

中华人民共和国国家标准

GB/T 22988—2008

牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、 竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of spiramycin, pirlimycin, oleandomycin, tilmicosin,
erythromycin and tylosin 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 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、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郭春海、艾连峰、段文仲、陈瑞春、马育松、窦彩云、刘宝圣、张增利、庞国芳。

牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、 竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素 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螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素残留量的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素残留量的测定和确证。

本标准的方法检出限：牛奶为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，奶粉为 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

用乙腈提取试样中的分析物，固相萃取柱净化，高效液相色谱-串联质谱测定，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，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 乙腈，液相色谱纯。
- 4.2 甲醇，液相色谱纯。
- 4.3 乙酸，液相色谱纯。
- 4.4 甲酸铵，液相色谱纯。
- 4.5 磷酸氢二钠。
- 4.6 氢氧化钠。
- 4.7 甲醇-水溶液（3+7）：300 mL 甲醇与 700 mL 水混合。
- 4.8 5 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 20 g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 100 mL。
- 4.9 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液：6 g 磷酸氢二钠（4.5）溶解于 450 mL 水中，用氢氧化钠（4.8）溶液调节 pH=8，加水至 500 mL，使用前配制。
- 4.10 0.1 mol/L 甲酸铵溶液：0.63 g 甲酸铵（4.4）加水溶解至 1 000 mL。
- 4.11 标准品：螺旋霉素（spiramycin, CAS: 8025-81-8）、吡利霉素（pirlimycin, CAS: 79548-73-5）、竹桃霉素（oleandomycin, CAS: 7060-74-4）、替米卡星（tilmicosin, CAS: 108050-54-0）、红霉素（erythromycin,

CAS:114-07-8)、泰乐菌素(tylosin,CAS:1401-69-0),纯度均大于等于98%。

4.12 标准储备液:分别精确称取适量标准品,用甲醇配制成100 μg/mL的标准储备液。

4.13 混合标准中间工作液:取标准储备液(4.12)各1 mL至100 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成混合标准工作液,浓度为1 μg/mL。

4.14 滤膜:0.45 μm。

4.15 HLB固相萃取柱¹⁾或相当者:500 mg,6 mL。使用前依次用3 mL甲醇、3 mL水和3 mL磷酸盐缓冲溶液(4.9)预处理。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 离心机:转速大于3 000 r/min。

5.3 旋涡混合器。

5.4 旋转蒸发仪。

5.5 氮吹仪。

5.6 固相萃取装置。

6 试样的制备与保存

6.1 牛奶

取均匀样品约250 g装入洁净容器作为试样,密封置4 °C下保存,并标明标记。

6.2 奶粉

取均匀样品约250 g装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶

称取4 g,准确至0.01 g,牛奶样品于50 mL具塞离心管中,加入20 mL乙腈振荡提取2 min后,3 000 r/min离心10 min,移取上清液过滤至鸡心瓶中。再用10 mL乙腈重复提取一次,合并上清液于同一鸡心瓶中。

7.1.2 奶粉

称取0.5 g,准确至0.01 g,奶粉样品,加入4 mL水于50 mL具塞离心管中,混匀。加入20 mL乙腈振荡提取2 min后,3 000 r/min离心10 min,移取上清液过滤至鸡心瓶中。再用10 mL乙腈重复提取一次,合并上清液于同一鸡心瓶中。

7.2 净化

将提取液于45 °C下旋转蒸发至约4 mL左右,加入2 mL磷酸盐缓冲液(4.9),混匀后,转移到已条件化的HLB固相萃取柱(4.15)上,再用2 mL磷酸盐缓冲液洗涤鸡心瓶两次,洗液一并转移到柱上,以小于2 mL/min流速滴下。接着依次用3 mL水和2 mL甲醇-水溶液(4.7)淋洗并抽干柱,最后用6 mL乙腈洗脱并收集于10 mL带刻度的玻璃管中(此过程流速小于2 mL/min)。洗脱液在45 °C水浴上氮气吹至约1 mL,用甲酸胺溶液(4.10)定容至2 mL,涡旋混合后,过0.45 μm滤膜供HPLC-MS-MS分析。

7.3 空白基质溶液的制备

将取牛奶阴性样品4 g,奶粉阴性样品0.5 g,精确到0.01 g,按7.1和7.2操作。

1) HLB固相萃取柱是Waters公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

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：苯基柱，5 μm ，150 mm \times 2.1 mm(内径)或相当者；
- 色谱柱温度：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 进样量：15 μL ；
- 流动相梯度及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/ $(\mu\text{L}/\text{min})$	0.1%甲酸水溶液/%	甲醇/%
0.00	200	80	20
6.00	200	20	80
8.00	200	20	80
8.01	200	80	20
10.0	200	80	20

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子化模式：电喷雾正离子模式(ESI+)；
- 质谱扫描方式：多反应监测(MRM)；
- 鞘气压力：104 kPa；
- 辅助气压力：138 kPa；
- 正离子模式电喷雾电压(IS)：4 000 V；
- 毛细管温度：350 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 源内诱导解离电压：10 V；
- Q1 为 0.7，Q3 为 0.7；
- 碰撞气：高纯氦气；
- 碰撞气压力：0.2 Pa；
- 参考保留时间、监测离子对和裂解能量见表 2。

表 2 参考保留时间、监测离子对和裂解能量

化合物名称	保留时间/min	监测离子对(m/z)	裂解能量/eV
螺旋霉素	4.73	843.50/173.87 ^a	36
		843.50/540.09	29
吡利霉素	4.78	411.12/111.98 ^a	25
		411.12/363.02	14
竹桃霉素	5.62	688.46/158.20 ^a	35
		688.46/544.30	20
替米卡星	5.83	869.57/173.83 ^a	41
		869.57/155.89	37
红霉素	6.12	734.18/157.88 ^a	33
		734.18/576.13	20
泰乐菌素	6.33	916.36/173.80 ^a	38
		916.36/772.18	28

^a 为定量离子对，对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

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应的保留时间偏差在 ±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混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 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 ≤ 10
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 对混合基质标准校准溶液进样, 以峰面积为纵坐标, 混合基质校准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对样品进行定量, 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。上述色谱和质谱条件下, 标准物质多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 A 中的图 A.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 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液, 用空白基质溶液稀释成所需浓度的标准校准溶液。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, 回收率范围参见附录 B 中的表 B.1。

7.7 空白试验

除不称取样品外, 均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中分析物的残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X_i = c_i \times \frac{V_i}{m_i} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X_i ——试样中被测组分残留量, 单位为微克每千克(μg/kg);
- c_i ——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_i ——样品溶液最终定容体积, 单位为毫升(mL);
- m_i ——样品溶液所代表最终试样的量, 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, 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), 被测物的添加浓度范围及重复性方程见表 4 和表 5。

表 4 牛奶中四种分析物的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
螺旋霉素	1~10	$\lg r=1.134\ 4\ \lg m-0.876\ 5$	$\lg R=0.822\ 1\ \lg m-0.499\ 5$
吡利霉素	1~10	$r=0.176\ 2\ m-0.035\ 6$	$R=0.210\ 4\ m+0.171\ 2$
竹桃霉素	1~10	$\lg r=0.990\ 9\ \lg m-0.812\ 1$	$\lg R=1.101\ 0\ \lg m-0.551\ 9$
替米卡星	1~10	$r=0.135\ m+0.000\ 2$	$R=0.406\ 1\ m-0.311\ 8$
红霉素	1~10	$\lg r=0.829\ 4\ \lg m-0.914\ 4$	$\lg R=0.844\ 2\ \lg m-0.630\ 6$
泰乐菌素	1~10	$\lg r=1.175\ 5\ \lg m-0.888\ 3$	$\lg R=0.954\ 4\ \lg m-0.561\ 3$
注： m 为两次测定值的算术平均值。			

表 5 奶粉中四种分析物的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
螺旋霉素	8~80	$\lg r=0.974\ 0\ \lg m-0.697\ 3$	$\lg R=0.856\ 5\ \lg m-0.409\ 2$
吡利霉素	8~80	$r=0.181\ 1\ m-0.067\ 5$	$R=0.205\ 5\ m+1.186\ 6$
竹桃霉素	8~80	$r=0.138\ 7\ m+0.292\ 4$	$R=0.370\ 1\ m-1.413\ 4$
替米卡星	8~80	$r=0.137\ 4\ m+0.236\ 4$	$R=0.372\ 7\ m-2.124\ 9$
红霉素	8~80	$\lg r=0.840\ 4\ \lg m-0.659\ 4$	$\lg R=0.844\ 8\ \lg m-0.502\ 6$
泰乐菌素	8~80	$\lg r=1.069\ 9\ \lg m-0.813\ 1$	$\lg R=0.958\ 5\ \lg m-0.534\ 8$
注： m 为两次测定值的算术平均值。			

如果差值超过重复性限,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),被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 4 和表 5。

附录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素标准物质多反应监测(MRM)色谱图, 见图 A.1。

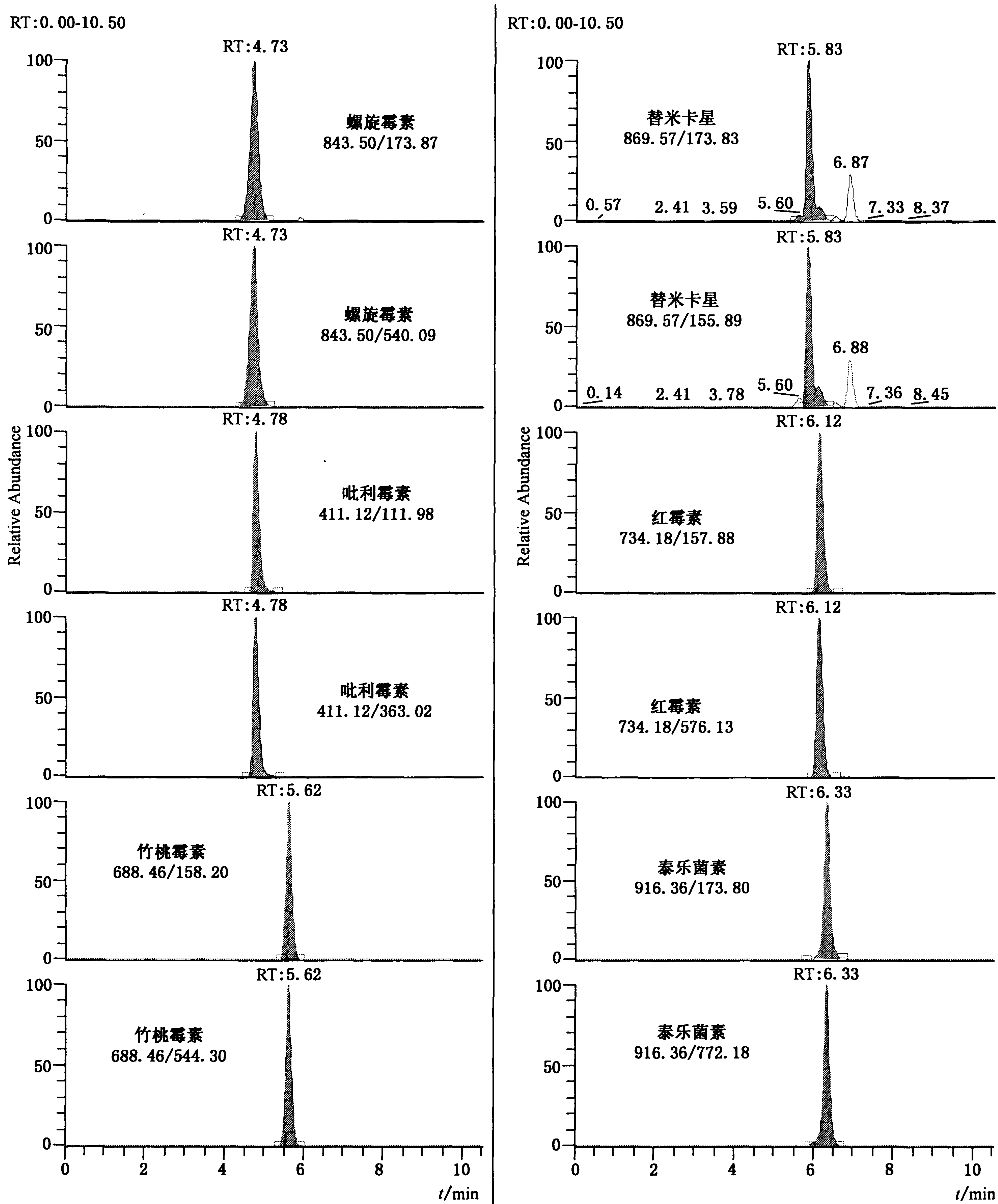


图 A.1 标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

六种化合物的添加浓度及其平均回收率范围数据,见表 B.1。

表 B.1 六种化合物的添加浓度及其平均回收率范围数据

化合物名称	牛奶		奶粉	
	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率范围/%	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率范围/%
螺旋霉素	1	78.0~87.0	8	79.1~98.0
	2	78.0~95.0	16	79.4~98.1
	5	82.2~97.2	40	79.8~105
	10	78.0~96.4	80	79.6~105
吡利霉素	1	77.0~97.0	8	77.8~96.6
	2	73.0~94.5	16	70.0~94.4
	5	81.2~100	40	68.3~92.0
	10	78.3~92.0	80	78.4~94.5
竹桃霉素	1	78.0~105	8	74.8~98.1
	2	75.0~93.5	16	85.6~105
	5	82.2~98.0	40	80.3~99.8
	10	74.5~96.0	80	79.3~105
替米卡星	1	85.0~108	8	76.9~109
	2	72.5~94.5	16	81.3~98.1
	5	77.6~96.6	40	83.8~111
	10	72.4~93.6	80	81.1~101
红霉素	1	74.0~95.0	8	73.4~89.4
	2	81.5~96.5	16	85.0~94.4
	5	77.0~93.6	40	76.0~101
	10	79.4~91.1	80	77.0~94.6
泰乐菌素	1	77.0~88.0	8	81.0~105
	2	76.0~89.0	16	78.1~96.9
	5	79.2~95.0	40	83.8~107
	10	74.0~92.6	80	78.6~98.5