



中华人民共和国国家标准

GB/T 22974—2008

牛奶和奶粉中氮氨菲啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of isometamidium 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。

本标准主要起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司。

本标准主要起草人：潘国卿、张春艳、白国涛、刘来俊、郑书展、李红、张伟、常建军、李梅、庞国芳。



牛奶和奶粉中氮氨菲啶残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中氮氨菲啶残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中氮氨菲啶残留量的测定。

本标准方法检出限：牛奶为 0.010 mg/kg，奶粉为 0.080 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 方法原理

试样中的氮氨菲啶用乙腈和甲酸铵甲醇混合溶液提取，提取液经浓缩、脱脂后，用液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量，选择离子定性。

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 甲酸：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 正己烷：色谱纯。

4.5 甲酸铵。

4.6 0.25 mol/L 甲酸铵甲醇溶液：称取 15.76 g 甲酸铵（4.5）溶于 1 000 mL 甲醇（4.1）中。

4.7 80 % 甲醇水溶液：量取 80 mL 甲醇（4.1）加入 20 mL 水中。

4.8 饱和了 80 % 甲醇水的正己烷溶液：在分液漏斗中加入 300 mL 正己烷（4.4），取适量 80 % 甲醇水溶液（4.7）进行振荡、静置分层，弃去下层甲醇水溶液，上层正己烷溶液备用。

4.9 提取液：量取乙腈（4.3）和 0.25 mol/L 甲酸铵甲醇溶液（4.6）按照 1 : 1（体积比）进行混合。

4.10 氮氨菲啶盐酸盐标准品：纯度大于或等于 97 %。

4.11 氮氨菲啶标准储备溶液：准确称取适量氮氨菲啶盐酸盐标准品，用甲醇（4.1）配成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。此溶液在 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。

4.12 氮氨菲啶标准中间液：准确吸取 5 mL 的氮氨菲啶标准储备溶液（4.11）于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（4.1）定容至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的氮氨菲啶标准中间液。该溶液于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱

中避光保存。

4.13 氮氨菲啶基质标准工作溶液：根据需要吸取适量的氮氨菲啶标准中间液(4.12)，用阴性样品提取液稀释配制成浓度范围为 2.5 ng/mL~200 ng/mL 的系列基质标准工作溶液，该溶液应现用现配。

4.14 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 分析天平：感量 0.01 mg 和 0.01 g。

5.3 振荡器。

5.4 超声波清洗器。

5.5 旋转蒸发器。

5.6 旋涡混合器。

5.7 离心机：转速不小于 10 000 r/min。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

6.1.1 牛奶：取有代表性试样约 500 g，搅拌均匀后装入洁净容器内密封并做好标识。

6.1.2 奶粉：取有代表性试样约 500 g，搅拌均匀后装入洁净容器内密封并做好标识。准确称取 12 g 乳粉试样(精确到 0.01 g)于 250 mL 烧杯中，少量多次加入 50 mL 煮沸并冷却到 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右的水溶解，冷却至室温后，移入 100 mL 容量瓶中，用少量水分次淋洗烧杯，淋洗液一并移入容量瓶，再用水定容到刻度，混匀，制备成奶粉复原乳试样。

6.2 试样的保存

将试样于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取与净化

准确称取 5 g 牛奶试样(精确到 0.01 g)或量取 5.00 mL 奶粉复原乳试样(6.1.2)于 50 mL 具塞离心管中，加入 20 mL 提取液(4.9)盖上盖混匀，置于振荡器上以 300 r/min 振荡 10 min，在离心机中以 10 000 r/min 离心 5 min，将上层溶液用滤纸过滤于鸡心瓶，残渣再用 20 mL 提取液(4.9)超声提取 10 min，以 10000 r/min 离心 5 min，将上层溶液用滤纸过滤，合并二次滤液，于低于 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转蒸发至近干(约剩余 2 mL 以下)，剩余液转移至 10 mL 具塞刻度离心管中，用甲醇(4.1)洗涤鸡心瓶，合并溶液并用甲醇(4.1)定容至 5.00 mL，旋涡混匀 1 min，然后加入 5 mL 饱和了 80 % 甲醇水的正己烷溶液(4.8)，旋涡混匀 1 min，以 3 000 r/min 离心 3 min，弃去上层正己烷层，再加入 5 mL 饱和了 80 % 甲醇水的正己烷溶液(4.8)，旋涡混匀 1 min，以 3 000 r/min 离心 3 min，取下层溶液过 0.2 μm 滤膜(4.14)，供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 阴性样品提取液的制备

取不含氮氨菲啶的阴性牛奶或者奶粉样品，按 7.1 步骤制备阴性样品提取液，用于配制氮氨菲啶基质标准工作溶液。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：Acquity UPLCTM BEH C₁₈，1.7 μm ，100 mm $\times$ 2.1 mm (内径)或相当者；

b) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；

- c) 进样量:5 μ L;
- 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/(mL/min)	水(含 0.2 %的甲酸)/%	甲醇/%
0.00	0.3	10	Initial
3.00	0.3	90	6
4.00	0.3	90	6
4.50	0.3	10	6
5.00	0.3	10	1

7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 毛细管电压:1.00 kV;
- e) 锥孔电压:31 V;
- f) 离子源温度:110 $^{\circ}$ C;
- g) 脱溶剂温度:400 $^{\circ}$ C;
- h) 脱溶剂气流量:450 L/h;
- i) 锥孔气流量:50 L/h;
- j) 碰撞室压力:0.415 Pa;
- k) 碰撞气氦气;
- l) 氮氨菲啶定量离子对、定性离子对及碰撞能量见表 2。

表 2 氮氨菲啶定性离子对、定量离子对、碰撞能量及驻留时间

定量离子对(m/z)	定性离子对(m/z)	碰撞能量/eV	驻留时间/s
460.4/298.5	460.4/298.5	23	0.30
	460.4/313.6	21	0.30

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

在相同的实验条件下进行样品测定时,如果样品中待测物质的色谱峰保留时间与标准品色谱峰保留时间相差在 $\pm 2.5\%$ 以内,且样品色谱图中定性离子的相对丰度与浓度相近的基质标准工作溶液色谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,相对偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定样品中存在该种待测物。

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	$K>50$	$20<K\leq 50$	$10<K\leq 20$	$K\leq 10$
允许最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对氮氨菲啶基质标准工作溶液(4.13)进行色谱分析,以峰面积为纵坐标,基质标准工作溶液浓度为横坐标绘制,用标准工作曲线对样品进行定量,基质标准工作溶液和样液中氮氨菲啶的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱和质谱条件下,氮氨菲啶的参考保留时间

为 2.70 min。氮氨菲啶基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

本方法的添加回收数据参见附录 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

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

8 结果计算

样品中氮氨菲啶残留量的测定结果可由仪器工作站软件计算,也可按式(1)计算:

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

式中:

- X——试样中被测组分残留量,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(μg/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);
- F——换算系数,牛奶 F=1,奶粉 F=20 。

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),试样中氮氨菲啶含量范围在 0.010 mg/kg~0.10 mg/kg 之间时,重复性方程:牛奶为 lg r=1.135 5 lg m-0.835 8,奶粉为 lg r=1.097 3 lg m-1.002 7。

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),试样中氮氨菲啶含量范围在 0.010 mg/kg~0.10 mg/kg 之间时,重复性方程:牛奶为 lg R=0.999 5 lg m-0.815 9,奶粉为 lg R=0.895 0 lg m-0.987 8。

注: m 为两次测定结果的算术平均值。



附录 A
(资料性附录)

标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

氮氨菲啶基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

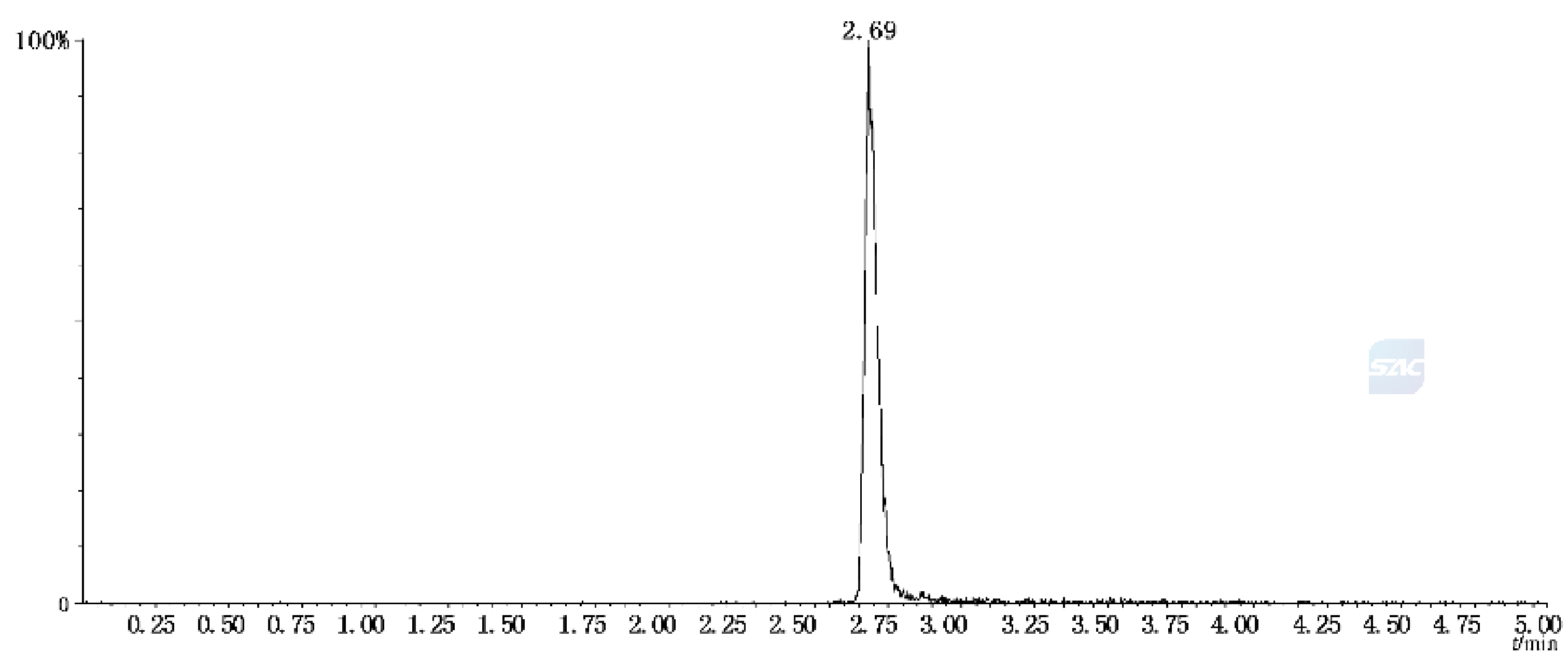


图 A.1 氮氨菲啶基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

氮氨基菲啶添加浓度及平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 氮氨基菲啶添加浓度及平均回收率的试验数据

样品基质	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/%
牛奶	0.01	89.2
	0.02	90.0
	0.10	83.7
奶粉复原乳	0.01	85.6
	0.02	89.8
	0.10	83.2