

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告 — 12 — 2008

鸡肉、猪肉中四环素类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法

Determination of tetracyclines residues in muscle of chicken and swine
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施



中华人民共和国农业部 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 制样 1

3.1 样品的制备 1

3.2 样品的保存 1

4 测定方法 1

4.1 方法提要或原理 1

4.2 试剂和材料 1

4.3 仪器和设备 2

4.4 测定步骤 2

4.5 结果计算和表述 3

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度 4

5.1 灵敏度 4

5.2 准确度 4

5.3 精密度 4

附录 A(资料性附录)四环素类药物总离子流(TIC)及特征离子质量色谱图 5

前 言

本标准附录 A 是资料性附录。

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：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：王树槐、孙雷、汪霞、刘琪、刘艳华。

本标准系首次发布的国家标准。

鸡肉、猪肉中四环素类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中四环素、土霉素及金霉素单个或混合物残留检测的制样和高效液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于猪肉、鸡肉组织中四环素、土霉素及金霉素单个或混合物残留量的检测。

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 分析实验室用水规则和试验方法

农牧发[2003]1号 兽药残留试验技术规范(试行)

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料中残留的四环素、土霉素及金霉素经 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液提取,HLB 柱净化。用高效液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 盐酸四环素:含盐酸四环素(C₂₂H₂₅ClN₂O₈)不得少于 97%。

4.2.2 盐酸土霉素:含盐酸土霉素(C₂₂H₂₅ClN₂O₉)不得少于 96%。

4.2.3 盐酸金霉素:含盐酸金霉素(C₂₂H₂₄Cl₂N₂O₈)不得少于 83%。

4.2.4 柠檬酸(C₆H₈O₇·H₂O):分析纯。

4.2.5 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O):分析纯。

4.2.6 乙二胺四乙酸二钠(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O):分析纯。

4.2.7 氢氧化钠:分析纯。

4.2.8 甲醇:色谱纯。

4.2.9 甲酸:分析纯。

4.2.10 乙腈:色谱纯。

4.2.11 氢氧化钠溶液(1 mol/L):取氢氧化钠 4 g,加水溶解并稀释至 100 mL,即得。

4.2.12 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液:分别取柠檬酸 12.9 g,磷酸氢二钠 10.9 g,乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,加水 900 mL 溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 4.0 ± 0.5 ,加水稀释至 1 000 mL,即得。

4.2.13 四环素、土霉素和金霉素标准储备液:分别取盐酸四环素、盐酸土霉素和盐酸金霉素对照品适量,精密称定。按四环素、土霉素和金霉素计,用甲醇溶解并稀释成浓度均为 1 mg/mL 的溶液,作为标准储备液。置 -20°C 冰箱中保存,有效期为 1 个月。

4.2.14 四环素、土霉素和金霉素工作液:精密量取标准储备液适量,用甲醇-水(3+7,V/V)溶液稀释成适宜浓度的四环素、土霉素和金霉素标准工作液。临用前配制。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪(带电喷雾、离子源)。

4.3.2 天平:感量 0.01 g。

4.3.3 分析天平:感量 0.000 01 g。

4.3.4 漩涡振荡器。

4.3.5 振荡器。

4.3.6 组织匀浆机。

4.3.7 离心机。

4.3.8 酸度计。

4.3.9 离心管:50 mL。

4.3.10 固相萃取柱:HLB 柱(60 mg/3mL)。

4.3.11 样品浓缩器。

4.3.12 微孔滤膜:0.45 μm 。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品,作为供试试料;

——取绞碎后的空白样品,作为空白试料;

——取绞碎后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

4.4.2 提取

取 10 000 r/min 匀浆 1 min 的试料(2 ± 0.05)g,置 50 mL 离心管中,加 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液 8 mL,涡动充分混匀,8 000 r/min 离心 10 min(温度低于 15°C),取上清液于另一离心管内。重复提取一次,合并上清液,备用。

4.4.3 净化

HLB 固相萃取柱依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 预洗。取备用液 8 mL 过柱,用水 5 mL、5% 甲醇水溶液 5 mL 淋洗,减压抽干。用甲醇 5 mL 洗脱,氮气吹干洗脱液(温度低于 40°C)。用甲醇-水(3+7) 1.0 mL 溶解残余物,过滤膜后作为试样溶液,供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.4 标准曲线的制备

精密量取标准储备液适量,用甲醇-水(3+7)溶液稀释成含四环素、土霉素和金霉素分别为 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL 的系列工作液,供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

色谱柱: XBridge C₁₈ 150 mm×2.1 mm(i. d.), 粒径 5 μm, 或相当者;

流动相: A: 0.3% 的甲酸乙腈溶液, B: 0.3% 的甲酸水溶液;

梯度洗脱: 0 min~10 min, 10% A 线性变化至 35% A; 10 min~15 min, 35% A 线性变化至 10% A;
15 min~25 min, 10% A;

流速: 0.2 mL/min;

柱温: 20℃;

进样量: 20 μL。

4.4.5.2 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;

电离电压: 2.5 kV;

源温: 80℃;

雾化温度: 200℃;

锥孔气流速: 50 L/h;

雾化气流速: 310 L/h;

定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量见表 1。

表 1 三种四环素类药物定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量

药物	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
四环素	445>410	445>410	26	18
	445>428			12
土霉素	461>426	461>426	25	20
	461>443			14
金霉素	479>444	479>444	32	23
	479>462			19

4.4.5.3 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液, 作单点或多点校准, 按外标法以峰面积计算, 即得。对照溶液及试样溶液中四环素、土霉素和金霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液和试样溶液的总离子流和特征离子质量色谱图分别见附录 A 中图 A. 1、图 A. 2。

4.4.6 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

按式(1)计算试料中四环素、土霉素和金霉素的残留量:

$$X = \frac{A_c V_1 V_3}{A_s V_2 m} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

X——试料中四环素、土霉素和金霉素的残留量, 单位为纳克每克(ng/g);

A——试样溶液中相应药物的峰面积;

A_s——标准溶液中相应药物的峰面积;

c_s——标准溶液中相应药物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

V₁——提取试料后缓冲液的总体积, 单位为毫升(mL);

V₂——过固相萃取柱所用备用液体积, 单位为毫升(mL);

V₃——溶解残余物的体积, 单位为毫升(mL);

m ——供试试料的质量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

四环素、土霉素和金霉素在猪肉、鸡肉组织中的检测限为 5 ng/g,定量限为 10 ng/g。

5.2 准确度

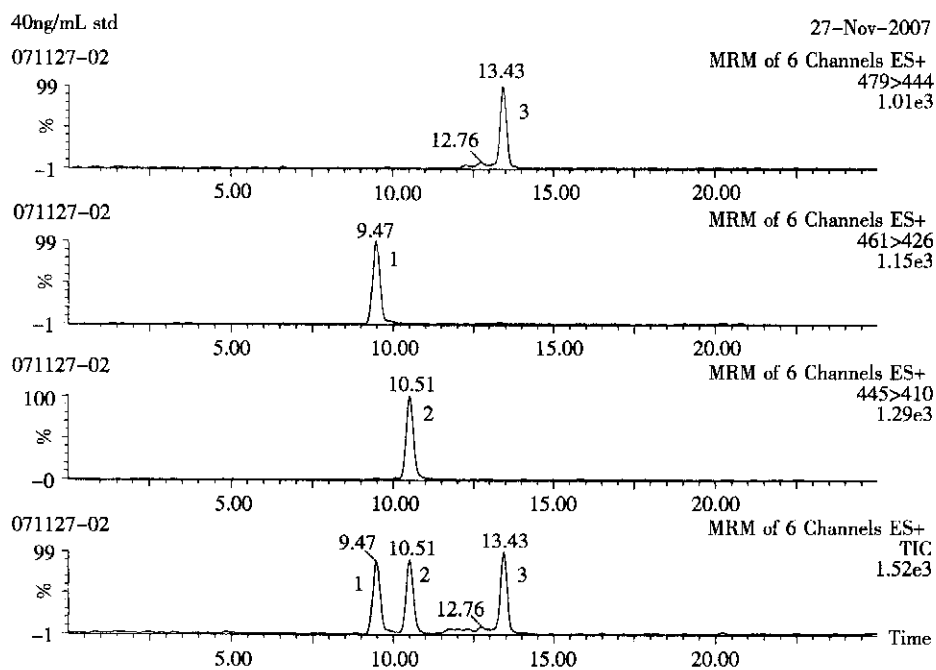
本方法在 50 ng/g~200 ng/g 添加浓度的回收率为 60%~120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 20\%$,批间变异系数 $\leq 20\%$ 。

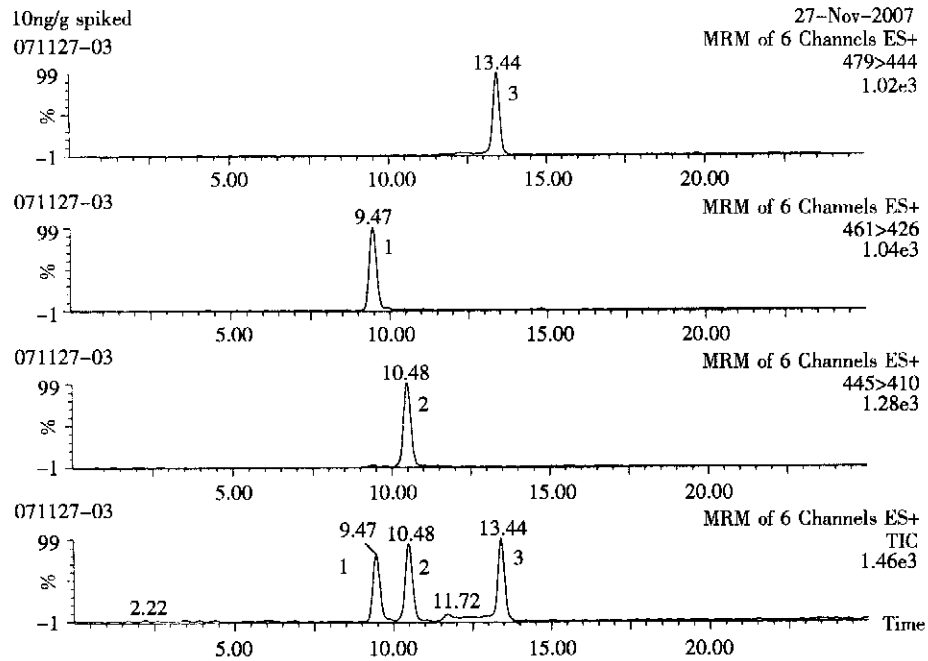
附录 A
(资料性附录)

四环素类药物总离子流(TIC)及特征离子质量色谱图



- 1——上霉素得到的特征离子质量色谱图(461.0>426.0);
2 四环素得到的特征离子质量色谱图(445.0>410.0);
3——金霉素得到的特征离子质量色谱图(479.0>444.0)。

图 A. 1 40 ng/mL 标液中三种药物 TIC 和特征离子质量色谱图



- 1——土霉素得到的特征离子质量色谱图(461.0>426.0)；
2——四环素得到的特征离子质量色谱图(445.0>410.0)；
3 金霉素得到的特征离子质量色谱图(479.0>444.0)。

图 A.2 10 ng/g 空白猪肉添加试液中三种药物 TIC 和特征离子质量色谱图