



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 22977—2008

## 牛奶和奶粉中保泰松残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of phenylbutazone residues  
in bovine 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。

本标准主要起草人：王飞、王海洋、曹彦忠、贾光群、张进杰、石玉秋、庞国芳。

# 牛奶和奶粉中保泰松残留量的测定

## 液相色谱-串联质谱法

### 1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中保泰松残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中保泰松残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛奶 5.0  $\mu\text{g/kg}$ ，奶粉 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

牛奶和奶粉中保泰松的残留用氨水保持碱性条件，用乙醇、乙醚和石油醚去除脂肪，然后在酸性条件下用四氢呋喃-正己烷混合溶液提取保泰松残留，浓缩后定容，供液相色谱-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 甲醇。

4.3 乙醇。

4.4 氨水：化学纯。

4.5 乙醚。

4.6 石油醚。

4.7 四氢呋喃：色谱纯。

4.8 正己烷：色谱纯。

4.9 乙腈：色谱纯。

4.10 乙酸乙酯。

4.11 盐酸。

4.12 甲酸铵。

4.13 二硫苏糖醇（dithiothreitol, CAS:3483-12-3）： $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ，纯度 $\geq 99\%$ 。

4.14 N,N-二甲基甲酰胺（N,N-Dimethylformamide, CAS:68-12-2）： $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ ，含量 99.5%。

4.15 四氢呋喃-正己烷混合溶液:(1+4)。200 mL 四氢呋喃(4.7)与 800 mL 正己烷(4.8)混合。

4.16 3.0 mol/L 盐酸:吸取 25.8 mL 的盐酸(4.11)于 100 mL 容量瓶中,用水定容至 100 mL。

4.17 0.01 mol/L 甲酸铵溶液:0.63 g 甲酸铵(4.12)于 1 000 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,过 0.2  $\mu\text{m}$  的水性滤膜。

4.18 稳定剂:0.25 mg/mL。称取 0.125 g 二硫苏糖醇(4.13),用乙酸乙酯(4.10)溶解并定容至 500 mL 容量瓶中。

4.19 标准物质:保泰松(CAS:50-33-9),纯度 $\geq 95\%$ 。

4.20 保泰松标准储备溶液:100.0  $\mu\text{g/mL}$ 。准确称取 10.0 mg 保泰松标准物质(4.19)于 100 mL 容量瓶中,用约 80 mL 甲醇(4.2)溶解,加入 5.0 mL 稳定剂(4.18),用甲醇(4.2)定容至刻度,混匀。4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

4.21 中间浓度标准溶液:1.0  $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 10.0  $\mu\text{L}$  保泰松标准储备溶液(4.20)于 10 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度。4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

4.22 基质标准工作溶液:分别吸取 5.0  $\mu\text{L}$ 、10.0  $\mu\text{L}$ 、50.0  $\mu\text{L}$ 、200.0  $\mu\text{L}$  中间浓度保泰松标准溶液(4.21),加入 20  $\mu\text{L}$  N,N-甲基甲酰胺(4.18),用基质空白溶液定容至 1.0 mL,配成 5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、200.0 ng/mL 浓度系列标准工作溶液。在 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,可使用一周。

4.23 滤膜:0.2  $\mu\text{m}$ 。

## 5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 天平:感量 0.01 g,0.000 1 g。

5.3 旋涡混合器。

5.4 氮气浓缩仪。

5.5 具塞聚丙烯离心管:10 mL。

5.6 离心机:可提供 2 600 g 离心力下(相当于 4 200 r/min)。

5.7 超声波清洗仪。

5.8 振荡器。

## 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-18  $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 试样提取

#### 7.1.1 牛奶

称取 1 g 试样,精确至 0.01 g,置于 10 mL 离心管中,加入 1.0 mL 乙醇(4.3),混匀;加入 0.1 mL 氨水(4.4),混匀;加入 2.5 mL 乙醚(4.5),于旋涡混合器混匀 20 s,静置 5 min;加入 2.5 mL 石油醚(4.6),于旋涡混合器混匀 20 s,静置 5 min;小心吸弃上清液后,依次加入 5 mL 四氢呋喃-正己烷混合溶液(4.15)和 0.4 mL 3.0 mol/L 盐酸(4.16),于振荡器上剧烈振荡 30 min;在 4 200 r/min 离心力下离心 10 min。小心吸取上清液于另一 10 mL 离心管中,用氮气浓缩仪于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中吹至近干。

准确加入 20  $\mu\text{L}$  N,N-二甲基甲酰胺(4.14)和 980  $\mu\text{L}$  0.01 mol/L 甲酸铵溶液(4.17),于超声波仪

中助溶,残渣溶解后,过 0.2 μm 滤膜(4.23),供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.1.2 奶粉

按照 1 g 奶粉加水 8 mL 的比例,将奶粉溶解为还原奶后,按照 7.1.1 的提取步骤进行。

7.2 空白样品提取液的制备

用阴性样品,按 7.1 操作步骤,制备用于配制系列基质标准工作溶液的空白样品提取液。

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: Intersil C<sub>18</sub>, 3 μm, 150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 进样量: 30 μL;
- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 40 ℃;
- e) 流动相 A: 0.01 mol/L 甲酸铵溶液;
- f) 流动相 B: 乙腈;
- g) 洗脱条件: 恒配比 A : B 为 63% : 37%; 流速: 0.20 mL/min; 时间: 10.0 min。

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;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应检测;
- d) 电喷雾电压: 500 V;
- e) 雾化气压力: 0.069 MPa;
- f) 辅助气流速: 0.414 L/min;
- g) 离子源温度: 500 ℃;
- h) 碰撞室出口电压: 32 V;
- i) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压: 见表 1。

表 1 保泰松的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

| 化合物中文名称 | 化合物英文名称        | 定性离子对( <i>m/z</i> ) | 定量离子对( <i>m/z</i> ) | 碰撞气能量/V | 去簇电压/V |
|---------|----------------|---------------------|---------------------|---------|--------|
| 保泰松     | phenylbutazone | 309/160             | 309/160             | 31      | 31     |
|         |                | 309/146             |                     | 30      | 31     |

7.4 液相色谱-串联质谱测定

7.4.1 定性测定

被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同的试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差±2.5%之内;且待测样品溶液中,被测物中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准工作溶液中被测物的各定性离子相对丰度的比值 *K*,偏差不得超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

| 相对离子丰度的比值 <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          |

7.4.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,以基质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。用基质标准工作溶液的工作曲线对样品中的保泰松进行定量,样品溶液中保泰松的响应值在仪器测定的线性范围内。

在上述色谱参考条件和质谱参考条件下,保泰松的参考保留时间 5.46 min,保泰松的标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

本方法的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

7.5 平行试验

按试样步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

不称取样品,其余均按试样步骤进行。

8 结果计算

试样中保泰松残留量的计算按式(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,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度;单位为微克每毫升(μg/mL);
- V——试样溶液定容体积,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

在重复性实验的条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r),保泰松的添加浓度范围及重复性方程见表 3。

表 3 添加浓度范围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                     | 添加浓度范围    | 重复性限 <i>r</i>                             | 再现性限 <i>R</i>                             |
|---------------------------|-----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 保泰松                       | 5.0~200.0 | lg <i>r</i> =1.036 7 lg <i>m</i> −1.032 5 | lg <i>R</i> =0.836 1 lg <i>m</i> −0.427 6 |
| 注: <i>m</i> 为两次测定值的算术平均值。 |           |                                           |                                           |

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

在再现性实验的条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限(*R*),保泰松的添加浓度范围及再现性方程见表 3。



## 附录 A

(资料性附录)

## 标准物质多反应监测(MRM)色谱图

保泰松标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

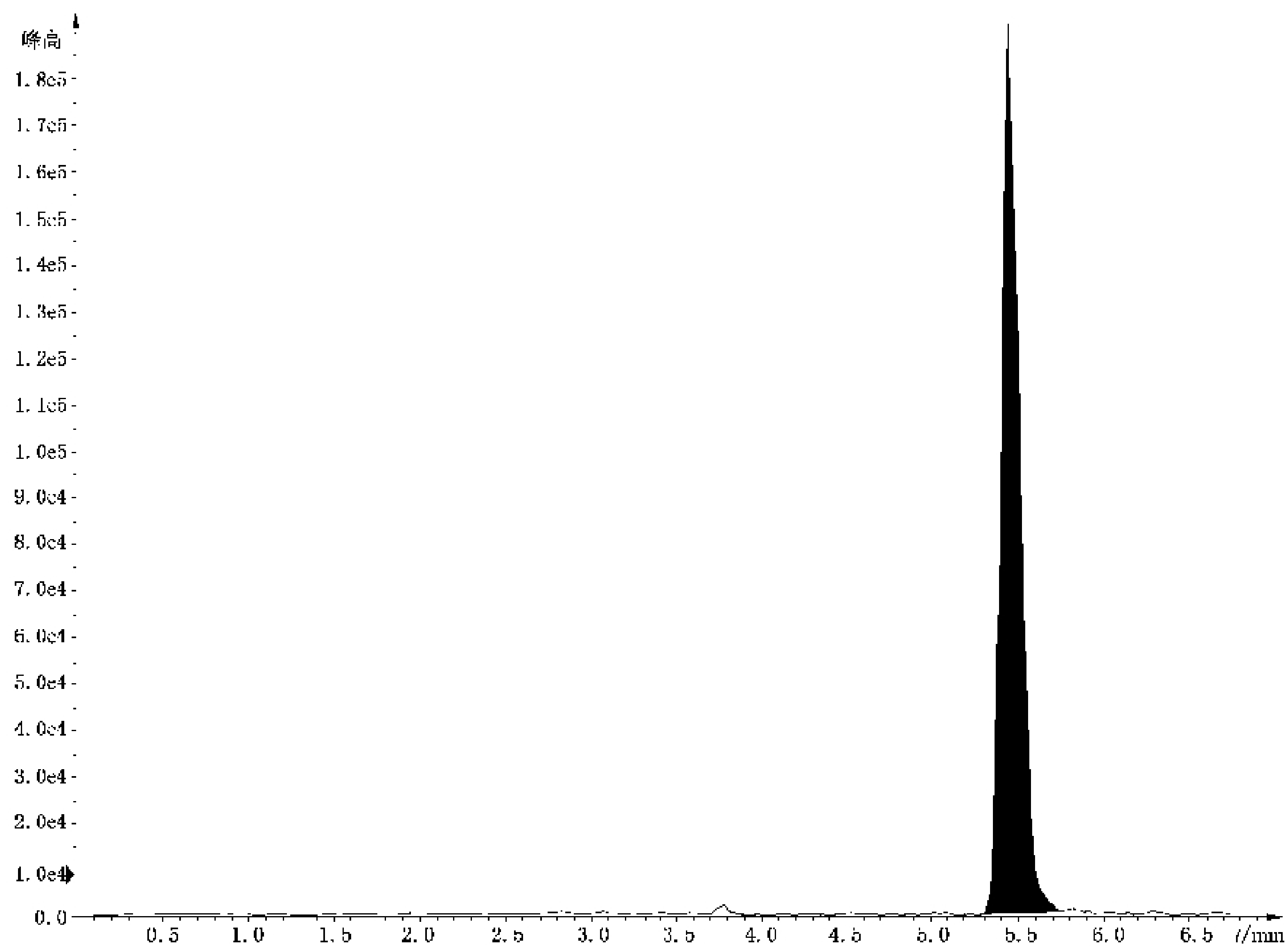


图 A.1 保泰松标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B  
(资料性附录)  
回 收 率

本方法中保泰松添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 保泰松添加浓度及其平均回收率的试验数据

| 样品基质   | 添加浓度/(μg/kg) | 平均回收率/% |
|--------|--------------|---------|
| 牛奶     | 5.0          | 86.0    |
|        | 10.0         | 89.3    |
|        | 50.0         | 86.3    |
|        | 200.0        | 89.3    |
| 全脂奶粉   | 5.0          | 93.5    |
|        | 10.0         | 91.9    |
|        | 50.0         | 92.5    |
|        | 200.0        | 92.6    |
| 脱脂奶粉   | 5.0          | 92.6    |
|        | 10.0         | 96.1    |
|        | 50.0         | 92.9    |
|        | 200.0        | 96.1    |
| 全脂加糖奶粉 | 5.0          | 90.4    |
|        | 10.0         | 88.1    |
|        | 50.0         | 88.9    |
|        | 200.0        | 88.8    |