

中华人民共和国国家标准

GB ×××××-××××

食品安全国家标准
动物性食品中有机磷类药物残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of organophosphorus pesticides residue in animal derived
food by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

(送审稿)

202×-××-××发布

202×-××-××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 发布
国家市场监督管理总局

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

动物性食品中有机磷类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中敌百虫、敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、二嗪农等7种有机磷类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡、猪、牛、羊的肌肉和脂肪，鸡蛋和牛奶中敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、敌百虫、二嗪农等7种有机磷类药物残留量的检测。

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

文件中没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的有机磷类药物经酸化的乙腈-二氯甲烷溶液提取，酸性氧化铝柱净化，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 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.3 丙酮（ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ）：色谱纯。

5.1.4 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

5.1.5 二氯甲烷（ CH_2Cl_2 ）。

5.1.6 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ）。

5.1.7 氯化钠（ NaCl ）。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸丙酮溶液：取甲酸 0.1 mL 于 100 mL 容量瓶，加丙酮定容至 100 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 0.1 mL 于 100 mL 容量瓶，加乙腈定容至 100 mL，混匀。

5.2.3 酸化乙腈-二氯甲烷溶液（6:4，v/v）：取乙腈 600 mL、二氯甲烷 400 mL 和甲酸 1 mL，混匀。

5.2.4 0.1% 甲酸水溶液（含乙酸铵 1.25 mmol/L）：取 0.0986 g 乙酸铵、1 mL 甲酸溶解并稀释于 1 L 水中，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 有机磷类标准品：敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、敌百虫、二嗪农，含量均 $\geq 95.0\%$ ，具体信息见附录 A。

5.3.2 同位素内标标准品：敌敌畏-D₆、倍硫磷-D₆、马拉硫磷-D₆、敌百虫-D₆、二嗪农-D₁₀，含量均 $\geq 92.0\%$ ，具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液：取有机磷类标准品各适量（相当于各待测组分 10 mg），精密称定，分别用丙酮（敌百虫用 0.1% 甲酸丙酮溶液）溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，配制成浓度均为 1 mg/mL 的标准储备液。-20 °C 以下避光保存，有效期 1 年。

5.4.2 混合标准储备液：精密量取敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、敌百虫标准储备液各 1 mL 和二嗪农标准储备液 0.2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% 甲酸乙腈溶液稀释至刻度，配制成二嗪农浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，其他有机磷类药物浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

5.4.3 混合标准中间液：精密量取混合标准储备液 1 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% 甲酸乙腈溶液稀释至刻度，配制成二嗪农浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，其他有机磷类药物浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

5.4.4 混合标准工作液：精密量取混合标准中间液 2 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% 甲酸乙腈溶液稀释至刻度，配制成二嗪农浓度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ，其他有机磷类药物浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。4 °C 以下避光保存，临用现配。

5.4.5 内标储备液：取敌敌畏-D₆、倍硫磷-D₆、马拉硫磷-D₆、敌百虫-D₆、二嗪农-D₁₀ 内标各 1 mg，精密称定，分别用丙酮（敌百虫用 0.1% 甲酸丙酮溶液）溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，配制成浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液。-20 °C 以下避光保存，有效期 3 个月。

5.4.6 混合内标中间液：精密量取敌敌畏-D₆、倍硫磷-D₆、马拉硫磷-D₆、敌百虫-D₆ 内标储备液各 1 mL 和二嗪农-D₁₀ 内标储备液 0.2 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% 甲酸乙腈溶液稀释至刻度，配制成二嗪农-D₁₀ 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，其他有机磷类药物内标的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合内标工作液。4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

5.4.7 混合内标工作液：精密量取混合标准中间液 2 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% 甲酸乙腈溶液稀释至刻度，配制成二嗪农-D₁₀ 浓度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ，其他有机磷类药物内标的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。4 °C 以下避光保存，临用现配。

5.5 材料

5.5.1 酸性氧化铝固相萃取柱：1000 mg/12 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.22 μm 有机系尼龙滤膜。

5.5.3 钢珠：304 不锈钢珠，直径 1 cm。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.3 氮吹仪。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 高速冷冻离心机。
- 6.6 垂直振荡仪，或相当者。
- 6.7 固相萃取装置。
- 6.8 恒温水浴锅。
- 6.9 刻度离心管：15 mL 和 50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混匀并均质。

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

7.1.2 鸡蛋

取新鲜或解冻的鸡蛋，去壳，将全蛋于匀浆机中充分混匀并均质。

- 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。

7.1.3 肌肉、脂肪组织

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

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 肌肉组织、鸡蛋、牛奶

取试样（ 2 ± 0.02 ）g，于50 mL离心管中，加入50 μ L混合内标工作液（5.4.7），于旋涡混合器上涡旋15 s，静置20 min。加入氯化钠0.5 g和酸化乙腈-二氯甲烷溶液（5.2.3）10 mL，以2 000 r/min涡旋30 s，加入4个钢珠，置于垂直振荡仪中，在速度500 冲/min的条件下混合20 min（或等效条件），于-4℃条件下，8 000 r/min离心5 min，取上清液，备用。

8.1.2 脂肪组织

取试样(2±0.02) g, 于50 mL离心管中, 加入50 μ L混合内标工作液(5.4.7), 于涡旋混合器上涡旋15 s, 静置20 min。加入氯化钠0.5 g和酸化乙腈-二氯甲烷溶液(5.2.3) 10 mL, 以2 000 r/min涡旋30 s, 加入4个钢珠, 如果脂肪组织因低温凝固, 40℃水浴适当微热至脂肪易于涡旋混匀, 置于垂直振荡仪中, 在速度500 冲/min的条件下混合20 min(或等效条件), 于-20℃冷冻30 min, 于-4℃条件下, 8 000 r/min离心5 min, 取上清液, 备用。

8.2 净化

在酸性氧化铝固相净化柱中加入3 g无水硫酸钠, 用乙腈5 mL和酸化乙腈-二氯甲烷溶液(5.2.3) 5 mL活化, 弃去活化液。取备用液过柱, 待备用液过完后加入酸化乙腈-二氯甲烷溶液(5.2.3) 2 mL洗柱, 待其自然流出, 收集过柱后的备用液以及洗柱液, 于15 mL刻度离心管中, 35℃氮气吹至近干(不得完全吹干)后取出, 残余物用1 mL甲醇溶解, 涡旋15 s, 滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取适量混合标准工作液适量和50 μ L混合内标工作液(5.4.7)用经提取净化后的空白试样溶液稀释配制成敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、敌百虫浓度为10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L和500 μ g/L, 二嗪农浓度为2 μ g/L、4 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L和100 μ g/L的系列基质匹配标准工作溶液(内标敌敌畏-D₆、倍硫磷-D₆、马拉硫磷-D₆、敌百虫-D₆浓度均为100 μ g/L, 二嗪农-D₁₀浓度均为20 μ g/L); 临用现配。以特征离子质量色谱峰面积与对应内标的色谱峰面积之比为纵坐标, 标准溶液浓度与对应内标的浓度之比为横坐标, 绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C₁₈色谱柱(50 mm×3.0 mm, 1.8 μ m)或相当者;
- 流动相: A为0.1%甲酸水溶液(含乙酸铵1.25 mmol/L), B为甲醇, 梯度洗脱程序见表1;
- 流速: 0.25 mL/min;
- 柱温: 30℃;
- 进样量: 2 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.0	30	70
7.0	30	70
7.1	1	99
10.0	1	99
10.1	50	50
10.6	30	70
12.0	30	70

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源: 电喷雾(ESI)离子源;
- 扫描方式: 正离子扫描;
- 检测方式: 多反应监测(MRM);
- 雾化气温度: 200℃;
- 雾化气流速: 10 L/min;

- f) 雾化气压力: 35 psi;
g) 鞘气温度: 200 °C;
h) 鞘气流速: 9 L/min;
i) 喷雾电压: 4000 V;
j) 喷嘴电压: 500 V;
k) 定性离子对、定量离子对、裂解电压和碰撞能量见表2。

表 2 定性离子对、定量离子对、裂解电压和碰撞能量

化合物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	裂解电压(V)	碰撞能量(eV)
敌百虫	258.9>79.0	258.9>108.9	85	32
	258.9>108.9			16
敌敌畏	221.1>109.1	221.1>109.1	98	18
	221.1>79.1			26
辛硫磷	299.0>129.0	299.0>77.0	60	8
	299.0>77.0			44
巴胺磷	282.0>155.9	282.0>137.9	60	12
	282.0>137.9			16
倍硫磷	279.1>247.0	279.1>247.0	79	10
	279.1>169.0			14
二嗪农	305.1>169.0	305.1>169.0	135	20
	305.1>153.0			20
马拉硫磷	330.9>127.0	330.9>127.0	85	12
	330.9>99.0			24
敌百虫-D ₆	265.0>115.0	265.0>115.0	100	18
敌敌畏-D ₆	227.2>115.0	227.2>115.0	77	18
倍硫磷-D ₆	285.3>250.1	285.3>250.1	110	12
二嗪农-D ₁₀	315.1>170.0	315.1>170.0	135	20
马拉硫磷-D ₆	337.0>127.1	337.0>127.1	85	12

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中有机磷类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中有机磷类药物的保留时间偏差在±2.5%以内, 且检测到的相对离子比率, 应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子比率一致, 其允许相对偏差不超过 40%。

8.4.3.2 定量测定

按8.4.1和8.4.2设定仪器条件, 以基质匹配标准溶液浓度与对应内标的浓度之比为横坐标, 目标物色谱峰面积与对应内标的色谱峰面积之比为纵坐标, 绘制标准曲线, 作单点或多点校准, 按内标法计算试

样中药物的残留量。其中敌百虫以敌百虫-D₆为内标；敌敌畏以敌敌畏-D₆为内标；倍硫磷以倍硫磷-D₆为内标；马拉硫磷、巴胺磷以马拉硫磷-D₆为内标；辛硫磷、二嗪农以二嗪农-D₁₀为内标。基质匹配标准溶液及试样溶液中目标物的响应值应在仪器检测的线性范围内，在上述色谱和质谱条件下，基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。对于试样中有机磷类药物残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质添加内标并经前处理获得空白基质溶液稀释后重新测定。

8.5 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

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算。

$$\omega = \frac{A \times A'_{is} \times \rho_s \times \rho_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times \rho'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω —试样中被测组分的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

ρ_{is} —试样溶液中被测组分对应内标物的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ_s —混合标准工作液中被测组分的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ'_{is} —混合标准工作液中测组分对应内标物的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A —试样溶液中被测组分的峰面积；

A_{is} —试样溶液中被测组分峰对应内标的峰面积；

A_s —混合标准工作液中被测组分的峰面积；

A'_{is} —混合标准工作液中内标的峰面积；

V —试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试样质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果不小于 $1 \mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字。

10 方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法敌百虫、敌敌畏、倍硫磷、辛硫磷、巴胺磷、马拉硫磷的检测限为 $5 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $10 \mu\text{g/kg}$ ；二嗪农的检测限为 $1 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法敌百虫在 $10 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，敌敌畏在 $10 \sim 200 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，倍硫磷在 $10 \sim 200 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，辛硫磷在 $10 \sim 800 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，巴胺磷在 $10 \sim 180 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，马拉硫磷在 $10 \sim 8000 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平，二嗪农在 $2.0 \sim 1400 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~120%。

10.3 精密度

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

附 录 A
(资料性)
药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

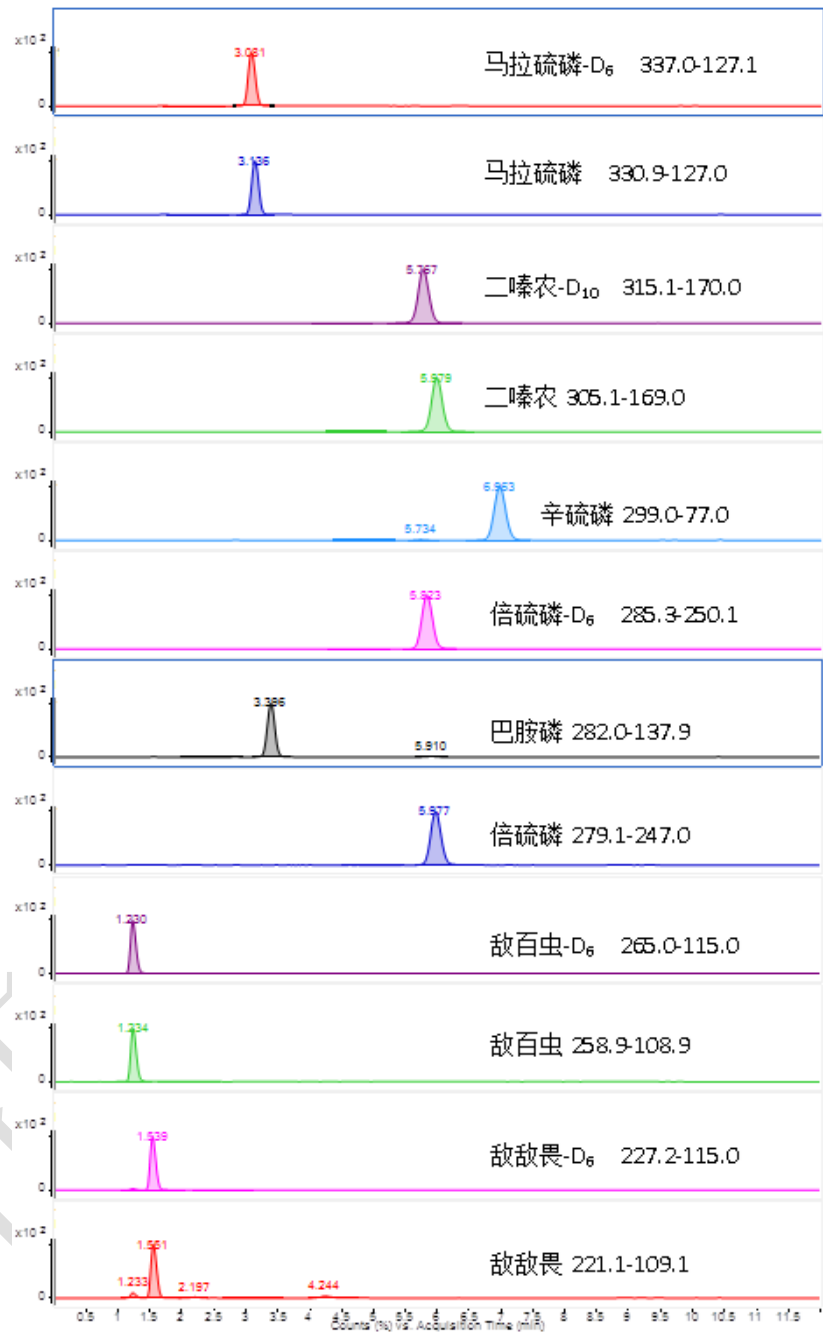
药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表A.1

表 A. 1 药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
敌百虫	Trichlorfon	$C_4H_8Cl_3O_4P$	52-68-6
敌敌畏	Dichlorvos	$C_4H_7Cl_2O_4P$	62-73-7
辛硫磷	Phoxim	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	14816-18-3
巴胺磷	Propetamphos	$C_{10}H_{20}NO_4PS$	31218-83-4
倍硫磷	Fenthion	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	55-38-9
二嗪农	Diazinon	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	333-41-5
马拉硫磷	Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	121-75-5
敌百虫-D ₆	Trichlorfon-D ₆	$C_4H_2Cl_3D_6O_4P$	1451910-96-5
敌敌畏-D ₆	Dichlorvos-D ₆	$C_4HCl_2D_6O_4P$	203645-53-8
倍硫磷-D ₆	Fenthion-D ₆	$C_{10}H_9D_6O_3PS_2$	1189662-83-6
二嗪农-D ₁₀	Diazinon-D ₁₀	$C_{12}H_{11}D_{10}N_2O_3PS$	100155-47-3
马拉硫磷-D ₆	Malathion-D ₆	$C_{10}H_{13}D_6O_6PS_2$	1189877-72-2

附录B
(资料性)
标准物质选择离子质量色谱图

有机磷类基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图参见图B. 1



注：二嗪农为 4 μg/L，敌敌畏、倍硫磷、马拉硫磷、辛硫磷、巴胺磷、敌百虫均为 20 μg/L

图 B.1 鸡肉基质匹配标准溶液的特征离子质量色谱图