	90.30
	16.0	94.13
氯丙嗪	4.0	90.71
	8.0	83.68
	12.0	84.11
	16.0	88.61
氟哌啶醇	0.8	88.79
	1.6	93.52
	2.4	88.02
	3.2	87.91
丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	4.0	92.18
	8.0	90.41
	12.0	87.24
	16.0	87.54
甲苯噻嗪	2.0	90.62
	4.0	86.98
	6.0	87.52
	8.0	81.59
阿扎哌隆	1.6	90.80
	3.2	85.89
	4.8	86.05
	6.4	94.65
阿扎哌醇	1.2	85.15
	2.4	89.98
	3.6	93.36
	4.8	97.45
咪唑心安	4.0	92.87
	8.0	91.00
	12.0	88.04
	16.0	91.72