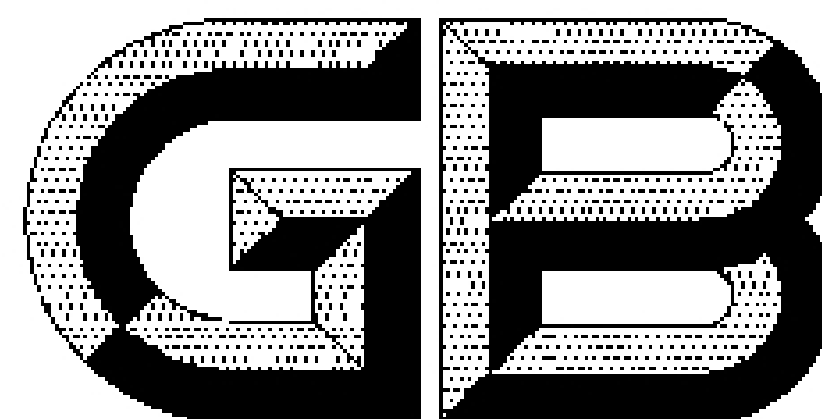




中华人民共和国国家标准

GB/T 21323—2007

动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法

Determination of aminoglycosides residues in animal tissues—
HPLC-MS/MS method

2007-10-29 发布

2008-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 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：中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、湖南师范大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：黄志强、林黎明、张鸿伟、张莹、陈波、彭涛、李晓娟、王美玲、颜鸿飞。



动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定

高效液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了动物组织中壮观霉素、潮霉素 B、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、庆大霉素和新霉素 10 种氨基糖苷类药物残留量的高效液相色谱-串联质谱测定和确证方法。

本标准适用于动物内脏、肌肉和水产品中 10 种氨基糖苷类药物残留量的测定。

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—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中氨基糖苷类药物残留,采用磷酸盐缓冲液提取,经过 C_{18} 固相萃取柱净化,浓缩后,使用七氟丁酸作为离子对试剂,高效液相色谱-质谱/质谱测定,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,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:液相色谱级。

4.2 冰乙酸:液相色谱级。

4.3 甲酸:液相色谱级。

4.4 七氟丁酸:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.5 浓盐酸。

4.6 氢氧化钠。

4.7 三氯乙酸:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.8 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA):纯度 $\geq 99\%$ 。

4.9 磷酸二氢钾。

4.10 七氟丁酸溶液(HFBA):100 mmol/L,准确量取 6.5 mL 七氟丁酸(4.4),用水稀释至 500 mL(4℃避光可保存 6 个月)。

4.11 七氟丁酸溶液:20 mmol/L,准确量取 100 mmol/L 七氟丁酸溶液 50 mL(4.10),用水稀释至 250 mL(4℃避光可保存 6 个月)。

4.12 磷酸盐缓冲液(含 0.4 mmol/L EDTA 和 2%三氯乙酸溶液):准确称取磷酸二氢钾(4.9)1.36 g,用 980 mL 水溶解,用 1.0 mol/L 的盐酸调 pH 到 4.0,分别加入 Na_2EDTA (4.8)0.15 g 和三氯乙酸(4.7)20 g,溶解混匀并定容至 1 000 mL(4℃避光可保存 1 个月)。

4.13 甲酸:0.1%(体积分数),准确吸取 1.0 mL 甲酸(4.3)于 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀。

4.14 壮观霉素、潮霉素 B、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、庆大霉素、新霉素标准品：纯度范围 92.0%~99%。

4.15 10 种氨基糖苷类药物标准贮备液：分别准确称取适量的每种氨基糖苷类药物标准品(4.14)，用水溶解，配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准贮备溶液(4℃避光可保存 6 个月)。

4.16 10 种氨基糖苷类药物混合标准中间溶液：分别准确量取壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素标准贮备溶液(4.15)各 1.0 mL，新霉素、潮霉素 B、安普霉素标准贮备溶液(4.15)各 5.0 mL，于 25 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，配制成壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素和庆大霉素浓度为 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，新霉素、潮霉素 B 和安普霉素浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间溶液(4℃避光可保存 1 个月)。

4.17 10 种氨基糖苷类药物标准工作溶液：精密量取标准中间溶液(4.16)适量，用空白样品基质配制成不同浓度系列的混合标准工作溶液(现用现配)。

4.18 固相萃取 C_{18} 柱：500 mg, 3 mL。

5 仪器

5.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.2 高速组织捣碎机。

5.3 均质器。

5.4 旋转蒸发器。

5.5 氮吹仪。

5.6 pH 计。

5.7 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 g 各一台。

5.8 真空泵。

5.9 离心机。

6 试样制备与保存

6.1 试样制备

样品经高速组织捣碎机均匀捣碎，用四分法缩分出适量试样，均分成两份，装入清洁容器内，加封后作出标记，一份作为试样，一份作为留样。

6.2 试样的保存

将试样于 -18℃ 下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取约 5 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 聚丙烯离心管中，加入 10.0 mL 磷酸盐缓冲液(4.12)均质 2 min，于平板振荡器上振荡提取 10 min，离心 10 min(4 500 r/min)，将上清液转移到另一个 50 mL 聚丙烯离心管中。在残渣中再加入 10.0 mL 磷酸盐缓冲液(4.12)，重复上述操作，合并上清液，用 1.0 mol/L 的盐酸调 pH 值为 3.5 ± 0.2 ，加入 2.0 mL 七氟丁酸溶液(4.10)，涡旋混匀。

7.2 净化

C_{18} 固相萃取柱用 3.0 mL 甲醇(4.1)，3 mL 七氟丁酸溶液(4.11)淋洗后，将提取液加载在固相萃取柱上，控制流速约 1 滴/s，先用 3 mL 七氟丁酸溶液(4.11)淋洗，再用每次 3 mL 水淋洗两次，弃去淋洗液，抽干 5 min。用 5 mL 乙腈-七氟丁酸溶液(4.11)(80+20，体积比)洗脱，收集洗脱液于精密刻度试管中，40℃ 氮气流挥去部分溶剂，用七氟丁酸溶液(4.11)定容至 1.0 mL，涡旋混匀后，过 0.2 μm 微孔滤膜，液相色谱-质谱/质谱测定。

7.3 测定

7.3.1 标准工作曲线制备

制备混合标准浓度系列,壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素分别为 50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL,新霉素、潮霉素 B、安普霉素分别为 300 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、1 500 ng/mL、2 000 ng/mL,按 7.3.2 条件测定并制作标准曲线,10 种氨基糖苷类药物的 CAS 号和在 7.3.2 色谱条件下测得的色谱保留时间参见表 B.1。

7.3.2 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱(可用 Intersil ODS-3, 粒径 5 μm, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm 或相当者);
- b) 流动相: 甲醇+水+100 mmol/L HFBA(梯度洗脱), 流动相组成和洗脱梯度见表 1;

表 1 流动相组成和洗脱梯度

时间/min	甲醇/%	水/%	100 mmol/L HFBA/%
0	5	75	20
0.5	5	75	20
1.0	60	20	20
12.0	70	10	20
12.1	80	0	20
15.0	80	0	20
15.1	5	75	20
35.0	5	75	20

- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 柱温: 30℃;
- e) 进样量: 30 μL。

7.3.3 质谱条件

参见附录 A。

7.3.4 液相色谱-串联质谱测定

7.3.4.1 定性测定

按照上述条件测定样品和建立标准工作曲线,如果样品中化合物质量色谱峰的保留时间与标准溶液相比在±2.5%的允许偏差之内;待测化合物的定性离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于 3 ($S/N \geq 3$),定量离子对的重构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,相对丰度偏差不超过表 2 的规定,则可判断样品中存在相应的目标化合物。10 种氨基糖苷类药物标准工作溶液的定量离子对的重构离子色谱图参见图 B.1~图 B.10。

表 2 定性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%

7.3.4.2 定量测定

按外标法使用标准工作曲线进行定量测定。

7.4 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

7.5 结果计算

试样中每种氨基糖苷类药物残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:



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

式中：
X——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克(μg/kg)；
c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
V——试样溶液定容体积，单位为毫升(mL)；
m——试样溶液所代表的质量，单位为克(g)。
注：计算结果应扣除空白值。

8 检测低限 (LOQ)



壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素为 20 μg/kg，新霉素、潮霉素 B、安普霉素为 100 μg/kg。

9 回收率和精密度

9.1 鱼肉

9.1.1 壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素

添加水平为 20 μg/kg 时，回收率范围为 72.1%~94.7%。
添加水平为 30 μg/kg 时，回收率范围为 71.4%~95.4%。
添加水平为 40 μg/kg 时，回收率范围为 71.1%~98.0%。

9.1.2 新霉素、潮霉素 B、安普霉素

添加水平为 100 μg/kg 时，回收率范围为 70.1%~93.6%。
添加水平为 150 μg/kg 时，回收率范围为 70.4%~93.0%。
添加水平为 200 μg/kg 时，回收率范围为 69.1%~94.5%。

9.2 鸡肉

9.2.1 壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素

添加水平为 20 μg/kg 时，回收率范围为 73.1%~94.5%。
添加水平为 30 μg/kg 时，回收率范围为 74.0%~97.9%。
添加水平为 40 μg/kg 时，回收率范围为 72.7%~98.3%。

9.2.2 新霉素、潮霉素 B、安普霉素

添加水平为 100 μg/kg 时，回收率范围为 70.3%~102.6%。
添加水平为 150 μg/kg 时，回收率范围为 71.4%~95.2%。
添加水平为 200 μg/kg 时，回收率范围为 72.3%~96.0%。

9.3 猪肾

9.3.1 壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素

添加水平为 20 μg/kg 时，回收率范围为 72.1%~95.5%。
添加水平为 30 μg/kg 时，回收率范围为 73.0%~96.2%。
添加水平为 40 μg/kg 时，回收率范围为 70.7%~99.3%。

9.3.2 新霉素、潮霉素 B、安普霉素

添加水平为 100 μg/kg 时，回收率范围为 73.9%~99.3%。
添加水平为 150 μg/kg 时，回收率范围为 71.4%~98.2%。
添加水平为 200 μg/kg 时，回收率范围为 73.0%~105.0%。

附 录 A
(资料性附录)

质谱/质谱测定参考质谱条件¹⁾

质谱/质谱测定参考质谱条件：

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测；
- d) 电喷雾电压：5 000 V；
- e) 雾化气压力：0.276 MPa；
- f) 气帘气压力：0.207 MPa；
- g) 辅助气压力：0.448 MPa；
- h) 离子源温度：500℃；
- i) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压，见表 A.1。

表 A.1 氨基糖苷类药物的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

名 称	定性离子对 (m/z) (母离子/子离子)	定量离子对 (m/z) (母离子/子离子)	碰撞气能量/eV	去簇电压/V
壮观霉素 (spectinomycin)	333.3/140.2	333.3/140.2	36	110
	333.3/189.2		32	115
潮霉素 B (hygromycin B)	528.3/177.3	528.3/177.3	44	145
	528.3/352.2		35	145
双氢链霉素 (dihydrostreptomycin)	584.3/263.3	584.3/263.3	45	140
	584.3/409.3		43	145
链霉素 (streptomycin)	582.4/263.3	582.4/263.3	47	160
	582.4/407.4		44	160
丁胺卡那霉素 (amikacin)	586.4/425.3	586.4/425.3	30	100
	586.4/324.2		34	100
卡那霉素 (kanamycin)	485.3/163.2	485.3/163.2	40	85
	485.3/324.2		26	85
安普霉素 (apramycin)	540.5/378.2	540.5/378.2	27	145
	540.5/217.2		42	140
妥布霉素 (tobramycin)	468.4/163.2	468.4/163.2	37	90
	468.4/205.2		35	90
庆大霉素 (gentamycin)	478.4/160.2	478.4/157.3	35	75
	478.4/157.3		36	70
新霉素 (neomycin)	615.4/293.3	615.4/293.3	36	150
	615.4/323.3		34	150

1) 所列参数是在 ABI4000 质谱仪完成的，此处列出的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不同型号的仪器。

附 录 B
(资料性附录)

标准样品定量离子对重构离子色谱图

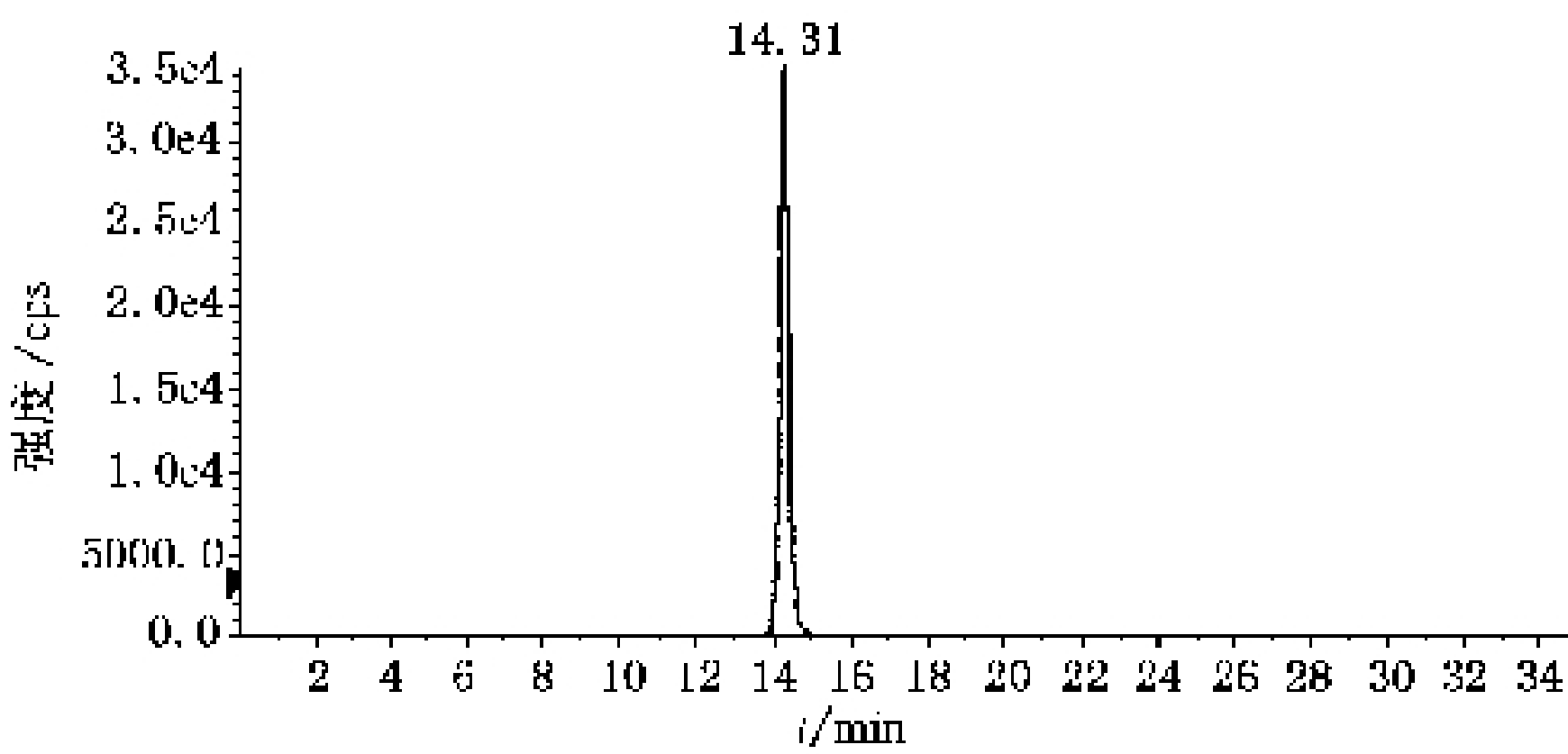


图 B.1 壮观霉素重构离子质量色谱图

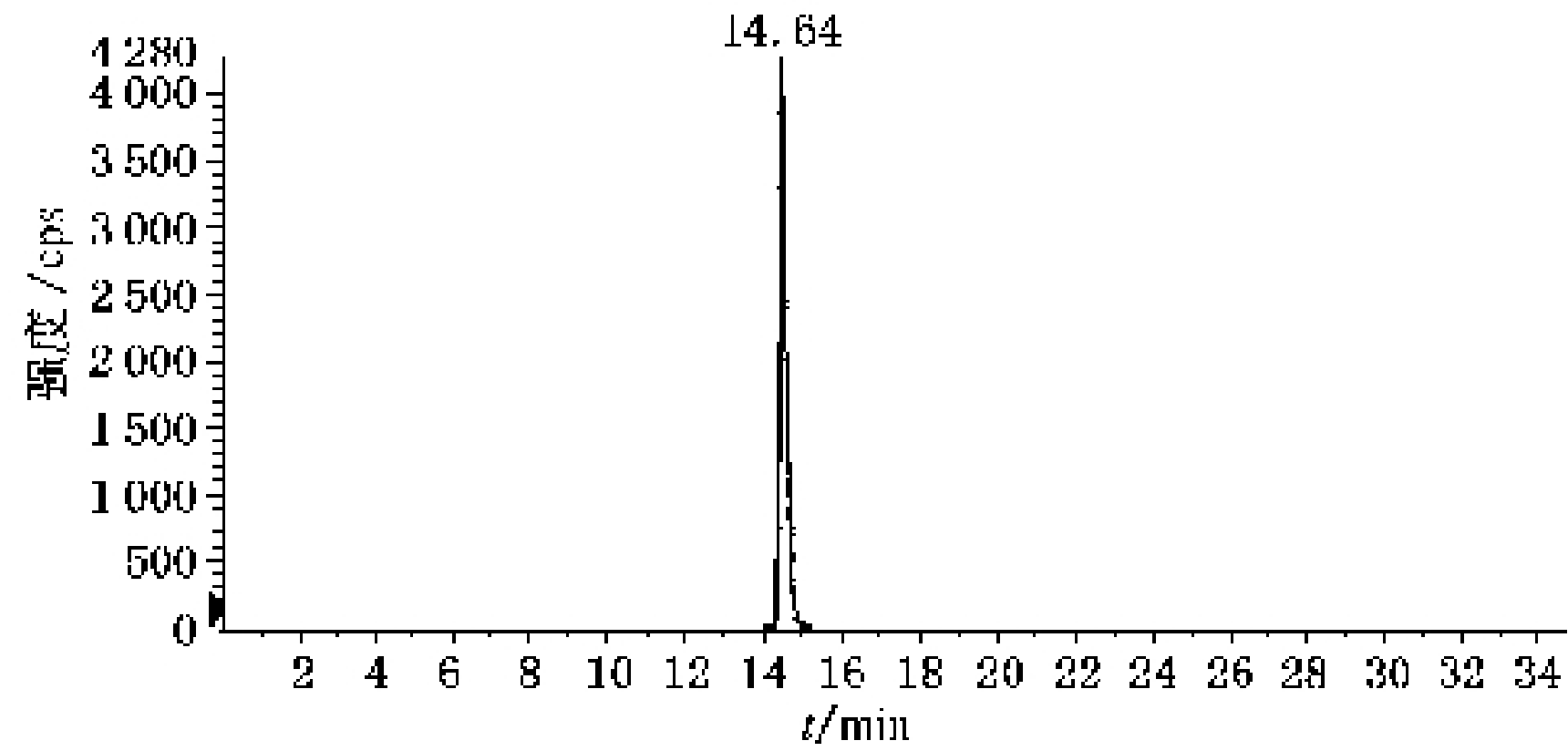


图 B.2 潮霉素 B 重构离子质量色谱图

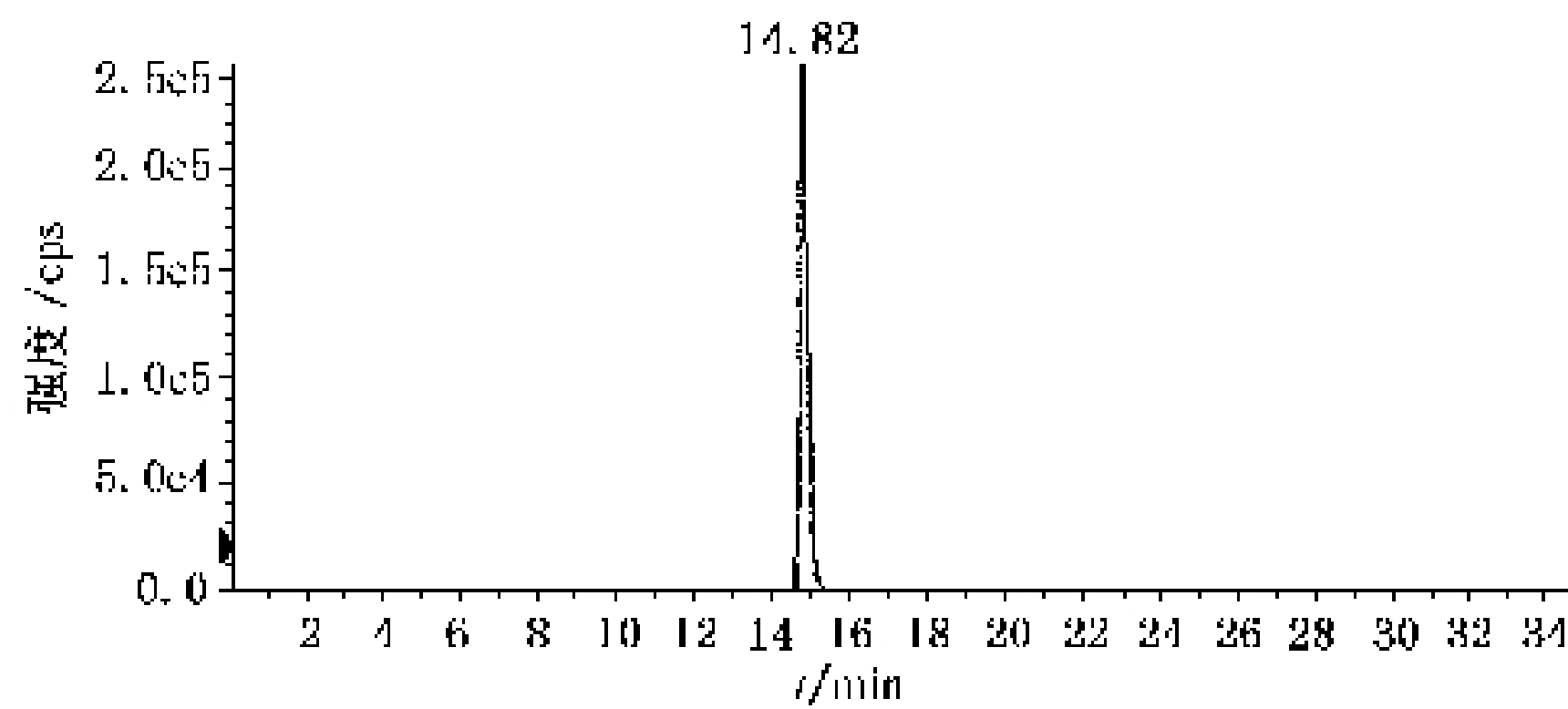


图 B.3 双氢链霉素重构离子质量色谱图

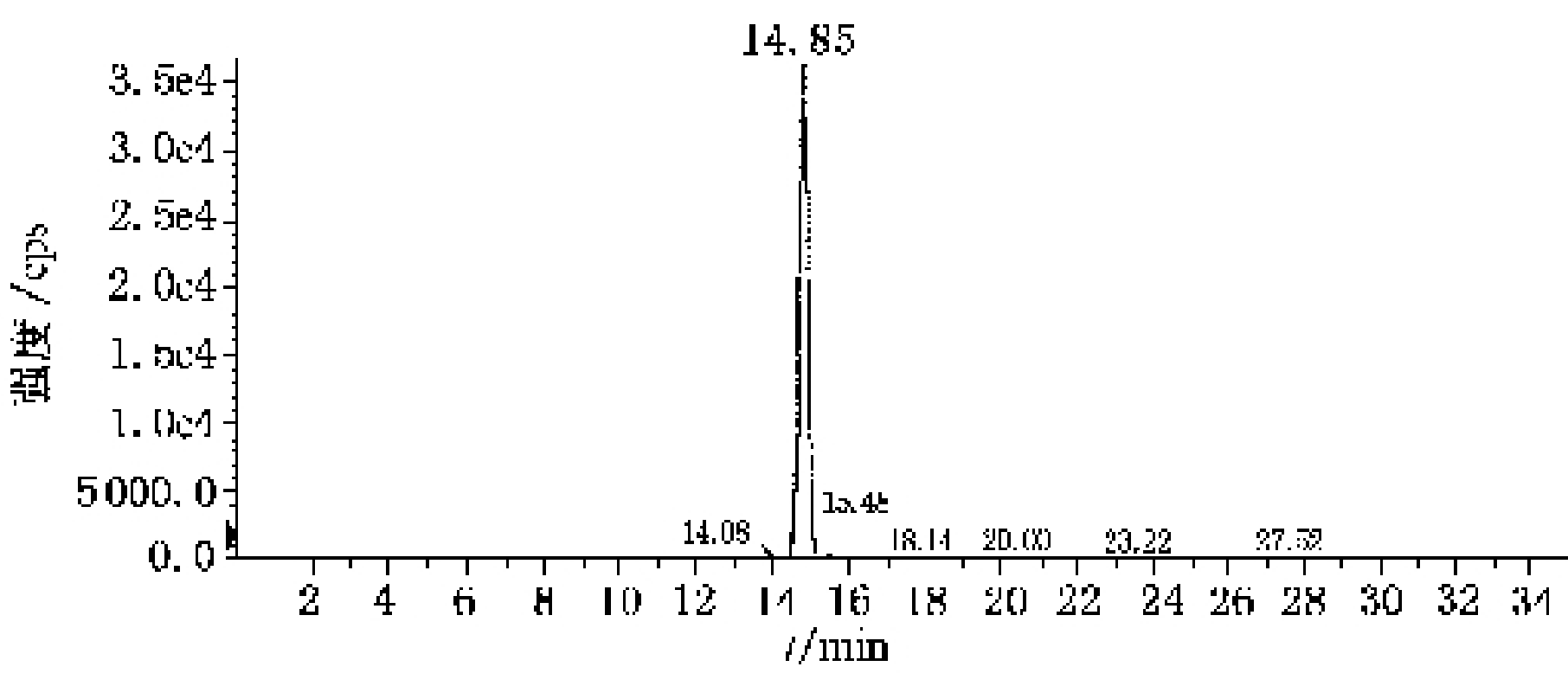


图 B.4 链霉素重构离子质量色谱图

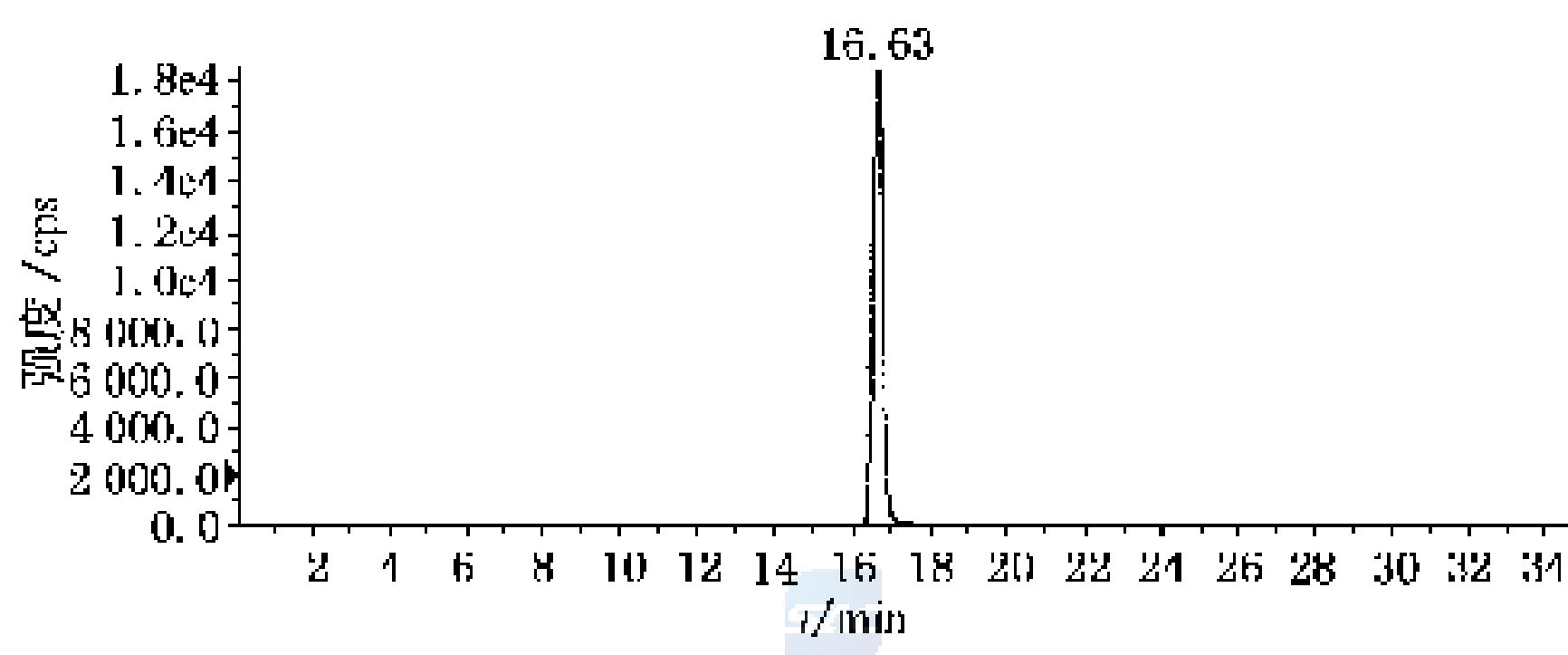


图 B.5 丁胺卡那霉素重构离子质量色谱图

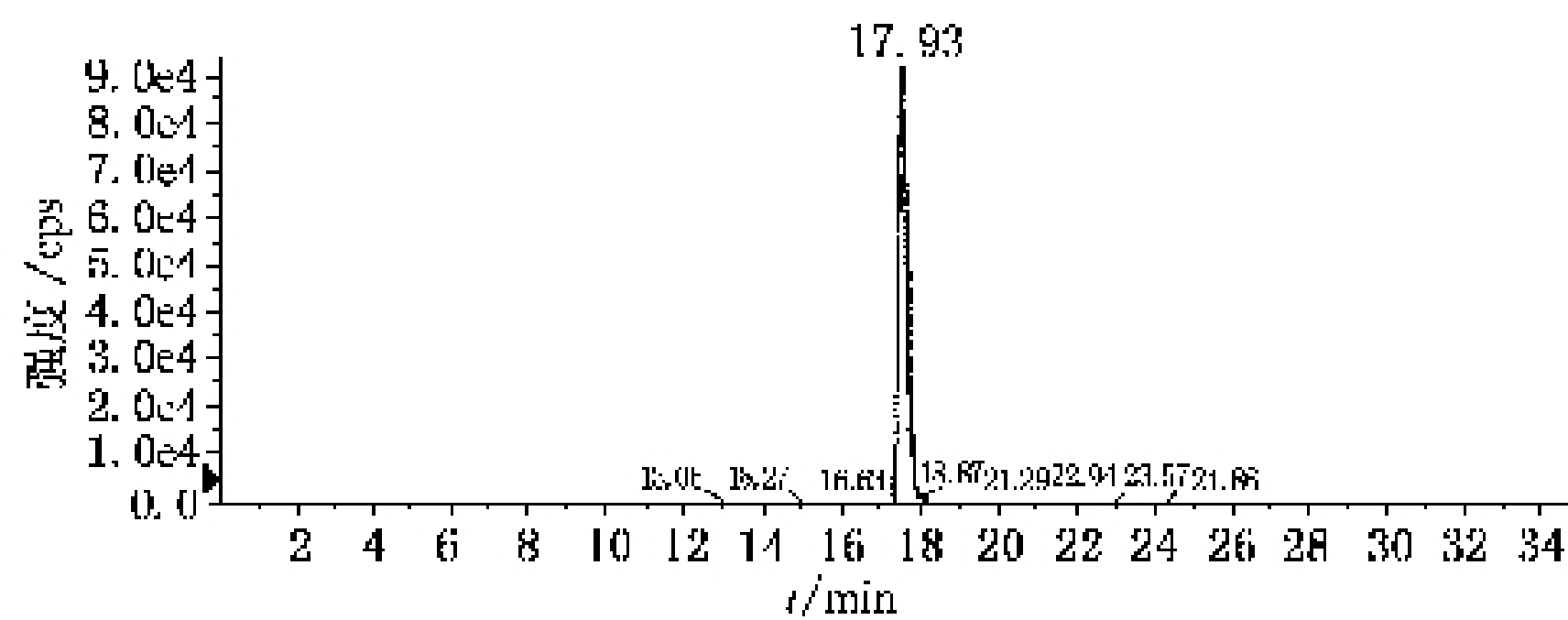


图 B.6 卡那霉素重构离子质量色谱图

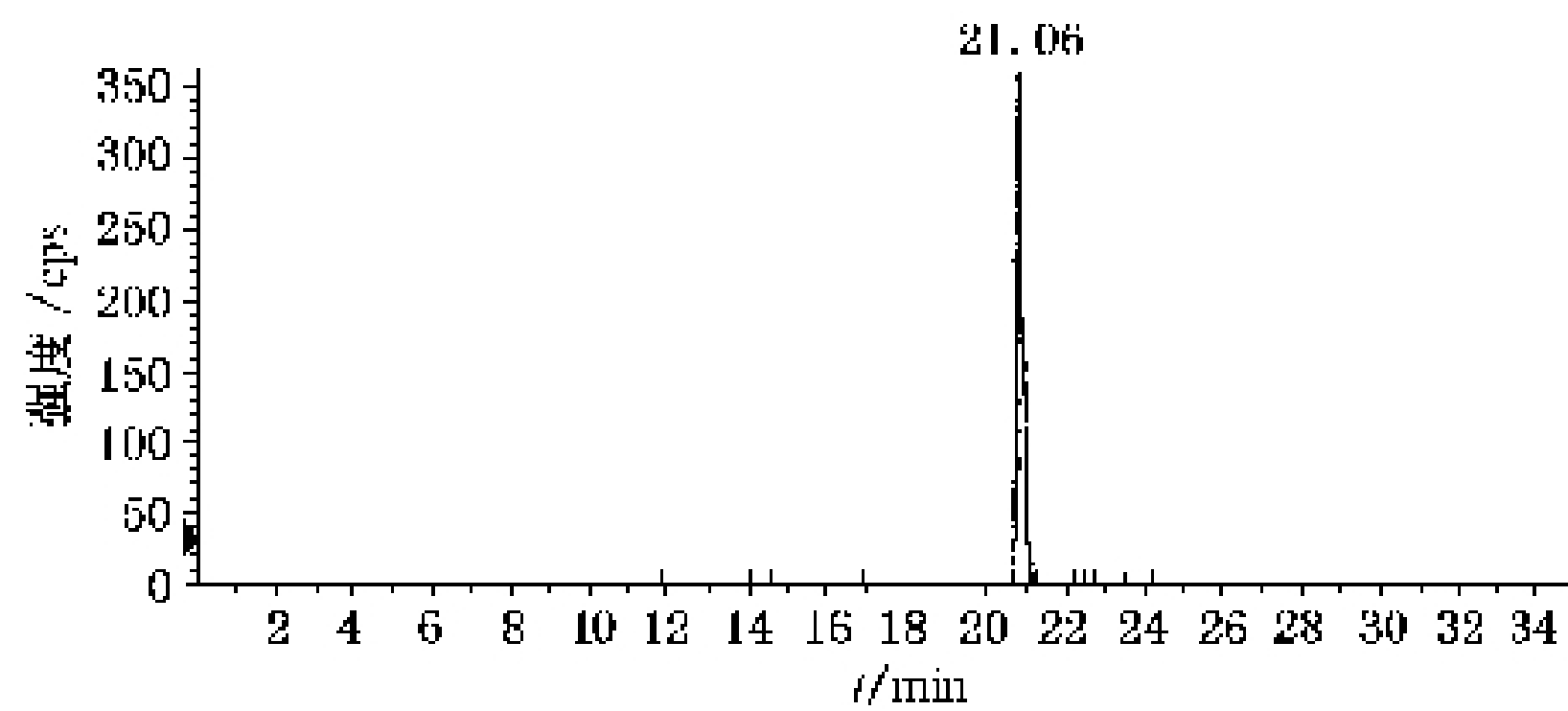


图 B.7 安普霉素重构离子质量色谱图

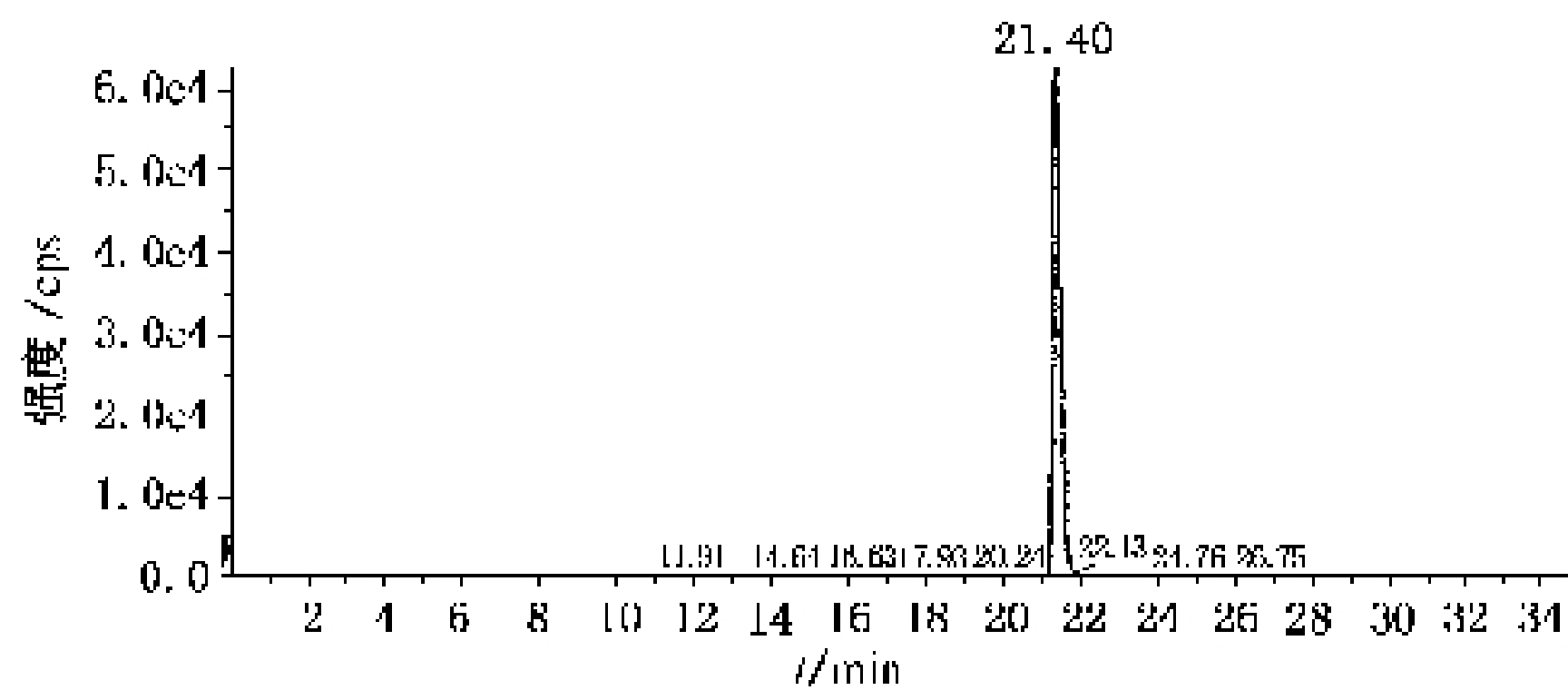


图 B.8 妥布霉素重构离子质量色谱图

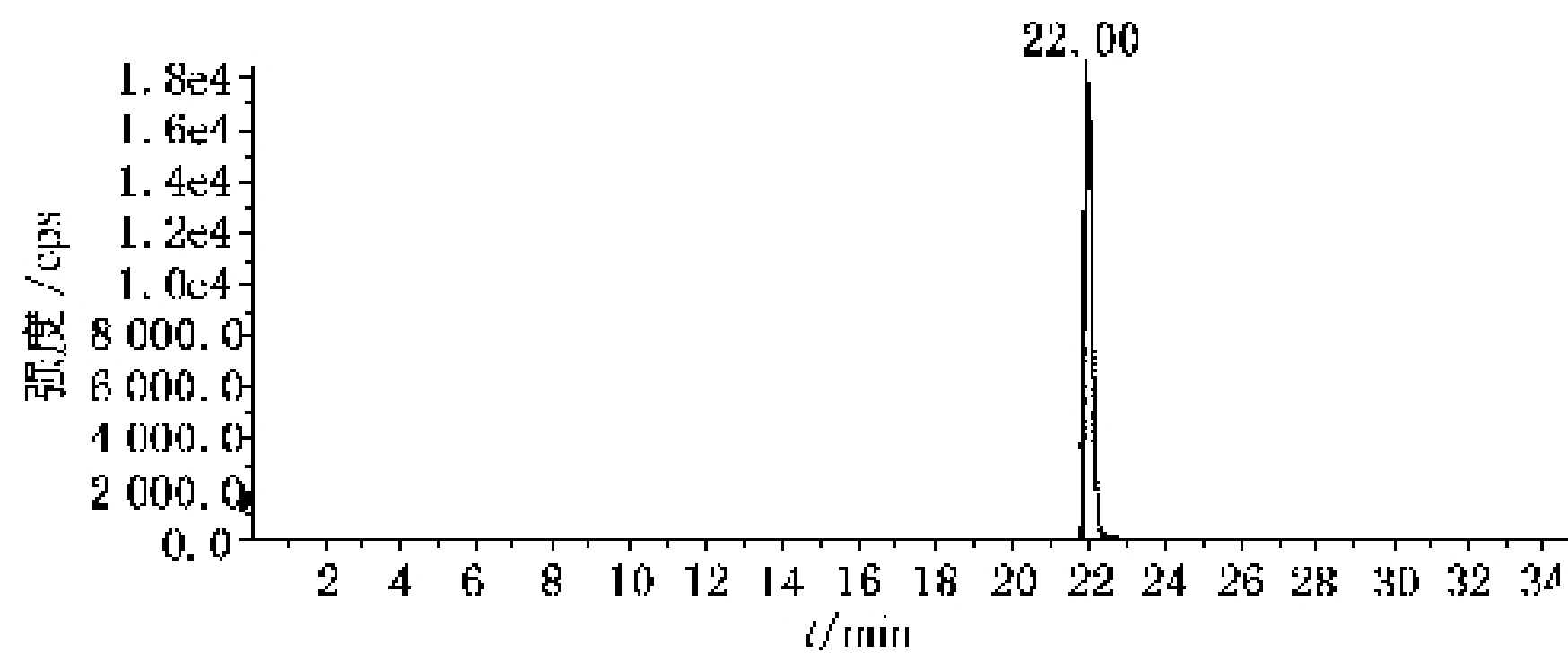


图 B.9 庆大霉素重构离子质量色谱图

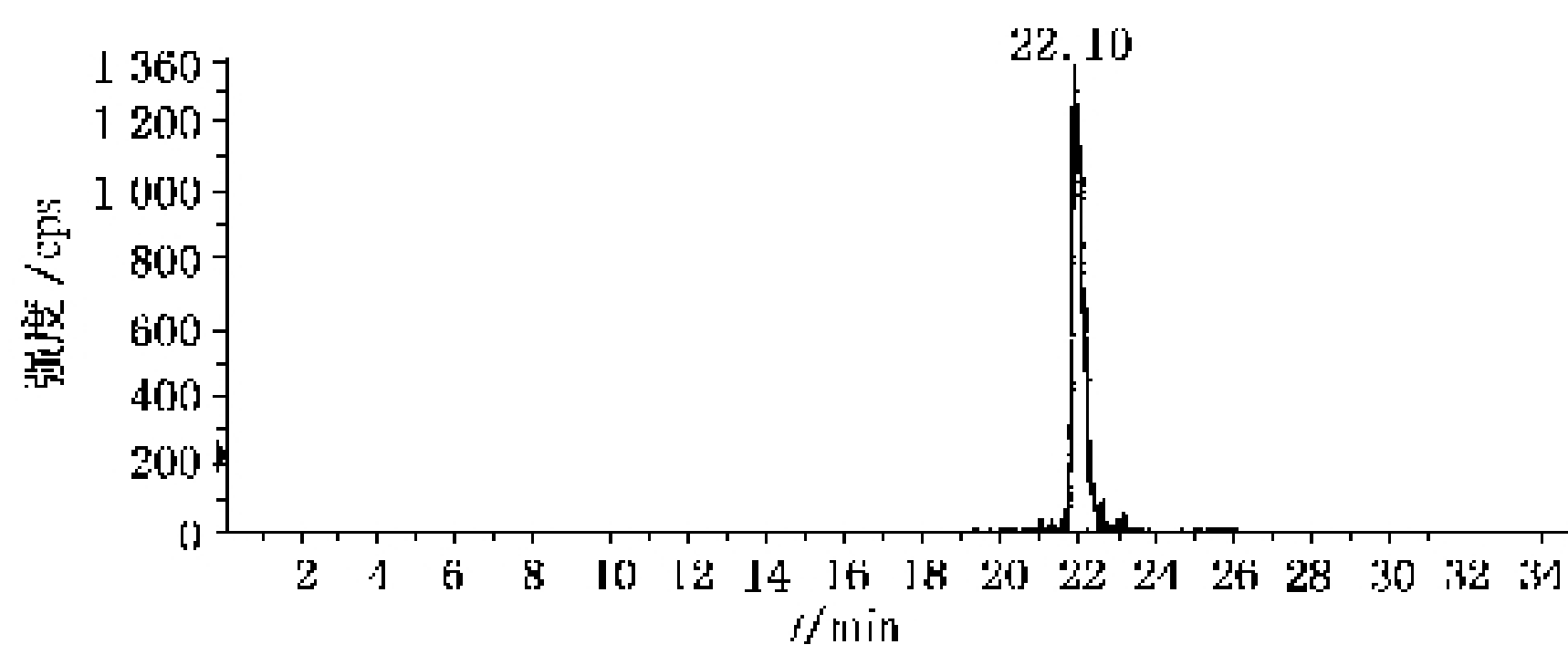


图 B.10 新霉素重构离子质量色谱图

表 B.1 10 种氨基糖苷药物参考保留时间及 CAS 号

化合物名称	保留时间/ min	CAS 号	化合物名称	保留时间/ min	CAS 号
壮观霉素 (spectinomycin)	14.31	21736-83-4	卡那霉素 (kanamycin)	17.93	25389-94-0
潮霉素 B (hygromycin B)	14.64	31282-04-9	安普霉素 (apramycin)	21.06	1445-69-8
双氢链霉素 (dihydrostreptomycin)	14.82	5490-27-7	妥布霉素 (tobramycin)	21.40	32986-56-4
链霉素 (streptomycin)	14.85	3810-74-0	庆大霉素 (gentamycin)	22.00	1405-41-0
丁胺卡那霉素 (amikacin)	16.63	37517-28-5	新霉素 (neomycin)	22.10	1405-10-3