

DB45

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T 1488—2017

动物源性食品中兽药残留量的测定 液相 色谱-串联质谱法

Determination of kinds of veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin by
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2017 - 02 - 20 发布

2017 - 03 - 20 实施

广西壮族自治区质量技术监督局

发布

前 言

本标准按GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由广西壮族自治区产品质量检验研究院提出并起草。

本标准主要起草人：李暄、郭盈岑、农馥俏、干宁军、莫百春、何晓蓉、黎德勇、黄超技、褚丽琼、宁盼盼、黎志诚。

动物源性食品中兽药残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中兽药残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鱼、虾、禽等动物源性食品中西马特罗（Cimaterol）、沙丁胺醇（Salbutamol）、克伦特罗（Clenbuterol）、甲硝唑（Metronidazole）、地美硝唑（Dimetronidazole）、氯丙嗪（Chlorpromazine）、氯霉素（Chloramphenicol）和 α -玉米赤霉醇（Zeranol）残留量的测定。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中兽药残留采用乙腈、甲醇水在超声波辅助条件下提取，提取液经离心分离，正己烷去脂，液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水应符合GB/T 6682—2008规定的一级水。

4.1 甲醇：质谱级。

4.2 乙腈：质谱级。

4.3 正己烷：色谱级。

4.4 乙腈饱和正己烷溶液：乙腈与正己烷体积比 1+1 混合振荡，静置分层后，取上层溶液。

4.5 甲醇：水（5:5）溶液：甲醇与水体积比 1+1 混合振荡，静置。

4.6 甲醇：水（9:1）溶液：甲醇与水体积比 9+1 混合振荡，静置。

4.7 甲醇：水（9:1）饱和正己烷溶液：甲醇水混合液（4.6）与正己烷以体积比 1+1 混合振荡，静置分层后，取上层溶液。

4.8 西马特罗、沙丁胺醇、克伦特罗、甲硝唑、地美硝唑、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇标准品：纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.9 标准溶液储备液： $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，可使用 6 个月。配制方法如下：

a) 分别准确量取适量的克伦特罗、沙丁胺醇、西马特罗、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪标准品，用甲醇配制成 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 标准溶液储备液；

b) 分别准确量取适量的氯霉素和 α -玉米赤霉醇，用甲醇配制成 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 标准溶液储备液。

4.10 标准中间浓度工作溶液： $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，可使用 3 个月。配制方法如下：

- a) 标准中间浓度工作溶液 A: 吸取 1.00 mL A 混合标准溶液储备液 (4.9) 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇水溶液 (4.5) 稀释至刻度;
- b) 标准中间浓度工作溶液 B: 吸取 1.00 mL B 混合标准溶液储备液 (4.9) 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇水溶液 (4.5) 稀释至刻度。

4.11 基质混合标准工作溶液: 根据每种标准物质的灵敏度和仪器线性范围, 分别吸取一定量的标准中间浓度工作溶液 4.10 a) 和 4.10 b), 用空白试样提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液, 当天配制。参考浓度梯度为 0.05 ng/mL, 0.10 ng/mL, 0.50 ng/mL, 1.00 ng/mL, 5.00 ng/mL, 10.00 ng/mL。

4.12 一次性注射式滤器: 配有 0.22 μm 微孔有机滤膜。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 离心机: 4 000 r/min。
- 5.4 组织捣碎机。
- 5.5 均质器。
- 5.6 超声波清洗机。
- 5.7 砂芯漏斗: G3 号。
- 5.8 涡旋混匀器。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

取动物源性食品可食部分约 400 g 用组织捣碎机绞碎, 装入洁净容器, 密封, 标记。

6.2 试样的保存

将试样于小于或等于 -18 °C 冰箱中保存。

7 测定步骤

7.1 提取与净化

7.1.1 称取 5.00 g 试样, 置于 50 mL 聚丙烯离心管 (管 1) 中, 加入 15 mL 乙腈, 10 mL 乙腈饱和正己烷溶液 (4.4) 均质匀浆 (10 000 r/min, 2 min), 以 4 000 r/min 离心 5 min, 得到一个三相体系, 从上至下分别为正己烷相、乙腈相及残渣。用玻璃滴管将正己烷相转移于 50 mL 离心管 (管 2) 中, 乙腈相转移于另一只 50 mL 离心管 (管 3) 中。用 1 mL 乙腈萃取管 2 中正己烷, 4 000 r/min 离心 5 min 后, 将乙腈相与管 3 中的乙腈相合并。

7.1.2 另取一支 50 mL 离心管 (管 4), 加入 10 mL 甲醇: 水 (9:1) 溶液 (4.6) 洗涤均质刀头 10 s, 洗涤液移入管 1 残渣中, 再向管 1 加入 10 mL 甲醇: 水 (9:1) 饱和正己烷溶液 (4.7), 用玻棒搅动残渣, 于涡旋混匀器上涡旋提取 1 min, 超声提取 5 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取甲醇相与管 3 中乙腈相合并。

7.1.3 向管1残渣中加入15 mL超纯水超声提取5 min, 4 000 r/min离心5 min, 将水相与管3中有机相合并。将管3于4 000 r/min离心5 min, 若溶液有分层, 用玻璃滴管吸去上层正己烷相, 若无分层则直接过砂芯漏斗, 用水于50 mL容量瓶中定容, 过有机滤膜, 待液相色谱-串联质谱分析。

7.1.4 按以上步骤对同一试样进行平行试验, 并进行空白试验。

7.2 液相色谱-串联质谱条件

7.2.1 液相色谱条件

7.2.1.1 色谱柱: Synchronis C₁₈ 色谱柱, 1.7 μm, 100 mm×2.1 mm 或相当者。

7.2.1.2 柱温: 35 ℃。

7.2.1.3 A 溶液流动相: 甲醇 + 0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序参见表1。

表1 A 溶液梯度洗脱程序

时间 min	甲醇 %	0.1%甲酸水溶液 %
0.00	10	90
2.00	70	30
3.50	70	30
4.00	95	5
7.00	95	5
7.10	10	90
10.00	10	90

7.2.1.4 B 溶液流动相: 甲醇 + 水, 梯度洗脱程序参见表2。

表2 B 溶液梯度洗脱程序

时间 min	甲醇 %	水 %
0.00	10	90
1.00	10	90
5.00	95	5
8.00	95	5
8.10	10	90
10.50	10	90

7.2.1.5 流速: 0.3 mL/min。

7.2.1.6 进样量: 20 μL。

7.2.2 串联质谱条件

7.2.2.1 离子源: 电喷雾离子源。

7.2.2.2 扫描方式: A 溶液: 正离子模式; B 溶液: 负离子模式。

7.2.2.3 检测方式: 多反应监测 (MRM)。

7.2.2.4 电喷雾电压：正离子模式：4 500 V；负离子模式：-4 500 V。

7.2.2.5 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体，使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

7.2.2.6 离子源温度：550 ℃。

7.2.2.7 采集时间：20 ms。

7.2.2.8 定性离子对、定量离子对、去簇电压及碰撞能量见表 3。

表3 西马特罗、沙丁胺醇、克伦特罗、甲硝唑、地美硝唑、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇质谱参数

序号	中文名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 V
1	西马特罗	220.2/160.2	220.2/160.2	70	22
		220.2/143.1			31
2	沙丁胺醇	240.2/148.2	240.2/148.2	70	26
		240.2/222.2			13.9
3	甲硝唑	172.1/128.1	172.1/128.1	60	18.3
		172.1/82.1			31
4	地美硝唑	142.1/96.1	142.1/96.1	82	22.7
		142.1/81.1			38
5	克伦特罗	277.1/203.0	277.1/203.0	80	22.4
		277.1/168.1			38
		277.1/132.1			38
6	氯丙嗪	319.1/86.1	319.1/86.1	90	24.6
		319.1/58.1			66
7	氯霉素	320.9/152.0	320.9/152.0	-80	-24
		320.9/257.0			-17
8	α -玉米赤霉醇	321.1/277.1	321.1/277.1	-80	-29
		321.1/303.1			-29

7.3 测定

7.3.1 概述

待仪器条件稳定后，取适当基质标准溶液及样品提取液上机测定。在上述色谱条件下，西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇的参考保留时间分别为2.42 min、2.59 min、3.05 min、3.29 min、3.41 min、3.99 min、4.62 min和 5.41 min，基质标准溶液的总离子流图参见附录A，多反应监测（MRM）色谱图参见附录B。

7.3.2 液相色谱-串联质谱确证

按照液相色谱-串联质谱条件测定试样和基质混合标准工作溶液，试样中待测物质的保留时间与基质标准工作溶液中待测物质的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ ；待测化合物定性离子对的离子色谱峰的信噪比大于或等于3（ $S/N \geq 3$ ），定量离子对的离子色谱峰的信噪比大于或等于10（ $S/N \geq 10$ ）；定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准溶液相比，相对丰度允许偏差不超过表4规定的范围，则可判断试样中存在对应的被测物。定量测定采用标准曲线法。

表4 相对离子丰度的最大允许偏差

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

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

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 —— 由基质标准工作曲线而得的样液中被测组分含量的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

c_0 —— 由基质空白试验中被测组分含量的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V —— 试样溶液最终定容体积, 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: 在重复条件下获得二次独立结果的绝对差值不应超过算术平均值的15%。

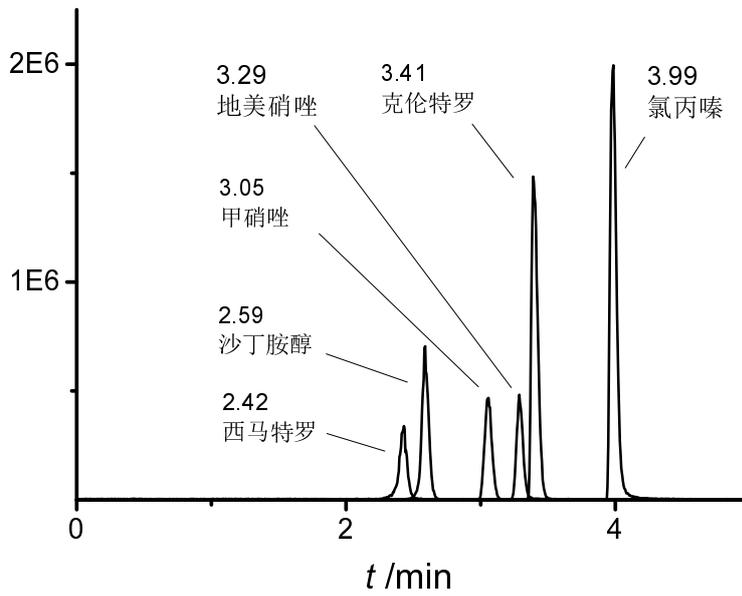
9 检出限

本标准氯丙嗪、克伦特罗、沙丁胺醇、 α -玉米赤霉醇和氯霉素检出限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$; 西马特罗、甲硝唑和地美硝唑的检出限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

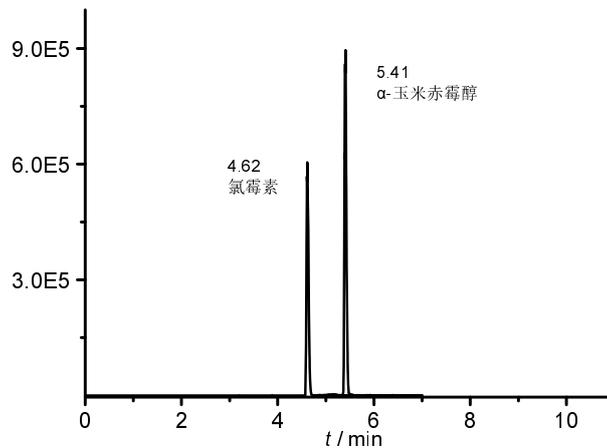
附录 A
(资料性附录)

西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇基质标准溶液的总离子流图

西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇基质标准溶液的总离子流图见图A. 1、图A. 2。



图A. 1 正离子模式下西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗和氯丙嗪基质标准溶液的总离子流图



图A. 2 负离子模式下氯霉素和 α -玉米赤霉醇基质标准溶液的总离子流图

附录 B
(资料性附录)

西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图

西马特罗、沙丁胺醇、甲硝唑、地美硝唑、克伦特罗、氯丙嗪、氯霉素和 α -玉米赤霉醇基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图见图 B.1、图 B.2、图 B.3、图 B.4、图 B.5、图 B.6、图 B.7、图 B.8。

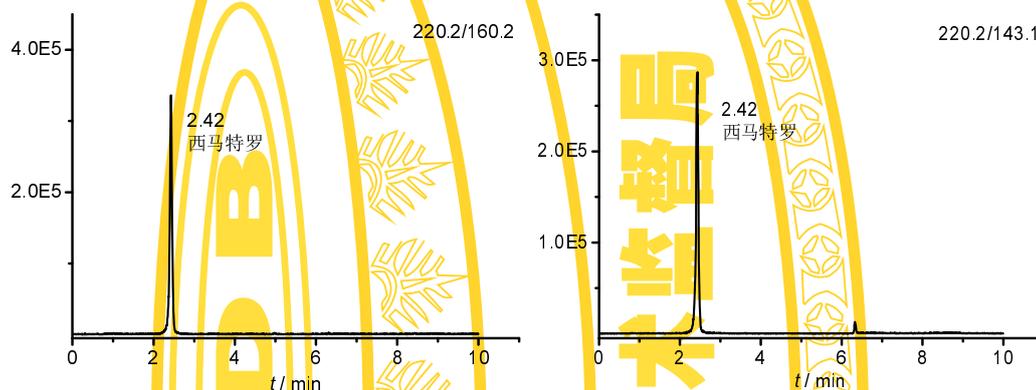


图 B.1 西马特罗基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图

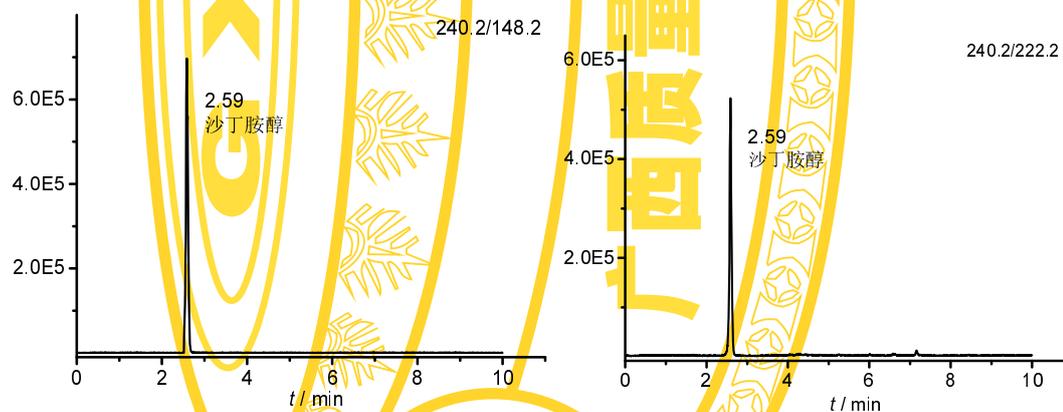
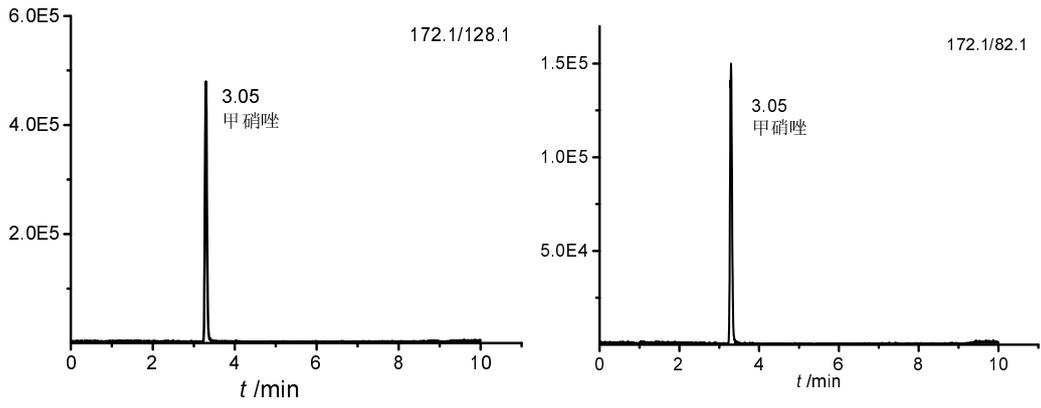
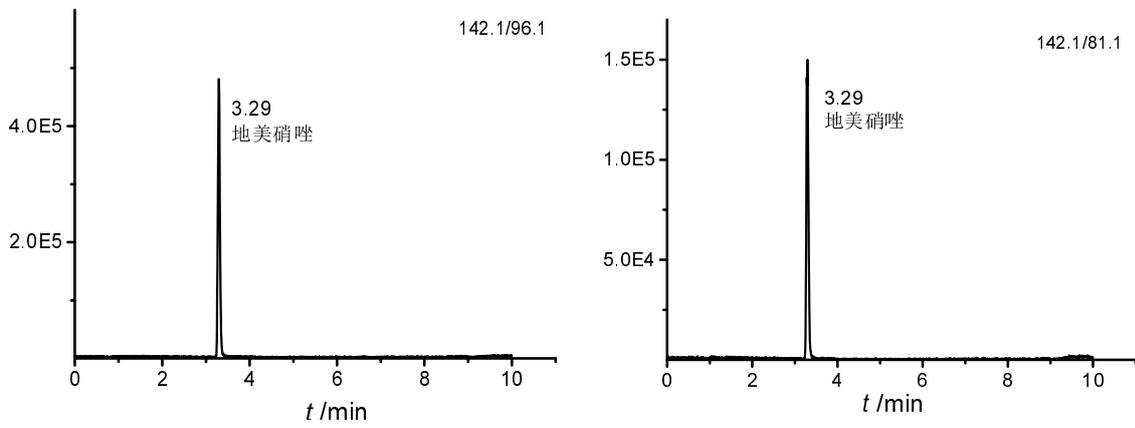


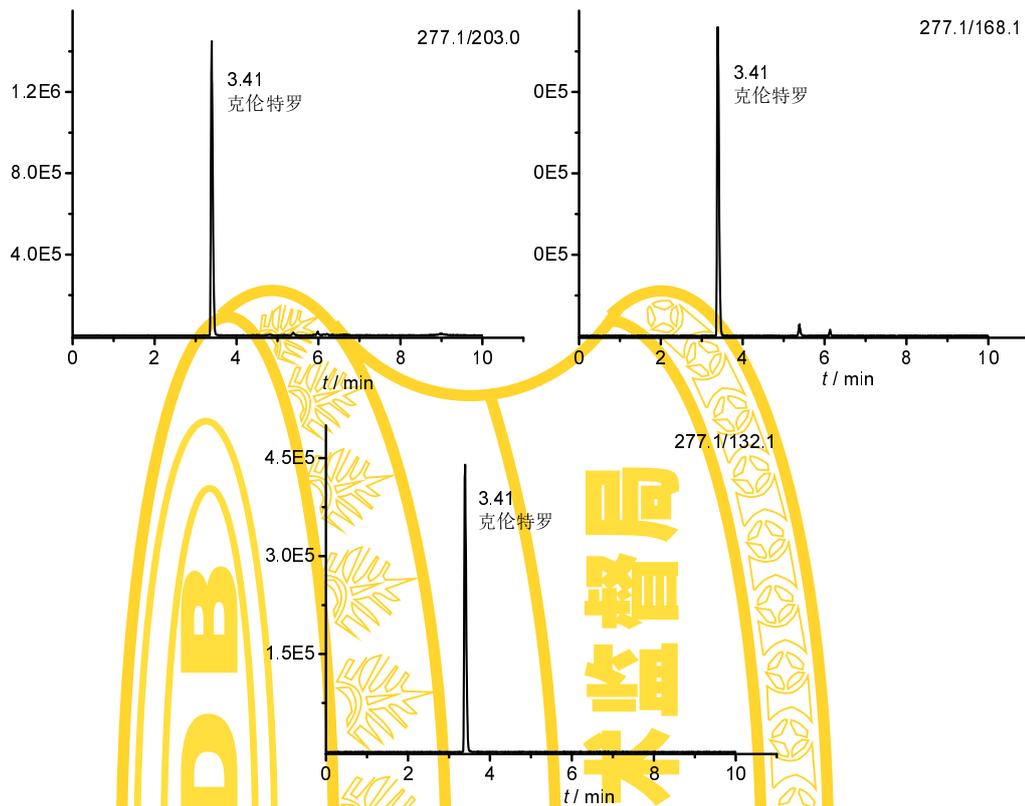
图 B.2 沙丁胺醇基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



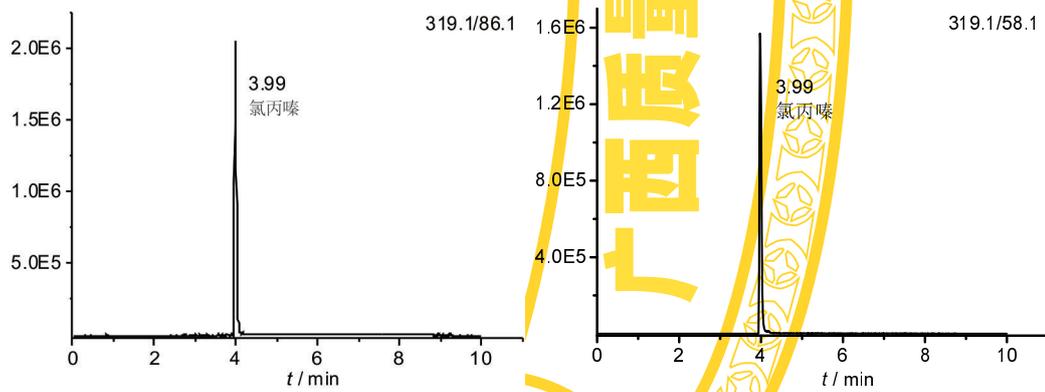
图B.3 甲硝唑基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



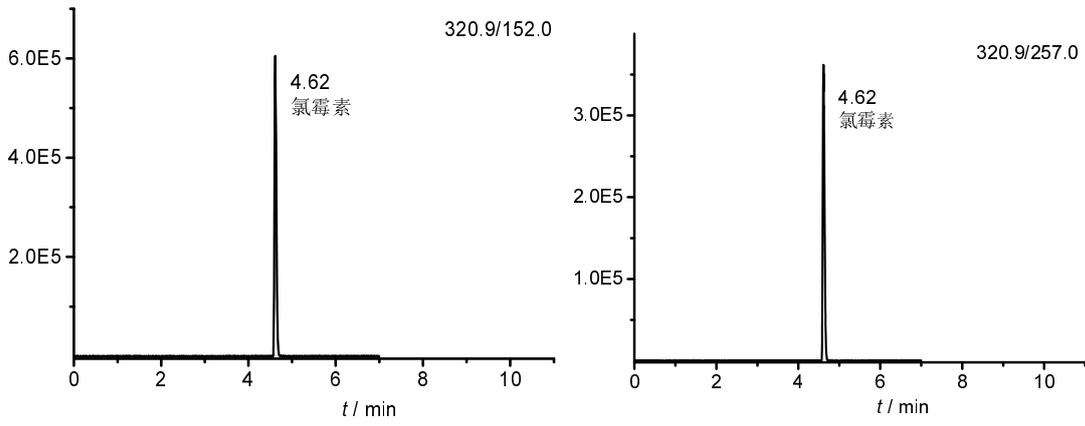
图B.4 地美硝唑基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



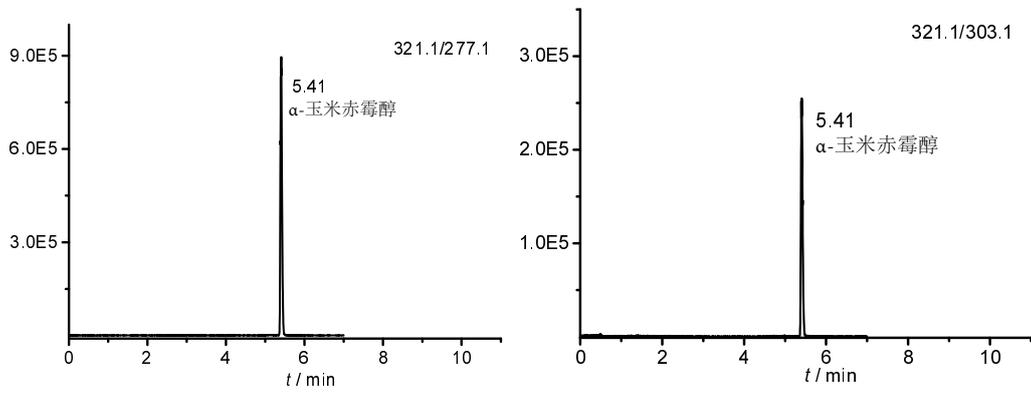
图B.5 克伦特罗基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.6 氯丙嗪基质标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.7 氯霉素基质标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图



图B.8 α-玉米赤霉醇基质标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图

中华人民共和国广西地方标准
动物源性食品中兽药残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

DB45/T 1488—2017

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究