



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4747.3—2017

进出口食用动物大环内酯类药物残留 量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of macrolide residues of live animals for import and export—
LC-MS/MS

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本部分为 SN/T 4747 系列标准的第 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：宓捷波、李淑静、黄晨、王飞、张敏、许泓。

进出口食用动物大环内酯类药物残留 量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

SN/T 4747 的本部分规定了进出口食用动物中红霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、交沙霉素、吉他霉素、竹桃霉素的检测方法。

本部分适用于出入境检验检疫工作中牛、羊、猪、鸡血清和牛、猪、羊尿液中红霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、交沙霉素、吉他霉素、竹桃霉素的检测。

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 试剂和材料

3.1 甲醇:色谱纯。

3.2 乙腈:色谱纯。

3.3 叔丁基甲醚:分析纯。

3.4 磷酸氢二钠:分析纯。

3.5 甲醇-水(1+1)定容溶液:量取 50 mL 甲醇(3.1)和 50 mL 水混合均匀。

3.6 标准物质:红霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、交沙霉素、吉他霉素、竹桃霉素和内标物质罗红霉素(见附录 A),纯度 $\geq 95\%$ 。

3.7 标准储备液:0.1 mg/mL。称取 3.6 所述各标准物质,用甲醇分别配成 0.1 mg/mL 的标准储备溶液, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.8 混合标准工作溶液:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 3.7 所述各标准储备溶液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度, $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.9 内标储备溶液:0.1 mg/mL。称取 1.0 mg 罗红霉素于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,混匀。 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.10 内标工作溶液:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取 1 mL 3.9 所述内标储备液于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。

3.11 饱和磷酸氢二钠溶液:称取 22 g 磷酸氢二钠,溶于 100 mL 水中。

3.12 15 mL 具塞离心管。

3.13 0.22 μm 滤膜(有机系)。

3.14 水:为 GB/T 6682 规定的一级水。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

4.2 天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

4.3 氮吹浓缩仪。

4.4 高速冷冻离心机(最高转速可达 30 000 g)。

5 样品的采集与保存

5.1 血样的采集

采集动物血样,待自然凝固后分离血清,分装于小管,加盖密封。

5.2 尿样的采集

采集动物尿样,于 4 °C,30 000 g 离心 10 min 后,上清分装于小管,加盖密封。

5.3 试样的保存

将分装后的血清、尿样于-15 °C~-20 °C 保存。

6 测定步骤

6.1 提取

6.1.1 血清试样

称取约 1 g 血清(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 50 μ L 内标工作溶液(3.10),再加入 2 mL 叔丁基甲醚,振荡 3 min,4 °C 18 750 g 离心 5 min,取叔丁基甲醚层置于 15 mL 离心管中,用 2 mL 叔丁基甲醚重复提取 2 次,合并提取液,40 °C 水浴氮吹至近干,以 1.0 mL 甲醇-水定容液(3.5)复溶,过 0.22 μ m 滤膜,待测。

6.1.2 尿样

称取约 1 g 尿样(精确至 0.01 g),加入 1 mL 饱和磷酸氢二钠溶液用以调节 pH \geq 7,加入 50 μ L 内标工作溶液(3.10),再加入 2 mL 叔丁基甲醚,振荡 3 min,4 °C 18 750 g 离心 5 min,取叔丁基甲醚层置于 15 mL 离心管中,用叔丁基甲醚重复提取 2 次,合并提取液,40 °C \pm 1 °C 水浴氮吹至近干,以 1.0 mL 定容液(3.5)复溶,过 0.22 μ m 滤膜,待测。

6.2 基质工作曲线的配制

取空白试样,不加内标工作溶液(3.10),按 6.1.1 或 6.1.2 进行提取,获得基质提取液。分别吸取 2.5 μ L、5.0 μ L、10 μ L、20 μ L、50 μ L 混合标准工作溶液(3.8),依次加入相应试剂瓶中,再分别加入 50 μ L 内标工作溶液(3.10),用基质提取液定容至 1.0 mL,获得 2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 的系列基质标准混合溶液。

6.3 测定条件

6.3.1 液相色谱参考条件

6.3.1.1 色谱柱:Zorbax SB-C₁₈,3.5 μ m,2.1 \times 150 mm,或相当者。

6.3.1.2 流速:0.3 mL/min。

6.3.1.3 柱温箱温度:25 °C \pm 1 °C。

6.3.1.4 进样量:20 μ L。

6.3.1.5 流动相:0.15%甲酸水溶液(A)和乙腈(B)。梯度洗脱条件见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95	5
0.5	95	5
3.0	40	60
3.1	5	95
6	5	95
6.1	95	5
12	95	5

6.3.2 质谱条件¹⁾

6.3.2.1 离子源:电喷雾离子源。

6.3.2.2 扫描方式:正离子扫描。

6.3.2.3 检测方式:多反应监测。

6.3.2.4 电喷雾电压:5 500 V。

6.3.2.5 气帘气压力:172.37 kPa(25 psi)。

6.3.2.6 辅助气压力:GS1:40 psi;GS2:45 psi。

6.3.2.7 离子源温度:600 ℃。

6.3.2.8 定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量,见表2。

表2 7种大环内酯类抗生素定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量

被测物名称	保留时间	离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/V
红霉素	5.0	734.5/576.5	50	29
		734.5/158.3	50	41
螺旋霉素	4.5	843.4/174.0	80	53
		843.4/142.1	80	51
泰乐菌素	5.2	916.5/174.1	90	53
		916.5/772.6	90	42
替米考星	4.7	869.6/174.2*	80	60
		869.6/696.4	80	55
交沙霉素	5.5	828.4/174.1*	80	46
		828.4/109.0	80	57
吉他霉素	5.3	772.3/174.2	90	46
		772.3/215.2*	90	42
竹桃霉素	4.9	688.4/158.2*	60	60
		688.4/544.3	60	42
* 为定量离子对。				

1) 非商业性声明:所列质谱参数是在 API4000+质谱仪上完成的,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。

6.3.3 液相色谱-串联质谱测定

6.3.3.1 定性测定

在相同试验条件下,样品溶液中的被测物的保留时间与基质标准工作溶液中被测物的保留时间比值,偏差在±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

6.3.3.2 定量测定

在相同的仪器工作条件下,用基质标准工作溶液分别进样,以各标准溶液中被测组分峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标,以各标准溶液被测组分浓度(ng/mL)与内标物浓度的比值为横坐标,绘制标准工作曲线。用基质标准工作曲线对样品进行定量,应使样品溶液中大环内酯类药物的响应值在仪器测定的线性范围内。在上述色谱和质谱条件下,大环内酯类药物的参考保留时间见表2。典型的提取离子色谱图参见附录B。

6.4 空白试验

除不加试样和内标溶液外,均按上述操作步骤进行。

7 结果计算

各大环内酯类药物的含量用色谱数据处理软件内标法计算或按式(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 ——试样中大环内酯类药物残留量,单位为微克每千克(μg/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 ——最终样液代表的试样质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

8 检测限和定量限、回收率和精密度

8.1 检测限和定量限

本方法对血清和尿样中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、交沙霉素、吉他霉素、替米考星、竹桃霉素的检测限为 $1.5 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

8.2 回收率和精密度

牛、猪、羊、鸡血清和牛、猪、羊尿液中 7 种大环内酯类药物的添加回收率和精密度参见附录 C。

附 录 A
(规范性附录)
标准物质的基本信息

7 种大环内酯类标准物质的基本信息见表 A.1。

表 A.1 7 种大环内酯类标准物质的基本信息

序号	化合物中英文名称	CAS 编号	分子式
1	红霉素(A,B,C 混合物) Erythromycin(mixture A,B,C)	114-07-8	$C_{37}H_{67}NO_{13}$
2	螺旋霉素 spiramycin	8025-81-8	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$
3	泰乐菌素酒石酸盐 Tylosin tartrate	74610-55-2	$C_{46}H_{77}NO_{17}$
4	替米考星 tilmicosin	108050-54-0	$C_{45}H_{80}N_2O_{12}$
5	交沙霉素 josamycin	16846-24-5	$C_{42}H_{69}NO_{15}$
6	竹桃霉素磷酸盐 Oleandomycin phosphate	7060-74-4	$C_{35}H_{61}NO_{12}$
7	吉他霉素-水化合物 Kitasamycin hydrate	1392-21-8	$C_{40}H_{67}NO_{14}$

附录 B
(资料性附录)

7 种大环内酯类药物标准物质的多反应监测色谱图

7 种大环内酯类药物标准物质的多反应监测色谱图,见图 B.1~图 B.7。

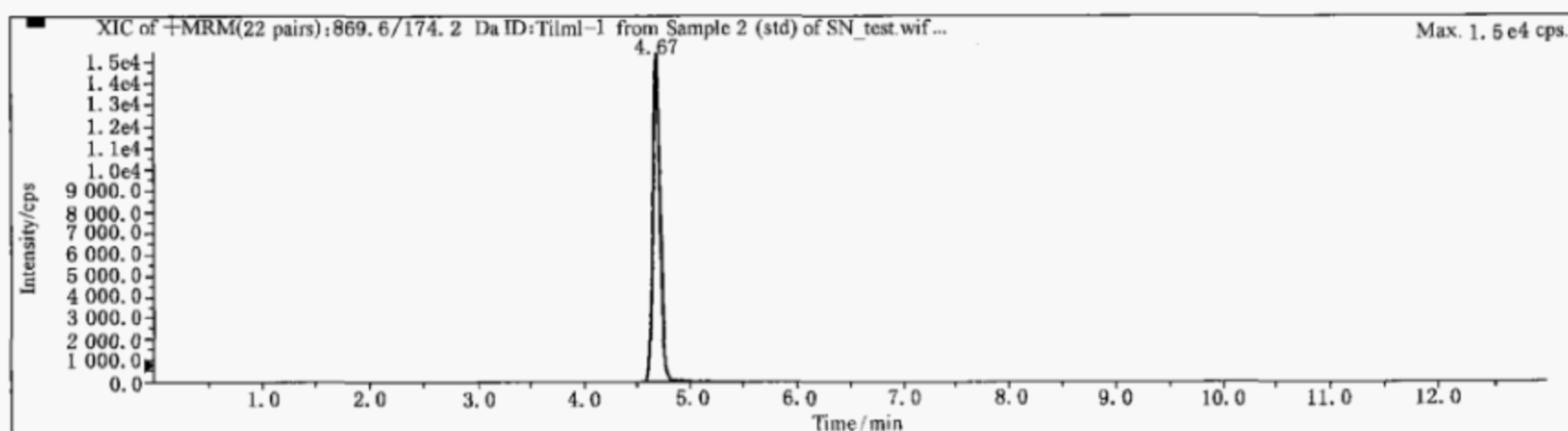


图 B.1 红霉素标准物质的提取离子色谱图

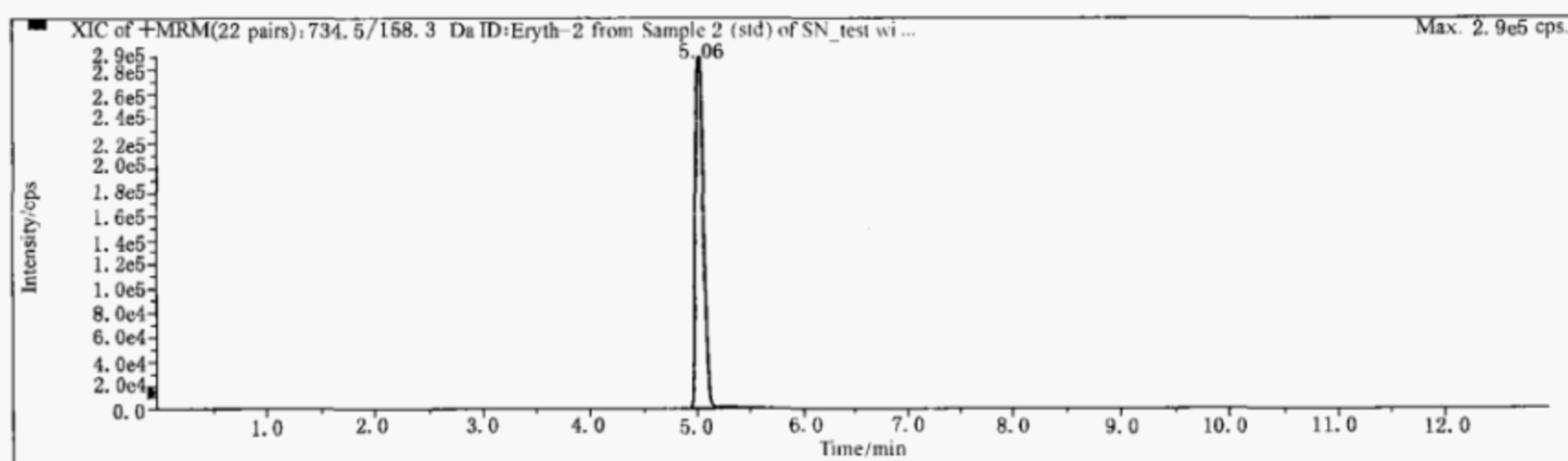


图 B.2 螺旋霉素标准物质的提取离子色谱图

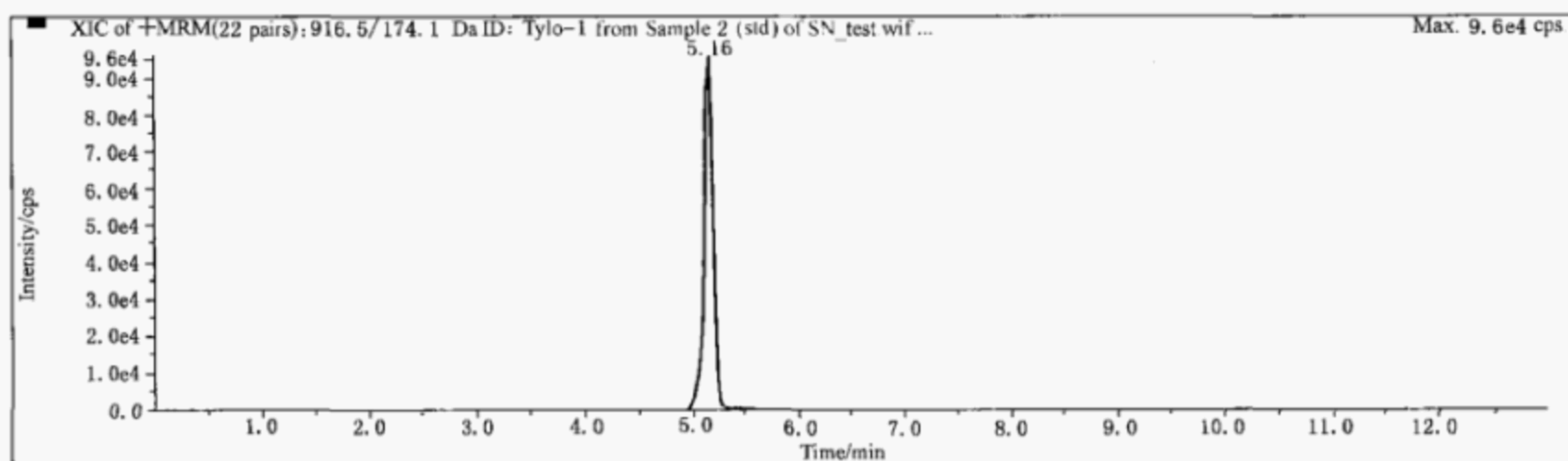


图 B.3 泰乐菌素标准物质的提取离子色谱图

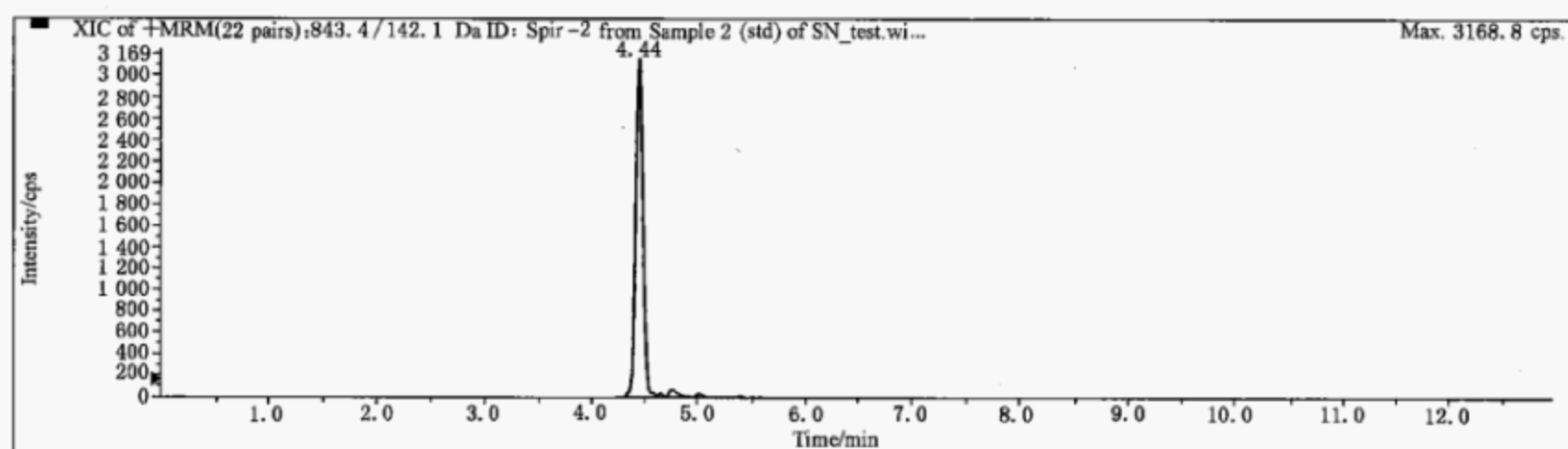


图 B.4 替米考星标准物质的提取离子色谱图

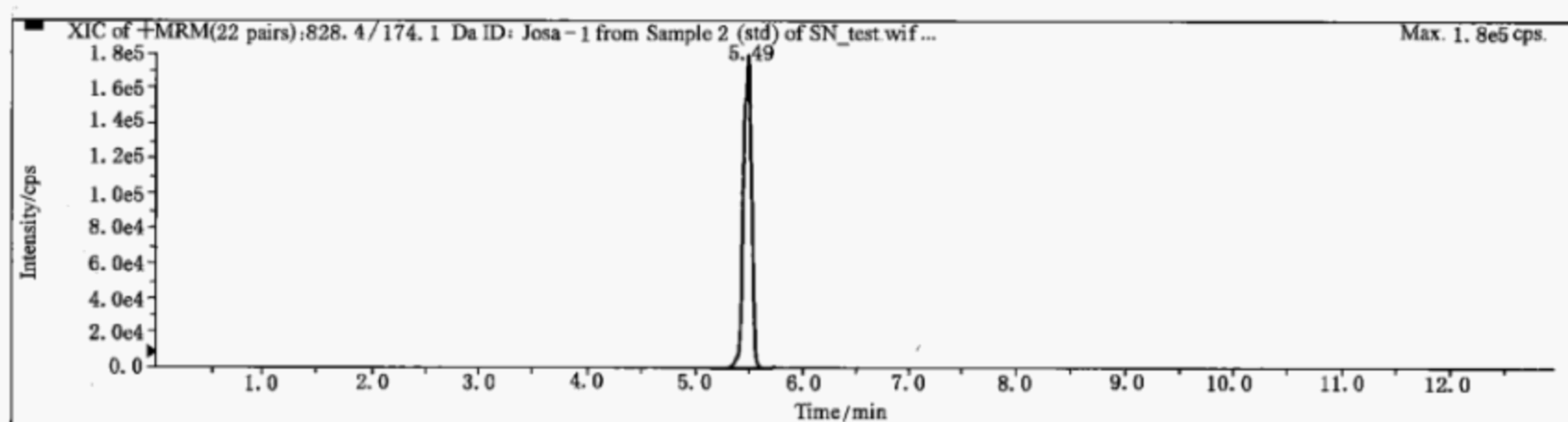


图 B.5 交沙霉素标准物质的提取离子色谱图

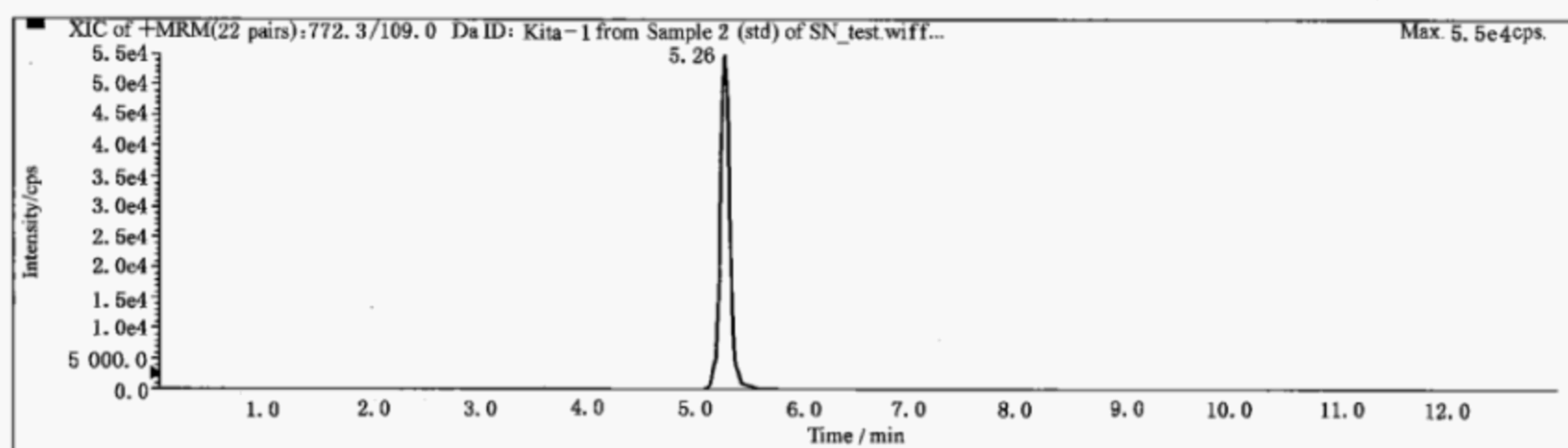


图 B.6 吉他霉素标准物质的提取离子色谱图

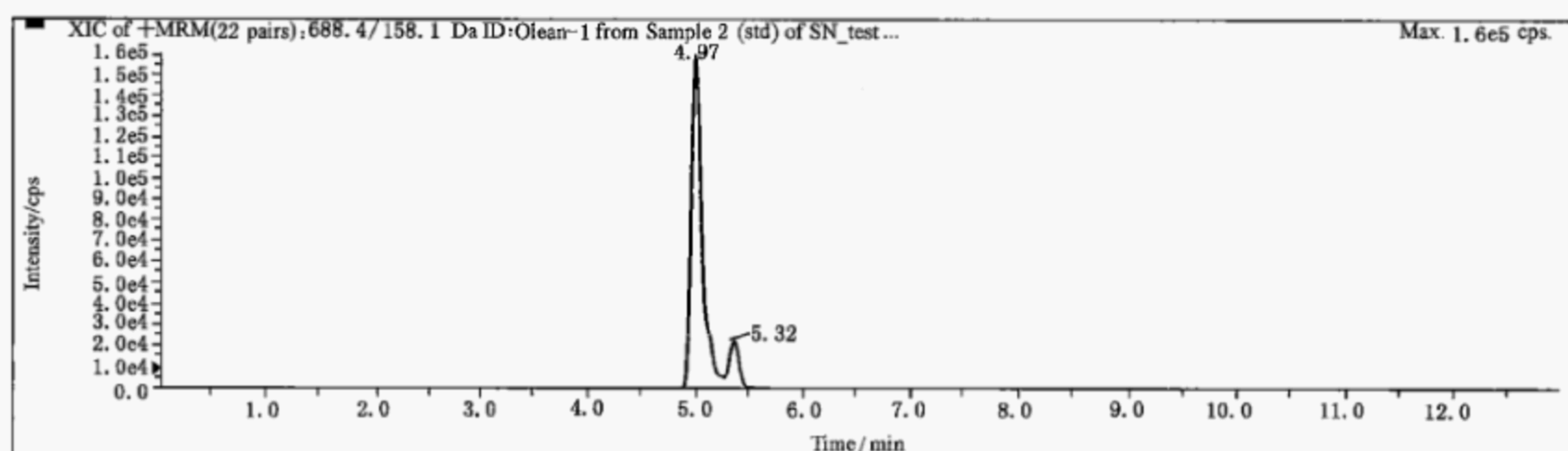


图 B.7 竹桃霉素标准物质的提取离子色谱图

附 录 C

(资料性附录)

7 种大环内酯类药物的添加浓度及平均回收率

本方法中 7 种大环内酯类药物的添加浓度及平均回收率的实验数据,见表 C.1~表 C.4。

表 C.1 牛血清和尿样中 7 种大环内酯类药物的添加回收率和精密度

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	牛尿液		牛血清	
		回收率	RSD/%	回收率	RSD/%
红霉素	5	72%~102%	11.1	87.4%~108.4%	6.1
	10	70.6%~98.5%	10.1	75.4%~106%	9.5
	20	80%~95.5%	5.1	86%~106%	6.6
螺旋霉素	5	76%~108%	12.6	80.2%~106%	8.3
	10	73%~105%	13.5	83.1%~113%	8.9
	20	70.5%~101%	12.7	84%~107%	7.8
替米考星	5	76%~109%	12.3	86.6%~106.8%	6.7
	10	75.7%~106%	11.7	89.2%~102%	4.6
	20	81%~101%	7.5	84.5%~103.5%	7.1
吉他霉素	5	70.4%~97.2%	11.0	87.2%~103.2%	6.0
	10	75.3%~106%	11.6	86.3%~105%	5.3
	20	70.5%~97%	11.1	79%~105%	8.0
泰乐菌素	5	82%~106%	8.0	73.2%~104.2%	12.9
	10	78%~97%	7.5	82.3%~105%	6.3
	20	71%~93%	9.5	84%~106%	8.6
交沙霉素	5	80%~99.8%	7.7	78.4%~107.2%	9.7
	10	78.9%~100%	8.3	83.5%~104%	8.5
	20	82%~98.5%	5.1	81%~106.5%	9.9
竹桃霉素	5	78%~99.4%	8.0	80.8%~103.4%	10.3
	10	84.9%~94.8%	4.0	85%~101%	7.1
	20	88%~107%	6.6	87%~110%	10.9

表 C.2 猪血清和尿样中 7 种大环内酯类药物的添加回收率和精密度

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	猪尿液		猪血清	
		回收率	RSD/%	回收率	RSD/%
红霉素	5	74.8%~108.6%	13.4	71%~106.2%	13.3
	10	74.8%~106%	12.6	78.6%~109%	12.1
	20	77%~108%	10.3	76.5%~108%	12.3
螺旋霉素	5	84.2%~107.2%	7.5	70.8%~106.4%	14.2
	10	73.9%~108%	13.6	72.1%~104%	12.2
	20	85.5%~106%	7.2	71%~110%	12.5

表 C.2 (续)

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	猪尿液		猪血清	
		回收率	RSD/%	回收率	RSD/%
替米考星	5	74.2%~104.4%	11.1	72.6%~104.8%	10.2
	10	76.8%~103%	10.3	74.8%~99.8%	8.9
	20	78%~101.5%	8.2	76%~102.5%	8.1
吉他霉素	5	70.8%~91.6%	8.3	72.2%~92%	9.0
	10	77%~98.5%	9.1	71%~98.2%	10.7
	20	77%~97%	9.0	71.5%~92.5%	11.3
泰乐菌素	5	71.4%~104.2%	12.9	70.4%~107.6%	14.4
	10	71%~99.8%	10.7	87.7%~106%	5.1
	20	85.5%~103%	6.8	70.5%~104%	14.8
交沙霉素	5	75%~99.8%	8.6	71.6%~105.2%	9.2
	10	76.7%~94.6%	6.6	84.6%~101%	5.0
	20	78.5%~98%	8.1	84%~97%	4.2
竹桃霉素	5	78.4%~107%	7.7	81.6%~109.4%	10.3
	10	78%~109%	11.6	76.7%~109%	10.6
	20	74%~106.5%	9.7	74.5%~110%	13.0

表 C.3 羊血清和尿样中 7 种大环内酯类药物的添加回收率和精密度

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	羊尿液		羊血清	
		回收率	RSD/%	回收率	RSD/%
红霉素	5	87.4%~107.8%	6.2	79.4%~106.8%	8.4
	10	89%~105%	5.1	77.1%~102%	8.4
	20	85.5%~107.5%	7.0	81%~96.5%	7.0
螺旋霉素	5	78.2%~108.6%	9.4	72.8%~106.8%	12.9
	10	79%~107%	10.2	81.2%~108%	9.1
	20	89.7%~101%	5.1	72%~105.5%	12.1
替米考星	5	79.2%~106%	9.0	80.6%~110%	9.8
	10	85.4%~101%	5.6	86.1%~111%	8.8
	20	88%~106.5%	6.2	82%~107.5%	8.6
吉他霉素	5	86.2%~103%	5.0	77%~107%	12.0
	10	87.3%~101%	4.3	82.3%~107%	7.2
	20	85.5%~97.5%	5.1	85.5%~103%	6.5
泰乐菌素	5	86.6%~103.2%	5.2	78.8%~101.6%	7.6
	10	77.6%~102%	7.2	83.9%~108%	7.2
	20	82.2%~109%	8.1	88%~109.5%	6.4
交沙霉素	5	75.4%~106.2%	9.4	84.8%~108.6%	7.3
	10	85.1%~101%	5.2	88.4%~107%	6.2
	20	82.5%~105.5%	8.0	87%~105%	5.2

表 C.3 (续)

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	羊尿液		羊血清	
		回收率	RSD/%	回收率	RSD/%
竹桃霉素	5	72.4%~107%	15.7	70.4%~106.6%	12.4
	10	72.1%~109%	12.8	83.5%~108%	11.1
	20	70.5%~109.5%	16.2	71%~105%	13.6

表 C.4 鸡血清中 7 种大环内酯类药物的添加回收率和精密度

名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	鸡血清	
		回收率	RSD/%
红霉素	5	79.6%~104.2%	10.0
	10	79.6%~110%	12.4
	20	70%~98%	11.0
螺旋霉素	5	73.4%~109.4%	12.7
	10	74.6%~106%	10.8
	20	71.5%~110%	14.0
替米考星	5	77.8%~101.8%	9.0
	10	79.2%~107%	10.2
	20	79%~94%	6.5
吉他霉素	5	84.4%~105.4%	8.2
	10	77.1%~108%	12.1
	20	73%~106.5%	11.5
泰乐菌素	5	74.8%~109.6%	11.7
	10	75.7%~107%	10.5
	20	72.5%~94.5%	7.1
交沙霉素	5	73%~104%	10.2
	10	75.5%~91.4%	6.7
	20	78.5%~97.5%	5.9
竹桃霉素	5	72.6%~97.2%	8.7
	10	78.6%~106%	11.3
	20	71%~106%	15.4

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食用动物大环内酯类药物残留
量的测定 液相色谱-质谱/质谱法
SN/T 4747.3—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2018年5月第一版 2018年5月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-33349 定价 18.00 元



SN/T 4747.3—2017