



中华人民共和国国家标准

GB 31613.3—2021

食品安全国家标准 鸡可食性组织中二硝托胺残留量的测定

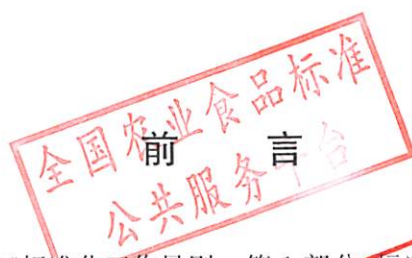
National food safety standard—
Determination of dinitolmide residues in chicken edible tissues

2021-09-16 发布

2022-02-01 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 发布
国家市场监督管理总局



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。

食品安全国家标准

鸡可食性组织中二硝托胺残留量的测定

方法一 液相色谱法

1 范围

本文件规定了鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中二硝托胺及其代谢物残留量检测的制样和液相色谱测定方法。

本文件适用于鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中二硝托胺及其代谢物残留量的检测。

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

试样中残留的二硝托胺及其代谢物经磷酸盐缓冲液提取,HLB固相萃取柱净化,液相色谱分离,二极管阵列检测器检测,外标法定量。

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 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

5.1.2 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。

5.1.3 氢氧化钠(NaOH)。

5.1.4 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.5 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.6 盐酸(HCl)。

5.2 溶液的配制

5.2.1 1.0 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 21.2 mL,用水稀释至 250 mL,摇匀。

5.2.2 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 40 g,加水适量使溶解并稀释至 1 L,混匀。

5.2.3 磷酸盐缓冲液(pH 6.0):取磷酸氢二钾 2.0 g、磷酸二氢钾 8.0 g,加水适量使溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。

5.2.4 磷酸盐缓冲液(pH 4.0):取磷酸盐缓冲液(pH 6.0),用 1.0 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 4.0,即得。

5.2.5 0.1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.2.6 0.1%甲酸-乙腈:取 0.1%甲酸溶液 800 mL、乙腈 200 mL,混匀。

5.3 标准品

二硝托胺、二硝托胺代谢物(3-ANOT),含量均 $\geq 95\%$,见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液:取二硝托胺、3-ANOT 标准品各 10 mg,精密称定,用适量乙腈溶解并定容至 100 mL 容量瓶,摇匀。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准储备液:分别精密量取 2 种标准储备液各 50 mL 于 100 mL 容量瓶中,摇匀,即得。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准工作液:分别精密量取混合标准储备液适量,用 0.1%甲酸-乙腈稀释制成含 3-ANOT 和二硝托胺浓度为 25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 、1 000 $\mu\text{g/L}$ 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 HLB 固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 滤膜:孔径 0.22 μm ,有机系。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱仪:配二极管矩阵检测器。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 固相萃取装置。

6.4 均质机。

6.5 离心管:聚丙烯塑料离心管,50 mL。

6.6 离心机:8 000 r/min 或以上。

6.7 pH 计。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

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液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,3 个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g(准确至 $\pm 0.02\text{ g}$)于 50 mL 离心管,加磷酸盐缓冲液(pH 6.0)10.0 mL[鸡肝脏、肾脏加磷酸盐缓冲液(pH 4.0)],10 000 r/min 均质 1 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,残渣加相应磷酸盐缓冲液 10.0 mL,重复处理,合并上清液。准确移取上清液 8 mL,用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化。取备用液,过柱,待液面到达柱床表面时用水 3 mL 淋洗,抽干,用 0.1%甲酸-乙腈 4 mL 洗脱,收集洗脱液,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

分别精密量取混合标准工作液适量,注入液相色谱,记录色谱图。以各组分峰面积为纵坐标、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 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 或相当者;
- b) 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为乙腈, 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	80	20
1.0	80	20
5.0	30	70
5.1	80	20
7.0	80	20

- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 波长: 246 nm(二硝托胺); 310 nm(3-ANOT);
- e) 柱温: 30 ℃;
- f) 进样量: 10 μL。

8.4.2 测定法

取试样溶液和标准溶液, 作单点或多点校准, 按外标法以色谱峰峰面积定量。标准溶液及试样溶液中目标药物的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样液中二硝托胺和 3-ANOT 的保留时间与标准工作液中二硝托胺和 3-ANOT 保留时间偏差在 ±2.5% 以内。标准溶液液相色谱图见附录 B 中的图 B.1。

8.5 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

试样中二硝托胺的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中二硝托胺或 3-ANOT 残留量的数值, 单位为微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 标准溶液中二硝托胺或 3-ANOT 浓度的数值, 单位为微克每升(μg/L);
- A —— 试样溶液中二硝托胺或 3-ANOT 的峰面积;
- A_s —— 标准溶液中二硝托胺或 3-ANOT 的峰面积;
- V₁ —— 提取液总体积的数值, 单位为毫升(mL);
- V₂ —— 用于固相萃取净化上清液体积的数值, 单位为毫升(mL);
- V₃ —— 洗脱液体积的数值, 单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值, 单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中的检测限为 150 μg/kg, 定量限为 500 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 500 μg/kg~12 000 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 70%~110%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 ≤15%, 批间相对标准偏差 ≤20%。

方法二 液相色谱-串联质谱法

11 范围

本文件规定了鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中二硝托胺及其代谢物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中二硝托胺及其代谢物残留量的检测。

12 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

13 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

14 原理

试样中残留的二硝托胺及其代谢物经磷酸盐缓冲液提取,HLB固相萃取柱净化,液相色谱串联质谱法检测,基质校准外标法定量。

15 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。

15.1 试剂

15.1.1 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

15.1.2 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。

15.1.3 氢氧化钠(NaOH)。

15.1.4 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

15.1.5 甲酸(HCOOH):色谱纯。

15.1.6 盐酸(HCl)。

15.2 溶液的配制

15.2.1 1.0 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 21.2 mL,用水稀释至 250 mL,摇匀。

15.2.2 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 40 g,加水适量使溶解并稀释至 1L,混匀。

15.2.3 磷酸盐缓冲液(pH 6.0):取磷酸氢二钾 2.0 g、磷酸二氢钾 8.0 g,加水适量使溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。

15.2.4 磷酸盐缓冲液(pH 4.0):取磷酸盐缓冲液(pH 6.0),用 1.0 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 4.0,即得。

15.2.5 0.1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

15.2.6 0.1%甲酸溶液-乙腈:取 0.1%甲酸溶液 800 mL 与乙腈 200 mL,混匀。

15.3 标准品

二硝托胺、二硝托胺代谢物(3-ANOT),含量均 $\geq 95\%$,见附录 A。

15.4 标准溶液的制备

15.4.1 标准储备液:取二硝托胺、3-ANOT 标准品各 10 mg,精密称定,分别,加乙腈适量使溶解并稀释定容至 100 mL 容量瓶,摇匀。—18 °C 以下保存,有效期 6 个月。

15.4.2 混合标准储备液:分别精密量取 2 种标准储备液各 50 mL 于 100 mL 容量瓶中,摇匀,即得。—18 °C 以下保存,有效期 6 个月。

15.4.3 混合基质标准工作液:取适量混合标准储备液于 5 mL 容量瓶中,用空白样品洗脱液定容,得含二硝托胺和 3-ANOT 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合基质标准工作液,现用现配。

15.5 材料

HLB 固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

16 仪器和设备

16.1 液相色谱串联质谱仪:配电喷雾离子源。

16.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

16.3 固相萃取装置。

16.4 均质机。

16.5 离心管:聚丙烯塑料离心管,50 mL。

16.6 离心机:8 000 r/min 或以上。

16.7 pH 计。

17 试料的制备与保存

17.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

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液,作为空白添加试料。

17.2 试料的保存

—18 °C 以下保存,3 个月内进行分析检测。

18 测定步骤

18.1 提取

取试料 2 g(准确至 ± 0.02 g)于 50 mL 离心管,加磷酸盐缓冲液(pH 6.0)10.0 mL[鸡肝脏、肾脏加磷酸盐缓冲液(pH 4.0)],10 000 r/min 均质 1 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,残渣加相应磷酸盐缓冲液 10.0 mL,重复处理,合并上清液。准确移取上清液 8 mL,用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

18.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化。取备用液,过柱,待液面到达柱床表面时用水 3 mL 淋洗,抽干,用 0.1%甲酸-乙腈 4 mL 洗脱,收集洗脱液,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱串联质谱仪测定。

18.3 基质标准曲线的制备

取二硝托胺和 3-ANOT 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合基质标准工作液进行液相色谱串联质谱分析。以各组份定量离子对峰面积为纵坐标、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。

18.4 测定

18.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),或相当者;
- b) 流动相: A 为 0.1%甲酸溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱条件见表 2;

表 2 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	80	20
1.0	80	20
3.0	20	80
3.1	80	20
5.0	80	20

- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 30 ℃;
- e) 进样量: 10 μL。

18.4.2 质谱参考条件

- a) 电离方式: 电喷雾正负离子(二硝托胺为负离子模式, 3-ANOT 为正离子模式)切换方式;
- b) 检测方式: 多反应监测;
- c) 脱溶剂气、锥孔气均为高纯氮气; 碰撞气为高纯氩气或其他合适气体, 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- d) 毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压优化至最佳灵敏度;
- e) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 3。

表 3 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和锥孔电压参考值

化合物名称	定性离子对(<i>m/z</i>)和碰撞能量 eV	定量离子对(<i>m/z</i>)和碰撞能量 eV	锥孔电压 V
二硝托胺	224.10>76.90(22) 224.10>150.87(16)	224.10>76.90(22)	22
3-ANOT	196.03>106.93(16) 196.03>132.91(20)	196.03>106.93(16)	32

18.4.3 测定法

取试样溶液和基质匹配标准溶液, 作单点或多点校准, 按外标法以色谱峰面积定量。基质匹配标准溶液及试样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。试样液中二硝托胺和 3-ANOT 的保留时间与基质匹配标准工作液中的二硝托胺和 3-ANOT 保留时间偏差在±2.5%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, 符合表 4 的要求。基质匹配标准溶液多反应监测色谱图见图 B. 2。

表 4 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

18.5 空白试验

除不加试料外, 均按上述测定步骤进行。

19 结果计算和表述

试样中二硝托胺的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中二硝托胺或 3-ANOT 残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_s —— 标准溶液中二硝托胺或 3-ANOT 浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A —— 试样溶液中二硝托胺或 3-ANOT 的峰面积;

A_s —— 标准溶液中二硝托胺或 3-ANOT 的峰面积;

V_1 —— 提取液总体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 —— 用于固相萃取净化上清液体积的数值,单位为毫升(mL);

V_3 —— 洗脱液体积的数值,单位为毫升(mL);

m —— 试样质量的数值,单位为 g 。

20 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

20.1 灵敏度

本方法在鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中的检测限为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

20.2 准确度

本方法在 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 12\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 110\%$ 。

20.3 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 $\leq 20\%$ 。

附 录 A
(资料性)

二硝托胺和 3-ANOT 的英文名称、分子式、CAS 号

二硝托胺和 3-ANOT 的英文名称、分子式、CAS 号见表 A.1。

表 A.1 二硝托胺和 3-ANOT 的英文名称、分子式、CAS 号

化合物	英文名称	分子式	CAS 号
二硝托胺	dinitolmide	$C_8H_7N_3O_5$	148-01-6
3-ANOT	3-amino-5-nitro-o-toluamide	$C_8H_9N_3O_3$	3572-44-9



附录 B
(资料性)
色谱图与 MRM 色谱图

标准溶液液相色谱图见图 B.1, 标准溶液 MRM 质量色谱图见图 B.2。

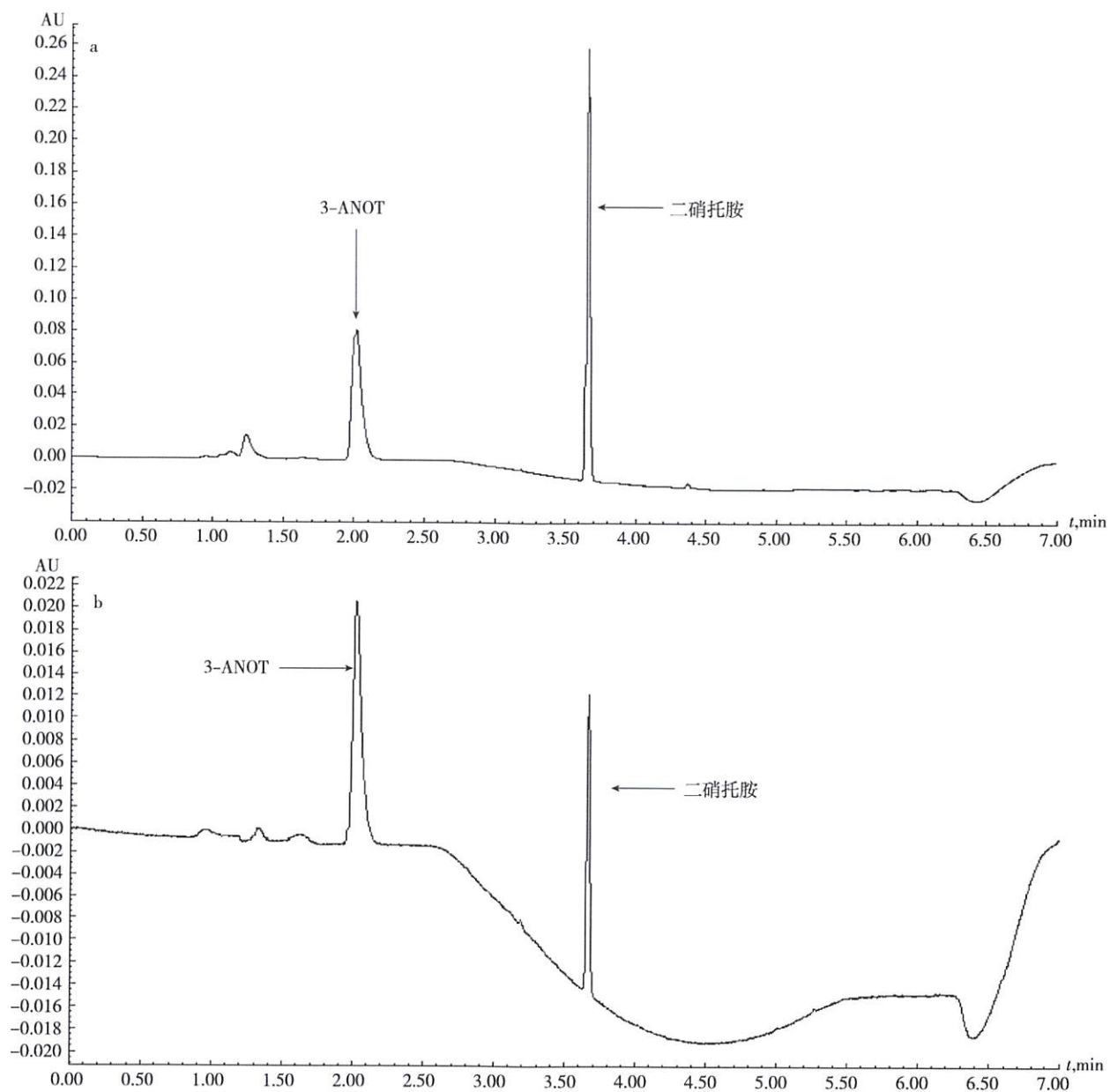


图 B.1 标准溶液液相色谱图(a, 246 nm; b, 310 nm)

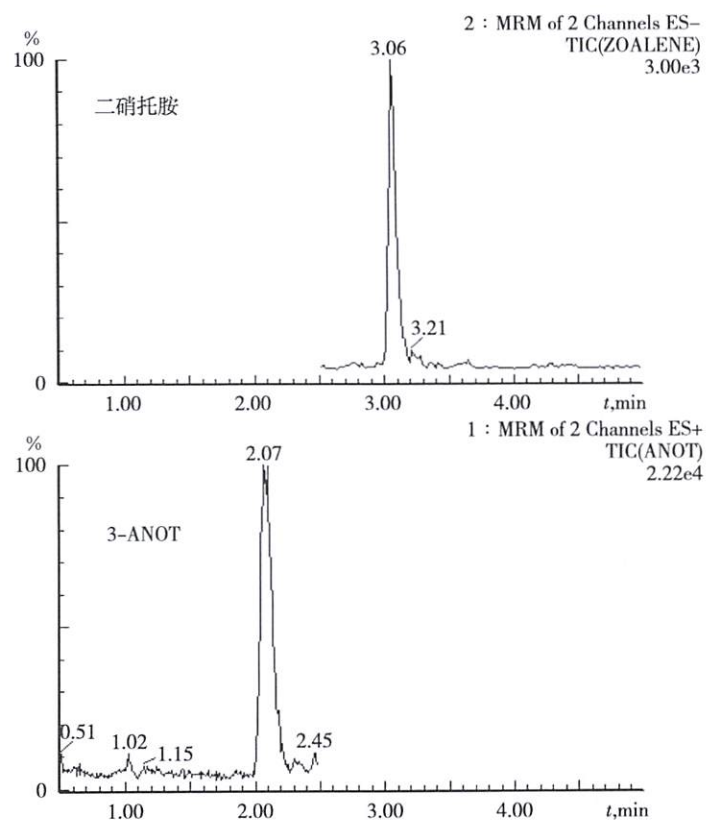


图 B.2 标准溶液 MRM 质量色谱图



食品安全国家标准
鸡可食性组织中二硝托胺残留量的测定

GB 31613.3—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8735

定价: 32.00 元



GB 31613.3—2021

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261