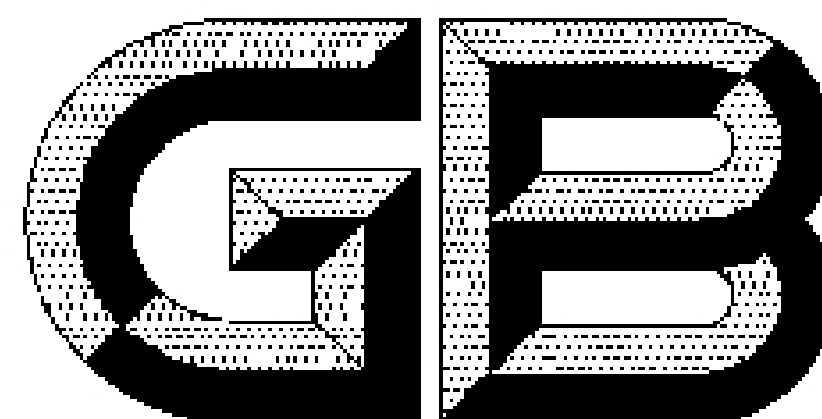




中华人民共和国国家标准

GB/T 22994—2008

牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of levamisole 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、中华人民共和国青海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：薄海波、雒丽丽、贾光群、曹彦忠、赵青、庞国芳。



牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于液态奶(包括原料奶、纯牛奶、脱脂牛奶)和奶粉(包括纯奶粉、脱脂奶粉和婴幼儿配方奶粉)中左旋咪唑(levamisole)残留量的测定。

本标准牛奶中左旋咪唑检出限为 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$;奶粉中左旋咪唑检出限为 $3.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

在碱性环境下用乙酸乙酯提取试样中的左旋咪唑残留,用稀盐酸将提取液中左旋咪唑转化为盐酸左旋咪唑并反提到盐酸层,强阳离子交换固相萃取柱净化,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 乙酸乙酯:色谱纯。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 甲醇:色谱纯。

4.5 氢氧化钠。

4.6 浓盐酸。

4.7 氨水。

4.8 氯化钠。

4.9 无水硫酸钠:用前在 $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灼烧 4 h,置于干燥器中冷却后备用。

4.10 甲酸:优级纯。

4.11 0.1%甲酸溶液:取 1 mL 甲酸,用水定容至 1 000 mL。当天配制。

4.12 0.2 mol/L 盐酸溶液:取 18 mL 盐酸(4.6),用水定容至 1 000 mL。

4.13 10 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 40 g 氢氧化钠(4.5),用水溶解并定容至 100 mL。

4.14 氨水-甲醇溶液(1+3):量取 50 mL 氨水(4.7)与 150 mL 甲醇(4.4)混合,摇匀。

- 4.15 盐酸左旋咪唑标准品(levamisole hydrochloride, CAS:16595-80-5):纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.16 标准储备溶液:准确称取适量的标准品,用甲醇(4.4)溶解、转移至 50 mL 棕色容量瓶中并定容至刻度。该溶液浓度为 1 mg/mL。储备液贮存在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中,有效期为半年。
- 4.17 标准中间溶液:吸取 1.00 mL 标准储备溶液(4.16),移入 100 mL 棕色容量瓶,用水定容,该溶液浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。
- 4.18 标准工作溶液:根据需要吸取适量标准中间溶液(4.17),用流动相稀释至所需浓度,使用前配制。
- 4.19 强阳离子交换固相萃取柱或相当者:3 mL,500 mg。使用前依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 和 0.2 mol/mL 盐酸 1 mL 活化,保持柱体湿润。
- 4.20 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱联用仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 固相萃取净化装置。
- 5.3 分析天平:感量 0.1 mg,0.01 g。
- 5.4 旋涡混匀器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 离心机:带有 50 mL 螺口聚丙烯离心管。
- 5.7 移液器:1 mL,2 mL。
- 5.8 氮气吹干仪。
- 5.9 样品瓶:2 mL。

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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶样品

称取 10 g 混匀的试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mol/mL 氢氧化钠 0.1 mL、氯化钠(4.8)约 5 g 和乙酸乙酯(4.2)20 mL,涡旋混匀 1 min,振荡 10 min,以 4 000 r/min 离心 10 min。取上层乙酸乙酯 10 mL 于另一个 50 mL 聚丙烯离心管中,加 0.2 mol/L 盐酸 20 mL,振荡 10 min,以 2 000 r/min 离心 5 min。取下层盐酸溶液 10 mL,待净化。

7.1.2 奶粉样品

称取 12.5 g 奶粉于烧杯中,加适量 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水将其溶解,待冷却至室温后,用水定容至 100 mL,充分混匀。量取 10 mL 溶液于 50 mL 聚丙烯离心管中,按 7.1.1 步骤提取。

7.2 净化

将 7.1 所得的提取液 10 mL 加载到 SCX 小柱,依次用水 3 mL、0.2 mol/L 盐酸 1 mL 和甲醇 3 mL 淋洗,用氨水-甲醇溶液(4.14)4.0 mL 洗脱。用氮气吹干仪将洗脱液吹干,用流动相定容至 1 mL,过 0.2 μm 滤膜。供液相色谱-串联质谱测定。

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:BEH C₁₈,1.7 μm,50 mm×2.1 mm(内径)或相当者；
- b) 流动相:乙腈-0.1%甲酸溶液(3+17)；
- c) 流速 0.25 mL/min；
- d) 柱温:35 ℃；
- e) 进样量:5.0 μL。

7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离模式:ESI+；
- b) 检测方式:多反应监测(MRM)；
- c) 毛细管电压:2.5 kV；
- d) 离子源温度:110 ℃；
- e) 去溶剂气温度:380 ℃；
- f) 去溶剂气(氮气)流量:600 L/h；
- g) 锥孔气(氮气)流量(N₂):40 L/h；
- h) 碰撞气(氩气)流量:0.1 L/h；
- i) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量等参数见表 1。

表 1 定量离子对、定性离子对和碰撞能量等参数

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>)	碰撞能量/ V	驻留时间/ ms	锥孔电压/ V
左旋咪唑	levamisole	205/92	205/92	38	300	40
		205/179		20	300	40

7.4 测定

7.4.1 定性测定

样品溶液按照液相色谱-串联质谱分析条件进行测定时,如果检出的色谱峰保留时间与标准溶液中左旋咪唑的保留时间偏差在±2.5%之内,在扣除背景后的样品质谱图中,所选择的两对定性对均出现,而且离子对丰度比与浓度接近的标准溶液谱图中离子相对丰度比偏差不得超过规定的范围(见表 2),则可以判断样品中存在左旋咪唑。

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 <i>K</i>	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> <50	10< <i>K</i> <20	<i>K</i> ≤10
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.2 定量测定

用混合标准工作溶液(4.18)进样,以工作溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。待测样液等体积进样测定。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中左旋咪唑的响应值应在检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱分析条件下,左旋咪唑的参考保留时间约为 1.2 min。左旋咪唑标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中图 A.1。左旋咪唑的添加浓度和回收率实验数据参见附录 B 中的表 B.1。

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

除不称取试样外,均按上述步骤进行测定。

8 结果计算

左旋咪唑残留量的测定按式(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)。

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 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,试样中左旋咪唑添加浓度范围及重复性方程见表 3。

表 3 左旋咪唑含量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
左旋咪唑	0.4~20	$\lg r=1.133\ 9\ \lg m-0.568\ 0$	$\lg R=1.579\ 1\ \lg m-0.888\ 2$
	3.2~160		
注： m 为两次测定结果的平均值。			

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,试样中左旋咪唑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

左旋咪唑标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

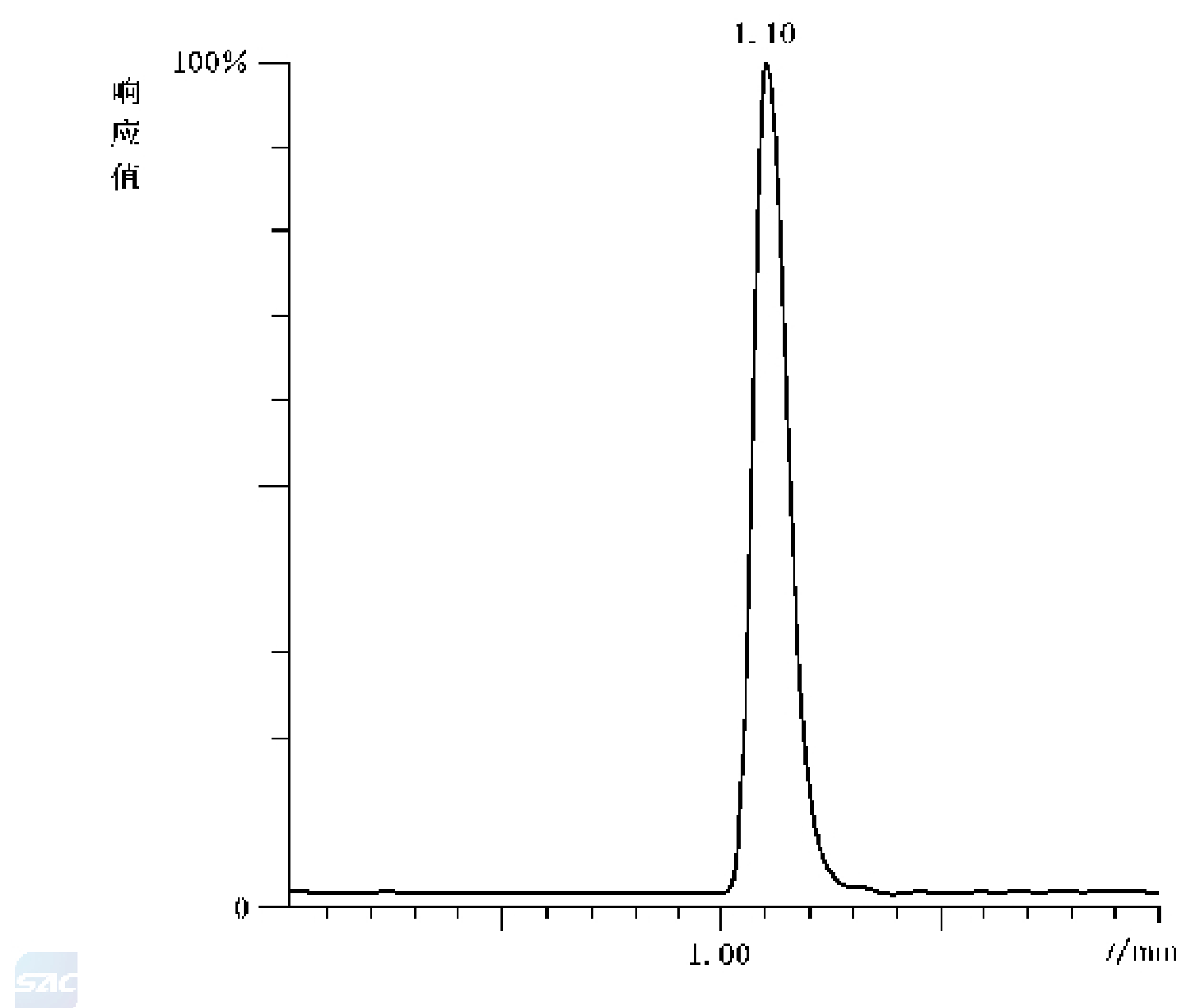


图 A.1 左旋咪唑标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

左旋咪唑的添加浓度和平均回收率试验数据,见表 B.1。

表 B.1 左旋咪唑的添加浓度和平均回收率试验数据

样品基质	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%
牛奶	2.0	78.2
	10	80.5
	20	86.0
	100	89.1
奶粉	5.0	87.3
	10	83.5
	20	88.5
	100	93.4

