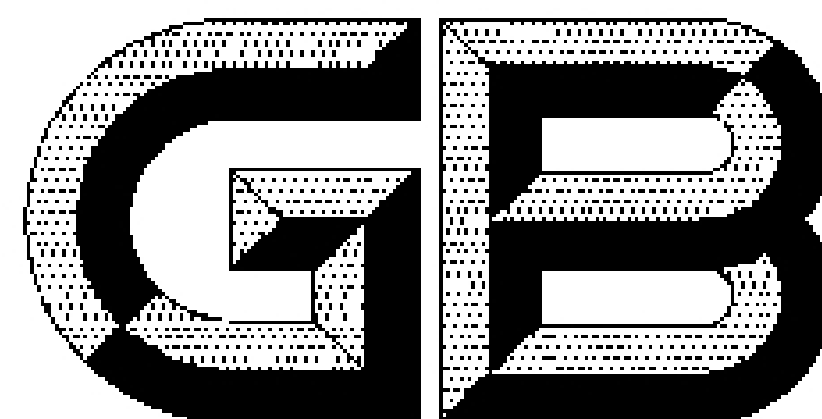




中华人民共和国国家标准

GB/T 22981—2008

牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of bacitracin 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、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：段文仲、马育松、郭春海、王凤池、葛娜、艾连峰、窦彩云、吕红英、庞国芳。

牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的测定和确证。

本标准的方法检出限：牛奶 50.0 $\mu\text{g/kg}$ ；奶粉 250 $\mu\text{g/kg}$ 。

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

试样中的杆菌肽残留用乙腈-甲醇提取试样中的杆菌肽残留，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，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 甲酸：色谱纯。

4.4 乙腈-甲醇(2+1)：量取 200 mL 乙腈(4.2)与 100 mL 甲醇(4.1)混合。

4.5 0.1%甲酸溶液：移取 1 mL 甲酸(4.3)于装有约 800 mL 水的 1 L 容量瓶中，用水定容至刻度并混匀。

4.6 0.1%甲酸甲醇溶液：移取 1 mL 甲酸于装有约 800 mL 甲醇的 1 L 容量瓶中，用甲醇定容至刻度并混匀。

4.7 杆菌肽标准物质：杆菌肽 A(CAS:1505-87-4)纯度大于等于 92.0%，以下杆菌肽标准均以杆菌肽 A 计。

4.8 杆菌肽标准储备溶液：准确称取适量的杆菌肽 A(4.7)于 50 mL 容量瓶中，用 0.1%甲酸甲醇溶液配制成浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备溶液。该溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.9 杆菌肽标准工作溶液：移取杆菌肽标准储备溶液(4.8)1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用 0.1%甲酸甲醇溶液定容，配制成浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。该溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.10 杆菌肽基质标准工作溶液：根据需要吸取适量的杆菌肽标准工作溶液(4.9)，用空白样品提取液稀释成适当浓度的基质标准工作溶液，临用前配制。

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。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 涡旋振荡器。
- 5.4 离心机:转速不低于 5 000 r/min。
- 5.5 具塞离心管:50 mL,带刻度。

6 试样的制备与保存

6.1 牛奶

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封置 4 ℃下保存,并标明标记。

6.2 奶粉

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

7 测定步骤

7.1 牛奶样品

称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈-甲醇(2+1)(4.4),涡旋提取 1 min,以 5 000 r/min 离心 10 min,移取上清液于 50 mL 刻度离心管中,以 0.1%甲酸溶液(4.5)定容至 15 mL,摇匀,用 0.22 μm 滤膜过滤后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.2 奶粉样品

称取 1 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 水,涡旋混匀后,加入 10 mL 乙腈-甲醇(2+1)(4.4),以下操作同牛奶样品。

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:苯基柱,5.0 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 液相色谱梯度洗脱条件见表 1;
- c) 柱温:40 ℃;
- d) 进样量:20 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	水(含 0.1%甲酸)/%	乙腈/%
0.00	200	85.0	15.0
5.00	200	60.0	40.0
6.00	200	60.0	40.0
8.00	200	20.0	80.0
8.01	200	85.0	15.0
10.00	200	85.0	15.0

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:多反应监测;
- d) 鞘气压力: $2.07\times10^5\text{ Pa}$;
- e) 辅助气压力: $5.52\times10^4\text{ Pa}$;
- f) 正离子模式电喷雾电压(IS):4 000 V;
- g) 毛细管温度: $320\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- h) 源内诱导解离电压:10 V;
- i) Q1,Q3 分辨率:Q1 为 0.4,Q3 为 0.7;
- j) 碰撞气:高纯氩气;
- k) 碰撞气压力:0.2 Pa;
- l) 其他质谱参数见表 2。

表 2 杆菌肽的参考保留时间、定性离子对、定量离子对和裂解能量

化合物名称	保留时间/min	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	裂解能量/eV
杆菌肽	6.42	475.3/669.3	475.3/669.3	15
		475.3/869.4		15

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校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误差 %

相对离子丰度 <i>k</i>	$k>50$	$20<k<50$	$10<k<20$	$k\leq10$
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

7.3.3.2 定量测定

在上述色谱条件下,用 6 个不同浓度的杆菌肽基质标准工作溶液分别进样,以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。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中杆菌肽的响应值应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,杆菌肽标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。杆菌肽的参考保留时间为 6.42 min。

本方法的添加回收率数据参见附录 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

杆菌肽残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X=c\times\frac{V}{m}\times\frac{1\,000}{1\,000}$$

.....(1)

式中:

- X*——试样中杆菌肽残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c*——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V*——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m*——最终试样溶液所代表的试样质量,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)。牛奶和奶粉中杆菌肽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 单位为毫克每千克

样品基质	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
牛奶	0.05~0.50	$\lg r=1.168\ 9\ \lg m-1.853\ 8$	$R=0.055\ 4m+4.253\ 1$
奶粉	0.25~2.50	$r=0.021\ 5m+9.228\ 0$	$\lg R=0.610\ 9\ \lg m+0.009\ 2$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

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)。牛奶和奶粉中杆菌肽添加浓度范围及重复性方程见表 4。



附录 A
(资料性附录)
标准物质多反应监测(MRM)色谱图

杆菌肽标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

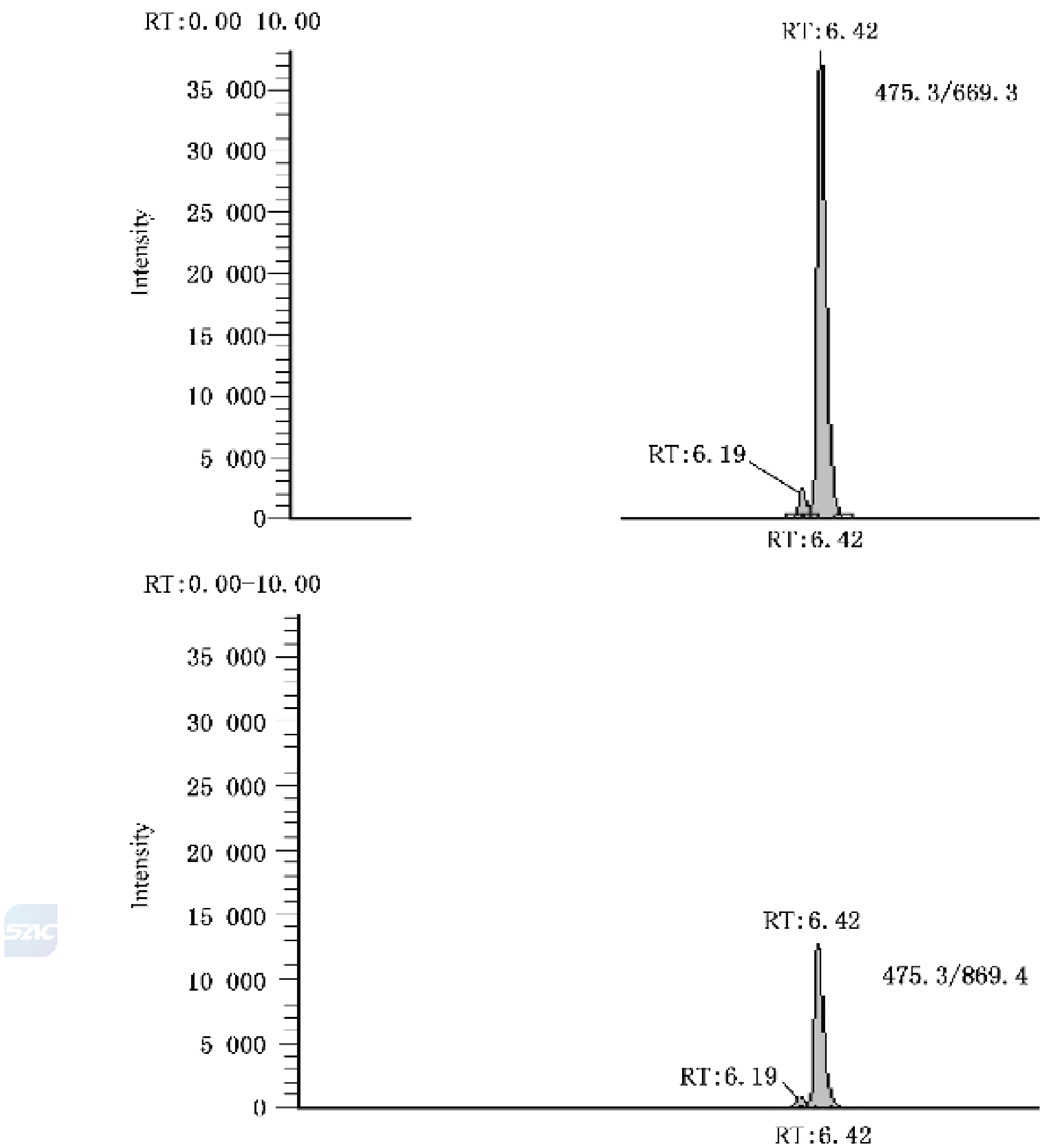


图 A.1 杆菌肽标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中杆菌肽添加浓度及回收率范围的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 杆菌肽添加浓度及其回收率范围的试验数据

样品基质	添加浓度/(μg/kg)	回收率范围/%
牛奶	50	90.2~100.0
	100	93.8~101.0
	200	94.0~103.0
	500	94.4~100.2
奶粉	250	88.0~101.2
	500	93.0~100.2
	1 000	93.8~102.0
	2 500	95.6~99.6