



中华人民共和国国家标准

GB/T 22983—2008

牛奶和奶粉中六种聚醚类抗生素 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of six polyether antibiotics 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、中华人民共和国青海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：薄海波、曹彦忠、雒丽丽、贾光群、星玉秀、李连通、庞国芳。

牛奶和奶粉中六种聚醚类抗生素 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中六种聚醚类抗生素残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于液态奶(包括原料奶、纯牛奶、脱脂牛奶)和奶粉(包括纯奶粉、脱脂奶粉和婴幼儿配方奶粉)中拉沙洛菌素(lasalocid)、莫能菌素(monensin)、尼日利亚菌素(nigericin)、盐霉素(salinomycin)、甲基盐霉素(narasin)、马杜霉素铵(madubamycin ammonium)残留量的测定。

本标准的方法检出限:牛奶中拉沙洛菌素、莫能菌素、尼日利亚菌素、盐霉素、甲基盐霉素、马杜霉素铵检出限均为 $0.2\ \mu\text{g/L}$;奶粉中拉沙洛菌素、莫能菌素、尼日利亚菌素、盐霉素、甲基盐霉素、马杜霉素铵检出限均为 $1.6\ \mu\text{g/kg}$ 。

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

试样中聚醚类抗生素,用乙腈提取,固相萃取柱净化,高效液相色谱-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 正己烷:色谱纯。

4.5 乙腈饱和的正己烷:取少量乙腈(4.2)加入正己烷(4.4)中,充分混匀。静止分层后,取上层正己烷。

4.6 甲酸:优级纯。

4.7 乙酸铵:优级纯。

4.8 无水硫酸钠:用前在 $650\ ^\circ\text{C}$ 灼烧4 h,置于干燥器中冷却后备用。

4.9 水系流动相:1 mL甲酸与0.385 g乙酸铵溶于1 000 mL水,混匀。当天配制。

4.10 甲醇溶液(1+1):100 mL甲醇与100 mL水混合均匀。

4.11 拉沙洛菌素(CAS 25999-20-6)、莫能菌素(CAS 22373-78-0)、尼日利亚菌素(CAS 28643-80-3)、盐霉素(CAS 55721-31-8)、甲基盐霉素(CAS 55134-13-9)、马杜霉素铵(CAS 84878-61-5)标准品:纯度大于等于95%。

4.12 标准储备溶液:准确称取适量的每种标准物质(4.11),分别用甲醇(4.3)配制成浓度为1 mg/mL标准储备溶液。储备液贮存在-18℃冰柜中。

4.13 标准工作溶液:吸取1.00 mL标准储备溶液(4.12),移入100 mL棕色容量瓶,用甲醇定容,该溶液浓度为10 μg/mL,贮存在0℃~4℃冰箱中。

4.14 Oasis HLB固相萃取小柱或相当者:3 mL,60 mg。使用前依次用3 mL甲醇和5 mL水活化小柱,保持柱体湿润。

4.15 滤膜:0.2 μm。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱联用仪:配有电喷雾离子源(ESI源)。

5.2 分析天平:感量0.1 mg和0.01 g。

5.3 漩涡混匀器。

5.4 振荡器。

5.5 离心机:最大转速不低于5 000 r/min。

5.6 移液器:1 mL。

5.7 自动浓缩仪或相当者。

5.8 浓缩瓶:50 mL。

5.9 固相萃取装置。

5.10 氮气吹干仪。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

从全部样品中取出有代表性样品约1 kg,充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封后作为试样,标明标记。在抽样和制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样的保存

将试样于4℃保存。

7 测定方法

7.1 提取

7.1.1 牛奶样品

称取10.0 g混匀的试样于50 mL聚丙烯离心管中,加无水硫酸钠(4.8)约10 g和乙腈(4.2)2×20 mL,漩涡混匀1 min,振荡10 min,以3 000 r/min离心3 min。合并上清液,加10 mL乙腈饱和的正己烷(4.5),漩涡1 min,弃去正己烷,减压浓缩至近干。用4 mL甲醇溶液(4.10)溶解残渣,待净化。

7.1.2 奶粉样品

称取12.5 g奶粉于烧杯中,加适量35℃~50℃水将其溶解,待冷却至室温后,用水定容至100 mL,充分混匀。量取10.0 g样品溶液于50 mL聚丙烯离心管中,按7.1.1步骤提取。

7.2 净化

将7.1所得的样品溶液加载到固相萃取柱中,并用2 mL甲醇溶液(4.10)淋洗浓缩瓶,并入固相萃取柱,依次用5 mL水和3 mL甲醇溶液(4.10)淋洗柱体,4 mL甲醇(4.3)洗脱。用氮气吹干仪将洗脱液吹干,用1.0 mL甲醇溶解,过0.2 μm滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 基质标准工作溶液的制备

称取 6 份阴性样品各 10.0 g, 置于 50 mL 具塞的聚丙烯管中, 分别加入不同体积的六种聚醚类抗生素的标准工作溶液(4.13), 按 6.1 和 6.2 步骤操作。制备成浓度为 1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL 的基质标准工作溶液。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: BEH C₁₈, 1.7 μm, 50 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温: 40 °C;
- 进样量: 5.0 μL;
- 流动相: 流动相 A: 甲醇(4.3), 流动相 B: 水系流动相(4.9)。洗脱程序及流速见表 1。

表 1 流动相梯度程序及流速

时间/min	流速/(μL/min)	A/%	B/%
0.00	250	90.0	10.0
2.00	250	70.0	30.0
2.01	250	90	10.0
2.50	250	90	10.0

7.4.2 串联质谱参考条件

串联质谱参考条件如下:

- 离子源: 电喷雾离子源;
- 扫描方式: 正离子扫描;
- 检测方式: 多反应监测;
- 毛细管电压: 2.8 kV;
- 离子源温度: 110 °C;
- 去溶剂气温度: 380 °C;
- 去溶剂气(氮气)流量: 600 L/h;
- 锥孔气(氮气)流量: 50 L/h;
- 碰撞气流量: 0.1 L/h;
- 锥孔电压、碰撞能量和驻留时间等质谱参数及母离子和子离子详见表 2。

表 2 六种聚醚类抗生素的质谱参数和保留时间

化合物名称	保留时间/ min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (定量) (<i>m/z</i>)	子离子 (定性) (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ V	驻留时间/ ms	锥孔电压/ V
拉沙洛菌素	1.48	613.5	377.1	377.1 595.3	28 38	50	72
莫能菌素	1.23	693.5	675.6	675.6 479.3	51 40	50	65
尼日利亚 菌素	1.76	742.7	657.6	657.6 461.4	30 25	50	42

表 2 (续)

化合物名称	保留时间/ min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (定量) (<i>m/z</i>)	子离子 (定性) (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ V	驻留时间/ ms	锥孔电压/ V
盐霉素	1.55	773.6	431.3	431.3 531.5	50 48	50	65
甲基盐霉素	1.85	787.6	431.3	431.3 531.5	45 48	50	70
马杜霉素铵	1.38	939.6	877.4	877.4 896.3	30 30	50	38

7.5 测定

7.5.1 定性测定

样品溶液按照液相色谱-串联质谱分析条件进行测定时,如果检出的质量色谱峰保留时间与基质标准溶液中对应物质的保留时间一致,并且在扣除背景后的样品质谱图中,子离子的相对丰度与浓度接近的、相同条件下所得到的基质标准溶液谱图相比,误差不超过表 3 规定的范围,则可以判断样品中存在对应的被测物质。

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 <i>K</i>	<i>K</i> > 50	20 < <i>K</i> < 50	10 < <i>K</i> < 20	<i>K</i> ≤ 10
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

7.5.2 定量测定

根据样品中被测物质的含量情况,选取峰面积相近的标准工作溶液一起进行液相色谱-串联质谱分析。标准工作溶液和待测样液中聚醚类抗生素的响应值均应在检测的线性范围内。对标准工作溶液和待测样液等体积参插进样测定。在上述液相色谱-串联质谱分析条件下,6种被测物质的保留时间见表 2。其标准品的多反应离子监测色谱图参见附录 A 中图 A.1 至图 A.6。

本方法六种聚醚类抗生素在牛奶和奶粉中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 和表 B.2。

7.6 平行试验

按以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

7.7 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行测定。

8 结果计算

聚醚类抗生素残留量的测定按式(1)计算

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

式中:

X——试样中被测组分残留量,液态奶样品:单位为微克每升(μg/L),奶粉样品:单位为微克每千克(μg/kg);

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

V——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m——样品溶液所代表试样的体积或质量,液态奶样品:单位为升(mL),奶粉样品: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 规定确定的,其重复性和再现性的值是以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,试样中六种聚醚类抗生素添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 六种聚醚类抗生素添加浓度及重复性限和再现性限方程 单位为微克每千克

化合物名称	样品基质	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
拉沙洛菌素	牛奶	0.2~4	$\lg r=1.014\ 8\ \lg m-0.523\ 0$	$\lg R=0.958\ 4\ \lg m-0.585\ 8$
	奶粉	1.6~32		
莫能菌素	牛奶	0.2~4	$\lg r=1.190\ 3\ \lg m-0.596\ 1$	$\lg R=1.340\ 8\ \lg m-0.590\ 2$
	奶粉	1.6~32		
尼日利亚菌素	牛奶	0.2~4	$\lg r=0.950\ 7\ \lg m-0.520\ 1$	$\lg R=0.890\ 5\ \lg m-0.572\ 8$
	奶粉	1.6~32		
盐霉素	牛奶	0.2~4	$\lg r=0.967\ 9\ \lg m-0.525\ 8$	$\lg R=0.968\ 3\ \lg m-0.952\ 7$
	奶粉	1.6~32		
甲基盐霉素	牛奶	0.2~4	$\lg r=1.089\ 9\ \lg m-0.578\ 2$	$\lg R=1.025\ 4\ \lg m-0.614\ 0$
	奶粉	1.6~32		
马杜霉素铵	牛奶	0.2~4	$\lg r=1.086\ 0\ \lg m-0.647\ 4$	$\lg R=1.052\ 3\ \lg m-0.676\ 5$
	奶粉	1.6~32		

注： m 为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限 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

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,试样中六种聚醚类抗生素添加浓度范围及再现性方程见表 4。

附录 A
(资料性附录)

标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

六种聚醚类抗生素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1~图 A.6。

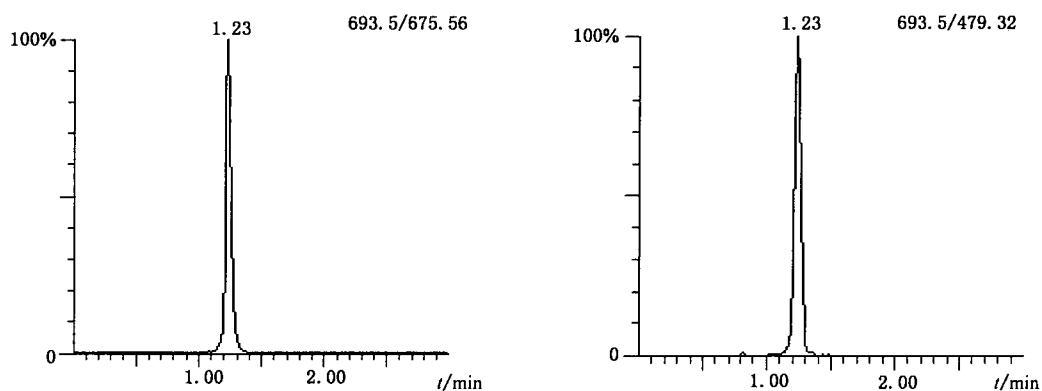


图 A.1 莫能菌素标准物质反应监测(MRM)色谱图

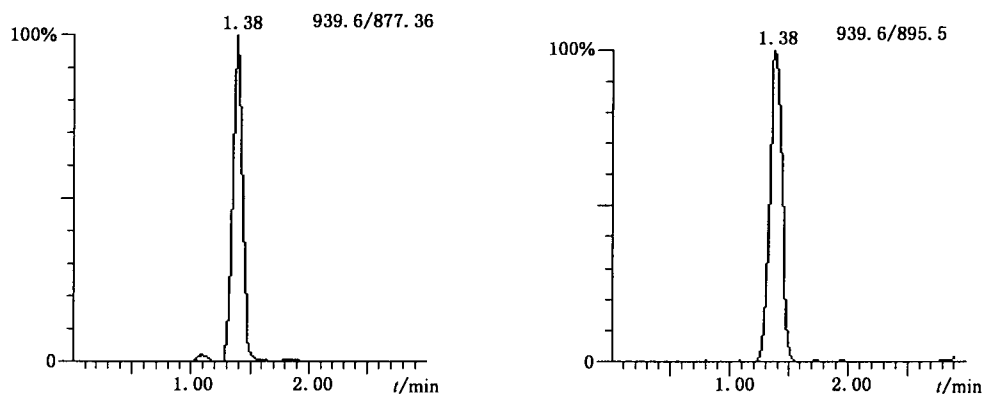


图 A.2 马杜霉素铵标准品物质的多反应监测(MRM)色谱图

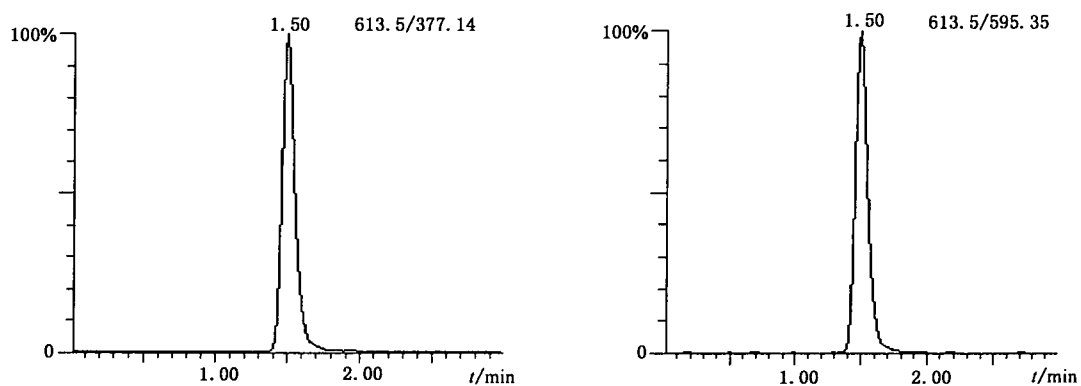


图 A.3 拉沙洛菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

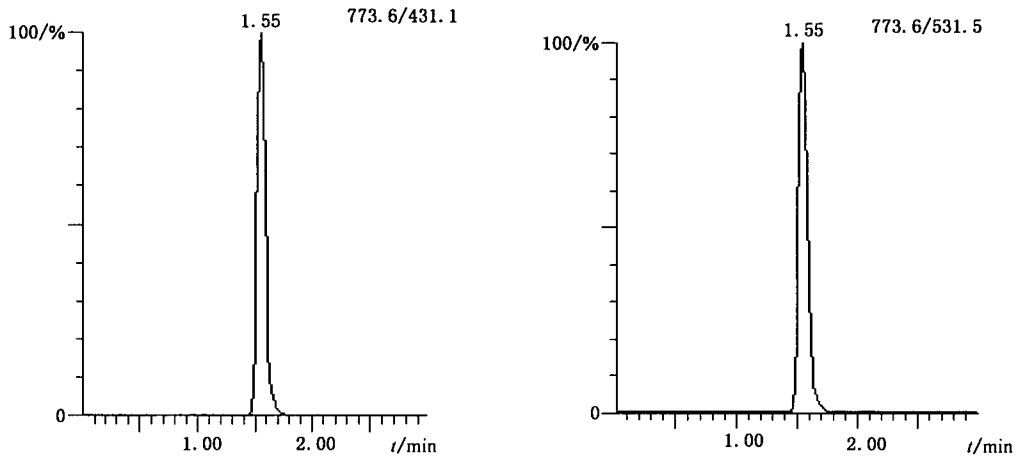


图 A.4 盐霉素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

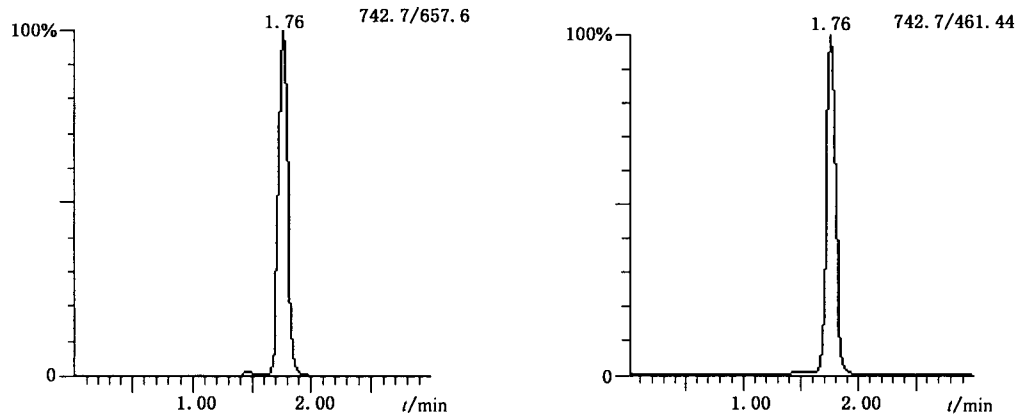


图 A.5 尼日利亚菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

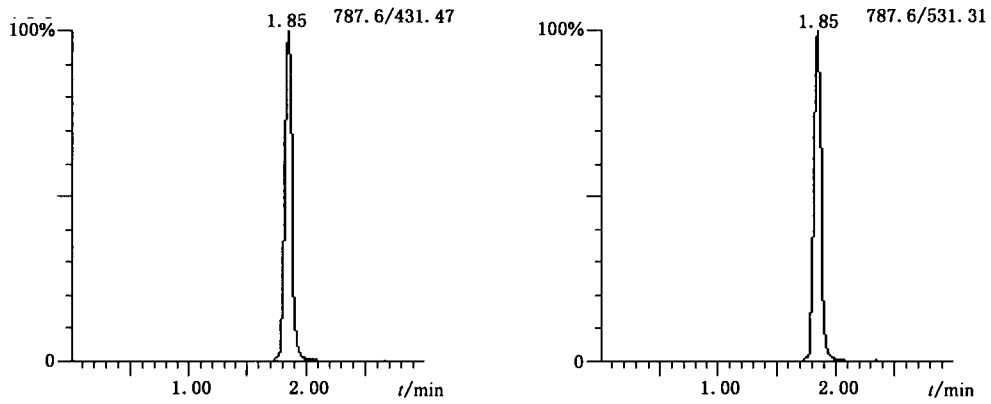


图 A.6 甲基盐霉素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附录 B
(资料性附录)
回收率

六种聚醚类抗生素在牛奶中添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B. 1;六种聚醚类抗生素在奶粉中添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B. 2。

表 B. 1 六种聚醚类抗生素在牛奶中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/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
拉沙洛菌素	1	97.6
	2	92.3
	5	95.8
	10	87.6
莫能菌素	0.5	94.0
	2	91.7
	5	92.4
	10	89.9
尼日利亚菌素	0.5	88.3
	2	94.4
	5	97.0
	10	95.5
盐霉素	1	87.8
	2	92.3
	5	85.8
	10	97.5
甲基盐霉素	0.5	86.6
	2	91.7
	5	92.4
	10	89.8
马杜霉素铵	1	88.9
	2	94.8
	5	97.0
	10	98.5

表 B.2 六种聚醚类抗生素在奶粉中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/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
拉沙洛菌素	2	87.6
	4	92.3
	10	85.8
	20	95.5
莫能菌素	1	86.0
	2	91.7
	5	92.4
	10	89.9
尼日利亚菌素	1	88.3
	2	94.4
	5	97.0
	10	87.5
盐霉素	2	87.6
	4	92.3
	10	85.8
	20	95.5
甲基盐霉素	1	86.0
	2	91.7
	5	92.4
	10	89.9
马杜霉素铵	2	88.3
	4	94.4
	10	97.0
	20	87.5