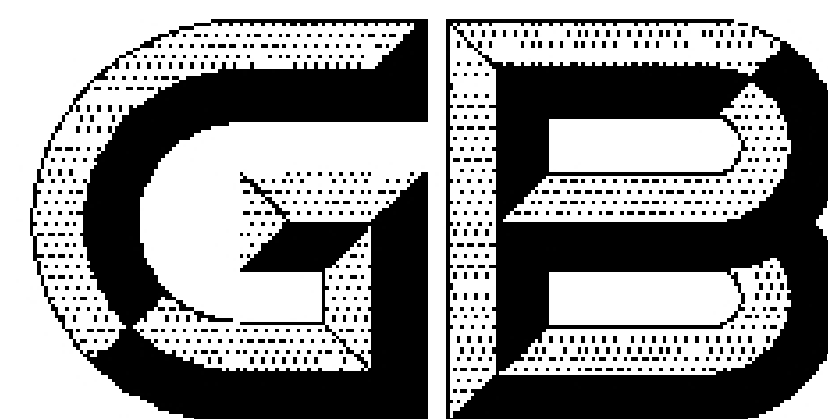




中华人民共和国国家标准

GB/T 20743—2006

猪肉、猪肝和猪肾中杆菌肽残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of bacitracin residues
in porcine liver, kidney and muscle tissues—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

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、山东农业大学。

本标准主要起草人：庞国芳、范春林、连玉晶、李岩、郑军红、曹彦忠、张进杰、李学民、刘永明。

本标准系首次发布的国家标准。



猪肉、猪肝和猪肾中杆菌肽残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了猪肉、猪肝和猪肾中杆菌肽残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪肉、猪肝和猪肾中杆菌肽残留量的测定(本方法测定杆菌肽中主要成分杆菌肽 A)。

本标准的方法检出限:50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中杆菌肽残留用酸化的甲醇水匀浆提取,经双硫脲三氯甲烷溶液进行液液分配净化后,再经固相萃取柱净化,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,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 三氯甲烷:色谱纯。

4.3 甲酸。

4.4 双硫脲:优级纯。

4.5 杆菌肽标准物质:纯度 $\geq 92.0\%$ 。

4.6 甲醇+水(1+1):量取 250 mL 甲醇(4.1)与 250 mL 水混合。

4.7 0.3%甲酸溶液:移取 3 mL 甲酸(4.3)于装有约 800 mL 水的 1 L 容量瓶中,用水定容至刻度并混匀。

4.8 0.1%甲酸甲醇溶液:移取 1 mL 甲酸于装有约 800 mL 甲醇的 1 L 容量瓶中,用甲醇定容至刻度并混匀。

4.9 0.002 5%双硫脲三氯甲烷溶液:称取 0.025 g 双硫脲(4.4)于装有约 800 mL 三氯甲烷(4.2)的 1 L 容量瓶中,用三氯甲烷定容至刻度并混匀。

4.10 饱和双硫脲三氯甲烷溶液:移取适量的 0.002 5%双硫脲三氯甲烷溶液于盛有约 100 mL 甲醇+水(1+1)的 250 mL 分液漏斗中,振摇 1 min,静置分层,取下层溶液备用。

4.11 杆菌肽标准储备溶液:准确称取适量的杆菌肽于 50 mL 容量瓶中,用 0.1%甲酸甲醇溶液配制成浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备溶液。储备液在 2℃~4℃保存,可用 3 个月。

4.12 杆菌肽标准工作溶液:移取杆菌肽标准储备溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 0.1%甲酸甲醇溶液定容,配制成浓度为 10.0 mg/L 的标准工作溶液,在 2℃~4℃保存,可用 1 周。

4.13 杆菌肽基质标准工作溶液:根据需要吸取适量的杆菌肽标准工作溶液,用空白样品提取液稀释成适当浓度的基质标准工作溶液,当天配制。

4.14 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:60 mg,3 mL。使用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水预处理,并保持柱体湿润。

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 高速组织捣碎机:转速不低于 10 000 r/min。

5.4 振荡器。

5.5 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

5.6 离心管:10 mL 和 60 mL,具塞。

5.7 贮液器:50 mL。

5.8 固相萃取真空装置。

5.9 氮气吹干仪。

5.10 微量注射器:25 μ L,100 μ L。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

猪肝脏、肾脏要去除脂肪和其他的非肝脏、肾脏组织,猪肉要去皮和骨头,将其搅碎拌匀,分出 0.5 kg 作为试样,将制备好的试样密封,并做上标记。

6.2 试样保存

将试样置于-18℃条件下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 10 g 试样(精确到 0.01 g)置于 60 mL 离心管中,加入 0.1 mL 甲酸和 20 mL 甲醇+水(1+1),于高速组织捣碎机上匀浆提取 1 min,然后加入 20 mL 经甲醇+水(1+1)饱和的 0.002 5%双硫脲三氯甲烷溶液,于振荡器上剧烈振荡 10 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 mL 于 50 mL 试管中,弃去其余上清液。

往上述双硫脲三氯甲烷溶液中加入 30 mL 水,捣碎残渣,置于振荡器上剧烈振荡 10 min,移取全部上清液于另一 60 mL 离心管中。重复提取一次,合并上清液,混匀,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 30 mL 与 50 mL 试管中的提取液合并,混匀。

7.2 净化

在预处理过的固相萃取柱顶部连接贮液器,移入上述试管中样液,待样液全部通过萃取柱后,加入 2 mL 水,弃去全部流出液。然后,将固相萃取柱在 50 kPa~55 kPa 的负压下抽干 1 h,最后用 2 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管中,洗脱液在 35℃水浴中用氮气吹干,用 0.5 mL 甲醇重新溶解残渣,再加入 0.5 mL 0.3%甲酸溶液,摇匀后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱:Inertsil ODS-3,5.0 μ m,150 mm $\times$ 2.1 mm(内径)或相当者;

- b) 液相色谱梯度洗脱条件见表 1；
- c) 柱温:40℃；
- d) 进样量:20 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	水(含 0.3%甲酸)/(%)	甲醇/(%)
0.00	400	95.0	5.0
5.00	400	50.0	50.0
20.00	400	50.0	50.0
20.10	400	95.0	5.0
25.00	400	95.0	5.0

7.3.2 质谱条件

- 
- 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) 电喷雾电压:5 500 V；
 - e) 碰撞气压力:410 kPa；
 - f) 雾化气压力:690 kPa；
 - g) 气帘气压力:410 kPa；
 - h) 辅助加热气压力:690 kPa；
 - i) 离子源温度:700℃；
 - j) 定性离子对、定量离子对和去簇电压(DP)、聚焦电压(FP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)见表 2。

表 2 杆菌肽的定性离子对、定量离子对、去簇电压、聚焦电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

名 称	定性 离子对 (<i>m/z</i>)	定量 离子对 (<i>m/z</i>)	去簇 电压(DP)/ V	聚焦 电压(FP)/ V	碰撞气 能量(CE)/ V	碰撞室 出口电压(CXP)/ V
杆菌肽	712.3/227.2	712.3/199.2	52	90	73	3
	712.3/356.2				48	7
					43	3

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

用 5 个不同浓度的杆菌肽基质标准工作溶液分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中杆菌肽的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,杆菌肽的总离子流图参见图 A.1。杆菌肽的保留时间为 8.49 min。

本方法的添加回收率数据参见表 B.1。

7.4 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

8 结果计算

杆菌肽残留量按式(1)计算:

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

式中:

- X——试样中杆菌肽残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

注: 计算结果需将空白值扣除。

9 精密度

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。

9.1 重复性

在重复性测定的条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 *r*。样品中杆菌肽含量范围及重复性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 <i>r</i>	再现性限 <i>R</i>
杆菌肽	0.05~1.0	$\lg r = 0.919\,3 \lg m - 0.920\,3$	$\lg R = 0.959\,6 \lg m - 0.640\,2$
注: <i>m</i> 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。

9.2 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*。样品中杆菌肽含量范围及重复性方程见表 3。



附录 A

(资料性附录)

杆菌肽标准物质的总离子流图

杆菌肽标准物质的总离子流图,见图 A.1。

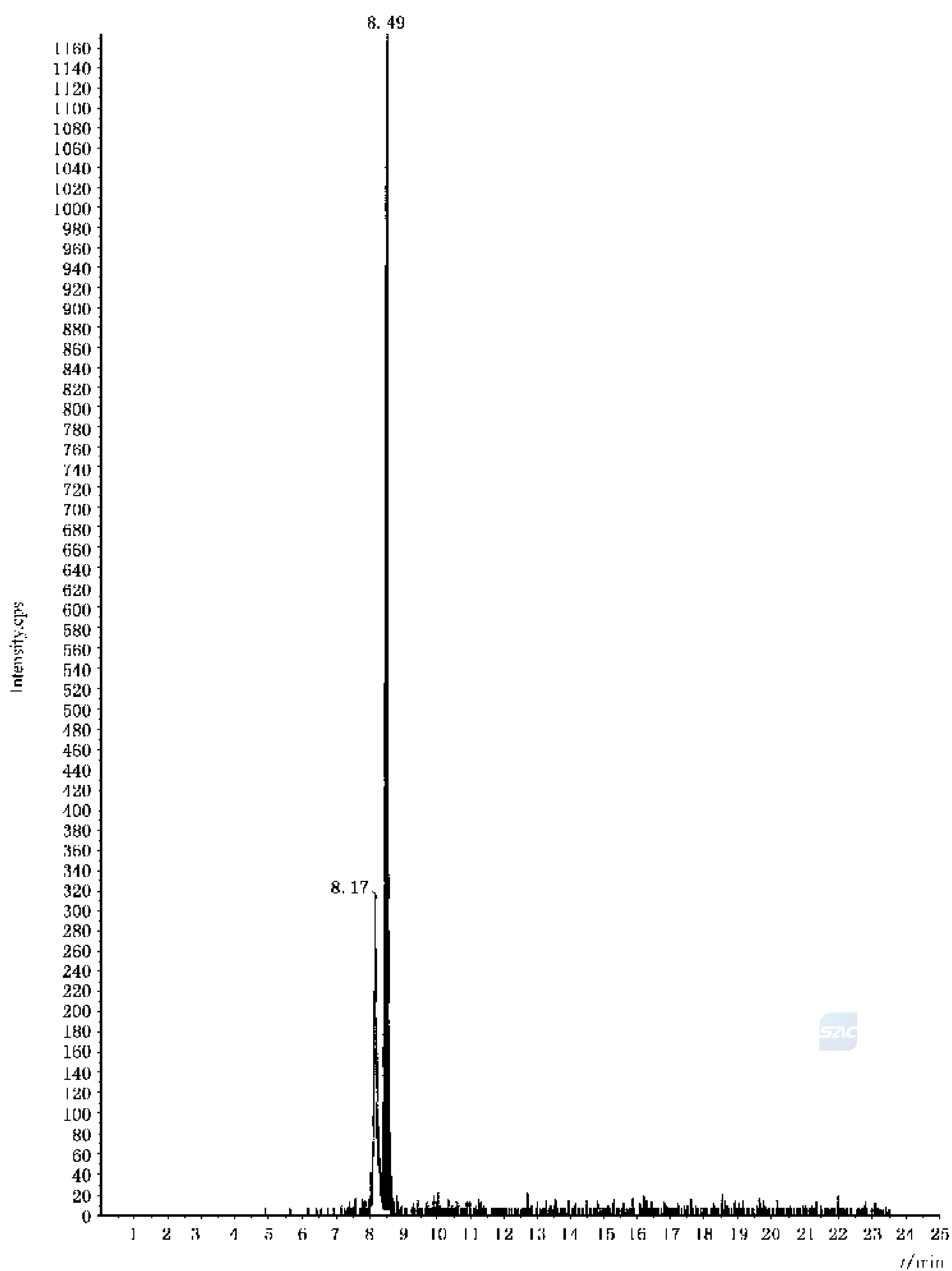


图 A.1 杆菌肽标准物质的总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本标准中杆菌肽添加浓度及平均回收率的试验数据见表 B.1。

表 B.1 杆菌肽添加浓度及其平均回收率的试验数据

样品名称	添加浓度/(mg/kg)	回收率/(%)
猪肉	0.05	83.3
	0.20	92.8
	0.50	86.7
	1.00	98.9
猪肝	0.05	86.9
	0.20	85.3
	0.50	84.2
	1.00	82.2
猪肾	0.05	84.2
	0.20	82.0
	0.50	83.8
	1.00	83.1

