

附件 2

原料乳及液态乳中舒巴坦的测定

BJS 201702

1 范围

本标准规定了原料乳及液态乳中舒巴坦的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于原料乳及液态乳（酸奶除外）中舒巴坦的测定。

2 原理

原料乳或液态乳用酸性水溶液超声提取，离心后上清液用固相萃取小柱净化，经液相色谱-串联质谱法测定和确证，外标法定量。

3 试剂和材料

注：水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

3.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

3.1.3 乙酸（CH₃COOH）：分析纯。

3.2 舒巴坦标准品

舒巴坦标准品的分子式、相对分子量、CAS 登录号见表 1，纯度≥99%。

表 1 舒巴坦标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量
舒巴坦	Sulbactam	68373-14-8	C ₈ H ₁₁ NO ₅ S	233.24

3.3 标准溶液配制

3.3.1 舒巴坦标准储备液：称取舒巴坦标准品（3.2）0.01 g（精确至 0.000 1 g），用水溶解并定容至 100 mL，标准储备液的浓度为 0.1 mg/mL，贮存于 4℃冰箱中，有效期 3 个月。

3.3.2 舒巴坦标准工作液：吸取舒巴坦标准储备液（3.3.1）1.00 mL 于 100 mL 的容量瓶中，用水定容至刻度，配得浓度为 1.0 μg/mL 的标准工作溶液，此溶液现配现用。

3.4 0.2%乙酸水溶液：准确量取 2 mL 乙酸（3.1.3），用水定容至 1 000 mL。

3.5 HLB 固相萃取小柱，200 mg/6 mL，或相当者。

3.6 微孔滤膜，0.22 μm，有机相。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

4.2 超声波清洗器。

4.3 涡旋混合仪。

4.4 分析天平：感量分别为 0.01g 和 0.000 1 g。

4.5 氮吹仪。

4.6 离心机：转速≥8 000 r/min。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 提取

称取试样 5 g (精确至 0.01 g), 至 25 mL 比色管中, 加入 15 mL 0.2%乙酸水溶液 (3.4), 涡旋 30 s, 超声提取 20 min, 用 0.2%乙酸水溶液 (3.4) 定容至 25 mL, 涡旋混匀, 转移至 50 mL 离心管内, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待净化。

5.1.2 净化

HLB 固相萃取小柱 (3.5) 预先用 5 mL 甲醇 (3.1.1) 和 5 mL 0.2%乙酸水溶液 (3.4) 进行活化, 取 10 mL 离心上清液 (5.1.1) 流经小柱, 待上清液自然流尽后, 用 5 mL 0.2%乙酸水溶液 (3.4) 淋洗, 用吸耳球吹出小柱中残留液体, 加 5 mL 甲醇 (3.1.1) 洗脱, 收集洗脱液, 采用氮气将洗脱液缓慢吹干, 准确吸取 2 mL 水溶解残渣, 经 0.22 μm 滤膜 (3.6) 过滤作为测定液, 用液相色谱-串联质谱仪测定。

5.2 空白试验

除不加试样外, 均按 5.1 测定步骤进行。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱分离条件

- a) 色谱柱: C_{18} 色谱柱, 50 mm \times 4.6 mm (i.d.), 1.8 μm , 或性能相当者。
- b) 流动相: A: 水, B: 乙腈 (3.1.2), 梯度洗脱条件见表 2。
- c) 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。
- d) 流速: 0.3 mL/min。
- e) 进样量: 20 μL 。

表 2 梯度洗脱表

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)	流速 (mL/min)
0.0	95	5	0.3
1.0	95	5	0.3
3.0	5	95	0.3
5.0	5	95	0.3
5.1	95	5	0.3
8.0	95	5	0.3

5.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI)。
- b) 扫描方式: 负离子扫描。
- c) 干燥气: 氮气, 温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 流速 10 L/min。
- d) 雾化器: 氮气, 压力 40 psi。
- e) 毛细管电压: 4 000V。
- f) 检测方式: 多反应监测 (MRM)。
- g) 质谱参数见表 3。

表 3 舒巴坦的质谱参数

化合物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	裂解电压 V	碰撞能量 eV
舒巴坦	232.1>140.1 232.1>64.0	232.1>140.1	70	4 30

5.4 标准曲线的制作

取空白试样按照 5.1 步骤制备空白基质溶液，将标准工作溶液（3.3.2）用空白基质溶液逐级稀释得到所需浓度系列的标准溶液，按浓度从低到高依次经液相色谱-串联质谱测定，以定量离子的峰面积为纵坐标，以标准溶液的浓度为横坐标，得标准工作曲线。

舒巴坦的 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

5.5 定性测定

在相同试验条件下，试样中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且试样中定性、定量离子的相对丰度比与浓度接近的标准溶液中对应的定性、定量离子的相对丰度比进行比较，若偏差不超过表 4 规定的范围，可判定为试样中含有对应的待测物。

表 4 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对丰度 (%)	>50	>20—50	>10—20	≤10
允许偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

5.6 定量测定

本方法采用外标标准曲线法定量。以不同浓度的标准溶液浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，作标准曲线线性回归方程，以试样的峰面积与标准曲线比较定量。待测物的响应值均应在线性范围内。

6 结果计算

试样中舒巴坦的含量由色谱数据处理软件或按式（1）计算获得：

$$X = \frac{C \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中舒巴坦的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；
- C——试样中舒巴坦峰面积对应的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- V——试样定容体积，单位为毫升（ mL ）；
- m——试样的质量，单位为克（ g ）；
- f——稀释倍数；

计算结果保留三位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

8 其他

本方法对原料乳和液态乳（酸奶除外）中舒巴坦的检测限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附录A

舒巴坦标准溶液LC-MS/MS多反应监测质量色谱图

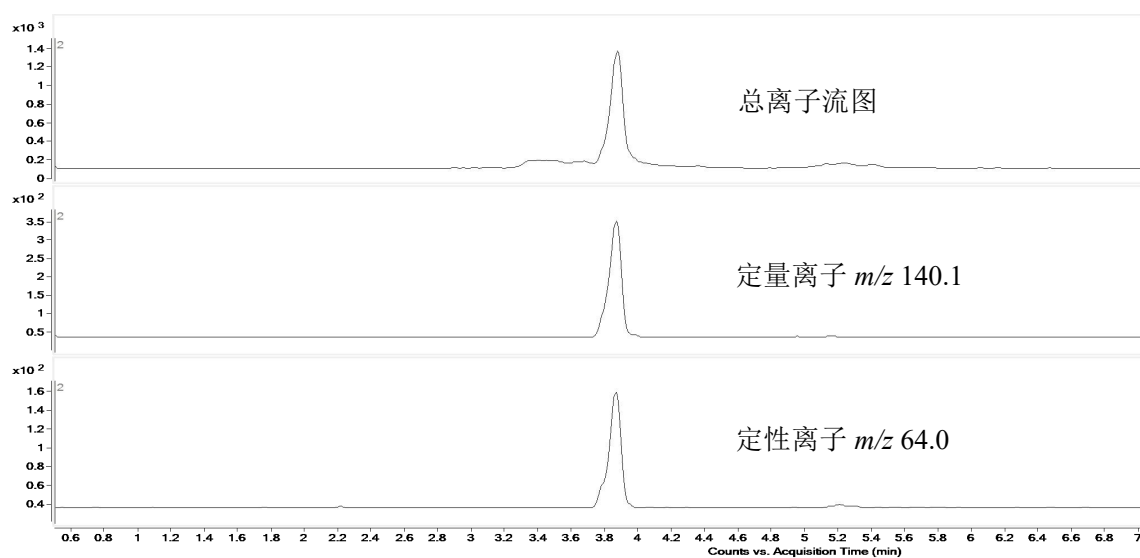


图 A.1 舒巴坦标准溶液 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图

本方法负责起草单位：北京市食品安全监控和风险评估中心（国家食品质量安全监督检验中心）

验证单位：大连市食品检验所、山东省食品药品检验研究院、辽宁省食品检验检测院、广州质量监督检测研究院、中国检验检疫科学研究院综合检测中心。

主要起草人：史海良、潘红艳、边海涛、薛霞、刘家阳。