

中华人民共和国国家标准

GB 31660.1—2019

食品安全国家标准
水产品中大环内酯类药物残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of macrolides residues in fishery products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometric method

2019-09-06 发布

2020-04-01 实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本标准系首次发布。

食品安全国家标准

水产品中大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素9种大环内酯类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于水产品中鱼、虾、蟹、贝类等的可食组织中竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素9种大环内酯类药物残留量的检测。

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

试样中大环内酯类药物的残留经乙腈提取，正己烷除脂、中性氧化铝柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

4 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

4.1.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

4.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）：色谱纯。

4.1.4 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

4.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）。

4.1.6 异丙醇（ CH_3 ）₂CHOH。

4.2 溶液配制

4.2.1 乙腈饱和正己烷：取正己烷 200 mL 于 250 mL 分液漏斗中，加入适量乙腈后，剧烈振摇，待分配平衡后，弃去乙腈层即得。

4.2.2 0.05 mol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 0.77 g，用水溶解并稀释至 200 mL。

4.2.3 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.2.4 定容液：取乙腈 20 mL 和乙酸铵溶液 80 mL，混合均匀。

4.3 标准品

竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素含量均 \geq 92.0%，吉他霉素含量 \geq 72.0%，具体见附件 A。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准贮备液：取竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星和泰乐菌素标准品各适量（相当于各活性成分约 10 mg），精密称定，分别于 100 mL 棕色量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 μ g/mL 大环内酯类药物标准贮备液。红霉素、克拉霉素和泰乐菌素-20℃以下避光保存，竹桃霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星 4℃以下避光保存，有效期 3 个月。

4.4.2 混合标准工作液：精密量取标准贮备液各 1 mL，于 10 mL 棕色量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 10 μ g/mL 大环内酯类药物混合标准工作液。4℃以下避光保存，有效期 1 个月。

4.5 材料

4.5.1 中性氧化铝固相萃取柱：2g/6mL，或相当者。

4.5.2 尼龙微孔滤膜：0.22 μ m。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01g。

5.3 氮吹仪。

5.4 旋涡混合器：3 000 r/min。

5.5 移液枪：200 μ L，1 mL，5 mL。

5.6 离心机：4 000 r/min。

5.7 梨形瓶：100 mL。

5.8 超声波振荡器。

5.9 旋转蒸发器。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

- 取均质后的供试样品，作为供试试料。
- 取均质后的空白样品，作为空白试料。
- 取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-18℃以下保存，3个月内进行分析检测。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料5g（准确至±20mg），于50 mL塑料离心管，加入乙腈20 mL，于旋涡混合器上以2 000 r/min旋涡1 min，超声5 min，以3 500 r/min离心6 min，取上清液转移至另一离心管中，残渣再加乙腈15 mL，重复提取一次，合并上清液，备用。

7.2 净化

中性氧化铝固相萃取柱预先用乙腈5 mL活化，取备用液过柱，用乙腈5 mL洗脱，收集洗脱液于梨形瓶中，加入异丙醇4 mL，40℃旋转蒸发至干。精密加入定容液2 mL溶解残余物，加乙腈饱和正己烷2 mL，转至10 mL离心管中，旋涡10 s，以3 000 r/min离心8 min，取下层清液过0.22 μm滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量，用空白样品提取液溶解稀释，配制成大环内酯类药物浓度为1 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL和1 000 ng/mL的系列基质标准工作溶液；现配现用。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈色谱柱（150 mm×2.0 mm，5 μm）或相当者；
- b) 流动相：A：0.1%的甲酸水溶液，B：乙腈，梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速：0.2 mL/min；
- d) 柱温：30 ℃；
- e) 进样量：10 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	0.1%甲酸水溶液, %	乙腈, %
0	95	5
2	95	5
10	5	95
11	95	5
16	95	5

7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾（ESI）离子源；
 b) 扫描方式：正离子扫描；
 c) 检测方式：多反应监测；
 d) 喷雾电压：4 000 V；
 e) 离子传输毛细管温度：350 ℃；
 f) 雾化气压力：248 KPa；
 g) 辅助气压力：48 KPa；
 h) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表2。

表2 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
竹桃霉素 (OLD)	688.4/158.1 (28) 688.4/544.3 (16)	688.4/544.3 (16)
红霉素 (ERM)	734.4/158.2 (28) 734.4/576.2 (18)	734.4/576.2 (18)
克拉霉素 (CLA)	748.5/158.1 (28) 748.5/590.4 (18)	748.5/158.1 (28)
阿奇霉素 (AZI)	749.5/158.0 (36) 749.5/591.4 (27)	749.5/158.0 (36)
吉他霉素 (KIT)	772.4/109.4 (33) 772.4/174.3 (30)	772.4/174.3 (30)
交沙霉素 (JOS)	828.3/109.4 (35) 828.3/174.1 (32)	828.3/174.1 (32)
螺旋霉素 (SPI)	843.4/174.2 (36) 843.4/142.1 (40)	843.4/174.2 (36)
替米考星 (TIL)	869.5/137.7 (41) 869.5/696.3 (36)	869.5/696.3 (36)
泰乐菌素 (TYL)	916.4/174.2 (36) 916.4/772.2 (29)	916.4/174.2 (36)

7.4.3 测定法

a) 定性测定

在同样测试条件下，试样溶液中大环内酯类药物的保留时间与标准工作液中大环内酯类药物的保留时间之比，偏差在±5%以内，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表3要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对离子丰度, %	允许偏差, %
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

b) 定量测定

按7.4.1和7.4.2设定仪器条件，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，作单点或多点校准，按外标法计算试样中药物的残留量，定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片。标准溶液特征离子质量色谱图参见附录B。

7.5 空白试验

除不加试料外，均按上述测定步骤进行。

8 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

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

C_s —标准工作液测得的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A —试样溶液中被测组分峰面积；

A_s —标准工作液被测组分峰面积；

V —试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试料质量，单位为克（ g ）。

计算结果需扣除空白值。测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；红霉素、替米考星定量限为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，竹桃霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、泰乐菌素定量限为 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

红霉素、替米考星在 $2.0 \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $70\% \sim 120\%$ ；竹桃霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、泰乐菌素在 $4.0 \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录A
(资料性附录)
药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

表 A.1 9 种大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
竹桃霉素	Oleandomycin	$C_{35}H_{61}NO_{12}$	2751-09-9
红霉素	Erythromycin	/	110-07-8
克拉霉素	Clarithromycin	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	81103-11-9
阿奇霉素	Azithromycin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	83905-01-5
吉他霉素	Kitasamycin	/	69-23-8
交沙霉素	Josamycin	$C_{42}H_{69}NO_{15}$	16846-24-5
螺旋霉素	Spiramycin	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	8025-81-8
替米考星	Tilmicosin	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	108050-54-0
泰乐菌素	Tylosin	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	1401-69-0

附录B
 (资料性附录)
 标准溶液特征离子质量色谱图

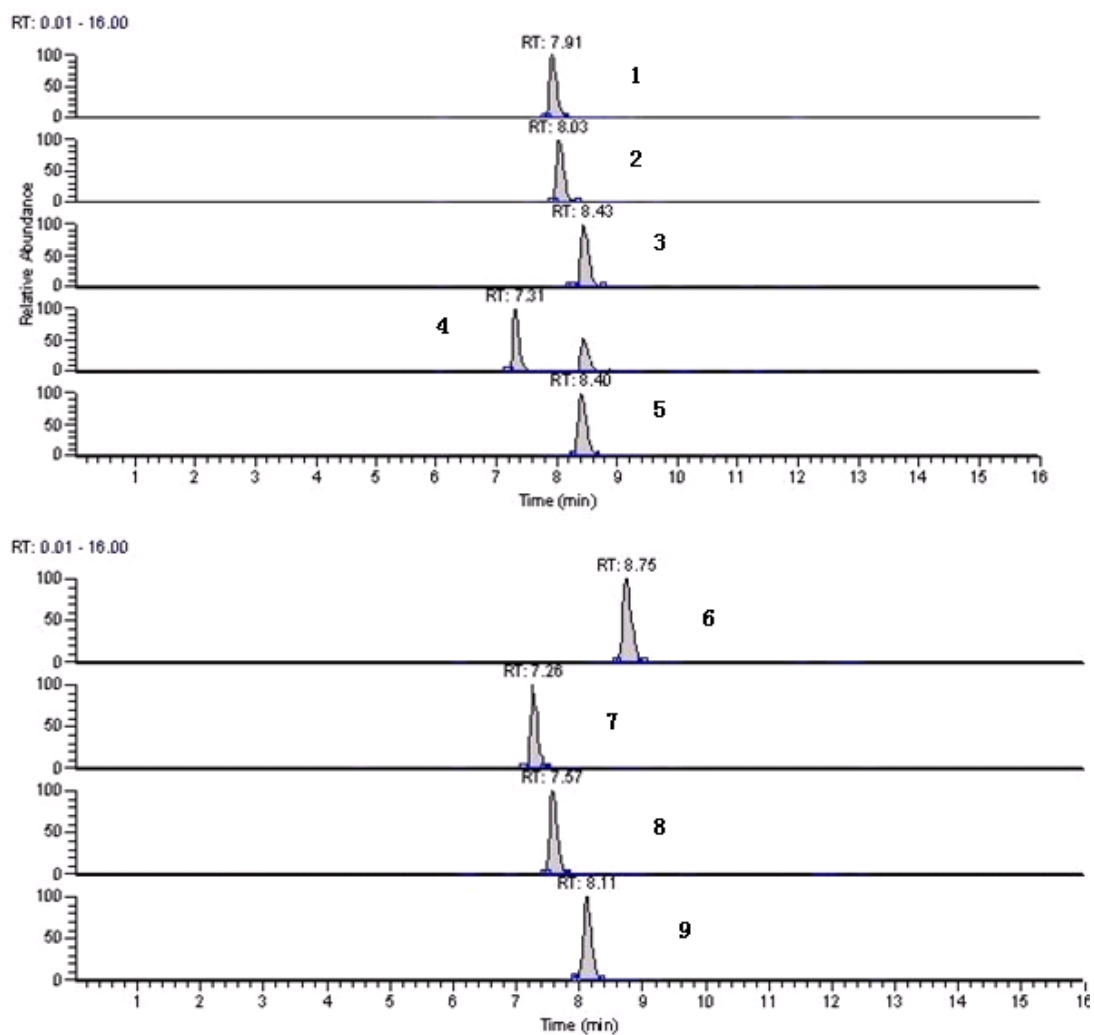


图 B.1 混合标准溶液的特征离子质量色谱图

(1.竹桃霉素 1ng/mL 2.红霉素 1ng/mL 3.克拉霉素 1ng/mL 4.阿奇霉素 1ng/mL 5.吉他霉素 1ng/mL 6.交沙霉素 1ng/mL 7.螺旋霉素 1ng/mL 8.替米考星 1ng/mL 9.泰乐菌素 1ng/mL)