

中华人民共和国国家标准

GB/T 20762—2006

畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、 替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、 吉它霉素、交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of lincomycin, oleandomycin,
erythromycin, tilmicosin, tylosin, clindamycin, spiramycin, kitasamycin
and josamycin residues in livestock and poultry muscles—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

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、山东农业大学。

本标准主要起草人：庞国芳、王飞、曹彦忠、贾光群、连玉晶、张进杰、李学民、范春林、刘永明、石玉秋。

本标准系首次发布的国家标准。

畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肉、猪肉、羊肉和鸡肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素和交沙霉素残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肉、猪肉、羊肉和鸡肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素和交沙霉素残留量的测定。

本标准的方法检出限：林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素和交沙霉素均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

畜禽肉中九种大环内酯类抗生素（林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素和交沙霉素）的残留用乙腈提取，提取液用正己烷去除脂肪后浓缩，再用磷酸盐溶液溶解后，经 Oasis HLB 固相萃取柱净化，甲醇洗脱，洗脱液浓缩定容后，供液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，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 正己烷：色谱纯。
- 4.4 甲酸铵。
- 4.5 磷酸氢二钠。
- 4.6 氢氧化钠。
- 4.7 氯化钠。

- 4.8 2%氯化钠溶液:称取 10.0 g 氯化钠(4.7), 溶解于 500 mL 水中。
- 4.9 磷酸盐缓冲溶液:0.1 mol/L。6.0 g 磷酸氢二钠(4.5)溶解于 450 mL 水中,用氢氧化钠(4.6)饱和溶液调节 pH=8,用水定容至 500 mL。使用前配制。
- 4.10 甲醇+水溶液(2+3):400 mL 甲醇(4.1)与 600 mL 水混合。使用前配制。
- 4.11 甲酸铵溶液:0.1 mmol/L。0.63 g 甲酸铵(4.4)加水溶解至 1 000 mL。
- 4.12 林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素和罗红霉素(roxithromycin)标准物质:纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.13 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取每种标准物质(4.12)10.0 mg 分别放入 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,混匀。4℃保存。
- 4.14 混合标准储备溶液:10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取 0.1 mL 各标准储备溶液(4.13)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。4℃保存,可使用一周。
- 4.15 混合标准工作溶液:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 1.0 mL 混合标准储备溶液(4.14)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。用前配制。
- 4.16 内标储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取 10.0 mg 罗红霉素(4.12)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,混匀。4℃保存。
- 4.17 中间浓度内标溶液:10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 0.1 mL 内标储备溶液(4.16)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。4℃保存。
- 4.18 内标工作溶液:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 1.0 mL 中间浓度内标标准溶液(4.17)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。用前配制。
- 4.19 基质标准工作溶液:分别吸取 1.0 μL 、2.0 μL 、5.0 μL 、10.0 μL 、50.0 μL 混合标准工作溶液(4.15),加入 10.0 μL 内标工作溶液(4.18),用样品空白提取液定容至 1.0 mL,配成 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL 浓度系列基质标准工作溶液。用前配制。
- 4.20 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:500 mg,6 mL,或相当者。使用前,分别用 10 mL 甲醇、10 mL 水、5 mL 氯化钠溶液和 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.9)活化,保持柱体湿润。
- 4.21 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 5.2 天平:感量 0.01 g,0.000 1 g。
- 5.3 固相萃取装置。
- 5.4 氮气浓缩仪。
- 5.5 具塞聚丙烯离心管:50 mL。
- 5.6 离心机。

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,充分搅碎,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-18℃保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样,精确至 0.01 g,置于 50 mL 离心管(5.5)中,加入 10.0 μ L 内标工作溶液(4.18)和 15.0 mL 乙腈(4.2),于振荡器上剧烈振荡 10 min。以 4 200 r/min 的转速离心 5 min,取上清液于另一离心管中,加入 2.0 g 氯化钠(4.7)和 10.0 mL 正己烷(4.3),于振荡器上剧烈振荡 10 min。以 4 200 r/min 的转速离心 10 min,小心吸取中间乙腈层 12.0 mL 于另一离心管中,用氮气浓缩仪于 55 $^{\circ}$ C 水浴中吹至近干。

7.2 净化

用 7 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.9)分两次溶解残液(7.1),使样液以小于 1.0 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 固相萃取柱(4.20)。样液全部流出后,再用 10 mL 水和 5 mL 甲醇+水溶液(4.10)洗柱,弃去全部流出液,固相萃取柱用真空泵抽干 1 h。再用 10 mL 甲醇(4.1)洗脱于 15 mL 锥形试管中,用氮气浓缩仪于 55 $^{\circ}$ C 水浴中吹至近干,准确加入 1.0 mL 甲酸铵溶液(4.11)溶解残渣。用阴性样品,按上述步骤制备空白样品提取液。过 0.2 μ m 滤膜(4.21)后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- 色谱柱: Intersil C_{18} , 3 μ m, 150 mm \times 2.1 mm 或相当者;
- 进样量: 20 μ L;
- 流速: 0.5 mL/min;
- 柱温: 20 $^{\circ}$ C;
- 流动相: A: 0.1 mmol/L 甲酸铵溶液, B: 乙腈。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/(%)	流动相 B/(%)
0.0	0.50	95	5
1.0	0.50	95	5
6.0	0.50	40	60
6.1	0.50	5	95
10.0	0.50	5	95
10.1	0.50	95	5
20.0	0.50	95	5

7.3.2 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;
- 电喷雾电压: 5 500 V;
- 雾化气压力: 0.069 MPa;
- 气帘气压力: 0.69 MPa;
- 辅助气流速: 0.414 MPa;
- 离子源温度: 350 $^{\circ}$ C;
- 碰撞室出口电压: 2.0 V;
- 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压,见表 2。

表 2 九种大环内酯类抗生素定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

被测物名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	碰撞气能量/V	去簇电压/V
林可霉素	407.2/126.1	407.2/126.1	37	50
	407.2/359.2		24	50
竹桃霉素	688.4/158.2	688.4/158.2	70	30
	688.4/544.3		42	30
红霉素	734.3/158.2	734.3/158.2	42	50
	734.3/576.3		28	50
替米考星	869.4/174.2	869.4/174.2	62	90
	869.4/132.1		70	90
泰乐菌素	916.4/174.2	916.4/174.2	54	80
	916.4/145.1		55	80
克林霉素	425.2/126.1	425.2/126.1	45	53
	425.2/377.3		28	53
螺旋霉素	843.3/142.2	843.3/142.2	48	60
	843.3/174.2		50	60
吉它霉素	772.3/215.2	772.3/215.2	43	70
	772.3/109.1		42	70
交沙霉素	828.3/174.2	828.3/174.2	45	80
	828.3/109.1		45	80

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

在相同试验条件下,待测样品溶液(7.2)中被测物的保留时间与基质标准工作溶液(4.19)中被测物的保留时间的比值,偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。并且,待测样品溶液中,被测物中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准工作溶液中被测物的各定性离子相对丰度的比值,若偏差不超过表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偏差

%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,以基质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。用基质标准工作溶液的工作曲线对样品进行定量,应使样品溶液中九种大环内酯类抗生素的响应值在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,九种大环内酯类抗生素的参考保留时间见表4,九种大环内酯类抗生素的标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见图A.1。

表 4 九种大环内酯类抗生素参考保留时间

被测物名称	保留时间/min
林可霉素	6.96
竹桃霉素	7.36
红霉素	8.06
替米考星	8.36

表 4 (续)

被测物名称	保留时间/min
泰乐菌素	8.48
克林霉素	8.51
螺旋霉素	8.67
吉它霉素	8.83
交沙霉素	9.14

7.4 平行试验

按试样步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

不称取样品,其余均按试样步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;

A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;

c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

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以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性实验的条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,畜禽肉中九种大环内酯类抗生素含量范围及重复性方程见表 5。

表 5 含量范围及重复性和再现性方程

被测物名称	含量范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	重复性限 r	再现性限 R
林可霉素	1.0~10.0	$\lg r = 1.094\ 0 \lg m - 1.421\ 4$	$\lg R = 0.933\ 1 \lg m - 0.833\ 5$
竹桃霉素	1.0~10.0	$\lg r = 1.063\ 2 \lg m - 1.423\ 6$	$R = 0.146\ 1 m - 0.012\ 4$
红霉素	1.0~10.0	$\lg r = 0.882\ 0 \lg m - 1.315\ 0$	$\lg R = 1.019\ 6 \lg m - 0.852\ 7$
替米考星	1.0~10.0	$\lg r = 1.154\ 3 \lg m - 1.456\ 8$	$R = 0.115\ 7 m + 0.009\ 4$

表 5 (续)

被测物名称	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
泰乐菌素	1.0~10.0	$\lg r=1.113\ 7\ \lg m-1.437\ 3$	$\lg R=1.397\ 3\ \lg m-1.195\ 5$
克林霉素	1.0~10.0	$r=0.043\ 6\ m-0.013\ 7$	$\lg R=1.443\ 6\ \lg m-1.191\ 1$
螺旋霉素	1.0~10.0	$\lg r=1.152\ 1\ \lg m-1.471\ 1$	$\lg R=0.993\ 0\ \lg m-0.837\ 9$
吉它霉素	1.0~10.0	$\lg r=0.701\ 8\ \lg m-1.258\ 0$	$\lg R=1.017\ 1\ \lg m-1.007\ 2$
交沙霉素	1.0~10.0	$\lg r=0.997\ 1\ \lg m-1.436\ 9$	$\lg R=0.986\ 5\ \lg m-0.797\ 2$
注： m 为两次测定值的算术平均值。			

如果差值超过重复性限 r , 应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

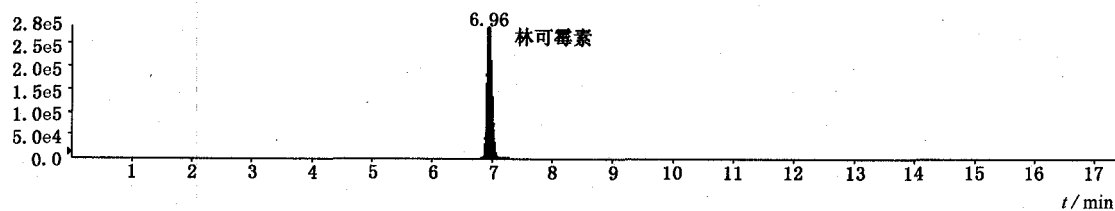
9.2 再现性

在再现性实验的条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R , 畜禽肉中九种大环内酯类抗生素的含量范围及再现性方程见表 5。

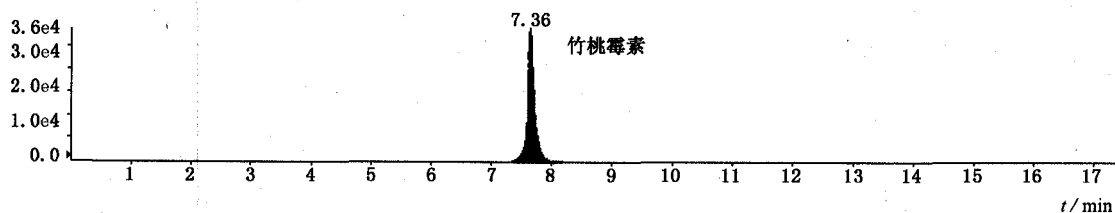
附录 A
(资料性附录)

九种大环内酯类抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图

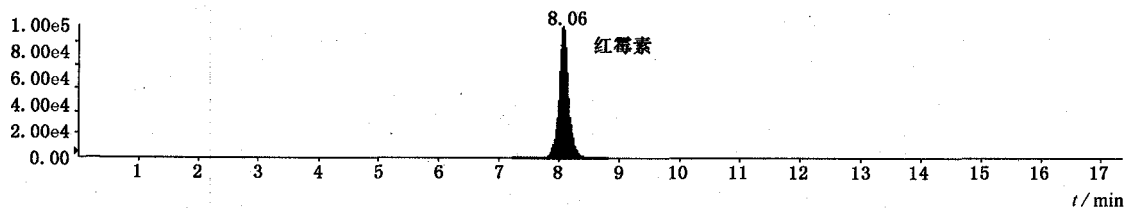
九种大环内酯类抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。



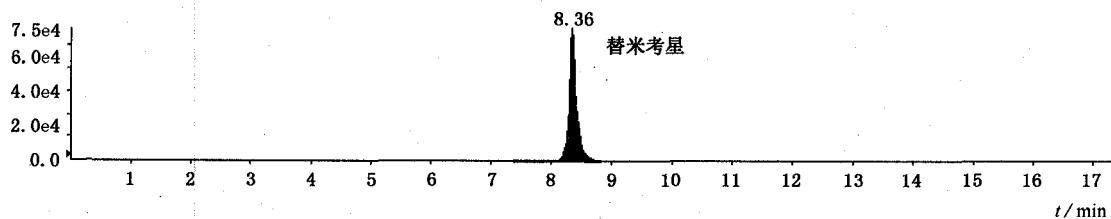
a) 林可霉素



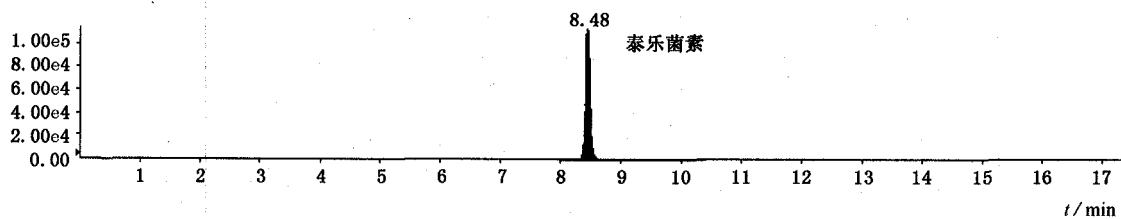
b) 竹桃霉素



c) 红霉素

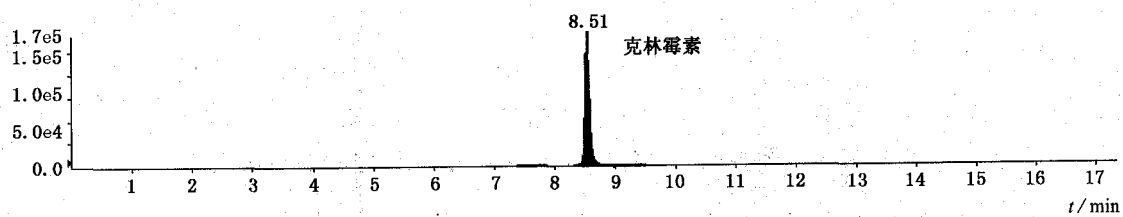


d) 替米考星

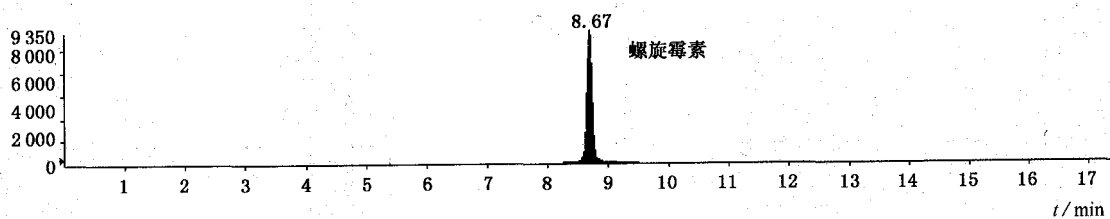


e) 泰乐菌素

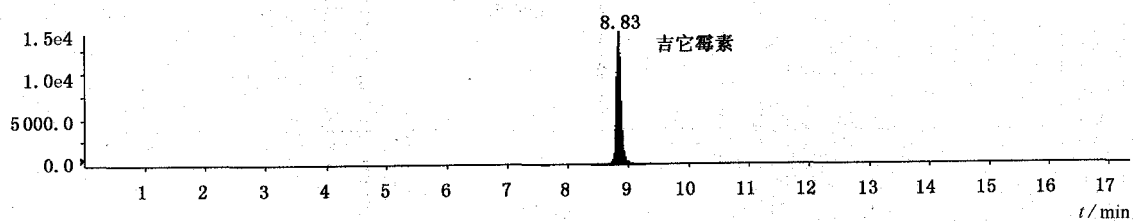
图 A.1 九种大环内酯类抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图



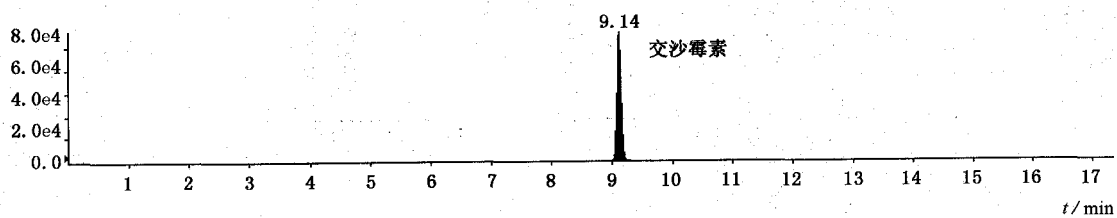
f) 克林霉素



g) 螺旋霉素



h) 吉它霉素



i) 交沙霉素

图 A.1 (续)

附录 B
(资料性附录)
回收率

本方法中九种大环内酯类抗生素添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 九种大环内酯类抗生素添加浓度及其平均回收率的试验数据

被测物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
林可霉素	1.0	88.0
	2.0	88.2
	5.0	87.1
	10.0	84.5
竹桃霉素	1.0	84.9
	2.0	85.1
	5.0	85.7
	10.0	86.4
红霉素	1.0	84.9
	2.0	82.7
	5.0	86.7
	10.0	88.6
替米考星	1.0	86.9
	2.0	87.8
	5.0	84.8
	10.0	89.4
泰乐菌素	1.0	86.6
	2.0	77.2
	5.0	84.0
	10.0	85.5
克林霉素	1.0	89.5
	2.0	82.0
	5.0	88.8
	10.0	87.0
螺旋霉素	1.0	86.8
	2.0	86.6
	5.0	88.4
	10.0	86.8
吉它霉素	1.0	83.3
	2.0	88.2
	5.0	87.4
	10.0	87.1
交沙霉素	1.0	85.9
	2.0	84.2
	5.0	86.9
	10.0	82.9