ICS 67.050
CCS X 04

中华人民共和国国家标准

GB 31658.36—2026

食品安全国家标准　动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶和二甲氧甲基苄啶残留量的测定　液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—Determination of trimethoprim, diaveridine and ormetoprim residues in animal derived food—Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2026-04-24 发布　　2026-10-01 实施

纸质版与本文件同为有效版本
参考件

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

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。

正式版纸质文本为准
参考件
联系电话010-59194426

食品安全国家标准
动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶和二甲氧甲基苄啶残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中甲氧苄啶、二甲氧苄啶、二甲氧甲基苄啶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、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、皮＋脂肪，牛奶，鸡蛋，鱼皮＋肉中甲氧苄啶、二甲氧苄啶、二甲氧甲基苄啶残留量的检测。其他畜禽产品的检测经验证后可参照执行。

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

试样中残留的待测药物，用10%甲酸乙腈溶液提取、正己烷除脂、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 甲酸(HCOOH)：色谱纯。

5.1.3 乙腈(CH_3CN)。

5.1.4 甲酸(HCOOH)。

5.1.5 甲醇(CH_3OH)。

5.1.6 正己烷(C_6H_{14})。

5.1.7 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

5.1.8 氨水($NH_3 \cdot H_2O$)：25%～28%。

5.2 溶液配制

5.2.1 10%甲酸乙腈溶液：取甲酸(5.1.4)50 mL，用乙腈(5.1.3)稀释至500 mL。现用现配。

5.2.2 20%乙腈溶液：取乙腈(5.1.1)20 mL，用水稀释至100 mL。

5.2.3 乙腈饱和正己烷：取乙腈(5.1.3)50 mL、正己烷150 mL，混合，涡旋30 s，静置后取用上层液体。

5.2.4 5%氨化甲醇溶液：取氨水5 mL，用甲醇稀释至100 mL。现用现配。

5.2.5 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸(5.1.2)1 mL，用乙腈(5.1.1)稀释至1 000 mL。

5.2.6 0.1%甲酸溶液：取甲酸(5.1.2)1 mL，用水稀释至1 000 mL。

5.3 标准品

5.3.1 甲氧苄啶(trimethoprim，TMP，$C_{14}H_{18}N_4O_3$，CAS号：738-70-5)，纯度≥98%。

5.3.2 二甲氧苄啶(diaveridine，DVD，$C_{13}H_{16}N_4O_2$，CAS号：5355-16-8)，纯度≥98%。

5.3.3 二甲氧甲基苄啶(ormetoprim，OMP，$C_{14}H_{18}N_4O_2$，CAS号：6981-18-6)，纯度≥98%。

5.3.4 氘代甲氧苄啶(trimethoprim D_9，TMP-D_9，$C_{14}H_9D_9N_4O_3$)。

5.3.5 氘代二甲氧苄啶(diaveridine D_6，DVD-D_6，$C_{13}H_{10}D_6N_4O_2$)。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取TMP、DVD和OMP标准品各适量(相当于各有效成分约10 mg)，精密称定，分别加甲醇适量使溶解并稀释定容至10 mL，配制成浓度为1 mg/mL的TMP、DVD和OMP标准储备液。−18 ℃以下保存，有效期6个月。

5.4.2 100 μg/mL混合标准储备液：分别精密量取各标准储备液1 mL，于10 mL容量瓶中，用乙腈(5.1.1)稀释至刻度，制成浓度为100 μg/mL的混合标准储备液。−18 ℃以下保存，有效期6个月。

5.4.3 系列混合标准工作液：精密量取混合标准储备液适量，以乙腈(5.1.1)稀释，制成浓度分别为0.6 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL和50 μg/mL的系列混合标准工作液。−18 ℃以下保存，有效期1个月。

5.4.4 内标储备液：取TMP-D_9和DVD-D_6标准品各适量(至少相当于各活性成分约1 mg)，精密称定，分别加甲醇适量使溶解并稀释定容至10 mL，配制成浓度为100 μg/mL的内标储备液。−18 ℃以下保存，有效期6个月。

5.4.5 混合内标工作液：精密量取各内标储备液0.5 mL，于10 mL容量瓶中，以乙腈(5.1.1)稀释至刻度，制成浓度为5 μg/mL的混合内标工作液。−18 ℃以下保存，有效期1个月。

5.5 材料

5.5.1 混合型强阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.2 μm，有机系。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾电离源(ESI)。

6.2 分析天平：感量为0.000 01 g和0.001 g。

6.3 均质机。

6.4 水浴超声仪：工作频率40 kHz。

6.5 高速冷冻离心机：4 500 r/min或以上。

6.6 涡旋混合器。

6.7 恒温水浴锅。

6.8 氮吹仪或其他浓缩仪。

6.9 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并均质。

a) 取均质的供试样品，作为供试试样；

b) 取均质的空白样品，作为空白试样；

c) 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.1.2 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

a) 取均质的供试样品，作为供试试样；

b) 取均质的空白样品，作为空白试样；

c) 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.1.3 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳，并均质。

a) 取均质的供试样品，作为供试试样；

b) 取均质的空白样品，作为空白试样；

c) 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

−18 ℃以下保存，避免反复冻融。

8 试验步骤

8.1 提取

8.1.1 肌肉、肝脏、肾脏、鸡蛋、鱼皮＋肉

称取试料(2±0.05) g，置于 50 mL 离心管中，加入 5 μg/mL 的混合内标工作溶液 20 μL，涡旋混匀后，加水 10 mL，涡旋 1 min 使完全分散；加入无水硫酸钠 5 g，涡旋 1 min 使充分溶解；加入 10%甲酸乙腈溶液 10 mL，涡旋 1 min，水浴超声处理 10 min(40 kHz)，涡旋 1 min。4 ℃条件下，4 500 r/min 离心 10 min。

8.1.2 皮＋脂肪

称取试料(2±0.05) g，置于 50 mL 离心管中，于 50 ℃水浴中使完全融化，加入 5 μg/mL 的混合内标工作溶液 20 μL，涡旋混匀后，加入提前温热至 50 ℃的水 10 mL，涡旋 1 min，加入无水硫酸钠 5 g，涡旋 1 min 使充分溶解；加入 10%甲酸乙腈溶液 10 mL，50 ℃水浴保温 10 min，涡旋 1 min，水浴超声处理 10 min(40 kHz)，50 ℃水浴保温 10 min，涡旋 1 min。4 ℃条件下，4 500 r/min 离心 10 min。

8.1.3 牛奶

称取试料(2±0.05) g，置于 50 mL 离心管中，加入 5 μg/mL 的混合内标工作溶液 20 μL，涡旋混匀后，加入无水硫酸钠 5 g，涡旋 1 min 使充分溶解；加入 10%甲酸乙腈溶液 10 mL，涡旋 1 min，水浴超声处理 10 min(40 kHz)，涡旋 1 min。4 ℃条件下，4 500 r/min 离心 10 min。

8.2 净化

将离心后的有机相提取液转移至另一 50 mL 离心管中，加入乙腈饱和正己烷溶液 10 mL，涡旋 1 min，静置分层后，弃去正己烷层，备用。

固相萃取柱依次用甲醇、水各 3 mL 预处理。取备用液过柱，用水、甲醇各 3 mL 依次淋洗，抽干，5%氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱。收集洗脱液，于 40 ℃浓缩至近干。残余物中加入 20%乙腈溶液 2 mL 充分溶解，滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取 TMP、DVD 和 OMP 的系列混合标准工作液及混合内标工作液适量，以 20%乙腈溶液稀释，配制成待测药物浓度均为 3 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 250 ng/mL 的系列标准工作液，含内标均为 50 ng/mL；以待测药物和其对应内标的特征离子峰面积之比为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。以合适的加权方式进行线性回归，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：C_{18}(3.0 mm × 50 mm，1.8 μm)，或相当者；
b) 柱温：35 ℃；
c) 进样量：5 μL；
d) 流速：0.4 mL/min；
e) 流动相：A 为 0.1%甲酸乙腈溶液，B 为 0.1%甲酸溶液，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	10	90
2.0	10	90
2.5	90	10
4.0	90	10
4.5	10	90
5.5	10	90

8.4.2 质谱参考条件

a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
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：4 000 V；
e) 喷雾器压力：33 psi；
f) 干燥气温度：350 ℃；
g) 干燥气流量(氮气)：11 L/min；
h) 定性离子对、定量离子对，以及对应的碎裂电压、碰撞能量参考值、对应内标见表 2。

表 2 待测药物定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量参考值及对应内标

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碎裂电压 V	碰撞能量 eV	内标
TMP	291.2>230.1	291.2>230.1	135	28	$TMP\text{-}D_9$
	291.2>123.1		135	30	
$TMP\text{-}D_9$	300.3>234.2	300.3>234.2	135	30	—
DVD	261.2>245.1	261.2>245.1	130	29	$DVD\text{-}D_6$
	261.2>123.1		130	29	
$DVD\text{-}D_6$	267.3>247.1	267.3>247.1	130	30	—
OMP	275.3>259.1	275.3>259.1	130	26	$TMP\text{-}D_9$
	275.3>123.1		130	26	

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试料溶液中待测物与其内标物的保留时间之比，与标准溶液中相应峰的相对保留时间一致，其允许偏差在 1%以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致，其允许偏差在±40%以内。

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和标准工作液，作单点或多点校准，按内标法定量。系列标准工作液及试料溶液中待测药物与其相应内标(见表 2)峰面积比，均应在仪器检测的线性范围内。对于超出线性范围的样品，应以空白样品对其进行适当稀释后复测。在上述液相色谱-串联质谱条件下，标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录 A。

8.5 空白试验

取空白试料，采用完全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。

$$\omega=\frac{\rho_S\times\rho_{iS}\times A\times A'_{iS}\times V}{\rho'_{iS}\times A_S\times A_{iS}\times m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

ω ——试样中待测药物残留量的数值，单位为微克每千克(μg/kg)；

ρ_S ——标准溶液中待测药物浓度的数值，单位为微克每升(μg/L)；

ρ_{iS} ——试料溶液中待测药物对应内标浓度的数值，单位为微克每升(μg/L)；

A ——试料溶液中待测药物的峰面积；

A'_{iS} ——标准溶液中待测药物对应内标的峰面积；

V ——溶解残余物的 20%乙腈溶液体积的数值，单位为毫升(mL)；

ρ'_{iS} ——标准溶液中待测药物对应内标浓度的数值，单位为微克每升(μg/L)；

A_S ——标准溶液中待测药物的峰面积；

A_{iS} ——试料溶液中待测药物对应内标的峰面积；

m ——供试试料质量的数值，单位为克(g)。

注：计算结果保留 3 位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为 3 μg/kg，定量限为 5 μg/kg。

10.2 正确度

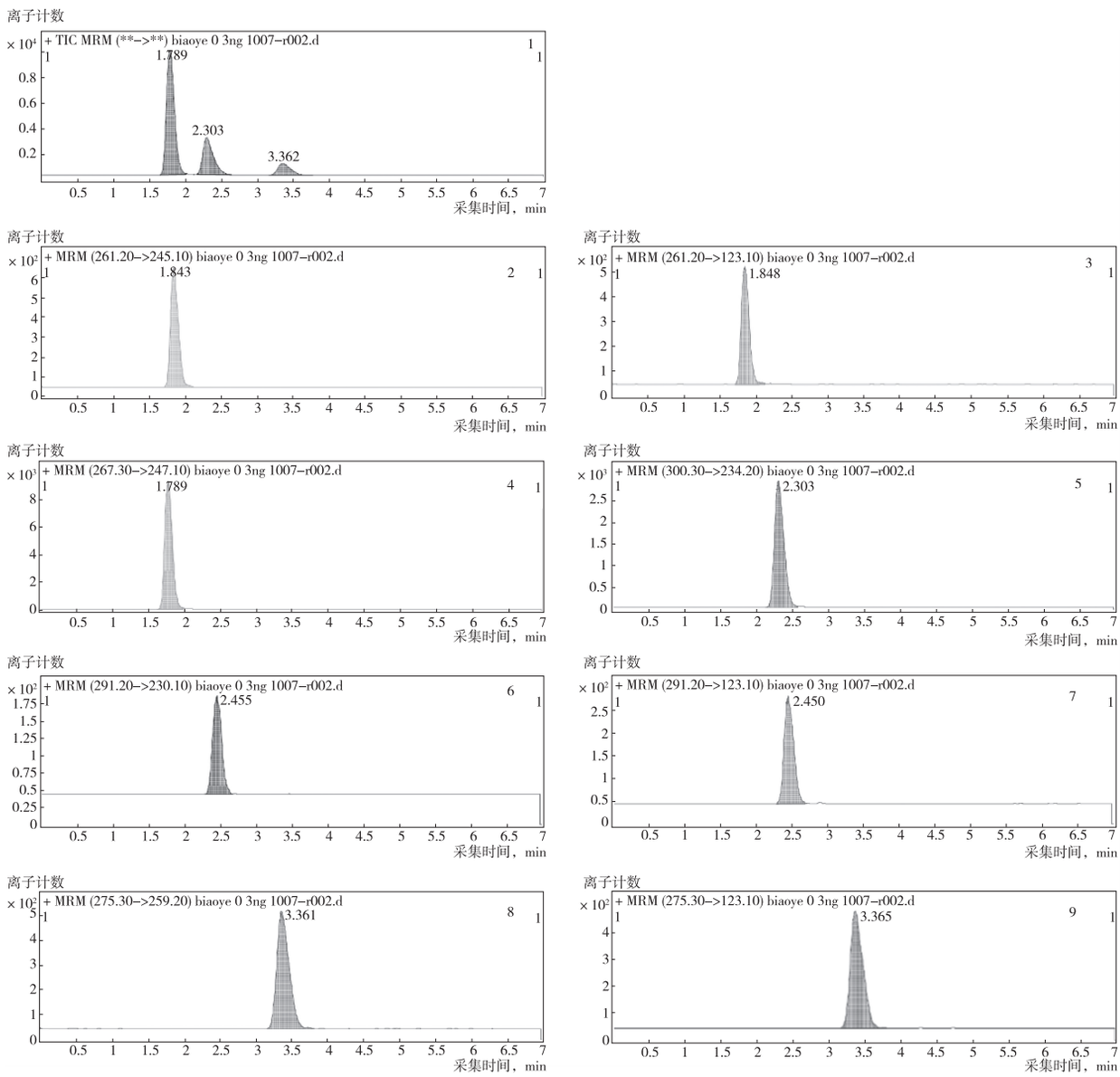
本方法甲氧苄啶、二甲氧苄啶和二甲氧甲基苄啶，于肌肉、肝脏、肾脏、皮＋脂肪、鱼皮＋肉等组织和牛奶，在 5 μg/kg～250 μg/kg 添加浓度水平上，于鸡蛋在 5 μg/kg～100 μg/kg 添加水平上的准确度均为 70%～120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤20%。

附 录 A
（资料性）
标准溶液特征离子质量色谱图

待测药物标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

1 ——TIC；

2、3——DVD 3 μg/L；

4 ——DVD-D_6 50 μg/L；

5 ——TMP-D_9 50 μg/L；

6、7——TMP 3 μg/L；

8、9——OMP 3 μg/L。

图 A.1 待测药物标准溶液特征离子质量色谱图