

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5117—2019

进出口食用动物、饲料 链霉素类 (链霉素、二氢链霉素)药物残留测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin residues in live animals and feeds for import and export-HPLC MS/MS method

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国大连海关、沈阳农业大学。

本标准主要起草人：徐静，孙兴权，苏明明，田宏哲，杨璐，李一尘，肖珊珊，代弟，曹际娟。

行业标准信息服务平台

进出口食用动物、饲料 链霉素类 (链霉素、二氢链霉素)药物残留测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了链霉素、二氢链霉素药物残留量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于猪、牛、羊、兔、鸡血清及猪、牛、羊、兔尿液,以及玉米粉、小麦粉、高粱粉饲料中链霉素、二氢链霉素药物残留量的测定和确证。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中残留的链霉素、二氢链霉素经混合提取液提取,HLB固相萃取柱净化,经水淋洗、甲醇洗脱,定容后供液相色谱-质谱/质谱法测定,外标法定量。

4 试剂与材料

4.1 乙腈:高效液相色谱纯。

4.2 甲酸:高效液相色谱纯。

4.3 甲醇:高效液相色谱纯。

4.4 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

4.5 三氯乙酸。

4.6 盐酸(HCl)。

4.7 氢氧化钠(NaOH)

4.8 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

4.9 乙二胺四乙酸二钠盐($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$)

4.10 提取液:10 mmol/L KH_2PO_4 溶液(含 0.4 mmol/L EDTA 和 2% 三氯乙酸),称取 2.72 g KH_2PO_4 ,加入 2 L 水,用 1 mol/L HCl 溶液调节 pH 值为 4.0,再加入 0.3 g 乙二胺四乙酸二钠盐(含 2 个结晶水)和 40 g 三氯乙酸,混匀即可。

4.11 0.1%甲酸:取 1.0 mL 甲酸溶于 1 L 水中即可。

4.12 链霉素标准物质:CAS 号 57-92-1,纯度 98.0%。

4.13 双氢链霉素标准物质:CAS 号 128-46-1,纯度 99.0%。

4.14 标准储备溶液的配制:分别准确称取适量的标准物质,用水配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液,

置于-4℃避光保存,有效期1个月。

4.15 混合标准溶液的配制:取适量标准储备溶液(4.14)至100 mL容量瓶中,用水定容至刻度,配制成混合标准溶液,各组分浓度均为1 μg/mL。-4℃避光保存,有效期5天。

4.16 标准工作溶液的配制:根据需要,吸取一定量的混合标准溶液(4.15),用空白基质提取液稀释至所需浓度,临用现配。

4.17 HLB固相萃取柱或相当者:60 mg,3 mL。使用前依次用3 mL甲醇、5 mL超纯水预洗活化。

4.18 滤膜:0.22 μm,水相。

4.19 水:GB/T 6682规定的一级水。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱串联二级质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 电子天平:感量分别为0.01 g,0.000 1 g。

5.3 离心机:转速8 500 r/min以上。

5.4 涡旋振荡器。

5.5 氮吹仪。

5.6 固相萃取装置。

5.7 pH计。

5.8 10 mL塑料离心管。

6 试样的制备与保存

6.1 试样制备

无菌采集待检动物非抗凝血(≥8 mL),分离血清于洁净容器内作为试样,加封并标明标记。尿液样品(≥5 mL)装入洁净容器内加封并标明标记。饲料样品(≥500 g)经粉碎机粉碎,过20目筛,混匀,密封,作为试样,标明标记。在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样保存

血清和尿液样品于-20℃以下条件下保存。饲料样品于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取约2 g(精确至0.01)样品于50 mL具塞离心管中,准确加入8 mL提取液(4.10),涡旋振荡提取3 min后,8500 r/min离心5 min,倾出上清液。重复提取一次,合并上清液。上清液用氨水(4.8)调至pH 3~4,待净化。

7.2 净化

将提取液转移到已活化的HLB固相萃取柱(4.17),流速控制在1 d/s左右,用3 mL水淋洗,弃去流出液,用5 mL甲醇(4.3)洗脱,洗脱液收集于10 mL刻度塑料离心管(5.8)中,并于45℃氮气吹干,用1 mL水溶解残渣,过微孔滤膜(4.18)后,待上机检测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Atlantis HILIC Silica,150 mm×2.1 mm(内径),粒度 3 μm ,或相当者;
- b) 色谱柱温度:40 $^{\circ}\text{C}$;
- c) 流动相:梯度洗脱条件见表 1;
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 进样量:20 μL ;

表 1 梯度洗脱程序

| 步骤 | 时间(min) | 乙腈/% | 0.1%甲酸水溶液/% |
|----|---------|------|-------------|
| 1 | 0.00 | 90 | 10 |
| 2 | 1.00 | 90 | 10 |
| 3 | 4.00 | 20 | 80 |
| 4 | 6.00 | 20 | 80 |
| 5 | 6.01 | 90 | 10 |
| 6 | 15.00 | 90 | 10 |

7.3.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子化模式:电喷雾正离子模式(ESI+);
- b) 扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气;使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求,喷雾电压等电压值应优化至最佳灵敏度,参考质谱条件见附录 A。

7.3.3 定性标准

每组被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测组分的保留时间,与混合基质标准校准溶液中的对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内;且样品谱图中各组分监测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监测离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 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 |
|-----------|----------|----------|----------|-----------|
| 允许的相对偏差/% | ± 20 | ± 25 | ± 30 | ± 50 |

7.3.4 定量测定

根据试样中被测试物的含量情况,选取响应值相近的标准工作液一起进行色谱分析,标准工作液和待测液中 2 种链霉素类药物的响应值应在仪器线性响应值范围内。对标准工作液和样液等体积参差进行测定。在上述色谱条件下 2 种链霉素类药物的参考保留时间参见附录 B。链霉素类药物的标准溶液

的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 B。

7.3.5 空白试验

分别取阴性的血清、尿液和饲料样品 2 g,按 7.1 和 7.2 操作。

8 结果计算

用色谱数据处理机或按式(1)计算,计算结果需扣除空白值:

$$X_i = \frac{A_i \times c_s \times V}{A_s \times m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i —— 试样中被测组分含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A_i —— 样品溶液中被测组分的峰面积;

c_s —— 标准工作溶液中被测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);

A_s —— 标准工作溶液中被测组分的峰面积;

m —— 最终样液所代表的试样质量,单位为克(g)。

9 方法的性能指标

9.1 测定低限

本方法 2 种链霉素类药物的测定低限均为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 回收率

本方法回收率的实验数据见附录 C。

9.3 精密度

本方法精密度的实验数据见附录 C。

附录 A

(资料性附录)

电喷雾离子源参考条件¹⁾

电喷雾离子源参考条件:

- a) 雾化气:65 psi;
- b) 辅助气:65 L/min;
- c) 气帘气:28 psi;
- d) 电喷雾电压:5 500 V;
- e) 离子源温度:550 ℃。

表 A.1 被测物监测离子对、保留时间、去簇电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

| 序号 | 组分名称 | 定性离子对 m/z | 保留时间 min | 去簇电压(DP) V | 碰撞能量(CE) V | 碰撞室出口 电压(CXP) V |
|----|-------|----------------|-------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 1 | 链霉素 | 582.3/263.5 * | 8.7 | 150 | 45 | 10 |
| | | 582.3/246.5 | | 150 | 55 | 10 |
| 2 | 二氢链霉素 | 584.4/263.4 * | 8.7 | 150 | 45 | 10 |
| | | 584.4/245.5 | | 150 | 55 | 10 |

* 为定量离子对,对于不同质谱仪器,质谱参数可能存在差异,测定前应该将质谱参数优化到最佳。

1) 非商业性声明:表 B.1 所列参数是用 5500 QTRAP 质谱仪完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B

(资料性附录)

标准物质多反应检测(MRM)色谱图

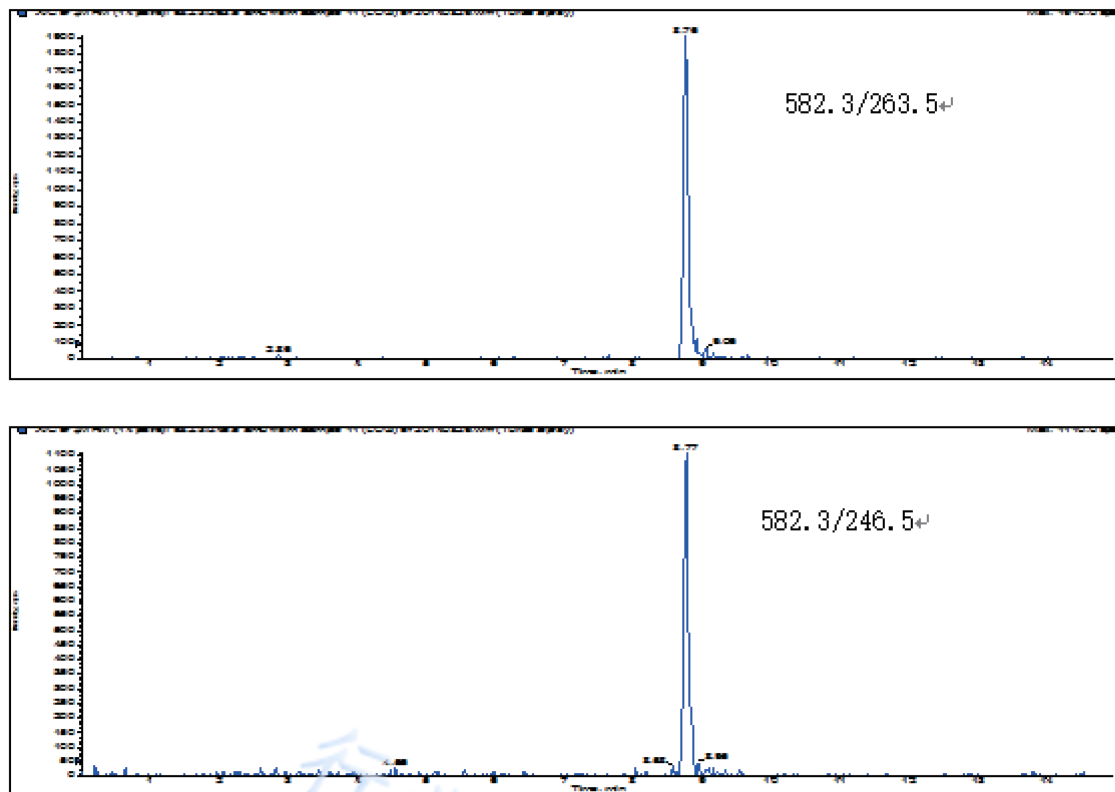


图 B.1 链霉素标准溶液的多反应检测(MRM)色谱图(提取离子流图)

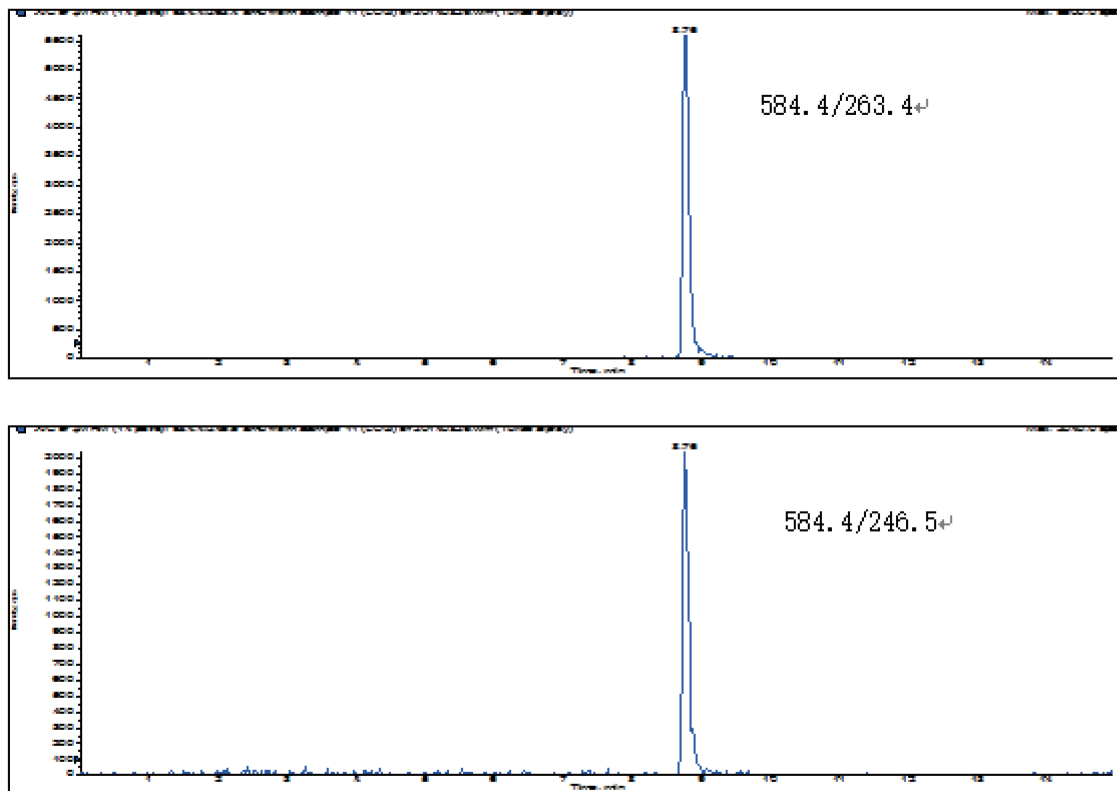


图 B.2 二氢链霉素标准溶液的多反应检测(MRM)色谱图(提取离子流图)

行业标准信息服务平台

附录 C
(规范性附录)

2 种链霉素类药物添加回收率和精密度(n=6)

表 C.1 2 种链霉素类药物在动物血清中的回收率和精密度(n=6)

| 化合物 | 添加水平/ μg/kg | 回收率范围/ % | | | | | 相对标准 偏差范围/ % |
|-------|----------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| | | 牛 | 羊 | 猪 | 兔 | 鸡 | |
| 链霉素 | 10 | 70.2~81.5 | 69.8~84.7 | 78.8~91.9 | 73.3~89.1 | 77.3~93.3 | <8.4 |
| | 20 | 73.1~83.4 | 75.6~90.0 | 76.3~89.4 | 74.8~83.8 | 74.7~88.8 | <7.2 |
| | 40 | 75.4~91.2 | 68.2~85.6 | 71.6~90.0 | 69.8~86.0 | 79.0~89.3 | <8.6 |
| 二氢链霉素 | 10 | 66.2~84.1 | 71.0~79.9 | 68.4~83.0 | 67.5~82.1 | 72.2~84.0 | <9.3 |
| | 20 | 82.1~97.0 | 88.5~93.6 | 77.0~85.6 | 82.0~94.5 | 76.4~92.6 | <7.6 |
| | 40 | 85.0~104.5 | 79.5~100.0 | 86.5~105 | 73.0~95.0 | 80.5~94.5 | <8.8 |

表 C.2 2 种链霉素类药物在动物尿液中的回收率和精密度(n=6)

| 化合物 | 添加水平/ μg/kg | 回收率范围/ % | | | | 相对标准 偏差范围/ % |
|-------|----------------|-------------|-----------|------------|-----------|--------------------|
| | | 牛 | 羊 | 猪 | 兔 | |
| 链霉素 | 10 | 69.4~83.7 | 70.0~83.0 | 77.5~93.5 | 76~90.5 | <7.4 |
| | 20 | 69.5~88.5 | 74.0~92.0 | 86.1~100.2 | 78.5~86.3 | <8.7 |
| | 40 | 84.5~90.5 | 76.0~87.0 | 82.5~93.0 | 65.8~80.3 | <7.8 |
| 二氢链霉素 | 10 | 70.2~81.5 | 65.8~84.7 | 71.8~89.1 | 71.0~81.4 | <8.5 |
| | 20 | 71.8~89.1 | 73.6~81.4 | 69.8~83 | 70.0~85.2 | <7.2 |
| | 40 | 76.0~93.3 | 76.0~86.5 | 69.2~85.2 | 73.8~85.1 | <8.2 |

表 C.3 2 种链霉素类药物在饲料中的回收率和精密度(n=6)

| 化合物 | 添加水平/ μg/kg | 回收率范围/ % | | | 相对标准 偏差范围/ % |
|-------|----------------|-------------|-----------|-----------|--------------------|
| | | 玉米粉 | 小麦粉 | 高粱粉 | |
| 链霉素 | 10 | 66.7~82.9 | 69.9~84.7 | 68.2~84.1 | <8.5 |
| | 20 | 76.7~86.5 | 69.8~84.4 | 75.0~88.3 | <7.5 |
| | 40 | 70.7~88.9 | 79.0~90.4 | 76.0~90.8 | <8.4 |
| 二氢链霉素 | 10 | 76.7~86.5 | 71.2~84.4 | 74.3~88.3 | <6.8 |
| | 20 | 80.4~95.2 | 80.4~92.4 | 74.2~91.8 | <7.0 |
| | 40 | 78.8~91.0 | 72.2~86 | 74.4~86.8 | <5.8 |