

中华人民共和国国家标准

GB 29690—2013

食品安全国家标准

动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 残留量的测定 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
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 4,4'-二硝基苯缩脲残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉组织和鸡蛋中尼卡巴嗪残留标志物 4,4'-二硝基均二苯脲残留量的检测。

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

试料中残留的 4,4'-二硝基苯缩脲,用乙腈提取,正己烷除脂,75%甲醇水溶液萃取,液相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

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 4,4'-二硝基均二苯脲对照品:含量≥98.0%。
- 4.2 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 对照品:含量≥98.0%。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 甲醇:色谱纯。
- 4.5 无水硫酸钠。
- 4.6 正己烷。
- 4.7 乙酸铵。
- 4.8 二甲基甲酰胺。
- 4.9 0.1 mol/L 乙酸铵溶液:取乙酸铵 1.93 g,用水溶解并稀释至 250 mL。
- 4.10 75% 甲醇水溶液:取甲醇 75 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.11 75% 甲醇水溶液饱和的正己烷:取 75% 甲醇水溶液 100 mL,加正己烷 100 mL,摇匀,静置分层,取上层液。
- 4.12 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲标准贮备液:精密称取 4,4'-二硝基均二苯脲对照品 10 mg,于 10 mL 量瓶内,用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯脲标准贮备液。2 ℃~8 ℃保存,有效期 3 个月。

4.13 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲标准工作液:精密量取 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲标准贮备液 1.0 mL,于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 10 μg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯脲标准工作液。-18 ℃保存,有效期 3 个月。

4.14 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准贮备液:精密称取 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 对照品 10 mg,于 10 mL 量瓶内,用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准贮备液。2 ℃~8 ℃保存,有效期 3 个月。

4.15 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准工作液:精密量取 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准贮备液 1.0 mL,于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 10 μg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准工作液。-18 ℃保存,有效期 3 个月。

5 仪器和设备

5.1 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 01 g。

5.3 天平:感量 0.01 g。

5.4 涡旋振荡器。

5.5 离心机。

5.6 氮吹仪。

5.7 离心管:50 mL。

5.8 滤膜:0.2 μm。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

6.1.1 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋,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 鸡肌肉

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,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 提取与净化

称取试料 2 g±0.02 g,于 50 mL 离心管中,添加 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准工作液适

量,加无水硫酸钠 2 g,乙腈 8 mL,涡旋 0.5 min,超声 5 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 40 ℃氮气吹干,加 75%甲醇水溶液饱和的正己烷 1 mL,涡旋 10 s,再加 75%甲醇水溶液 1.0 mL,充分涡旋混合,于 40 ℃水浴中静置 5 min,2 000 r/min 离心 5 min,取下层清液,滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 标准曲线的制备

精密量取 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲标准工作液和 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 标准工作液适量,用 75%甲醇水溶液稀释,配制成 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 浓度均为 100 ng/mL 以及 4,4'-二硝基均二苯脲浓度为 2、10、20、50、200 和 500 ng/mL 系列对照溶液,供液相色谱-串联质谱法测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,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。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- 7.3.1.1 色谱柱:C₁₈(150 mm×2.1 mm,粒径 5 μm),或相当者。
- 7.3.1.2 流动相:甲醇+0.1 mol/L 乙酸铵溶液(75+25,体积比)。
- 7.3.1.3 流速:0.2 mL/min。
- 7.3.1.4 柱温:30 ℃。
- 7.3.1.5 进样量:20 μL。

7.3.2 质谱条件

- 7.3.2.1 离子源:电喷雾离子源。
- 7.3.2.2 扫描方式:负离子扫描。
- 7.3.2.3 检测方式:多反应监测。
- 7.3.2.4 电离电压:3.0 kV。
- 7.3.2.5 源温:110 ℃。
- 7.3.2.6 雾化温度:350 ℃。
- 7.3.2.7 锥孔气流速:50 L/h。
- 7.3.2.8 雾化气流速:450 L/h。
- 7.3.2.9 定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量见表 1。

表 1 DNC 和内标的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

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
DNC	300.9>136.9	300.9>136.9	20	18
	300.9>106.9			32
DNC-D ₈	309.0>141.0	309.0>141.0	20	18

7.3.3 测定法

取试样溶液和对照溶液,作单点或多点校准,按内标法,以峰面积比计算。试料溶液及对照溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲及 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 的峰面积比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空白添加标准溶液中的离子相对丰度相比,符合表 2 的要求。对照溶液和空白添加试样溶液中各特征离子质量色谱图见附录 A。

表 2 试料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

7.4 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

单点校准:

$$c = \frac{AA'_{is}c_s c_{is}}{A_{is}A_s c'_{is}} \quad (1)$$

或标准曲线校准:由 $\frac{A_s}{A'_{is}} = a \frac{c_s}{c'_{is}} + b$ 求得 a 和 b ,则

$$c = \frac{c_{is}}{a} \left(\frac{A}{A_{is}} - b \right) \quad (2)$$

试料中 DNC 残留量按式(3)计算:

$$X = \frac{CV}{m} \quad (3)$$

式中:

c ——试样溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——试样溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲的峰面积;

A'_{is} ——对照溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 的峰面积;

c_s ——对照溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_{is} ——试样溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_{is} ——试样溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 的峰面积;

A_s ——对照溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲的峰面积;

c'_{is} ——对照溶液中 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈ 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

X ——供试试料中 4,4'-二硝基均二苯脲的残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

V ——溶解残余物所用 75% 甲醇水溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——供试试料质量,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 0.5 μg/kg,定量限为 1 μg/kg。

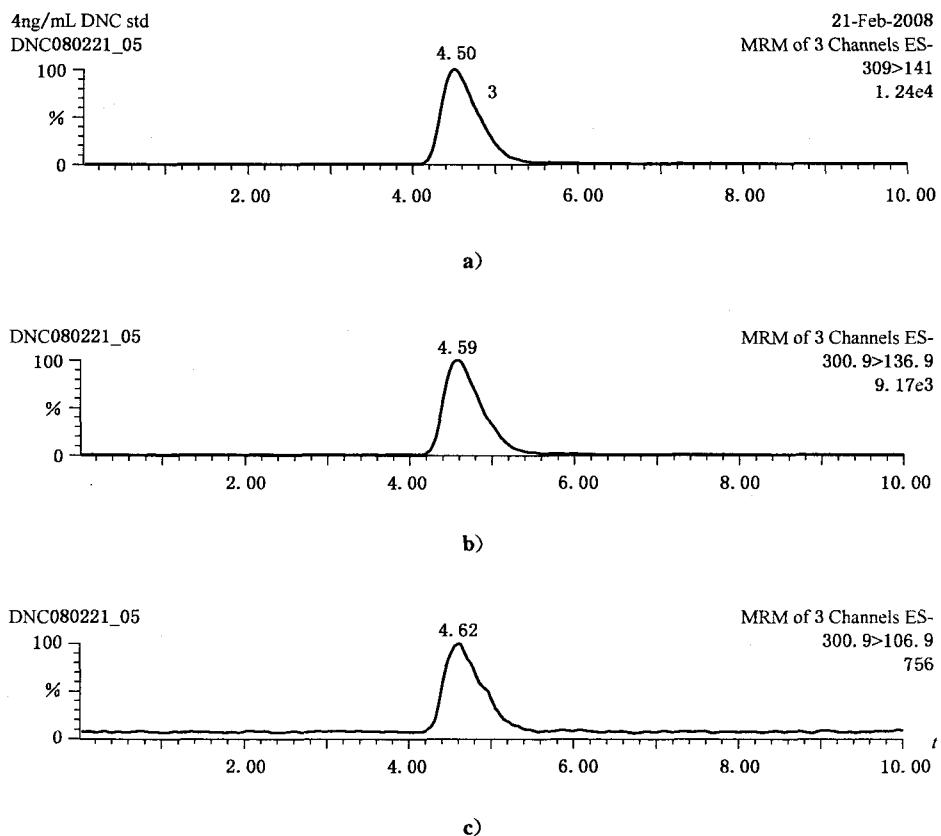
9.2 准确度

本方法鸡蛋试料在 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度、鸡肌肉试料在 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 80%~120%。

9.3 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
色谱图



说明：

- 1——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 106.9$)；
- 2——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 136.9$)；
- 3——DNC-D₈ 特征离子质量色谱图($309.0 > 141.0$)；
- 4——空白组织总离子流色谱图(TIC)。

图 A.1 4,4'-二硝基均二苯脲及内标物标准溶液特征离子质量色谱图(4 ng/mL)

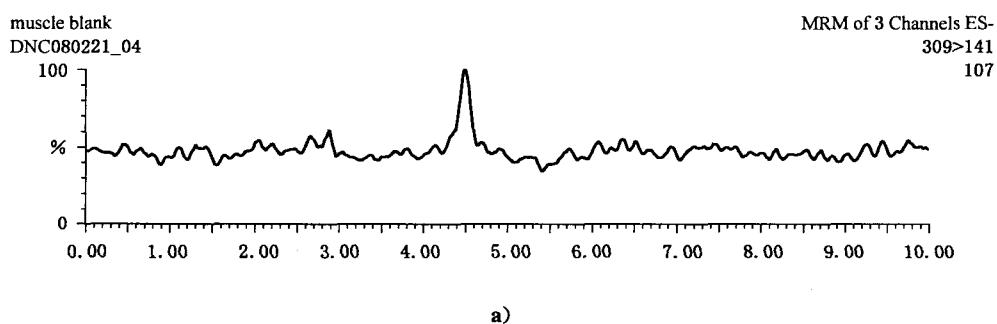
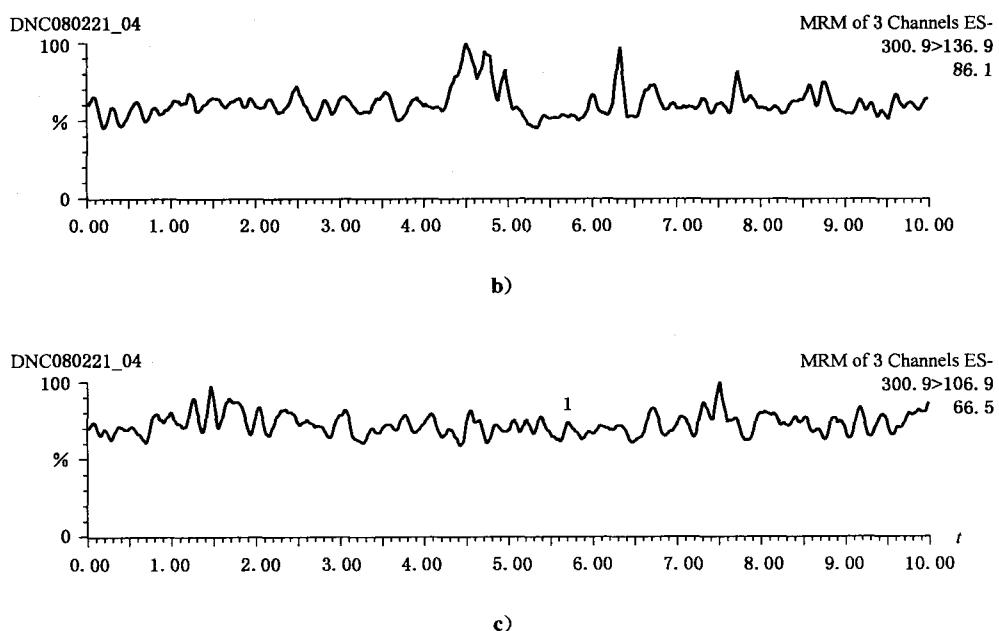


图 A.2 鸡肌肉组织空白试样特征离子质量色谱图



说明：

- 1——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 106.9$)；
- 2——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 136.9$)；
- 3——DNC-D₈ 特征离子质量色谱图($309.0 > 141.0$)；
- 4——空白组织总离子流色谱图(TIC)。

图 A.2 (续)

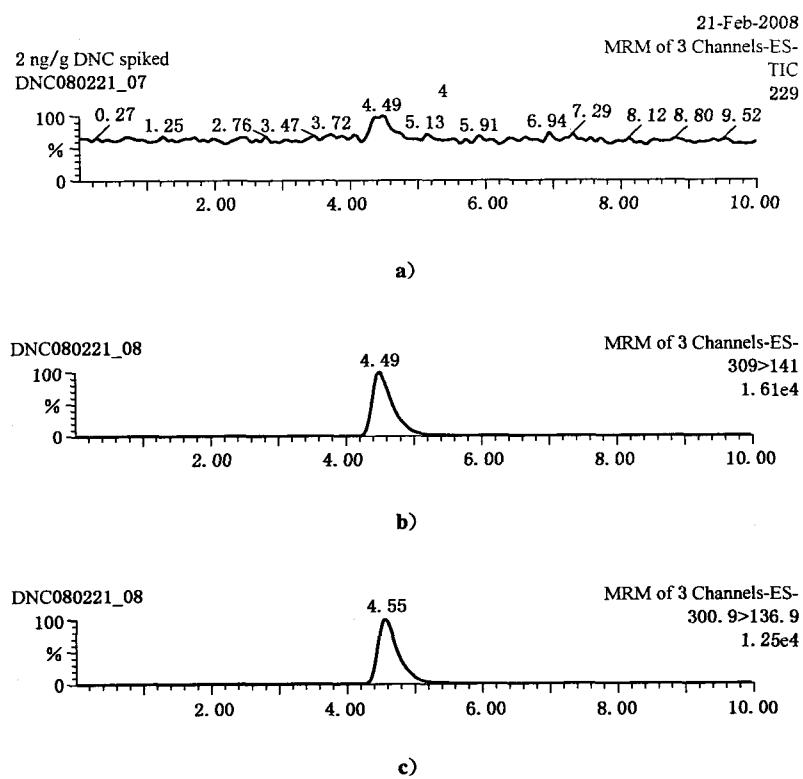
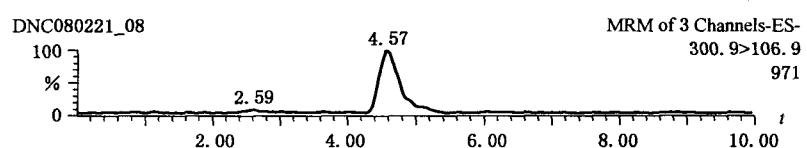


图 A.3 鸡空白肌肉组织添加 4,4'-二硝基均二苯脲及内标物试样特征离子质量色谱图(2 ng/g)



d)

说明：

- 1——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 106.9$)；
- 2——DNC 特征离子质量色谱图($300.9 > 136.9$)；
- 3——DNC-D₈ 特征离子质量色谱图($309.0 > 141.0$)；
- 4——空白组织总离子流色谱图(TIC)。

图 A.3 (续)