



中华人民共和国国家标准

GB/T 23408—2009

蜂蜜中大环内酯类药物残留量测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of macrolides residues in honey—
LC-MS/MS method

2009-03-28 发布

2009-07-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴斌、徐锦忠、陈惠兰、刘艳、黄娟、魏云计、蒋原、陶宏锦。

蜂蜜中大环内酯类药物残留量测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中大环内酯类药物残留量液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于蜂蜜中罗红霉素、替米考星、泰乐菌素、北里霉素、交沙霉素、竹桃霉素、螺旋霉素-I、红霉素残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 方法提要

试样用碱性溶液提取,经固相萃取柱净化,洗脱液浓缩定容后,用液相色谱-质谱/质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 碳酸钠。

4.3 碳酸氢钠。

4.4 甲醇-水(2+8,体积比):量取 20 mL 甲醇(4.1)与 80 mL 水混合。

4.5 甲醇-水(4+6,体积比):量取 40 mL 甲醇(4.1)与 60 mL 水混合。

4.6 替米考星(Tilmicosin,CAS 号:108050-54-0)、螺旋霉素-I(Spiramycin-I,CAS 号:8025-81-8)、竹桃霉素(Oleandomycin,CAS 号:7060-74-4)、红霉素(Erythromycin,CAS 号:114-07-8)、罗红霉素(Roxithromycin,CAS 号:80214-83-1)、泰乐菌素(Tylosin,CAS 号:1405-54-5)、北里霉素(Kitasamycin,CAS 号:8059-95-8)和交沙霉素(Josamycin,CAS 号:16846-24-5)标准物:纯度 $\geq 92\%$ 。

4.7 大环内酯类药物标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取(精确至 0.1 mg)适量的大环内酯类药物标准物质(4.6),用甲醇(4.1)配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。储备液贮存在 4℃ 冰箱中,可使用 2 个月。

4.8 空白样品提取液:用不含药物残留的样品,按照 7.1 制备空白样品溶液。

4.9 大环内酯类药物标准工作溶液:用空白样品提取液分别配成大环内酯类药物浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准工作溶液,现用现配。

4.10 0.1 mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠(pH9.3)缓冲溶液:称取 5.3 g 碳酸钠(4.2)和 4.2 g 碳酸氢钠(4.3)溶于 800 mL 水中,用稀氢氧化钠或稀盐酸调节 pH 为 9.3,加水稀释至 1 000 mL。

4.11 聚苯乙烯吡咯烷酮填料固相萃取柱或相当者:60 mg,3 mL。使用前分别用 3 mL 甲醇和 5 mL 水预处理,保持柱体湿润。

4.12 滤膜:0.45 μm ,水相。

5 仪器

5.1 液相色谱-质谱仪(串联四极杆):配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量分别为 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 自动浓缩仪或相当者。

5.4 液体混匀器。

5.5 真空泵:真空度大于或等于 80 kPa。

5.6 离心管:50 mL,具塞。

5.7 刻度离心管:10 mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,在密闭情况下,置于不超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,冷却至室温。分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并标明标记。在制样的操作过程中,应防止样品污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样的保存

将试样于常温状态下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)。置于 50 mL 具塞离心管中,加入 15 mL 0.1 mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液(4.10),于液体混匀器上快速混合 1 min,使试样完全溶解。将溶液以 1 mL/min 左右的流速通过固相萃取柱(4.11),待溶液完全流出后,用 5 mL 水洗离心管并过柱,然后再用 5 mL 甲醇-水(4.4)洗柱,弃去全部淋出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 10 min,最后用 5 mL 甲醇(4.1)洗脱,收集洗脱液于 10 mL 刻度离心管(5.7)中,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 用氮气吹干仪吹干,用甲醇-水(4.5)定容至 1.0 mL,过 0.45 μm 的滤膜(4.12)到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} , 5 μm , 150 mm $\times$ 2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相:0.1%甲酸+甲醇,梯度参见附录 A;
- c) 流速:0.25 mL/min;
- d) 柱温:室温;
- e) 进样量:25 μL 。

7.2.2 质谱条件

串联四级杆质谱条件参见附录 B。

7.2.3 液相色谱-质谱测定

大环内酯类药物标准工作溶液(4.9)在液相色谱-质谱设定条件下分别进样,以样品峰面积为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制 6 点标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中大环内酯类药物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,大环内酯类药物参考保留时间如表 1 所示。大环内酯类药物标准物质色谱图参见附录 C。

表 1 八种大环内酯类药物参考保留时间

药物名称	保留时间/min
螺旋霉素-I	7.23
替米考星	8.24
竹桃霉素	8.53
泰乐菌素	9.09
北里霉素	9.36
红霉素	9.55
交沙霉素	10.13
罗红霉素	10.52

7.2.4 定性测定

进行样品测定时,如果检出的质量色谱峰保留时间与标准样品一致,并且在扣除背景后的样品谱图中,各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,最大允许相对偏差不超过表 2 中规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许相对偏差

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 平行试验

按以上(7.1~7.2)步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述(7.1~7.2)步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X_i = \frac{(c_i - c_{0i}) \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X_i ——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c_i ——由标准曲线而得的样液中药物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c_{0i} ——由标准曲线而得的空白试验中药物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

9 测定低限和回收率

9.1 测定低限

本标准测定低限:罗红霉素、替米考星、泰乐菌素、北里霉素、交沙霉素为 $0.2 \mu\text{g/kg}$,竹桃霉素、螺旋霉素-I 为 $0.5 \mu\text{g/kg}$,红霉素为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 回收率

大环内酯类药物回收率数据见表 3。

表 3 大环内酯类药物的回收率数据

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%
替米考星	0.2	72.5~100.5
	0.5	75.4~95.4
	2.0	77.2~91.8
螺旋霉素-I	0.5	84.4~101.4
	2.0	84.8~100.6
	5.0	83.8~104.9
竹桃霉素	0.5	89.2~106.2
	2.0	85.1~101.2
	5.0	81.1~106.0
红霉素	0.1	92.0~105.0
	0.5	94.2~107.6
	2.0	79.0~95.1
罗红霉素	0.2	97.0~110.0
	0.5	86.6~98.2
	2.0	85.3~101.7
泰乐菌素	0.2	80.5~97.7
	0.5	77.2~89.1
	2.0	96.6~104.4
北里霉素	0.2	82.0~98.0
	0.5	75.6~96.8
	2.0	81.3~101.9
交沙霉素	0.2	91.5~110.5
	0.5	76.6~100.8
	2.0	85.2~110.2

附 录 A
(资料性附录)

液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法梯度洗脱条件

表 A.1 液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	甲醇/%	0.1%甲酸/%
0	0.25	20	80
3.00	0.25	60	40
4.00	0.25	60	40
8.00	0.25	90	10
11.00	0.25	90	10
11.10	0.25	20	80
13.00	0.25	20	80

附 录 B

(资料性附录)

液相色谱-质谱/质谱法仪器参数与监测离子

表 B.1 质谱参数

离子模式	ESI, 正离子
源温度	350 ℃
气帘气	氮气, 0.060 MPa
辅助气	氮气, 5.0 L/h
碰撞气	氩气, 0.2 Pa(1.5 mTor)
喷雾电压	4 500 V
数据采集参数	扫描速度 0.05 s

表 B.2 八种大环内酯的定性离子对、定量离子对及碰撞气能量

名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	碰撞气能量/V
替米考星	869.5/174	869.5/174	43
	869.5/696.3		37
螺旋霉素-I	843.5/174	843.5/174	20
	843.5/540.1		12
竹桃霉素	688.4/158	688.4/158	32
	688.4/544		14
红霉素	734.3/158	734.3/158	32
	734.3/576		17
罗红霉素	837.5/158	837.5/158	33
	837.5/679.1		19
泰乐菌素	916.5/174	916.5/174	35
	916.5/772.2		29
北里霉素	772.3/174	772.3/174	30
	772.3/108		35
交沙霉素	828.4/174	828.4/174	32
	828.4/645.2		22

附 录 C
(资料性附录)
大环内酯类药物标准物质
选择离子流色谱图

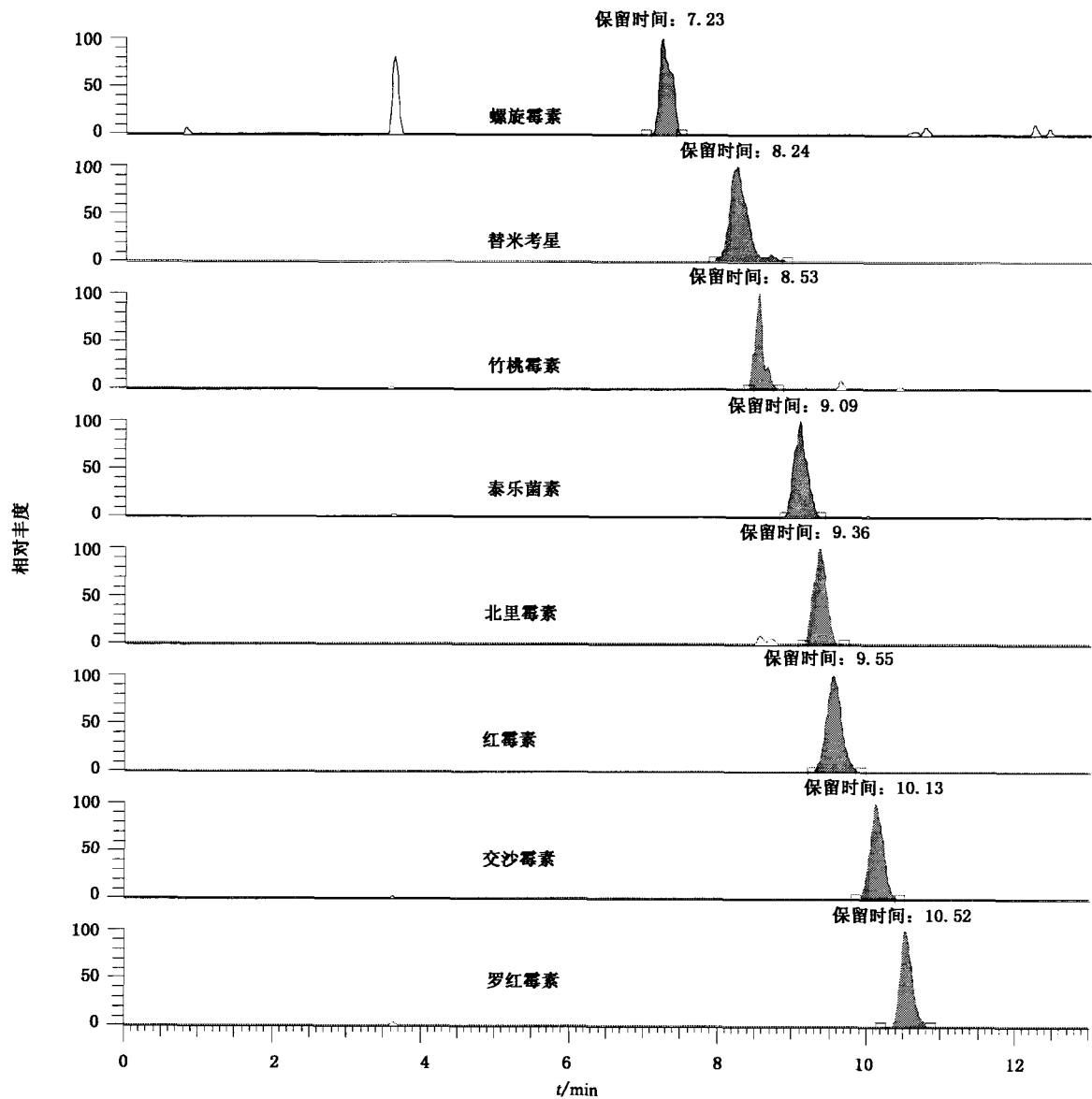


图 C.1 大环内酯类药物标准物质选择离子流色谱图