



团 体 标 准

T/JSYX X—XXXX

水产品中地西洋、甲硝唑、地 美硝唑和氯丙嗪残留量的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of diazepam, metronidazole, dimetridazole and chlorpromazine
residues in aquatic products by UPLC-MS/MS method

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

江苏省渔业协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》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专利的责任。

本文件由南京市农产品质量检测院提出。

本文件由江苏省渔业协会归口。

本文件起草单位：南京市农产品质量检测院。

本文件主要起草人：陈桂芳、丁春晖、张聪、陈琳琳、倪建秀、李文杰。

水产品中地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪残留量的测定

超高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪残留量检测的制样和超高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于淡水鱼、虾中地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪残留量的测定。

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

GB/T 30891 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样用 90%乙腈水溶液提取之后，残留的药物经固相萃取柱富集、净化，超高效液相色谱-串联质谱仪测定，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，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（HCOOH，CAS 号：64-18-6）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（CH₃CN，CAS 号：75-05-8）：色谱纯。

5.1.4 盐酸（HCL，CAS 号：7647-01-0）。

5.1.5 氨水（NH₃·H₂O，CAS 号：7664-41-7）。

5.2 溶液的配制

5.2.1 90%乙腈水溶液：量取 900 mL 乙腈（5.1.3）用水稀释并定容至 1000 mL，摇匀。

5.2.2 0.1mol/L 盐酸水溶液：量取 8.3 mL 盐酸（5.1.4）用水稀释并定容至 1000 mL，摇匀。

5.2.3 氨化甲醇溶液：量取 5 mL 氨水（5.1.5）用甲醇稀释并定容至 100 mL，摇匀。

5.2.4 0.1%甲酸水溶液：量取 1 mL 甲酸（5.1.2）用水稀释并定容至 1000 mL，摇匀。

5.2.5 0.1%甲酸甲醇溶液：量取 1 mL 甲酸（5.1.2）用甲醇（5.1.1）稀释并定容至 1000 mL，摇匀。

5.2.6 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇（80+20，V/V）：量取 80 mL 0.1%甲酸水溶液（5.2.4）和 20 mL 0.1%甲酸甲醇溶液（5.2.5）混匀。

5.3 标准品

- 5.3.1 地西洋标准品 ($C_{16}H_{13}ClN_2O$) (CAS: 439-14-5) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.2 地美硝唑标准品 ($C_5H_7N_3O_2$) (CAS: 551-92-8) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.3 甲硝唑标准品 ($C_6H_9N_3O_3$) (CAS: 443-48-1) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.4 氯丙嗪标准品 ($C_{17}H_{19}ClN_2S$) (CAS: 50-53-3) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.5 地西洋-D₅标准品 ($C_{16}H_8D_5ClN_2O$) (CAS: 65854-76-4) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.6 地美硝唑-D₃标准品 ($C_5H_4D_3N_3O_2$) (CAS: 64678-69-9) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.7 甲硝唑-D₄标准品 ($C_6H_5D_4N_3O_3$) (CAS: 1261392-47-5) : 纯度 \geq 98%。
- 5.3.8 氯丙嗪-D₆标准品 ($C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$) (CAS: 1228182-46-4) : 纯度 \geq 98%。

5.4 标准溶液的制备

- 5.4.1 标准储备液: 取地西洋、地美硝唑、甲硝唑和氯丙嗪标准品各 10 mg, 精密称定, 分别加甲醇(5.1.1)适量使溶解并稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶, 摇匀, 制成浓度均为 100 μ g/mL 的标准储备液。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。-18 $^{\circ}$ C及以下条件保存, 有效期 6 个月。
- 5.4.2 内标储备液: 取地西洋-D₅、地美硝唑-D₃、甲硝唑-D₄和氯丙嗪-D₆标准品各 10 mg, 精密称定, 分别加甲醇(5.1.1)适量使溶解并稀释至 100 mL 棕色容量瓶, 摇匀, 制成浓度均为 100 μ g/mL 的内标储备液。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。-18 $^{\circ}$ C及以下条件保存, 有效期 6 个月。
- 5.4.3 混合标准中间液: 分别准确量取标准储备液(5.4.1)各 0.1 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶, 用甲醇(5.1.1)稀释至刻度, 制成浓度为 1 μ g/mL 的混合标准中间液。-18 $^{\circ}$ C及以下条件保存, 有效期 3 个月。
- 5.4.4 混合标准工作液: 准确量取混合标准中间液 (5.4.3) 适量, 用甲醇(5.1.1)稀释, 制成合适的混合标准工作液, 现配现用。
- 5.4.5 混合内标工作液: 分别准确量取内标储备溶液(5.4.2)各 0.1 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶, 用甲醇(5.1.1)稀释, 配制成浓度为 1 μ g/mL 的混合内标工作液。-18 $^{\circ}$ C及以下条件保存, 有效期 3 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 混合型阳离子固相萃取柱: 150 mg/6 mL, 或相当者。
- 5.5.2 亲水 PTFE 针式过滤器: 滤膜孔径为 0.22 μ m, 或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 超高效液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源。
- 6.2 电子天平: 感量 0.01 g 和 0.00001 g。
- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 氮吹仪。
- 6.5 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

- 取均质后的供试样品, 作为供试试料;
- 取均质后的空白样品, 作为空白试料;
- 取均质后的空白样品, 添加适宜浓度的标准工作液, 作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

—18℃以下保存，3个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 样品处理

称取 5.00 g 试样(准确至±0.05g)于 50 mL 离心管中,加入 1 µg/mL 混合内标工作液 10 µL(5.4.5),充分混匀。加 90%乙腈水溶液(5.2.1) 15 mL,充分混匀。8000 r/min 离心 10 min。将 10 mL 上清液转移至 15 mL 离心管中于 40 °C 水浴用氮气吹至近干,用 0.1 mol/L 盐酸水溶液(5.2.2)5 mL 复溶待净化。

取固相萃取柱,依次使用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,将复溶液以约 3~5 mL/min 流速通过固相萃取柱(5.5.1)。过柱后依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗,负压抽干。最后用 6 mL 氨化甲醇溶液(5.2.3)洗脱。洗脱液于 40 °C 水浴用氮气吹至近干,用 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇(80+20)(5.2.6)定容至 1 mL,涡旋混匀 1 min,过 0.22 µm 针式过滤器(5.5.2),供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

8.2 标准曲线的制备

精确量取适量混合标准中间液(5.4.3)和适量混合内标工作液(5.4.5),用 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇(80+20)(5.2.6)配制成同位素内标浓度为 10 µg/L 以及各组分浓度为 0.2 µg/L、0.5 µg/L、1.0 µg/L、2.5 µg/L、5.0 µg/L、10.0 µg/L、20.0 µg/L 和 50.0 µg/L 系列标准溶液。以被测组分和相应内标的峰面积比值为纵坐标,浓度比值为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程和相关系数。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C₁₈ (3.0 mm×150 mm, 1.8 µm), 或性能相当者;
- 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液(5.2.4), B 为 0.1%甲酸甲醇溶液(5.2.5); 梯度洗脱程序见表 1;
- 柱温: 40 °C;
- 流速: 0.25 mL/min;
- 进样量: 20 µL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0.00	80	20
1.00	80	20
3.00	30	70
9.00	10	90
11.00	10	90
11.01	80	20

8.3.2 质谱参考条件

- 离子化模式: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式;
- 毛细管电压: 4000 V;
- 干燥气温度: 340 °C;
- 雾化气压力: 45 psi;

- e) 干燥气流速：11 L/min；
f) 扫描模式：多反应监测(MRM)，扫描参数及监测离子见表 2；

表 2 地西洋、甲硝唑、地美硝唑、氯丙嗪及内标物的母离子、子离子、碎裂电压和碰撞能量

组 分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压 V	碰撞能量 eV
地西洋	285.0	193.0*	135	35
		154.1	135	30
甲硝唑	172.1	128.0*	80	10
		82.1	80	25
地美硝唑	141.9	96.0*	80	12
		81.1	80	28
氯丙嗪	318.9	86.0*	100	18
		58.1	100	46
地西洋-D ₅	290.1	198.1	135	35
甲硝唑-D ₄	176.1	128.1*	95	12
		82.1	95	25
地美硝唑-D ₃	145.1	99.1	95	15
氯丙嗪-D ₆	325	92*	100	18
		64.1	100	46

注：*表示定量离子

8.3.3 定性测定

在同样测试条件下，试样溶液中各组分的保留时间与标准物质保留时间相对偏差在±2.5%以内，且检测到的定性离子的相对丰度，应与浓度相当的标准溶液中定性离子的相对丰度一致。基峰与次强碎片离子丰度比应符合表 3 要求。各组分的保留时间参考表 4。

表 3 基峰与次强碎片离子丰度比要求

单位为百分号

次强碎片离子相对丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差	±20	±25	±30	±50

表 4 地西洋、甲硝唑、地美硝唑参考保留时间

化合物名称	保留时间 min
地西洋	8.944
甲硝唑	5.080
地美硝唑	5.410
氯丙嗪	6.803

8.3.4 定量测定

取混合标准工作液和试料溶液等体积进样测定，作单点或多点校准，以色谱峰面积定量，按内标法计算，其中地西洋以地西洋-D₅为内标，甲硝唑以甲硝唑-D₄为内标，地美硝唑以地美硝唑-D₃为内标，氯丙嗪以氯丙嗪-D₆为内标。标准溶液及试料溶液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述超高效液相色谱-质谱条件下，标准溶液中特征离子质量色谱图见附录 A。

8.3.5 空白试验

取空白试料，除不加标准溶液外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

8.3.6 平行试验

按上述测定条件和步骤对同一样品进行平行试验测定。

9 结果计算与表述

试料中药物残留量按公式(1)计算，计算结果需扣除空白值，结果保留三位有效数字。

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i — 试料中组分含量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

ρ_i — 试料溶液中组分的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V — 试料溶液最终体积，单位为毫升(mL)；

m — 试料质量，单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法检出限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上的回收率为 $70.0\% \sim 110.0\%$ 。

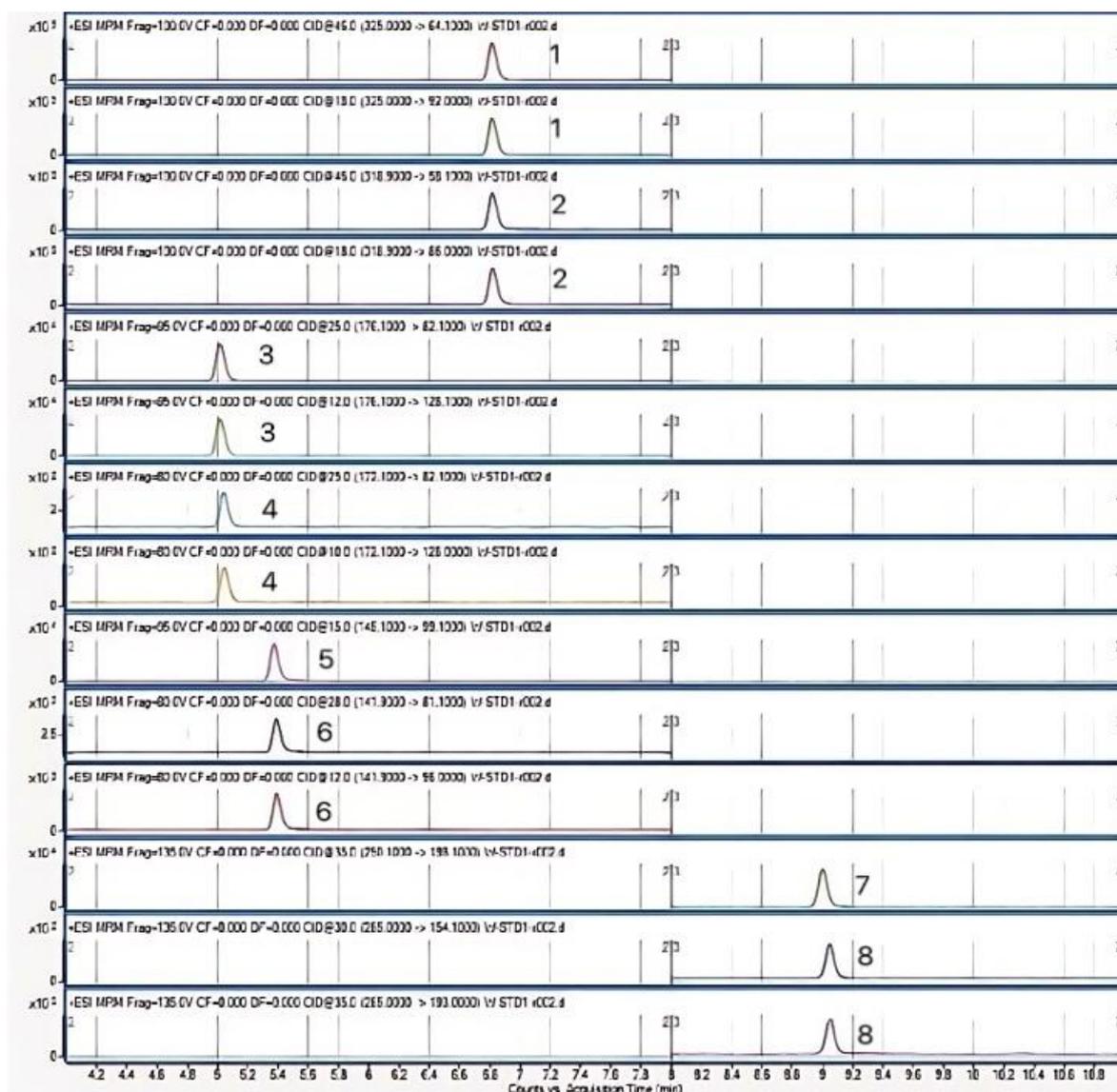
10.3 精密度

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

附录 A
(资料性附录)

甲硝唑、地美硝唑、地西洋和同位素标准溶液特征离子质量色谱图 (1.0 $\mu\text{g/L}$)

甲硝唑、地美硝唑、地西洋和同位素标准溶液 (1.0 $\mu\text{g/L}$) 特征离子质量色谱图见图A.1。



图A.1 甲硝唑、地美硝唑、地西洋和同位素标准溶液特征离子质量色谱图 (1.0 $\mu\text{g/L}$)

质量色谱图中:

- 1-氯丙嗪- D_6 特征离子质量色谱图 (325 \rightarrow 64.1) ;
- 2-氯丙嗪特征离子质量色谱图 (318.9 \rightarrow 86.0, 318.9 \rightarrow 58.1) ;
- 3-甲硝唑- D_4 特征离子质量色谱图 (176.1 \rightarrow 128.1) ;
- 4-甲硝唑特征离子质量色谱图 (172.1 \rightarrow 128.0, 172.1 \rightarrow 82.1) ;
- 5-地美硝唑- D_3 特征离子质量色谱图 (145.1 \rightarrow 99.1) ;

- 6-地美硝唑特征离子质量色谱图 (141.9>96.0, 141.9>81.1) ;
 - 7-地西洋-D₅特征离子质量色谱图 (290.1>198.1) ;
 - 8-地西洋特征离子质量色谱图 (285.0>193.0, 285.0>154.1) 。
-