



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 猪、鸡可食性组织及鸡蛋中哌嗪残留量的 测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-

Determination of piperazine residue in swine and chicken edible tissues and
egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

(公开征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

猪、鸡可食性组织及鸡蛋中哌嗪残留量的测定

液相色谱—串联质谱法

1 范围

本文件规定了猪、鸡可食性组织及鸡蛋中哌嗪残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织以及鸡蛋中哌嗪残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中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

肌肉和脂肪中残留的药物用三氯乙酸溶液和乙腈提取，经正己烷去脂后过混合型阳离子交换柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配内标法定量。其他样品中残留的药物用氨水乙腈提取，提取液氮吹复溶后用正己烷去脂，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配内标法定量。

5 试剂与材料

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 三氯乙酸 (CCl_3COOH)。

5.1.6 氨水 ($NH_3 \cdot H_2O$)：含量 25%-28%。。

5.2 溶液的配制

5.2.1 5%三氯乙酸溶液：取 50 g 三氯乙酸，溶于 950 mL 水，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.3 乙腈饱和正己烷：100 mL 乙腈中加入 500 mL 正己烷，充分振荡后，静置分层，取上层正己烷。

5.2.4 20%乙腈溶液：取 40 mL 乙腈，加水稀释至 200 mL，混匀。

5.2.5 5%氨水乙腈：取 25 mL 氨水，用乙腈稀释至 500 mL，混匀。

5.2.6 2%甲酸溶液：取 10 mL 甲酸，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.2.7 10%氨水乙腈：取 50 mL 氨水，用乙腈稀释至 500 mL，混匀。

5.3 标准品

哌嗪 (piperazine, $C_4H_{10}N_2$, CAS 110-85-0)，含量 $\geq 99\%$ 。

哌嗪- D_{10} (piperazine- D_{10} , $C_4D_{10}N_2$, CAS 362049-61-4)，含量 $\geq 99\%$ 。

5.4 标准溶液的制备

4.4.1 标准储备溶液 (1000 $\mu g/mL$)：取哌嗪适量 (相当于有效成分 10 mg)，精密称定，用乙腈适量使溶解，并稀释定容至刻度，配制成浓度为 1000 $\mu g/mL$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}C$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标储备溶液 (1000 $\mu g/mL$)：取哌嗪- D_{10} 适量 (相当于有效成分 10 mg)，精密称定，用乙腈适量使溶解，并稀释定容至刻度，配制成浓度为 1000 $\mu g/mL$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}C$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.3 标准中间液 (100 $\mu g/mL$)：准确移取标准储备溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制溶液浓度为 100 $\mu g/mL$ 的标准中间液。-18 $^{\circ}C$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.4 同位素内标中间液 (100 $\mu g/mL$)：准确移取同位素内标储备溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制溶液浓度为 100 $\mu g/mL$ 的同位素内标中间液。-18 $^{\circ}C$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.5 同位素内标工作液 (10 $\mu g/mL$)：准确移取同位素内标中间液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，该溶液浓度为 10 $\mu g/mL$ 。-18 $^{\circ}C$ 以下保存，有效期 14 d。

5.4.6 标准系列工作液 I：准确移取标准中间液和同位素内标中间液适量，用 20% 乙腈溶液逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、200 和 1000 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液，每一标准工作溶液含内标浓度均为 200 $\mu\text{g/L}$ 。现用现配。

5.4.7 标准系列工作液 II：准确移取标准中间液和同位素内标中间液适量，用 20% 乙腈溶液逐级稀释成浓度为 50、200、500、1000、2000 和 5000 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液，每一标准工作溶液含内标浓度均为 2000 $\mu\text{g/L}$ 。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 混合型阳离子交换柱：60 mg，3 mL，或相当者。

5.5.2 针头式过滤器（通用型滤膜）：孔径 0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 离心机：6 000 r/min 或以上。

6.4 涡旋混合器。

6.5 振荡器。

6.6 超声波清洗器。

6.7 氮吹仪。

6.8 离心管：聚丙烯塑料离心管，50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

——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。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 前处理

8.1.1 肌肉和脂肪

取试料 (2.5 ± 0.05) g 于 50 mL 离心管中, 加入同位素内标工作液 50 μ L, 再依次准确加入 5% 三氯乙酸溶液 6 mL 和乙腈 2 mL, 涡旋混合 1 min, 超声提取 10 min, 6000 r/min 离心 3 min, 收集上清液, 残渣中准确加入 5% 三氯乙酸溶液 6 mL 和乙腈 2 mL, 同样步骤提取 1 次, 合并上清液, 加入乙腈饱和正己烷 10 mL, 涡旋混合 1 min, 4°C 下 6000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层, 取下层清液备用。

依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 和 2% 甲酸溶液 5 mL 活化固相萃取柱, 备用液上样后, 再依次用 2% 甲酸溶液 5 mL、水 5 mL 和甲醇 5 mL 淋洗, 抽干小柱, 再用 10% 氨水乙腈 10 mL 进行洗脱, 收集洗脱液, 50°C 水浴氮气吹干, 准确加入 20% 乙腈溶液 2.5 mL 溶解残渣, 超声混匀, 过 0.22 μ m 滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.1.2 肝脏、肾脏和鸡蛋

取试料 (5 ± 0.05) g 于 50 mL 离心管中, 加入同位素内标中间液 100 μ L, 再准确加入 5% 氨水乙腈 15 mL, 涡旋混合 1 min, 振荡 15 min, 6000 r/min 离心 3 min, 收集上清液, 50°C 水浴氮气吹干, 准确加入 20% 乙腈溶液 5.0 mL 溶解残渣, 超声混匀, 并加入乙腈饱和正己烷 5 mL, 涡旋混合 1 min, 6000 r/min 离心 3 min, 弃去正己烷层, 取下层清液过 0.22 μ m 滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.2 基质匹配标准曲线的制备

取空白试料依次按 8.1.1 或 8.1.2 处理, 50°C 水浴氮气吹干后分别加入 2.5 mL (5.4.6) 或 5.0 mL (5.4.7) 系列标准工作溶液, 再按 8.1.1 或 8.1.2 后续步骤处理, 得内标浓度均为 200 μ g/L 的 10、20、50、100、200 和 1000 μ g/L 的系列肌肉和脂肪基质匹配标准工作溶液或含内标浓度均为 2000 μ g/L 的 50、200、500、1000、2000 和 5000 μ g/L 的系列肝脏、肾脏和鸡蛋基质匹配标准工作溶液, 供液相色谱-串联质谱测定。以定量离子对峰面积与内标物离子对峰面积的比值为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 或相当者;

b) 流动相: A: 0.1% 甲酸溶液, B: 乙腈, 梯度洗脱程序见表1;

c) 流速: 0.3 mL/min;

d) 柱温: 35 °C;

e) 进样量: 5 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	0.1%甲酸溶液 (%)	乙腈 (%)
0	90	10
2.0	90	10
3.0	50	50
4.0	50	50
4.1	90	10
6.0	90	10

8.3.2 质谱参考条件

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 (MRM)。

d) 毛细管电压: 1.5 KV。

e) RF透镜电压: 0.5 V。

f) 离子源温度: 150 °C。

g) 脱溶剂气温度: 500 °C。

h) 锥孔气流速: 50 L/h。

i) 脱溶剂气流速: 1000 L/h。

j) 倍增器电压: 650 V。

k) 二级碰撞气: 氦气。

l) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表2。

表 2 保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

中文名称	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)
哌嗪	0.67	87.2>44.1 87.2>56.1	87.2>44.1	30	12 16

哌嗪-D ₁₀	0.68	96.5>49.2	96.5>49.2	30	12
--------------------	------	-----------	-----------	----	----

8.3.3 测定法

8.3.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试样中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值与标准溶液中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值相对偏差在±1.0%以内，且试料溶液中的相对离子丰度与基质匹配标准溶液中的相对离子丰度相比在±40%以内，则可判定为样品中存在对应的待测物质。

8.3.3.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，内标法计算。基质匹配标准溶液及试料溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱-质谱条件下，基质匹配标准溶液多反应监测色谱图见附录A.1。对于试料中哌嗪残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

8.4 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 结果计算和表述

试料中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is} V}{A_{is} A_s C'_{is} m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样溶液中哌嗪的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_{is} ——试样溶液中哌嗪内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_s ——对照溶液中哌嗪浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C'_{is} ——对照溶液中哌嗪内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A_i ——试样溶液中哌嗪的峰面积；

A_{is} ——试样溶液中哌嗪内标的峰面积；

A_s ——对照溶液中哌嗪的峰面积；

A'_{is} ——对照溶液中哌嗪内标的峰面积；

V ——定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试料的质量，单位为克（g）；

注：计算结果不小于 $1 \mu\text{g/kg}$ 的保留 3 位有效数字， $1 \mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后 2 位。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法肌肉和脂肪的检测限为 $15\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $20\mu\text{g/kg}$ ；肝脏、肾脏和鸡蛋的检出限为 $100\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $200\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法肌肉和脂肪组织哌嗪在 $20\sim 1600 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $80\%\sim 120\%$ ，肝脏、肾脏和鸡蛋组织哌嗪在 $200\sim 4000 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $80\%\sim 120\%$ 。

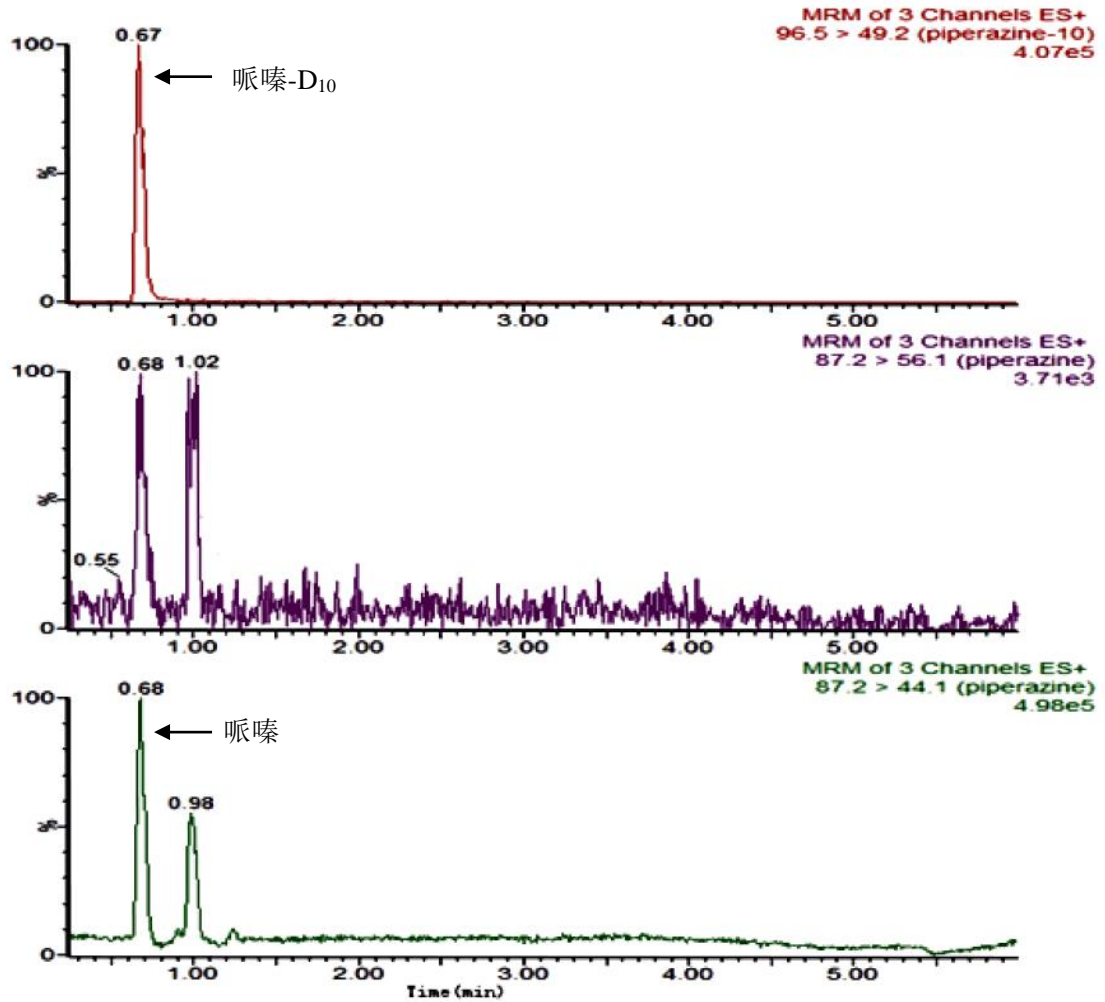
10.3 精密度

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

附录 A
(资料性附录)

猪脂肪基质匹配标准工作溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图

猪脂肪基质匹配标准工作溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图见图A.1。



图A.1 猪脂肪基质匹配哌嗪标准溶液(10 $\mu\text{g/L}$, 内标浓度200 $\mu\text{g/L}$) MRM色谱图