



中华人民共和国国家标准

GB/T 20742—2006

牛甲状腺和牛肉中硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、 正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of 2-thiouracil, methyl thiouracil, propyl
thiouracil, tapazole and 2-mercaptobenzimidazole residues in bovine
thyroid and muscles—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、张进杰、曹彦忠、郭彤彤、范春林、李学民、刘永明、曹亚平、刘小茂。

本标准系首次发布的国家标准。

牛甲状腺和牛肉中硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、 正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛甲状腺和牛肉中硫脲嘧啶(2-thiouracil)、甲基硫脲嘧啶(methyl thiouracil)、正丙基硫脲嘧啶(propyl thiouracil)、它巴唑(tapazole)、巯基苯并咪唑(2-mercaptobenzimidazole)残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛甲状腺和牛肉中硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑残留量的测定。

本标准方法的检出限:牛甲状腺和牛肉中硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑均为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中残留的硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑用乙酸乙酯提取,氨基固相萃取柱净化后浓缩,用4-氯-7-苯并咪唑衍生化,再用固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱检测。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为优级纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.4 磷酸氢二钠, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。
- 4.5 磷酸二氢钾, KH_2PO_4 。
- 4.6 乙酸。
- 4.7 浓盐酸。
- 4.8 氢氧化钠。

- 4.9 三氯甲烷。
- 4.10 正己烷。
- 4.11 4-氯-7-苯并呋咱(4-chloro-7-nitrobenzo-2-furazan NBF-Cl), $C_6H_2ClN_3O_3$; 含量 $\geq 99\%$ 。
- 4.12 巯基乙醇:分析纯。
- 4.13 乙二胺四乙酸二钠, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ 。
- 4.14 无水硫酸钠:使用前 650℃灼烧 4 h。
- 4.15 磷酸盐缓冲溶液:pH=8, 0.2 mol/L。称取 67.7 g 磷酸氢二钠(4.4)和 1.5 g 磷酸二氢钾(4.5), 用水溶解,定容至 1 000 mL。
- 4.16 盐酸溶液:0.2 mol/L。量取 17 mL 浓盐酸(4.7),用水定容至 1 000 mL。
- 4.17 氢氧化钠溶液:1 mol/L。称取 40 g 氢氧化钠(4.8),用水溶解,定容至 1 000 mL。
- 4.18 衍生剂:5 mg/mL。称取 0.05 g 4-氯-7-苯并呋咱(NBF-Cl)(4.11)溶于 10 mL 甲醇(4.1),现用现配。
- 4.19 乙二胺四乙酸二钠溶液:0.1 mol/L。称 37.2 g 乙二胺四乙酸二钠(4.13)溶于 1 000 mL 水中。
- 4.20 洗脱液:含 3%乙酸的甲醇和三氯甲烷(15+85)混合溶液。吸取 3 mL 乙酸(4.6)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀。吸取该溶液 15 mL 于 100 mL 容量瓶中,用三氯甲烷(4.9)定容至刻度,混匀。
- 4.21 定容液:含 0.3%乙酸的乙腈水溶液。吸取 0.3 mL 乙酸和 15 mL 乙腈(4.2)于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。
- 4.22 标准物质:硫脲嘧啶(2-thiouracil, TU)、甲基硫脲嘧啶(Methyl thiouracil, MTU)、正丙基硫脲嘧啶(propylthiouracil, PrTU)、它巴唑(Tapazole, TAP)、巯基苯并咪唑(2-mercaptobenzimidazole, MBI), 纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.23 内标标准物质:甲基巯基苯并咪唑(2-methoxethox-mercaptobenzimidazole, MEMBI), 纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.24 标准储备溶液:1.0 mg/mL。称取适量的硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑标准物质(4.22),分别用甲醇配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光-18℃保存,可使用 6 个月。
- 4.25 混合标准工作溶液:0.1 μ g/mL。吸取每种适量标准储备溶液(4.24),用甲醇稀释成 0.1 μ g/mL 的混合标准工作溶液,避光-18℃保存,可使用 3 个月。
- 4.26 内标标准储备溶液:1.0 mg/mL。称取适量的甲基巯基苯并咪唑标准物质(4.23),用甲醇配成 1.0 mg/mL 的标准储备液,避光-18℃保存,可使用 6 个月。
- 4.27 内标标准工作溶液:0.1 μ g/mL。吸取内标标准储备溶液(4.26),用甲醇稀释成 0.1 μ g/mL 的内标标准工作溶液,避光-18℃保存,可使用 3 个月。
- 4.28 Sep-Park Amino Propyl 固相萃取柱或相当者:500 mg, 3 mL。使用前用 20 mL 正己烷预处理,保持柱体湿润。
- 4.29 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:60 mg, 3 mL。使用前分别用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。
- 4.30 0.2 μ m 滤膜。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 液体混匀器。
- 5.4 固相萃取装置。

- 5.5 氮气吹干仪。
- 5.6 恒温振荡水浴。
- 5.7 真空泵:真空度应达到 80 kPa。
- 5.8 微量注射器:25 μ L,100 μ L。
- 5.9 棕色具塞离心管:25 mL,50 mL。
- 5.10 pH 计:测量精度 ± 0.02 pH 单位。
- 5.11 贮液器:50 mL。
- 5.12 离心机:转速大于 4 000 r/min。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

6.1.1 牛甲状腺样品的制备

取 50 g~100 g 阴性牛甲状腺组织,加入 3 倍质量的干冰,用组织捣碎机绞碎后,使干冰在室温下蒸发,备用。

6.1.2 牛肌肉组织用组织捣碎机绞碎,分出 0.5 kg 作为试样备用。

6.2 试样保存

制备好的试样置于 -18°C 冰柜中避光保存。

7 测定步骤

7.1 混合基质标准校准溶液的制备

7.1.1 样品称取

称取 5 个阴性样品,每个样品为 1 g(精确到 0.01 g),将上述样品置于 50 mL 棕色离心管中(5.9),分别加入不同量混合标准工作溶液(4.25),使各被测组分的浓度均为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL。再分别加入适量内标标准工作溶液(4.27),使其浓度均为 2.0 ng/mL。

7.1.2 提取和初次净化

分别往上述离心管中加入 10 mL 乙酸乙酯(4.3),3 g 无水硫酸钠(4.14),20 μ L 巯基乙醇(4.12),30 μ L 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(4.19),均质 15 s,再用 5 mL 乙酸乙酯洗涤均质器刀头,二者合并,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液并在氮气吹干仪(5.5)上 50°C 水浴吹干。用 2 mL 乙腈溶解残余物,加入 3 mL 正己烷(4.10)振荡 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,吸取并弃掉正己烷,再加 3 mL 正己烷重复一次。剩余溶液在氮气吹干仪上 50°C 水浴吹干。用 0.5 mL 三氯甲烷溶解残余物,边摇边在超声波水浴中停留几秒钟,加入 3 mL 正己烷,涡旋混匀,倒入下接预处理好的 Sep-Park Amino Propyl 固相萃取柱(4.28)的贮液器(5.11)中,在固相萃取装置(5.4)上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过 Sep-Park Amino Propyl 固相萃取柱,待样液全部通过固相萃取柱后用 10 mL 正己烷淋洗固相萃取柱,弃去全部流出液。用 5 mL 洗脱液(4.20)洗脱到 25 mL 棕色离心管(5.9)中并在氮气吹干仪上 50°C 水浴吹干。

7.1.3 衍生化和再次净化

用 5 mL 0.1 mol/L pH=8 的磷酸盐缓冲溶液(4.15)溶解上述残留物,加入 0.3 mL 衍生剂(4.18),涡旋混合 1 min,在 50°C 恒温振荡水浴避光反应 3 h。衍生液放至室温,用 0.2 mol/L 盐酸溶液(4.16)调节 pH 值在 3~4 之间,溶液倒入下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.29)的贮液器中,在固相萃取装置上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 柱,待样液全部通过固相萃取柱后用 10 mL 水洗固相萃取柱,弃去全部流出液。用真空泵(5.7)在 65 kPa 负压下抽干 Oasis HLB 固相萃取柱 10 min。再用 5 mL 乙酸乙酯洗脱被测物于 25 mL 棕色离心管中,在氮气吹干仪上 50°C 水浴吹干,残余物加

300 μL 无水乙醇溶解,再加 700 μL 定容液(4.21)定容,混匀后过 0.2 μm 滤膜(4.30),供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 实测样品溶液的制备

称取待测样品 1 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 棕色离心管中,加入内标工作溶液,使其含量均为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 1 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 棕色离心管中,按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Atlantis C_{18} , 3.5 μm , 150 mm $\times$ 2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:45 $^{\circ}\text{C}$;
- c) 进样量:20 μL ;
- d) 流动相及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/($\mu\text{L}/\text{min}$)	0.3%乙酸水溶液/(%)	0.3%乙酸乙腈溶液/(%)
0.00	200	85	15
1.00	200	85	15
1.01	200	50	50
12.00	200	10	90
12.01	200	85	15
20.00	200	85	15

7.4.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 电喷雾电压(IS):4 500 V;
- e) 辅助气(AUX)流速:7 L/min;
- f) 辅助气温度(TEM):450 $^{\circ}\text{C}$;
- g) 聚焦电压(FP):140 V;
- h) 碰撞室出口电压(CXP):12 V;
- i) 定性离子对、定量离子对、采集时间、簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2 硫脲嘧啶、甲基硫脲嘧啶、正丙基硫脲嘧啶、它巴唑、巯基苯并咪唑的质谱参数

被测物及内标物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	采集时间 /ms	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
硫脲嘧啶衍生物	292/229	292/229	100	55	29
	292/216				29
甲基硫脲嘧啶衍生物	306/243	306/243	100	55	29
	306/230				31
正丙基硫脲嘧啶衍生物	334/271	334/271	100	55	30
	334/258				31

表 2(续)

被测物及内标物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	采集时间 /ms	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
它巴唑衍生物	278/202	278/202	100	50	32
	278/232				26
巯基苯并咪唑衍生物	314/238	314/238	100	52	36
	314/268				28
甲基巯基苯并咪唑衍生物(内标)	344/268	344/268	100	55	34
	344/281				35

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与混合基质标准校准溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内;且样品色谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液色谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

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	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

内标法定量:用仪器软件中的内标定量法定量。

外标法定量:在仪器最佳工作条件下,对混合基质标准校准溶液进样,以峰面积为纵坐标,混合基质校准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。五种甲基硫氧嘧啶的标准物质和内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图参见图 A.1。五种甲基硫氧嘧啶的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B.1。

7.5 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液和内标标准工作溶液,分别按 7.1.3 衍生、浓缩,得到相应浓度的混合标准衍生溶液和内标标准衍生溶液。用空白基质溶液(7.3)稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液,按 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

试样中被测组分残留量按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000}$$

.....(1)

式中:

- X——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——样品溶液所代表最终试样的质量,单位为克(g)。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,被测物的含量范围及重复性方程见表 4。

表 4 五种甲基硫氧嘧啶的含量范围及重复性和再现性方程

被测物名称	含量范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
硫脲嘧啶衍生物	2~20	$\lg r=0.879\ 7\lg m-0.854\ 2$	$\lg R=0.770\ 1\lg m-0.650\ 5$
甲基硫脲嘧啶衍生物	2~20	$\lg r=0.832\ 0\lg m-0.857\ 2$	$\lg R=1.023\ 9\lg m-0.844\ 6$
正丙基硫脲嘧啶衍生物	2~20	$\lg r=1.109\ 3\lg m-1.071\ 0$	$\lg R=1.034\ 8\lg m-0.890\ 0$
它巴唑衍生物	2~20	$r=0.132\ 7m-0.000\ 9$	$\lg R=1.013\ 0\lg m-0.788\ 5$
巯基苯并咪唑衍生物	2~20	$\lg r=1.059\ 9\lg m-0.932\ 1$	$\lg R=1.053\ 9\lg m-0.807\ 8$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,被测物的含量范围及再现性方程见表 4。

附 录 A
(资料性附录)

五种甲基硫氧嘧啶标准物质及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图

五种甲基硫氧嘧啶标准物质及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

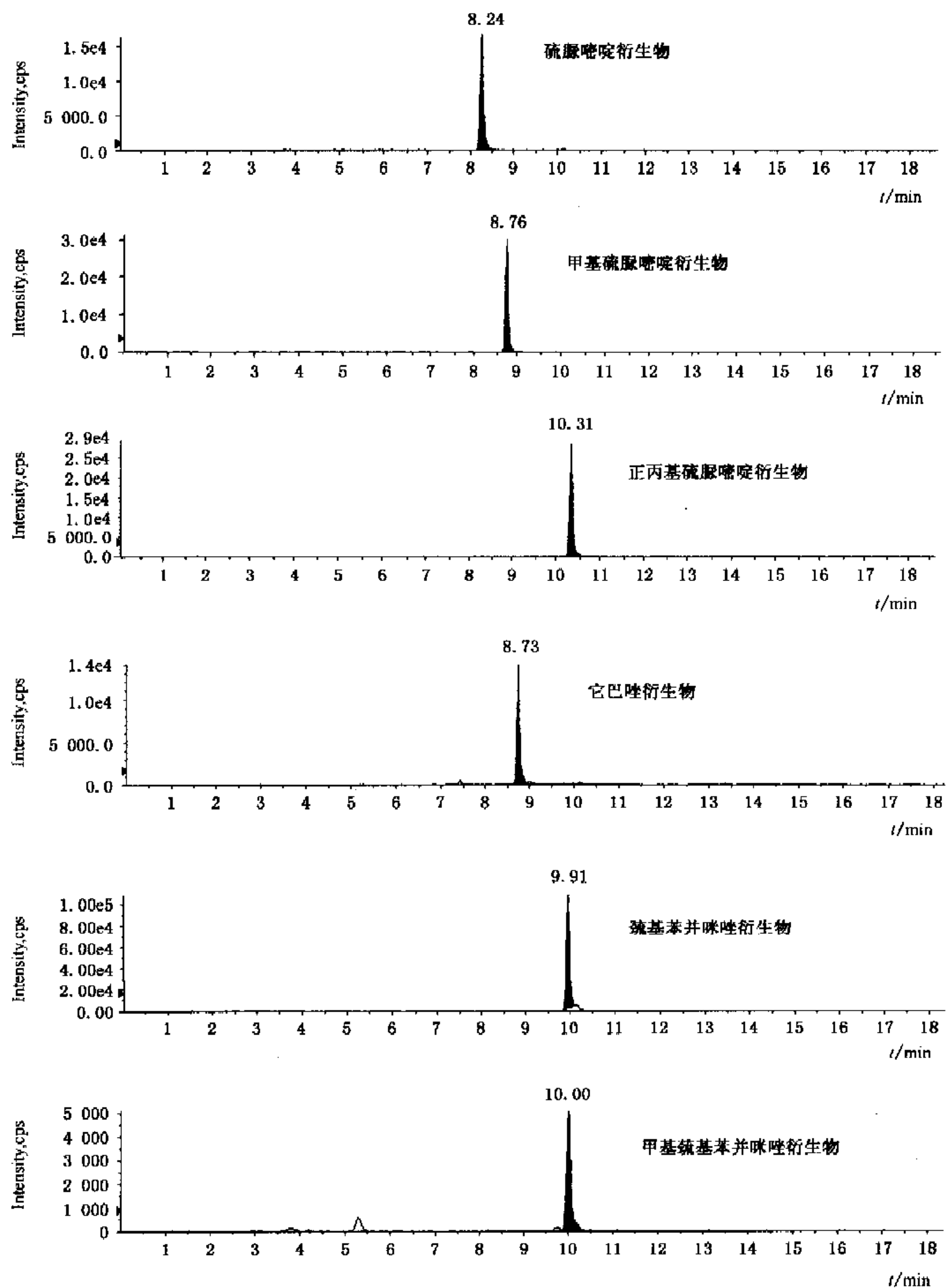


图 A.1 五种甲基硫氧嘧啶标准物质及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

牛甲状腺和牛肉中五种甲基硫氧嘧啶的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 五种甲基硫氧嘧啶的添加浓度及其平均回收率的试验数据

被测物名称	添加水平和平均回收率/(%)							
	2 μg/kg		5 μg/kg		10 μg/kg		20 μg/kg	
	牛甲状腺	牛肉	牛甲状腺	牛肉	牛甲状腺	牛肉	牛甲状腺	牛肉
硫腺嘧啶衍生物	86.6	88.9	87.1	89.9	82.1	86.5	83.2	87.8
甲基硫腺嘧啶衍生物	87.8	90.2	89.2	91.2	84.2	85.4	85.4	90.1
正丙基硫腺嘧啶衍生物	85.9	91.3	82.8	90.5	87.3	81.5	83.7	88.2
它巴唑衍生物	83.8	86.7	87.9	89.1	85.2	88.3	82.9	83.2
巯基苯并咪唑衍生物	85.6	88.4	84.6	87.2	87.1	82.1	81.7	85.4



GB/T 20742-2006

图书名称：兽药典

书号：155066-1-2006

定价：34.00 元