

BJS

食品补充检验方法

BJS 202110

水产品及相关用水中 12 种卡因类麻醉剂 及其代谢物的测定

2021-07-28 发布

国家市场监督管理总局 发布

水产品及相关用水中 12 种卡因类麻醉剂 及其代谢物的测定

1 范围

本方法规定了水产品及相关用水中 9 种麻醉剂及其 3 种代谢物的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于鱼、虾中间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)及其代谢物间氨基苯甲酸、苯佐卡因及其代谢物对氨基苯甲酸和对乙酰氨基苯甲酸、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因的测定。

本方法也适用于养殖和运输用海水或淡水中 MS-222、苯佐卡因、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因的测定。

2 原理

用乙酸钠缓冲溶液提取水产品试样中的卡因类麻醉剂及其代谢物后,离心取上清液经正己烷除脂,固相萃取柱净化,采用高效液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

用 1%甲酸乙腈提取相关用水中的卡因类麻醉剂,提取液经离心、浓缩后,采用高效液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为符合 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 无水硫酸镁(MgSO_4)。

3.1.5 无水乙酸钠(CH_3COONa)。

3.1.6 乙酸(CH_3COOH)。

3.1.7 正己烷(C_6H_{14})。

3.2 试剂配制

3.2.1 0.1%甲酸水溶液:吸取甲酸(3.1.3)1 mL,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

3.2.2 乙酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L):称取无水乙酸钠(3.1.5)8.2 g,加水 900 mL 溶解,用乙酸(3.1.6)调节 pH 值至 5.0,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

3.2.3 5%甲醇水溶液:量取甲醇(3.1.1)5 mL,用水稀释至 100 mL,混匀。

3.2.4 甲醇-乙腈-水(1+3+6,体积比):量取甲醇(3.1.1)10 mL、乙腈(3.1.2)30 mL、水 60 mL,混匀。

3.2.5 1%甲酸乙腈溶液:量取甲酸(3.1.3)10 mL,加乙腈(3.1.2)稀释至 1 000 mL,混匀。

3.3 标准品

MS-222、间氨基苯甲酸、苯佐卡因、对氨基苯甲酸、对乙酰氨基苯甲酸、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因标准品,纯度均 $\geq 90\%$ 。标准品的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量见附录A中表A.1。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 麻醉剂及其代谢物标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取MS-222、间氨基苯甲酸、苯佐卡因、对氨基苯甲酸、对乙酰氨基苯甲酸、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因标准品(3.3)各10 mg(精确至0.01 mg),分别置于50 mL容量瓶中,用甲醇(3.1.1)超声溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度各为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期6个月。

3.4.2 混合标准中间液A:分别准确吸取MS-222、苯佐卡因、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.1)各0.05 mL,及间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、对乙酰氨基苯甲酸标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.1)各0.5 mL,置于同一10 mL容量瓶中,用甲醇-乙腈-水(3.2.4)稀释至刻度,摇匀,制成麻醉剂质量浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和代谢物质量浓度均为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液A。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期1个月。

3.4.3 混合标准中间液B:准确吸取混合标准中间液A(3.4.2)1 mL,置于10 mL容量瓶中,用甲醇-乙腈-水(3.2.4)稀释至刻度,摇匀,制成麻醉剂质量浓度均为100 ng/mL和代谢物质量浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液B。临用现配。

3.4.4 水产品基质混合标准系列工作溶液的制备:准确称取与试样基质相同或相近的空白试样2 g(精确至0.01 g)共7份,吸取混合标准中间液B(3.4.3)0 μL 、20 μL 、40 μL 、100 μL 、200 μL 和混合标准中间液A(3.4.2)40 μL 、100 μL ,分别加入上述空白试样中,按试样同法(6.1)制备,作为水产品基质混合标准系列工作溶液S0、S1~S6。麻醉剂质量浓度依次为0 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL和100 ng/mL,代谢物质量浓度依次为0 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL和1 000 ng/mL,或依需要制备适当浓度的混合标准系列工作溶液。临用现配。

3.4.5 水样混合标准系列工作溶液的制备:吸取混合标准中间液B(3.4.3)0 μL 、20 μL 、40 μL 、100 μL 、200 μL 和混合标准中间液A(3.4.2)40 μL 、100 μL ,分别置于1 mL容量瓶中,用甲醇-乙腈-水(3.2.4)定容至刻度,摇匀,作为水样混合标准系列工作溶液S0、S1~S6。麻醉剂质量浓度依次为0 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL和100 ng/mL,或依需要配制适当浓度的混合标准系列工作溶液。临用现配。

3.5 材料

3.5.1 固相萃取小柱(500 mg,6 mL):HLB柱或性能相当者。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI源)。

4.2 涡漩混合器:转速 $\geq 2\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

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

4.4 离心机:转速 $\geq 4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

4.5 电子天平:感量分别为0.01 mg和0.01 g。

4.6 微量移液器:量程20 μL ~200 μL 和100 μL ~1 000 μL 。

- 4.7 氮吹浓缩仪。
- 4.8 超声波清洗器。
- 4.9 pH计:精度 0.01。
- 4.10 固相萃取装置。
- 4.11 均质器。
- 4.12 真空泵。

5 试样制备与保存

鱼、虾:取适量新鲜或解冻的供试组织绞碎,并使均质,−18℃以下冷冻保存,备用。

水样:取具代表性的样本约 100 mL,充分混匀,−18℃以下冷冻保存,备用。

6 分析步骤

6.1 样品前处理

6.1.1 水产品(鱼、虾)

6.1.1.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 具塞离心管中,加入乙酸钠缓冲溶液(3.2.2)10 mL,涡漩 2 min,振荡提取 10 min,在 4℃下以不低于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液倒入另一离心管中。残渣中再加入乙酸钠缓冲溶液 10 mL,重复提取一次,合并上清液,待净化。

6.1.1.2 净化

待净化液中加入正己烷(3.1.7)10 mL,振摇 30 s,以不低于 4 000 r/min 离心 10 min,弃去上层液,取下层清液,备用。HLB 固相萃取小柱(3.5.1)使用前依次用甲醇(3.1.1)6 mL 和水 6 mL 活化,保持柱体湿润。取全部下层清液上样至已活化的 HLB 固相萃取小柱,依次用水 6 mL、5%甲醇水溶液(3.2.3)6 mL 淋洗小柱,弃去全部流出液,真空抽干 1 min,用甲醇(3.1.1)10 mL 洗脱,收集全部洗脱液。于 45℃水浴中氮吹至近干,用甲醇-乙腈-水(3.2.4)定容至 1 mL,涡漩混匀 1 min,以不低于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液待测定。

6.1.2 相关用水(养殖和运输用海水或淡水)

称取试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 1%甲酸乙腈溶液(3.2.5)10 mL,振荡 10 min,加入无水硫酸镁(3.1.4)4 g 和无水乙酸钠(3.1.5)1 g,立即涡漩混合 1 min,以不低于 4 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液 4 mL,于 15 mL 离心管中,于 45℃水浴中氮吹至近干,用甲醇-乙腈-水(3.2.4)定容至 1 mL,涡漩混匀 1 min,取样液待测定。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,4.6 mm×150 mm,粒径 5 μ m,或性能相当者。
- b) 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液(3.2.1),B 为乙腈。梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速:0.6 mL/min。

- d) 柱温:35 ℃。
- e) 进样量:5 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	85	15
3.00	85	15
6.00	60	40
12.00	5	95
14.00	5	95
15.00	85	15
18.00	85	15

6.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI 源)；
- b) 检测方式:多反应监测(MRM)；
- c) 扫描方式:正离子扫描；
- d) 雾化气(GS1)、气帘气(CUR)、辅助气(GS2)均为高纯氮气或其他合适气体,使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求,参考条件见附录 B；
- e) 电喷雾电压(IS)、碰撞电压(CE)、去簇电压(DP)、碰撞室入口电压(EP)、碰撞室出口电压(CXP)等参数使用前应优化至最佳灵敏度,监测离子对和定量离子对等信息见附录 B 中表 B.1。

6.3 定性测定

在相同试验条件下测定试样和混合标准工作溶液,记录试样和混合标准工作溶液中麻醉剂及其代谢物的色谱保留时间,以相对于最强离子丰度的百分比作为定性离子的相对离子丰度。若试样中化合物色谱峰的保留时间与混合标准工作溶液中麻醉剂及其代谢物保留时间的相对偏差不大于 2.5%,且其定性离子与浓度相当的标准溶液中相应的定性离子的相对丰度相比,偏差不超过表 2 规定的范围,则可以确定试样中检出相应麻醉剂及其代谢物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

6.4 定量测定

6.4.1 标准曲线的制作

将混合标准系列工作溶液(3.4.4 或 3.4.5)按仪器参考条件(6.2)进行测定,以混合标准系列工作溶液中各标准品的浓度为横坐标,以对应标准品峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程。

6.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液同标准系列工作溶液进样测定,得到待测物峰面积。根据标准曲线计算得到试样溶液

中待测物的含量。

空白基质加标样品中麻醉剂及其代谢物的参考定量离子流图见附录 C。

6.5 空白试验

除不加试样外,均按试样同法处理。应确认不含有干扰待测组分的物质。

7 结果计算

试样中目标化合物含量采用标准曲线法定量,标准曲线法定量结果按式(1)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times f \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——试样中被测组分 i 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ_i ——由标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分 i 的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试样制备过程中的稀释倍数;

m ——试样的取样量,单位为克(g);

1 000 ——换算系数。

计算结果应扣除空白值,结果保留三位有效数字。

8 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%。

9 其他

本方法中 MS-222、苯佐卡因、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、利多卡因、辛可卡因、布比卡因、丙胺卡因、罗哌卡因检出限均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$;间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸和对乙酰氨基苯甲酸检出限均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

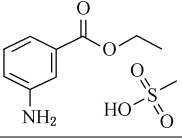
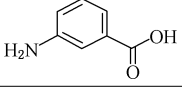
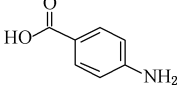
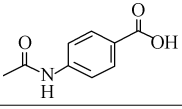
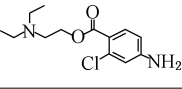
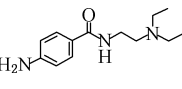
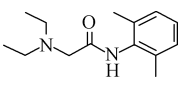
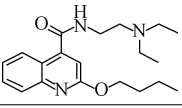
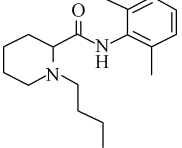
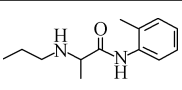
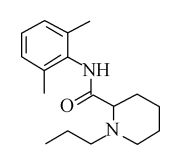
附录 A

(资料性)

麻醉剂及其代谢物的相关信息

麻醉剂及其代谢物的相关信息见表 A.1。

表 A.1 12 种化合物名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及结构式

序号	名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
1	间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (MS-222) Tricaine methanesulfonate	886-86-2	$C_9H_{11}NO_2 \cdot CH_4O_3S$	261.29	
2	间氨基苯甲酸 3-Aminobenzoic acid	99-05-8	$C_7H_7NO_2$	137.14	
3	苯佐卡因 Benzocaine	94-09-7	$C_9H_{11}NO_2$	165.19	
4	对氨基苯甲酸 4-Aminobenzoic acid	150-13-0	$C_7H_7NO_2$	137.14	
5	对乙酰氨基苯甲酸 <i>p</i> -Acetylamino benzoic acid	556-08-1	$C_9H_9NO_3$	179.17	
6	氯普鲁卡因 Chlorprocaine	133-16-4	$C_{13}H_{19}ClN_2O_2$	270.75	
7	普鲁卡因胺 Procainamide	51-06-9	$C_{13}H_{21}N_3O$	235.33	
8	利多卡因 Lidocaine	137-58-6	$C_{14}H_{22}N_2O$	234.34	
9	辛可卡因 Cinchocaine	85-79-0	$C_{20}H_{29}N_3O_2$	343.47	
10	布比卡因 Bupivacaine	2180-92-9	$C_{18}H_{28}N_2O$	288.43	
11	丙胺卡因 Prilocaine	721-50-6	$C_{13}H_{20}N_2O$	220.31	
12	罗哌卡因 Ropivacaine	84057-95-4	$C_{17}H_{26}N_2O$	274.40	

附 录 B
(资料性)
参考质谱条件

以下所列质谱条件仅供参考,当采用不同质谱仪器时,仪器参数可能存在差异,测定前将质谱参数优化到最佳。

正离子模式扫描质谱条件:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI 源);
- b) 检测方式:多反应监测(MRM);
- c) 电喷雾电压(IS):5 500 V(ESI+);
- d) 气帘气(CUR):275.8 kPa(40 psi);
- e) 雾化气(GS1):379.2 kPa(55 psi);
- f) 辅助气(GS2):344.7 kPa(50 psi);
- g) 离子源温度(TEM):400 °C。

表 B.1 正离子模式下麻醉剂及其代谢物定性、定量离子对及质谱分析参数

序号	分析物	离子对 m/z	去簇电压/V	碰撞能量/eV
1	MS-222	166.0/138.1 ^a	60	22
		166.0/94.0	60	30
2	间氨基苯甲酸	138.1/77.0 ^a	85	29
		138.1/65.1	85	34
3	苯佐卡因	166.1/138.2 ^a	60	18
		166.1/94.3	60	24
4	对氨基苯甲酸	138.1/77.1 ^a	60	30
		138.1/94.0	60	19
5	对乙酰氨基苯甲酸	180.1/94.1 ^a	70	24
		180.1/138.1	70	19
6	氯普鲁卡因	271.2/100.1 ^a	46	21
		271.2/154.2	46	39
7	普鲁卡因胺	236.1/163.1 ^a	45	25
		236.1/120.2	45	42
8	利多卡因	235.2/86.1 ^a	40	23
		235.2/58.2	40	53
9	辛可卡因	344.2/271.3 ^a	75	30
		344.2/215.1	75	41
10	布比卡因	289.1/140.1 ^a	60	28
		289.1/98.0	60	54

表 B.1 (续)

序号	分析物	离子对 m/z	去簇电压/V	碰撞能量/eV
11	丙胺卡因	221.2/86.1 ^a	40	20
		221.2/136.1	40	27
12	罗哌卡因	275.1/126.2 ^a	60	27
		275.1/84.1	60	60

^a 定量离子对。

附录 C
(资料性)
典型图谱

C.1 空白鱼样基质加标样品中麻醉剂及其代谢物特征离子的提取离子流图见图 C.1。

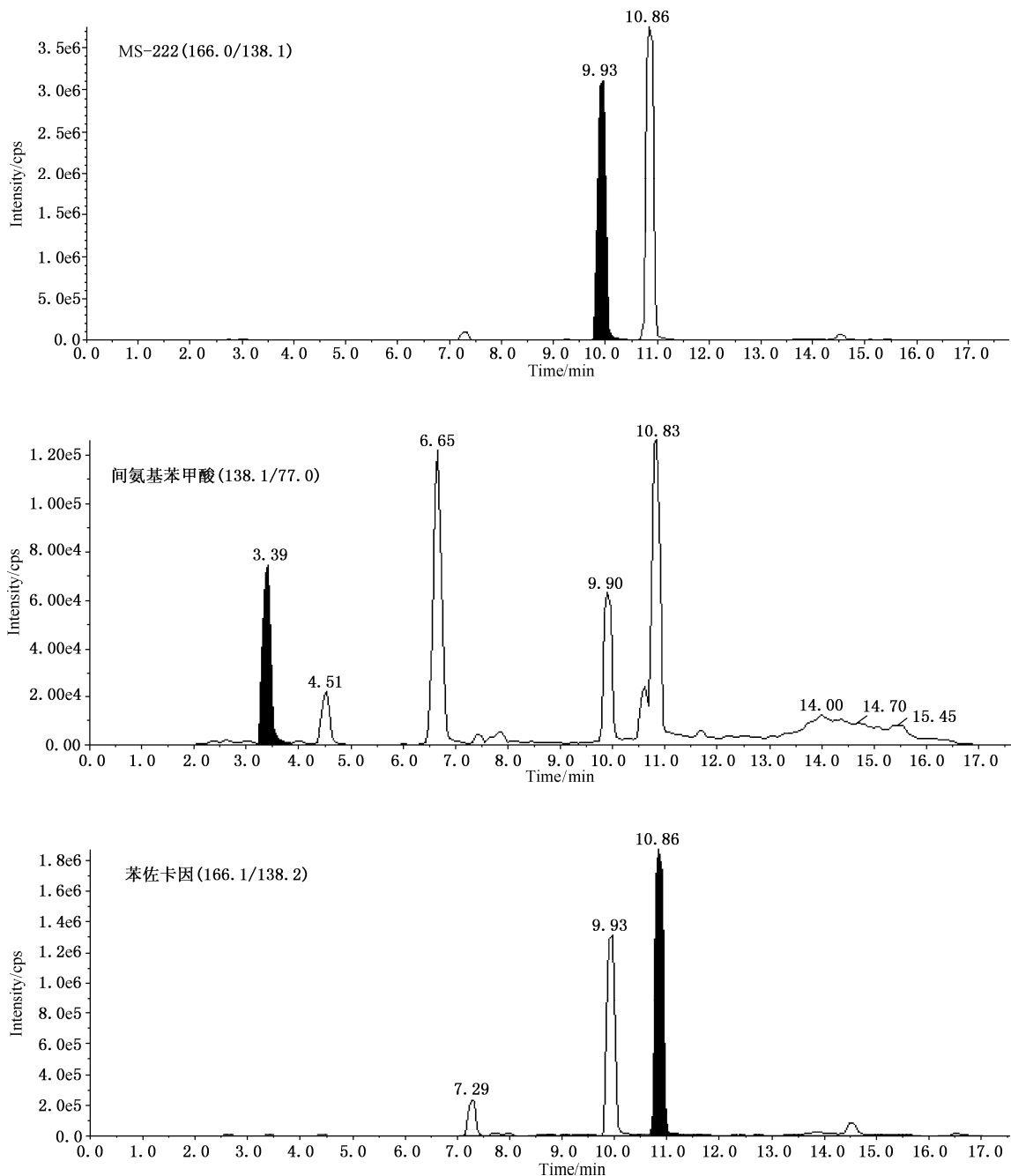


图 C.1 空白鱼样基质加标样品中目标化合物特征离子的提取离子流图(添加浓度:均为 10 μg/kg)

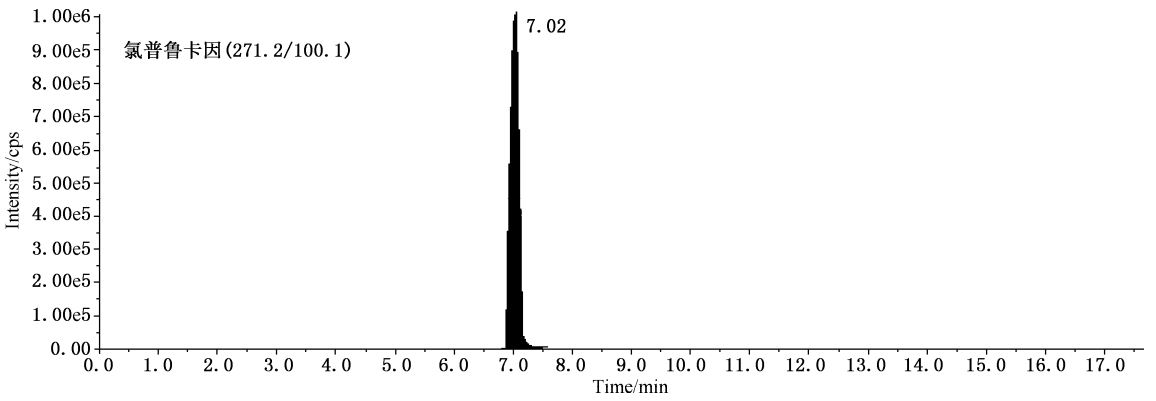
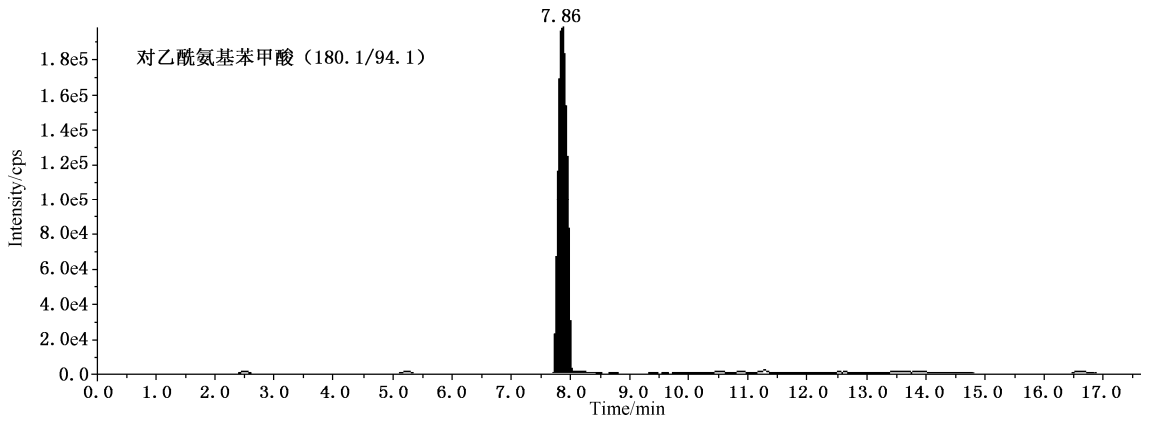
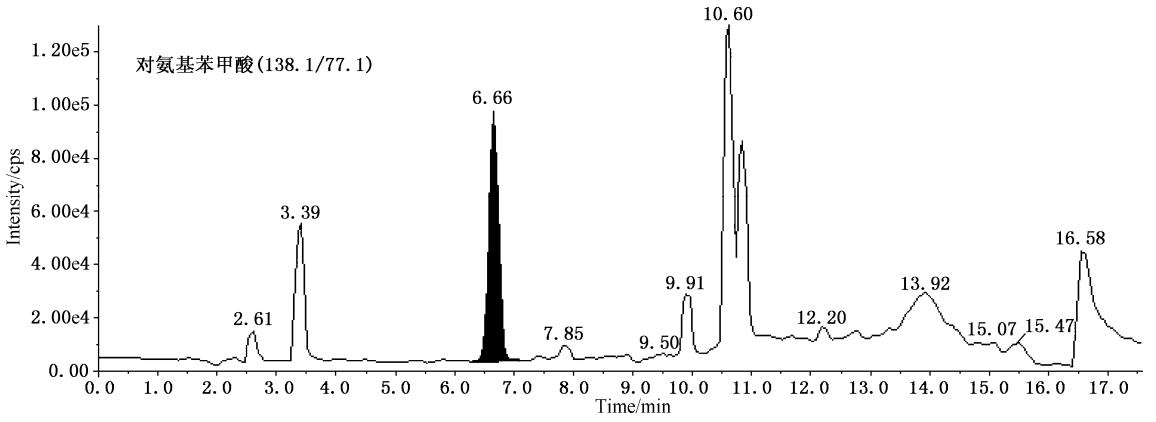


图 C.1 (续)

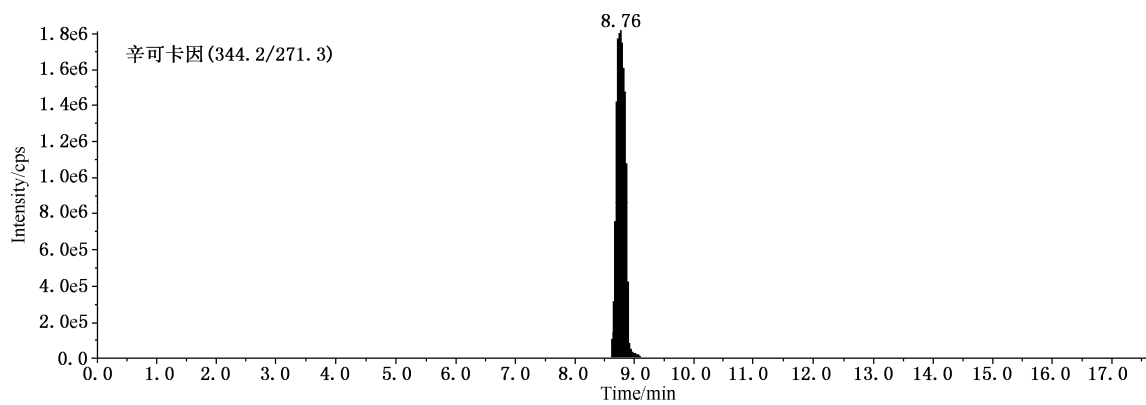
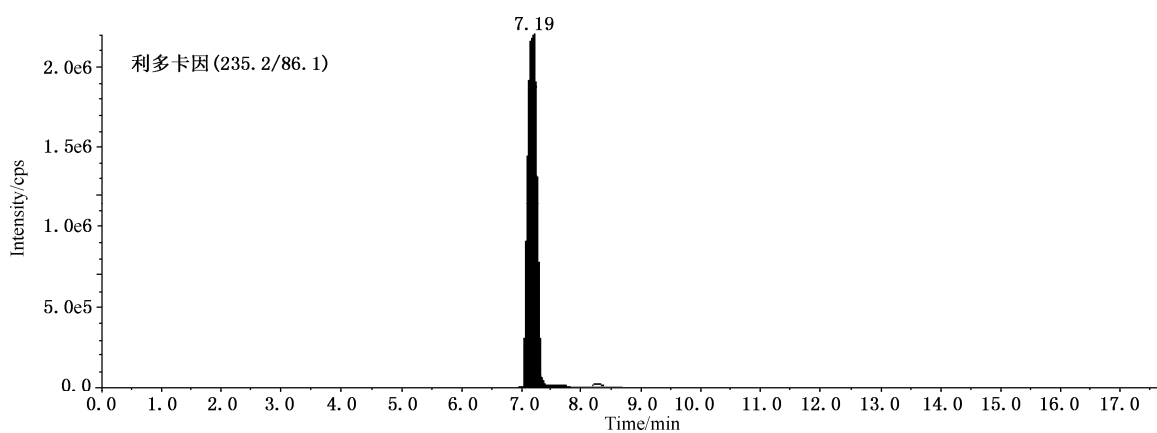
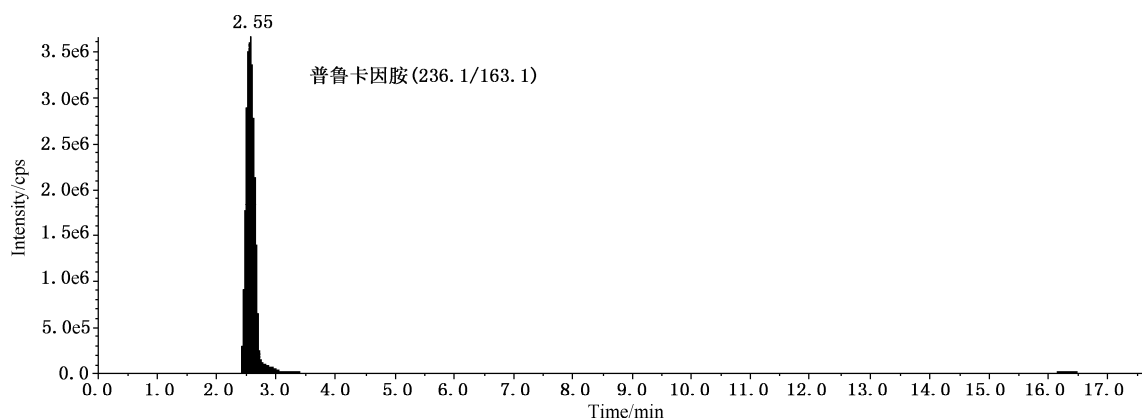


图 C.1 (续)

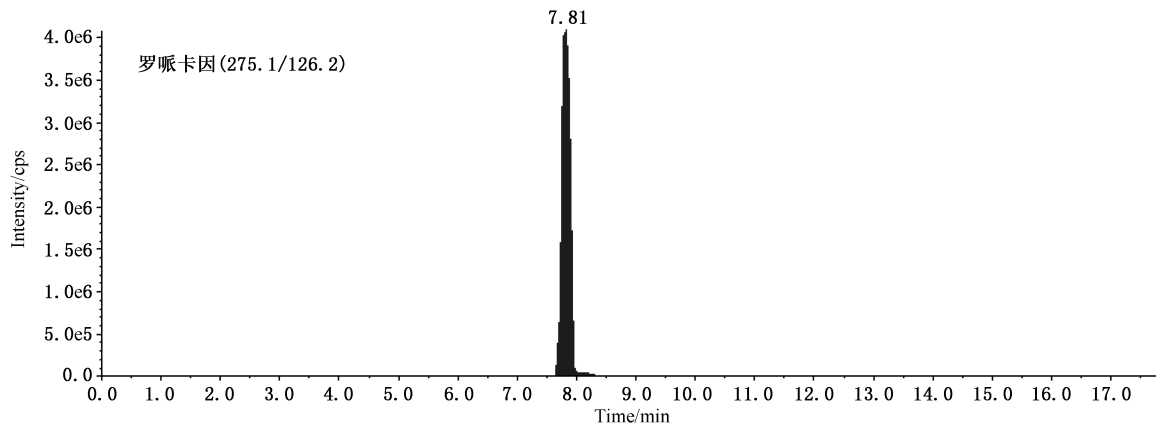
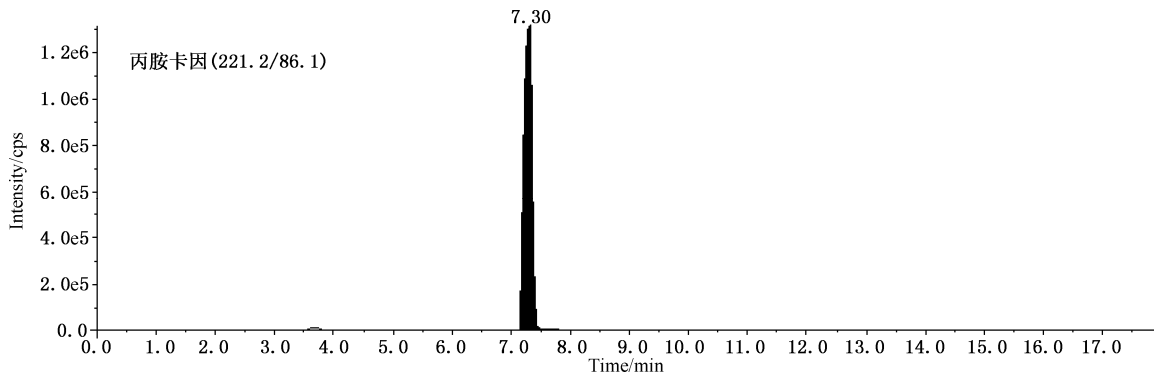
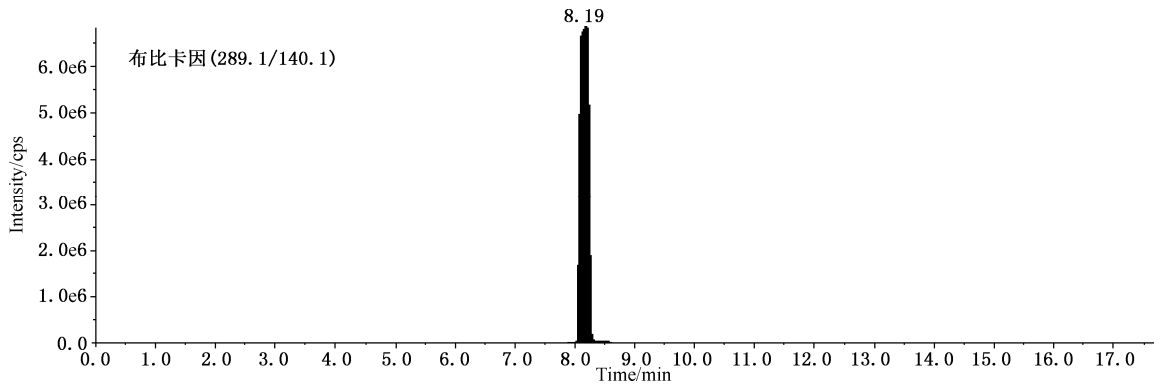


图 C.1 (续)

C.2 空白水样基质加标样品中麻醉剂特征离子的提取离子流图见图 C.2。

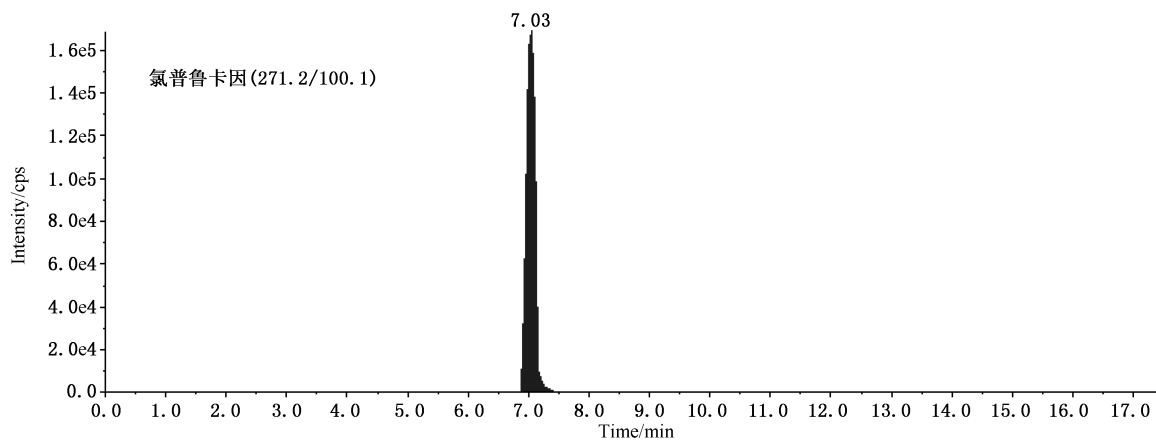
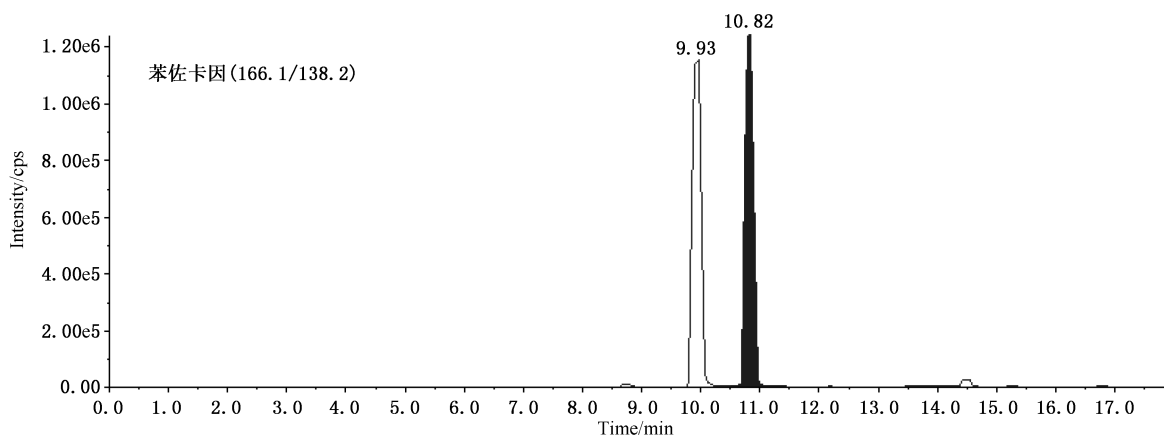
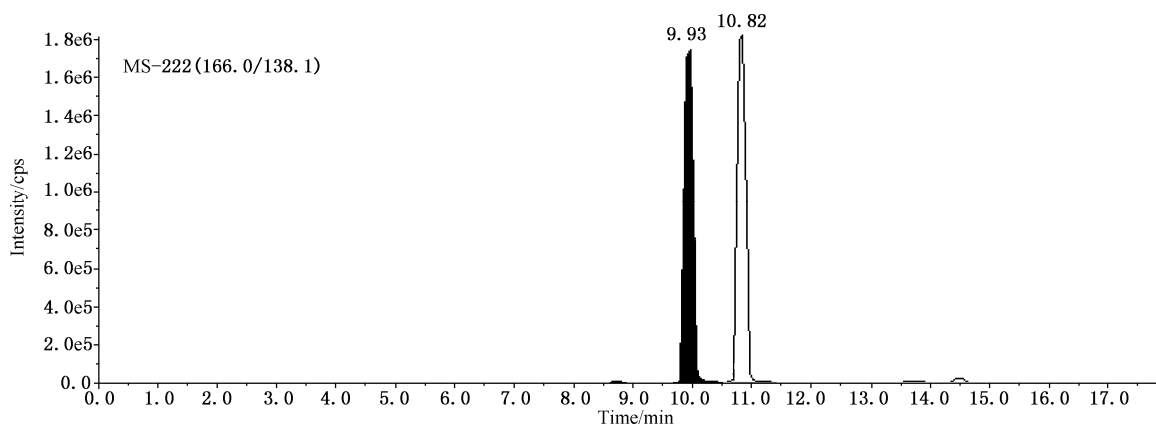


图 C.2 空白水样基质加标样品中目标化合物特征离子的提取离子流图(添加浓度:均为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

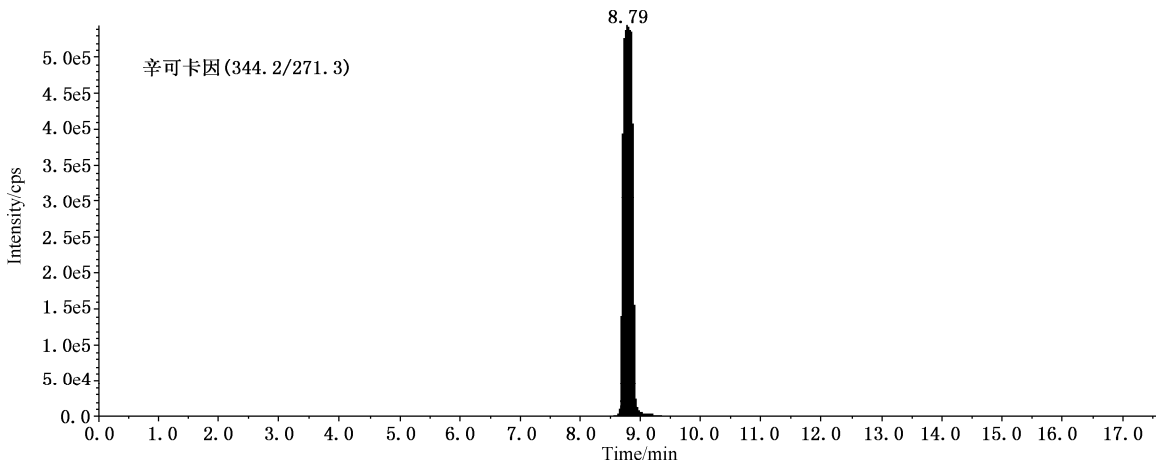
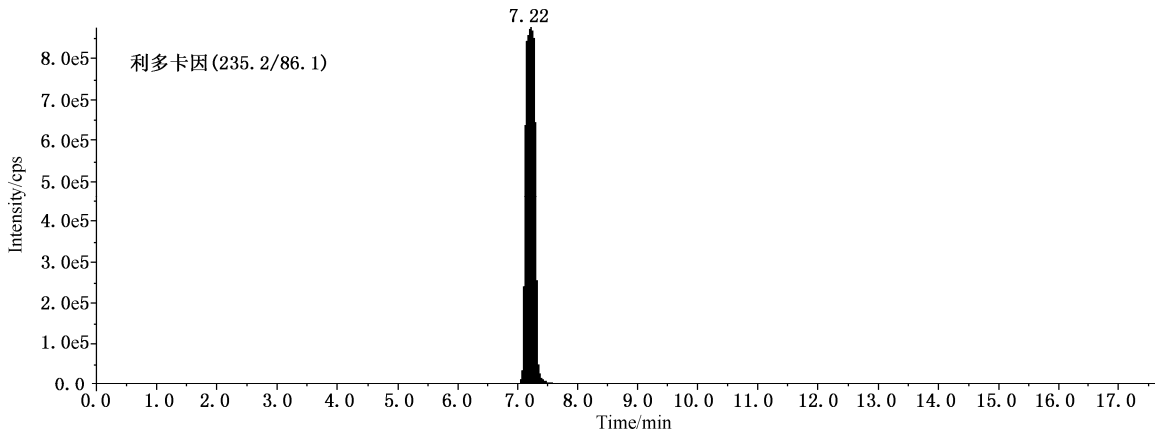
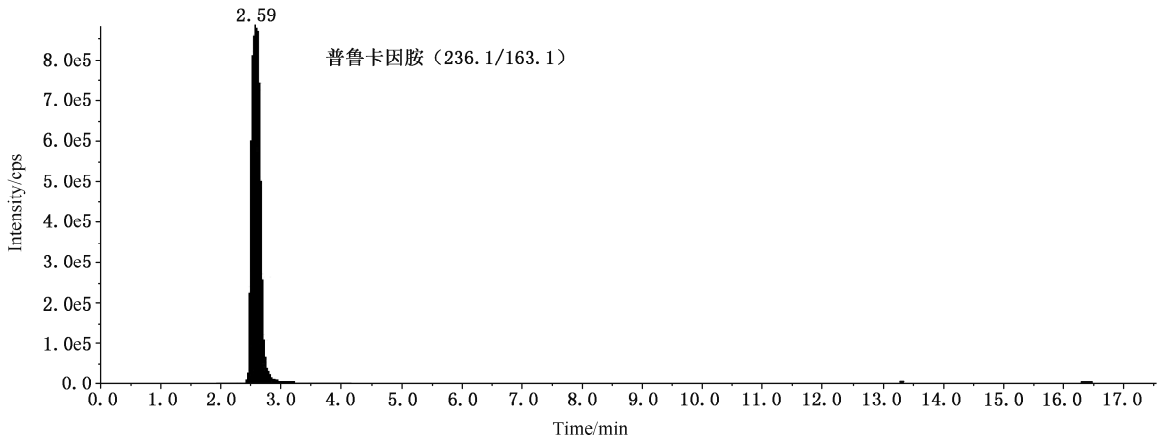


图 C.2 (续)

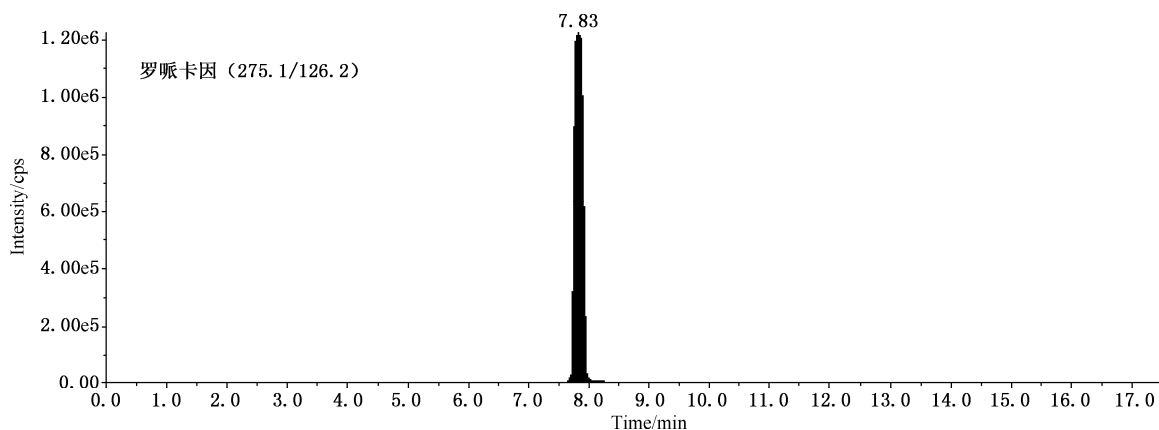
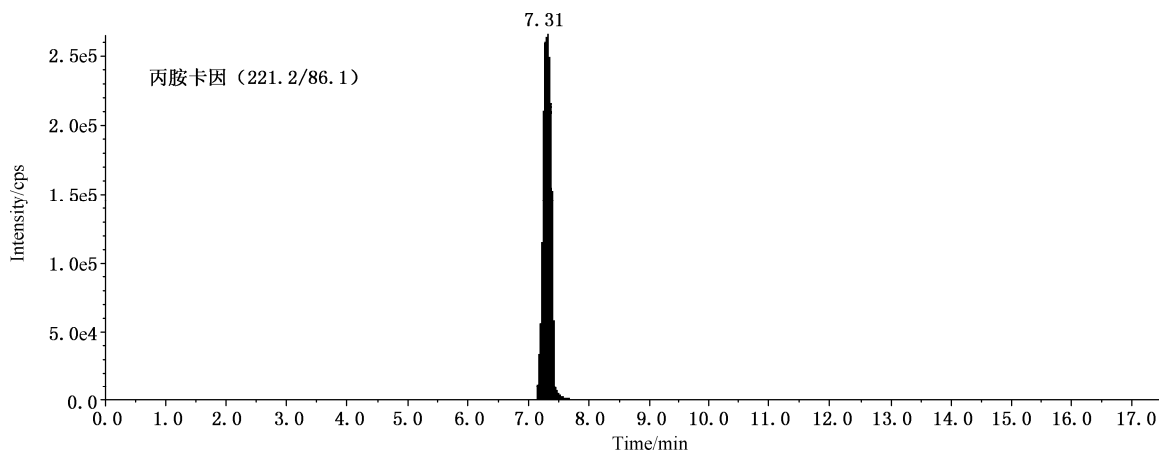
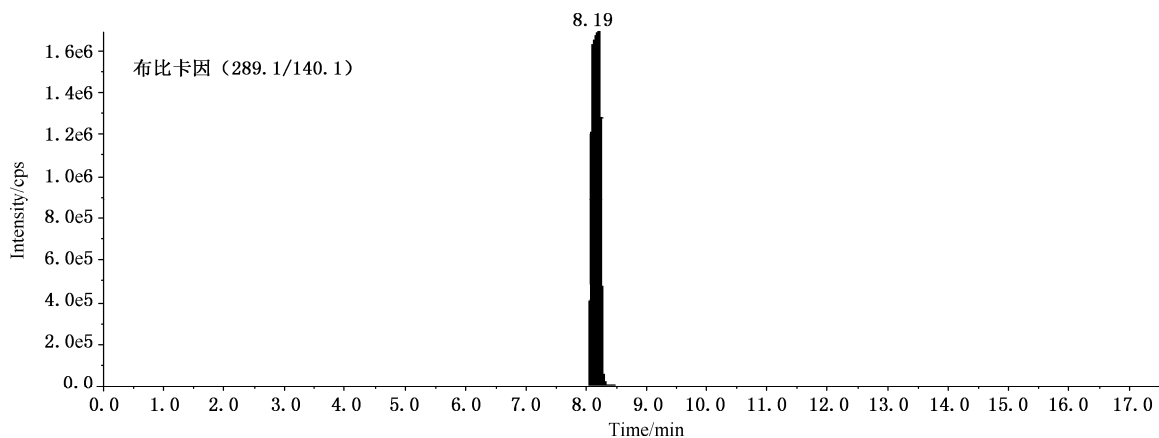


图 C.2 (续)

本方法牵头起草单位：上海市食品药品检验研究院。

本方法参与起草单位：湛江市食品药品检验所。

本方法验证单位：中国肉类食品综合研究中心、四川省食品药品检验检测院、安徽省食品药品检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、广州市食品检验所。

本方法主要起草人：潘颖、张泸文、夏苏捷、陈燕、高平、郭文萍、李澍才、张居舟、刘柱、钱振杰。