

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5649—2023

动物源食品中克百威及代谢物 3-羟基克百威残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of carbofuran and its metabolites residues 3-Hydroxycarbofuran
in foods of animal origin—LC-MS/MS method

2023-11-01 发布

2024-05-01 实施

中华人民共和国海关总署 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。

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国广州海关、中华人民共和国南宁海关、中华人民共和国拉萨海关、中华人民共和国合肥海关。

本文件主要起草人：席静、李菊、黎天勇、曹晓钢、徐娟、司露露、宋伟、吴舒悦。

以正式出版文本为准

动物源食品中克百威及代谢物 3-羟基克百威残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了动物源食品中克百威及代谢物 3-羟基克百威残留量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于动物组织、蛋、乳、蜂蜜、蜂王浆、蜂胶和肠衣中克百威及代谢物 3-羟基克百威残留量的测定。

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 方法提要

试样中残留的克百威与 3-羟基克百威用乙腈提取,分散固相萃取方法净化,采用液相色谱-质谱/质谱仪检测,外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

- 5.1 乙腈:色谱纯。
- 5.2 甲醇:色谱纯。
- 5.3 甲酸:色谱纯。
- 5.4 氢氧化钙。
- 5.5 无水硫酸镁:于 500 °C 马弗炉内烘烤约 4 h,冷却后贮于密闭容器中备用。
- 5.6 氯化钠。
- 5.7 柠檬酸钠二水合物。
- 5.8 柠檬酸二钠-盐倍半水合物。
- 5.9 甲酸铵:优级纯。
- 5.10 5 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液:准确称取 0.314 5 g 甲酸铵于小烧杯中,加少量水溶解并转移至 1 000 mL 容量瓶中,准确加入 1 mL 甲酸,用水稀释至刻度,混匀。

- 5.11 0.5%氢氧化钙溶液:称取5 g 氢氧化钙,用水充分溶解稀释至1 000 mL,过滤取滤液,现配现用。
- 5.12 克百威标准物质($C_{12}H_{15}NO_3$,CAS号1563-66-2):纯度 $\geq 98\%$ 。
- 5.13 3-羟基克百威标准物质($C_{12}H_{15}NO_4$,CAS号16655-82-6):纯度 $\geq 98\%$ 。
- 5.14 克百威标准储备溶液,1 000 mg/L。精密称取10 mg 克百威标准品于小烧杯中,加少量甲醇溶解,移入10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,摇匀,-18 °C 避光保存,有效期为6个月。
- 5.15 3-羟基克百威标准储备溶液,1 000 mg/L。精密称取10 mg 3-羟基克百威标准品于小烧杯中,加少量甲醇溶解,移入10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,摇匀,-18 °C 避光保存,有效期为6个月。
- 5.16 混合标准中间溶液:分别量取1 mL 标准储备溶液(5.14与5.15),用乙腈稀释并定容至10 mL,混合标准中间溶液浓度相当于100.0 mg/L,-18 °C 避光保存,有效期为1个月。
- 5.17 混合标准工作溶液:准确量取适量混合标准中间液(5.16),用空白基质稀释成0.001 mg/L、0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.010 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L和0.100 mg/L的系列浓度标准工作溶液,现配现用。
- 5.18 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(PSA):粒径40 μm ~60 μm 。
- 5.19 十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18}):粒径40 μm ~60 μm 。
- 5.20 微孔滤膜:0.22 μm ,有机相。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 6.2 电子天平:感量为0.01 g和0.1 mg。
- 6.3 组织捣碎机。
- 6.4 均质器:10 000 r/min。
- 6.5 摇床。
- 6.6 涡旋混合器。
- 6.7 移液器:100 μL ~1 000 μL 。
- 6.8 离心机:转速 $\geq 4\ 000$ r/min。
- 6.9 高速冷冻离心机:转速 $\geq 12\ 000$ r/min。
- 6.10 超声清洗仪。
- 6.11 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 牛肉、鸡肉、猪肝脏、罗非鱼、鸡蛋、猪脂肪

取样品中具有代表性的可食部分500 g,经组织捣碎机捣碎后充分混匀,装入洁净容器中。密封并做好标记,于-18 °C 以下保存。

7.2 蜂蜜

取代表性样品500 g,对于无结晶的样品将其搅拌均匀,对于有结晶析出的样品,在密闭情况下,将样品置于不超过60 °C 的水浴中温热,待样品全部融化后搅拌均匀,迅速冷却至室温。在融化时应注意防止水分挥发,装入洁净容器中。密封并做好标记,室温避光保存。

7.3 牛奶、蜂王浆

取有代表性样品500 g,搅拌均匀,装入洁净容器中,密封并做好标记,于-18 °C 以下保存。

7.4 蜂胶

取有代表性样品 500 g, -20 °C 冷冻后经组织捣碎机捣碎, 充分混匀, 装入洁净容器中。密封并做好标记, 于 -18 °C 以下保存。

7.5 猪肠衣

取有代表性样品 500 g, 用剪刀剪至 5 mm 或以下长度, 用组织捣碎机捣碎后充分混匀, 装入洁净容器中。密封并做好标记, 于 -18 °C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 样品提取

8.1.1 牛肉、鸡肉、罗非鱼

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 用均质器以 10 000 r/min 均质 20 s~30 s, 再取 10 mL 乙腈清洗均质器刀头上的残渣, 合并乙腈提取液后, 涡旋混合器上混合提取 20 s~30 s, 加入 4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠二水合物、0.5 g 柠檬酸二钠-盐倍半水合物, 混匀后放入摇床振荡提取 10 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取出 1 mL 上清液待净化。

8.1.2 猪肝脏、牛奶、猪脂肪和猪肠衣

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 涡旋混合器上混匀 20 s~30 s, 加入 4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠二水合物、0.5 g 柠檬酸二钠-盐倍半水合物, 混匀后放入摇床振荡提取 10 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取出 1 mL 上清液待净化(猪脂肪提取上清液吸取前先在 -18 °C 冷冻 1 h 去除冻结的脂肪)。

8.1.3 鸡蛋、蜂蜜、蜂王浆

称取鸡蛋 5 g, 蜂蜜、蜂王浆 2 g(精确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加 5 mL 水, 涡旋混合器混匀 1 min, 静置 5 min。加入 10 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 摇床提取 10 min, 加 2 g~3 g 氯化钠涡旋混匀 1 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取出 1 mL 上清液待净化。

8.1.4 蜂胶

称取 0.2 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 置超声清洗仪提取 10 min, 加入 10 mL 0.5% Ca(OH)₂ 水溶液, 涡旋混匀 2 min 后再加 4 g~6 g 氯化钠, 涡旋混匀 2 min, 0 °C 条件下以 10 000 r/min 离心 10 min, 取出 4 mL 上清液待净化。

8.2 净化

8.2.1 牛肉、鸡肉、罗非鱼、猪肝脏、牛奶、猪脂肪、猪肠衣、鸡蛋、蜂蜜、蜂王浆

取 8.1.1、8.1.2、8.1.3 中待净化液分别转移至内含 150 mg 无水硫酸镁, 50 mg PSA 和 50 mg C₁₈ 的塑料离心管中, 涡旋混匀 1 min, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机相微孔滤膜, 供 LC-MS/MS 测定。

8.2.2 蜂胶

取 8.1.4 中待净化液全部转移至内含除水剂和净化材料的塑料离心管中(每毫升待净化液使用

150 mg 无水硫酸镁, 50 mg PSA 和 50 mg C₁₈), 涡旋混匀后以 12 000 r/min 离心 5 min。准确吸取 2 mL 上清液至氮吹管, 45 °C 水浴氮吹至干后立即加入 1 mL 乙腈复溶, 涡旋混匀后过 0.22 μm 有机相微孔滤膜, 供 LC-MS/MS 测定。

8.3 空白基质提取液

取经测定不含被测组分的试样按 8.1 和 8.2 操作, 获得空白基质提取液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱条件

由于测试结果取决于所使用的仪器, 因此不可能给出液相色谱分析的通用参数。设定的参数应保证色谱分析时被测组分与其他组分能得到有效的分离, 下列给出的参数可供参考。

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱, 150 mm×2.1 mm(内径), 粒径 2.6 μm 或性能相当者;
- b) 流动相: A: 甲醇; B: 5 mmol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1;
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 进样量: 2 μL;
- e) 柱温: 45 °C;

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	20	80
5.0	90	10
8.0	90	10
9.0	20	80
10.0	20	80

8.4.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 电离方式: 电喷雾电离(ESI);
- b) 鞘气(kPa): 241.32;
- c) 辅助气(kPa): 68.95;
- d) 吹扫气(kPa): 6.89;
- e) 离子传输管温度(°C): 350;
- f) 蒸发温度(°C): 300;
- g) 扫描方式: 正离子;
- h) 监测方式: 多反应监测方式(MRM);
- i) 定量离子对、定性离子对、碰撞能量(eV)见表 2。

表 2 定量离子对、定性离子对、碰撞能量

化合物	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV
克百威	222.0	123.1 *	22
		165.1	13
3-羟基克百威	238.1	163.0 *	16
		181.1	10
注：带“*”的离子为定量离子。			

8.4.3 标准工作曲线的绘制

取空白样品按照 8.1 及 8.2 处理。用所得的样品溶液将克百威和 3-羟基克百威混合标准中间溶液(5.16)稀释得到的混合标准工作液,按浓度由低到高的顺序进样检测,以定量离子峰面积为纵坐标,标准工作溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线。

8.4.4 定性测定

按照 8.4.1 及 8.4.2 的条件测定试样和标准工作溶液,如果试样中待测物质的保留时间与标准工作溶液一致,保留时间偏差在±2.5%以内,并且定性离子对的相对丰度(是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示)与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致,相对丰度允许偏差不超过表 3 的规定,且每个离子的信噪比均≥3,则可判断试样中存在相应的被测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度(基峰)/%	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量测定

对标准工作溶液和样液等体积进样测定,待测样液中克百威和 3-羟基克百威的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。克百威及 3-羟基克百威物质信息见附录 A 中表 A.1,克百威与 3-羟基克百威的多反应监测色谱图见附录 B 中图 B.1 和图 B.2。

8.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

9 计算结果与表述

采用外标法定量,用色谱数据处理软件或按公式(1)分别计算试样中克百威和 3-羟基克百威的残留量,计算结果应扣除空白值。

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X —— 试样中克百威和 3-羟基克百威残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终样液代表的试样质量,单位为克(g)。

克百威残留物在 GB 2763 中定义为克百威及 3-羟基克百威之和,以克百威表示。因此按公式(2)计算试样中克百威的总残留量:

$$X_{\text{总}} = X_{\text{克百威}} + X_{\text{3-羟基克百威}} \times 0.93 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$X_{\text{总}}$ ——试样中以克百威表示的总残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

$X_{\text{克百威}}$ ——试样中克百威的残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

$X_{\text{3-羟基克百威}}$ ——试样中 3-羟基克百威的残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

0.93 ——3-羟基克百威换算为克百威的系数。

计算结果保留两位有效数字,当含量超过 1 mg/kg 时,保留三位有效数字。

10 定量限

本方法在牛奶中克百威和 3-羟基克百威的定量限为 0.001 mg/kg ;蜂胶中克百威和 3-羟基克百威的定量限为 0.05 mg/kg ;牛肉、鸡肉、猪肝脏、罗非鱼、鸡蛋、蜂蜜、蜂王浆、猪脂肪和猪肠衣中克百威和 3-羟基克百威定量限均为 0.01 mg/kg 。

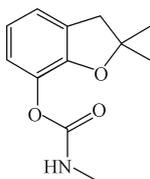
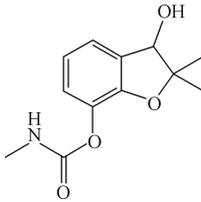
11 回收率与精密度

本方法对牛肉、鸡肉、猪肝脏、罗非鱼、鸡蛋、蜂蜜、蜂王浆、蜂胶、牛奶、猪脂肪和猪肠衣基质进行添加回收率试验,不同基质中不同添加水平下的回收率数据与精密度见附录 C 中表 C.1。

附 录 A
(资料性)
克百威及代谢物物质信息

克百威及代谢物物质信息见表 A.1。

表 A.1 克百威及代谢物物质信息

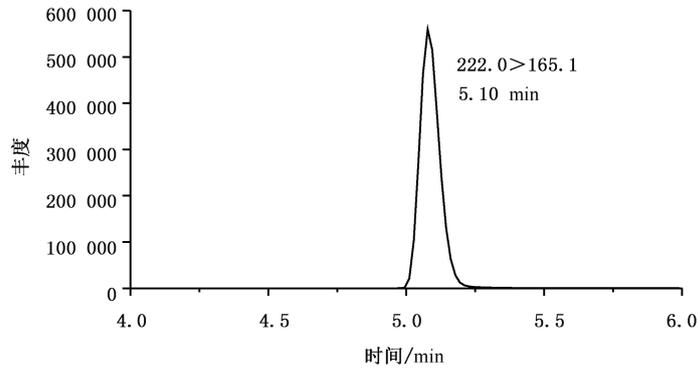
中文名称	英文名称	CAS号	分子式	结构式
克百威	Carbofuran	1563-66-2	$C_{12}H_{15}NO_3$	
3-羟基克百威	3-Hydroxycarbofuran	16655-82-6	$C_{12}H_{15}NO_4$	

附录 B

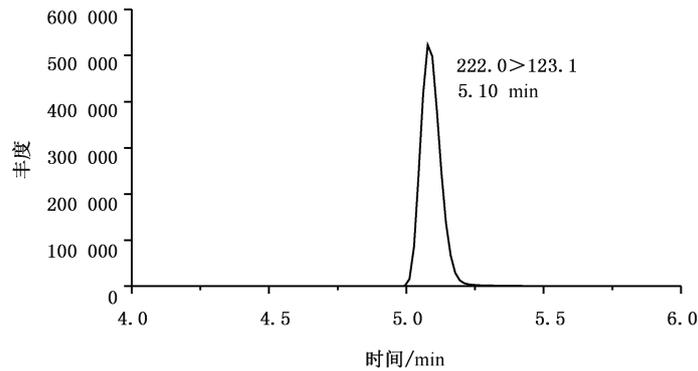
(资料性)

标准溶液多反应监测(MRM)色谱图

标准溶液多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1~图 B.2。

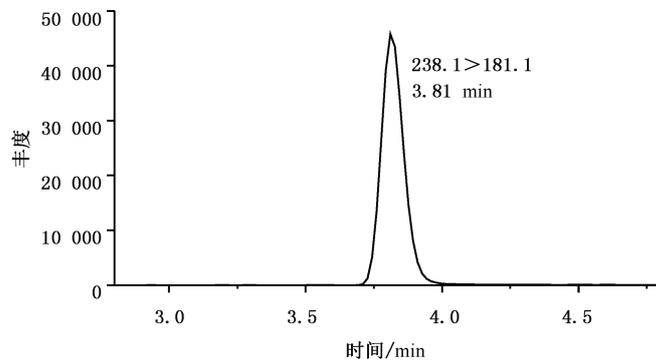


a) 克百威标准溶液定性离子色谱图



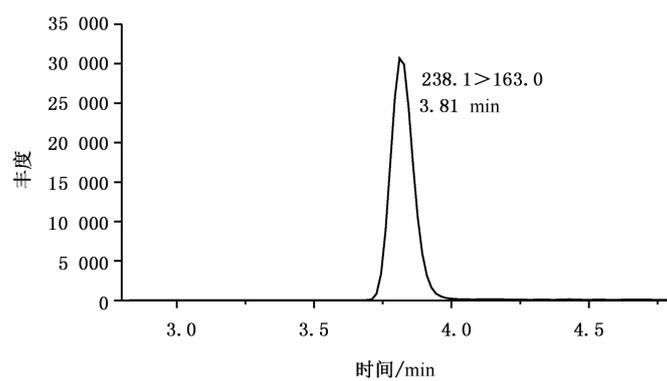
b) 克百威标准溶液定量离子色谱图

图 B.1 克百威标准溶液的多反应监测色谱图(0.01 mg/L)



a) 3-羟基克百威标准溶液定性离子色谱图

图 B.2 3-羟基克百威标准溶液的多反应监测色谱图(0.01 mg/L)



b) 3-羟基克百威标准溶液定量离子色谱图

图 B.2 3-羟基克百威标准溶液的多反应监测色谱图(0.01 mg/L) (续)

以正式出版文本为准

附 录 C

(资料性)

克百威及代谢物 3-羟基克百威各基质添加水平、回收率范围及精密度

克百威及代谢物 3-羟基克百威各基质添加水平、回收率范围及精密度见表 C.1。

表 C.1 克百威及代谢物 3-羟基克百威各添加水平的回收率范围及精密度

基质	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%		RSD/%	
		克百威	3-羟基克百威	克百威	3-羟基克百威
牛肉	10	100.0~106.0	103.0~108.0	2.9	1.7
	20	92.5~95.0	90.5~95.5	1.0	2.4
	100	92.3~94.8	87.9~92.3	1.1	2.0
鸡肉	10	94.0~99.0	86.0~92.0	2.2	2.2
	20	95.0~99.0	88.5~92.5	1.6	1.0
	100	93.0~93.9	87.8~90.1	0.4	1.1
猪肝脏	10	89.0~94.0	82.0~89.0	2.0	2.7
	20	90.0~94.0	84.0~93.0	1.5	3.3
	100	86.5~98.2	86.4~96.4	4.4	5.1
罗非鱼	10	95.0~101.0	101.0~108.0	2.1	3.2
	20	83.0~102.5	94.0~106.5	6.7	4.7
	100	85.4~98.0	89.0~97.4	5.0	3.9
鸡蛋	10	100.0~104.0	88.0~97.0	1.6	4.7
	20	96.0~102.0	90.5~94.5	2.5	1.6
	100	92.7~95.4	90.2~92.3	1.1	0.8
蜂蜜	10	98.0~107.0	99.0~109.0	3.1	3.5
	20	96.5~98.0	98.0~105.5	0.5	2.7
	100	92.4~99.2	89.8~97.2	2.8	3.0
蜂王浆	10	95.0~100.0	87.0~100.0	2.0	6.2
	20	92.5~95.5	86.5~93.5	1.3	3.0
	100	88.8~93.7	84.5~99.9	1.9	6.8
蜂胶	50	89.2~100.6	92.4~105.2	5.2	4.8
	100	98.9~108.2	92.7~103.6	3.5	3.9
	500	97.6~101.8	92.4~97.5	1.7	2.0
牛奶	1	90.0~100.0	86.0~90.0	5.8	1.8
	2	90.0~105.0	90.0~100.0	5.4	3.9
	10	87.0~93.0	83.0~91.0	2.3	3.4

表 C.1 克百威及代谢物 3-羟基克百威各添加水平的回收率范围及精密度 (续)

基质	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%		RSD/%	
		克百威	3-羟基克百威	克百威	3-羟基克百威
猪脂肪	10	98.0~108.0	95.0~101.0	3.5	2.5
	20	85.0~100.0	91.5~95.0	6.2	1.5
	100	87.8~100.6	92.9~95.8	4.3	1.1
猪肠衣	10	92.0~103.0	85.0~96.0	4.8	5.0
	20	84.5~98.0	84.5~92.5	5.7	3.8
	100	85.0~99.0	83.6~97.1	5.3	5.8

以正式出版文本为准

参 考 文 献

- [1] GB 2763 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量
-