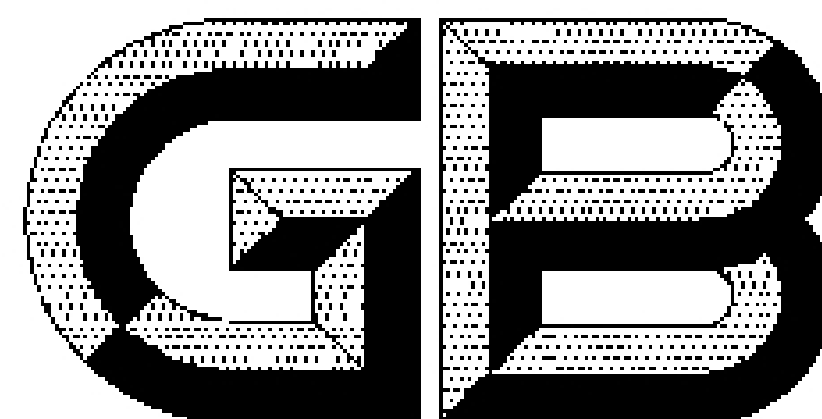




中华人民共和国国家标准

GB/T 22986—2008

牛奶和奶粉中氢化泼尼松残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of prednisolone 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、白国涛、张春艳、刘来俊、郑书展、李红、张伟、李梅、常建军、庞国芳。

牛奶和奶粉中氢化泼尼松残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中氢化泼尼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氢化泼尼松残留量的测定。

本标准方法检出限：牛奶为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ ，奶粉为 $4.0 \mu\text{g/kg}$ 。

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 方法原理

试样中的氢化泼尼松用甲醇-乙酸缓冲溶液提取，正己烷除脂，固相萃取柱净化，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 正己烷：色谱纯。

4.4 冰乙酸。

4.5 三水乙酸钠。

4.6 0.2 mol/L 乙酸溶液：吸取 5.72 mL 冰乙酸（4.4）至 500 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。

4.7 0.2 mol/L 乙酸钠溶液：称取 27.22 g 三水乙酸钠（4.5），用水溶解后转移至 1000 mL 容量瓶中，水定容至刻度。

4.8 乙酸-乙酸钠缓冲溶液（ $\text{pH}=5.2$ ）：量取 21 mL 乙酸溶液（4.6）与 79 mL 乙酸钠溶液（4.7）混合，调节溶液的 $\text{pH}=5.2$ 。

4.9 30% 甲醇水溶液：量取 30 mL 甲醇（4.1），用水稀释定容至 100 mL 。

4.10 甲醇饱和正己烷：量取甲醇（4.1） 10 mL 置于分液漏斗中，加正己烷（4.3） 90 mL ，振荡混合 1 min ，静置分层后，取上层液备用。

4.11 氢化泼尼松标准品：纯度大于 99% 。

4.12 氢化泼尼松标准储备溶液：准确称取氢化泼尼松标准品，用甲醇（4.1）配成 0.10 mg/mL 的标准

储备溶液,于-18℃避光储存。

4.13 氢化泼尼松标准工作溶液:根据需要吸取适量的氢化泼尼松标准储备溶液(4.12),用甲醇(4.1)逐级稀释成适当浓度的标准工作溶液,于-18℃避光储存。

4.14 氢化泼尼松基质标准工作溶液:根据需要吸取适量的氢化泼尼松标准工作溶液(4.13),用阴性样品提取液稀释配制成浓度范围为0.50 ng/mL~100 ng/mL的系列基质标准工作溶液,该溶液应现用现配。

4.15 固相萃取柱:Oasis HLB柱或性能相当者,500 mg、6 mL。使用前用5 mL甲醇(4.1)和5 mL水进行活化。

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 分析天平:感量0.01 mg和0.01 g。

5.3 固相萃取真空装置。

5.4 均质器。

5.5 旋转蒸发器。

5.6 离心机。

5.7 微量注射器:50 μL。

5.8 氮气吹干仪。

5.9 旋涡混合器。

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℃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℃保存。

7 测定步骤

7.1 提取

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离心管中,依次加入10 mL乙酸缓冲溶液(4.8)、15 mL甲醇(4.1)和10 mL甲醇饱和正己烷(4.10),用均质器以15 000 r/min提取1 min,并用约2 mL甲醇(4.1)淋洗均质器,用离心机在4℃以10 000 r/min离心10 min,弃去上层正己烷层,清液转入鸡心瓶中,在40℃下旋转蒸发至体积小于10 mL,待净化。

7.2 净化

将上述浓缩液以小于等于3 mL/min的速度通过预先活化好的固相萃取柱(4.15),依次用5 mL水、3 mL 30%的甲醇水溶液(4.9)和5 mL正己烷(4.3)淋洗固相萃取柱,弃去全部淋洗液。减压抽干1 min,然后用6 mL甲醇(4.1)洗脱。洗脱液在低于40℃氮气吹干至体积小于2 mL,用甲醇(4.1)定容至2.00 mL,混匀后,过0.2 μm有机相滤膜(4.16),供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 阴性样品提取液的制备

取不含氢化泼尼松的阴性牛奶或者奶粉样品,按 7.1 和 7.2 步骤制备阴性样品提取液,用于配制氢化泼尼松基质标准工作溶液。

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:Acquity UPLC™ BEH C₁₈¹⁾,1.7 μm,100 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:35 ℃;
- c) 进样量:5 μL;
- 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 0.1%的甲酸)/%	甲醇/%
0.00	0.3	90	10
3.00	0.3	10	90
5.00	0.3	10	90
6.00	0.3	90	10
8.00	0.3	90	10

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(ESI);
- b) 扫描方式:负离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 锥孔电压:23 V;
- e) 毛细管电压:3.00 kV;
- f) 离子源温度:110 ℃;
- g) 脱溶剂气温度:400 ℃;
- h) 脱溶剂气流:400 L/h;
- i) 锥孔气流量:50 L/h;
- j) 碰撞气压力:0.36 Pa;
- k) 碰撞气:氩气;
- l) 氢化泼尼松定性离子对、定量离子对、碰撞能量及驻留时间见表 2。

表 2 氢化泼尼松定量离子对、定性离子对、碰撞能量及驻留时间

定量离子对(<i>m/z</i>)	定性离子对(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV	驻留时间/s
405.4/329.5	405.4/329.5	23	0.05
	405.4/359.6	15	0.05

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 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

1) Acquity UPLC™ BEH C₁₈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。



留时间相差在±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	$K>50$	$20<K<50$	$10<K<20$	$K\leq 10$
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,对氢化泼尼松基质标准工作溶液(4.14)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标准工作曲线,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氢化泼尼松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,氢化泼尼松的参考保留时间为3.55 min,基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图参见附录A中图A.1。氢化泼尼松添加浓度及平均回收率参见附录B中的表B.1。

7.5 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

8 结果计算

样品中氢化泼尼松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,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c ——从标准工作曲线上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),试样中氢化泼尼松含量范围在 $0.50\ \mu\text{g/kg}\sim 10\ \mu\text{g/kg}$ 之间时,重复性方程:牛奶为 $\lg r=0.714\ 8\ \lg m-0.653\ 9$,奶粉为 $\lg r=0.700\ 2\ \lg m-0.578\ 7$ 。

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实验的测定。

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),试样中氢化泼尼松含量范围在 $0.50\ \mu\text{g/kg}\sim 10\ \mu\text{g/kg}$ 之间时,重复性方程为:牛奶为 $\lg R=0.610\ 7\ \lg m-0.591\ 7$,奶粉为 $\lg R=0.670\ 2\ \lg m-0.603\ 8$ 。

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

附录 A
(资料性附录)

基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

氢化泼尼松基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

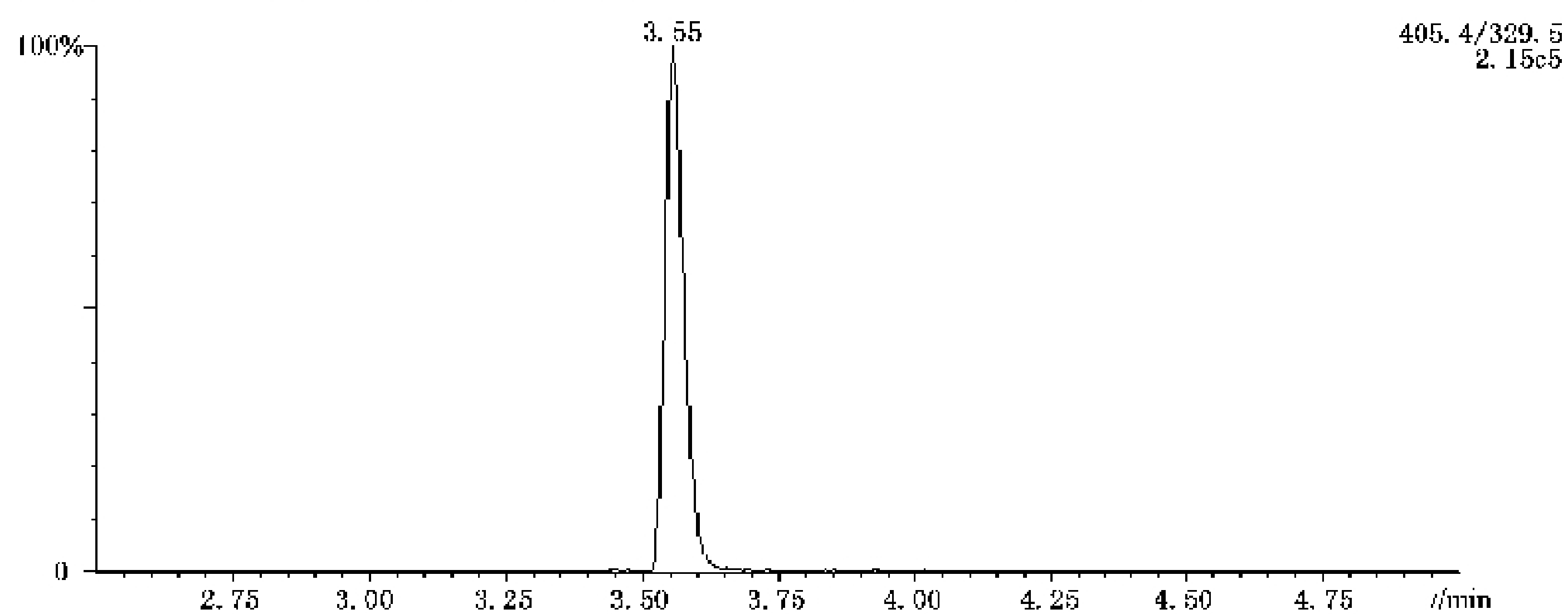


图 A.1 氢化泼尼松基质标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

氢化泼尼松添加浓度及平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 氢化泼尼松添加浓度及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	0.5	81.7
	1.0	90.1
	10	93.8
奶粉复原乳	0.5	81.4
	1.0	88.0
	10	94.2