



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 动物性食品中二氢吡啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

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

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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
国家市场监督管理总局

发布

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

动物性食品中二氢吡啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中二氢吡啶残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于牛、鸡的肌肉、脂肪、肾脏、肝脏组织和牛奶、鸡蛋中二氢吡啶残留量的检测。

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

试样中残留的二氢吡啶经乙腈提取，增强型脂质去除净化柱除脂，液相色谱-串联质谱法测定，同位素内标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。
- 5.1.2 甲酸铵 (HCOONH₄)：色谱纯。
- 5.1.3 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。
- 5.1.4 氯化钠 (NaCl)。
- 5.1.5 无水硫酸镁 (MgSO₄)。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.005 mol/L 甲酸铵溶液 (含 0.1%甲酸)：取甲酸铵 0.315 g，加甲酸 1 mL，用适量水溶解并稀释至 1000 mL，混匀。

5.3 标准品

- 5.3.1 二氢吡啶 (dihydropyridine, C₁₃H₁₉NO₄, CAS号:1149-23-1)：含量≥99.0%。
- 5.3.2 二氢吡啶-¹³C₄ (dihydropyridine-¹³C₄, C₉H₁₉NO₄-¹³C₄, CAS号:—)：含量≥99.0%。

5.4 标准溶液制备

- 5.4.1 标准储备液 (1 mg/mL)：取二氢吡啶标准品约 10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18 °C 以下避光保存，有效期 3 个月。
- 5.4.2 内标储备液 (1 mg/mL)：取二氢吡啶-¹³C₄ 标准品约 10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的内标储备液。-18 °C 以下避光保存，有效期 3 个月。
- 5.4.3 标准中间液 (5.0 μg/mL)：准确量取上述标准储备液适量，用乙腈稀释配制成浓度为 5.0 μg/mL

的标准中间液。-18℃以下避光保存，有效期1个月。

5.4.4 内标中间液（5.0 μg/mL）：准确量取上述内标储备液适量，用乙腈稀释配制成浓度为5.0 μg/mL的内标中间液。-18℃以下避光保存，有效期1个月。

5.4.5 标准工作液（1.0 μg/mL）：准确量取标准中间液适量，用乙腈稀释配制成浓度为1.0 μg/mL的标准工作液。临用现配。

5.4.6 内标工作液（1.0 μg/mL）：准确量取内标中间液适量，用乙腈稀释配制成浓度为1.0 μg/mL的内标工作液。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 增强型脂质去除净化柱：300 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 亲水性聚四氟乙烯滤膜：0.22 μm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 离心机：8 000 r/min 或以上。

6.3 电子天平：感量为0.000 01 g和0.01 g。

6.4 涡旋混合器。

6.5 超声波清洗器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 均质机。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 肌肉、脂肪、肾脏、肝脏组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.2 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋样品，去壳，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.3 牛奶

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶样品，混匀。

——取混匀的供试样品，作为供试试样。

——取混匀的空白样品，作为空白试样。

——取混匀的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，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、脂肪、肾脏、肝脏

准确称取试料 (2 ± 0.05 g)，于50 mL离心管中，加入内标工作液50 μ L，加水2 mL，涡旋30 s，加乙腈4 mL，涡旋30 s，超声提取10 min，8 000 r/min离心10 min，取上清液于10 mL容量瓶。残渣加乙腈3 mL，重复提取一次，合并上清液，用乙腈定容至刻度，备用。

8.1.2 鸡蛋、牛奶

准确称取试料 (2 ± 0.05 g)，于50 mL离心管中，加入内标工作液50 μ L，加水8 mL，涡旋30 s，加乙腈9 mL，涡旋30 s，超声提取20 min，加氯化钠3.5 g和无水硫酸镁1.5 g，涡旋1 min，8 000 r/min离心5 min，取上层清液于10 mL容量瓶，加2 mL水，混匀，用乙腈定容至刻度，备用。

8.2 净化

不需活化，取3 mL混匀的备用液过增强型脂质去除净化柱，自然滴干，收集过柱液，混匀，过0.22 μ m滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试料，除不加二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 标准工作液外，按上述方法处理制得其空白基质溶液。取标准工作液适量，用乙腈稀释，配制成二氢吡啶浓度为10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、1000 ng/mL的系列溶剂标准溶液。再精密量取溶剂标准溶液和内标工作液适量 ($V_{\text{溶剂标准溶液}} : V_{\text{内标工作液}} : V_{\text{空白基质溶液}} = 1 : 1 : 18$)，用空白基质溶液稀释，配制成二氢吡啶浓度为0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL，内标浓度均为5 ng/mL的系列基质匹配标准溶液，现用现配，供液相色谱-串联质谱测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.9 μ m)，或相当者；
- 流动相：A：0.005 mol/L 甲酸铵 (含 0.1% 甲酸)，B：乙腈，梯度洗脱程序见表 1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：30 $^{\circ}$ C；
- 进样量：10 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.0	90	10
1.0	90	10
5.0	25	75
5.1	5	95
6.0	5	95
6.1	90	10
8.0	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- 电离方式：电喷雾电离，正离子模式；
- 数据采集：多反应监测 (MRM)，质谱参数参见表 2；
- 毛细管电压：4000 V；
- 干燥气温度：350 $^{\circ}$ C；

- e) 干燥气流速: 10 L/min;
 f) 雾化器压力: 45 psi;
 g) 鞘气温度: 350 °C;
 h) 鞘气流速: 12 L/min。

表2 化合物的母离子及定量定性离子、碎裂电压和碰撞能量

药物	定性离子对	定量离子	碎裂电压 V	碰撞能量 eV
	m/z	m/z		
二氢吡啶	254>208	254>208	70	8
	254>180			21
二氢吡啶- ¹³ C ₄	258>212	258>212	70	8

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中二氢吡啶的保留时间与基质匹配标准溶液中对应的保留时间相比, 偏差在±0.1 min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为横坐标, 以二氢吡啶与内标的峰面积比为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 作单点或多点校准, 按内标法计算试样中药物的残留量, 基质匹配标准溶液及试样溶液中二氢吡啶与内标的响应值均在仪器检测的线性范围之内。对于试样中二氢吡啶残留量超过仪器测定线性范围的, 在提取时根据药物浓度响应增加内标工作液的添加量, 使试样溶液稀释后二氢吡啶的响应在仪器线性范围内, 对应二氢吡啶-¹³C₄浓度与基质匹配标准曲线制备中二氢吡啶-¹³C₄浓度一致。基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见附录A。

8.5 空白试验

取空白试样, 除不加药物外, 采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中二氢吡啶的残留量按标准曲线或公式(1)计算,

$$\omega = \frac{A \times A'_{is} \times \rho_s \times \rho_{is} \times V \times 1000}{A_{is} \times A_s \times \rho'_{is} \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

式中:

ω —试样中二氢吡啶残留量的数值, 单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A_s —标准溶液中二氢吡啶的色谱峰面积;

A'_{is} —标准溶液中内标的色谱峰面积;

ρ_s —标准溶液中二氢吡啶浓度的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

ρ'_{is} —标准溶液中内标浓度的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

ρ_{is} —试样溶液中内标浓度的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

A —试样溶液中二氢吡啶的色谱峰面积;

A_{is} —试样溶液中内标的色谱峰面积;

V —试样定容体积的数值, 单位为毫升 (mL);

m —试样质量的数值，单位为克（g）；

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

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法二氢吡啶的检出限为 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%。

10.3 精密度

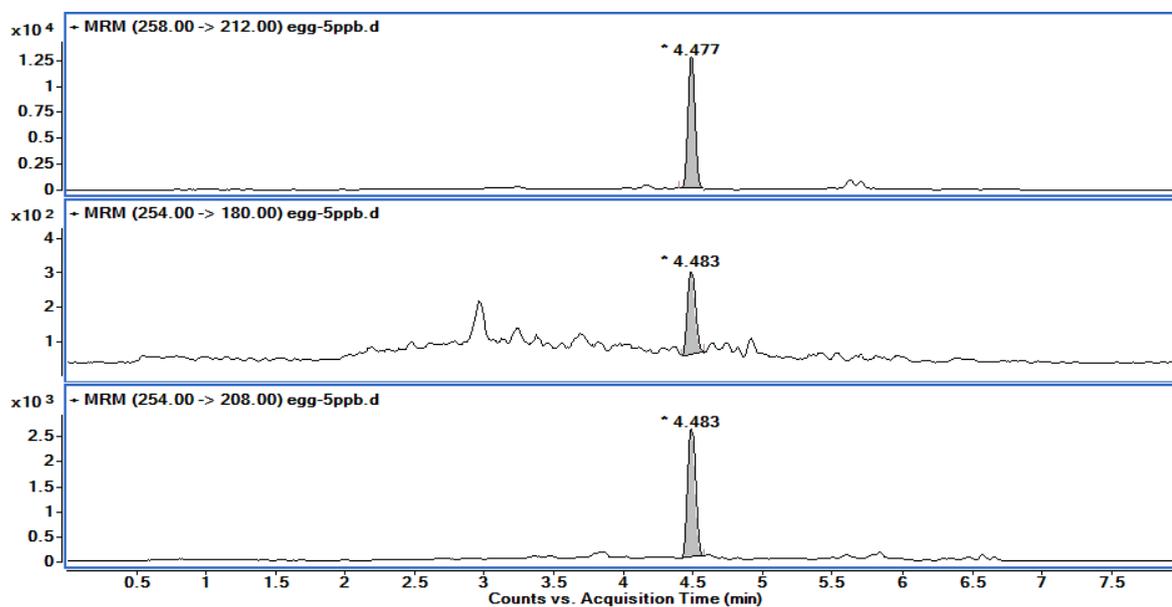
本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(规范性)

二氢吡啶和内标基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图

二氢吡啶和内标鸡蛋基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。



图A.1 二氢吡啶和内标鸡蛋基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图（二氢吡啶浓度为 0.5 ng/mL，内标浓度为 5.0 ng/mL）