



中华人民共和国国家标准

GB 29704—2013

食品安全国家标准

动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多 残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

食品安全国家标准

动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺残留量检测的制样和超高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉、肾脏和蛋中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 原理

试样中残留的环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺,用3%三氯乙酸溶液提取,MCX柱净化,超高效液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 环丙氨嗪、三聚氰胺对照品:含量 $\geq 98.0\%$ 。
- 4.2 三氯乙酸。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 甲醇:色谱纯。
- 4.5 甲酸。
- 4.6 氨水。
- 4.7 乙酸铵。
- 4.8 MCX固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。
- 4.9 3%三氯乙酸溶液:取三氯乙酸3 g,用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.10 2%甲酸水溶液:取甲酸2 mL,用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.11 5%氨化甲醇溶液:取氨水5 mL,用甲醇溶解并稀释至100 mL。
- 4.12 50%乙腈水溶液:取乙腈50 mL,用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.13 0.1 mol/L乙酸铵溶液:取乙酸铵7.71 g,用水溶解并稀释至1 000 mL。
- 4.14 1 mg/mL环丙氨嗪、三聚氰胺标准贮备液:精密称取环丙氨嗪和三聚氰胺对照品10 mg,分别于10 mL棕色量瓶中,用50%乙腈水溶液溶解并稀释至刻度,配制成浓度为1 mg/mL的环丙氨嗪标准贮

备液和三聚氰胺标准贮备液。2℃~8℃保存,有效期3个月。

4.15 10 µg/mL 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液:精密量取1 mg/mL 的环丙氨嗪标准贮备液和三聚氰胺标准贮备液各1.0 mL,于100 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为10 µg/mL 的环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液。2℃~8℃保存,有效期3个月。

5 仪器和设备

5.1 超高效液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量0.000 01g。

5.3 天平:感量0.01 g。

5.4 涡旋混合器。

5.5 离心机。

5.6 氮吹仪。

5.7 离心管:50 mL。

5.8 微孔滤头:0.2 µm。

6 样品的制备与保存

6.1 试料的制备

6.1.1 鸡蛋

取新鲜或冷冻空白或供试鸡蛋,去壳,并使均质。

——取均质后的供试样品,作为供试试料。

——取均质后的空白样品,作为空白试料。

——取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

6.1.2 鸡的肌肉和肾脏组织

取新鲜或冷冻空白或供试组织,绞碎,并使均质。

——取均质后的供试样品,作为供试试料。

——取均质后的空白样品,作为空白试料。

——取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

—20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 基质匹配标准曲线的制备

精密量取10 µg/mL 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液适量,用95%乙腈水溶液稀释,配制成浓度为2、5、10、20、50和100 ng/mL 的系列混合标准溶液,并各取1.0 mL,分别溶解经提取、净化及吹干后的6份空白试料残余物,过滤,供超高效液相色谱-串联质谱测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,基质匹配对照溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.2 提取

称取试料 $2\text{ g} \pm 0.02\text{ g}$, 于 50 mL 离心管中, 加 3% 三氯乙酸溶液 20 mL , 涡旋混合 30 s , 超声 10 min , 静置 10 min , $10\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min , 取上层液, 备用。

7.3 净化

MCX 柱依次用甲醇 3 mL 和水 3 mL 活化, 取备用液 10 mL 过柱, 加 2% 甲酸水溶液 3 mL 、甲醇 3 mL 淋洗, 抽干, 加 5% 氯化甲醇溶液 3 mL 洗脱, 抽干, 收集洗脱液, 于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 用 95% 乙腈水溶液 1.0 mL 溶解残余物, 滤膜过滤, 供超液相色谱-串联质谱测定。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

7.4.1.1 色谱柱: BEH HILIC 色谱柱 ($50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, 粒径 $1.7\text{ }\mu\text{m}$), 或相当者。

7.4.1.2 流动相: A: 乙腈; B: 0.1 mol/L 乙酸铵溶液。

7.4.1.3 梯度: $0\text{ min} \sim 2.5\text{ min}$, $95\% \text{ A}$ 线性变化至 $80\% \text{ A}$; $2.5\text{ min} \sim 4\text{ min}$, 保持 $95\% \text{ A}$ 。

7.4.1.4 流速: 0.3 mL/min 。

7.4.1.5 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.4.1.6 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

7.4.2 质谱条件

7.4.2.1 离子源: 电喷雾离子源。

7.4.2.2 扫描方式: 正离子扫描。

7.4.2.3 检测方式: 多反应监测。

7.4.2.4 电离电压: 3.0 kV 。

7.4.2.5 源温: $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.4.2.6 雾化温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.4.2.7 锥孔气流速: 50 L/h 。

7.4.2.8 雾化气流速: 650 L/h 。

7.4.2.9 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量: 见表 1。

表 1 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量

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
环丙氨嗪	$166.9 > 84.6$	$166.9 > 84.6$	35	18
	$166.9 > 124.8$			18
三聚氰胺	$126.9 > 84.7$	$126.9 > 84.7$	30	15
	$126.9 > 67.7$			22

7.4.3 测定法

取试样溶液和相应的基质匹配标准溶液, 作单点或多点校准, 外标法计算。标准溶液及试样溶液中环丙氨嗪及三聚氰胺的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与基质匹

配标准溶液中的离子相对丰度相比,符合表2的要求。标准溶液和试样溶液中各特征离子的质量色谱图见附录A。

表2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 %	允许偏差 %
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

7.5 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试料中环丙氨嗪和三聚氰胺残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$)按式(1)计算:

$$X = \frac{A_{cs}V_1V_3}{A_sV_2m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——供试试料中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A ——试样溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的峰面积;

c_s ——基质匹配标准溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——过固相萃取柱所用提取液体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);

A_s ——基质匹配标准溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的峰面积;

m ——供试试料的质量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

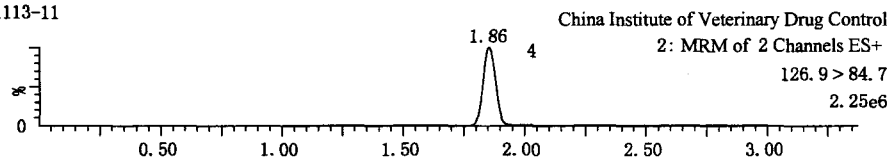
本方法在 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

9.3 精密度

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

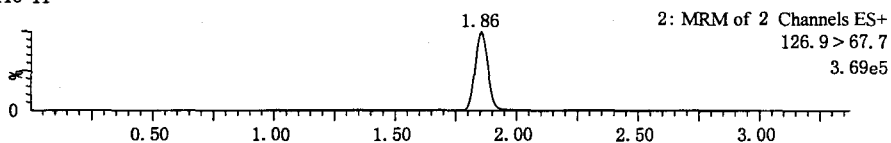
附录 A 色谱图

10 ng/mL std
081113-11



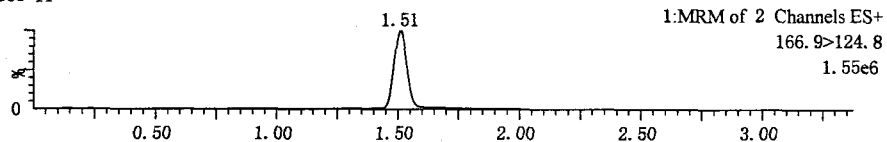
a)

081113-11



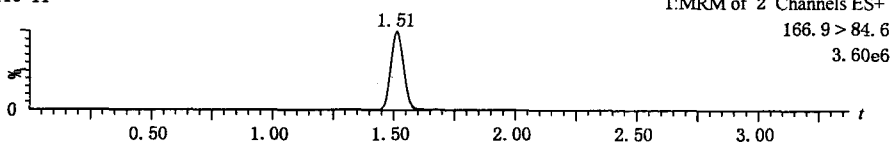
b)

081113-11



c)

081113-11



d)

图 A.1 环丙氨嗪及三聚氰胺标准溶液特征离子质量色谱图(10 ng/mL)

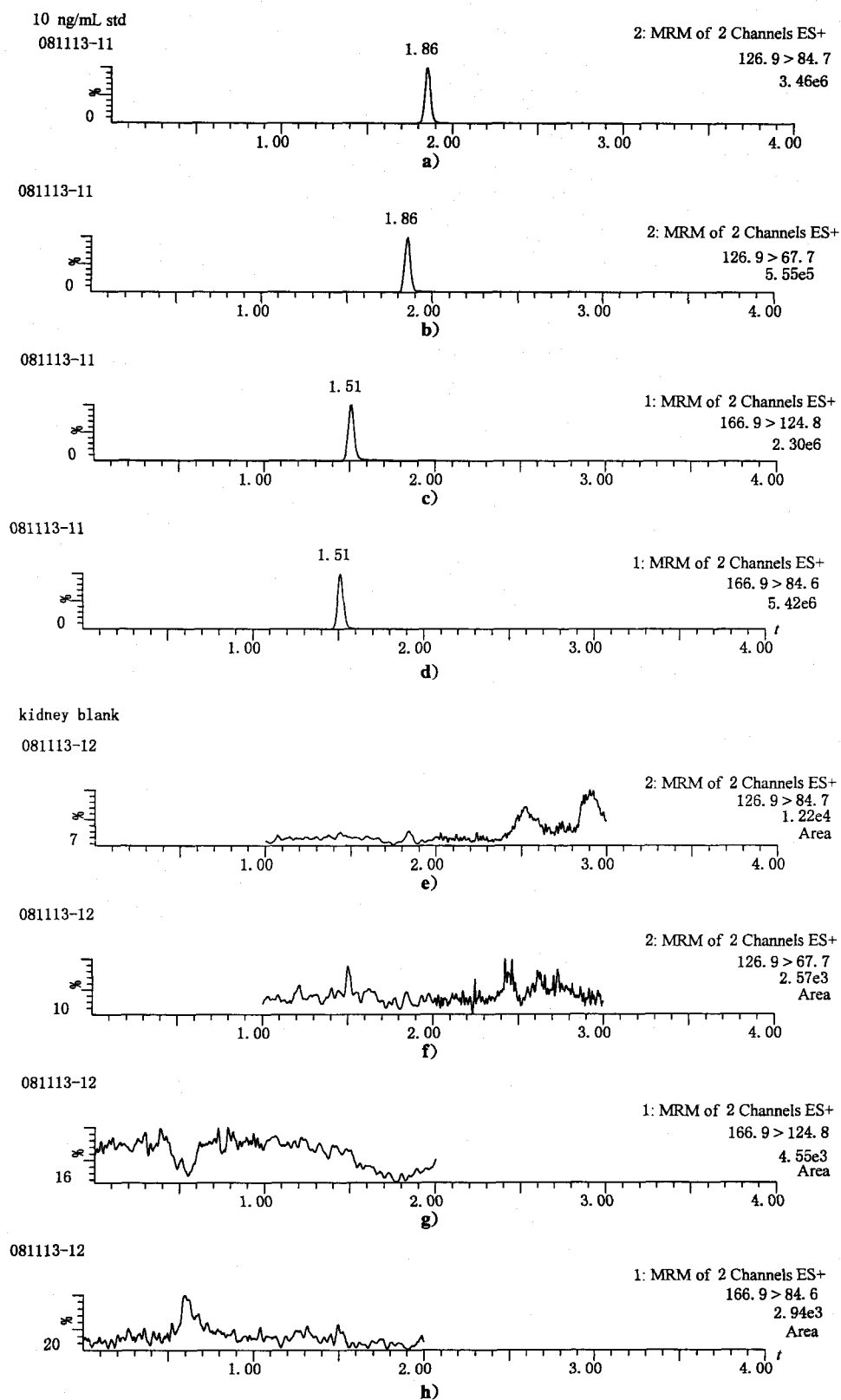
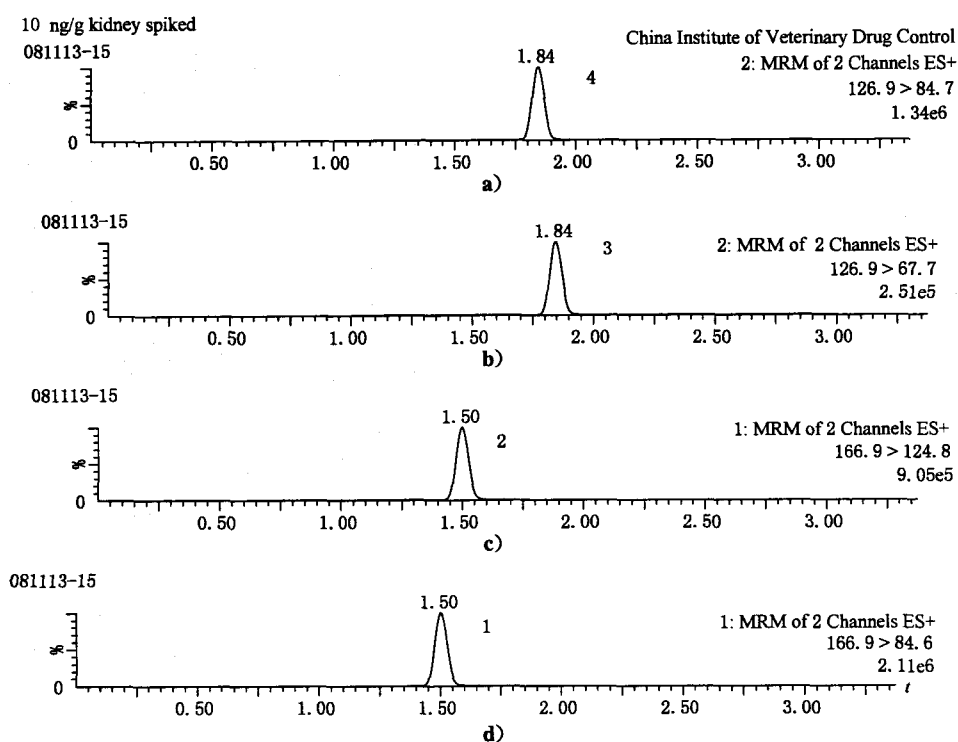


图 A.2 鸡肾脏组织空白试样特征离子质量色谱图



说明:

- 1——环丙氨嗪特征离子质量色谱图(166.9>84.6);
- 2——环丙氨嗪特征离子质量色谱图(166.9>124.8);
- 3——三聚氰胺特征离子质量色谱图(126.9>67.7);
- 4——三聚氰胺特征离子质量色谱图(126.9>84.7)。

图 A.3 鸡肾脏组织空白添加环丙氨嗪和三聚氰胺试样特征离子质量色谱图(10 ng/g)