



中华人民共和国国家标准

GB/T 22969—2008

奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素 和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin and kanamycin
residues in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘晓茂、张守军、张进杰、曹彦忠、曹亚平、杨志伟、庞国芳。

奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素 和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了奶粉、牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于奶粉、牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的检出限均为 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，奶粉中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的检出限均为 $80.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD）

3 原理

奶粉或牛奶试样中的抗生素用磷酸溶液提取，三氯乙酸沉淀蛋白，用苯磺酸型和羧酸型固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱仪（ESI+）检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯。

- 4.1 水：GB/T 6682，一级。
- 4.2 甲醇：色谱纯。
- 4.3 乙腈：色谱纯。
- 4.4 甲酸。
- 4.5 浓磷酸。
- 4.6 磷酸氢二钾（ K_2HPO_4 ）。
- 4.7 三氯乙酸（ $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ）。
- 4.8 庚烷磺酸钠（ $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）。
- 4.9 5%磷酸溶液（1+19）：取 50 mL 浓磷酸（4.5），用水定容至 1 L。
- 4.10 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液：pH=8.5。称取 34.8 g 磷酸氢二钾（4.6）用水溶解，定容至 1 L，用氢氧化钠溶液调节 pH=8.5。
- 4.11 三氯乙酸溶液：50%（质量分数）。取 20 g 三氯乙酸（4.7），用水定容至 20 mL。
- 4.12 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠溶液：称取 2.20 g 庚烷磺酸钠（4.8），用水溶解，定容至 1 L。

- 4.13 SPE 洗脱溶液:取 4 mL 甲酸(4.4),用 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠溶液(4.12)定容至 100 mL。
- 4.14 25% 甲醇溶液(1+3):取 25 mL 甲醇(4.2),用水定容至 100 mL。
- 4.15 标准物质:链霉素(CAS:3810-74-0)、双氢链霉素(CAS:128-46-1)和卡那霉素(CAS:25389-94-0);纯度均大于等于 98%。
- 4.16 1.0 mg/mL 标准储备溶液:称取适量的链霉素、双氢链霉素和卡那霉素标准物质(4.15),分别用 0.3% 乙酸水溶液溶解并配制成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。避光保存于一 18 °C 冰柜中。
- 4.17 0.1 μg/mL 混合标准溶液:吸取适量链霉素、双氢链霉素和卡那霉素标准储备溶液(4.16),用 0.3% 乙酸水稀释成 0.1 μg/mL 的混合标准溶液。避光保存于一 18 °C 冰柜中。
- 4.18 苯磺酸型固相萃取柱(500 mg,3 mL)或相当者。使用前依次用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。
- 4.19 羧酸型固相萃取柱(500 mg,3 mL)或相当者。使用前依次用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。
- 4.20 滤膜:0.2 μm。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 液体混匀器。
- 5.4 固相萃取装置。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 真空泵:真空度应达到 80 kPa。
- 5.7 微量注射器:25 μL,100 μL。
- 5.8 pH 计:测量精度±0.02 pH 单位。
- 5.9 具塞离心管:100 mL。
- 5.10 刻度离心管:5 mL。
- 5.11 贮液器:50 mL。
- 5.12 离心机:转速 4 000 r/min 以上。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

实验室样品混合均匀,分出 0.5 kg 作为试样。

6.2 试样保存

试样置于一 18 °C 冰柜,避光保存。

7 测定步骤

7.1 待测样品溶液的制备

7.1.1 牛奶样品提取和初净化

称取牛奶样品 8 g(精确到 0.01 g),置于 100 mL 离心管中,加入 30 mL 5% 磷酸溶液(4.9),置于振荡器上振荡提取 10 min,加入 3 mL 三氯乙酸溶液(4.11)涡旋混合后在 4 000 r/min 下离心 10 min。上清液全部倒入下接苯磺酸型固相萃取柱(4.18)的贮液器中,在固相萃取装置上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过萃取柱,待样液全部通过固相萃取柱后,依次用 5 mL 5% 磷酸溶液(4.9)和 10 mL 水洗涤苯磺酸型固相萃取柱(4.18),弃去全部流出液。用 20 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.10)洗脱至 50 mL 离心管中。

7.1.2 奶粉样品提取和初净化

称取奶粉样品 1 g(精确到 0.01 g),置于 100 mL 离心管中,加入 8 mL 水,涡旋混合后,再加入 30 mL 磷酸溶液(4.9),置于振荡器上振荡提取 10 min,加入 3 mL 三氯乙酸溶液(4.11)涡旋混合后在 4 000 r/min 下离心 10 min。上清液全部倒入下接苯磺酸型固相萃取柱(4.18)的贮液器中,在固相萃取装置上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过萃取柱,待样液全部通过固相萃取柱后,依次用 5 mL 5% 磷酸溶液(4.9)和 10 mL 水洗涤苯磺酸型固相萃取柱(4.18),弃去全部流出液。用 20 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.10)洗脱至 50 mL 离心管中。

7.1.3 样品溶液再净化

上述洗脱液倒入下接羧酸型固相萃取柱(4.19)的贮液器中,在固相萃取装置上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过萃取柱,待样液全部通过固相萃取柱后,依次用 10 mL 水和 10 mL 25% 甲醇溶液(4.14)洗涤羧酸型固相萃取柱(4.19),弃去全部流出液。减压抽干羧酸型固相萃取柱(4.19)30 min。用 2 mL SPE 洗脱液(4.13)洗脱至 5 mL 刻度离心管中,用 SPE 洗脱液(4.13)定容至 2.0 mL,混匀后过 0.2 μm 滤膜(4.20),供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 基质混合标准校准溶液的制备

7.2.1 牛奶基质混合标准校准溶液的制备

称取五个阴性牛奶样品 10 g(精确到 0.01 g),分别置于 100 mL 具塞离心管中,加入适量混合标准溶液(4.17),制成链霉素、双氢链霉素和卡那霉素含量均为 5.0 μg/kg、10.0 μg/kg、20.0 μg/kg、100.0 μg/kg 和 200.0 μg/kg 的基质标准溶液。其余按 7.1.1 和 7.1.2 步骤操作完成。

7.2.2 奶粉基质混合标准校准溶液的制备

称取五个阴性奶粉样品 1 g(精确到 0.01 g),分别置于 100 mL 具塞离心管中,加入适量混合标准溶液(4.17),制成链霉素、双氢链霉素和卡那霉素含量均为 40.0 μg/kg、80.0 μg/kg、160.0 μg/kg、800.0 μg/kg 和 1 600.0 μg/kg 的基质标准溶液。其余按 7.1.2 和 7.1.3 步骤操作完成。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:Atlantis C₁₈, 3.5 μm, 150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温:40 ℃;
- 进样量:30 μL;
- 流动相:流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,流动相 C 为甲醇。

梯度洗脱参考条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱参考条件

时间/min	流速/(μL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	200	85	10	5
3.01	200	60	35	5
6.00	200	60	35	5
6.01	200	85	10	5
16.00	200	85	10	5

7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测(MRM);

- d) 电喷雾电压(IS):5 000 V;
- e) 辅助气(AUX)流速:7 L/min;
- f) 辅助气温度(TEM):550 ℃;
- g) 聚焦电压(FP):150 V;
- h) 链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的质谱参数见表 2。

表 2 链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的质谱参数

化合物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压(DP)/ V	采集时间/ ms	碰撞能量(CE)/ V
链霉素 (streptomycin)	582/263	582/263	110	100	45
	582/246				55
双氢链霉素 (dihydrostreptomycin)	584/263	584/263	100	100	43
	584/246				55
卡那霉素 (kanamycin)	485/163	485/163	50	100	34
	485/324				23

7.4 液相色谱-串联质谱测定

7.4.1 定性确证

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间与混合基质标准校准溶液中对对应组分的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品谱图中各组分的相对离子丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的相对离子丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度 K	K>50	20<K<50	10<K<20	K≤10
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.2 定量测定

外标法定量:在仪器最佳工作条件下,对链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的混合基质标准校准溶液进样测定,以混合基质标准校准溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对待测样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。

链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

7.5 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

不称取样品,其余均按试样步骤进行。

7.7 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的测定按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X ——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

c ——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V ——样品溶液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m ——样品溶液所代表最终试样的质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 规定确定的，重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r 。链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 添加浓度范围及重复性和再现性方程

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
链霉素	5.0~200.0	$\lg r=0.844\ 8\ \lg m-0.842\ 8$	$\lg R=0.910\ 2\ \lg m-0.814\ 5$
双氢链霉素	5.0~200.0	$\lg r=0.899\ 0\ \lg m-0.950\ 8$	$\lg R=0.944\ 9\ \lg m-0.920\ 5$
卡那霉素	5.0~200.0	$\lg r=0.889\ 6\ \lg m-0.920\ 8$	$\lg R=0.726\ 3\ \lg m-0.691\ 6$

注： m 为两次测定结果的算术平均值。

如果差值超过重复性限 r ，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R 。链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度范围及再现性方程见表 4。

附录 A
(资料性附录)
多反应监测(MRM)色谱图

链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

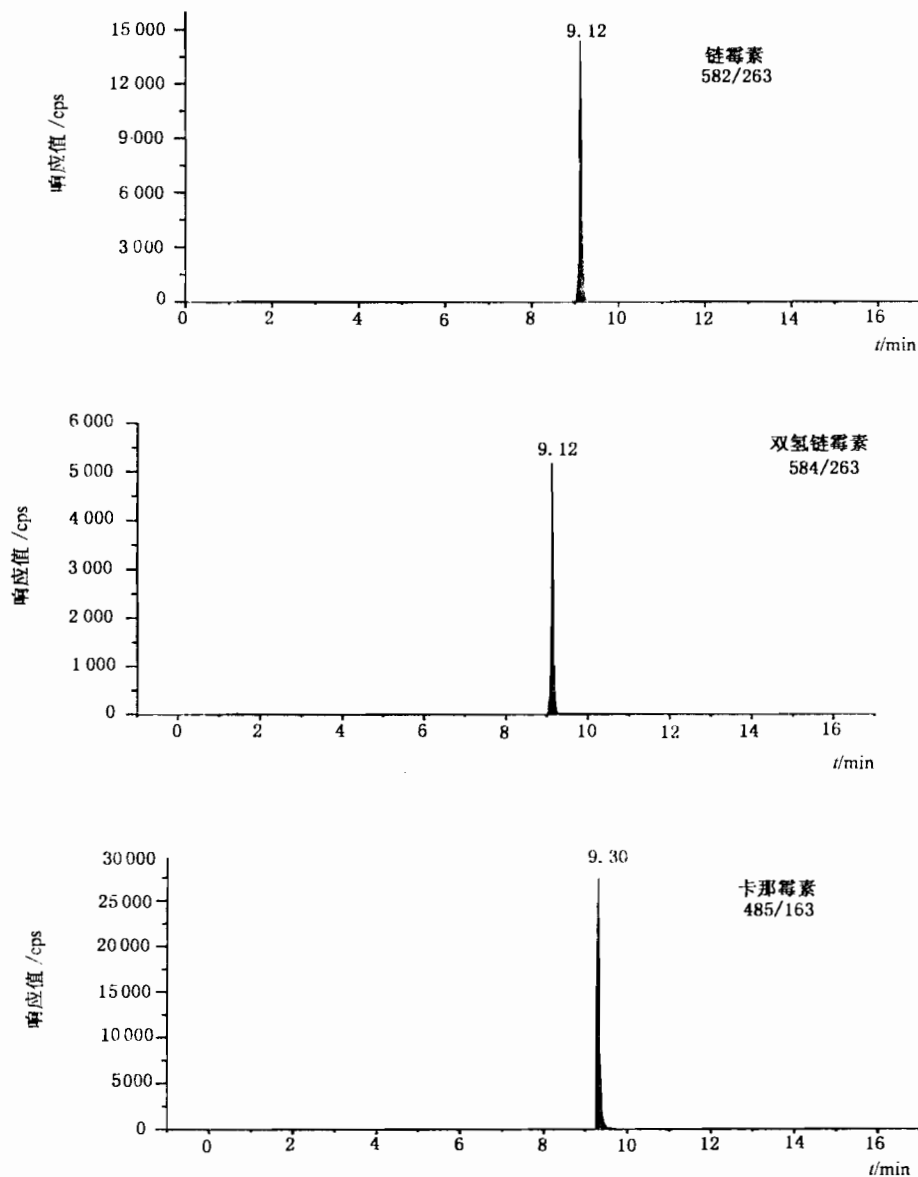


图 A.1 链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度及其平均回收率的试验数据

牛奶样品				奶粉样品			
添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%			添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%		
	链霉素	双氢链霉素	卡那霉素		链霉素	双氢链霉素	卡那霉素
5.0	97.31	96.35	95.15	40.0	91.78	93.17	89.32
10.0	95.88	93.75	98.66	80.0	92.58	94.19	91.57
20.0	96.36	94.86	95.91	160.0	92.79	92.78	93.45
50.0	96.96	94.80	95.56	400.0	90.43	93.61	89.13