



中华人民共和国国家标准

GB 31613.5—2022

食品安全国家标准 鸡可食组织中抗球虫药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of coccidiostats residues in chicken edible tissues by
liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2022-09-20 发布

2023-02-01 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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

鸡可食组织中抗球虫药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了鸡可食组织中常山酮、氯苯胍、盐霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、马度米星铵和拉沙洛西 7 种抗球虫药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡肌肉、肝脏和皮脂(皮+脂)中常山酮、氯苯胍、盐霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、马度米星铵和拉沙洛西 7 种抗球虫药物残留量的检测。

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的抗球虫药物经胰蛋白酶酶解,乙酸乙酯提取,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法检测,基质匹配外标法定量。

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 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.3 乙酸(CH_3COOH):色谱纯。

5.1.4 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.5 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$):色谱纯。

5.1.6 胰蛋白酶:来源于牛胰腺, $\geq 10\,000\text{ U/mg}$ 。

5.1.7 碳酸钠(Na_2CO_3)。

5.2 溶液配制

5.2.1 10%碳酸钠溶液:取碳酸钠 20 g,加水适量使溶解并稀释至 200 mL,混匀。

5.2.2 1%乙酸溶液:取乙酸 1 mL,用水稀释至 100 mL,混匀。

5.2.3 20%甲醇溶液:取甲醇 20 mL,用水稀释至 100 mL,混匀。

5.2.4 洗脱液:取甲醇 100 mL,加乙酸乙酯 200 mL,混匀。

5.2.5 复溶液:取甲醇 50 mL,加水 50 mL、甲酸 0.1 mL,混匀。

5.3 标准品

常山酮、氯苯胍、盐霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、马度米星铵、拉沙洛西含量 $\geq 95\%$ 。具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(1 mg/mL):取常山酮、氯苯胍、盐霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、马度米星铵、拉沙洛西标准品适量(相当于各有效成分 10 mg),精密称定,分别加甲醇适量使溶解并稀释定容于 10 mL 容量瓶,配制成浓度均为 1 mg/mL 的标准储备液。—18 °C 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作液(10 µg/mL):分别精密量取标准储备液各 0.1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 µg/mL 的混合标准工作液。—18 °C 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准工作液(1 µg/mL):精密量取 10 µg/mL 的混合标准工作液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 µg/mL 的混合标准工作液。—18 °C 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.4 混合标准工作液(0.1 µg/mL):精密量取 1 µg/mL 的混合标准工作液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 0.1 µg/mL 的混合标准工作液。—18 °C 以下避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 三键键合 C₁₈ 固相萃取柱:500 mg/6 mL,或相当者。

5.5.2 尼龙微孔滤膜:0.22 µm。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.3 高速冷冻离心机:10 000 r/min。

6.4 组织匀浆机。

6.5 涡旋混合器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

6.8 水浴摇床。

6.9 pH 计。

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 °C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料 1 g(准确至 ±0.01 g),加胰蛋白酶 25 mg、水 5 mL,涡旋 1 min,用 10%碳酸钠溶液调 pH 至 7.5,40 °C 水浴过夜酶解。取出放至室温,加 10%碳酸钠溶液 1 mL,涡旋 1 min。加乙酸乙酯 9 mL,涡旋 5 min,于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,转移上清液,残渣重复提取 1 次。合并 2 次提取液,用乙酸乙酯稀释至 20.0 mL,混匀。取提取液 2.0 mL 于 35 °C 水浴氮气吹干,加乙腈 1 mL 涡旋 1 min,加水 10 mL,混匀,备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇 5 mL、1%乙酸溶液 5 mL 活化,取备用液全部过柱,控制流速为每 2 s~3 s

1 滴。用 1%乙酸溶液 3 mL 和 20%甲醇溶液 3 mL 淋洗,用洗脱液 10 mL 洗脱。收集洗脱液,35 ℃水浴氮气吹干,加复溶液 1.0 mL 涡旋 1 min,于-4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,过滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取 6 份空白样品经提取和净化后,加入适量的标准工作液,35 ℃水浴氮气吹干,加复溶液 1.0 mL 涡旋 1 min,配制成浓度为 0.5 μg/L、1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L 和 50 μg/L 的基质匹配标准溶液,于-4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,过滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,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(50 mm×2.1 mm,1.7 μm),或相当者;
- 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为 0.1%甲酸甲醇溶液;
- 梯度洗脱:梯度洗脱程序见表 1;
- 流速:0.3 mL/min;
- 柱温:30 ℃;
- 进样量:10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0	90	10
0.5	90	10
1.0	0	100
2.0	0	100
2.1	90	10
4.0	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾(ESI)离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 电离电压:4.0 kV;
- e) 离子源温度:100 ℃;
- f) 雾化温度:350 ℃;
- g) 锥孔气流速:30 L/h;
- h) 雾化气流速:600 L/h;
- i) 待测药物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值见表 2。

表 2 待测药物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
常山酮	416.0>100.2	416>120.2	25	20
	416.0>120.2			20
氯苯胍	334.2>138.1	334.2>155.1	35	30
	334.2>155.1			20
盐霉素	773.5>265.2	773.5>265.2	55	40
	773.5>531.4			55
莫能菌素	693.5>461.4	693.5>461.4	55	50
	693.5>479.4			50

表 2 (续)

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
甲基盐霉素	787.7>431.5	787.6>431.5	60	50
	787.7>531.5			40
马度米星铵	939.2>859.5	939.5>877.5	45	50
	939.2>877.5			30
拉沙洛西	613.4>377.4	613.4>377.4	45	35
	613.4>577.5			35

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中抗球虫药物的保留时间与基质匹配标准工作液中抗球虫药物的保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和基质匹配标准工作液,作单点或多点校准,按外标法定量。基质匹配标准工作液及试料溶液中目标物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,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

试样中抗球虫药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中抗球虫药物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- A——试样中抗球虫药物的峰面积;
- C_s——基质匹配标准溶液中抗球虫药物浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- V₁——提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V₂——分取提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V₃——复溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- A_s——基质匹配标准溶液中抗球虫药物的峰面积;
- m——试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 5 μg/kg,定量限为 10 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 10 μg/kg~100 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 60%~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)

抗球虫药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

抗球虫药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 抗球虫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
常山酮	Halofuginone	$C_{16}H_{17}BrClN_3O_3$	55837-20-2
氯苯胍	Robenidine	$C_{15}H_{13}Cl_2N_5$	25875-51-8
盐霉素	Salinomycin	$C_{42}H_{70}O_{11}$	53003-10-4
莫能菌素	Monensin	$C_{36}H_{62}O_{11}$	17090-79-8
甲基盐霉素 A	Narasin A	$C_{43}H_{72}O_{11}$	55134-13-9
马度米星铵	Maduramicin Ammonium	$C_{47}H_{83}NO_{17}$	84878-61-5
拉沙洛西	Lasalocid	$C_{34}H_{54}O_8$	25999-31-9

附录 B

(资料性)

抗球虫药物标准溶液特征离子质量色谱图

抗球虫药物标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。

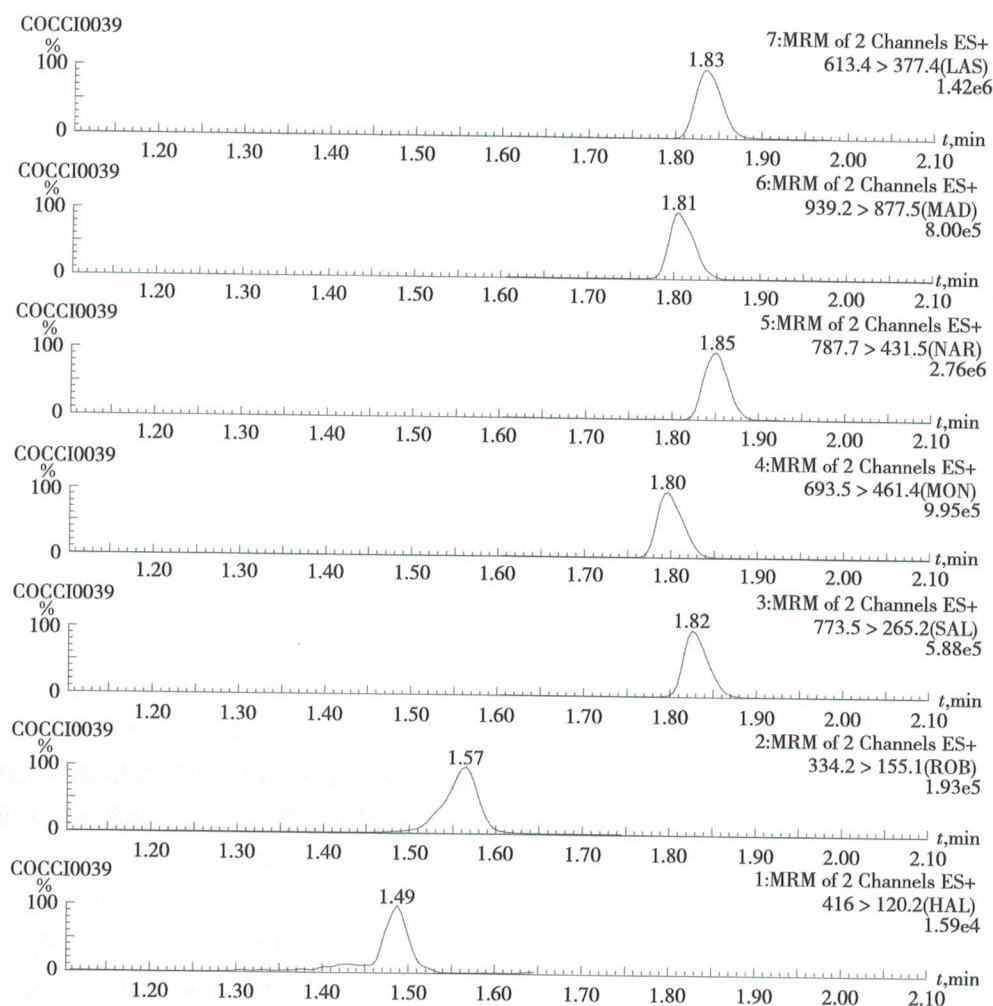


图 B.1 抗球虫药物标准溶液特征离子质量色谱图 (1 µg/L)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品安全国家标准 鸡可食组织中抗球虫药物
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
GB 31613.5—2022

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

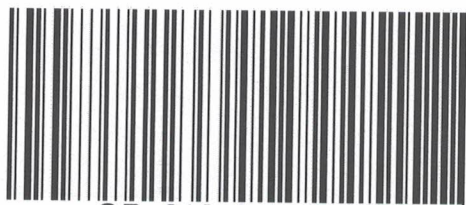
2022 年 12 月第 1 版 2022 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·9132

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31613.5—2022