



中华人民共和国国家标准

GB/T 22971—2008

牛奶和奶粉中安乃近代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of metabolite residues of dipyrone
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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：沈金灿、谢丽琪、肖陈贵、朱玉兰、熊贝贝、林燕奎、庞国芳。

牛奶和奶粉中安乃近代谢物 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安乃近代谢物 4-甲酰氨基安替比林(4-formylaminoantipyrine)、4-乙酰氨基安替比林(4-acetylaminoantipyrine)、4-甲基氨基安替比林(4-methylaminoantipyrine)和 4-氨基安替比林(4-aminoantipyrine)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 4-甲酰氨基安替比林、4-乙酰氨基安替比林、4-甲基氨基安替比林和 4-氨基安替比林残留量的测定。

本标准的方法检出限为：对于牛奶，4-甲酰氨基安替比林、4-氨基安替比林、4-甲基氨基安替比林和 4-乙酰氨基安替比林均为 $5.0 \mu\text{g/kg}$ ；对于奶粉，4-甲酰氨基安替比林、4-氨基安替比林、4-甲基氨基安替比林和 4-乙酰氨基安替比林均为 $40.0 \mu\text{g/kg}$ 。

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

牛奶和奶粉中安乃近代谢物残留加入 Tris 溶液后用乙腈提取，提取液经正己烷脱脂净化，液相色谱-串联质谱仪测定。4-乙酰氨基安替比林、4-甲酰氨基安替比林和 4-氨基安替比林采用外标法定量，4-甲基氨基安替比林采用内标法进行定量。

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 异丙醇。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。

4.5 乙酸铵：色谱纯。

4.6 1.0 mol/L Tris 溶液：准确称取 12.1 g 三羟甲基氨基甲烷，用水定容至 100 mL。

4.7 样品定容溶液：甲醇-水(1+19)。

4.8 5 mmol/L 乙酸铵溶液:准确称取 0.385 g 乙酸铵,用 950 mL 水溶解,用乙酸将溶液调至 pH 3.0,再加水定容至 1 000 mL。

4.9 4-甲基氨基安替比林(4-methylaminoantipyrine, $C_{12}H_{15}N_3O$, CAS:519-98-2)、4-乙酰氨基安替比林(4-acetylaminoantipyrine, $C_{13}H_{15}N_3O_2$, CAS:83-15-8)、4-甲酰氨基安替比林(4-formylaminoantipyrine, $C_{12}H_{13}N_3O_2$, CAS:1672-58-8)和 4-氨基安替比林(4-aminoantipyrine, $C_{11}H_{13}N_3O$, CAS:83-07-8)标准物质:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.10 内标标准物质:4-异丙基氨基安替比林(4-isopropylantipyrine, $C_{14}H_{19}N_3O$),纯度 $\geq 99\%$ 。

4.11 100 mg/L 标准储备溶液:准确称取适量的各种安乃近代谢物标准物质(4.9),用甲醇(4.1)配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备溶液,避光 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.12 1.0 mg/L 混合标准储备溶液:吸取每种适量标准储备溶液(4.11),用甲醇稀释成 1.0 mg/L 的混合标准工作溶液,避光 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.13 100 mg/L 内标储备溶液:准确称取适量的内标标准物质(4.10)用甲醇(4.1)配制成浓度为 100 mg/L 标准储备溶液,避光 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.14 1.0 mg/L 内标工作溶液:吸取适量的内标储备溶液(4.13),用甲醇稀释成 1.0 mg/mL 的内标标准工作溶液,避光 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.15 基质混合标准工作溶液:吸取适量的混合标准储备溶液(4.12)和适量内标工作溶液(4.14),用空白样品提取液配成浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 、40.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 和内标浓度为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 的基质混合标准工作溶液。当天配制。

4.16 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 旋涡混匀器。

5.4 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.5 移液器:10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 。

5.6 带刻度聚丙烯离心管:15 mL 和 50 mL,具塞。

5.7 低温离心机:转速大于 5 000 r/min,可制冷到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.8 容量瓶:25 mL。

5.9 鸡心瓶。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取不少于 500 g 有代表性的牛奶或奶粉,充分混匀,分为两份,置于样品瓶中,密封,并作出标记。

6.2 试样保存

牛奶置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜中避光保存,奶粉则在室温下置于干燥器保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶

称取 5 g 试样,精确至 0.01 g,置于 50 mL 带刻度的聚丙烯离心管(5.6)中,加入 100 μL 内标工作

溶液(4.14)和 0.5 mL 1.0 mol/L 的 Tris 溶液(4.6),再加入 10 mL 乙腈,旋涡混合 1 min,振荡提取 15 min,4 ℃下 5 000 r/min 离心 5 min,提取液转移至 25 mL 容量瓶(5.8)中。再加入 8 mL 乙腈,重复上述操作,合并提取液,用乙腈定容至 25 mL,混匀。

7.1.2 奶粉

取 12.5 g 奶粉,精确至 0.01 g,置于 100 mL 烧杯中,加适量 35 ℃~50 ℃水将其溶解,待冷却至室温后,加水至总重量为 100 g,充分混匀后准确称取 5 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,按 7.1.1 步骤进行处理。

7.2 净化

取 5.0 mL 提取液至干净的 15 mL 离心管中,加入 3.0 mL 乙腈饱和过的正己烷,旋涡振荡 3 min,4 ℃下 5 000 r/min 离心 5 min,弃去正己烷层。

将乙腈层转移至鸡心瓶(5.9)中,再加入 5.0 mL 异丙醇,在 40 ℃下旋转蒸发至近干。残渣加入 1.0 mL 样品定容溶液(4.7)溶解,混匀后过滤膜(4.16),供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 5 g(精确至 0.01 g),按 7.1 和 7.2 步骤操作。

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:

- a) 色谱柱:C₁₈ 色谱柱,1.7 μm,50 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:40 ℃;
- c) 进样量:10 μL;
- d) 流动相、流速及梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	5 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 3.0)/%	甲醇/%
0	0.25	95	5
3.0	0.25	85	15
4.0	0.25	10	90
4.1	0.25	95	5
5.5	0.25	95	5

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 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(MRM);
- d) 电喷雾电压:3 000 V;
- e) 碰撞气:氩气;
- f) 辅助气流速:750 L/h;
- g) 辅助气温度:350 ℃;
- h) 离子源温度:105 ℃;
- i) 参考保留时间、定性离子对、定量离子对、碰撞能量及锥孔电压见表 2。

表 2 安乃近代谢物测定的质谱参数

化合物名称	参考保留时间/ min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ eV	锥孔电压/ V
4-甲酰氨基安替比林	2.76	232/104 232/83	232/104	21 21	28 28
4-氨基安替比林	2.95	204/159 204/83	204/159	12 13	30 30
4-甲基氨基安替比林	2.39	218/56 218/97	218/56	15 13	24 24
4-乙酰氨基安替比林	2.79	246/228 246/104	246/228	13 22	32 32
4-异丙氨基安替比林 (内标)	3.28	246/56 246/125	246/56	16 13	30 30

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,样品中待测物质和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与基质混合标准工作溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质混合标准工作溶液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 <i>K</i>	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> <50	10< <i>K</i> <20	<i>K</i> ≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准工作溶液进样,以峰面积或峰面积比值为纵坐标,基质混合工作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。四种安乃近代谢物标准物质和内标物的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。4-甲酰氨基安替比林、4-氨基安替比林和 4-乙酰氨基安替比林采用外标法定量;4-甲基氨基安替比林以 4-异丙基氨基安替比林作为内标,采用内标法进行定量。

本方法对四种安乃近代谢物的添加回收率数据参见附录 B 中的表 B.1 和表 B.2。

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

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

4-甲酰氨基安替比林、4-氨基安替比林和 4-乙酰氨基安替比林结果按式(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(μg/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。

4-甲基氨基安替比林结果按式(2)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

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

c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;

A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;

c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样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

本部分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 ,牛奶和奶粉中 4 种安乃近代谢物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
牛 奶	4-甲酰氨基安替比林	5.0~50	$\lg r=0.981\,4\,\lg m-0.543\,5$	$\lg R=0.903\,1\,\lg m-0.501\,6$
	4-氨基安替比林	5.0~50	$\lg r=1.022\,1\,\lg m-0.636\,5$	$\lg R=0.964\,9\,\lg m-0.525\,2$
	4-甲基氨基安替比林	5.0~50	$\lg r=0.838\,3\,\lg m-0.403\,3$	$\lg R=0.844\,9\,\lg m-0.409\,8$
	4-乙酰氨基安替比林	5.0~50	$\lg r=1.033\,3\,\lg m-0.655\,4$	$\lg R=0.973\,1\,\lg m-0.547\,2$
奶 粉	4-甲酰氨基安替比林	40.0~400	$\lg r=0.890\,7\,\lg m-0.296\,9$	$\lg R=0.993\,1\,\lg m-0.515\,1$
	4-氨基安替比林	40.0~400	$\lg r=1.107\,9\,\lg m-0.876\,4$	$\lg R=1.087\,9\,\lg m-0.773\,0$
	4-甲基氨基安替比林	40.0~400	$\lg r=0.821\,8\,\lg m-0.198\,2$	$\lg R=0.978\,9\,\lg m-0.525\,0$
	4-乙酰氨基安替比林	40.0~400	$\lg r=1.113\,0\,\lg m-0.807\,1$	$\lg R=1.079\,3\,\lg m-0.742\,8$
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 ,牛奶和奶粉中 4 种安乃近代谢物的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

四种安乃近代谢物标准物质及内标物的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

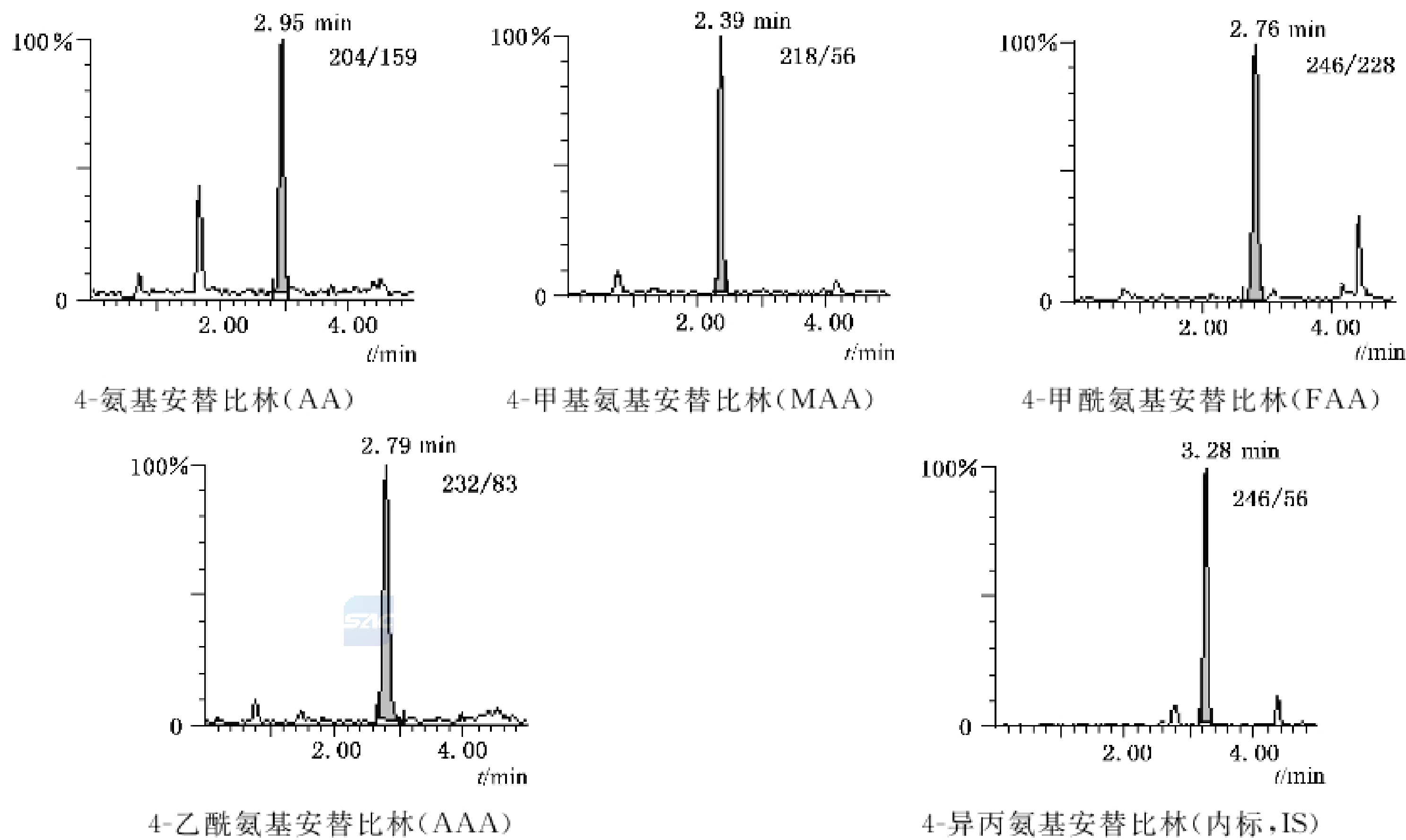


图 A.1 5.0 $\mu\text{g/L}$ 安乃近标准物质及内标物的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法对于牛奶中 4 种安乃近代谢物的添加浓度及其平均回收率试验数据,见表 B. 1。

表 B. 1 牛奶中安乃近代谢物的添加浓度及其平均回收率试验数据

安乃近代谢物名称	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%
4-甲酰氨基安替比林	5.0	97.5
	10.0	92.8
	20.0	96.0
	50.0	91.9
4-氨基安替比林	5.0	96.7
	10.0	88.6
	20.0	83.7
	50.0	85.5
4-甲基氨基安替比林	5.0	80.4
	10.0	84.7
	20.0	84.2
	50.0	85.5
4-乙酰氨基安替比林	5.0	90.2
	10.0	95.1
	20.0	97.9
	50.0	90.1

本方法对于奶粉中 4 种安乃近代谢物的添加浓度及其平均回收率试验数据,见表 B. 2。

表 B. 2 奶粉中安乃近代谢物的添加浓度及其平均回收率试验数据

安乃近代谢物名称	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%
4-甲酰氨基安替比林	40.0	81.2
	80.0	97.5
	160.0	97.9
	400.0	96.6
4-氨基安替比林	40.0	81.5
	80.0	90.8
	160.0	98.8
	400.0	92.7
4-甲基氨基安替比林	40.0	78.4
	80.0	88.1
	160.0	98.4
	400.0	96.1
4-乙酰氨基安替比林	40.0	79.7
	80.0	93.6
	160.0	99.4
	400.0	94.3