

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5877—2025

出口动物源性食品中左旋咪唑残留量的 测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of levamisole residue in animal-derived food for export—
LC-MS/MS method

2025-12-11 发布

2026-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

以正式出版文本为准

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。

请注意文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：合肥海关技术中心、杭州海关技术中心、中国海关科学技术研究中心、湛江海关技术中心。

本文件主要起草人：宋伟、侯建波、孔维恒、李红权、张文华、韩芳、周典兵、吴琼、刘宇欣、周晓莹、蒙晓笛、谢鹏飞。

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

出口动物源性食品中左旋咪唑残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件描述了动物源性食品中左旋咪唑残留量的液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本文件适用于水产、畜禽肉、畜禽内脏、禽蛋、奶、蜂蜜、蜂王浆、肠衣、脂肪等动物源性食品中左旋咪唑残留量的测定,其他动物源性食品参照执行。

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

试样中左旋咪唑残留经乙腈提取,提取液经分散固相萃取净化,液相色谱-质谱/质谱法测定,内标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均应为分析纯,水应为 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 甲酸铵(HCOONH_4)。

5.1.5 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

5.1.6 无水硫酸镁(MgSO_4)。

5.2 溶液配制

5.2.1 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1% 甲酸):取 0.63 g 甲酸铵和 1 mL 甲酸,用水溶解后定容至 1 000 mL。

5.2.2 乙腈-甲酸铵溶液:取 5 mL 乙腈,用 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)稀释至 100 mL。

5.3 标准品

5.3.1 标准品:盐酸左旋咪唑(Levamisole Hydrochloride, CAS 号:16595-80-5),纯度大于 98%,或等效有证标准物质。

5.3.2 内标物:盐酸左旋咪唑-D₅(Levamisole-D₅ Hydrochloride, CAS 号:1246819-64-6),纯度大于 98%,或等效有证标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 左旋咪唑标准储备溶液的配制:准确称取 11.78 mg 盐酸左旋咪唑标准品(相当于约 10 mg 左旋咪唑,精确至 0.01 mg),用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 容量瓶,配制成左旋咪唑质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,−18℃下保存,有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标储备液:准确称取 1 mg 盐酸左旋咪唑-D₅标准品(精确至 0.01 mg),用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 容量瓶,配制成盐酸左旋咪唑-D₅质量浓度为 100 μg/mL 的标准储备液,−18℃下保存,有效期 6 个月。

5.4.3 左旋咪唑标准中间溶液:精密移取 1.0 mL 左旋咪唑标准储备溶液,于 100 mL 容量瓶,用甲醇定容,配制成左旋咪唑质量浓度为 10 μg/mL 的标准中间液,0℃~4℃保存,有效期 3 个月。

5.4.4 同位素内标中间溶液:精密移取 1.0 mL 同位素内标储备溶液,于 10 mL 容量瓶,用甲醇定容,配制成盐酸左旋咪唑-D₅质量浓度为 10 μg/mL 的同位素内标中间液,0℃~4℃保存,有效期 3 个月。

5.4.5 左旋咪唑标准工作液:精密移取 1.0 mL 左旋咪唑标准中间液,于 100 mL 容量瓶,用乙腈稀释,配制成左旋咪唑质量浓度为 100 μg/L 的标准工作液,0℃~4℃保存,有效期 1 个月。

5.4.6 同位素内标工作液:精密移取 2.0 mL 同位素内标中间液,于 100 mL 容量瓶,用乙腈稀释,配制成盐酸左旋咪唑-D₅质量浓度为 200 μg/L 的同位素内标工作液,0℃~4℃保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 十八烷基键合硅胶(C₁₈),粒径 40 μm~60 μm。

5.5.2 N-丙基乙二胺(PSA),粒径 40 μm~60 μm。

5.5.3 石墨化碳黑(GCB),粒径 40 μm~60 μm。

5.5.4 滤膜:0.22 μm,有机系。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.01 mg。

6.3 组织捣碎机。

6.4 均质器:转速不低于 10 000 r/min。

6.5 涡旋振荡器。

6.6 高速冷冻离心机:最大转速不低于 10 000 r/min。

7 试样制备与保存

7.1 水产、畜禽肉、畜禽内脏、脂肪

从样品可食部分取出有代表性样品 500 g,用组织捣碎机捣碎,均匀分成两份,分别装入洁净的容器

内,密封并做好标记,一份作为试样,一份作为备用,分别于 -18°C 及以下条件保存。

7.2 禽蛋

取出有代表性样品 500 g,洗净、去壳后充分混匀,均匀分成两份,分别装入洁净的容器内,密封并做好标记,一份作为试样,一份作为备用,分别于 -18°C 及以下条件保存。

7.3 奶、蜂蜜、蜂王浆

对于结晶的蜂蜜样品,在密闭的情况下,放置于不超过 60°C 的水浴中融解,搅拌均匀后迅速冷却至室温。

对于冷冻的蜂王浆样品,在常温下完全解冻后,搅拌均匀。

取出有代表性品 500 g,充分混匀,均匀分成两份,分别装入洁净容器中,密封并标明标记并做好标记,一份作为试样,一份作为备用,蜂蜜常温保存,奶于 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下保存,蜂王浆于 -18°C 及以下条件保存。

7.4 肠衣

取出有代表性样品 500 g,去掉附盐,沥净盐卤,将肠衣剪碎混匀,均匀分成两份,分别装入洁净容器中,密封并标明标记,一份作为试样,一份作为备用,分别于 -18°C 及以下条件保存。

8 分析步骤

8.1 提取

8.1.1 水产、畜禽肉、畜禽内脏、肠衣

称取 4 g 试料(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 同位素内标工作液(5.4.6),加入 10 mL 乙腈(5.1.1),以 10 000 r/min 高速均质 1 min 后加入 5 g 无水硫酸钠(5.1.5),再加盖涡旋振荡 1 min;以 4 000 r/min, 4°C 离心 5 min,取 1.0 mL 上层清液待净化。

8.1.2 禽蛋、奶

称取 4 g 试料(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 同位素内标工作液(5.4.6),然后加入 10 mL 乙腈(5.1.1),加盖涡旋振荡 2 min 后加入 5 g 无水硫酸钠(5.1.5),再加盖涡旋振荡 1 min;以 4 000 r/min, 4°C 离心 5 min,取 1.0 mL 上层清液待净化。

8.1.3 蜂蜜、蜂王浆

称取 4 g 试料(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 同位素内标工作液(5.4.6),然后加入 4 mL 水溶解。加入 10 mL 乙腈(5.1.1),加盖涡旋振荡 2 min 后加入 5 g 无水硫酸钠(5.1.5),再加盖涡旋振荡 1 min;以 4 000 r/min, 4°C 离心 5 min,取 1.0 mL 上层清液待净化。

8.1.4 脂肪

试料在 60°C 水浴下加热融解并混匀。称取 2 g 试料(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 50 μL 同位素内标工作液(5.4.6),然后加入 10 mL 乙腈(5.1.1),加盖涡旋振荡 2 min。以 4 000 r/min, -5°C 离心 10 min,取 2.0 mL 上层清液,之后加入乙腈饱和的正己烷溶液除油数次,取下层乙腈溶液待净化。

8.2 净化

8.2.1 水产(虾、蟹等色素含量高的试样除外)、畜禽肉、畜禽内脏、肠衣、奶、蜂蜜、蜂王浆

将 1.0 mL 待净化液加入已装有 50 mg C_{18} (5.5.1)、50 mg PSA(5.5.2)和 150 mg 无水硫酸镁(5.1.6)的 2 mL 离心管中,涡旋 1 min,10 000 r/min,4 °C 离心 5 min;取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)(5.2.1)涡旋混匀,过有机系滤膜(5.5.4),供 HPLC-MS/MS 检测。

8.2.2 虾、蟹、禽蛋

将 1.0 mL 待净化液加入已装有 50 mg C_{18} (5.5.1)、50 mg PSA(5.5.2)、5 mg GCB(5.5.3)和 150 mg 无水硫酸镁(5.1.6)的 2 mL 离心管中,涡旋 1 min,10 000 r/min,4 °C 离心 5 min;取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)(5.2.1)涡旋混匀,过有机系滤膜(5.5.4),供 HPLC-MS/MS 检测。

8.2.3 脂肪

将全部待净化液加入已装有 50 mg C_{18} (5.5.1)、50 mg PSA(5.5.2)和 150 mg 无水硫酸镁(5.1.6)的 5 mL 离心管中,涡旋 1 min,10 000 r/min,4 °C 离心 5 min;取 1.0 mL 上清液于 60 °C 用氮气吹干,之后用 1.0 mL 乙腈-甲酸铵溶液(5.2.2)复溶。过有机系滤膜(5.5.4),供 HPLC-MS/MS 检测。

8.3 标准曲线的制备

精密量取左旋咪唑标准工作液(5.4.5)和盐酸左旋咪唑- D_5 内标工作液(5.4.6)适量,用乙腈-甲酸铵溶液(5.2.2)稀释,配制成左旋咪唑质量浓度为 0.06 $\mu\text{g/L}$ 、0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$,盐酸左旋咪唑- D_5 质量浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液,临用现配,供液相色谱-三重四极杆串联质谱仪测定。以左旋咪唑与内标的定量离子峰面积之比为纵坐标,左旋咪唑标准溶液质量浓度为横坐标,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

液相色谱参考条件如下。

- a) 液相色谱柱: C_{18} 色谱柱,50 mm×2.1 mm(内径),1.8 μm ,或性能相当。
- b) 流动相:A 为 10 mmol/L 甲酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸),B 为乙腈。梯度洗脱程序见表 1。
- c) 柱温:40 °C。
- d) 进样量:10.0 μL 。
- e) 流速:0.3 mL/min。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 $V_A/\%$	流动相 $V_B/\%$
0.0	95	5
1.0	95	5
3.0	15	85
4.0	15	85

表 1 梯度洗脱程序 (续)

时间/min	流动相 $V_A/\%$	流动相 $V_B/\%$
4.5	95	5
6.0	95	5

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下。

- 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:多反应监测模式(MRM);
- d) 雾化气、干燥气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。碎裂电压、碰撞能等电压值应优化至最佳灵敏度,参考质谱参数见附录 A。

8.4.3 定性测定

在相同测试条件下,试料溶液中左旋咪唑的保留时间与标准工作液中左旋咪唑的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$;且检测到的离子的相对丰度,应当与质量浓度相当的标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 2 要求。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对丰度	$>50\%$	$>20\% \sim 50\%$	$>10\% \sim 20\%$	$\leq 10\%$
最大允许偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

8.4.4 定量测定

取试料溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按内标法定量。试料溶液及标准溶液中左旋咪唑与左旋咪唑-D₅的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱条件下,左旋咪唑及左旋咪唑-D₅特征离子质量色谱图见附录 B。

8.4.5 空白试验

除不加试料外,按上述测定步骤进行。

8.4.6 结果计算与表述

试料中左旋咪唑的残留量单点校正按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V \times V_1}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试料中左旋咪唑的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A ——试料溶液中左旋咪唑的峰面积;

A_{is} ——试料溶液中内标的峰面积;

A_s ——标准溶液中左旋咪唑的峰面积;

A'_{is} ——标准溶液中内标的峰面积；

C_{is} ——试料溶液中内标质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)；

C_s ——标准溶液中左旋咪唑质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)；

C'_{is} ——标准溶液中内标质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)；

V ——上机前最终定容体积,单位为毫升(mL)；

V_1 ——提取液乙腈的总体积,单位为毫升(mL)；

V_2 ——分散固相萃取净化后离心所取上清液体积,单位为毫升(mL)；

m ——试料称样量,单位为克(g)。

试料中左旋咪唑的残留量多点校正按式(2)计算：

$$X = \frac{C \times V \times V_1}{V_2 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中左旋咪唑的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$)；

C ——标准曲线上查得的试样中左旋咪唑的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)；

V ——上机前最终定容体积,单位为毫升(mL)；

V_1 ——提取液乙腈的总体积,单位为毫升(mL)；

V_2 ——分散固相萃取净化后离心所取上清液体积,单位为毫升(mL)；

m ——试料称样量,单位为克(g)。

注：结果保留 2 位有效数字,含量超 $1 \mu\text{g/kg}$ 时,保留 3 位有效数字。计算结果需扣除空白值。

9 灵敏度、回收率和精密度

9.1 检出限和定量限

本方法左旋咪唑的检出限为 $0.3 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 回收率和精密度

在三个添加浓度范围内,鱼肉、虾肉、蟹肉、贝类、牛蛙、猪肉、牛肉、羊肉、兔肉、鸡肉、鸭肉、猪肝、鸡肝、猪肾、鸡肾、鸡蛋、牛奶、羊奶、蜂蜜、蜂王浆、猪肠衣、猪脂肪中左旋咪唑不同添加水平的回收率和精密度数据参见附录 C。

附 录 A
(资料性)
质谱系统参考条件

液相色谱-质谱/质谱仪器参数参考条件如下：

- a) 干燥气温度:300 ℃;
- b) 干燥气流速:10 L/min;
- c) 雾化气压力:275.8 kPa;
- d) 毛细管电压:4 000 V。
- e) 定量离子对、定性离子对的碎裂电压(FP)、碰撞气能量(CE)见表A.1。

表 A.1 左旋咪唑及左旋咪唑-D₅的定量参考离子对、定性参考离子对参数

化合物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碎裂电压 V	碰撞能量 eV
左旋咪唑	205.0/178.1	205.0/178.1	116	20
	205.0/123.0			30
左旋咪唑-D ₅	210.0/183.0	210.0/183.0	130	20

附 录 B

(资料性)

左旋咪唑及左旋咪唑-D₅特征离子质量色谱图

左旋咪唑特征离子质量色谱图见图 B.1。

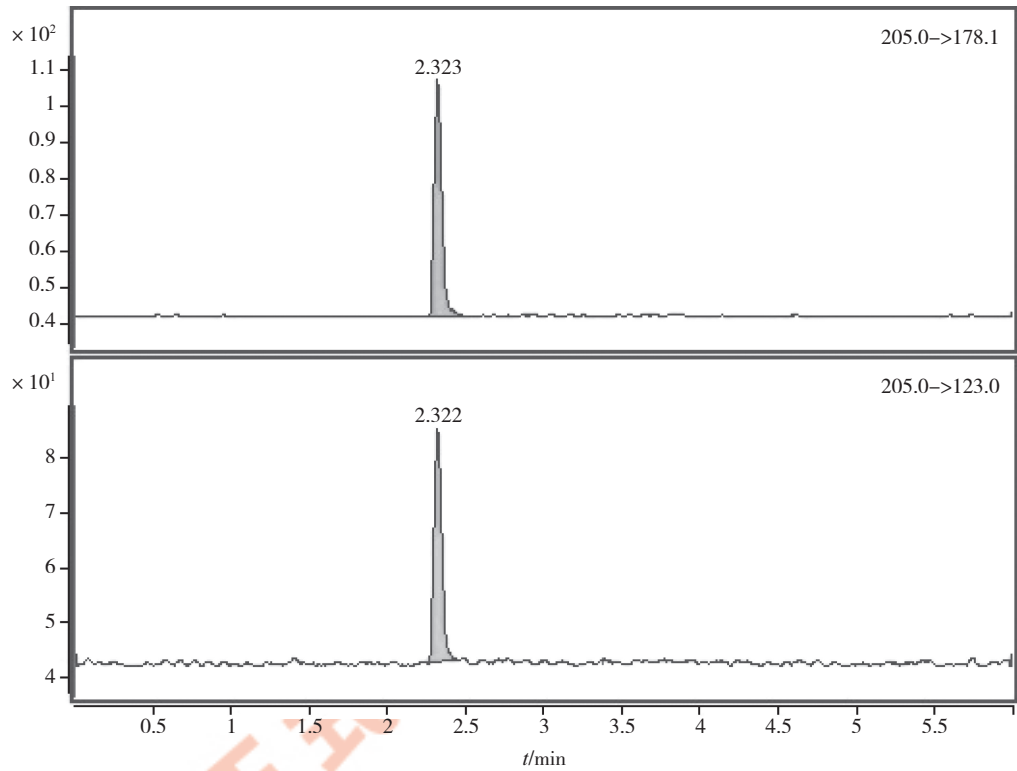


图 B.1 左旋咪唑特征离子质量色谱图(0.2 $\mu\text{g/L}$)

左旋咪唑-D₅特征离子质量色谱图见图 B.2。

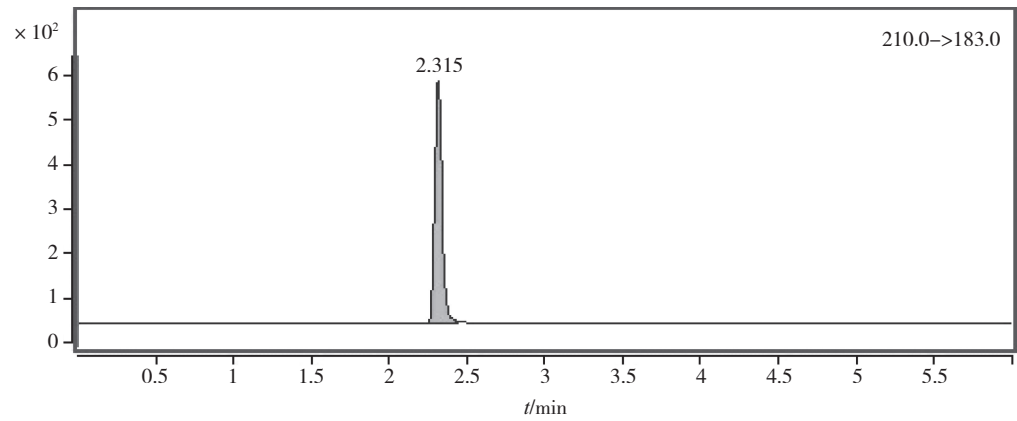


图 B.2 左旋咪唑-D₅特征离子质量色谱图(0.2 $\mu\text{g/L}$)

附 录 C

(资料性)

不同基质中左旋咪唑添加回收率试验结果

试样的添加浓度及回收率的试验数据见表 C.1。

表 C.1 试样的添加浓度及回收率的试验数据($n=6$)

试样名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	回收率范围/%	CV/%
鱼	1	90.7~102	5.0
	10	91.4~101	3.9
	100	92.1~99.3	3.3
虾	1	89.5~101	4.7
	10	92.0~101	3.2
	100	96.7~102	1.8
蟹	1	91.3~102	4.4
	10	92.7~102	4.1
	100	93.0~102	3.9
贝	1	89.3~101	4.3
	10	93.4~103	4.1
	100	93.3~103	3.9
牛蛙	1	90.1~100	4.1
	10	92.0~99.0	2.9
	100	95.1~102	3.0
猪肉	1	91.8~101	4.4
	10	92.6~102	4.7
	100	95.1~103	3.1
牛肉	1	89.2~100	4.5
	10	92.7~98.8	2.7
	100	92.4~103	4.1
羊肉	1	90.2~101	5.2
	10	91.5~103	4.7
	100	92.7~103	3.8
兔肉	1	89.1~102	6.2
	10	92.4~104	4.5
	100	92.1~101	3.7
鸡肉	1	90.0~102	5.0

表 C.1 试样的添加浓度及回收率的试验数据($n=6$) (续)

试样名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	CV/%
鸡肉	10	91.7~99.1	2.9
	100	93.7~102	3.2
鸭肉	1	89.7~101	4.3
	10	91.5~104	5.3
	100	95.4~103	2.7
猪肝	1	92.7~101	3.1
	10	92.2~98.1	2.4
	100	92.7~103	4.0
鸡肝	1	89.7~101	4.4
	10	92.1~102	4.0
	100	92.9~102	3.7
猪肾	1	91.2~101	4.2
	10	91.9~103	4.8
	100	92.9~104	3.8
鸡肾	1	91.6~99.5	3.4
	10	91.2~99.3	3.6
	100	93.7~99.1	2.2
鸡蛋	1	89.0~98.2	3.6
	2	93.5~100	3.0
	10	92.6~100	2.7
牛奶	1	91.0~98.7	3.2
	2	91.5~103	4.3
	10	92.9~101	3.5
羊奶	1	89.1~101	4.9
	2	91.5~98.5	2.5
	10	96.0~102	2.2
蜂蜜	1	89.3~100	3.7
	2	91.5~102	4.0
	10	93.3~101	2.9
蜂王浆	1	91.8~100	3.5
	2	92.0~100	3.4
	10	93.4~101	2.6
猪肠衣	1	90.2~101	5.0

表 C.1 试样的添加浓度及回收率的试验数据($n=6$) (续)

试样名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	回收率范围/%	CV/%
猪肠衣	10	91.5~100	3.8
	100	93.3~100	2.7
猪脂肪	1	89.1~101	4.7
	10	94.9~101	2.5
	100	96.1~102	2.1

以正式出版文本为准