T/ZACA

ICS 67.120.30

B 50

|  |
| --- |
|  |

团体标准

T /ZACAXXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

水产品中6种丁香酚类麻醉剂的测定气相色谱-串联质谱法

Determination of six eugenol anesthetics in aquatic products by gas chromatography-tandem mass spectrometry method

|  |
| --- |
| 征求意见稿 |
|  |

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

浙江省质量合格评定协会   发布

前言

本标准依据GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由浙江省质量合格评定协会提出。

本标准由浙江省质量合格评定协会归口。

本标准主要起草单位：绿城农科检测技术有限公司。

本标准参与起草单位：浙江省食品药品检验研究院、南京市产品质量监督检验院、杭州海润泰合检测技术有限公司、丽水蓝城农科检测技术有限公司。

本标准主要起草人：

本标准为首次发布。

水产品中6种丁香酚类麻醉剂的测定气相色谱-串联质谱法

1. 范围

本标准规定了水产品中6种丁香酚类麻醉剂残留量的气相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于水产品中6种丁香酚类麻醉剂残留量的测定，其它动物类食品可参照执行。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

1. 原理

试样用乙酸乙酯提取，经乙腈饱和正己烷除脂净化，采用气相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

1. 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用分析纯试剂，水为GB/T 6682规定的一级水。

* 1. 试剂

乙酸乙酯（C4H8O2）：色谱纯。

乙腈（C2H3N）：色谱纯。

正己烷（C6H14）：色谱纯。

丙酮（C3H6O）：色谱纯。

磷酸（H3PO4）：优级纯。

磷酸二氢钾（H3O4P）：优级纯。

乙腈饱和正己烷溶液：量取200 mL正己烷（4.1.3）于250 mL分液漏斗中，加入适量乙腈（4.1.2），剧烈振摇数分钟，静置分层，弃去下层乙腈。

磷酸二氢钾溶液：取磷酸二氢钾1.36 g（4.1.6），用水溶解并稀释至1 000 mL，用磷酸（4.1.5）调节pH至4.0。

* 1. 标准品

6种丁香酚类麻醉剂标准品，参见附录A，纯度≥98.5%。

* 1. 标准溶液配制

标准储备溶液（1 000 mg/L）：分别准确称取6种丁香酚类化合物标准品10.0 mg（精确至0.0001 g），用丙酮溶解并定容至10.0 mL，4℃避光密封保存，有效期1年。

混合标准储备溶液：将6种丁香酚类化合物标准储备溶液（4.2.1）用乙腈稀释成10.0 mg/L的混合标准中间溶液，4℃避光密封保存，有效期1年。

基质混合标准工作溶液：空白基质溶液氮气吹干，加入1 mL相应质量浓度的混合标准溶液复溶，过微孔滤膜，基质混合标准工作溶液应现用现配。

1. 空白基质溶液取样量应与相应的试样处理取样量一致。
2. 仪器
   1. 气相色谱-三重四级杆质谱联用仪：配电子轰击源（EI）。
   2. 分析天平：感量0.1 mg和0.01 g。
   3. 冷冻离心机：转速不低于12 000 r/min。
   4. 涡旋振荡器。
   5. 超声波振荡器。
   6. 均质机。
   7. 氮吹仪。
   8. 冰箱：冷冻温度不低于-18 ℃。
3. 分析步骤
   1. 试样制备

鱼类清洗后，去头、骨、内脏，取肌肉等可食部位绞碎混合均匀；虾类清洗后，去虾头、虾皮、肠腺，得到整条虾肉绞碎混合均匀，-18 ℃以下冷冻保存，备用。

* 1. 提取

称取2.0 g试样（精确至0.01 g）于50 mL具塞离心管中，加入5.0 mL磷酸二氢钾溶液（4.1.8），8 mL乙酸乙酯（4.1.1），盖上离心管盖，涡旋混匀1.0 min，超声提取20.0 min，12000 r/min离心3.0 min，上清液转移至另一50 mL具塞离心管中；残渣中再加入8 mL乙酸乙酯（4.1.1）重复提取一次，合并所有上清液。将提取液室温下氮气吹至近干，加2.0 mL乙腈（4.1.2）使溶解，转移至10 mL玻璃刻度管中，离心管用2.0 mL乙腈（4.1.2）洗涤一次，洗涤液合并入10 mL玻璃刻度管中，待净化。

* 1. 净化

将刻度管置于-18℃下冷冻2h，取出后在4℃、4000 r/min条件下离心3.0 min。将上清液转移至另一10 mL刻度管中，向该刻度管中加入2 mL乙腈饱和的正己烷（4.1.5），涡旋1.0 min，弃去正己烷层。下层乙腈层室温下氮气吹至近干，准确加入2 mL丙酮（4.1.4），混匀，过0.22 μm有机滤膜，供气相色谱-串联质谱仪测定。

* 1. 测定
     1. 仪器参考条件

1. 色谱柱：HP-5ms毛细管柱；30 m×0.25 mm×0.25 μm，或相当者；
2. 色谱柱温度：40 ℃保持1.0 min，然后以15℃/min程序升温至180 ℃，再以40℃/min升温至260 ℃，保持3min；
3. 载气：氦气，纯度≥99.999%，流速1.0 mL/min；
4. 进样口温度：250 ℃；
5. 进样方式：不分流进样；
6. 进样量：1 μL；
7. 电子轰击源；70 eV；
8. 离子源温度：230 ℃；
9. 传输线温度：280 ℃；
10. 溶剂延迟：2.0 min；
11. 多反应监测模式（MRM）：每个化合物选择一对定量离子、两对定性离子。每组所有需要检测的离子对按照出峰顺序，分时段分别检测。每种化合物的定量离子对、定性离子对和碰撞电压，参见附录B。
    * 1. 标准工作曲线

准确吸取一定量的混合标准溶液，逐级用丙酮稀释成质量浓度为0.005mg/L、0.01mg/L、0.02mg/L、0.04mg/L、0.08mg/L、0.16mg/L、0.32 mg/L的标准工作溶液。空白基质溶液氮气吹干，分别加入1.0 mL上述标准工作溶液复溶，过0.22 μm有机滤膜配制成系列基质混合标准工作溶液，供气相色谱-串联质谱仪测定。以化合物定量离子峰面积为纵坐标，化合物标准溶液质量浓度为横坐标，绘制标准曲线。

* + 1. 定性及定量
       1. 保留时间

被测试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内。

* + - 1. 定量离子、定性离子及子离子丰度比

在相同条件下进行样品测定时，如果检出的色谱峰保留时间与标准品相一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，目标化合物的质谱定量和定性离子均出现，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的定性离子和定量离子的相对丰度比与质量浓度相当的基质标准溶液相比，其允许偏差不超过表1规定的范围，则可判断样品中存在目标化合物。

1. 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分率（%）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对离子丰度 | ＞50 | 20~50(含) | 10~20(含) | ≤10 |
| 允许相对偏差 | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

本方法的标准物质多重反应监测GC-MS/MS图参见附录C。

* + - 1. 定量

基质匹配外标法定量。

* 1. 试样溶液的测定

将基质混合标准工作溶液和试样溶液依次注入气相色谱-串联质谱仪中，保留时间和定性离子定性，测得定量离子峰面积，待测样液中化合物的响应值应在仪器检测的定量测定线性范围之内，超过线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

* 1. 平行试验

按照6.1~6.5的规定对同一试验进行平行试验测定；

* 1. 空白试验

除不加试料外，按照6.1~6.5的规定进行平行操作。

1. 结果计算

样品中各麻醉剂残留量以质量分数（）计，单位为毫克每千克（mg/kg）表示，外标法按式（1）计算：

··········（1）

式中：

——样品中被测物残留量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

——基质标准工作溶液中被测物质的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

*A*——试样溶液中被测物的色谱峰面积；

——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积；

——试样溶液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

——试样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，计算结果以重复性条件下获得的2次独立测定结果的算术平均值表示，保留2位有效数字。含量超过1mg/kg时，保留3位有效数字。

1. 精密度
   1. 在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），应符合附录D的要求。
   2. 在再现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），应符合附录E的要求。
2. 准确度

本方法对水产品中6种丁香酚类化合物加标浓度为0.01~0.5 mg/kg时，回收率在70~120%之间。

1. 定量限

当水产品的取样量为2.0 g时，定容体积为2mL时，本方法中6种丁香酚类化合物定量限均为0.005 mg/kg。

附录 A

（资料性附录）

6种丁香酚类化合物信息

表A.16种丁香酚类化合物中、英文名称、CAS号、分子式、分子量和结构式

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS. | 分子式 | 分子量 | 结构式 |
| 1 | 丁香酚 | Eugenol | 97-53-0 | C10H12O2 | 164.20 |  |
| 2 | 甲基丁香酚 | Methyl eugenol | 93-15-2 | C11H14O2 | 178.23 |  |
| 3 | 异丁香酚 | Isoeugenol | 97-54-1 | C10H12O2 | 164.20 |  |
| 4 | 顺式-甲基异丁香酚 | Methyl isoeugenol | 93-16-3 | C11H14O2 | 178.23 |  |
| 5 | 乙酸丁香酚酯 | Eugenol Acetate | 93-28-7 | C12H14O3 | 206.24 |  |
| 6 | 乙酰基异丁香酚 | Acetyl isoeugenol | 93-29-8 | C12H14O3 | 206.24 |  |

附录B

（资料性附录）

6种丁香酚类化合物定量离子对、定性离子对、碰撞能量

表B.16种丁香酚类化合物定量离子对、定性离子对和碰撞能量

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物名称 | 定量离子对 | 碰撞  能量（CE） | 定性离子对 | 碰撞  能量（CE） | 定性离子对 | 碰撞  能量（CE） |
| 丁香酚 | 164.00>149.10 | 9 | 149.00>121.10 | 6 | 164.00>77.10 | 27 |
| 甲基丁香酚 | 178.00>107.10 | 15 | 178.00>163.10 | 6 | 178.00>147.10 | 6 |
| 异丁香酚 | 164.00>149.10 | 12 | 164.00>77.10 | 30 | 164.00>104.10 | 12 |
| 顺式-甲基异丁香酚 | 178.00>107.10 | 15 | 178.00>163.10 | 9 | 163.00>107.10 | 6 |
| 乙酸丁香酚酯 | 164.00>149.10 | 9 | 164.00>77.10 | 30 | 164.00>104.10 | 12 |
| 乙酰基异丁香酚 | 164.00>149.10 | 9 | 164.00>77.10 | 27 | 164.00>121.10 | 15 |

附录C

（资料性附录）

6种丁香酚类化合物多重反应监测（MRM）色谱图



图C.1 6种丁香酚类化合物多重反应监测（MRM）色谱图（0.5 mg/L）

附录D

（规范性附录）

实验室内重复性要求

表D.1 实验室内重复性要求

|  |  |
| --- | --- |
| 被测组分含量  mg/kg | 精密度  % |
| ≤0.001 | 36 |
| ＞0.001≤0.01 | 32 |
| ＞0.01≤0.1 | 22 |
| ＞0. 1≤1 | 18 |
| ＞1 | 14 |

附录E

（规范性附录）

实验室间再现性要求

表D.1 实验室间再现性要求

|  |  |
| --- | --- |
| 被测组分含量  mg/kg | 精密度  % |
| ≤0.001 | 54 |
| ＞0.001≤0.01 | 46 |
| ＞0.01≤0.1 | 34 |
| ＞0. 1≤1 | 25 |
| ＞1 | 19 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_