



中华人民共和国国家标准

GB/T××××—××××

食品安全国家标准
蜂产品中双甲脒及其代谢物残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of amitraz and its metabolites residues in bee products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本文件按照GB/T1.1—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》的规定起草编制。



食品安全国家标准

蜂产品中双甲脒及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂产品中双甲脒、2,4-二甲基苯胺残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中双甲脒、2,4-二甲基苯胺残留量的测定。

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 分析实验室用水规则和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

蜂蜜和蜂王浆中残留的药物用磷酸盐缓冲液和乙腈提取，氯化钠和无水硫酸镁基质固相分散净化，液相色谱-串联质谱检测，外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.3 磷酸二氢钾（KH₂PO₄）。

5.1.4 无水硫酸镁（MgSO₄）。

5.1.5 氯化钠（NaCl）。

5.2 溶液配制

5.2.1 磷酸二氢钾溶液（0.2 mol/L）：取磷酸二氢钾 13.6 g，用水溶解并稀释至 500 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.3 标准品及其纯度：双甲脒、2,4-二甲基苯胺，含量均≥98%，具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 单一标准储备液：分别准确称取 4 种药物标准品适量，用乙腈溶解，定容至 10mL，配制成 1000 mg/L 的标准储备液。于-18 ℃避光保存，有效期 3 个月。

5.4.2 混合标准储备液：分别准确吸取 4 种药物标准储备液 100 μL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至 10 mL，配制成浓度为 10 mg/L 的混合标准储备液。于-18 ℃避光保存，有效期 3 个月。

5.4.3 混合标准工作液：分别准确吸取适量 4 种药物混合标准储备液 1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至 10 mL，配制成浓度为 1 mg/L 的双甲脒及其代谢物混合标准工作液。于 4 ℃避光保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

微孔尼龙滤膜：0.22 μm。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾电离源。
- 6.2 涡旋振荡仪。
- 6.3 高速离心机：转速 8000 r/min 或以上。
- 6.4 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。
- 6.5 移液器：10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL、5000 μL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂产品，将其搅拌均匀。对有结晶的蜂蜜样品，在密闭情况下，置于不超过 60 ℃ 的水浴中解晶，待样品全部融化后搅匀，冷却至室温。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

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

7.2 试样的保存

蜂蜜样品于室温下避光保存；蜂王浆样品于-18 ℃下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 蜂蜜

称取蜂蜜试料（5±0.05）g 于 50mL 具塞塑料离心管中，加入 5 mL 磷酸盐缓冲液，涡旋混匀，加入 5.0 mL 乙腈，涡旋震荡 5 min，加入约 5 g 氯化钠，5 g 无水硫酸镁，立即剧烈震荡或涡旋震荡 5 min。于 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 5 min。准确量取 0.5 mL 上清液于 1.5 mL 塑料离心管中，用水稀释至 1.0 mL，混匀经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后，供液相色谱-串联质谱测定。

8.1.2 蜂王浆

称取蜂王浆试料 (2 ± 0.05) g于50mL具塞塑料离心管中, 加入2 mL磷酸盐缓冲液, 涡旋混匀, 加入10 mL乙腈, 涡旋震荡5 min, 加入约3 g氯化钠, 3 g无水硫酸镁, 立即剧烈震荡或涡旋振荡5 min。于4 °C下8000 r/min离心5 min。取0.5 mL上清液于1.5 mL塑料离心管中, 用水稀释至1.0 mL, 混匀经0.22 μ m尼龙滤膜过滤后, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.2 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量, 分别加入按7.1处理的蜂蜜或蜂王浆空白试料溶液中, 配制成浓度为1.0 μ g/L、5.0 μ g/L、10 μ g/L、15 μ g/L、20 μ g/L、25.0 μ g/L的基质匹配系列混合标准溶液, 供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积为纵坐标, 相应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制基质匹配标准曲线, 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色谱柱(100×2.1 mm, 2 μ m)或相当者;
- 流动相: A相: 0.1%甲酸溶液, B相: 甲醇, 洗脱梯度条件见表1;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 柱温: 35 °C;
- 进样量: 10 μ L。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
1.00	50	50
3.00	0	100
7.50	0	100
8.00	90	10
11.00	90	10

8.3.2 质谱参考条件

- 离子源: 电喷雾离子源;
 - 扫描方式: 正离子模式;
 - 检测方式: 多反应监测 (MRM);
 - 干燥气温度: 290 °C;
 - 干燥气流速: 11 L/min;
 - 雾化器压力: 45 psi;
 - 鞘气温度: 400 °C;
 - 鞘气流速: 12 L/min;
 - 毛细管电压: 3500 V;
- 选择离子参数设定见表2。

表 2 选择离子参数设定

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
-------	----------------	----------------

双甲脒	294.0 > 163.0 (16) 294.0 > 122.0 (35)	294.0 > 163.0 (16)
2, 4-二甲基苯胺	122.0 > 107.0 (20) 122.0 > 78.0 (48)	122.0 > 107.0 (20)

8.3.3 测定法

8.3.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试样溶液中双甲脒及其代谢物与校正标准溶液中双甲脒及其代谢物的保留时间偏差在±0.1min以内;且检测到的相对离子丰度,应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.3.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应穿插标准工作液,以便准确定量。双甲脒及其代谢物标准溶液的多反应监测色谱图参见附录B。

8.4 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中双甲脒及其代谢物的残留量按标准曲线或公式(1)计算:

$$X = \frac{C_S \times A \times V \times 1000}{A_S \times m \times 1000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X 一试样中相应的双甲脒及其代谢物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_S 一基质匹配标准溶液中相应的双甲脒及其代谢物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_S 一基质匹配标准溶液中相应的双甲脒及其代谢物峰面积;

A 一试样中相应的双甲脒及其代谢物峰面积;

V 一试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m 一试样质量的数值,单位为克(g);

f 一稀释因子,公式中蜂蜜为10,蜂王浆为20。

注:双甲脒及其代谢物残留量以双甲脒和2,4-二甲基苯胺残留量之和计。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法蜂蜜中双甲脒、2,4-二甲基苯胺、检测限为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$;蜂王浆中双甲脒、2,4-二甲基苯胺、检测限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法蜂蜜在 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%;蜂王浆在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

双甲脒及其代谢物的英文名称、分子式和 CAS 号

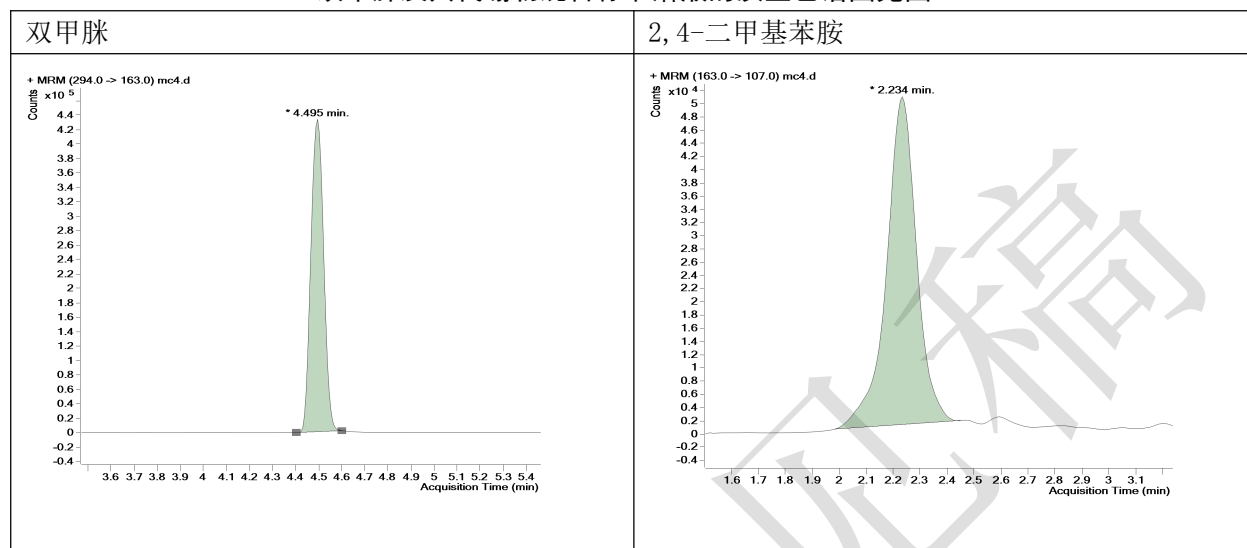
双甲脒及其代谢物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 双甲脒及其代谢物的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
双甲脒	Amitraz	$C_{19}H_{23}N_3$	33089-61-1
2, 4-二甲基苯胺	2,4-DiMethylaniline	$C_8H_{11}N$	95-68-1

附录 B
(资料性)

双甲脒及其代谢物混合标准溶液的质量色谱图见图 B. 1



图B.1双甲脒及其代谢物2,4-二甲基苯胺标准物质色谱图 (2.5 ng/mL)