



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4521—2016

出口番茄酱中链霉素和双氢链霉素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in
tomato paste for export—LC-MS/MS method

2016-06-28 发布

2017-02-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：巩志国、季新诚、苏敏、李世雨、谢文、王静静、齐冬琴、叶青。

出口番茄酱中链霉素和双氢链霉素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了番茄酱中链霉素和双氢链霉素的测定——液相色谱-质谱/质谱法。

本标准适用于番茄酱中链霉素和双氢链霉素残留量的测定。

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实验方法

3 方法提要

采用磷酸盐缓冲溶液提取链霉素和双氢链霉素,经硅藻土吸附和串联双柱固相萃取净化相结合的处理方法净化,用液相色谱-质谱/质谱仪进行测定和确证,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇和乙腈:色谱级。

4.2 甲酸:纯度 98%,色谱级。

4.3 磷酸:优级纯。

4.4 乙二胺四乙酸二钠。

4.5 盐酸:优级纯。

4.6 磷酸二氢钾。

4.7 磷酸盐缓冲溶液(pH=4.8):称取 1.36 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶解到 950 mL 水中,用 1 mol/L 的盐酸(HCl)调节 pH 为 4.8,然后加入 0.15 g 的乙二胺四乙酸二钠,充分溶解,最后用水去定容到 1 000 mL。

4.8 3%的甲酸甲醇溶液:取 3.0 mL 的甲酸,用甲醇定容至 100 mL。

4.9 1 mol/L 的盐酸:取 8.5 mL 的盐酸,用水定容至 100 mL。

4.10 乙腈-水(50+50,体积比,含 0.1%甲酸):量取 50 mL 水和 50 mL 乙腈混匀,并加入 0.1 mL 甲酸。

4.11 0.15%的甲酸溶液:量取 1.5 mL 甲酸,用水定容至 1 L。

4.12 50%甲醇水溶液:量取 50 mL 水和 50 mL 甲醇混匀。

4.13 标准品:链霉素(Streptomycin)(CAS 号 57-92-1)和双氢链霉素(Dihydrostreptomycin)(CAS 号 128-46-1);纯度:≥98%。

4.14 标准储备液:称取适量 4.13 标准品(精确至 0.1 mg),用 0.3%的甲酸水配制成 500 mg/L 的储备

液,于 0℃~4℃冰箱中避光保存。

4.15 标准工作液:根据需要用空白样品溶液将标准储备液稀释成:0.05 mg/L,0.10 mg/L,0.20 mg/L,0.40 mg/L,0.80 mg/L 的标准系列工作溶液。现用现配。

4.16 固相萃取柱:反相固相萃取柱 1:Strata-X(500 mg/6 mL)或 HLB(200 mg/6 mL)和弱阳离子交换固相萃取 2:Strata-X-CW(200 mg/6 mL)或 WCX(150 mg/6 mL)。

4.17 再生纤维素微孔滤膜:0.2 μm。

4.18 硅藻土(40 μm~60 μm)。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 pH 计。

5.3 固相萃取装置(SPE)。

5.4 分析天平:感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

5.5 振荡器。

5.6 超声仪。

5.7 离心机。

5.8 涡旋仪。

5.9 氮吹仪。

6 试样制备和保存

从所取全部样品中取出有代表性样品约 500 g,混合均匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样于-18℃冷冻保存。

在抽样和制样的操作中,应防止样品污染或发生残留物含量的变化。

7 测定步骤

7.1 样品处理

7.1.1 提取

称取 5.00 g 样品,加入提取液磷酸盐缓冲溶液(4.7)于样品中,定容至 20 mL。涡旋仪上涡旋 1 min,超声 30 min,以 8 000 r/min 离心 10 min,离心后的上清液待后续净化。

7.1.2 初净化

取 10.0 mL 7.1.1 中离心后的上清液于 15 mL 的离心管中,同时往离心管中加入 1.0 g 的硅藻土,充分涡旋 1 min,超声 5 min,以 6 000 r/min 离心 10 min,离心后的上清液待再净化。

7.1.3 串联双柱再净化

依次用 6.0 mL 甲醇,6.0 mL 水分别活化反相固相萃取柱和弱阳离子交换固相萃取柱,待甲醇和水活化溶液全部流出后,用固相萃取柱转接头串接好反相柱(在上部:柱 1)和弱阳离子交换柱(在下部:柱 2),取 7.1.2 中离心后待净化的上清液 4.0 mL 加入柱 1 中,控制流速约为 1.0 mL/min 通过两串接的

固相萃取柱。待净化液全部流出后,再加入 6.0 mL(每次加 3.0 mL,加 2 次)的提取液磷酸盐缓冲溶液(4.7)于柱 1 中。等待柱 1 中淋洗液全部流出后,从上部去除柱 1,在柱 2 中依次加入 6.0 mL(每次加 3.0 mL,加 2 次)的水和 3.0 mL 的 50% 甲醇水淋洗柱 2,柱 2 中淋洗液全部流出后,抽干 1.0 min,用 12.0 mL(每次加 4.0 mL,加 3 次)的甲醇(含 3% 的甲酸)溶液洗脱柱 2 中的待测物,用 15 mL 试管接收洗脱液,洗脱液于 50 ℃ 水浴下氮气吹干,用 1.0 mL 的 50 : 50(乙腈 : 水,含 0.1% 甲酸)溶解残渣,充分涡旋 1 min,超声 1 min,过 0.2 μm 的再生纤维素滤膜,滤液供 LC-MS/MS 测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱和质谱条件

参见附录 B 的表 B.1 和表 B.2。

7.2.2 液相色谱-质谱/质谱测定

根据样品中链霉素和双氢链霉素的含量情况,选定响应值适宜的标准工作液进行色谱分析,标准工作液应有 5 个浓度水平。待测样液中链霉素和双氢链霉素的响应值均应在仪器检测的工作曲线范围内。在 7.2.1 的色谱条件下,链霉素和双氢链霉素的参考保留时间约为 7.3 min,标准溶液的选择离子流程图参见附录 A 中图 A.1 和图 A.2。

7.2.3 液相色谱-质谱/质谱确证

按照 7.2.1 条件测定样品和标准工作液,如果检测的质量色谱峰保留时间与标准工作液一致,允许偏差小于 ±2.5%;定性离子对的相对丰度与浓度相当标准工作液的相对丰度一致,相对丰度允许偏差不得超过表 1 中规定,则可判断样品中存在相应的被测物。

表 1 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 空白实验

除不加试样外,均按 7.1~7.2 测定步骤进行。

8 结果计算和表述

按式(1)分别计算试样中链霉素和双氢链霉素的残留量,计算结果需扣除空白值:

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中被测化合物残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

c —— 从标准工作曲线上得到化合物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 样品的最终定容体积,单位为毫升(mL);

m —— 最终溶液代表的试样质量,单位为克(g)。

9 定量限(LOQ)与回收率

9.1 测定低限

本方法番茄酱中链霉素和双氢链霉素的定量限均为 0.10 mg/kg。

9.2 回收率

番茄酱中添加不同浓度水平的回收率范围参见附录 C 中的表 C.1。

附 录 A
(资料性附录)
液相色谱-质谱/质谱图

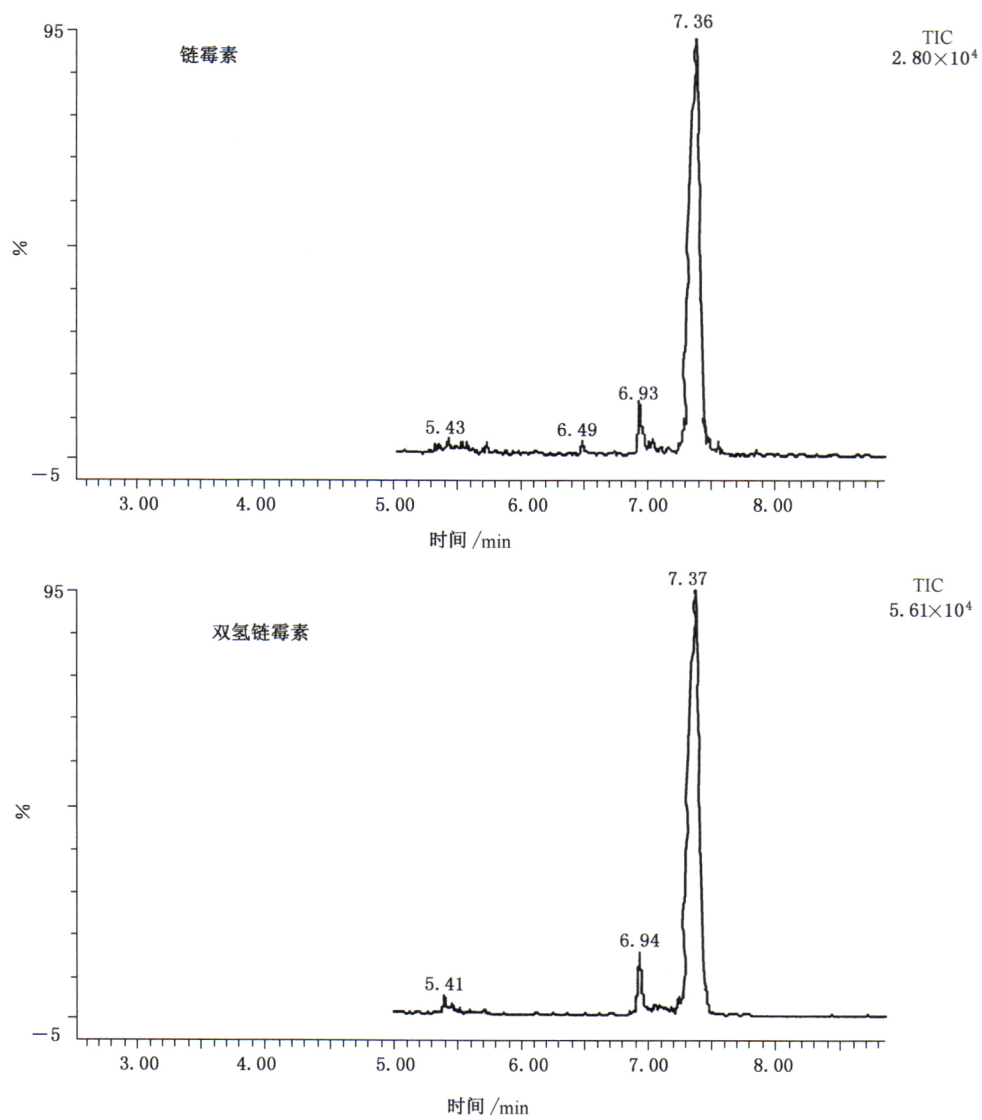


图 A.1 空白番茄酱样品基质配制标准点的总离子流色谱图

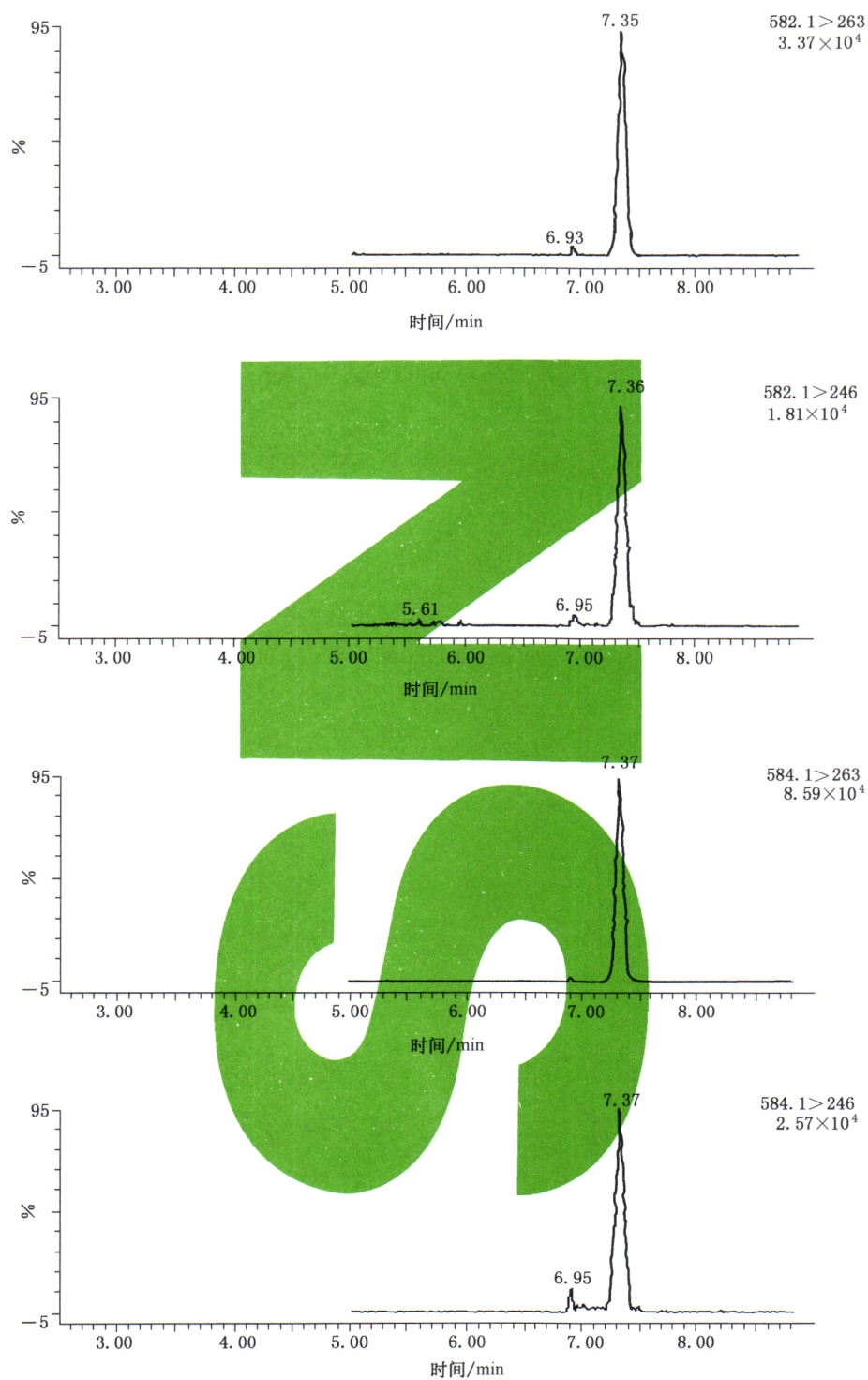


图 A.2 空白番茄酱样品基质配制标准点的提取离子流色谱图

附 录 B
(资料性附录)
LC-MS/MS 系统参考条件

B.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:Spursil C18 柱(150 mm×4.6 mm,3.0 μm);或相当者;
- b) 柱温:30 ℃;
- c) 进样体积:5.0 μL;
- d) 流动相:A 是水溶液(含 0.15%甲酸),B 是乙腈溶液;
- e) 梯度洗脱条件见表 B.1;
- f) 流速:0.4 mL/min。

表 B.1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A(水溶液,含 0.15%甲酸)/%	流动相 B(乙腈)/%
0.0	0.4	30	70
2.0	0.4	30	70
2.5	0.4	90	10
8.5	0.4	90	10
9.0	0.4	30	70
15.0	0.4	30	70

B.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描(+);
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 毛细管电压:3.0 kV;
- e) 离子源温度:115 ℃;
- f) 锥孔电压:55 V;
- g) 去溶剂气流量:680 L/h;
- h) 去溶剂气温度:380 ℃。

表 B.2 链霉素和双氢链霉素的质谱参数

分析物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碰撞气能量 V
链霉素	582.1	263.0 ^a	32
		246.0	40
双氢链霉素	584.1	263.0 ^a	30
		246.0	40
^a 定量离子。			

注：不同品牌的仪器，仪器参数可能存在差异，上述仪器条件供参考，测定时可根据实际仪器优化参数。

附 录 C
(资料性附录)

番茄酱中添加不同浓度水平的回收率

番茄酱中添加不同浓度水平的回收率见表 C.1。

表 C.1 番茄酱中添加不同浓度水平的回收率

待测物名称	添加浓度水平/(mg/kg)	回收率范围/%
链霉素	0.10	70.8~82.7
	0.20	75.1~85.2
	0.40	76.9~85.3
双氢链霉素	0.10	74.8~95.5
	0.20	76.1~93.8
	0.40	81.1~90.3