

中华人民共和国国家标准

农业部 781 号公告—12—2006

牛奶中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱—串联质谱法

Milk—Determination of sulfonamides residues—LC-MS/MS method

2006-12-16 发布

2006-12-16 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准中附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位:农业部食品质量监督检验测试中心(上海)。

本标准主要起草人:孟瑾、韩奕奕、余琛、刘罡一、吴榕、贾晶莹。

牛奶中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中 9 种磺胺类药物残留量的液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)确认检测方法。

本标准适用于生鲜牛奶、巴氏杀菌乳、超高温瞬时灭菌乳(UHT 灭菌乳)中磺胺类药物残留量的测定。

本标准的方法检出限为 $0.2 \mu\text{g/L}$ ~ $5 \mu\text{g/L}$,定量限为 $10 \mu\text{g/L}$ (见附录 A)。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

待测样品中加入乙腈,沉淀牛奶中的蛋白,离心后取上清液用液相色谱—串联质谱仪测定残留在滤液中的磺胺类药物,内标法定量。

4 试剂和材料

4.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

4.3 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

4.4 流动相:A液+B液(20+80)

A液(含 0.02%甲酸的乙腈溶液):吸取 0.2 mL 甲酸(HCOOH)于 1 000 mL 乙腈(4.3)中,充分摇匀,0.45 μm 滤膜(4.17)过滤;

B液(0.02%甲酸):吸取 0.2 mL 甲酸(HCOOH)于 1 000 mL 水中,充分摇匀,0.45 μm 滤膜(4.17)过滤。

4.5 磺胺嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.6 磺胺二甲氧基嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.7 磺胺二甲嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.8 磺胺甲基嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.9 磺胺甲氧嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.10 磺胺甲基异噁唑标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.11 磺胺吡啶标准物质:纯度 $\geq 98.0\%$ 。

4.12 磺胺二甲异嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.13 磺胺异噁唑标准物质:纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.14 $^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑贮备液:每毫升含 $^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑 100 μg 的乙腈(4.3)溶液,贮存于 4℃ 的冰箱

中,有效期 24 个月。

4.15 标准溶液

4.15.1 标准贮备液:准确称取各磺胺类药物标准物质(4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、4.10、4.11、4.12、4.13)10.0 mg,分别用甲醇(4.2)溶解并定容至 100 mL,混合均匀。该溶液每毫升分别含各标准物质 100 μg 。贮存于 4℃ 的冰箱中,有效期 3 个月。

4.15.2 混合标准液:准确吸取各标准贮备液(4.15.1)0.5 mL,用水稀释并定容至 50 mL,混合均匀。该溶液每毫升含各标准物质 1.0 μg 。贮存于 4℃ 的冰箱中,有效期 1 个月。

4.15.3 标准曲线工作液:准确吸取混合标准液(4.15.2)0.0、0.1、0.4、0.8、2.0、3.0 mL,分别用阴性牛奶样品稀释并定容至 10 mL,混合均匀。该溶液每毫升分别含各标准物质 0、10、40、80、200、300 ng。临用前配制。

4.16 内标工作液:准确吸取¹³C₆-磺胺甲噁唑贮备液(4.14)0.1 mL,用乙腈(4.3)稀释并定容至 100 mL,混合均匀。该溶液每毫升含¹³C₆-磺胺甲噁唑 100 ng。贮存于 4℃ 的冰箱中,有效期 3 个月。

4.17 滤膜:水相,0.45 μm 。

5 仪器和设备

5.1 分析天平:感量 0.000 01 g。

5.2 单刻线移液管:容量 0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL。

5.3 容量瓶:容量 10 mL、50 mL、100 mL。

5.4 烧杯:容量 100 mL。

5.5 聚丙烯塑料管:容量 1.5 mL。

5.6 具塞离心管:10 mL。

5.7 高速离心机:转速 15 000 r/min。

5.8 涡流混合器。

5.9 液相色谱—串联四极杆质谱仪:配有电喷雾离子源。

6 分析步骤

6.1 试样

6.1.1 贮藏在冰箱中的牛奶,应在试验前预先取出,与室温平衡后、摇匀待取样。

6.1.2 准确吸取 0.1 mL 样品于洁净聚丙烯塑料管(5.5)中,加入 0.1 mL 内标工作液(4.16),用涡流混合器(5.8)混合 5 s,以 15 000 r/min 离心 1 min。

6.1.3 准确吸取 0.1 mL 上层清液于洁净聚丙烯塑料管(5.5)中,加入 0.1 mL 乙腈(4.3),用涡流混合器(5.8)混合 5 s,以 15 000 r/min 离心 1 min。

6.1.4 准确吸取 0.1 mL 上层清液于洁净聚丙烯塑料管(5.5)中,加入 0.1 mL 水(4.1),用涡流混合器(5.8)混合 5 s。取上清液,供液相色谱—串联质谱仪(5.9)测定。

6.2 标准工作溶液

准确吸取 0.1 mL 各质量浓度标准曲线工作液(4.15.3),按步骤 6.1.2~6.1.4 操作,取上清液,供液相色谱—串联质谱仪(5.9)测定。

6.3 液相色谱—串联质谱测定

6.3.1 参考条件

6.3.1.1 液相色谱条件

色谱柱: C_{18} , 5 μm , 10 cm $\times$ 0.2 cm (i.d.), 或性能相当者;

预柱: C_{18} , 4.0 mm $\times$ 3.0 mm (i.d.), 或性能相当者;

流动相: 按 4.4 方法配制、过滤;

流速: 0.3 mL/min;

进样体积: 20 μL 。

6.3.1.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源;

扫描方式: 正离子扫描;

检测方式: 多反应监测;

喷雾口位置: 3:7;

雾化气压力: 0.33 MPa;

气帘气压力: 0.22 MPa;

碰撞气压力: 0.62 MPa;

辅助气流速: 6 L/min;

离子源电压: 3 500 V;

离子源温度: 400℃;

监测离子对参见附录 B。

注: 色谱、质谱条件可根据实际情况作相应调整。

6.3.2 各成分保留时间的确定

在上述条件下, 各磺胺类药物及内标物质的出峰顺序为: 磺胺二甲嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲异嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、 $^{13}C_6$ -磺胺甲噁唑、磺胺甲基异噁唑、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧基嘧啶。9 种磺胺类药物和内标物的参考保留时间参见附录 B, LC-MS/MS 质量色谱图参见附录 C。

6.3.3 标准工作曲线的绘制

准确吸取 20 μL 处理后的各浓度标准工作液(6.2)分别进样, 以各标准物质的质量浓度($\mu g/L$)为横坐标, 各标准物质与 $^{13}C_6$ -磺胺甲噁唑的峰面积比值为纵坐标, 分别绘制标准工作曲线。

6.3.4 样品测定

准确吸取 20 μL 处理后的待测样品溶液(6.1.4)进样, 得到待测样品溶液中各磺胺类药物和 $^{13}C_6$ -磺胺甲噁唑的峰面积, 用标准工作曲线对样品进行定量。样品溶液中待测磺胺类药物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。

6.4 空白试验

以阴性牛奶样品代替待测样品, 按 6.1~6.3 步骤同时完成空白试验。

7 结果计算

7.1 标准工作曲线回归方程利用数据处理系统得到, 形式如公式(1):

$$y = bx + a \quad \cdots \cdots \cdots (1)$$

式中:

y ——标准工作液中各磺胺类标准物质定量离子峰面积与 $^{13}C_6$ -磺胺甲噁唑定量离子峰面积的比值;

x ——标准工作液中各磺胺类标准物质的浓度, 单位为微克每升($\mu g/L$);

b ——标准工作曲线回归方程中的斜率;

a ——标准工作曲线回归方程中的截距。

7.2 待测样品中各磺胺类药物的残留量按公式(2)计算:

$$X = \frac{Y - a}{b} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——待测样品溶液中各磺胺类药物的残留量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

Y——待测样品溶液中各磺胺类药物定量离子峰面积与 $^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑定量离子峰面积的比值。

注:计算结果应扣除空白,用平行测定的算术平均值表示,保留至小数点后两位。

8 准确度和精密度

8.1 准确度

本方法 9 种磺胺类药物的添加浓度为 $10\ \mu\text{g/L} \sim 250\ \mu\text{g/L}$ 时,相对回收率为 85%~115%。

8.2 精密度

本方法的批间变异系数 $\text{CV} \leq 15\%$ 。

附 录 A
(规范性附录)

9 种磺胺类药物中英文名称和方法定量限、检出限

A.1 9 种磺胺类药物中英文名称和方法定量限、检出限见表 A.1。

表 A.1 9 种磺胺类药物中英文名称和方法定量限、检出限

序号	中文名称	英文名称	定量限($\mu\text{g/L}$)	检出限($\mu\text{g/L}$)
1	磺胺二甲嘧啶	Sulfadimidine	10.0	0.2
2	磺胺嘧啶	Sulfadiazine	10.0	2.0
3	磺胺吡啶	Sulfapyridine	10.0	2.0
4	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	10.0	2.0
5	磺胺二甲异嘧啶	Sulfisomidine	10.0	1.0
6	磺胺甲氧嘧啶	Sulfameter	10.0	3.0
7	磺胺甲基异噁唑	Sulfamethoxazole	10.0	4.0
8	磺胺异噁唑	Sulfisoxazole	10.0	5.0
9	磺胺二甲氧基嘧啶	Sulfadimethoxine	10.0	2.0
内标	$^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑	$^{13}\text{C}_6$ -Sulfamethoxazole	/	/

附 录 B
(资料性附录)

LC-MS/MS 测定的 9 种磺胺类药物和内标物监测离子对和保留时间

B.1 LC-MS/MS 测定的 9 种磺胺类药物和内标物监测离子对和保留时间参见表 B.1。

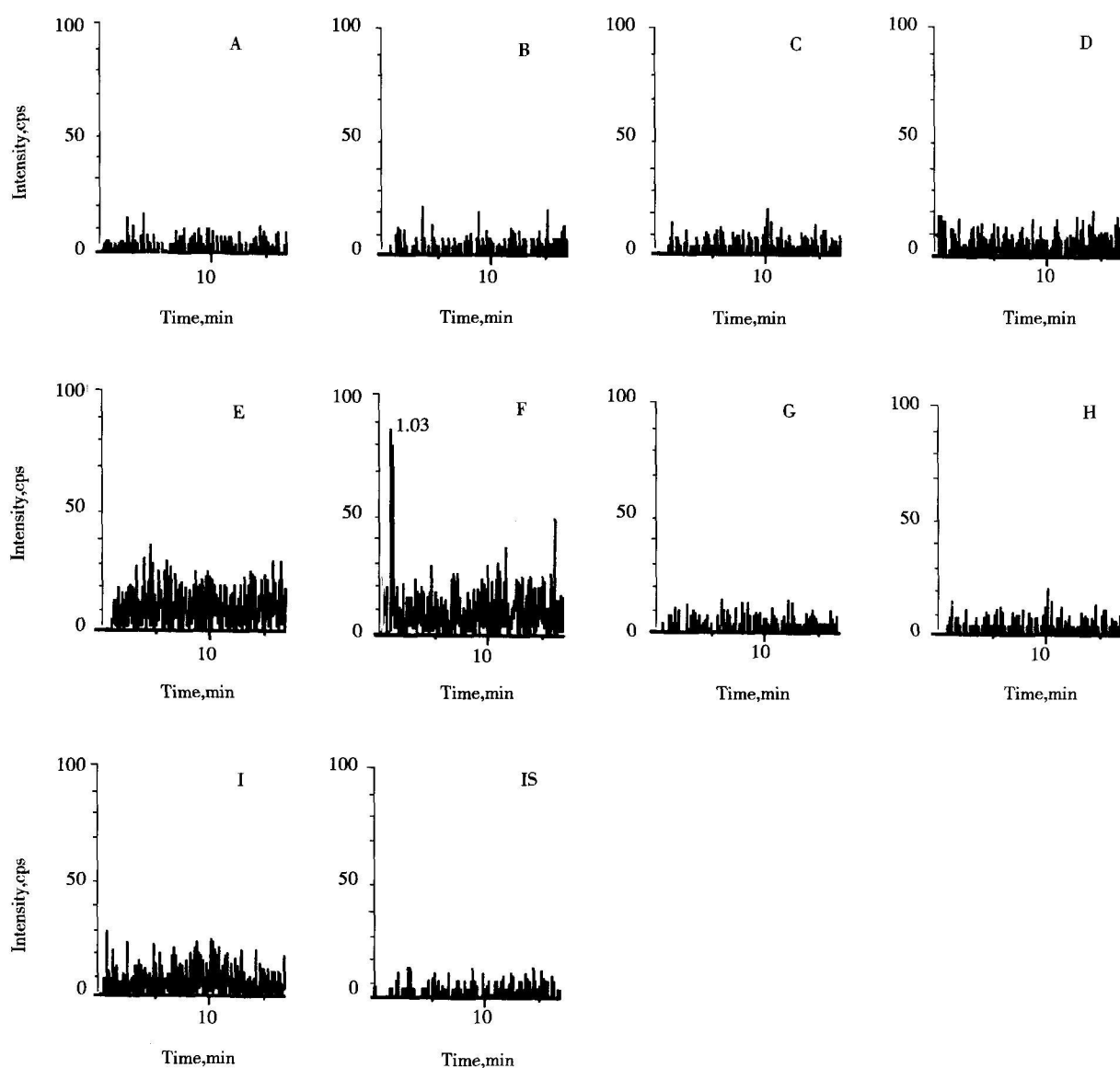
B.1 LC-MS/MS 测定的 9 种磺胺类药物和内标物监测离子对和保留时间

序号	名 称	参考保留时间(min)	定性离子对 1	定性离子对 2	定量离子对
1	磺胺二甲嘧啶	1.02	279/149	279/186	279/124
2	磺胺嘧啶	1.79	251/108	251/156	251/92
3	磺胺吡啶	1.93	250/108	250/92	250/156
4	磺胺甲基嘧啶	2.22	265/156	265/172	265/92
5	磺胺二甲异嘧啶	2.63	279/149	279/186	279/124
6	磺胺甲氧嘧啶	3.08	281/108	281/92	281/156
7	磺胺甲基异噁唑	5.78	254/108	254/92	254/156
8	磺胺异噁唑	6.93	268/113	268/108	268/156
9	磺胺二甲氧基嘧啶	11.07	311/108	311/92	311/156
内标	¹³ C ₆ -磺胺甲噁唑	5.76	260/92	260/108	260/162

附录 C
(资料性附录)

9 种磺胺类药物标准物质 LC-MS/MS 质量色谱图

C.1 空白牛奶的 LC-MS/MS 质量色谱图参见图 C.1。



注:A. 磺胺嘧啶

B. 磺胺二甲氧基嘧啶

C. 磺胺二甲嘧啶

D. 磺胺甲基嘧啶

E. 磺胺甲氧嘧啶

F. 磺胺甲基异噁唑

G. 磺胺吡啶

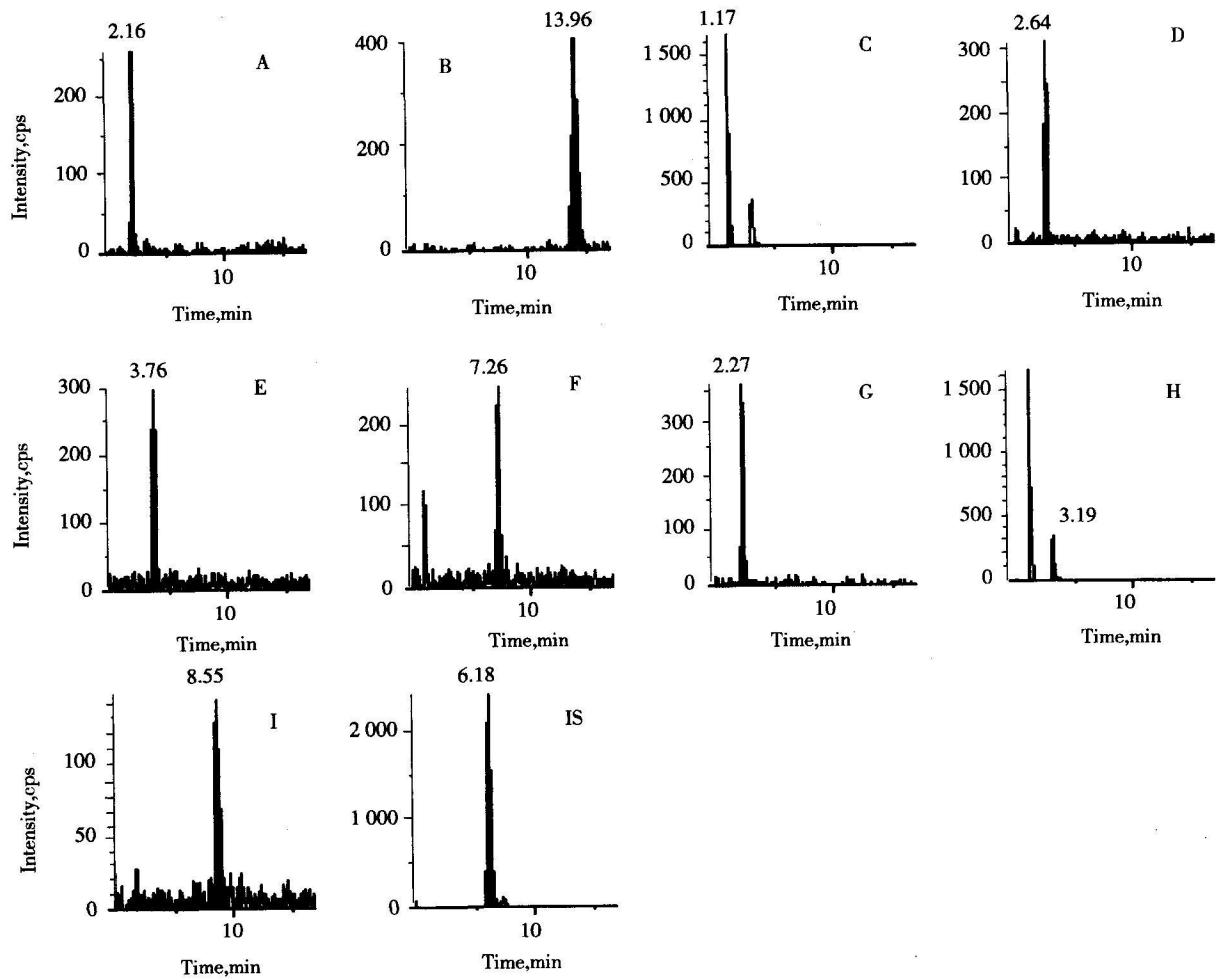
H. 磺胺二甲异嘧啶

I. 磺胺异噁唑

IS. $^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑

图 C.1 空白牛奶的 LC-MS/MS 质量色谱图

C.2 添加浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时 9 种磺胺类药物和内标物的 LC-MS/MS 质量色谱图参见图 C.2。



注:A. 磺胺嘧啶

B. 磺胺二甲氧基嘧啶

C. 磺胺二甲嘧啶

D. 磺胺甲基嘧啶

E. 磺胺甲氧嘧啶

F. 磺胺甲基异噁唑

G. 磺胺吡啶

H. 磺胺二甲异嘧啶

I. 磺胺异噁唑

IS. $^{13}\text{C}_6$ -磺胺甲噁唑

图 C.2 添加浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时 9 种磺胺类药物和内标物的 LC-MS/MS 质量色谱图