

中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 猪、羊可食性组织及羊奶中苯巴比妥残 留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of phenobarbital residue in edible tissues of swine and sheep and in
milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

公开征求意见稿

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

猪、羊可食性组织及羊奶中苯巴比妥残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了猪、羊可食性组织及羊奶中苯巴比妥残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱的测定方法。

本文件适用于猪和羊肌肉、脂肪、肝脏、肾脏及羊奶中苯巴比妥残留量的检测，其他畜禽产品的检测可以参照执行。

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

试料中残留的苯巴比妥经乙酸乙酯提取，正己烷除脂，亲水-亲脂固相萃取柱净化，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 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.2 正己烷（ C_6H_{14} ）。

5.1.3 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）。

5.1.4 磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）。

5.1.5 氢氧化钠（ NaOH ）。

5.2 溶液配制

5.2.1 2%甲醇溶液：取甲醇 2 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.2 10%甲醇溶液：取甲醇 10 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.3 10 mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 20 g，用水溶解并稀释至 50 mL。

5.2.4 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液（pH=6.0）：取磷酸二氢钾 13.6 g，加水 450 mL 溶解，用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 到 6.0，用水稀释至 500 mL。

5.2.5 正己烷-乙酸乙酯溶液（95:5）：取正己烷 190 mL，加乙酸乙酯 10 mL，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 苯巴比妥（Phenobarbital, $C_{12}H_{12}N_2O_3$, CAS 号:50-06-6）：含量 \geq 98.0%。

5.3.2 苯巴比妥-D₅（Phenobarbital-D₅, $C_{12}H_7D_5N_2O_3$, CAS:72793-46-5）：含量 \geq 98.0%。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 苯巴比妥标准储备液：取苯巴比妥标准品约 10 mg，精密称定，用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 苯巴比妥标准工作液：准确量取苯巴比妥标准储备液 0.1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用 10% 甲醇溶液稀释至刻度，配制成浓度为 1 μ g/mL 的标准工作液。2℃~8℃ 保存，有效期 3 个月。

5.4.3 苯巴比妥-D₅ 内标储备液：取苯巴比妥-D₅ 标准品约 10 mg，精密称定，用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 的内标储备液。-18℃ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.4 苯巴比妥-D₅ 内标中间溶液：准确量取苯巴比妥-D₅ 内标储备液 0.1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用 10% 甲醇溶液稀释至刻度，配制成浓度为 1 μ g/mL 的内标中间溶液。2℃~8℃ 保存，有效期 3 个月。

5.4.5 苯巴比妥-D₅ 内标工作液：准确量取苯巴比妥-D₅ 内标中间溶液 1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用 10% 甲醇溶液稀释至刻度，配制成浓度为 0.1 μ g/mL 的内标工作液。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 亲水-亲脂平衡型固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 尼龙微孔滤膜：0.22 μ m。

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 0.01 g 和 0.00001 g。

6.3 均质机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 振荡混合器。

6.6 冷冻高速离心机：转速不低于 13000 r/min。

6.7 pH 计。

6.8 固相萃取装置。

6.9 氮吹仪。

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奶，混合均匀。

a) 取均质后的供试样品，作为供试试样。

b) 取均质后的空白样品，作为空白试样。

c) 取均质后的空白样品，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

称取试料 (2 ± 0.05) g于50 mL离心管，准确加入苯巴比妥-D₅内标工作溶液100 μ L，加乙酸乙酯20 mL，涡旋30 s，振荡提取5 min，4℃下5 000 r/min离心5 min，收集上清液，于45℃水浴氮气吹干。加0.2 mol/L磷酸二氢钾溶液10 mL溶解残余物，涡旋1 min，加正己烷10 mL，振荡2 min，4℃下5 000 r/min离心5 min，去除正己烷层，重复去脂一次，取下层样液备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水和0.2 mol/L磷酸二氢钾溶液各5 mL活化，取备用液过柱，依次用水、2%甲醇溶液各5 mL淋洗，抽干，然后加正己烷-乙酸乙酯溶液5 mL淋洗，抽干。取甲醇5 mL洗脱，收集洗脱液，于45℃氮气吹干。用10%甲醇溶液1.0 mL溶解残余物，涡旋1 min，4℃下13 000 r/min离心10 min，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取苯巴比妥标准工作溶液、苯巴比妥-D₅内标工作溶液适量，用10%甲醇溶液稀释，配制成苯巴比妥浓度为1 μ g/L、2 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L、50 μ g/L和苯巴比妥-D₅浓度均为10 μ g/L的系列标准溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。以苯巴比妥特征离子质量色谱峰面积与内标物特征离子质量色谱峰面积比值为纵坐标、相应的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 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μ m）或相当者；
- 柱温：40℃；
- 进样量：5 μ L；
- 流速：0.3 mL/min；
- 流动相：A为水，B为甲醇，梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
-----------	--------	--------

0	90	10
3	90	10
4	60	40
6	20	80
7	10	90
7.1	90	10
10	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测；
- d) 喷雾电压：-4500 V；
- e) 雾化温度：500℃；
- f) 气帘气：40 psi；
- g) 雾化气：45 psi；
- h) 定性、定量离子对和去簇电压、碰撞能量见表2。

表2 定性离子对、定量离子对和去簇电压、碰撞能量

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
苯巴比妥	230.9>42.1	230.9>42.1	-30	-50
	230.9>188.2			-14
苯巴比妥-D ₅	236.0>85.0	236.0>85.0	-50	-17

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中苯巴比妥与其同位素内标（苯巴比妥-D₅）的保留时间之比与标准溶液中苯巴比妥与其同位素内标（苯巴比妥-D₅）的保留时间之比偏差在1%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。其允许偏差为 ±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按内标法定量。试样溶液及标准溶液中苯巴比妥与苯巴比妥-D₅的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。对于试样中苯巴比妥残留量超过仪器测定线性范围的，在提取时根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量，使试样溶液稀释后苯巴比妥的响应在仪器线性范围内，对应苯巴比妥-D₅浓度与标准曲线制备中的苯巴比妥-D₅浓度一致。在上述色谱-质谱条件下，苯巴比妥与苯巴比妥-D₅标准溶液的特征离子对质量色谱图见附录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

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算。

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

式中：

ω —试样中待测药物残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

ρ_{is} —试样溶液中待测药物同位素内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ_s —标准溶液中待测药物浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ'_{is} —标准溶液中待测药物同位素内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A_i —试样溶液中待测药物的峰面积；

A_{is} —试样溶液中待测药物同位素内标的峰面积；

A_s —标准溶液中待测药物的峰面积；

A'_{is} —标准溶液中待测药物同位素内标的峰面积；

V —溶解最终残余物溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试样质量，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 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法苯巴比妥的检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $1 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

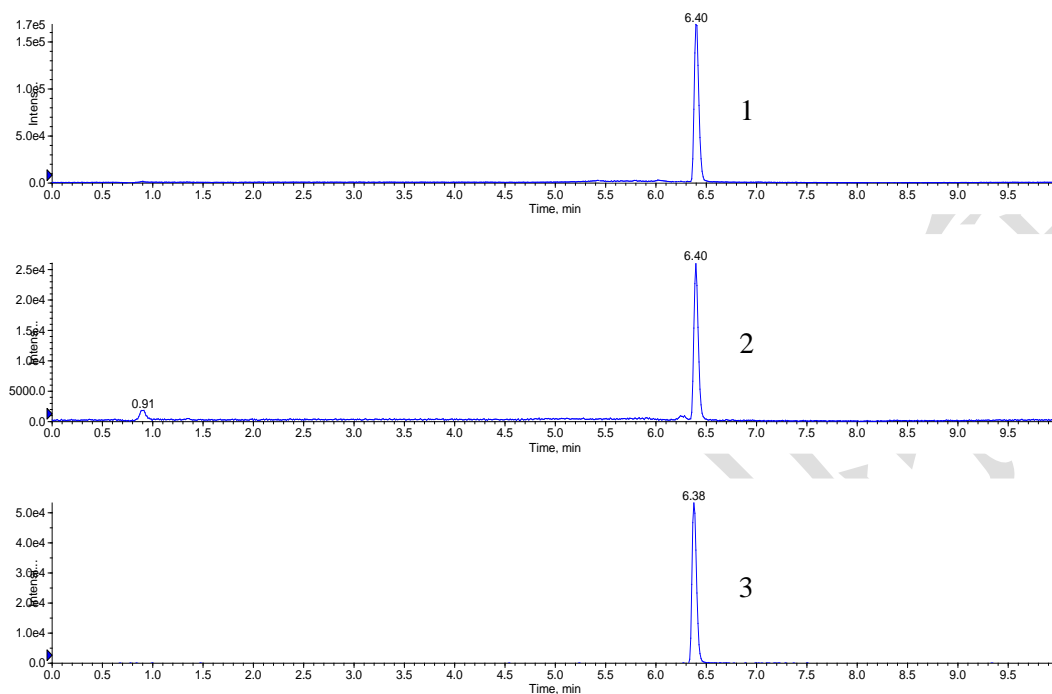
本方法在 $1 \mu\text{g/kg} \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为70%~120%。

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)
标准溶液特征离子质量色谱图

苯巴比妥及同位素内标标准溶液特征离子质量色谱图见图A. 1。



标引序号说明:

- 1——苯巴比妥特征离子质量色谱图 (230.9>42.1)
- 2——苯巴比妥特征离子质量色谱图 (230.9>188.2)
- 3——苯巴比妥-D₅ 特征离子质量色谱图 (236.0>85.0)

图 A.1 苯巴比妥及同位素内标标准溶液特征离子质量色谱图
(苯巴比妥为 2 $\mu\text{g/L}$, 苯巴比妥-D₅ 为 10 $\mu\text{g/L}$)