



中华人民共和国国家标准

GB/T 22991—2008

牛奶和奶粉中维吉尼霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of virginiamycin residue 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 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，中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：宋文斌、李一尘、董振霖、隋凯、赵景红、薛大芳、张华一、李振荣、庞国芳。



牛奶和奶粉中维吉尼霉素残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了原料乳和纯奶粉中维吉尼霉素 M1 (virginiamycin M1) 残留量测定的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于原料乳和纯奶粉中维吉尼霉素 M1 残留量的测定。

本标准的方法检出限:原料乳中维吉尼霉素 M1 为 $0.25 \mu\text{g/L}$,纯奶粉中维吉尼霉素 M1 为 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 。

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。凡是不注明日期的引用文件,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

试样中残留的维吉尼霉素 M1 在甲醇+乙腈混合提取液中涡旋提取、离心、取上清液用磷酸二氢铵缓冲溶液稀释,于 C_{18} 固相萃取柱进行净化。将洗脱液中的维吉尼霉素 M1 用三氯甲烷分离萃取,去除水层。氮吹三氯甲烷至干,用甲酸铵缓冲溶液与甲醇混合液溶解并定容,供液相色谱-串联质谱仪测定。

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 乙酸。

4.2 甲酸:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 乙腈:色谱纯。

4.5 三氯甲烷:色谱纯。

4.6 磷酸二氢铵:优级纯。

4.7 甲酸铵:优级纯。

4.8 磷酸二氢铵溶液: 0.1 mol/L ,称取 11.50 g 磷酸二氢铵(4.6),用水溶解定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。

4.9 磷酸二氢铵溶液: 0.01 mol/L ,量取 0.1 mol/L 磷酸二氢铵溶液(4.8) 100 mL ,用水稀释定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。

4.10 甲酸铵缓冲液: 0.12 mol/L , $\text{pH}=3.2$,称取 7.56 g 甲酸铵(4.7),用水溶解,用甲酸(4.2)调节 pH 到 3.2 ,定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。

4.11 甲酸铵缓冲液: 0.003 mol/L , $\text{pH}=3.2$,量取 25.0 mL 的甲酸铵缓冲液(4.10),用水稀释定容至

1 000 mL。

4.12 甲醇+乙腈溶液(1+1)。

4.13 水+乙腈溶液(4+1)。

4.14 水+甲醇溶液(13+7)。

4.15 水+甲醇溶液(9+11)。

4.16 流动相 A:0.003 mol/L 甲酸铵缓冲液(4.11)用 0.2 μm 滤膜过滤。

流动相 B:甲醇+乙腈溶液(1+1)(4.12)用 0.2 μm 滤膜过滤。

4.17 标准物质:维吉尼霉素 M1(CAS:21411-53-0),纯度 95%。

4.18 标准储备溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的维吉尼霉素 M1 标准物质,用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备溶液。该溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

注:称取标准物的质量是按纯度修正过的质量。

4.19 标准工作溶液:根据维吉尼霉素 M1 的灵敏度和仪器线性范围,用空白样品提取液配成不同浓度的标准工作溶液。标准工作溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

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 离心机:最大转速为 10 000 r/min。

5.3 离心管:锥形底玻璃离心管 40 mL、15 mL 和 10 mL,具塞;锥形底聚丙烯离心管 50 mL 具螺旋盖。

5.4 电子天平:感量 0.1 mg 和 0.1 g。

5.5 过滤器:聚四氟乙烯膜过滤器:0.22 μm ×13 mm;尼龙膜过滤器:0.22 μm ×47 mm。

5.6 移液器:量程为 1 mL~10 mL 和 5 mL~50 mL。

5.7 微量加液器:量程为 10 μL ~100 μL ,100 μL ~1 000 μL 。

5.8 流动相过滤装置。

5.9 氮气浓缩仪。

5.10 高速涡流混合器。

5.11 振荡器。

5.12 酸度计:精确度为 ± 0.02 。

5.13 超声波仪。

5.14 一次性注射器:1 mL。

5.15 固相萃取柱:Bond Elut C₁₈,500 mg,柱长为 6 mL。

5.16 鸡心瓶:150 mL。

5.17 贮液器:100 mL。

5.18 试样瓶:2 mL。

5.19 一次性移液管。

5.20 滤纸。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将原料乳和纯奶粉样品分别混合均匀。各自分出 0.5 kg 作为试样,将分出的试样密封,并作上标记。

6.2 试样保存

将试样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 原料乳样品

称取原料乳 5.00 mL,精确到 0.01 mL,放入 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 的甲醇+乙腈溶液(1+1)涡旋 1 min,高速振荡 10 min,离心 15 min(5 000 r/min),将上清液转移至 40 mL 离心管中。再向残渣中加入 2 mL 甲醇+乙腈溶液(1+1)涡旋 5 s,高速振荡 5 min,在 5 000 r/min 下离心 10 min。合并两次上清液与 40 mL 离心管中。加入 15 mL 的 0.01 mol/L 磷酸二氢铵溶液(4.9),高速振荡 5 min,以 5 000 r/min 离心 10 min,用滤纸过滤至 150 mL 的鸡心瓶中,加入 80 mL 磷酸二氢铵缓冲液(4.9)混匀待净化。

7.1.2 纯奶粉样品

称取纯奶粉 0.625 g,精确到 0.001 g,放入 50 mL 聚丙烯离心管中加水 4.375 g,超声溶解得到复原乳。加入 10 mL 的甲醇+乙腈溶液(1+1)涡旋 1 min,以下步骤同原料乳样品。

7.2 净化

依次用 5 mL 乙腈、5 mL 水和 5 mL 的磷酸二氢铵(4.9)洗涤活化固相萃取柱(5.15)。在柱上装上贮液器(5.17),将样液(7.1)过柱,移去贮液器(5.17)。依次用 2 mL 水,10 mL 水+乙腈溶液(4+1),2 mL 水和 10 mL 水+甲醇溶液(13+7)洗柱,弃去全部流出液。最后用 5 mL 水+甲醇溶液(9+11)洗涤维吉尼霉素 M1,收集洗脱液到 15 mL 的玻璃离心管中。将 10 mL 三氯甲烷(4.5)加入洗脱液中,振荡 5 min,离心 10 min(5 000 r/min)。用一次性移液管定量收集三氯甲烷层到 10 mL 离心管中,在 40 ℃条件下氮吹至干。再向离心管中加入 500 μL 甲醇,超声 5 min,加入 500 μL 甲酸铵缓冲液(4.11),高速涡旋 5 s。样液用 0.2 μm 的滤膜过滤到样品瓶中,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:SunFire C₁₈, 5 μm, 150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:40 ℃;
- c) 进样量:30 μL;
- d) 色谱柱总流量:300 μL/min;
- e) 流动相及梯度见表 1。

表 1 流动相及梯度

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	93	7
20.00	40	60
26.00	40	60
28.00	93	7
35.00	93	7

7.3.2 质谱条件

质谱条件如下:

- 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(IS):5 000 V;
- e) 雾化气压力(CAS1):517.1 kPa;

- f) 气帘气压力(CUR):103.4 kPa;
- g) 辅助气压力(CAS2):620.5 kPa;
- h) 离子源温度(TEM):700 ℃;
- i) 定性离子对、定量离子对,采集时间(Dwell),去簇电压(DP)、碰撞气能量(CE)、入口电压(EP),及碰撞室出口电压(CXP)见表 2。

表 2 维吉尼霉素 M1 的质谱参数

定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	采集时间/ms	去簇电压/V	碰撞气能量/V	入口电压/V	出口电压/V
526.3/336.9	526.3/336.9	200	80	20	11	15
526.3/355.1						
526.3/508.4						

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

按照液相色谱-串联质谱测定条件进行样品溶液测定。如果检出的色谱峰的保留时间与基质标准中物质相一致,并且所选择的离子均出现,选择 1 个母离子和 2 个以上子离子,样品谱图中组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质标准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不得超过表 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

7.3.3.2 定量测定

用标准工作溶液(4.19)分别进样,以峰面积为纵坐标,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,样品溶液中维吉尼霉素 M1 的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述的色谱条件和质谱条件下,维吉尼霉素 M1 的参考保留时间为 24.28 min。维吉尼霉素 M1 的标准总离子流图参见附录 A。维吉尼霉素 M1 的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B。

7.4 平行试验

按照以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

空白样品中添加标准溶液按 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

试样中维吉尼霉素 M1 残留量利用数据处理系统计算或按式(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*——从标准曲线上得到被测组分溶液的浓度,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)。

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 ,原料乳和纯奶粉中维吉尼霉素 M1 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

样品基质	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
原料乳	0.25~2.00	$\lg r=0.894 \lg m-0.666$	$\lg R=2.268 \lg m+0.273$
纯奶粉	2.0~8.0	$\lg r=0.532 \lg m+0.111$	$\lg R=0.685 \lg m+0.086$
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。

9.2 再现性

在线性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,原料乳和纯奶粉中维吉尼霉素 M1 的添加浓度范围及再现性方程见表 4。



附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图

维吉尼霉素 M1 标准物质总离子流图,见图 A.1。

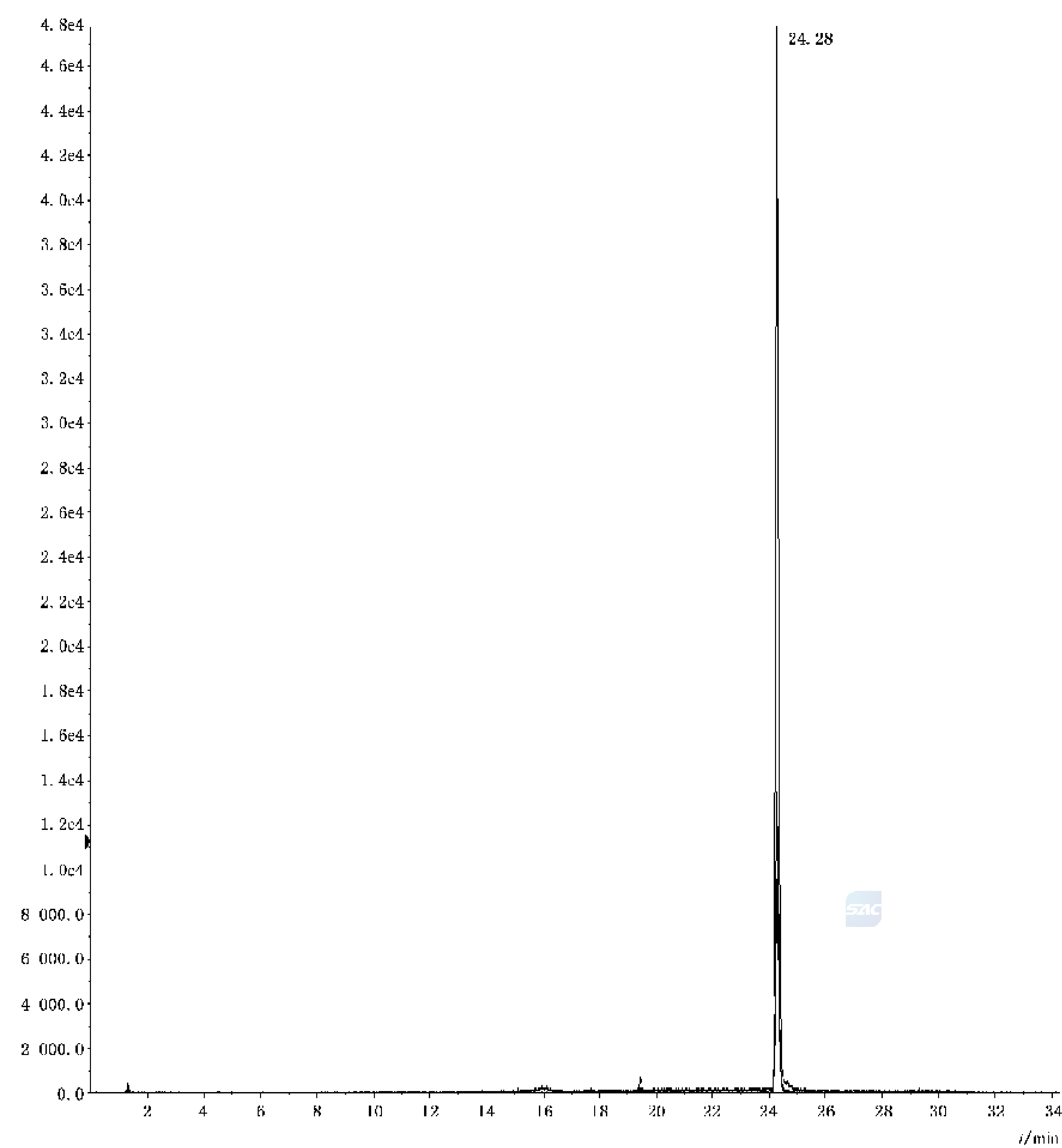


图 A.1 维吉尼霉素 M1 标准物质总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

维吉尼霉素 M1 添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B. 1。

表 B. 1 维吉尼霉素 M1 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/%
原料乳	0.25	87.95
	0.50	88.44
	1.00	92.92
	2.00	93.64
纯奶粉	2.0	89.41
	4.0	91.15
	6.0	95.75
	8.0	99.87