

ICS XX.XX
CCS X XX

团 体 标 准

T/HBFIA 00XX—2021

动物源性食品及饲料中多种类兽药残留 的测定 液相色谱-串联质谱法

XXXXXXXXXXXX
XXXXXXX

2021-XX-XX 发布

2021-XX-XX 实施

河北省食品工业协会 发布

目 次

前 言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂和材料	1
6 样品制备与保存	3
7 分析步骤	3
8 结果计算与表述	8
9 定量限, 准确性、精密度	9
附录 A (资料性) 68 种兽残及 5 种内标中英文名称、所属类别, 储备液配制溶剂及保存条件	10
附录 B (资料性) 工作液分组、浓度, 配制过程及保存条件	13
附录 C (资料性) 方法曲线配制表	15
附录 D (资料性) 方法线性范围, 相关系数、定量限	16
附录 E (资料性) 68 种兽残多反应监测色谱图	18

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河北省食品工业协会提出并归口。

本文件起草单位：秦皇岛正大有限公司、河北省食品检验研究院、河北智德检验检测股份有限公司、河北冠卓检测科技有限公司、北京六角体检测技术有限公司、秦皇岛市食品药品检验中心、秦皇岛市农产品质量安全检验监测中心。

本文件主要起草人：鹿翠珍、王建娜、贾昭斌、张红园、马晓斐、冯达、温春晓、石佳松、王立国、郑秋颖、马俊美、唐慧玲、张广敬、夏卫东、张会军、刘浩、李润岩、郭峰、杨赵伟、杨晓雪、西迎、周茉、王娣、温晓园、张嘉楠、何亮娜、孙磊。

动物源性食品及饲料中多种类兽药残留准的测定

液相色谱-串联质谱法名称

1 范围

本标准适用于动物源性食品中禽肉、禽内脏、猪肉、牛肉、羊肉、水产、鸡蛋中兽药残留的测定。

本标准适用于含有动物源性成分的辅料中兽药残留的测定。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料中兽药残留的测定。

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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

建立了动物源性食品及饲料中兽药残留的固相萃取/液相色谱-电喷雾串联质谱分析方法。以0.1mol/L EDTA-Mellvaine缓冲液(pH=4.0±0.05)作提取溶剂,振荡萃取离心,萃取液用Waters Oasis HLB 固相萃取柱进行净化浓缩。以Kinetex® 2.6µm 50x3.0mm色谱柱为分离柱,在正(负)离子模式下以电喷雾电离串联质谱仪进行测定。

5 试剂和材料

5.1 基本要求

除另有说明外,所有试剂均为分析纯。所用水为GB/T 6682规定的一级水

5.2 试剂

5.2.1 甲醇:色谱级。

5.2.2 甲酸:色谱级。

5.2.3 乙腈:色谱级。

5.2.4 乙二胺四乙酸二钠。

5.2.5 柠檬酸。

5.2.6 磷酸氢二钠。

5.2.7 氢氧化钠

5.3 溶液配制

5.3.1 氢氧化钠溶液：20%。称取 200g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 1000mL。

5.3.2 柠檬酸溶液：0.1mol/L。称取 21.01g 柠檬酸，用水溶解，定容至 1000mL。

5.3.3 磷酸氢二钠溶液：0.2mol/L。称取 28.41g 磷酸氢二钠，用水溶解，定容至 1000mL。

5.3.4 Mellvaine 缓冲液：将 1000mL 0.1mol/L 柠檬酸溶液与 625mL 0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液混合，用氢氧化钠溶液调节 pH=4.0±0.05。

5.3.5 Na₂EDTA-Mellvaine 缓冲液：0.1mol/L。称取 60.5g 乙二胺四乙酸二钠放入 1625mL Mellvaine 缓冲液，使其溶解、摇匀。

5.3.6 甲醇水溶液（5%）：量取 25mL 甲醇与 475mL 水混合。

5.3.7 定溶液：475mL 水与 25mL 乙腈与 1.5mL 冰乙酸混合。

5.3.8 0.1%甲酸水：1mL 甲酸与 999mL 水混合

5.4 标准品

5.4.1 标准品兽药标准物质：纯度≥95%，见附录 A《68 种兽残及 5 种内标中英文名称、所属类别，储备液配制溶剂及保存条件》。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 标准储备溶液：分别准确称量 10mg 各种兽药标准物分别于 10mL 容量瓶中，根据标准物的溶解性选甲醇、氯化甲醇、二甲基亚砷等溶剂溶解并定容至刻度（溶剂选择参见附录 A），按照附录 A 保存。

5.5.2 标准内标储备液：分别准确称量 10mg 各种兽药内标准物分别于 10mL 容量瓶中，根据标准物的溶解性选甲醇、氯化甲醇溶解并定容至刻度，（溶剂选择参见附录 A），按照附录 A 保存。

5.5.3 混合标准溶液分 A、B、C、D、E 五组分别配制，五组混合标准溶液配制方式参见附录 B。根据标准物的溶解性选适当的溶剂定容 10mL。混合标准溶液按照附录 B 保存

5.5.4 混合标准内标溶液为 F 组，混合内标标准溶液浓度参见附录 B。根据标准物的溶解性选适当的溶剂定容 10mL。混合内标标准溶液按照附录 B 保存

5.6 材料

5.6.1 Oasis HLB 固相萃取柱（3cc, 60mg），使用前依次用 5 mL 甲醇，10mL 水活。

5.6.2 尼龙微孔过滤膜：φ0.2μm。

5.7 仪器设备

5.7.1 液相色谱串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.7.2 高速冷冻离心机：转速不低于 8000r/min。

5.7.3 涡旋混合器。

5.7.4 超声波。

5.7.5 氮吹仪。

- 5.7.6 精密分析天平（感量0.00001g）；天平（感量0.01g）。
- 5.7.7 振荡器。
- 5.7.8 组织捣碎机。
- 5.7.9 空气真空泵。
- 5.7.10 酸度计。
- 5.7.11 分析筛：孔径0.42mm。

6 样品制备与保存

6.1 样品制备

- 6.1.1 制作过程中必须防止样品收到污染或发生残留物含量的变化
- 6.1.2 动物源性食品：从所取样品中全部样品中取出有代表性的样品约200g，用组织捣碎机捣碎均匀，均分成两份，分别装入干净的自封袋中，密封。并明确标记，
- 6.1.3 饲料：按照GB/T 20195制备样品，至少200g，粉碎使其全部通过0.42mm孔径分析筛，充分搅拌均匀，均分成两份，分别装入干净的自封袋中，密封。并明确标记。
- 6.1.4 鸡蛋：取16枚鸡蛋（约1kg），洗净去壳后用组织捣碎机充分搅拌均匀，均分成两份，分别装入干净的自封袋中，密封。并明确标记。
- 6.1.5 辅料：从所取样品中全部样品中取出有代表性的样品约200g，用组织捣碎机捣碎均匀，均分成两份，分别装入干净的自封袋中，密封。并明确标记。

6.2 试样保存

动物源性组织、鸡蛋样品保存于-18℃以下冷冻保存。饲料、辅料常温保存。

7 分析步骤

7.1 试样的提取

7.1.1 动物源性食品及辅料

准确称取2.00g（精确至0.01g）试样至50mL离心管中，加入20μl内标工作液，20mL Na₂EDTA-Mellvaine缓冲液溶液，振荡15 min，8000r/min离心10 min。

7.1.2 饲料

准确称取2.00g（精确至0.01g）试样至50mL离心管中，加入20μl内标工作液，加入20mL Na₂EDTA-Mellvaine缓冲液溶液，旋涡混匀，超声15 min，8000r/min离心10 min。

7.2 试样的净化浓缩

移取5.1方式提取的上清液于上述已活化的HLB固相萃取柱中，控制流速为1 mL/min，先用5mL水淋洗、再用3mL 5% 甲醇溶液淋洗，流干后真空泵抽干，然后用5 mL 甲醇分两次洗脱。洗脱液在60℃水浴中氮气吹至近干。

7.3 试样的定容

7.3.1 动物源性食品及辅料试样

加1.0mL定溶液，涡旋30s溶解，用0.2 μ m滤膜过滤后供液相色谱-质谱/质谱测定。同一个样品要进行平行实验，同时做空白试验

7.3.2 饲料试样

加10.0mL定溶液，涡旋30s溶解，用0.2 μ m滤膜过滤后供液相色谱-质谱/质谱测定。同一个样品要进行平行实验，同时做空白试验

7.4 混合基质校准曲线的制备

7.4.1 动物源性食品及辅料：

称取5个阴性2.00g（精确至0.01g）试样至50 mL离心管中，从附录B中F组（内标工作液配制）混合内标中间工作液中均移取20 μ l加入上述5个阴性样品中；68种标准曲线移取方式和浓度依照以下说明进行：

定量限为10 μ g/kg项目曲线配制浓度：10.0、30.0、100.0、200.0、500.0 μ g/kg

定量限为1.0 μ g/kg项目曲线配制浓度：1.0、3.0、10.0、20.0、100.0 μ g/kg

定量限为0.1 μ g/kg项目曲线配制浓度：0.3、0.3、1.0、2.0、10.0 μ g/kg

定量限为20 μ g/kg项目曲线配制浓度：20.0、60.0、200.0、400.0、500.0 μ g/kg

具体配置过程依照附录C，定容溶剂均为甲醇定容。另，曲线配制现配现用。

配制后，按照5进行同步检测。

7.4.2 饲料

参照5.2.1配制饲料样品曲线，配制后，按照5进行同步检测。

7.5 色谱条件

7.5.1 色谱柱：Kinetex® 2.6 μ m 50x3.0mm 或相当者。

7.5.2 流动相：0.1%甲酸水（A）、乙腈（B）。

7.5.3 流速：400ul/min。

应符合表1中的规定。

表1 流动相比例

时间 (min)	流动相A 0.1%甲酸水溶液 (%)	流动相B 乙腈 (%)
0.00	90	10
1.5	90	10
2.8	60	40
2.81	60	40
3.00	20	80
3.01	20	80
5.0	90	10

7.6 质谱条件

离子源为电喷雾离子源（ESI源）。