

ICS 67.120
B 40



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准

动物性食品中氮哌酮及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of residues of azaperone and its metabolite in animal derived foods by

liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

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 发布

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 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

动物性食品中氮哌酮及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中氮哌酮及其代谢物氮哌醇残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中氮哌酮及其代谢物氮哌醇残留量的测定。

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

试样中残留的氮哌酮和氮哌醇，经氨化乙腈提取，饱和氯化钠水溶液净化，正己烷除脂，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

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 正己烷。

5.1.5 浓氨水：25%~28%。

5.1.6 氯化钠。

5.2 溶液配制

5.2.1 1%氯化乙腈溶液：取 1 mL 浓氨水，加乙腈稀释至 100 mL，混匀。

5.2.2 2%甲酸水溶液：取 2 mL 甲酸，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.2.3 0.1%甲酸水溶液：取 1 mL 甲酸，加水稀释至 1000 mL，混匀。

5.3 标准品

氮哌酮 (Azaperone, $C_{19}H_{22}FN_3O$, CAS: 1649-18-9)、氮哌醇 (Azaperol, $C_{19}H_{24}FN_3O$, CAS: 2804-05-9)、氮哌酮-D4 (Azaperone-D4, $C_{19}H_{18}D_4FN_3O$)、氮哌醇-D4 (Azaperol-D4, $C_{19}H_{20}D_4FN_3O$) 对照品，所有标准品含量均 $\geq 99\%$ 。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液：取氮哌酮和氮哌醇标准品各约 10 mg，精密称定，用甲醇稀释并定容于 10 mL 容量瓶中，配制成浓度约为 1 mg/mL 的标准储备溶液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.2 内标储备溶液：取氮哌酮-D4 和氮哌醇-D4 标准品各约 10 mg，精密称定，用甲醇稀释并定容于 100 mL 容量瓶中，配制成浓度约为 100 mg/L 的内标储备溶液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准工作溶液：准确移取氮哌酮和氮哌醇标准储备溶液各 1 mL，用甲醇稀释并定容于 100 mL 容量瓶中，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 1 个月。

5.4.4 混合内标工作溶液：准确移取氮哌酮-D4 和氮哌醇-D4 内标储备溶液各 0.2 mL 用甲醇稀释并定容于 100 mL 容量瓶中，配制成浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合内标工作溶液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 有机系滤膜：孔径为 0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源 (ESI)。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 氮吹仪。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 恒温水浴振荡器。

6.6 旋涡混合器。

6.7 高速离心机：转速不低于 8 000 r/min。

6.8 组织匀浆机。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试样品，并使均质。

a) 取均质后的供试样品，作为供试试样。

b) 取均质后的空白样品，作为空白试样。

c) 取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 °C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 肌肉、肝脏和肾脏的提取

称取试料 (5 ± 0.05) g，置于 50 mL 离心管中，加入 50 μ L 混合内标工作液和 10 mL 1% 氨化乙腈溶液，涡旋混合 1 min，超声 10 min，8 000 r/min 离心 5 min，转移上清液至另一个 50 mL 离心管，残渣再用 10 mL 1% 氨化乙腈溶液重新提取一次，合并上清液，备用。

8.2 脂肪的提取

称取试料 (5 ± 0.05) g 置于 50 mL 离心管中，加入 50 μ L 混合内标工作液和 10 mL 1% 氨化乙腈溶液，放置于 55 °C 水浴振荡 30 min，每隔 6 min 手摇 10 s，8 000 r/min 离心 5 min，转移上清液至另一个 50 mL 离心管，残渣再用 10 mL 1% 氨化乙腈溶液重新提取一次，合并上清液，备用。

8.3 净化

在上清液中加入 10 mL 水和 4 g NaCl，涡旋混合 1 min，振荡 10 min，4 500 r/min 离心 5 min，转移 4.0 mL 上层有机相至另一个 15 mL 离心管，于 40 °C 下氮气吹干。残渣加入 1.0 mL 2% 甲酸水溶液和 2 mL 正己烷，超声 1 min，涡旋混合 1 min，4 500 r/min 离心 5 min，弃去上层有机相，下层溶液过 0.22 μ m 滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.4 标准工作曲线的制备

精密量取适量混合标准工作溶液及混合内标工作溶液，用 2% 甲酸水溶液稀释配制成浓度为 1.0 μ g/L、5.0 μ g/L、10.0 μ g/L、50.0 μ g/L、100.0 μ g/L、200.0 μ g/L 的系列标准工作液，

同位素内标工作溶液浓度均为 2.0 $\mu\text{g/L}$ ，供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物与同位素内标物的特征离子质量色谱图面积比值为纵坐标，对应浓度为横坐标绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

8.5 测定

8.5.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱： C_{18} 柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.7 μm ，或相当者；
- 进样量：5.0 μL ；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 流动相：A为0.1%甲酸水溶液；B为 甲醇，梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间, min	0.1%甲酸水溶液, %	甲醇, %
0.0	90	10
3.5	40	60
4.0	0	100
4.5	90	10
6.0	90	10

8.5.2 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、离子源温度、脱溶剂温度和氮气流速等参数应优化至最优灵敏度；
- 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表2。

表2 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物名称	定性离子对及碰撞能量(eV)	定量离子对及碰撞能量(eV)
氮哌酮	328.2/122.9 (35) 328.2/165 (20)	328.2/165 (20)
氮哌醇	330.1/121.1 (30) 330.1/312 (15)	330.1/312 (15)
氮哌酮-D4	331.9/169 (20)	331.9/169 (20)

	331.9/121 (20)	
氮派醇-D4	334.1/121 (30)	334.1/121 (30)
	334.1/316.5 (15)	

8.5.3 测定法

8.5.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试样溶液中待测物与其内标物的保留时间之比与标准溶液中待测物与其内标物的保留时间之比偏差在1%以内;且检测到的相对离子丰度,应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致,其允许偏差为±40%。

8.5.3.2 定量测定

按8.5.1和8.5.2设定的仪器条件,以待测物标准溶液浓度为横坐标,待测物与同位素内标物的特征离子质量色谱图面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,作单点或多点校准,按内标法计算试样中待测物的残留量,标准溶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,待测物及其同位素内标溶液的特征离子质量色谱图参见附录A。

8.6 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测物的残留量按标准曲线或公式(1)计算:

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V_3 \times V_1}{A'_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m \times V_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——供试试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_{is} ——试样溶液中同位素内标物浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_s ——标准溶液中被测物浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C'_{is} ——标准溶液中同位素内标物浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A_i ——试样溶液中被测物峰面积;

A_{is} ——试样溶液中同位素内标峰面积;

A_s ——标准溶液中被测物峰面积；

A'_{is} ——标准溶液中同位素内标物峰面积；

c ——试样溶液中被测物浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

V_1 ——提取溶剂总体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——吸取出用于检测提取溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——样品溶液定容体积，单位为毫升 (mL)；

m ——供试试样的质量，单位为克 (g)。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、牛的肌肉、脂肪、肾脏和肝脏组织中氮哌酮和氮哌醇的检出限均为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ，定量限均为 $5.0 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在猪、牛的肌肉、脂肪、肾脏和肝脏组织中氮哌酮和氮哌醇在 $5.0 \mu\text{g/kg} \sim 100.0 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平的回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性附录)

标准溶液特征离子质量色谱图

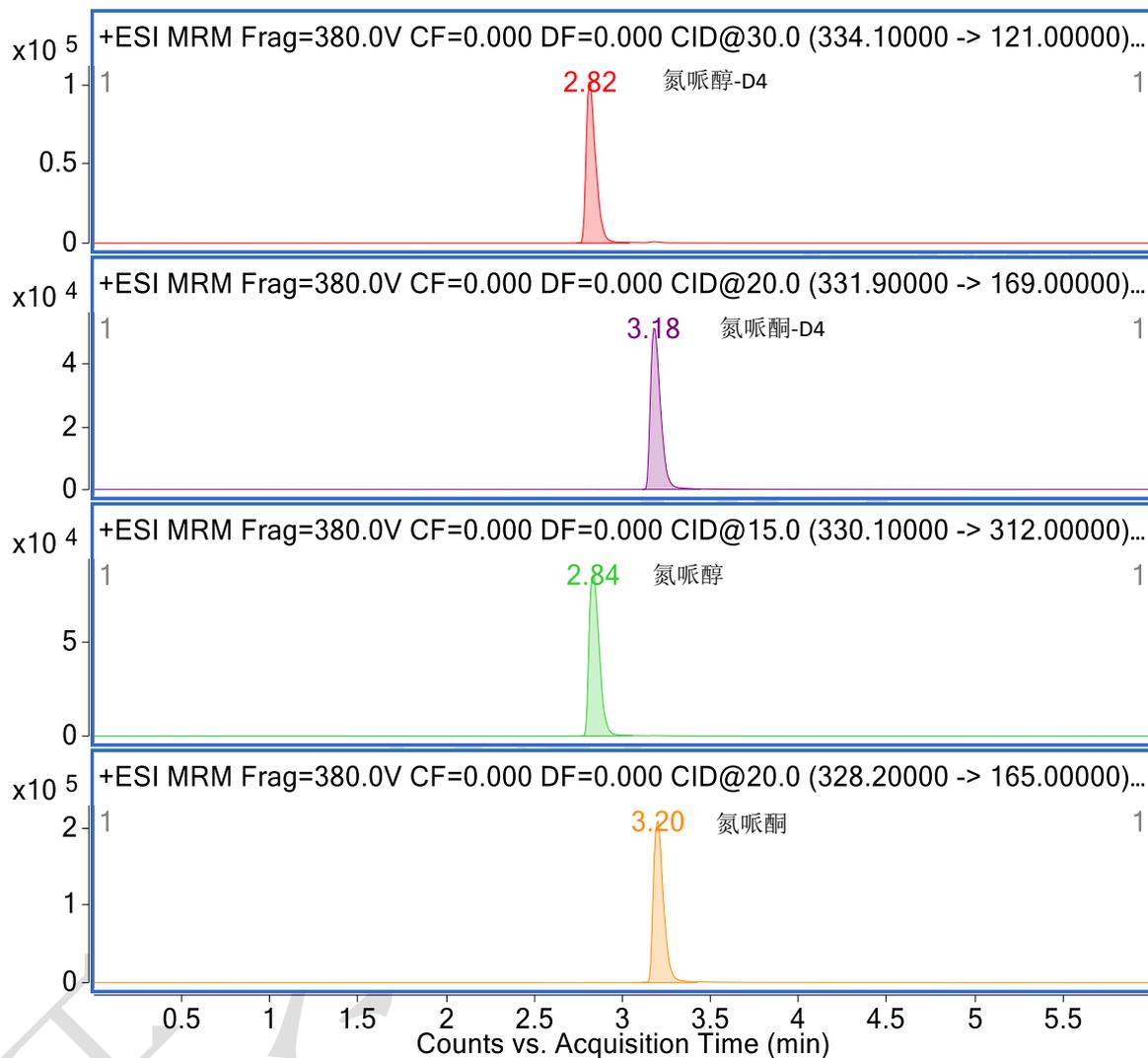


图 A1 混合标准溶液特征离子质量色谱图

(氮派酮和氮派醇浓度均为 5.0 $\mu\text{g/L}$, 氘代内标浓度均为 2.0 $\mu\text{g/L}$)

征求意见稿