

中华人民共和国国家标准

GB/T 22972—2008

牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、 芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of thiabendazole, albendazole, fenbendazole, oxfendazole
and febantel residues in milk and milk powder—
HPLC-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 发布
中国国家标准化管理委员会

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、中华人民共和国沈阳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵颖、刘宁、金雁、孟祥勇、姚家彪、庞国芳。

牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、 芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑和苯硫氨酯残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑和苯硫氨酯残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛奶中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑和苯硫氨酯的检出限为 0.01 mg/kg；奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑和苯硫氨酯的检出限为 0.08 mg/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

样品经乙腈提取，C₁₈ 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯。

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 甲醇：色谱纯。

4.4 正丙醇。

4.5 碳酸氢钠（NaHCO₃）。

4.6 碳酸钠（Na₂CO₃）。

4.7 碳酸氢钠溶液：0.1 mol/L。称取 8.4 g 碳酸氢钠（4.5），用水溶解，定容至 1 000 mL。

4.8 碳酸钠溶液：0.1 mol/L。称取 1.06 g 碳酸钠（4.6），用水溶解，定容至 100 mL。

4.9 碳酸盐缓冲溶液（pH 值为 9.1）：将 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液（4.7）900 mL 与 0.1 mol/L 碳酸钠溶液（4.8）100 mL 混合。

4.10 标准物质：噻苯达唑（thiabendazole CAS:148-79-8）、阿苯达唑（albendazole CAS:54965-21-8）、芬苯达唑（fenbendazole CAS:43210-67-9）、奥芬达唑（oxfendazole CAS:53716-50-0）和苯硫氨酯（febantel CAS:58306-30-2）的纯度均≥99%。

4.11 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取适量的五种苯并咪唑类药物标准物质(4.10),分别用甲醇(4.3)配制成浓度为1.0 mg/mL的标准储备液。保存于0℃~4℃冰箱中。

4.12 混合标准储备溶液:100 μg/mL。吸取适量五种苯并咪唑类药物标准储备溶液(4.11),用甲醇稀释成100 μg/mL的混合标准溶液,于0℃~4℃冰箱保存。

4.13 基质混合标准工作溶液:根据每种标准的灵敏度和仪器线性范围,吸取一定量的混合标准储备溶液(4.12),用空白样品提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液,当天配制。

4.14 C₁₈固相萃取柱:500 mg,6 mL。使用前依次用5 mL甲醇、5 mL水和2 mL碳酸盐缓冲液(4.9)预处理,同时保持柱体湿润。

4.15 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0.01 g和0.1 mg。

5.3 固相萃取装置。

5.4 旋转蒸发器。

5.5 离心机:转速4 000 r/min以上。

5.6 涡旋混匀器。

5.7 超声波清洗器。

6 试样制备与保存

6.1 试样制备

取代表性样品约500 g,混匀,装入洁净容器,密封,标明标记。在抽样及制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样保存

将试样于0℃~4℃保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶样品

称取10 g牛奶试样,精确至0.01 g,置于100 mL具塞离心管中。加入30 mL乙腈,涡旋混匀3 min,超声30 min,以4 000 r/min离心5 min,取上清液加入10 mL正丙醇(4.4),于40℃水浴旋转蒸发除去有机溶剂,用碳酸盐缓冲溶液(4.9)定容至10 mL。

7.1.2 奶粉样品

称取12.5 g奶粉试样于烧杯中,加适量35℃~45℃水将其充分溶解,待冷却至室温后,加水至100 g,混匀,准确称取10 g试样,精确至0.01 g,置于100 mL具塞离心管中,按7.1.1步骤进行处理。

7.2 净化

移取5 mL提取液,注入预处理过的C₁₈固相萃取柱(4.14),调节流速为1.0 mL/min,用5 mL水淋洗,弃去全部流出液后抽干。用6 mL乙腈(4.2)洗脱被测物,流速1.0 mL/min,40℃水浴氮气吹干,再用甲醇溶液(1+4)溶解并定容至1.0 mL,过0.2 μm滤膜(4.15),供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

a) 色谱柱:BEH C₁₈,1.7 μm,50 mm×2.1 mm(内径)或相当者;

- b) 柱温:40 °C;
c) 进样量:10 μL;
d) 流动相及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	甲醇/%	0.1%甲酸水溶液/%
0.0	200	5	95
12.0	200	90	10
12.1	200	5	95
14.0	200	5	95

7.3.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源;
b) 扫描方式:正离子扫描;
c) 检测方式:多反应监测;
d) 电离电压:2.0 kV;
e) 离子源温度:110 °C;
f) 锥孔反吹气流量:80 L/h;
g) 脱溶剂气温度:380 °C;
h) 脱溶剂气流量:700 L/h;
i) 五种苯并咪唑类药物定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量质谱参数见表 2。

表 2 五种苯并咪唑类药物的质谱参数

化合物名称	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
噻苯达唑	202.0	174.7 ^a	46	25
		130.7	46	31
阿苯达唑	266.0	233.9 ^a	34	19
		190.9	34	33
芬苯达唑	300.0	267.9 ^a	34	21
		158.7	34	34
奥芬达唑	316.0	158.7 ^a	38	34
		190.8	38	21
苯硫氨酯	447.0	382.9 ^a	26	18
		414.9	26	14

^a 定量离子。

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

每种被测组分选择一个母离子,两个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中相对应物质的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质标准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为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	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.3.2 定量测定

用基质混合标准工作溶液(4.13)分别进样,以标准溶液浓度为横坐标,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,样品溶液中的待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,五种苯并咪唑类药物标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。五种苯并咪唑类药物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。

7.4 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

五种苯并咪唑类药物残留量的测定按式(1)计算。

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

式中:

X ——试样中被测组分的残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表试样的质量,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照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性实验的条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,牛奶和奶粉中五种苯并咪唑类药物添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 牛奶和奶粉中五种苯并咪唑类药物添加浓度及
重复性限和再现性限方程

单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	样品基质	重复性限 r	再现性限 R
噻苯达唑	0.01~0.50	牛奶	$\lg r = 0.919\ 9 \lg m - 1.123\ 3$	$\lg R = 0.999\ 5 \lg m - 0.886\ 1$
		奶粉	$\lg r = 1.108\ 6 \lg m - 0.809\ 7$	$\lg R = 1.084\ 5 \lg m - 0.813\ 6$
阿苯达唑	0.01~0.50	牛奶	$\lg r = 1.001\ 7 \lg m - 1.171\ 2$	$\lg R = 0.983\ 6 \lg m - 1.037\ 8$
		奶粉	$\lg r = 0.981\ 9 \lg m - 1.158\ 8$	$\lg R = 0.953\ 7 \lg m - 1.131\ 6$
芬苯达唑	0.01~0.50	牛奶	$\lg r = 0.950\ 8 \lg m - 1.100\ 2$	$\lg R = 0.947\ 4 \lg m - 1.088\ 8$
		奶粉	$\lg r = 1.137\ 0 \lg m - 0.837\ 3$	$\lg R = 1.062\ 6 \lg m - 0.875\ 8$

表 4 (续)

单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	样品基质	重复性限 r	再现性限 R
奥芬达唑	0.01~0.50	牛奶	$\lg r=0.973\ 7\ \lg m-1.071\ 2$	$\lg R=1.028\ 5\ \lg m-0.977\ 1$
		奶粉	$\lg r=0.949\ 3\ \lg m-1.095\ 9$	$\lg R=0.930\ 9\ \lg m-1.078\ 6$
苯硫氨酯	0.01~0.50	牛奶	$\lg r=0.907\ 4\ \lg m-1.176\ 1$	$\lg R=0.888\ 7\ \lg m-1.182\ 0$
		奶粉	$\lg r=1.000\ 3\ \lg m-1.008\ 1$	$\lg R=0.977\ 1\ \lg m-0.993\ 0$
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

在再现性实验的条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R , 牛奶和奶粉中五种苯并咪唑类药物添加浓度范围及再现性限方程见表 4。

附录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

五种苯并咪唑类药物标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

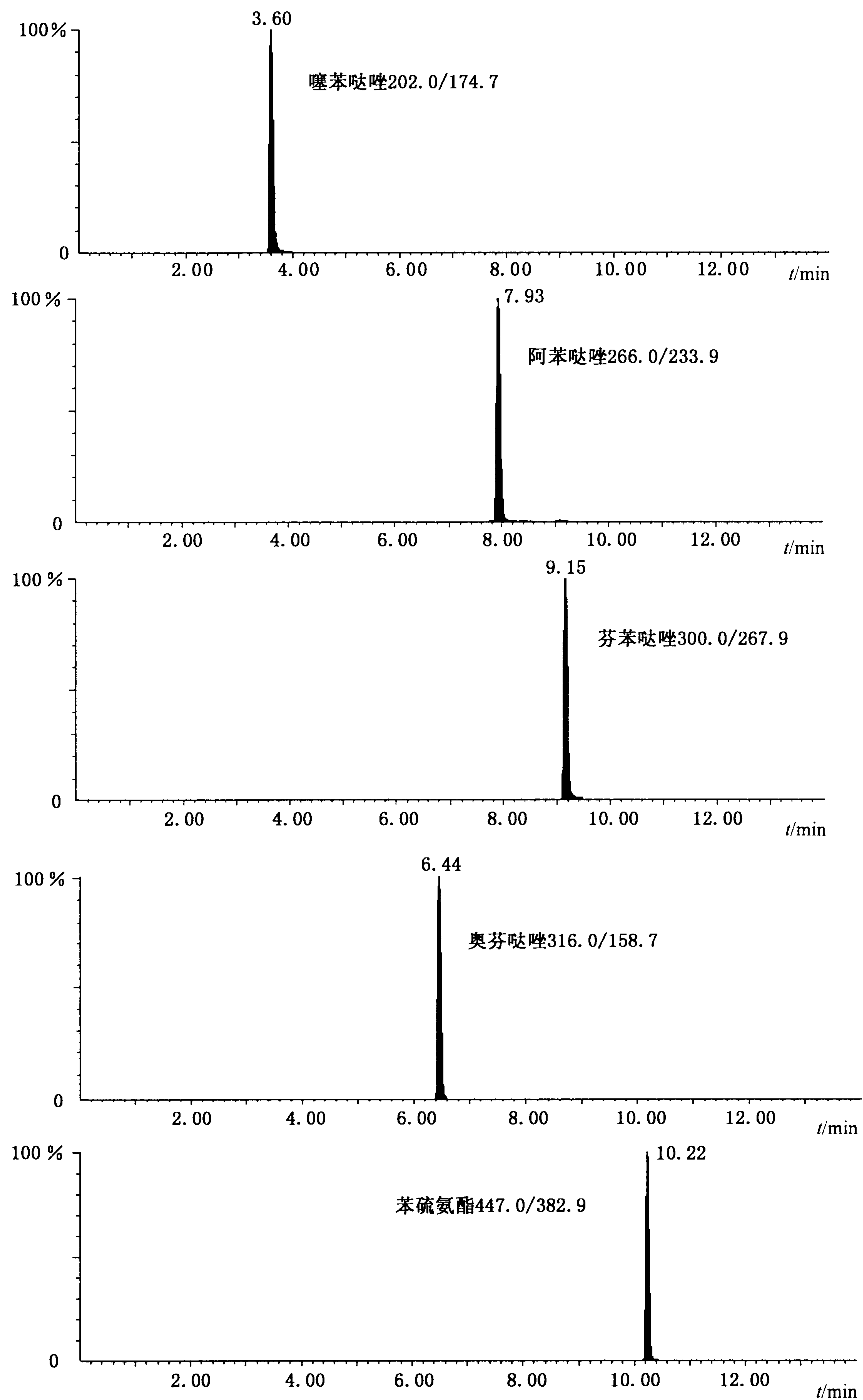


图 A.1 五种苯并咪唑类药物标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

五种苯并咪唑类药物的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 五种苯并咪唑类药物的添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	
		牛 奶	奶 粉
噻苯达唑	0.01	72.5	71.4
	0.10	80.4	81.2
	0.50	82.4	83.3
阿苯达唑	0.01	80.2	82.6
	0.10	85.0	87.4
	0.50	92.7	93.6
芬苯达唑	0.01	81.0	79.1
	0.10	85.2	86.2
	0.50	83.0	90.2
奥芬达唑	0.01	78.5	75.2
	0.10	81.6	80.7
	0.50	83.6	83.9
苯硫氨酯	0.01	71.2	70.8
	0.10	80.1	80.5
	0.50	81.1	82.8