

附件 2

畜肉中阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因的测定

BJS 201711

1 范围

本方法规定了畜肉中阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于畜类肌肉组织中阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因的定性确证和定量测定。

2 原理

用磷酸盐缓冲溶液提取畜类肌肉组织中阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因，提取液经离心、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

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯，水应为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

3.1.2 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。

3.1.3 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

3.1.4 乙酸 (CH₃COOH)：色谱纯。

3.1.5 正己烷 (C₆H₁₄)：色谱纯。

3.1.6 氢氧化钠 (NaOH)。

3.1.7 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)。

3.1.8 氨水 (NH₃·H₂O)。

3.2 试剂的配制

3.2.1 氢氧化钠溶液 (200 g/L)：称取氢氧化钠 (3.1.6) 20g，加适量的水溶解，冷却后加水稀释至 100 mL，混匀。

3.2.2 磷酸二氢钾缓冲溶液 (0.1mol/L)：称取磷酸二氢钾 (3.1.7) 13.6g，加水溶解至近 1000 mL，用氢氧化钠溶液 (3.2.1) 调节 pH 至 4.0，加水定容至 1000 mL，混匀。

3.2.3 甲酸溶液 (2 mL/100 mL)：移取甲酸 (3.1.3) 2 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。

3.2.4 氨水甲醇溶液 (2+98)：移取氨水 (3.1.8) 2 mL，加甲醇 (3.1.1) 稀释至 100 mL，混匀。

3.2.5 乙酸溶液 (0.1 mL/100 mL)：移取乙酸 (3.1.4) 1 mL，加水稀释至 1000 mL，混匀。

3.2.6 甲酸溶液 (0.1 mL/100 mL)：移取甲酸 (3.1.3) 1 mL，加水稀释至 1000 mL，混匀。

3.3 标准品

硫酸阿托品、消旋山莨菪碱、氢溴酸东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因标准品的中文名称、英

文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量和折算系数见附录A表A.1，纯度均 $\geq 98\%$ 。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 标准储备液（100 mg/L）：准确称取标准品（3.3），分别折算成含阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、普鲁卡因和利多卡因10 mg（精确至0.0001 g），置于100 mL烧杯中，加适量的甲醇（3.1.1）溶解，并用甲醇转移并定容至刻度，摇匀，配制成浓度为100 mg/L标准储备液。置-18 °C以下冰箱中保存，有效期6个月。

3.4.2 标准中间液（1.00 $\mu\text{g/mL}$ ）：移取标准储备液（3.4.1）1.00 mL，置100 mL容量瓶中，加甲醇（3.1.1）定容至刻度，摇匀，配制成浓度为1.00 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液。置于4°C~8°C保存，有效期3个月。

3.4.3 标准工作溶液：临用现配。

3.5 SPE小柱：Oasis MCX阳离子交换柱，60mg/3mL，或性能相当者。

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 均质器。

4.3 高速冷冻离心机：转速 ≥ 10000 r/min。

4.4 固相萃取装置。

4.5 涡旋混合器。

4.6 超声波清洗器。

4.7 氮气吹干仪。

4.8 电子天平：感量分别为0.01 g和0.0001 g。

4.9 pH计：精度0.01。

5 测定步骤

5.1 试样的制备与保存

取空白或供试肌肉组织，绞碎，并使均质，得空白或试样。

5.2 试样的处理

5.2.1 提取

称取试样5 g（精确至0.01g）于50 mL具塞离心管中，加入磷酸二氢钾缓冲溶液（3.2.2）20 mL，加盖后涡旋2 min，再超声处理15 min，4°C以下10000 r/min离心15min，上清液倒入另一离心管中。残渣中再加入缓冲溶液20 mL，重复提取一次，合并上清液，滤纸过滤，用上述缓冲溶液4 mL洗涤滤纸，收集全部滤液于50 mL容量瓶中，用缓冲溶液定容至50 mL，待净化。

5.2.2 净化

Oasis MCX阳离子交换柱使用前依次用3 mL甲醇（3.1.1）、3 mL水和3 mL甲酸溶液（3.2.3）活化，保持柱体湿润。取待净化液5.00 mL加入SPE小柱（3.5），流速控制在1 mL/min内，依次用3 mL甲酸溶液、3 mL甲醇、3 mL正己烷（3.1.5）淋洗小柱，弃去全部流出液，在65 kpa的负压下，抽干2 min，最后用氨水甲醇溶液（3.2.4）5 mL洗脱，收集洗脱液。洗脱液在40°C以下氮气吹干，加入甲酸溶液（3.2.6）1.00 mL，涡旋0.5 min，过0.22 μm 滤膜，供测定。

5.3 标准工作溶液的制备

称取空白试样5 g（精确至0.01 g）于50 mL具塞离心管中，分别加入标准中间液（3.4.2）适量，

使其浓度为0.500、1.00、2.00、5.00、10.0、50.0 ng/mL，经5.2步骤操作，供测定。

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

a.色谱柱: C₁₈色谱柱(2.1 x 50 mm, 1.8 μm), 或性能相当者。

b.流动相: A: 乙腈(3.1.2), B: 乙酸溶液(3.2.5), 梯度洗脱条件见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	10	90
1.0	10	90
3.0	17	83
3.5	90	10
4.0	10	90
5.0	10	90

c.柱温: 30 °C。

d.流速: 0.4 mL/min。

e.进样量: 5 μL。

5.4.2 质谱参考条件

a.扫描方式: 正离子扫描;

b.采集方式: MRM采集方式;

c.电离电压: 3.0 kV;

d.脱溶剂温度: 450 °C;

e.定性离子对、定量离子和碰撞能量见表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)
阿托品	290	124*; 93	22/30
山莨菪碱	306	140*; 122	25/30
东莨菪碱	304	138*; 156	18/20
普鲁卡因	237	100*; 120	16/30
利多卡因	235	86*; 58	20/40

注: *为定量离子。

5.5 定性测定

按照上述条件测定试样和混合标准工作溶液, 如果试样中的质量色谱峰保留时间与混合标准测定溶液中的某种组分一致(变化范围在±2.5%之内); 试样中定性离子对的相对丰度与浓度相

当混合标准测定溶液的相对丰度一致，相对丰度（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%≥k>20%	20%≥k>10%	k≤10%
允许的最大偏差（%）	± 20	± 25	± 30	± 50

5.6 定量测定

5.6.1 标准曲线的制作

将混合标准测定溶液（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。

5.6.2 试样溶液的测定

将试样溶液（5.2.2），按仪器参考条件（5.4）进行测定，得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到试样测定溶液中待测组分的浓度，平行测定两次；试样待测液响应值若低于标准曲线线性范围，应视为未检出；

标准品多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B 的图 B。

5.7 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤操作。

6 结果计算与表述

试样中各待测组分的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X—试样中各待测组分的残留量，单位为微克每千克（μg/kg）

C—试样测定溶液中各待测组分的浓度，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

本方法在畜肉中的检出限均为0.5 μg/kg。

7.2 准确度

本方法在0.5 μg/kg~5.0 μg/kg的添加水平上的回收率范围为83.2%~100.3%。

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%。

本方法批内相对标准偏差≤20%，批间相对标准偏差≤20%。

附录A

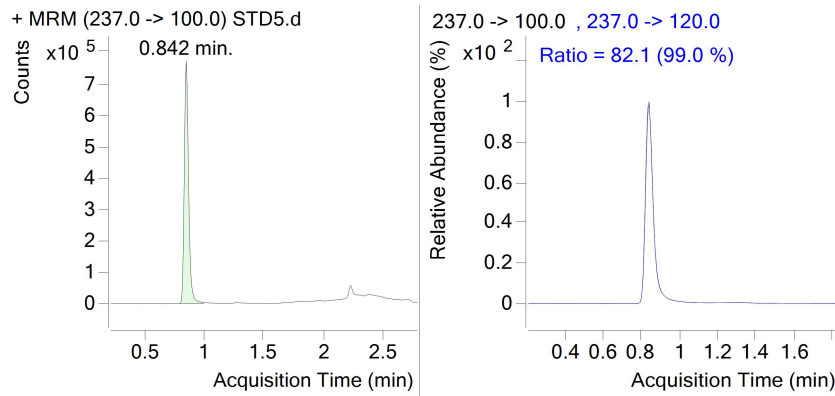
标准品信息

表A.1 标准品的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量和折算系数

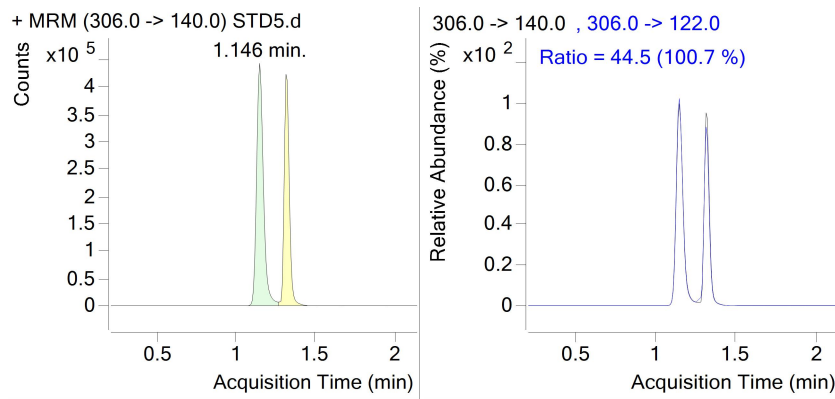
序号	中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分 子量	折算 系数
1	硫酸阿托品	Atropine sulfate	55-48-1	$(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4$	676.82	0.855
2	消旋山莨菪碱	Anisodamine	17659-49-3	$C_{17}H_{23}NO_4$	305.37	1.000
3	氢溴酸东莨菪碱	Scopolamine Hydrobromide	6533-68-2	$C_{17}H_{28}BrNO_7$	438.31	0.692
4	普鲁卡因	Procaine	59-46-1	$C_{13}H_{20}N_2O_2$	236.32	1.000
5	利多卡因	Lidocaine	137-58-6	$C_{14}H_{22}N_2O$	234.34	1.000

附录 B

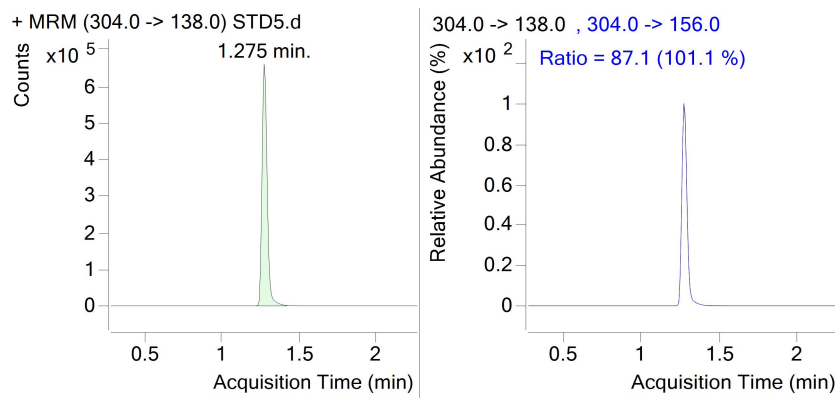
标准品多反应监测 (MRM) 色谱图



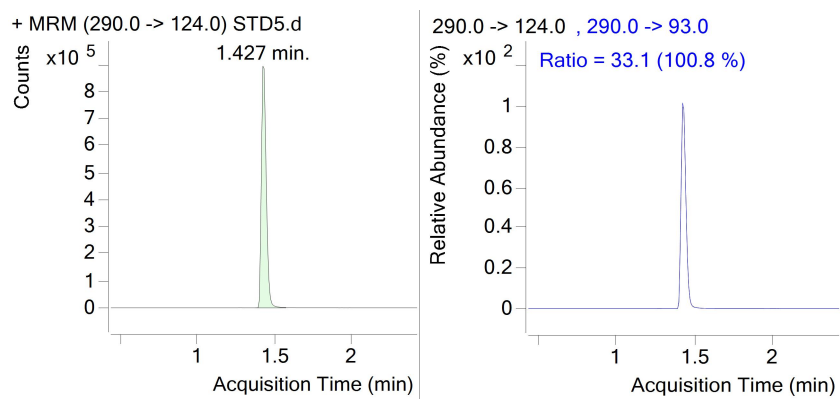
普鲁卡因



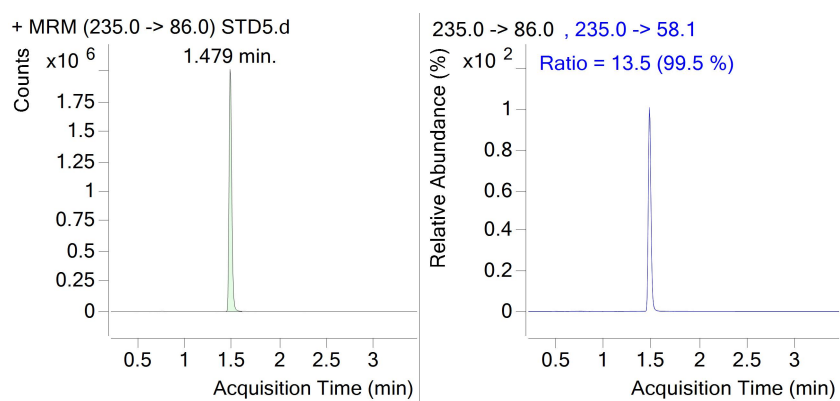
山莨菪碱



东莨菪碱



阿托品



利多卡因

图 B 标准品多反应监测 (MRM) 色谱图

本方法负责起草单位：中国食品药品检定研究院
 本方法的参与验证单位：中国肉类食品综合研究中心、黑龙江食品药品检验检测所、江苏省食品药品监督检验研究院、大连市食品检验所、辽宁省食品检验检测院
 主要起草人：王海燕、郭文萍、姜连阁、颜春荣、胡侠、高广慧