

中华人民共和国国家标准

GBxxxx—20xx

食品安全国家标准 动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶和 二甲氧甲基苄啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of trimethoprim, diaveridine and ormetoprim residues in animal
derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20xx-xx-xx 发布

20xx-xx-xx 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

动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶和二甲氧甲基苄啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶、二甲氧甲基苄啶残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、皮+脂肪，牛奶，鸡蛋，鱼皮+肉中甲氧苄啶、二甲氧苄啶、二甲氧甲基苄啶残留量的检测。

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

试样中残留的待测药物，用10%甲酸乙腈溶液提取，正己烷除脂，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

5 试剂与材料

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 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。
- 5.1.3 乙腈（ CH_3CN ）。
- 5.1.4 甲酸（ HCOOH ）。
- 5.1.5 甲醇（ CH_3OH ）。
- 5.1.6 正己烷（ C_6H_{14} ）。
- 5.1.7 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ）。
- 5.1.8 氨水（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）：25%~28%。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 10%甲酸乙腈溶液：取甲酸 50 mL，用乙腈稀释至 500 mL。现用现配。
- 5.2.2 20%乙腈溶液：取乙腈 20 mL，用水稀释至 100 mL。
- 5.2.3 乙腈饱和正己烷：取乙腈 50 mL、正己烷 150 mL，混合，涡旋 30 s，静置后取用上层液体。
- 5.2.4 5%氨化甲醇溶液：取氨水 5 mL，用甲醇稀释至 100 mL。现用现配。
- 5.2.5 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 1 mL，用乙腈稀释至 1 000 mL。
- 5.2.6 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1 000 mL。

5.3 标准品

- 5.3.1 甲氧苄啶 (Trimethoprim, TMP, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, CAS 号: 738-70-5)，含量 $\geq 98\%$ 。
- 5.3.2 二甲氧苄啶 (Diaveridine, DVD, $C_{13}H_{16}N_4O_2$, CAS 号: 5355-16-8)，含量 $\geq 98\%$ 。
- 5.3.3 二甲氧甲基苄啶 (Ormetoprim, OMP, $C_{14}H_{18}N_4O_2$, CAS 号: 6981-18-6)，含量 $\geq 98\%$ 。
- 5.3.4 氘代甲氧苄啶 (Trimethoprim D₉, TMP-D₉, $C_{14}H_9D_9N_4O_3$)。
- 5.3.5 氘代二甲氧苄啶 (Diaveridine D₆, DVD-D₆, $C_{13}H_{10}D_6N_4O_2$)。

5.4 标准溶液制备

- 5.4.1 标准储备液：取 TMP、DVD 和 OMP 标准品各适量(相当于各活性成分约 10 mg)，精密称定，分别加甲醇适量使溶解并定容于 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的 TMP、DVD 和 OMP 标准储备液。—18℃以下保存，有效期 3 个月。
- 5.4.2 100 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准储备液：分别精密量取各标准储备液 1 mL，用乙腈稀释并定容于 10 mL 容量瓶中，制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准储备液。—18℃以下保存，有效期 3 个月。
- 5.4.3 系列混合标准工作液：精密量取混合标准储备液适量，用乙腈稀释，制成浓度分别为 0.6、1、2、5、10、20 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合标准工作液。—18℃以下保存，有效期 1 个月。
- 5.4.4 内标储备液：取 TMP-D₉ 和 DVD-D₆ 标准品各适量(至少相当于各活性成分约 1 mg)，精密称定，分别加甲醇适量使溶解并定容于 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液。—18℃以下保存。
- 5.4.5 混合内标工作液：精密量取各内标储备液 0.5 mL，用乙腈稀释并定容于 10 mL 容量瓶中，制成浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的混合内标工作液。—18℃以下保存。

5.5 材料

- 5.5.1 微孔滤膜：0.2 μm ，有机系。
- 5.5.2 混合型强阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3mL，或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱—串联质谱仪：带电喷雾电离源 (ESI)。
- 6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.001 g。
- 6.3 均质机。
- 6.4 水浴超声仪：工作频率 40 KHz。
- 6.5 高速冷冻离心机：离心力 $\geq 4\ 500\ g$ 。
- 6.6 涡旋混合器。

- 6.7 恒温水浴锅。
- 6.8 氮吹仪或其他浓缩仪。
- 6.9 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并均质。

- 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。

7.1.2 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

- 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。

7.1.2 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳，并均质。

- 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

-18℃以下保存，避免反复冻融。

8 试验步骤

8.1 提取

8.1.1 肌肉、肝脏、肾脏、鸡蛋、鱼皮+肉

称取试料(2±0.05)g，置于50 mL离心管中，加入5 μg/mL的混合内标工作溶液20 μL，涡旋混匀后，加水10 mL，涡旋1 min使完全分散；加入无水硫酸钠5 g，涡旋1 min使充分溶解；加入10%甲酸乙腈溶液10 mL，涡旋1 min，水浴超声处理10 min(40 KHz)，涡旋1 min。4℃条件下，4500 g离心10 min。

8.1.2 皮+脂肪

称取试料(2±0.05)g，置于50 mL离心管中，于50℃水浴中使完全融化，加入5 μg/mL的混合内标工作溶液20 μL，涡旋混匀后，加入提前温热至50℃的水10 mL，涡旋1 min，

加入无水硫酸钠 5 g, 涡旋 1 min 使充分溶解; 加入 10%甲酸乙腈溶液 10 mL, 50 °C水浴保温 10 min, 涡旋 1 min, 水浴超声处理 10 min (40 KHz), 50 °C水浴保温 10 min, 涡旋 1 min。4 °C条件下, 4500 g 离心 10 min。

8.1.3 牛奶

称取试料(2±0.05)g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 µg/mL 的混合内标工作溶液 20 µL, 涡旋混匀后, 加入无水硫酸钠 5 g, 涡旋 1 min 使充分溶解; 加入 10%甲酸乙腈溶液 10 mL, 涡旋 1 min, 水浴超声处理 10 min (40 KHz), 涡旋 1 min。4 °C条件下, 4500 g 离心 10 min

8.2 净化

将离心后的有机相提取液转移至另一 50 mL 离心管中, 加入乙腈饱和正己烷溶液 10 mL, 涡旋 1 min, 静置分层后, 弃去正己烷层, 备用。

固相萃取柱依次用水、甲醇各 3 mL 活化。取备用液过柱, 用水、甲醇各 3 mL 依次淋洗, 抽干, 5%氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱。收集洗脱液, 于 40 °C浓缩至近干。残余物中加入 20%乙腈溶液 2 mL 充分溶解, 滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取 TMP、DVD 和 OMP 的系列混合标准工作液及混合内标工作液适量, 以 20%乙腈溶液稀释, 配制成待测药物浓度均为 3 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 250 ng/mL 的系列标准工作液, 含内标均为 50 ng/mL, 用于肌肉、肝脏、肾脏、皮+脂肪、牛奶和鱼皮+肉等样品的检测; 配制成待测药物浓度为 3 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 和 100 ng/mL 的系列标准工作液, 含内标均为 50 ng/mL, 用于鸡蛋样品的检测。以待测药物和其对应内标的特征离子峰面积之比为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。以合适的加权方式进行线性回归, 求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 色谱参考条件

- 色谱柱: C₁₈ (3.0 mm × 50 mm, 1.8 µm), 或相当者;
- 柱温: 35 °C;
- 进样量: 5 µL;
- 流速: 0.4 mL/min;
- 流动相: A 为 0.1%甲酸乙腈溶液, B 为 0.1%甲酸溶液, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间, min	0.1%甲酸乙腈溶液, %	0.1%甲酸溶液, %
0	10	90
2.0	10	90
2.5	90	10
4.0	90	10
4.5	10	90
5.5	10	90

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测；
- d) 毛细管电压：+4 000 V；
- e) 喷雾器压力：33 psi；
- f) 干燥气温度：350 °C；
- g) 干燥气流量（氮气）：11 L/min；
- h) 定性离子对、定量离子对，及对应的碎裂电压、碰撞能量参考值及对应内标见表 2。

表 2 待测药物特征离子对、碎裂电压、碰撞能量参考值及对应内标

药物	母离子 m/z	子离子 m/z	碎裂电压 V	碰撞能量 eV	内标
TMP	291.2	230.1*	135	28	TMP-D ₉
	291.2	123.1	135	30	
TMP-D ₉	300.3	234.2*	135	30	—
DVD	261.2	245.1*	130	29	DVD-D ₆
	261.2	123.1	130	29	
DVD-D ₆	267.3	247.1*	130	30	—
OMP	275.3	259.1*	130	26	TMP-D ₉
	275.3	123.1	130	26	

注：*，为定量离子

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中待测药物与其对应内标的保留时间之比，与标准溶液中待测药物与其对应内标的保留时间之比偏差在 1% 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%。

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和标准工作液，作单点或多点校准，按内标法定量。系列标准工作液及试料溶液中待测药物与其相应内标峰面积比，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，标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录 A。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加待测药物的标准溶液外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{C_S \times C_{iS} \times A \times A'_{iS} \times V}{C'_{iS} \times A_S \times A_{iS} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中待测药物的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_S ——标准溶液中待测药物的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

C_{iS} ——试料溶液中待测药物对应内标的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

C'_{iS} ——标准溶液中待测药物对应内标的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

A ——试料溶液中待测药物的峰面积；

A'_{iS} ——标准溶液中待测药物对应内标的峰面积；

A_S ——标准溶液中待测药物的峰面积；

A_{iS} ——试料溶液中待测药物对应内标的峰面积；

V ——溶解残余物的20%乙腈溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——供试试料的质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留3位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法中肌肉、肝脏、肾脏、皮+脂肪、鱼皮+肉等组织和牛奶在 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 250 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上，鸡蛋在 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上的准确度均为70%~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)

标准溶液特征离子质量色谱图

待测药物标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。

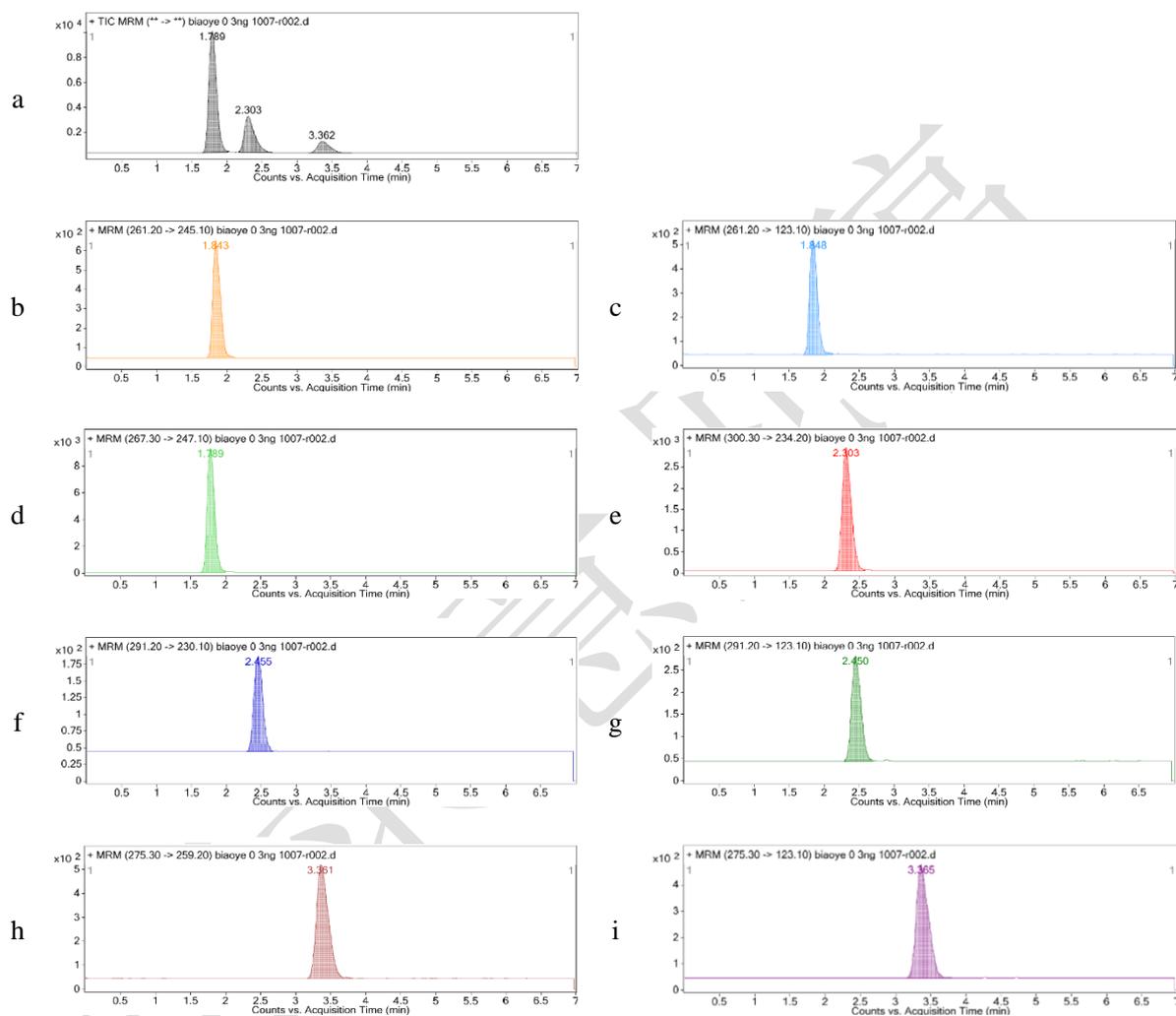


图 A.1 待测药物标准溶液特征离子质量色谱图

(a TIC, b、c DVD 3 $\mu\text{g/L}$, d DVD-D₆ 50 $\mu\text{g/L}$, e TMP-D₉ 50 $\mu\text{g/L}$,f、g TMP 3 $\mu\text{g/L}$, h、i OMP 3 $\mu\text{g/L}$)