



中华人民共和国国家标准

GB 29704—2013

食品安全国家标准

动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多 残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of Cyromazine and Melamine residue in animal derived food by Ultra
Performance Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometric method

(电子版本仅供参考，以标准正式出版物为准)

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部

发布

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

目 次

目 次	I
前 言	II
动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法	3
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 原理	3
4 试剂和材料.....	3
5 仪器和设备.....	4
6 样品的制备与保存	4
6.1 试料的制备	4
6.2 试料的保存	5
7 测定步骤	5
7.1 基质匹配标准曲线的制备	5
7.2 提取.....	5
7.3 净化	5
7.4 测定.....	5
7.5 空白试验.....	6
8 结果计算和表述.....	7
9 检测方法灵敏度、准确度和精密度.....	7
9.1 灵敏度.....	7
9.2 准确度	7
9.3 精密度	7
附录 A	8

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准系国内首次发布的国家标准。

动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定

超高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺残留量检测的制样和超高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉、肾脏和蛋中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 1.1-2000 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中残留的环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺，用3%三氯乙酸溶液提取，MCX柱净化，超高效液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 环丙氨嗪、三聚氰胺对照品：含量 \geq 98.0%。

4.2 三氯乙酸

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 甲酸

4.6 氨水

4.7 乙酸铵

4.8 MCX 固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。

- 4.9 3%三氯乙酸溶液：取三氯乙酸3 g，用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.10 2%甲酸水溶液：取甲酸 2 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.11 5%氨化甲醇溶液：取氨水 5 mL，用甲醇溶解并稀释至 100 mL。
- 4.12 50%乙腈水溶液：取乙腈 50 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.13 0.1mol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 7.71 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 4.14 1 mg/mL 环丙氨嗪、三聚氰胺标准贮备液：精密称取环丙氨嗪和三聚氰胺对照品 10 mg，分别于 10 mL 棕色量瓶中，用 50%乙腈水溶液溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的环丙氨嗪标准贮备液和三聚氰胺标准贮备液。2~8℃保存，有效期 3 个月。
- 4.15 10 μg/mL 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液：精密量取 1 mg/mL 的环丙氨嗪标准贮备液和三聚氰胺标准贮备液各 1.0 mL，于 100 mL 容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液。2~8℃保存，有效期 3 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 超高效液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平：感量 0.000 01g。
- 5.3 天平：感量 0.01 g。
- 5.4 涡旋混合器
- 5.5 离心机
- 5.6 氮吹仪
- 5.7 离心管：50 mL。
- 5.8 微孔滤头：0.2 μm。

6 样品的制备与保存

6.1 试料的制备

6.1.1 鸡蛋

取新鲜或冷冻空白或供试鸡蛋，去壳，并使均质。

——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。

6.1.2 鸡的肌肉肉和肾脏组织

取新鲜或冷冻空白或供试组织，绞碎，并使均质。

- 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。

6.2 试料的保存

-20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 基质匹配标准曲线的制备

精密量取10 μg/mL环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准工作液适量，用95%乙腈水溶液稀释，配制成浓度为2、5、10、20、50和100 ng/mL的系列混合标准溶液，并各取1.0 mL，分别溶解经提取、净化及吹干后的6份空白试料残余物，过滤，供超高效液相色谱-串联质谱测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标，基质匹配对照溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.2 提取

称取试料(2±0.02) g，于50 mL离心管中，加3%三氯乙酸溶液20 mL，涡旋混合30 s，超声10 min，静置10 min，10 000 r/min离心10 min，取上层液，备用。

7.3 净化

MCX柱依次用甲醇3 mL和水3 mL活化，取备用液10 mL过柱，加2%甲酸水溶液3 mL、甲醇3 mL淋洗，抽干，加5%氯化甲醇溶液3 mL洗脱，抽干，收集洗脱液，于50℃氮气吹干，用95%乙腈水溶液1.0 mL溶解残余物，滤膜过滤，供超液相色谱-串联质谱测定。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱柱：BEH HILIC色谱柱(50 mm×2.1 mm，粒径1.7 μm)，或相当者；

流动相：A：乙腈； B：0.1 mol/L 乙酸铵溶液；

梯度为：0~2.5 min，95%A 线性变化至 80%A；2.5~4 min，保持 95%A；

流速：0.3 mL/min；

柱温：30℃；

进样量：10 μL。

7.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

电离电压：3.0kV；

源温：110℃；

雾化温度：350℃；

锥孔气流速：50L/h；

雾化气流速：650L/h；

定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表1。

表1 定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
环丙氨嗪	166.9>84.6	166.9>84.6	35	18
	166.9>124.8			18
三聚氰胺	126.9>84.7	126.9>84.7	30	15
	126.9>67.7			22

7.4.3 测定法

取试样溶液和相应的基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，外标法计算。标准溶液及试样溶液中环丙氨嗪及三聚氰胺的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表2的要求。标准溶液和试样溶液中各特征离子的质量色谱图见附录A。

表2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 %	允许偏差 %
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

7.5 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试料中环丙氨嗪和三聚氰胺残留量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$): 按下式计算

$$X = \frac{Ac_s V_1 V_3}{A_s V_2 m}$$

式中: X ——供试试料中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的残留量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;
 A ——试样溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的峰面积;
 A_s ——基质匹配标准溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的峰面积;
 c_s ——基质匹配标准溶液中相应的环丙氨嗪或三聚氰胺的浓度, ng/mL ;
 V_1 ——提取液的总体积, mL ;
 V_2 ——过固相萃取柱所用提取液体积, mL ;
 V_3 ——溶解残余物的体积, mL ;
 m ——供试试料的质量, g 。

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留三位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $2.5 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

9.3 精密度

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

附录 A
(资料性附录)

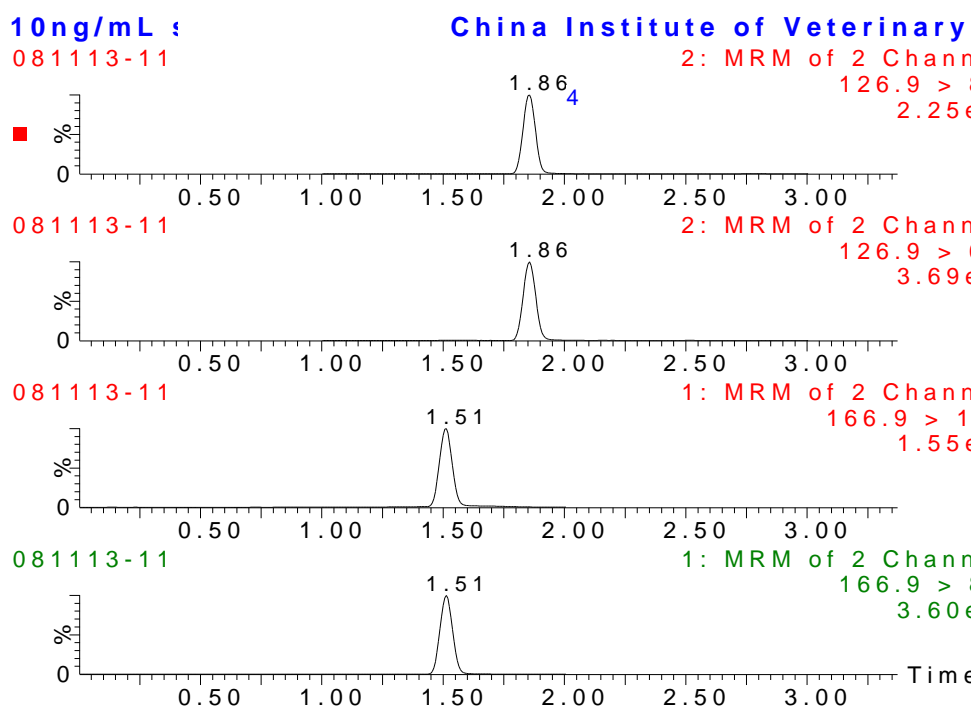
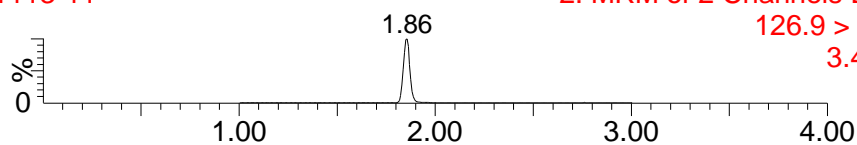


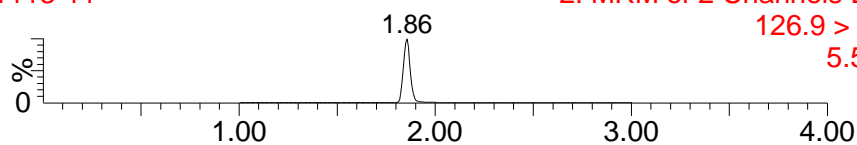
图 A1 环丙氨嗪及三聚氰胺标准溶液特征离子质量色谱图 (10 ng/mL)

10ng/mL std

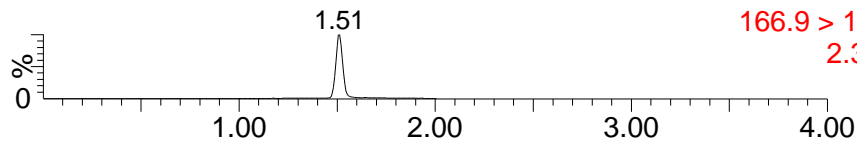
081113-11 2: MRM of 2 Channels ES+
126.9 > 84.7
3.46e6



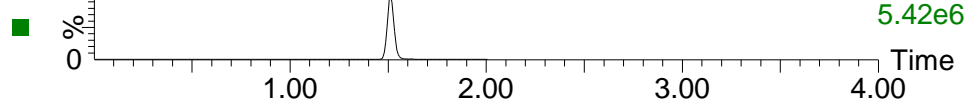
081113-11 2: MRM of 2 Channels ES+
126.9 > 67.7
5.55e5



081113-11 1: MRM of 2 Channels ES+
166.9 > 124.8
2.30e6

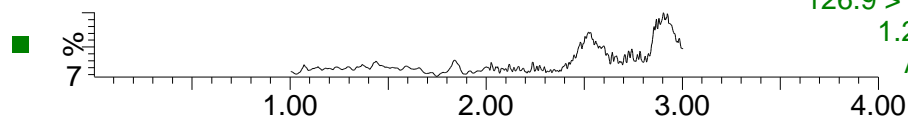


081113-11 1: MRM of 2 Channels ES+
166.9 > 84.6
5.42e6

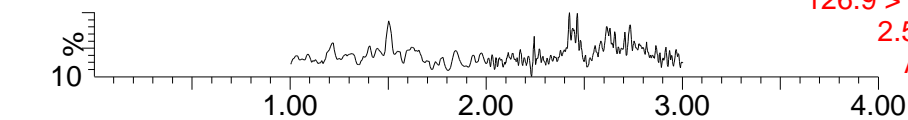


kidney blank

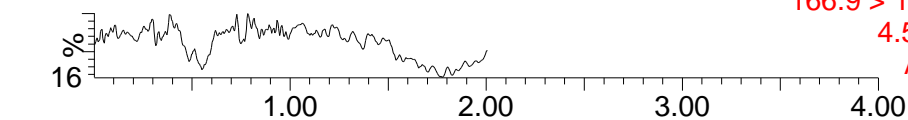
081113-12 2: MRM of 2 Channels ES+
126.9 > 84.7
1.22e4
Area



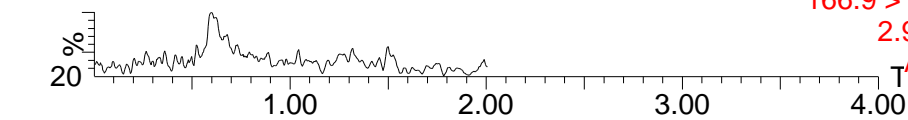
081113-12 2: MRM of 2 Channels ES+
126.9 > 67.7
2.57e3
Area



081113-12 1: MRM of 2 Channels ES+
166.9 > 124.8
4.55e3
Area



081113-12 1: MRM of 2 Channels ES+
166.9 > 84.6
2.94e3
Area



图A2 鸡肾脏组织空白试样特征离子质量色谱图

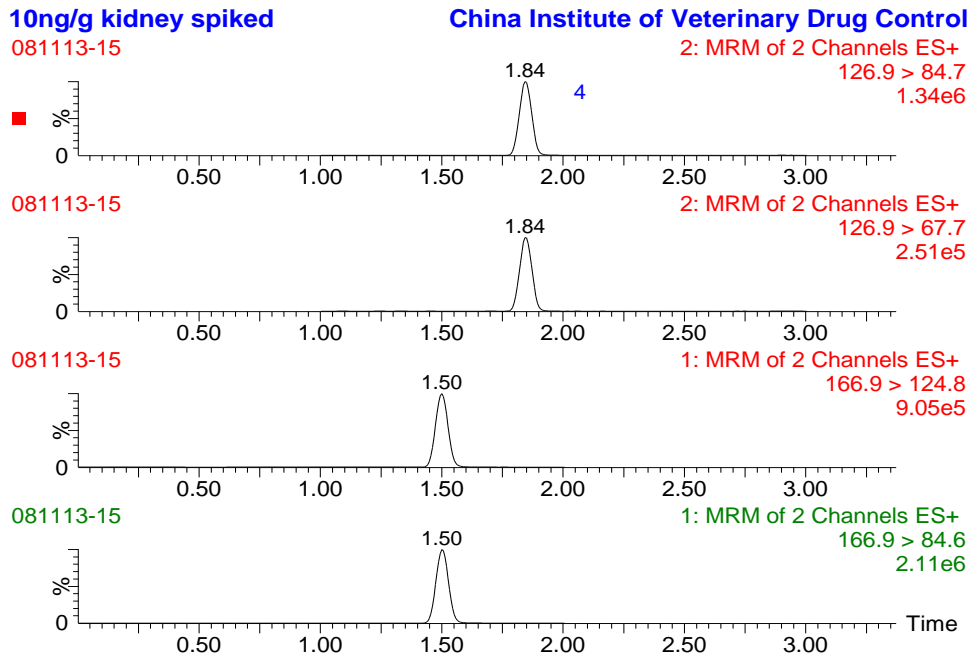


图 A3 鸡肾脏组织空白添加环丙氨嗪和三聚氰胺试样特征离子质量色谱图(10 ng/g)

- 注：1—环丙氨嗪特征离子质量色谱图（166.9>84.6）；
 2—环丙氨嗪特征离子质量色谱图（166.9>124.8）；
 3—三聚氰胺特征离子质量色谱图（126.9>67.7）；
 4—三聚氰胺特征离子质量色谱图（126.9>84.7）。