



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 蜂产品中克百威残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-

Determination of carbofuran residue in bee products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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/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》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

蜂产品中克百威残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂蜜、蜂王浆和蜂花粉中克百威及其代谢物3-羟基克百威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、蜂王浆和蜂花粉中克百威及其代谢物3-羟基克百威残留量的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留药物用1%乙酸乙腈溶液提取，分散固相萃取净化，采用液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液外标法定量。

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 乙腈（ CH_3CN ），色谱纯。

5.1.2 乙酸（ CH_3COOH ），色谱纯。

5.1.3 甲酸（ HCOOH ），色谱纯。

5.1.4 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ），色谱纯。

5.1.5 氯化钠（ NaCl ）。

5.1.6 无水硫酸镁（ MgSO_4 ）。

5.2 溶液配制

5.2.1 1%乙酸乙腈溶液：取乙酸10 mL，用乙腈稀释至1000 mL。

5.2.2 0.1%甲酸-5 mmol/L乙酸铵水溶液：0.5 mL甲酸和0.193 g乙酸铵以水溶解并稀释至500 mL。

5.3 标准品

5.3.1 克百威 (Carbofuran, $C_{12}H_{15}NO_3$, 分子量: 221.26, CAS号: 1563-66-2): 纯度 $\geq 98.0\%$ 。

5.3.2 3-羟基克百威 (3-Hydroxycarbofuran, $C_{12}H_{15}NO_4$, 分子量: 237.25, CAS号: 16655-82-6): 纯度 $\geq 98.0\%$ 。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取克百威和3-羟基克百威标准品各约10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至100 mL容量瓶，配制成质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，有效期为6个月。

5.4.2 混合标准中间液：精密量取克百威和3-羟基克百威标准储备液0.2 mL和2 mL，用乙腈稀释定容至10 mL容量瓶，配制成克百威和3-羟基克百威浓度分别为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准中间液。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，有效期为3周。

5.4.3 混合标准工作液：精密量取混合标准中间液0.2 mL，用乙腈稀释定容至100 mL容量瓶，配制成克百威浓度为4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、3-羟基克百威浓度为40 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准工作溶液。再精密量取上述混合标准工作液0.1 mL、0.25 mL、0.5 mL、1 mL、2.5 mL、5 mL，用乙腈稀释定容至10 mL容量瓶，配制成克百威浓度为0.04 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和2 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，3-羟基克百威浓度为0.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列混合标准工作溶液。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，有效期为3周。

5.5 材料

5.5.1 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶 (PSA)：粒径40 μm ~60 μm 。

5.5.2 十八烷基硅烷键合硅胶 (C_{18})：粒径40 μm ~60 μm 。

5.5.3 微孔滤膜 (有机相)：0.22 μm 。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱联用仪：配有电喷雾离子源 (ESI)。

6.2 分析天平：感量0.000 01 g和0.01 g。

6.3 涡旋混合仪。

6.4 离心机：5000 r/min及以上。

6.5 组织捣碎机。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

蜂蜜。取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂蜜，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 °C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。

蜂王浆。取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂王浆，将其搅拌均匀；对于冷冻的供试样品，在常温下完全解冻后，搅拌均匀。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

蜂花粉。将供试样品粉碎后充分混匀。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

- a) 取均质的供试样品，作为供试试样。
- b) 取均质的空白样品，作为空白试样。
- c) 取均质的空白样品，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。常温保存。

蜂王浆。-18°C以下保存。

蜂花粉。常温保存。

8 测定步骤

8.1 前处理

称取试料（ 2 ± 0.05 ）g，于50 mL具塞聚丙烯离心管中，加入10 mL水、涡旋30 s混匀后静置10 min，加入5 mL 1%乙酸乙腈溶液，涡旋提取3 min，加入6 g无水硫酸镁和1.5 g氯化钠后立即手动剧烈振摇1 min，随后以5000 r/min离心5 min；取上清液1.0 mL至装有50 mg C₁₈、50 mg PSA和150 mg无水硫酸镁的2 mL离心管中，涡旋混匀30 s后以5000 r/min离心5 min，吸取上清液0.5 mL与0.5 mL水混匀，经0.22 μm滤膜过滤至进样小瓶，待液相色谱-串联质谱联用仪测定。

8.2 基质匹配标准工作溶液的制备

准确量取0.5 mL经提取和净化的空白试样上清液，氮气吹干，加入0.5 mL混合标准工作溶液复溶，与0.5 mL水混匀，过微孔滤膜配制成克百威浓度为0.02 μg/L、0.05 μg/L、0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L和2 μg/L，3-羟基克百威浓度为0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、

5 µg/L、10 µg/L和20 µg/L的系列基质混合标准工作溶液，供液相色谱串联质谱测定。以标准工作溶液质量浓度为横坐标，以定量离子峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ (2.1×50 mm, 1.7 µm) 或相当者。
b) 流动相：A: 乙腈, B: 0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A: 乙腈 %	B: 0.1%甲酸-5mmol/L 乙酸铵水溶液 %
0.00	20	80
2.50	20	80
2.60	30	70
6.00	30	70
6.10	90	10
8.00	90	10
8.10	20	80
9.00	20	80

- c) 流速: 0.2 mL/min;
d) 柱温: 40 °C;
e) 进样量: 10 µL。

8.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾 (ESI), 正离子模式
b) 扫描方式: 多反应监测 MRM;
c) 毛细管电压: 3 kV;
d) 离子源温度: 400 °C;
e) 雾化气流速: 800 L/h;
f) 碰撞气: 二级碰撞气为氩气;
g) 碰撞气流速: 0.15 mL/min;
h) 保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 2。

表2 保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

化合物	保留时间 min	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 <i>V</i>	碰撞能量 <i>eV</i>
克百威	5.33	222.0>123.0	222.0>165.0	30	18
		222.0>165.0			10
3-羟基克百威	1.79	238.1>163.0	238.1>181.1	30	14
		238.1>181.1			10

8.3.3 测定法

8.3.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中克百威、3-羟基克百威与基质匹配标准溶液中克百威、3-羟基克百威的保留时间偏差在±0.1 min以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的基质匹配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

取试样溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，按外标法定量，以峰面积计算。基质匹配标准溶液及试样溶液中克百威和3-羟基克百威响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱条件下，基质匹配标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录A。

8.4 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用完全相同的操作步骤进行平行操作

9 结果计算和表述

试样中克百威和3-羟基克百威残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中克百威或3-羟基克百威残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_s——基质匹配标准溶液中克百威或3-羟基克百威浓度，单位微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

A_s——基质匹配标准溶液中克百威或3-羟基克百威峰面积；

A——试样溶液中克百威或3-羟基克百威峰面积；

V ——提取液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试料质量，单位为克（g）；

f ——稀释因子，公式中为 2。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，含量不小于 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 的保留 3 位有效数字， $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下保留至小数点后 2 位。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本标准方法中克百威和 3-羟基克百威在蜂蜜、蜂王浆和蜂花粉中的检测限分别为 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本标准方法中克百威和 3-羟基克百威在蜂蜜、蜂王浆和蜂花粉中的定量限分别为 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法克百威在 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}\sim 2\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ；3-羟基克百威在 $2\mu\text{g}/\text{kg}\sim 20\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

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)
特征质量离子色谱图

克百威和3-羟基克百威基质匹配标准工作溶液特征质量离子色谱图见图A.1

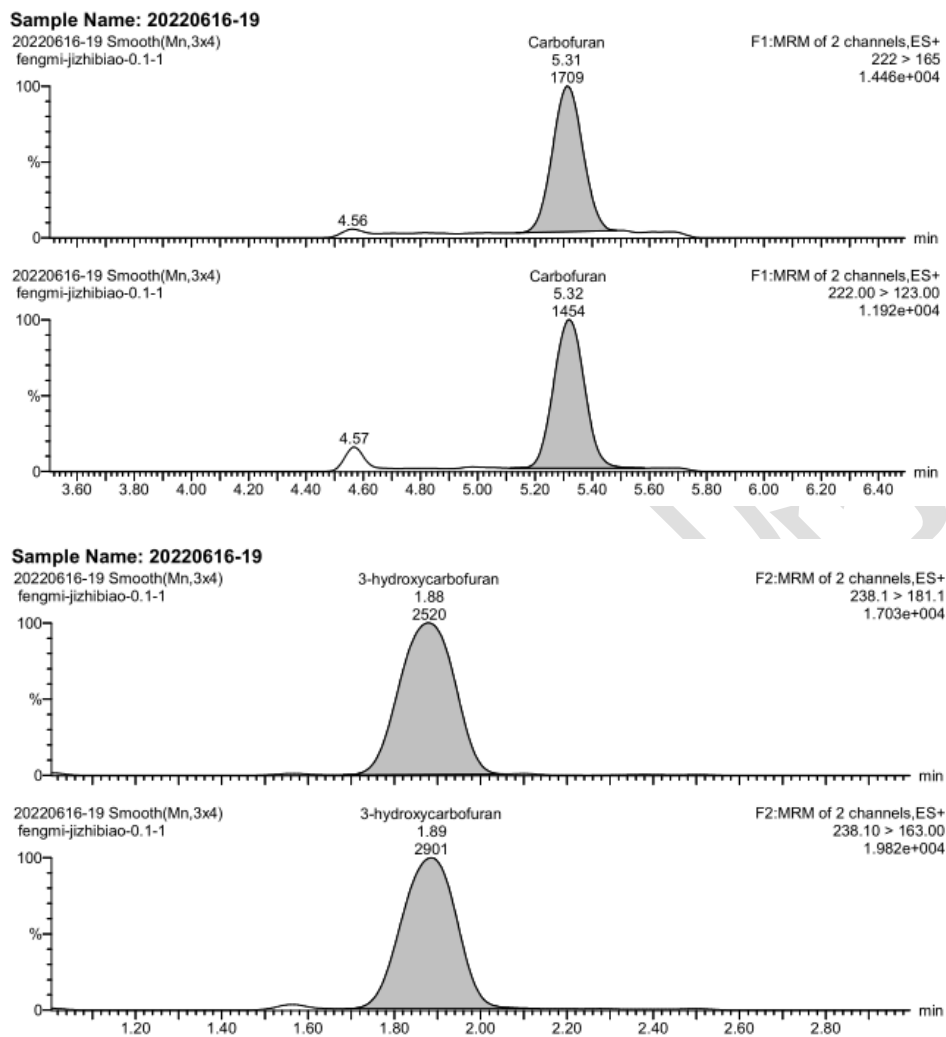


图 A.1 蜂蜜中 0.1 $\mu\text{g/L}$ 克百威 (5.32 min) 和 1 $\mu\text{g/L}$ 3-羟基克百威(1.89 min)基质匹配标准工作溶液特征质量离子色谱图