ICS 67.050
CCS X 04

中华人民共和国国家标准

GB 31658.13—2021

食品安全国家标准
动物性食品中氯苯胍残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of robenidine residues in animal derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

以正版纸质文本为准

2021-09-16 发布　　2022-02-17 实施

纸质版本为准
参考件

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

以正版纸质文本为准

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。

以正版纸质文本为准

以正版纸质文本为准

食品安全国家标准
动物性食品中氯苯胍残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中氯苯胍残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱的检测方法。

本文件适用于鸡的肌肉、肝脏、肾脏和皮＋脂组织中氯苯胍残留量的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的氯苯胍用 0.1%甲酸乙腈提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

5 试剂和材料

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 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 正己烷（C_6H_{14}）。

5.1.5 二甲亚砜（C_2H_6OS）。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 0.1 mL，用乙腈稀释至 100 mL。

5.2.2 85%乙腈溶液：取乙腈 85 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.3 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 0.1 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.4 0.3%甲酸水溶液：取甲酸 0.3 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.5 50%乙腈甲酸水溶液：取乙腈 50 mL，用 0.3%甲酸水溶液稀释至 100 mL。

5.3 标准品

5.3.1 盐酸氯苯胍（Robenidine hydrochloride，$C_{15}H_{14}Cl_3N_5$，CAS 号：25875-50-7）：含量≥99.0%。

5.3.2 盐酸氯苯胍-D_8（Robenidine-D_8 hydrochloride，$C_{15}H_6C_{l3}D_8N_5$，CAS 号：1173097-77-2）：含量≥99.0%。

5.4 标准溶液制备

以正版纸质文本为准

5.4.1 氯苯胍标准储备液：取盐酸氯苯胍标准品适量（相当于氯苯胍 10 mg），精密称定，加甲醇适量使溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。－18 ℃以下保存，有效期 6 个月。

5.4.2 氯苯胍标准工作液：准确量取氯苯胍标准储备液 1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的氯苯胍标准工作液。2 ℃～8 ℃保存，有效期 3 个月。

5.4.3 氯苯胍-D_8内标储备液：取盐酸氯苯胍-D_8标准品适量（相当于氯苯胍-D_8 10 mg），加二甲亚砜适量使溶解，用甲醇稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的氯苯胍-D_8内标储备液。－18 ℃以下保存，有效期 6 个月。

5.4.4 氯苯胍-D_8内标中间溶液：准确量取氯苯胍-D_8内标储备液 1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的氯苯胍-D_8内标中间溶液。2 ℃～8 ℃保存，有效期 1 个月。

5.4.5 氯苯胍-D_8内标工作溶液：准确量取氯苯胍-D_8内标中间溶液 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 的氯苯胍-D_8内标工作液。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 HLB 固相萃取柱[1)]：200 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 中性氧化铝固相萃取柱：500 mg/3 mL，或相当者。

5.5.3 尼龙微孔滤膜：0.22 μm。

5.5.4 离心管：50 mL。

5.5.5 刻度试管：10 mL，分度值 0.1 mL。

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 0.000 01 g 和 0.01g。

6.3 低温高速离心机：转速可达 8 000 r/min。

6.4 组织匀浆器。

6.5 涡旋混合器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

a） 取均质后的供试样品，作为供试试料；

b） 取均质后的空白样品，作为空白试料；

c） 取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作溶液，作为空白添加试料。

7.2 样品的保存

－18 ℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g（准确至±0.02 g），于 50 mL 离心管，准确加氯苯胍-D_8内标工作溶液 100 μL，加 0.1%甲酸乙腈溶液 5 mL，涡旋混合，中速振荡 10 min，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，再加水 1 mL，混匀，作

1） 此处列出 HLB 固相萃取柱仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的固相萃取柱。

以正版纸质文本为准

为备用液 1。

8.2 净化

取中性氧化铝固相萃取柱，用乙腈 2 mL 活化，取备用液 1 过柱，收集全部流出液于 10 mL 试管中，用 85%乙腈溶液 2 mL 淋洗，合并流出液，于 40 ℃氮气吹至体积小于 2 mL，再加水 8 mL，混匀，作为备用液 2。

取 HLB 固相萃取柱，依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化，取备用液 2 过柱，用水 3 mL 淋洗，抽干 30 s，正己烷 3 mL 淋洗，抽干 10 min，甲醇 5 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40 ℃氮气吹干，用 50%乙腈甲酸水溶液 1.0 mL 溶解残余物，涡旋，尼龙微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取氯苯胍标准工作溶液、氯苯胍-D_8内标工作溶液适量，用 50%乙腈甲酸水溶液稀释，配制成氯苯胍浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和氯苯胍-D_8内标均为 100 ng/mL 的系列标准溶液，供液相色谱-串联质谱测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、相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 色谱条件参考条件

a) 色谱柱：C_{18}(100 mm×2.1 mm，1.7 μm)，或相当者；

b) 柱温：30 ℃；

c) 进样量：5 μL；

d) 流速：0.3 mL/min；

e) 流动相：A 为乙腈，B 为 0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	20	80
0.5	20	80
5	80	20
6	80	20
6.1	20	80
7.0	20	80

8.4.2 质谱条件参考条件

a) 离子源：电喷雾离子源；

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：3.0 kV；

e) 源温：120 ℃；

f) 雾化温度：350 ℃；

g) 锥孔气流速：50 L/h；

h) 雾化气流速：700 L/h。

药物定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 氯苯胍及氯苯胍-D_8内标定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
氯苯胍	4.00	334.2>137.8 334.2>110.8	334.2>110.8	40	25
					40
氯苯胍-D_8	3.97	342.0>142.0	342.0>115.0	40	40

以正版纸质文本为准

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在同样测试条件下，试料溶液中氯苯胍的保留时间与标准工作液中氯苯胍的保留时间相对偏差在±2.5%以内，且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的校正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最大允许误差

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

8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的标准工作液，作单点或多点校准，按内标法以特征离子质量色谱峰面积定量，标准工作液及试料溶液中的氯苯胍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，氯苯胍标准溶液特征离子质量色谱图见附录A。

8.6 空白试验

取空白试料，除不加标准溶液外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中氯苯胍残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X=\frac{A\times A'_{iS}\times C_S\times C_{iS}\times V}{A_{iS}\times A_S\times C'_{iS}\times m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——供试试料中氯苯胍残留量的数值，单位为微克每千克(μg/kg)；

C_{iS} ——试料溶液中氯苯胍-D_8内标浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

C_S ——标准溶液中氯苯胍浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

C'_{iS} ——标准溶液中氯苯胍-D_8内标浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A ——试料溶液中氯苯胍的峰面积；

A_{iS} ——试料溶液中氯苯胍-D_8内标的峰面积；

A_S ——标准溶液中氯苯胍的峰面积；

A'_{iS} ——标准溶液中氯苯胍-D_8内标的峰面积；

V ——溶解残余物所用溶液体积的数值，单位为毫升(mL)；

m ——供试试料质量的数值，单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、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

本方法在肌肉、肝脏和肾脏组织10 μg/kg～200 μg/kg添加浓度水平上的回收率为70%～120%；在皮+脂组织10 μg/kg～400 μg/kg添加浓度水平上的回收率为70%～120%。

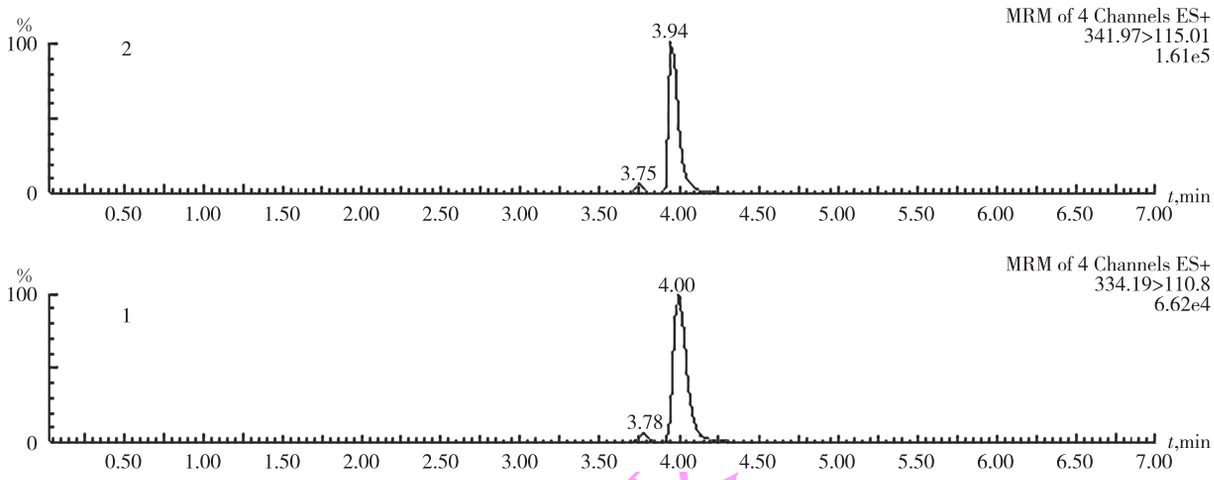
10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%，批间相对标准偏差≤20%。

以正版纸质文本为准

附　录　A
（资料性）
氯苯胍标准溶液特征离子质量色谱图

氯苯胍标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

1——氯苯胍特征离子质量色谱图(334.2>110.8)；

2——氯苯胍-D_8特征离子质量色谱图(342.0>115.0)。

图 A.1　氯苯胍标准溶液特征离子质量色谱图(20 μg/L)

以正版纸质为

以正版纸质文本为准

以正版纸质文本为准

GB 31658.13—2021

以正版纸质文本为准

GB 31658.13—2021

中国农业出版社出版
购买正版纸质文本请联系
中国农业出版社标准质量分社
编辑冀刚，电话 010－59194426