

附录 1

动物性食品中四环素类药物残留量的测定 液相色谱法

1. 范围

本标准规定了动物性食品中四环素类药物残留量检测的制样和液相色谱的测定方法。

本标准适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏和肾脏，猪和鸡的皮+脂肪和鸡蛋、牛奶、鱼肌肉、虾肌肉中土霉素、四环素、金霉素、多西环素残留量的检测。

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

试样中残留的四环素类药物，经EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液提取，HLB固相萃取柱串联LCX固相萃取柱净化，高效液相色谱-紫外法测定，以外标法定量。

4. 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 盐酸土霉素标准品：含量 $\geq 97.0\%$ ；盐酸四环素标准品：含量 $\geq 97.5\%$ ；盐酸金霉素标准品：含量 $\geq 93.1\%$ ；盐酸多西环素标准品：含量 $\geq 98.2\%$ 。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 三氟乙酸

4.5 二氯甲烷

4.6 乙二胺四乙酸二钠

4.7 枸橼酸

4.8 磷酸氢二钠

4.9 草酸

4.10 硫酸

4.11 钨酸钠

4.12 HLB固相萃取柱：500 mg/6 ml，或相当者。

4.13 LCX固相萃取柱1: 500 mg/6 ml, 或相当者。

4.14 0.1 mol/L柠檬酸溶液: 取柠檬酸21.01 g, 用水溶解并稀释至1 000 mL。

4.15 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液: 取磷酸氢二钠71.63 g, 用水溶解并稀释至1 000 mL。

4.16 McIlvain 缓冲溶液 (pH=4.0): 取0.1 mol/L枸橼酸溶液1 000 mL、0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液625 mL, 混匀, 用盐酸或氢氧化钠溶液调pH至 4.0 ± 0.05 。

4.17 EDTA • 2Na-McIlvaine缓冲溶液: 取乙二胺四乙酸二钠60.5 g, 加McIlvaine缓冲溶液1625 mL, 溶解, 混匀。

4.18 0.01 mol/L草酸溶液: 取草酸1.26 g, 用水溶解并稀释至1 000 mL。

4.19 0.01 mol/L三氟乙酸溶液: 取三氟乙酸0.8 mL, 用水溶解并稀释至1 000 mL。

4.20 0.34 mol/L硫酸溶液: 取硫酸1.85 mL, 用水溶解并稀释至100 mL。

4.21 7%钨酸钠溶液: 取钨酸钠7g, 用水溶解并稀释至100 mL。

4.22 1 mol/L草酸溶液: 取草酸12.6 g, 用水溶解并稀释至100 mL。

4.23 1 mol/L草酸-乙腈溶液: 取1 mol/L草酸溶液20 mL, 用乙腈溶解并稀释至100 mL。

4.24 1 mg/mL土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准贮备液: 取盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素和盐酸多西环素标准品各约10mg, 精密称定, 分别于10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成浓度为1 mg/mL的土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准贮备液, -20°C 以下保存, 有效期1个月。

4.25 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准贮备液: 准确量取1 mg/mL土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准贮备液各1 mL, 于100 mL容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准工作液。 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。现用现配。

5. 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器。

5.2 分析天平: 感量0.000 01 g。

5.3 天平: 感量0.01 g。

5.4 组织匀浆器

5.5 旋涡混合器: 3 000 r/min。

5.6 低温离心机: 4000 r/min。

¹注: 本实验所列 LCX 固相萃取柱由 Agela 公司研制提供的, 此处列出固相萃取柱仅是为了提供参考, 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固相萃取柱。

5.7 固相萃取装置。

5.8 氮吹仪

5.9 尼龙微孔滤膜：0.22 μm。

5.10 离心管：50mL。

5.11 刻度试管：分度值0.1 mL。

6. 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

6.1.1 组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织（鱼，去鳞，去皮，沿脊背取肌肉；虾，去头，去壳，去肠线，取肌肉部分），绞碎，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试料。

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试料。

6.1.2 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

——取均质的供试样品，作为供试试料。

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试料。

6.1.3 鸡蛋

取适量新鲜的供试鸡蛋，去壳，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试料。

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，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

7.1.1 脂肪

称取试料（5±0.05）g，于50 mL离心管中，加二氯甲烷15 mL，涡旋1 min，振荡5 min，加EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液15 mL，涡旋1 min，振荡5 min，8 500 r/min离心5 min，取上清液。下层溶液加EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液30 mL分两次萃取，合并三次上清液，中性滤纸过滤后，备用。

7.1.2 肌肉、肝脏、肾脏、牛奶、鸡蛋

称取试料(5±0.05)g,于50 mL离心管中,加EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液20 mL,涡旋1 min,振荡10 min,加0.34 mol/L硫酸溶液5 mL、7%钨酸钠溶液5 mL,涡旋1 min,8 500 r/min离心5 min,取上清液。残渣用EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液20 mL、10 mL重复提取两次,合并三次上清液,中性滤纸过滤后,备用。

7.2 净化

HLB柱依次用甲醇5 mL、水5 mL和EDTA·2Na-McIlvaine缓冲溶液5 mL活化,取备用液过柱,待全部备用液流出后,依次用水10 mL、5%甲醇溶液10 mL淋洗,抽干30 s,用甲醇6 mL洗脱,收集洗脱液于刻度试管中,加水2 mL,混匀,过甲醇5 mL、水5 mL活化的LCX柱,待全部液体流出后,用水5 mL、甲醇5 mL淋洗,抽干1 min,1 mol/L草酸-乙腈溶液6 mL洗脱,收集洗脱液,于40℃水浴氮气吹至0.5~1.0 mL,再加甲醇0.4 mL,用0.01 mol/L草酸溶液定容至2.0 mL,滤过,高效液相色谱测定。(上机溶液应在24小时内完成测定。)

7.3 标准曲线的制备

精密量取10 µg/mL混合标准工作液适量,用0.01 mol/L草酸溶液稀释成浓度为0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 µg/mL的系列混合标准液,供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标,对应的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

色谱柱: C18 (150 mm×4.6mm, 粒径5µ m), 或相当者。

流动相: A: 0.01 mol/L三氟乙酸溶液, B: 乙腈; 梯度洗脱, 见表1。

检测波长: 350 nm

进样量: 50 µL

柱温: 30℃

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	A %	B %	Curve
0	1.0	90	10	6
5	1.0	80	20	6
15	1.0	65	35	6
16	1.0	90	10	6
17	1.0	90	10	1

7.4.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中四环素类药物响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液和空白添加试样溶液的高效液相色谱图分别见附录A。

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

试样中四环素类药物的残留量（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ），按下式计算

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m}$$

式中：

X—— 试料中相应的四环素类药物的残留量， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

A—— 试料中相应的四环素类药物的峰面积；

A_s —— 标准溶液中相应的四环素类药物的峰面积；

C_s —— 标准溶液中相应的四环素类药物的浓度， $\mu\text{g}/\text{L}$ ；

V—— 最终试样定容体积，mL；

m—— 供试试料质量，g。

注：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. 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊、鸡的肌肉、鸡蛋、牛奶、鱼肌肉、虾肌肉中检测限为 $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ；在猪、牛、羊、鸡的肝脏、肾脏、猪和鸡的皮+脂肪的检测限为 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

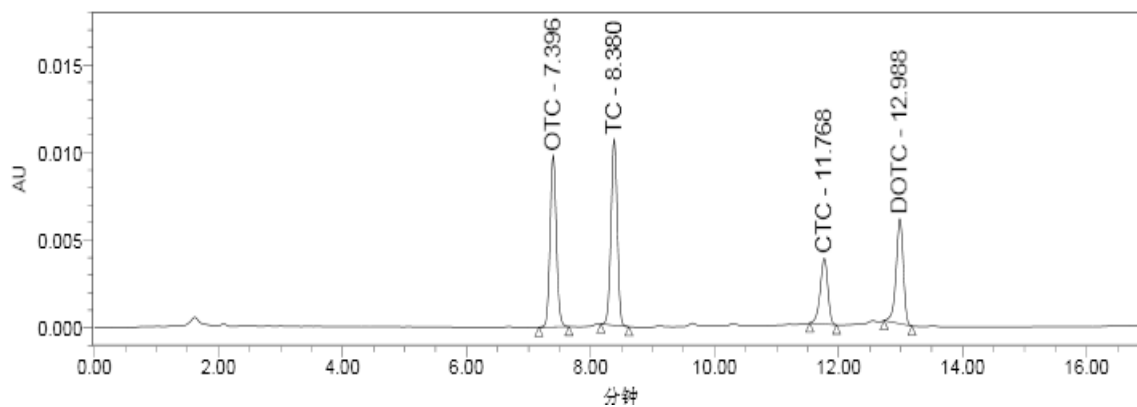
本方法在猪、牛、羊、鸡的肌肉组织 $50\sim 200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，在猪、牛、羊、鸡的肝脏组织 $100\sim 600\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，在猪、牛、羊、鸡的肾脏组织 $100\sim 1\ 200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，猪和鸡的皮+脂肪组织 $100\sim 600\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，鱼肌肉和虾肌肉 $50\sim 200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，在牛奶 $50\sim 200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ ，在鸡蛋 $50\sim 400\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

9.3 精密度

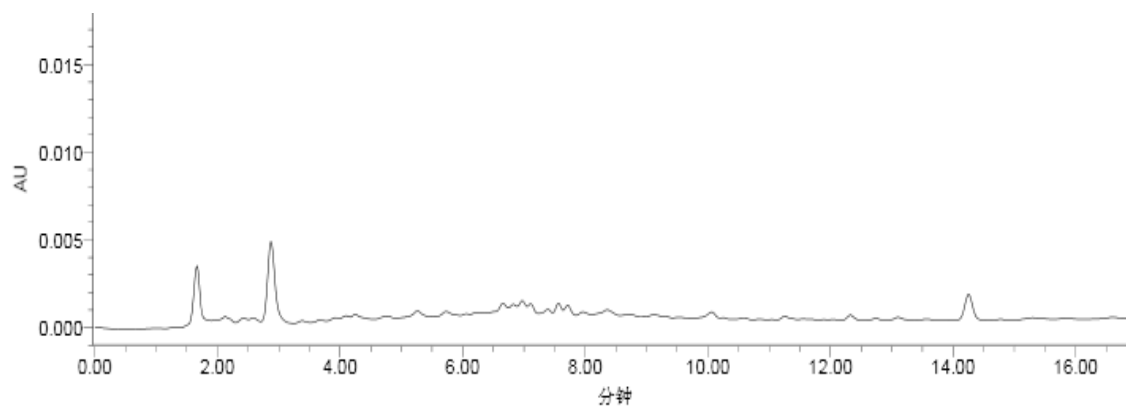
本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$

附录 A

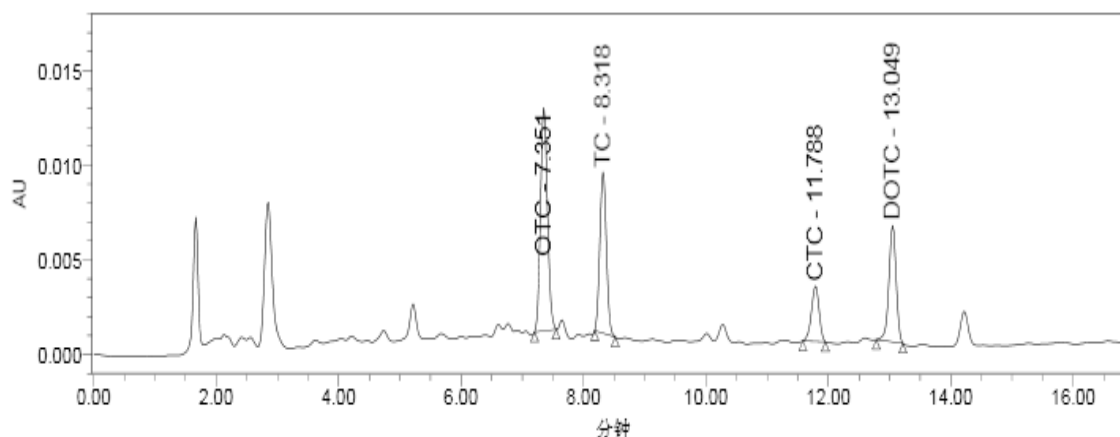
(资料性附录)



图A1 四环素类药物标准溶液色谱图(750 µg/L)



图A2 猪肝组织空白试样色谱图



图A3 猪肝组织空白添加四环素类药物色谱图 (300 µg/kg)

注：OTC为土霉素，TC为四环素，CTC为金霉素，DOTC为多西环素

附录 2

动物源食品中甲硝唑、地美硝唑及其代谢物残留检测 液相色谱 – 串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源食品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱方法。

本标准适用于猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝中的甲硝唑、地美硝唑、甲硝唑的代谢产物羟基甲硝唑、地美硝唑的代谢产物羟基地美硝唑残留量的检测。

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 分析实验室用水规则和试验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或解冻的空白或供试组织，剪碎，置于组织匀浆机中高速匀浆。

3.2 样品的保存

-20℃冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法原理或提要

用乙酸乙酯提取试样中的硝基咪唑类药物及其代谢物，经 0.1 mol/L 盐酸溶液-正己烷液液分配除脂，再经 MCX 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法检测，色谱保留时间和质谱碎片离子共同定性，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T6682 规定的一级水。

4.2.1 乙酸乙酯 色谱纯

4.2.2 乙腈 色谱纯

4.2.3 甲醇 色谱纯

4.2.4 浓盐酸

4.2.5 正己烷 色谱纯

4.2.6 氨水

4.2.7 乙酸 色谱纯

4.2.8 MCX 固相萃取柱 规格为 60mg

4.2.9 甲硝唑(MNZ) 纯度 \geq 98%

4.2.10 地美硝唑(DMZ) 纯度 \geq 98%

4.2.11 羟基甲硝唑 (MNZOH) 纯度 \geq 94%

4.2.12 羟基地美硝唑 (HMMNI) 纯度 \geq 94%

4.2.13 盐酸(0.1 mol/L)

取 8.3 mL 浓盐酸于 1000 mL 容量瓶中，用水稀释定容至刻度。

4.2.14 硝基咪唑类药物及其代谢物标准储备液(100 μ g/mL)

分别称取甲硝唑、地美硝唑、羟基甲硝唑、羟基地美硝唑各 0.01 g，用甲醇溶解定容至 100 mL，-20 $^{\circ}$ C 下保存，有效期 6 个月。

4.2.15 硝基咪唑类药物及其代谢物混合标准溶液(10 μ g/mL)

取 100 μ g/mL 硝基咪唑类药物标准储备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，-20 $^{\circ}$ C 下保存，有效期 6 个月。

4.2.16 硝基咪唑类药物及其代谢物标准工作液

取适量的 10 μ g/mL 硝基咪唑类药物混合标准溶液，用甲醇稀释成适宜浓度的标准工作液，4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存，有效期 1 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱 - 串联质谱仪

4.3.2 组织匀浆机

4.3.3 天平 感量 0.01g 和感量 0.00001g

4.3.4 涡旋振荡混合器

4.3.5 固相萃取装置

4.3.6 离心机

4.3.7 氮气吹干装置

4.4 测定步骤

4.4.1 提取

称取(2.0 \pm 0.02) g 试样于 50 mL 离心管中，加 15mL 乙酸乙酯，涡动 2 min，4000 r/min 离心 5min。上清液转移至另一 50 mL 离心管中，残渣用 15mL 乙酸乙酯重复提取一次，合并两次提取液，20 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干。

4.4.2 净化

加 0.1mol/L 盐酸 5mL，涡动 1min 充分溶解残渣，加 5mL 正己烷，手摇 20 次，4000r/min

离心 5min，弃正己烷层。下层再加 5 mL 正己烷重复去脂一次，除尽正己烷层，备用。

MCX 固相萃取柱依次用 2mL 甲醇和 2mL 0.1mol/L 盐酸活化，取备用液全部过柱，再依次用 2mL 0.1mol/L 盐酸、1mL 甲醇、1mL 2%氨水淋洗，用 2mL 甲醇-水-氨水（80-15-5）洗脱。洗脱液 20℃水浴氮气吹干，0.5mL 水复溶，过滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.3 空白添加标准曲线的制备

分别精密量取适量的硝基咪唑类药物的标准工作液，添加到 2.0g 空白试料中，制得浓度在 0~100 μ g/kg 范围内的 5~7 个不同添加浓度的试料，按 4.4.1 和 4.4.2 步骤操作，供液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.4 测定

4.4.4.1 色谱条件

色谱柱：SunFire C₈ (150×2.1mm，粒径 5 μ m)，或相当者；

柱温：室温；

进样量：10 μ L；

流动相及梯度条件见表 1：

表 1. 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	0.05% 乙酸水溶液 (%)	0.05% 乙酸乙腈溶液 (%)	变化曲线
0.0	0.2	100	0	1
6.0	0.2	0	100	6
10.0	0.2	0	100	6
20.0	0.2	100	0	1

4.4.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

离子源温度：80℃；

脱溶剂温度：300℃；

毛细管电压：2.8kV；

脱溶剂气流速：450 L/h；

锥孔气流速：30 L/h

定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量，见表 2。

表 2. 硝基咪唑类药物及其代谢物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

药物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
甲硝唑	172 > 82	172 > 128	25	21
	172 > 128			15
羟基甲硝唑	188 > 123	188 > 126	25	15
	188 > 126			15
地美硝唑	142 > 81	142 > 96	28	22
	142 > 96			15
羟基地美硝唑	158 > 55	158 > 140	25	15
	158 > 140			12

4.4.4.3 测定法

取试料溶液和空白添加标准溶液,作单点或多点校准,外标法计算试料中药物的残留量。试料溶液及空白添加标准溶液中硝基咪唑及其代谢物的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。供试试料和空白添加标准溶液中硝基咪唑及其代谢物的保留时间偏差不大于 2.5%。试料溶液中的离子相对丰度与空白添加标准溶液中的离子相对丰度比符合表 3 的要求。

表 3 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
> 50	±20
> 20~50	±25
> 10~20	±30
≤ 10	±50

4.4.5 空白试验

取空白试料,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

单点校准:
$$X = \frac{X_s A}{A_s}$$

或空白添加标准曲线校准: 由 $A_s = aX_s + b$,

求得 a 和 b, 则
$$X = \frac{A - b}{a}$$

式中:

X—供试试料中硝基咪唑及其代谢物残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$);

X_s —空白添加标准曲线试料中硝基咪唑及其代谢物的添加浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A—供试试料中硝基咪唑及其代谢物的峰面积;

A_s —空白添加标准曲线试料中硝基咪唑及其代谢物的峰面积；

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

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝中的检测限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 1.0 ~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内，用空白添加标准曲线校准，回收率为 60%-120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 20\%$ ，批间变异系数 $\leq 20\%$ 。

附录 3

动物性食品中氟苯尼考及代谢物多残留的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中氟苯尼考及代谢物的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡、猪、牛和羊的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的测定。

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 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中残留的氟苯尼考和氟苯尼考胺用碱化的乙酸乙酯提取，正己烷除脂，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法检测，内标法定量。

4 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 氟苯尼考对照品：含量 $\geq 99\%$ 。氟苯尼考胺对照品：含量 $\geq 97.6\%$ 。

4.2 同位素内标，氘代氯霉素，d5-CAP：含量为100ng/mL。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇：色谱级。

4.5 甲酸：色谱级。

4.6 乙酸乙酯

4.7 氨水

4.8 乙酸

4.9 MCX 固相萃取柱 60 mg/3 mL，或相当者。

4.10 5%乙酸水溶液：取乙酸5 mL，用水溶解并稀释至100 mL。

4.11 10%氨甲醇溶液：取氨水5 mL，用甲醇溶解并稀释至50 mL，宜现用现配。

- 4.12 30%乙腈水溶液：取乙腈30mL，用水溶解并稀释至100mL。
- 4.13 98:2乙酸乙酯-氨水溶液：取乙酸乙酯98mL，加氨水2mL，混匀。
- 4.14 1mg/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺标准贮备液：精密称取氟苯尼考和氟苯尼考胺相当于各药物25mg的对照品，分别于25 mL量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成1 mg/mL的氟苯尼考和氟苯尼考胺标准贮备液。-20℃以下保存，有效期6个月。
- 4.15 10 μg/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液：分别精密量取1mg/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺标准贮备液各0.1mL,于10mL量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为10 μg/mL混合标准工作液。2~8 ℃保存，有效期1个月。
- 4.16 1μg/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液：精密量取10μg/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液1.0mL,于10mL量瓶中，用乙腈稀释并定容，配制成浓度为1 μg/mL混合标准工作液。2~8 ℃保存，有效期1个月。

5 仪器和设备

- 5.1 超高效液相色谱-串联质谱仪（带电喷雾离子源）
- 5.2 分析天平 感量0.000 01 g
- 5.3 天平 感量0.01 g
- 5.4 高速离心机
- 5.5 涡旋混合器
- 5.6 水平振荡器
- 5.7 匀质机
- 5.8 固相萃取装置
- 5.9 氮吹仪
- 5.10 滤膜：有机相，0.2 μm。
- 5.11 鸡心瓶：100mL。

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，并使匀质。

——取均质的供试样品，作为供试试料。

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，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

-20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 基质匹配标准曲线的制备

精密量取1 μ g/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液5、25和50 μ L，10 μ g/mL氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液10、25和50 μ L，依次加入6份经提取和净化处理的空白试料浓缩液中，同时分别加入100 ng/mL氘代氯霉素内标溶液100 μ L，加30%乙腈水溶液溶解并稀释至0.5mL，配制成浓度为10、50、100、200、500和1000 ng/mL的基质匹配系列标准溶液，过滤，供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.2 提取

称取试料(2 \pm 0.02)g，于50mL离心管中，加入100 μ g/L氘代氯霉素内标溶液100 μ L，涡动混匀，静置15min。加98:2乙酸乙酯-氨水溶液10mL，涡动1min，3000r/min离心5 min，取上清液于100 mL 鸡心瓶中，残渣重复提取两次，合并三次提取液。鸡心瓶加5%乙酸2mL，振荡混匀，于40 $^{\circ}$ C水浴中浓缩至1.5mL。转至另一50mL离心管中，用5%乙酸2mL洗涤鸡心瓶，洗涤液转至同一离心管，加正己烷5mL脱脂，涡动1min，3000r/min离心5min，弃上层，下层提取液重复脱脂一次，备用。

7.3 净化

MCX 固相萃取柱依次用甲醇2mL和水2mL活化。取备用液过柱，用5%乙酸2mL淋洗，用10%氨甲醇5mL洗脱。收集洗脱液，于40 $^{\circ}$ C氮气吹干。用30%乙腈水溶液500 μ L溶解残余物，滤膜过滤，供超高效液相色谱-串联质谱测定。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱柱：C₁₈ 100mm \times 2.1mm，粒径1.7 μ m，或相当者；

流动相：A：纯水溶液；B：乙腈溶液；

梯度洗脱：梯度洗脱程序见表1；

流速：0.25 mL/min；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

进样量：10 μ L。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A %	B %
0	0.25	95	5
0.5	0.25	95	5
2.0	0.25	0	100
2.5	0.25	0	100
3.5	0.25	95	5

7.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描（氟苯尼考胺）和负离子扫描（氟苯尼考和氘代氯霉素）；

检测方式：多反应监测；

电离电压：2.8 kV；

源温：80 °C；

雾化温度：300 °C；

锥孔气流速：30 L/h；

雾化气流速：600 L/h；

测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表2。

表 2 氟苯尼考、氟苯尼考胺和 d5-CAP 定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
氟苯尼考	356 > 185	356 > 336	25	20
	356 > 336			15
氟苯尼考胺	248 > 130	248 > 230	15	15
	248 > 230			10
d5-CAP	326 > 157	326 > 157	35	15

7.4.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，内标法计算。试样溶液和基质匹配标准溶液中氟苯尼考和氟苯尼考胺的特征离子质量色谱峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表3的要求。标准溶液和添加试液中特征离子质量色谱图见附录A。

表 3 定性测定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

7.5 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

$$\text{单点校准: } X = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is} V}{A_{is} A_s C'_{is} m}$$

$$\text{或基质匹配标准曲线校准: } X = \frac{CV}{m}$$

式中:

C_{is} ——试样溶液中相应氘代氯霉素内标的浓度, $\mu\text{g/L}$;

C_s ——对照溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的浓度, $\mu\text{g/L}$;

C'_{is} ——对照溶液中相应氘代氯霉素内标的浓度, $\mu\text{g/L}$;

C ——从标准曲线得到的相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的浓度, $\mu\text{g/L}$;

A_i ——试样溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的峰面积;

A_{is} ——试样溶液中相应氘代氯霉素内标的峰面积;

A_s ——对照溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的峰面积;

A'_{is} ——对照溶液中相应氘代氯霉素内标的峰面积;

X ——试样中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的残留量, $\mu\text{g/kg}$;

V ——试样定容体积, mL ;

m ——供试试料质量, g 。

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

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $3\mu\text{g/kg}$, 定量限为 $10\mu\text{g/kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $10\sim 300\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\%\sim 120\%$ 。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)

氟苯尼考、氟苯尼考胺及 d5-CAP 特征离子质量色谱图

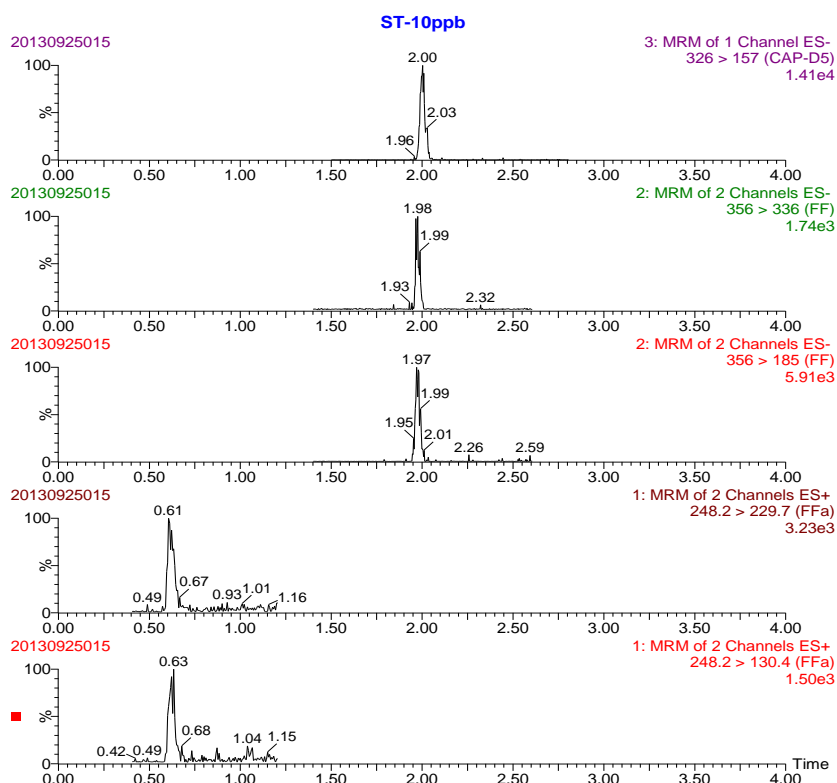


图 A1. 氟苯尼考和氟苯尼考胺标准溶液特征离子质量色谱图 (10 μg/L)

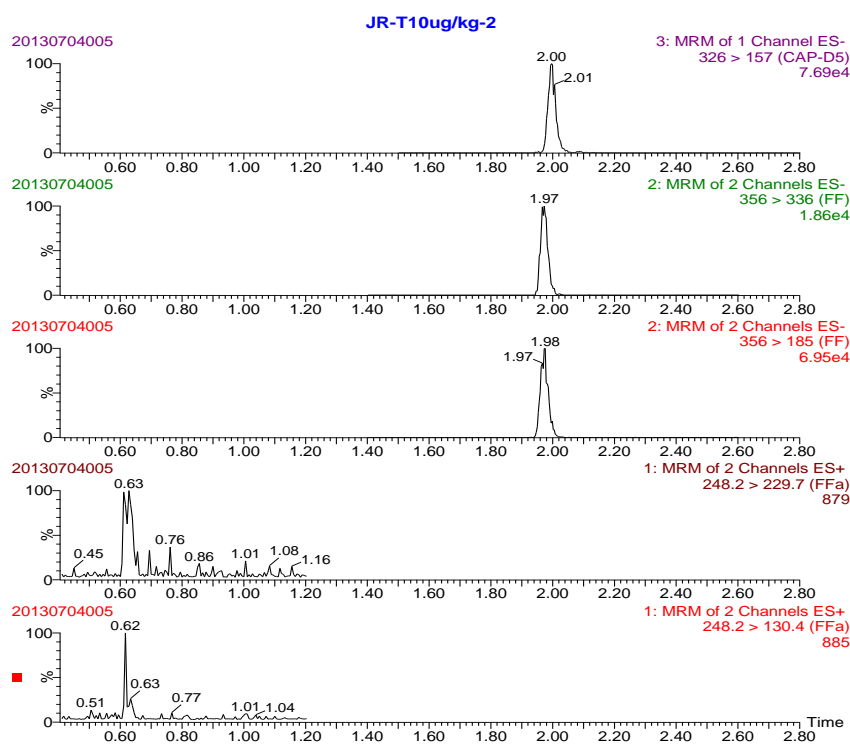


图 A2 空白鸡肉添加样品特征离子质量色谱图 (10 μg/kg)

附录 4

动物性食品中 β -内酰胺类药物残留检测—液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮等13种 β -内酰胺类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶、猪、鸡肌肉和肾脏中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮单个或多个药物残留量的检测。

1 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

2 制样

3.1 样品的制备

3.1.1 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

3.1.2 猪、鸡肌肉和肾脏

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎并使匀质。

3.2 样品的保存

上述制备样品-20℃以下贮存备用。

3 测定方法

4.1 方法提要或原理

供试样品中的残留药物用水和乙腈提取后，用正己烷去除脂肪，再用C₁₈固相萃取柱去除杂质，浓缩后供超高效液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的二级水。

4.2.1 青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮对照品：纯度均大于 95.0%。

4.2.2 乙腈 色谱纯

4.2.3 正己烷

4.2.4 甲酸

4.2.5 标准储备液（1mg/mL）：准确称取适量的青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮对照品，用 50%乙腈水溶液溶解并稀释，分别配制成 1mg/mL 的标准储备液。4℃下保存，有效期为 1 周。

4.2.6 混合标准工作液（10μg/mL）：分别准确吸取 0.1mL 的青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮标准储备液至 10mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀即得。4℃下保存，有效期为 1 周。

4.2.7 基质匹配标准工作液：准确量取适当浓度的混合标准工作液适量，加入空白组织经提取、净化及浓缩后的溶液中，加水定容至 1mL，充分混匀，即得。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪（配电喷雾离子源）

4.3.2 分析天平 感量0.00001g

4.3.3 天平 感量0.01g

4.3.4 高速离心机

4.3.5 涡旋混合器

4.3.6 水平振荡器

4.3.7 固相萃取装置

4.3.8 BakerBond C₁₈固相萃取柱：500mg/6mL，或相当者。

4.3.9 氮吹仪

4.3.10 滤膜 0.2μm

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括：

—— 取匀质的供试样品，作为供试试料。

—— 取匀质的空白样品，作为空白试料。

—— 取匀质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 2 (± 0.02) g 试料, 置于 50mL 离心管内, 加水 2mL 和乙腈 8mL (牛奶样品直接加乙腈 8mL), 涡旋混合后中速振荡 5min, 10000r/min 离心 10min, 取上清液于另一 50mL 离心管内, 加正己烷 5mL, 涡旋混合后中速振荡 5min, 5000r/min 离心 5min, 弃上层溶液, 下层溶液作为备用液。

4.4.3 净化

C₁₈小柱依次用乙腈 5mL、水 5mL 活化, 取全部备用液过柱同时收集于 15mL 玻璃试管内, 挤干, 于 40℃下氮气吹至体积小于 1mL, 加水定容至 1mL, 充分涡旋混匀, 转移至 1.5mL 塑料离心管内, 4℃下 15000r/min 离心 10min, 取适量上清液过滤膜后, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.4 基质匹配标准曲线的制备

分别准确量取 13 种 β -内酰胺类药物系列混合标准溶液适量, 依次加入 6 份空白组织经提取、净化及浓缩后的溶液中, 加水定容至 1mL, 充分混匀, 制得浓度为 5、10、50、100、200 和 500ng/mL 的基质匹配系列混合标准溶液, 离心过滤膜后上机测定。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。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱参考条件

色谱柱: BEH C₁₈ (50×2.1mm, 1.7 μ m), 或相当者;
流动相: A 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液; B 相为 0.1% 甲酸水溶液;
梯度洗脱: 0~1min, 保持 5%A; 1~2.5min, 5%A 线性变化至 50%; 2.5min~4min, 保持 50%A; 4~5min, 保持 5%A;
流速: 0.3mL/min;
柱温: 30℃;
进样量: 10 μ L。

4.4.5.2 质谱参考条件

离子源: 电喷雾离子源;
扫描方式: 正离子扫描;
检测方式: 多反应监测;
电离电压: 3.1kV;
源温: 110℃;
雾化温度: 350℃;
锥孔气流速: 50L/h;
雾化气流速: 650L/h;
测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表1。

表 1 13 种 β -内酰胺类药物定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 (min)	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔 电压(V)	碰撞 能量(eV)
阿莫西林	1.59	366.3 > 113.7	366.3 > 113.7	15	20
		366.3 > 208.0			12
头孢唑肟	2.15	529.4 > 133.9	529.4 > 133.9	25	15
		529.4 > 396.2			15
氨苄西林	2.24	350.4 > 105.8	350.4 > 105.8	25	15
		350.4 > 159.8			10
头孢氨苄	2.26	348.3 > 157.8	348.3 > 157.8	18	8
		348.3 > 174.0			15
头孢拉定	2.30	350.3 > 157.8	350.3 > 157.8	18	8
		350.3 > 175.9			12
头孢唑啉	2.46	455.2 > 155.7	455.2 > 323.1	20	15
		455.2 > 323.1			10
头孢哌酮	2.61	646.6 > 142.9	646.6 > 142.9	20	32
		646.6 > 530.3			10
羧苄西林	2.79	379.3 > 159.8	379.3 > 159.8	22	15
		379.3 > 220.0			18
青霉素 G	3.01	335.3 > 159.8	335.3 > 159.8	20	10
		335.3 > 176.0			12
青霉素 V	3.14	351.3 > 159.9	351.3 > 159.9	20	12
		351.3 > 192.0			10
苯唑西林	3.23	402.3 > 159.8	402.3 > 159.8	20	15
		402.3 > 243.1			12
氯唑西林	3.36	436.3 > 159.9	436.3 > 159.9	22	15
		436.3 > 277.2			12
萘夫西林	3.45	415.3 > 170.9	415.3 > 199.0	20	35
		415.3 > 199.0			15

4.4.5.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，外标法计算。试料溶液和基质匹配标准溶液中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮的特征离子质量色谱峰面

积均应在仪器检测的线性范围之内。试料溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表2的要求。标准溶液和添加试液中特征离子质量色谱图分别见附录A中图A.1~图A.4。

表2 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

4.4.6 空白试验

取空白试料，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

单点校准：
$$C = \frac{CsA}{As}$$

或基质匹配标准曲线校准：由 $As = aCs + b$,

求得a和b，则
$$C = \frac{A - b}{a}$$

按下式计算β-内酰胺类药物残留量：

$$X = \frac{CV}{m}$$

式中：

X——供试试料中β-内酰胺类药物残留量（μg/kg）；

Cs——基质匹配溶液中相应β-内酰胺类药物浓度（ng/mL）；

C——供试试料溶液中相应β-内酰胺类药物浓度（ng/mL）；

As——基质匹配溶液中相应β-内酰胺类药物峰面积；

A——供试试料溶液中相应β-内酰胺类药物峰面积；

V——浓缩后定容体积（mL）；

m——供试试料质量（g）。

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

5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

5.1 灵敏度

青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮在牛奶、猪、鸡肌肉和肾脏中的检测限为 1 µg/kg，定量限为 2 µg/kg。

5.2 准确度

本方法牛奶在 2 µg/kg~50 µg/kg 添加浓度范围内回收率为 60%~120%；猪、鸡肌肉和肾脏组织在 2 µg/kg~300 µg/kg 添加浓度范围内回收率为 60%~120%。

5.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%，批间相对标准偏差≤20%。

附录A

(资料性附录)

β -内酰胺类药物特征离子质量色谱图

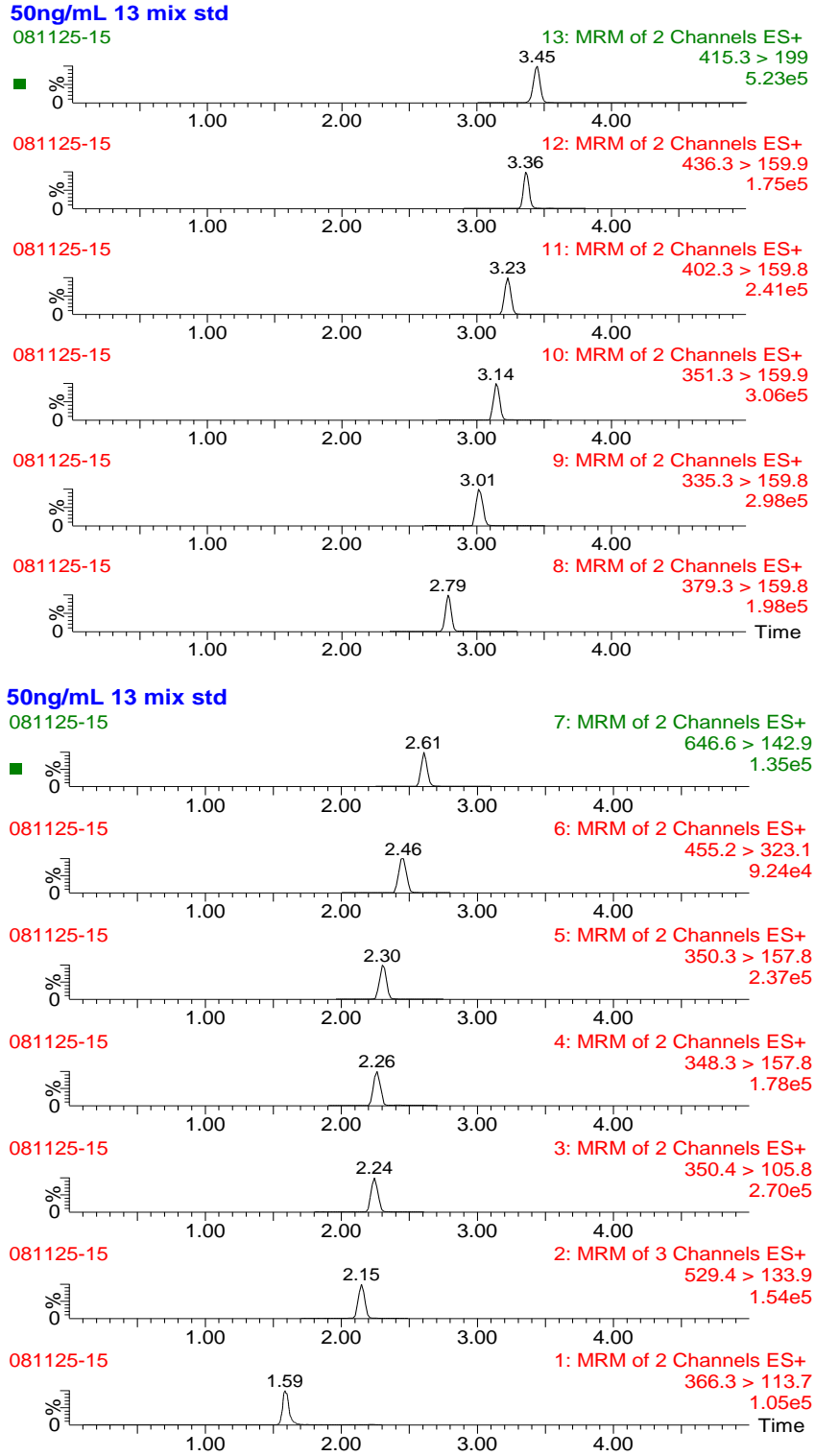
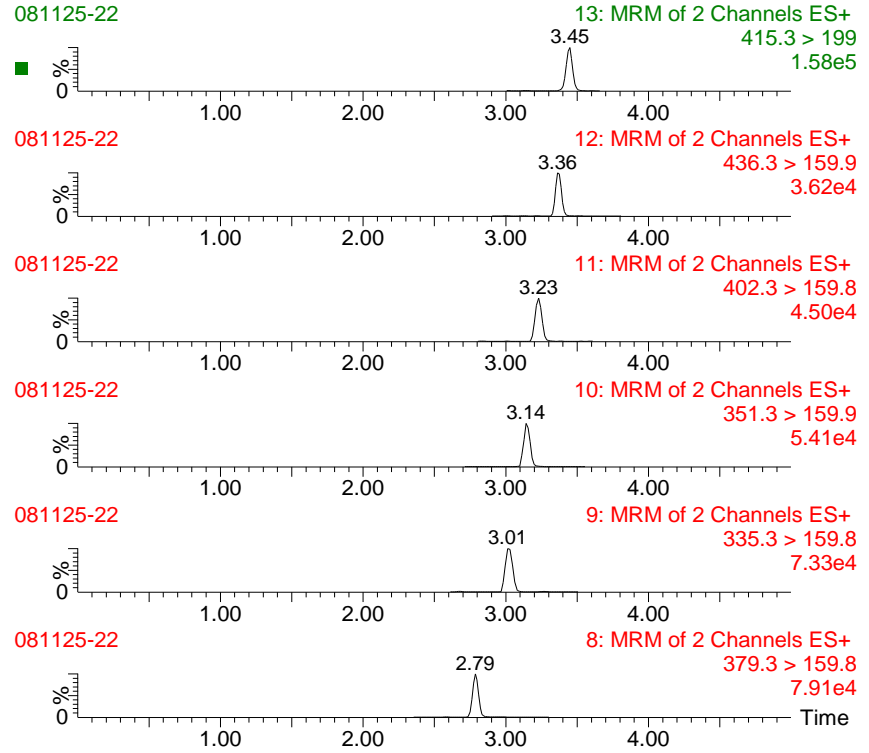


图 A.1 50ng/mL 标准溶液得到的特征离子质量色谱图

milk 5ng/g spiked



milk 5ng/g spiked

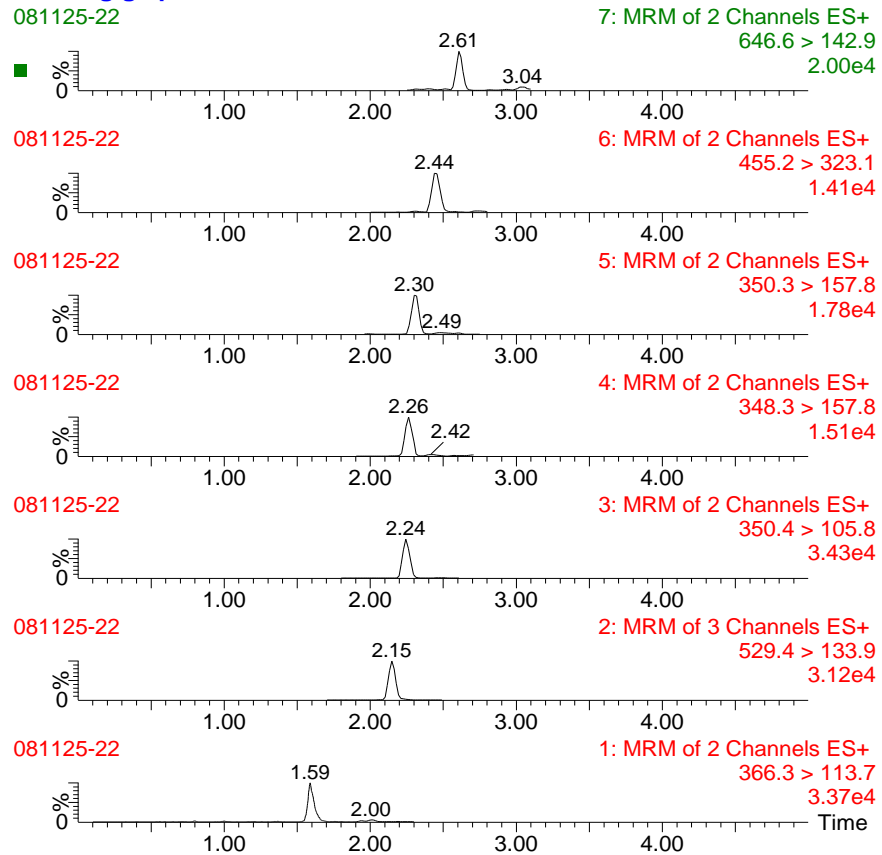
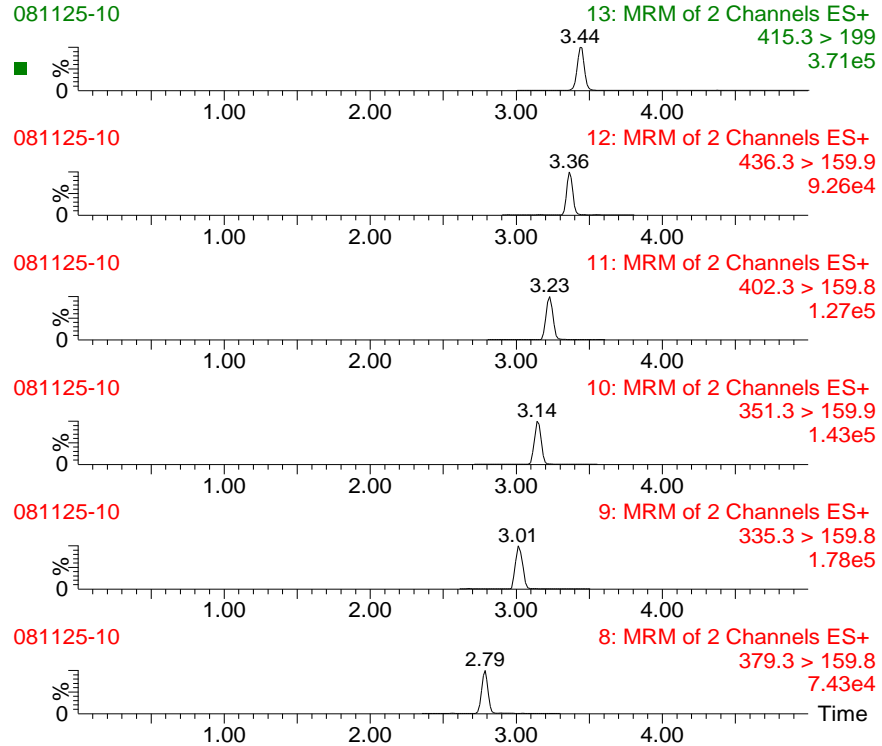


图 A.2 5ng/g 空白牛奶添加试液得到的特征离子质量色谱图

chicken 25ng/g spiked



chicken 25ng/g spiked

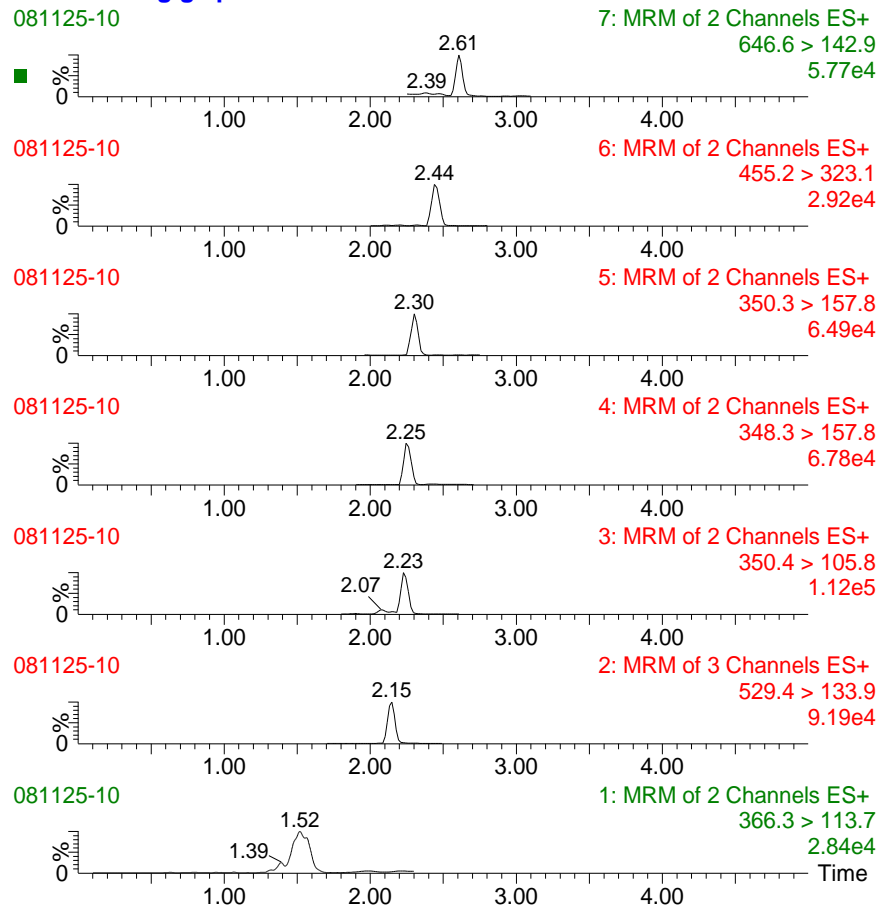
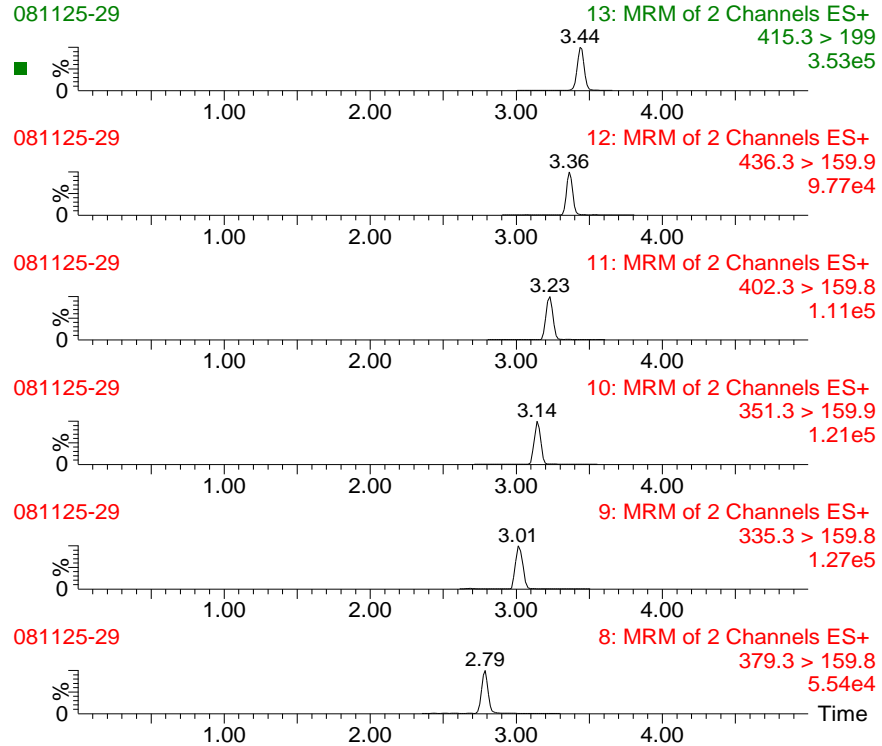


图 A.3 25ng/g 空白肌肉添加试液得到的特征离子质量色谱图

kidney 25ng/g spiked



kidney 25ng/g spiked

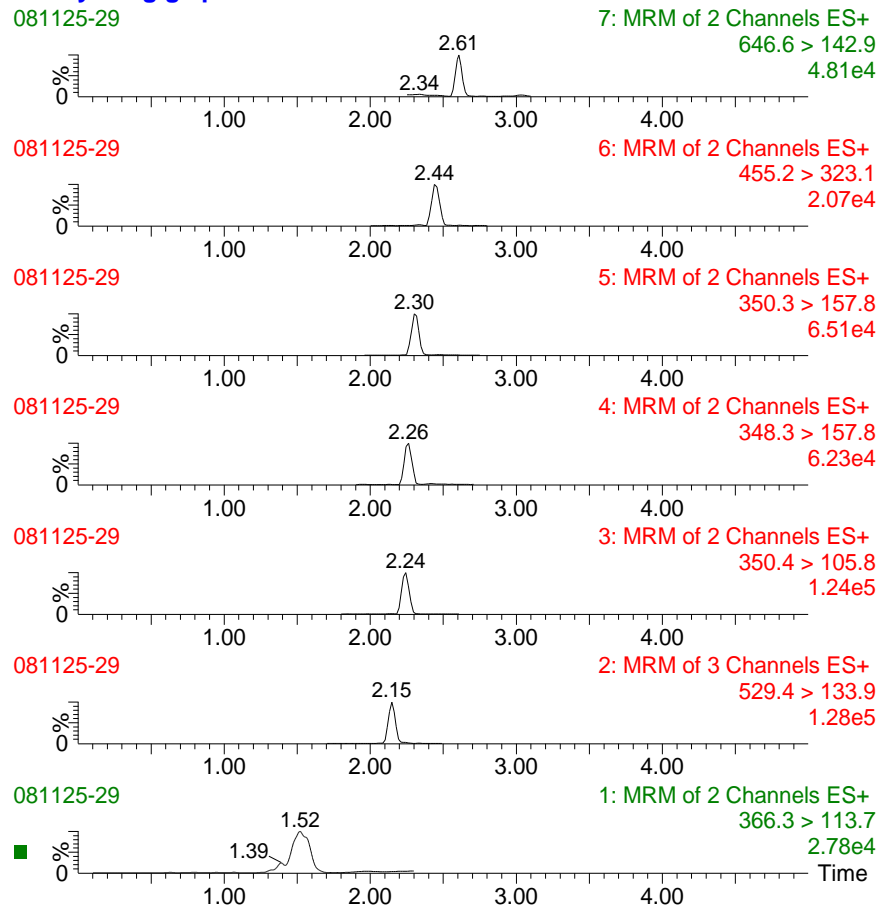


图 A.4 25ng/g 空白肾脏添加试液得到的特征离子质量色谱图

- 注：1—阿莫西林特征离子质量色谱图（366.3 > 113.7）；
2—头孢喹肟特征离子质量色谱图（529.4 > 133.9）；
3—氨苄西林特征离子质量色谱图（350.4 > 105.8）；
4—头孢氨苄特征离子质量色谱图（348.3 > 157.8）；
5—头孢拉定特征离子质量色谱图（350.3 > 157.8）；
6—头孢唑啉特征离子质量色谱图（455.2 > 323.1）；
7—头孢哌酮特征离子质量色谱图（646.6 > 142.9）；
8—羧苄西林特征离子质量色谱图（379.3 > 159.8）；
9—青霉素 G 特征离子质量色谱图（335.3 > 159.8）；
10—青霉素 V 特征离子质量色谱图（351.3 > 159.9）；
11—苯唑西林特征离子质量色谱图（402.3 > 159.8）；
12—氯唑西林特征离子质量色谱图（436.3 > 159.9）；
13—萘夫西林特征离子质量色谱图（415.3 > 199.0）。
-

附录 5

牛奶中四环素类药物残留检测—超高效液相色谱 —串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中四环素、土霉素、金霉素和多西环素单个或混合物残留检测的制样和超高效液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于牛奶中四环素、土霉素、金霉素和多西环素单个或混合物残留量的检测。

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 6682-2000 分析实验室用水规则和试验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试样品，混合均匀。

3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料中残留的四环素、土霉素、金霉素和多西环素经McIlvaine-Na₂EDTA缓冲液提取，HLB柱净化。用超高效液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.2.1 盐酸四环素 含量≥97%。

4.2.2 土霉素 含量≥92.4%。

4.2.3 盐酸金霉素 含量≥94.5%。

- 4.2.4 多西环素 含量 \geq 83.2%。
- 4.2.5 甲醇 色谱纯
- 4.2.6 乙腈 色谱纯
- 4.2.7 甲酸
- 4.2.8 氢氧化钠
- 4.2.9 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
- 4.2.10 磷酸氢二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
- 4.2.11 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)
- 4.2.12 氢氧化钠溶液 (1mol/L) 称取氢氧化钠4g, 加水溶解并稀释至100mL, 即得。
- 4.2.13 柠檬酸溶液 (0.1mol/L) 称取21.01g柠檬酸, 用水溶解并定容至1000mL, 即得。
- 4.2.14 磷酸氢二钠溶液 (0.2mol/L) 称取28.41g磷酸氢二钠, 用水溶解并定容至1000mL, 即得。
- 4.2.15 McIlvaine缓冲液 将0.1mol/L柠檬酸溶液1000mL与0.2mol/L磷酸氢二钠溶液625mL混合, 用1mol/L氢氧化钠溶液调pH值至 4.0 ± 0.5 。
- 4.2.16 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液 (0.1mol/L) 称取60.5g乙二胺四乙酸二钠放入1625mL McIlvaine缓冲液中, 使其溶解, 摇匀即得。
- 4.2.17 标准储备液 准确称取盐酸四环素、盐酸土霉素和盐酸金霉素对照品适量, 用甲醇溶解并稀释成浓度均为1mg/mL的溶液, 作为标准储备液。置-20℃冰箱中保存, 有效期为1个月。
- 4.2.18 混合标准工作液 准确量取标准储备液适量, 用甲醇-水(3+7, V/V)溶液稀释成适宜浓度的四环素、土霉素、金霉素和多西环素混合标准工作液。临用前配制。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 超高效液相色谱-串联质谱仪 (带电喷雾离子源)
- 4.3.2 分析天平 感量 0.00001g
- 4.3.3 天平 感量 0.01g
- 4.3.4 涡旋混合器
- 4.3.5 水平振荡器
- 4.3.6 离心机
- 4.3.7 酸度计
- 4.3.8 固相萃取柱 HLB 小柱(60mg/3mL), 或相当者。
- 4.3.9 氮吹仪

4.3.10 微孔滤膜 0.22 μ m

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括：

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

4.4.2 提取

称取2（ ± 0.05 ）g混匀样品，置50mL离心管中，加McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液18mL，涡旋混匀，8000r/min离心10min(温度低于15 $^{\circ}\text{C}$)，取上清液于另一离心管内备用。

4.4.3 净化

HLB小柱依次用甲醇、水各5mL预洗。取备用液10mL过柱，依次用水、5%甲醇水溶液各5mL淋洗，减压抽干。用甲醇-乙酸乙酯溶液（1+9，V/V）3mL洗脱，洗脱液用氮气吹干（温度低于40 $^{\circ}\text{C}$ ）。用甲醇-水（3+7，V/V）0.5mL溶解残余物，过滤膜后供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.4 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量，用甲醇-水（3+7，V/V）溶液稀释成含四环素、土霉素、金霉素和多西环素分别为10、20、50、100、200、500ng/mL的系列标准工作液，供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

色谱柱： BEH C_{18} （50 \times 2.1mm，1.7 μm ），或相当者；

流动相： A相为0.3%的甲酸乙腈溶液，B相为0.3%的甲酸水溶液；

梯度洗脱： 0~5min，15%A线性变化至35%A；5~6min，保持15%A。

流速：0.3mL/min；

柱温：20 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量：10 μL 。

4.4.5.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

电离电压：2.5KV；

源温：100℃；

雾化温度：300℃；

锥孔气流速：50L/h；

雾化气流速：500L/h；

定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表1。

表1 四环素类药物保留时间、定性定量离子对以及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
四环素	1.47	445.4>154.0	445.4>410.4	25	25
		445.4>410.4			20
土霉素	1.22	461.5>426.5	461.5>426.5	25	20
		461.5>443.5			12
金霉素	2.55	479.5>444.4	479.5>444.4	30	20
		479.5>462.5			15
多西环素	3.00	445.5>428.4	445.5>428.4	30	15
		445.5>410.5			25

4.4.5.3 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中四环素、土霉素、金霉素和多西环素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表2的要求。标准溶液和试样溶液的特征离子质量色谱图分别见附录A中图A.1、图A.2。

表2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

4.4.6 空白试验

除不加标准溶液外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

按下式计算试料中四环素、土霉素、金霉素和多西环素的残留量：

$$X = \frac{A_{c_s} V_1 V_3}{A_s V_2 m}$$

式中：

X ——试料中四环素、土霉素、金霉素和多西环素的残留量(ng/g)；

A ——试样溶液中相应药物的峰面积；

A_s ——对照溶液中相应药物的峰面积；

c_s ——对照溶液中相应药物的浓度(ng/mL)；

V_1 ——提取试料后缓冲液的总体积(mL)；

V_2 ——过固相萃取柱所用备用液体积(mL)；

V_3 ——溶解残余物的体积(mL)；

m ——供试试料的质量(g)。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

4 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

四环素、土霉素、金霉素和多西环素在牛奶中的检测限为5 μ g/kg，定量限为10 μ g/kg。

5.2 准确度

本方法在10 μ g/kg~200 μ g/kg添加浓度的回收率为70%~120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 \leq 20%，批间变异系数 \leq 20%。

附录A

(资料性附录)

四环素类药物特征离子质量色谱图

100ng/mL mix std

090505-35

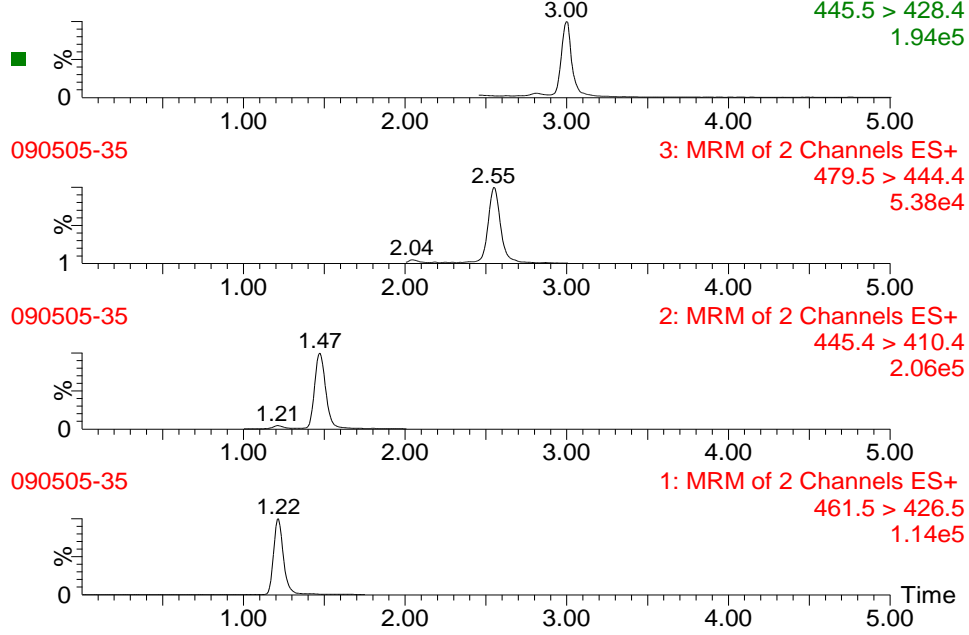


图 A.1 100ng/mL 标液中四环素类药物特征离子质量色谱图

50ng/g milk spiked

090505-27

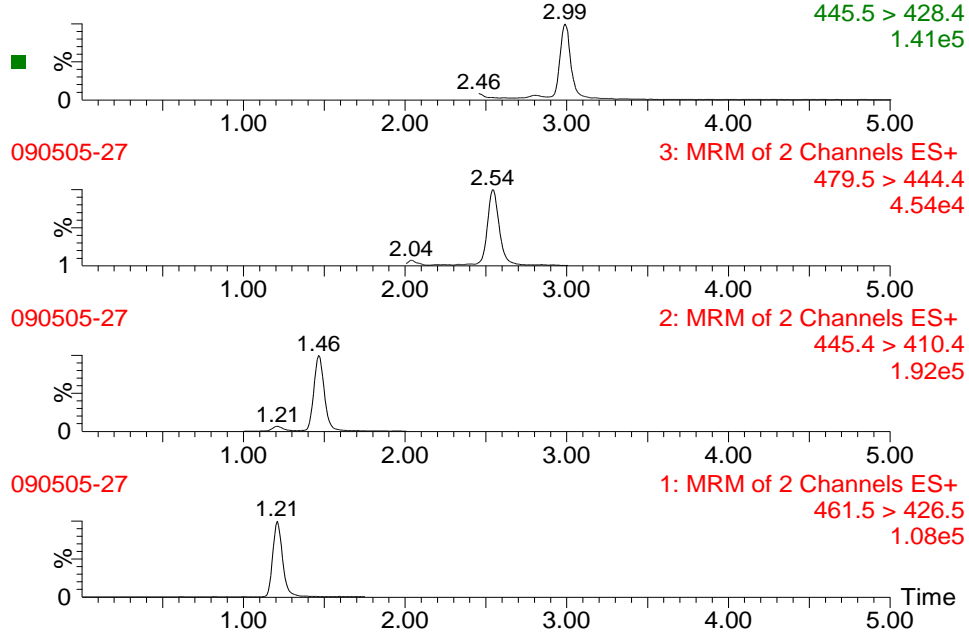


图 A.2 50ng/g 空白牛奶添加试液中四环素类药物特征离子质量色谱图

注：1—土霉素得到的特征离子质量色谱图（461.5>426.5）；

2—四环素得到的特征离子质量色谱图（445.4>410.4）；

3—金霉素得到的特征离子质量色谱图（479.5>444.4）；

4—多西环素得到的特征离子质量色谱图（445.5>428.4）。

附录 6

动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛、羊、猪和鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织中四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、乙酰磺胺、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑、磺胺甲噁唑、磺胺甲基异恶唑、磺胺甲二唑、苯甲酰磺胺、磺胺异噁唑、磺胺二甲噁唑、磺胺间甲氧噁唑、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧噁唑、磺胺氯哒嗪、磺胺邻二甲氧噁唑、磺胺间二甲氧噁唑、磺胺苯吡啶、酞磺胺噻唑、诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、麻保沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸和氟甲喹残留量的测定。

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文件。

GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中残留的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物，用缓冲溶液提取，固相萃取净化，液相色谱-串联质谱法检测，外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 四环素类药物对照品：四环素、金霉素、土霉素、强力霉素，含量 $\geq 95\%$ 。

- 4.2 磺胺类药物对照品：乙酰磺胺、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑、磺胺甲噻唑、磺胺甲基异恶唑、磺胺甲二唑、苯甲酰磺胺、磺胺异嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑，含量 $\geq 95\%$ 。
- 4.3 喹诺酮类药物对照品：诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、麻保沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸、氟甲喹，含量 $\geq 95\%$ 。
- 4.4 乙腈：色谱纯。
- 4.5 甲醇：色谱纯。
- 4.6 乙酸乙酯：色谱纯。
- 4.7 甲酸：色谱纯。
- 4.8 乙二胺四乙酸二钠 ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)
- 4.9 浓氨水
- 4.10 磷酸氢二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
- 4.11 磷酸二氢钠 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- 4.12 柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
- 4.13 氢氧化钠
- 4.14 HLB固相萃取柱:200 mg/6 mL，或相当者。
- 4.15 0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液：取磷酸二氢钠7.8 g，用水溶解并稀释至1000 mL。
- 4.16 0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液：取磷酸氢二钠17.9 g，用水溶解并稀释至1000 mL。
- 4.17 磷酸盐缓冲液：取0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液190 mL，用0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液稀释至1000 mL。
- 4.18 1 mol/L氢氧化钠溶液：取氢氧化钠4 g，用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.19 0.03 mol/L氢氧化钠溶液：取1 mol/L氢氧化钠溶液3 mL，用水稀释至100 mL。
- 4.20 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液：分别取柠檬酸12.9 g，磷酸氢二钠10.9 g，乙二胺四乙酸二钠39.2 g，用水900 mL溶解，用1 mol/L的氢氧化钠溶液调pH至 5.0 ± 0.2 ，用水稀释至1000 mL。
- 4.21 洗脱液：取甲醇150 mL，加乙酸乙酯150 mL、浓氨水6 mL，混匀。
- 4.22 复溶液：取水40 mL，加甲醇5 mL、乙腈5 mL、甲酸0.05 mL，混匀。

4.23 1 mg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物标准贮备液：精密称取相当于各药物10 mg的四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物对照品，分别于10 mL量瓶中，四环素类、磺胺类药物用甲醇溶解并稀释至刻度，喹诺酮类药物用0.03 mol/L氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度，配制成浓度为1 mg/mL的四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物标准贮备液。-20℃以下保存，有效期6个月。

4.24 10 µg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物混合标准工作液：分别精密量取1 mg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物标准贮备液各0.1 mL，于10 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为10 µg/mL的混合标准工作液。-20℃以下保存，有效期1个月。

4.25 1 µg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物混合标准工作液：精密量取10 µg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物混合标准工作液1 mL，于10 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为1 µg/mL的混合标准工作液。-20℃以下保存，有效期1个月。

4.26 0.1 µg/mL四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物混合标准工作液：精密量取1 µg/mL混合标准工作液1 mL，于10 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为0.1 µg/mL的混合标准工作液。-20℃以下保存，有效期1个月。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量0.000 01g。

5.3 天平：感量0.01g。

5.4 高速冷冻离心机

5.5 均质机

5.6 涡旋混合器

5.7 固相萃取装置

5.8 氮吹仪

5.9 超声波清洗仪

5.10 滤膜：0.2 µm。

6 试样的制备与保存

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。

——取均质的供试样品，作为供试试料

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，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

-20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 基质匹配标准曲线的制备

精密量取10 µg/mL混合标准工作液10和20 µL、1 µg/mL混合标准工作液20和40 µL、0.1 µg/mL混合标准工作液0、20和40 µL，分别加入7份经提取和净化的空白试料残渣中，45℃水浴氮气吹干，加复溶液溶解残余物并稀释至1 mL，配制成浓度为0、5、10、50、100、250和500 µg/L的基质匹配系列混合标准溶液，过滤，供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标，对应的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。

7.2 提取

称取试料(1±0.02) g，于50 mL离心管中，加入Mcllvaine- Na₂EDTA缓冲液8 mL，涡动1 min，超声20 min，于-2℃10000 r/min离心5 min，取上清液于另一50 mL离心管中。残渣加入磷酸盐缓冲液8 mL重复提取1次。合并两次提取液，混匀，备用。

7.3 净化

HLB固相萃取柱依次用甲醇5 mL和水5 mL活化，取备用液过柱，依次用水5 mL、20%甲醇水溶液5 mL淋洗，抽干5 min。用洗脱液10 mL洗脱。收集洗脱液，于45℃水浴氮气吹干，用复溶液1 mL，涡动1 min溶解残余物，14000 r/min离心5 min，滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱柱：C₁₈ (50 mm×2.1 mm，粒径1.7 µm)，或相当者；

流动相：A：0.1%甲酸水溶液；B：0.1%甲酸甲醇溶液；

梯度洗脱：梯度洗脱程序见表 1；

流速：0.3 mL/min；

柱温：35℃；

进样量：10 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A %	B %
0	0.3	95	5
2.0	0.3	85	15
5.0	0.3	60	40
7.0	0.3	5	95
7.1	0.3	95	5
9.0	0.3	95	5

7.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

电离电压：3.0 kV；

源温：100 ℃；

雾化温度：450 ℃；

锥孔气流速：30 L/h；

雾化气流速：1000 L/h；

测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表2。

表 2 四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的定性、定量离子及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
四环素	445.1 > 410.2	445.1 > 410.2	25	19
	445.1 > 427.2			13
金霉素	479.1 > 444.2	479.1 > 444.2	27	23

	479.1 > 462.2			19
土霉素	461.1 > 426.2	461.1 > 426.2	23	20
	461.1 > 443.2			13
强力霉素	445.1 > 410.2	445.1 > 428.2	26	24
	445.1 > 428.2			19
乙酰磺胺	215.0 > 108.0	215.0 > 156.0	17	18
	215.0 > 156.0			11
磺胺吡啶	250.0 > 108.0	250.0 > 156.0	27	25
	250.0 > 156.0			16
磺胺嘧啶	251.0 > 92.0	251.0 > 156.0	23	27
	251.0 > 156.0			15
磺胺甲恶唑	254.0 > 92.0	254.0 > 92.0	27	26
	254.0 > 156.0			16
磺胺噻唑	256.0 > 92.0	256.0 > 156.0	26	25
	256.0 > 156.0			15
磺胺甲噻啶	265.0 > 92.0	265.0 > 156.0	24	28
	265.0 > 156.0			15
磺胺甲基异恶唑	268.0 > 92.0	268.0 > 156.0	22	28
	268.0 > 156.0			16
磺胺甲二唑	271.0 > 92.0	271.0 > 92.0	19	30
	271.0 > 156.0			15
苯甲酰磺胺	277.0 > 108.0	277.0 > 156.0	14	22
	277.0 > 156.0			10
磺胺异噻啶	279.0 > 124.0	279.0 > 124.0	30	21
	279.0 > 186.0			17
磺胺二甲噻啶	279.0 > 92.0	279.0 > 186.0	30	28
	279.0 > 186.0			16
磺胺间甲氧噻啶	281.0 > 92.0	281.0 > 156.0	28	31

	281.0 > 156.0			22
磺胺甲氧哒嗪	281.0 > 92.0	281.0 > 156.0	26	30
	281.0 > 156.0			17
磺胺对甲氧嘧啶	281.0 > 92.0	281.0 > 156.0	25	29
	281.0 > 156.0			17
磺胺氯哒嗪	285.0 > 92.0	285.0 > 156.0	22	28
	285.0 > 156.0			15
磺胺邻二甲氧嘧啶	311.0 > 92.0	311.0 > 156.0	28	32
	311.0 > 156.0			17
磺胺间二甲氧嘧啶	311.0 > 92.0	311.0 > 156.0	28	32
	311.0 > 156.0			21
磺胺苯吡唑	315.0 > 92.0	315.0 > 158.0	32	42
	315.0 > 158.0			28
酞磺胺噻唑	404.0 > 149.0	404.0 > 256.0	27	32
	404.0 > 256.0			15
噁喹酸	262.0 > 216.0	262.0 > 244.0	24	28
	262.0 > 244.0			18
氟甲喹	262.0 > 202.0	262.0 > 244.0	26	32
	262.0 > 244.0			18
诺氟沙星	320.1 > 233.0	320.1 > 302.0	33	25
	320.1 > 302.0			19
依诺沙星	321.1 > 234.0	321.1 > 303.0	32	22
	321.1 > 303.0			20
环丙沙星	332.1 > 231.1	332.1 > 231.1	31	38
	332.1 > 314.1			22
培氟沙星	334.1 > 290.1	334.1 > 316.1	34	18
	334.1 > 316.1			20
洛美沙星	352.1 > 265.1	352.1 > 265.1	31	22

	352.1 > 308.1			16
达氟沙星	358.2 > 96.0	358.2 > 340.2	34	25
	358.2 > 340.2			23
恩诺沙星	360.2 > 245.0	360.2 > 316.1	34	26
	360.2 > 316.1			20
氧氟沙星	362.1 > 261.1	362.1 > 318.1	30	26
	362.1 > 318.1			20
麻保沙星	363.1 > 72.0	363.1 > 320.0	24	21
	363.1 > 320.0			15
沙拉沙星	386.2 > 299.1	386.2 > 299.1	33	27
	386.2 > 342.1			20
二氟沙星	400.2 > 299.0	400.2 > 356.1	37	30
	400.2 > 356.1			19

7.4.3 测定法

7.4.3.1 定性测定

通过样品色谱图的保留时间与标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准品各色谱峰的特征离子相对照定性。样品与标准品的保留时间的相对偏差不大于2.5%；样品特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不得超过表3的规定，则可判断样品中存在相应的被测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至50%	>10%至20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准工作液，按外标法定量，标准工作液及试样溶液中的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下，四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物标准溶液和试样溶液的液相色谱质谱图见附录A。

7.5 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

单点校准：
$$X = \frac{AC_s V}{A_s m}$$

或基质匹配标准曲线校准：
$$X = \frac{CV}{m}$$

式中：

X ——供试试料中相应的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物残留量， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

A ——试料溶液中相应的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的峰面积；

C_s ——对照溶液中相应的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的浓度， $\mu\text{g}/\text{L}$ ；

C ——从标准曲线得到相应的的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的浓度， $\mu\text{g}/\text{L}$ ；

V ——试样最终定容体积， mL ；

A_s ——对照溶液中相应的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的峰面积；

m ——供试试料的质量， g 。

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

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $10\sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 110\%$ 。

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 $\leq 20\%$ 。

附录 A (资料性附录)

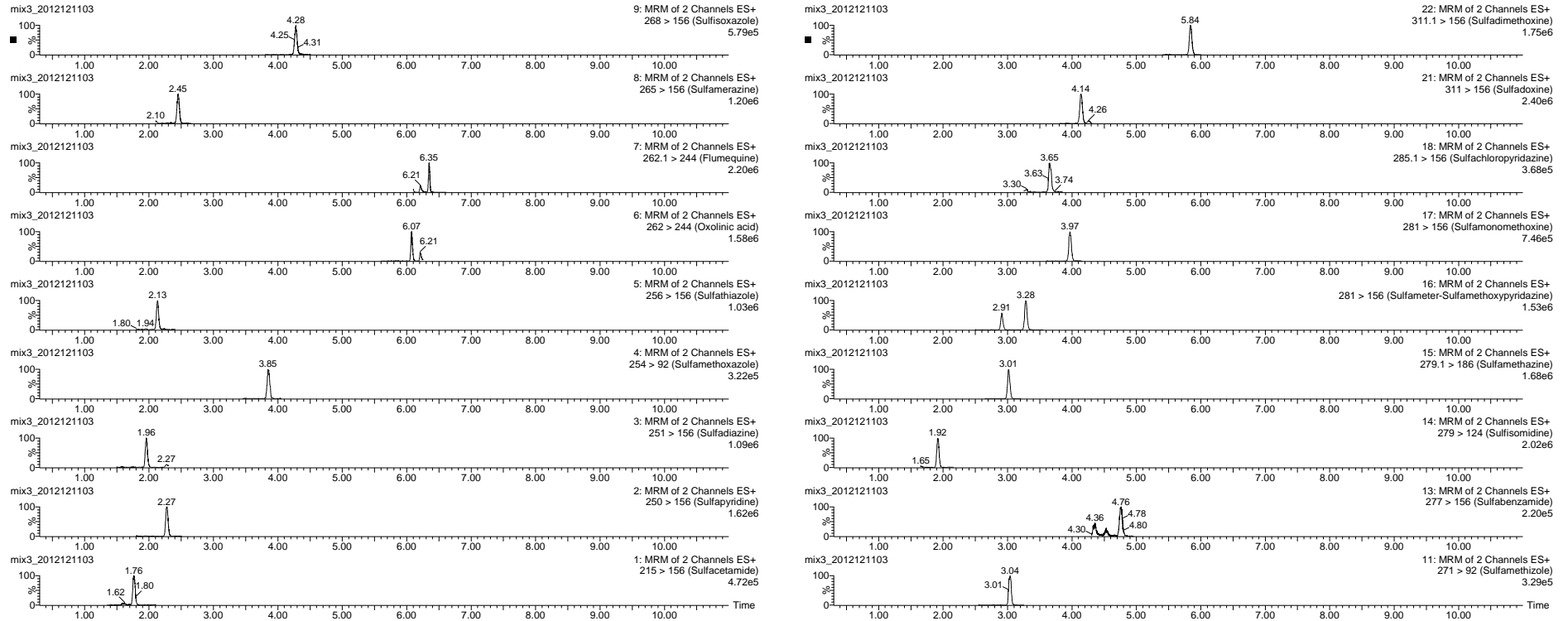


图 A.1a 猪肝脏组织基质匹配四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准溶液特征离子质量色谱图 (10 μg/L)

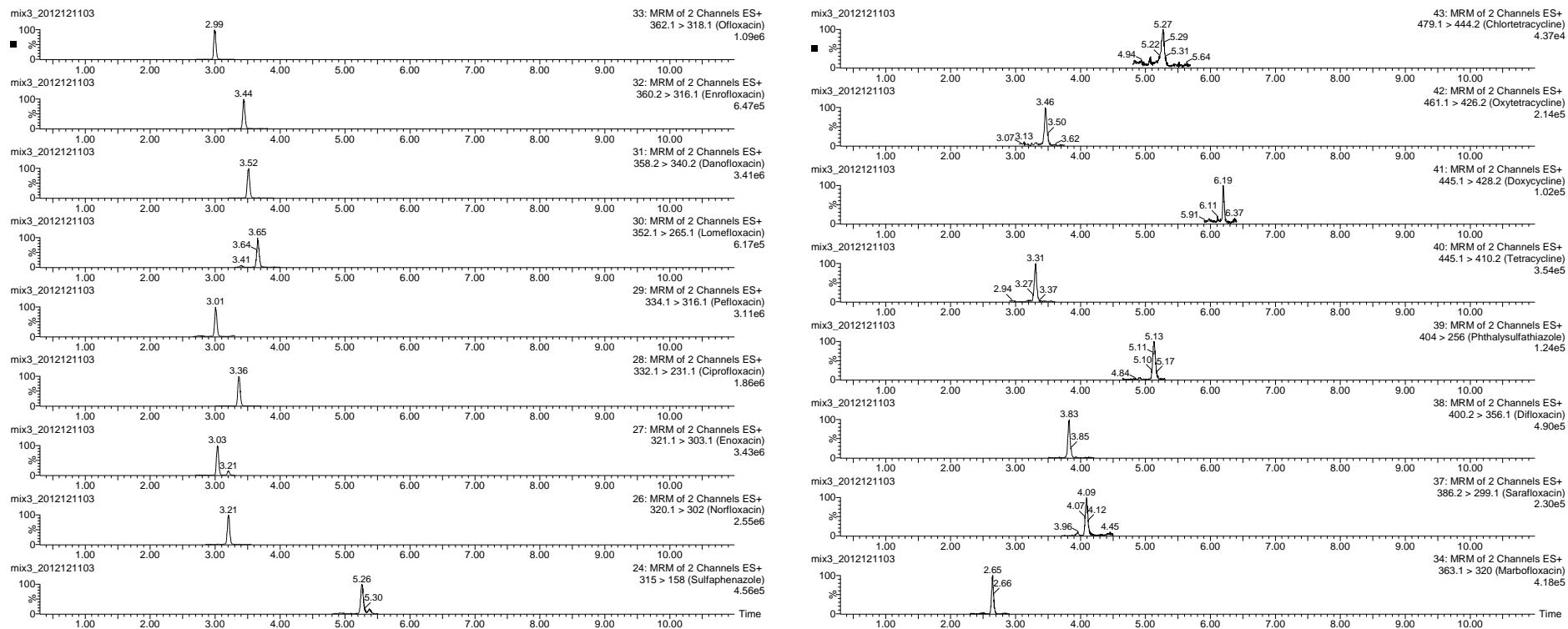


图 A.1b 猪肝脏组织基质匹配四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准溶液特征离子质量色谱图 (10 $\mu\text{g/L}$)

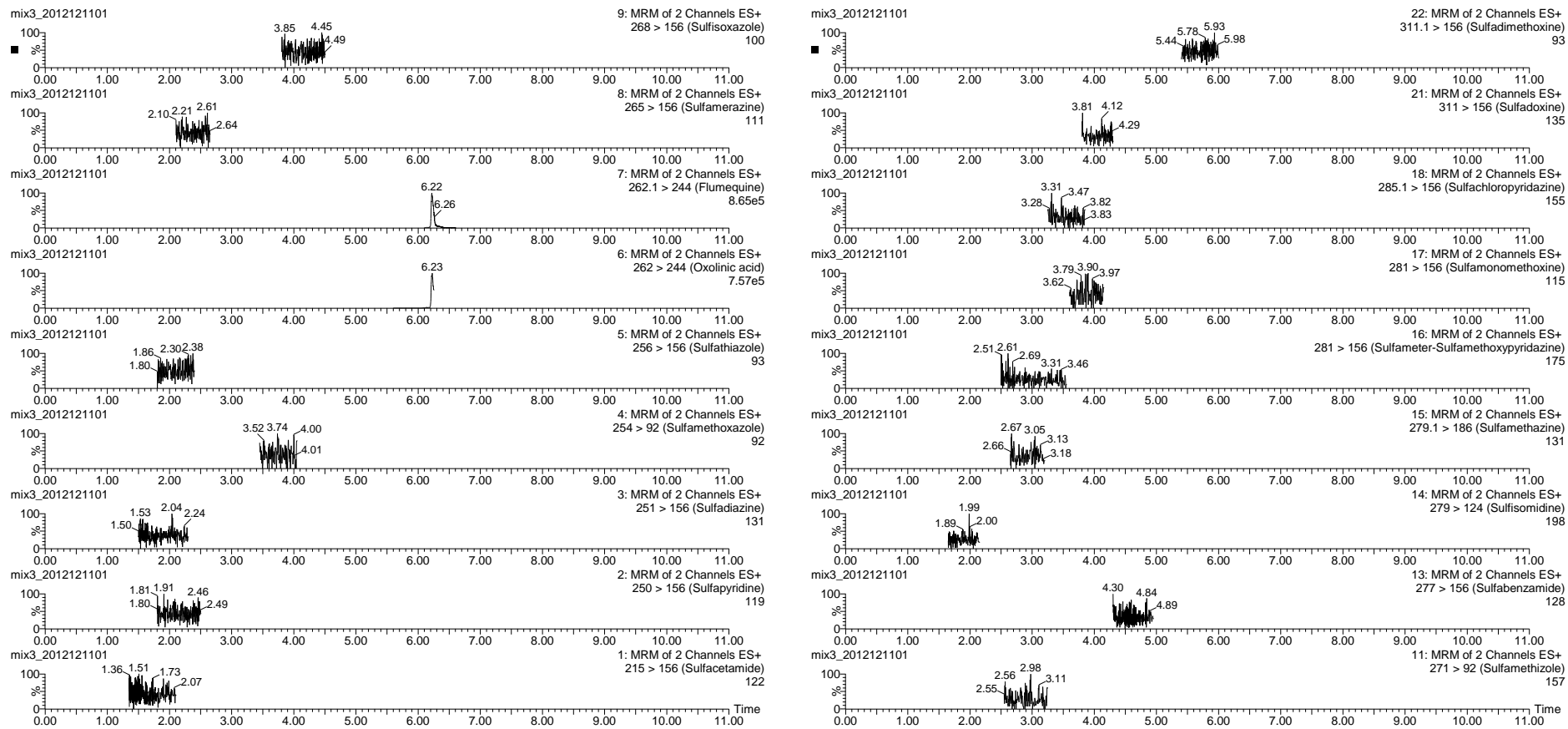


图 A.2a 猪肝组织空白试样特征离子质量色谱图

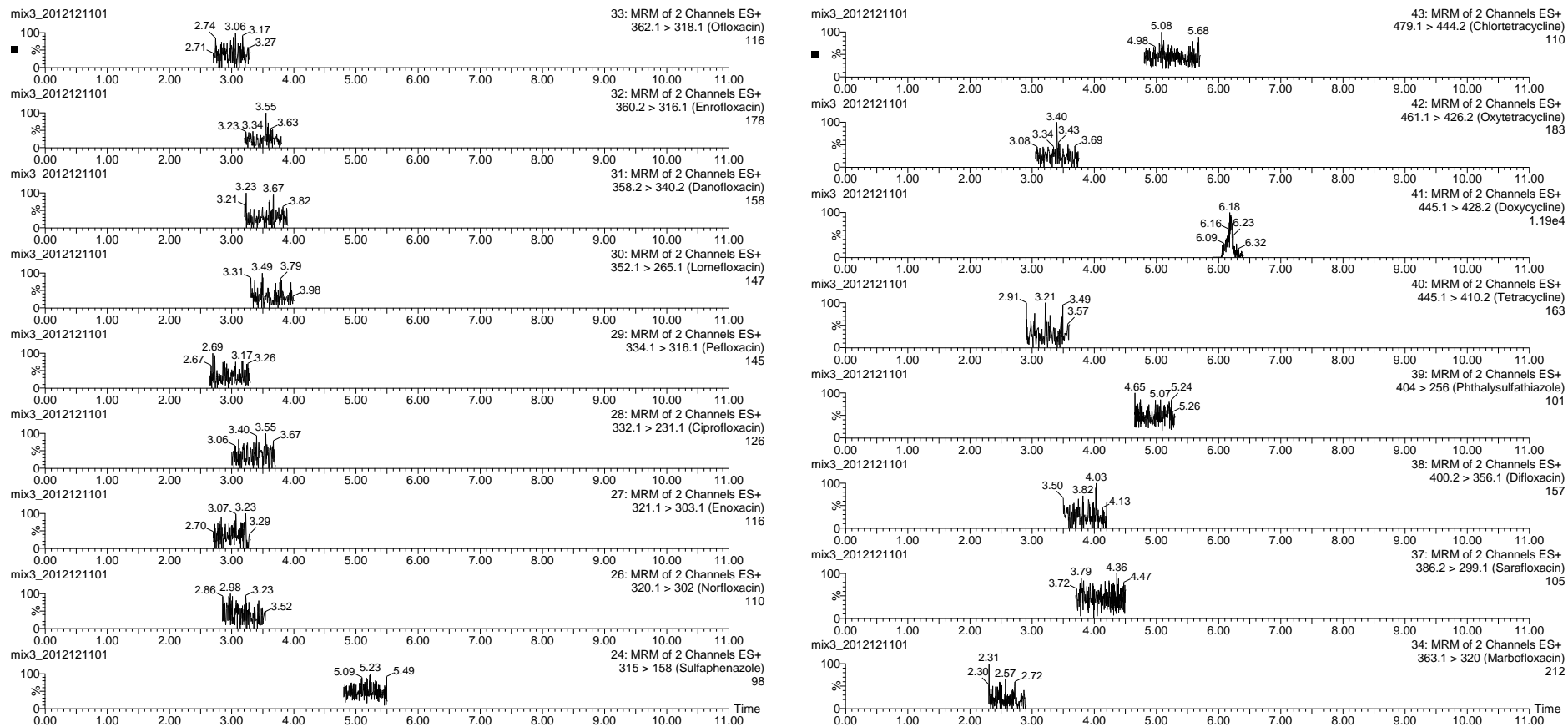


图 A.2b 猪肝脏组织空白试样特征离子质量色谱图

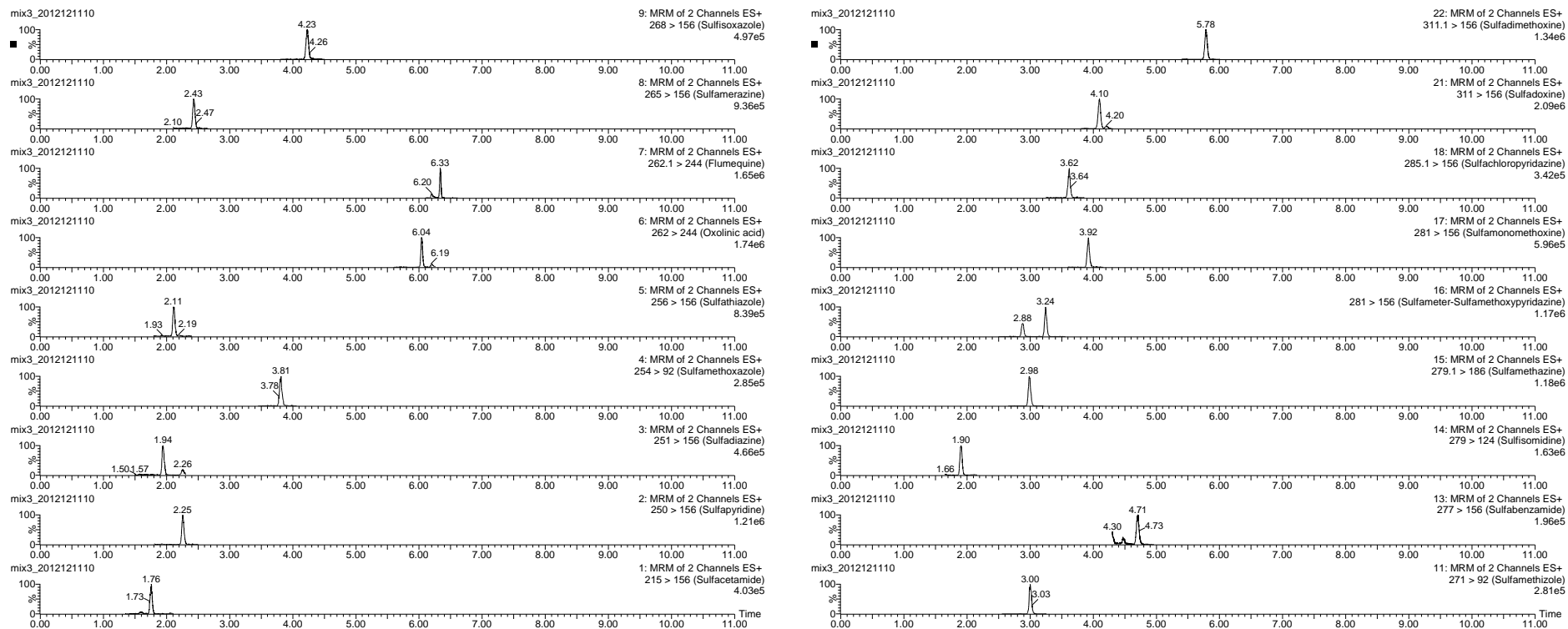


图 A.3a 猪肝脏组织空白添加四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物试样特征离子质量色谱图 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

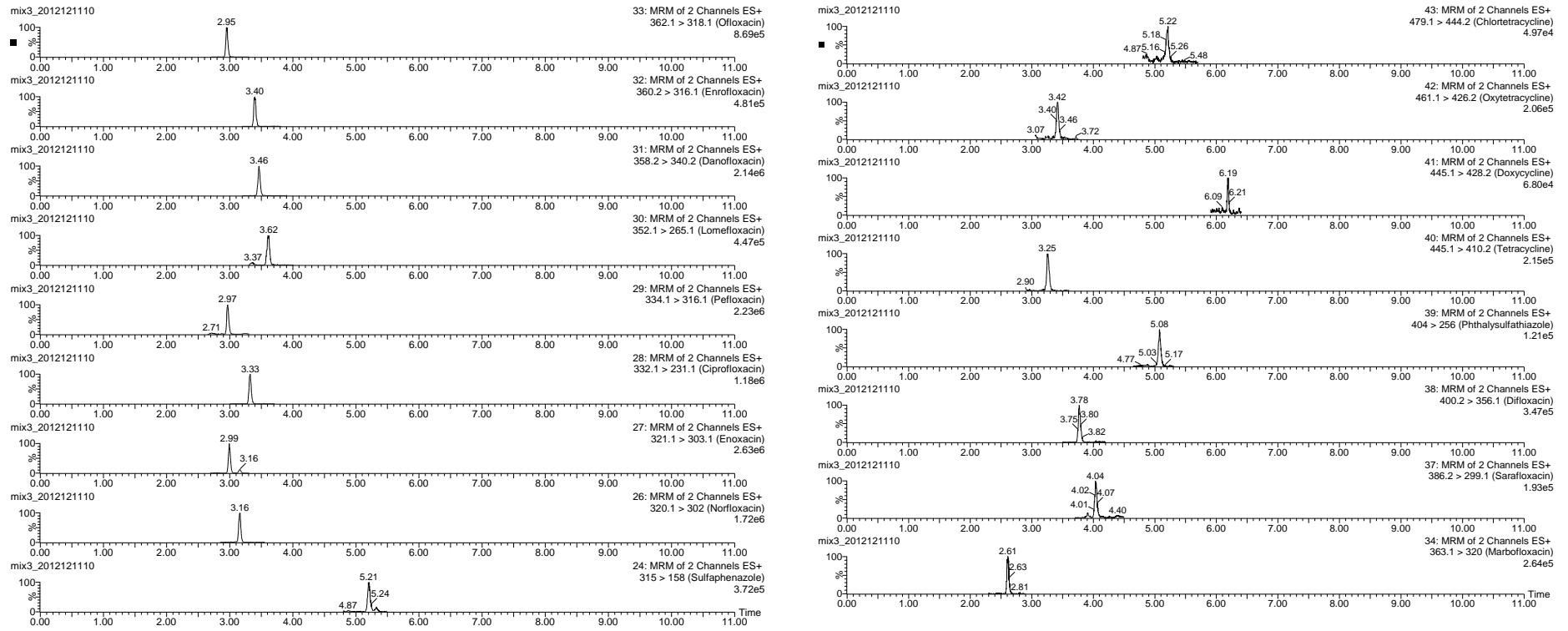


图 A.3b 猪肝脏组织空白添加四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物试样特征离子质量色谱图 (10 μ g/kg)

附录 7

动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定

方法一 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于猪、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定。

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

试样中阿维菌素类药物的残留经乙腈提取，C₁₈固相萃取柱净化，荧光衍生化，高效液相色谱法测定，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（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.1.3 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。

4.1.4 乙酸 (CH_3COOH)：色谱纯。

4.1.5 三氟乙酸酐 ($\text{C}_4\text{F}_6\text{O}_3$)：色谱纯。

4.1.6 三乙胺 ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$)。

4.1.7 1-N-甲基咪唑 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$)。

4.2 溶液配制

4.2.1 衍生化试剂 A 液：取 1-N-甲基咪唑 5 mL、乙腈 5 mL，混匀。

4.2.2 衍生化试剂 B 液：取三氟乙酸酐 5 mL、乙腈 10 mL，混匀。

4.2.3 洗涤液：取乙腈 80 mL、水 120 mL、三乙胺 0.2 mL，混匀。

4.3 标准品

阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素含量均 $\geq 95\%$ ，具体见附录 A。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准贮备液：取阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素标准品各适量（相当于各活性成分约 10 mg），精密称定，分别于 10 mL 量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液。 -18°C 以下避光保存，有效期 6 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 100 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准工作液。 -18°C 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.5 材料

4.5.1 固相萃取柱：Sep-Pak t C_{18} ，500mg/6mL，或相当者。

4.5.2 微孔尼龙滤膜：0.2 μm 。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器。

5.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

5.3 离心机。

- 5.4 组织匀浆机。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 固相萃取装置。
- 5.7 氮吹仪。

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。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

6.2 试料的保存

-18℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料 2 g（精确至±10 mg），加乙腈 8 mL，涡旋 2 min，4000 r/min 离心 5 min。收集上清液，残渣中加乙腈 8 mL，重复提取一次。合并两次提取液，混匀。取提取液 4 mL，加水 6 mL 和三乙胺 10 μL，混匀，备用。

7.2 净化

固相萃取柱依次用乙腈、洗涤液各 4 mL 活化，取备用液过柱，依次用洗涤液 5 mL 和水 3 mL 淋洗，抽干，用正己烷 4 mL 淋洗，抽干，用乙腈 8 mL 洗脱。收集洗脱液，40℃ 水浴氮气吹干。

7.3 衍生

加衍生化试剂 A 液 100 μL、衍生化试剂 B 液 150 μL、乙酸 50 μL、三乙胺 50 μL，涡旋 30 s，室温下避光静置 15 min。用甲醇稀释至 1 mL，涡旋 10 s，室温避光静置 15 min，过滤后供高效液相色谱仪测定。

7.4 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量，用甲醇稀释，配制成阿维菌素类药物浓度为 2.5 μg/L、5 μg/L、12.5 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、125 μg/L 和 250 μg/L 的系列标准工作液，40℃水浴氮气吹干，按 7.3 衍生化步骤处理，供高效液相色谱仪测定。以测得峰面积为纵坐标，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。

7.5 测定

7.5.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm），或相当者；
- b) 流动相：乙腈:水（90:10，v/v）；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 检测波长：激发波长：365 nm；发射波长：475 nm；
- e) 柱温：35℃；
- f) 进样量：50 μL。

7.6 测定法

取试样溶液和标准溶液，做单点或多点校准，按外标法以峰面积计算。试样溶液及标准溶液中阿维菌素类药物的峰面积应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液的高效液相色谱图见附录B。

7.7 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试样中阿维菌素类药物的残留量（μg/kg），按式（1）计算：

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中阿维菌素类药物的残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；

C_s ——标准溶液中阿维菌素类药物的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

A ——试样溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积；

A_s ——对照溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积；

V_1 ——提取用乙腈的总体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——合并后所取提取液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——试样最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

m ——供试试样质量，单位为克 (g)；

计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

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 $1.5 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $5 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

方法二 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定。

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

试样中残留的阿维菌素类药物，用乙腈提取，C₁₈固相萃取柱净化，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（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.2 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。

4.1.3 三乙胺（C₆H₁₅N）。

4.2 溶液配制

4.2.1 洗涤液：取乙腈 80 mL、水 120 mL、三乙胺 0.2 mL，混匀。

4.3 标准品

4.3.1 阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素含量均 $\geq 95\%$ 。具体见附录 A。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准贮备液（1 mg/mL）：取阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素标准品各适量（相当于各活性成分约 10 mg），精密称定，分别于 10 mL 量瓶中，用乙腈适量使溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液。-18℃ 以下保存，有效期 6 个月。

4.4.2 混合标准工作液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：精密量取标准贮备液各 0.1 mL，于 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.4.3 混合标准工作液（1 $\mu\text{g/mL}$ ）：精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.4.4 混合标准工作液（0.1 $\mu\text{g/mL}$ ）：取 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.5 材料

4.5.1 固相萃取柱：Sep-Pak tC₁₈，500 mg/6mL，或相当者。

4.5.2 微孔尼龙滤膜：0.2 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

5.3 离心机：4 000 r/min。

5.4 组织匀浆机。

5.5 涡旋混合器。

5.6 固相萃取装置。

5.7 氮吹仪。

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。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

6.2 试料的保存

-18℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样 2 g（精确至±10 mg），加乙腈 8 mL，涡旋 2 min，4000 r/min 离心 5 min。收集上清液，残渣中加乙腈 8 mL，重复提取一次。合并两次提取液，混匀。取提取液 4 mL，加水 6 mL 和三乙胺 10 μL，混匀，备用。

7.2 净化

固相萃取柱依次用乙腈、洗涤液各 4 mL 活化，取备用液过柱，依次用洗涤液 5 mL、水 3 mL 淋洗，抽干，用正己烷 4 mL 淋洗，抽干，用乙腈 8 mL 洗脱。收集洗脱液，40℃ 水浴氮气吹干。加入 50% 乙腈水溶液 0.5 mL，涡旋 1 min 溶解残余物，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取 10 μg/mL 混合标准工作液 5 μL 和 10 μL、1 μg/mL 混合标准工作液 5 μL 和 25 μL、0.1 μg/mL 混合标准工作液 5 μL 和 25 μL，分别加入 7 份经提取和净化的空白试样残渣中，40℃ 水浴氮气吹干，加入 50% 乙腈水溶液 0.5 mL 涡旋溶解残余物，配制成浓度为 1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L 的基质匹配系列混合标准溶液，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标，对应的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 色谱参考条件

a) 色谱柱：C₁₈（50 mm×2.1 mm，1.7 μm），或相当者；

- b) 柱温: 35℃;
- c) 进样量: 10 μL ;
- d) 流速: 0.3 mL/min;
- e) 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; B: 0.1%甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	0.1%甲酸水溶液, %	0.1%甲酸乙腈, %
0	10	90
0.2	10	90
1.2	0	100
1.5	0	100
1.6	10	90
3.0	10	90

7.4.2 质谱参考条件

- 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) 离子源温度: 100℃;
- e) 脱溶剂温度: 350℃;
- f) 毛细管电压: 3.0 kV;
- g) 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
阿维菌素	895.5 > 183.1 (52) 895.5 > 751.4 (40)	895.5 > 751.4 (80)
伊维菌素	897.4 > 183.1 (54) 897.4 > 753.4 (44)	897.4 > 753.4 (80)
多拉菌素	921.5 > 183.1 (52) 921.5 > 777.4 (46)	921.5 > 777.4 (85)
乙酰氨基阿维菌素	936.5 > 352.2 (56) 936.5 > 490.2 (48)	936.5 > 490.2 (85)

7.4.3 测定法

a) 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中阿维菌素类药物的保留时间与标准工作液中阿维菌素类药物的保留时间之比, 偏差在 $\pm 2.5\%$ 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

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试样中阿维菌素类药物的残留量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)，按下式计算：

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中阿维菌素类药物的残留量，单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_s ——标准溶液中阿维菌素类药物的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

A ——试样溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积；

V_1 ——提取用乙腈的总体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——合并后所取提取液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——试样最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

m ——供试试样质量，单位为克 (g)；

计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.2 灵敏度

本方法的检测限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录A

(资料性附录)

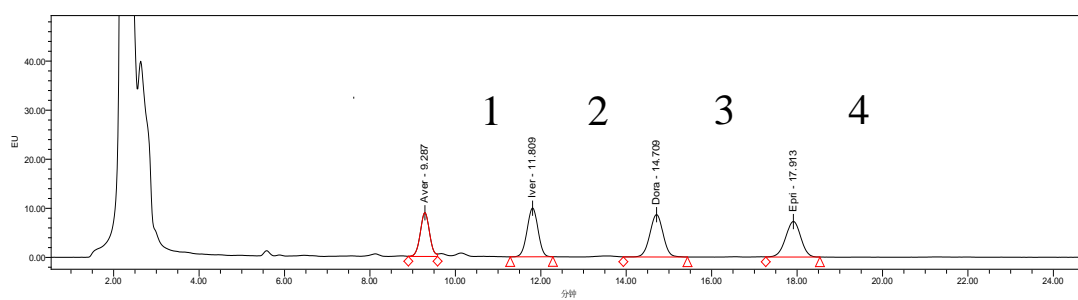
药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

表 A₁ 4种阿维菌素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
阿维菌素 B1a	Avermectin B1a	$C_{48}H_{72}O_{14}$	65195-55-3
伊维菌素 B1a	Ivermectin B1a	$C_{48}H_{74}O_{14}$	71827-03-7
多拉菌素	Doramectin	$C_{50}H_{74}O_{14}$	117704-25-3
乙酰氨基阿维菌素 B1a	Eprinomectin B1a	$C_{50}H_{75}NO_{14}$	123997-26-2

附 录B
(资料性附录)
色谱图

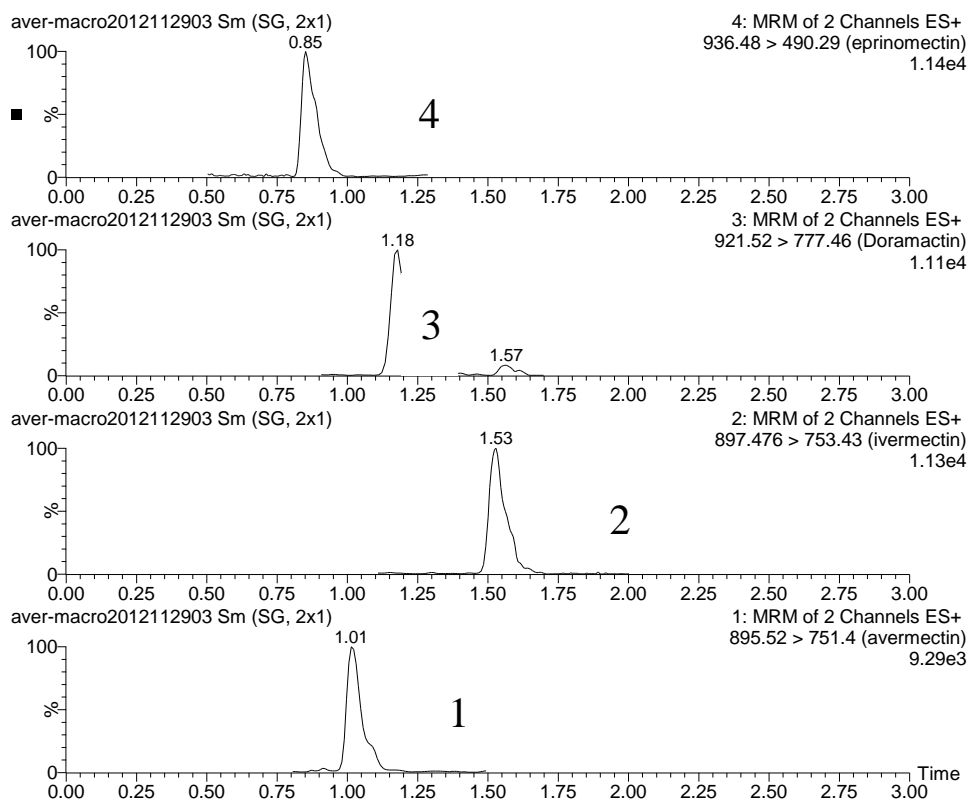
待测药物标准溶液色谱图见图B₁。



图B₁ 阿维菌素类药物标准溶液色谱图 (2.5 µg/L)

(峰1: 阿维菌素; 峰2: 伊维菌素; 峰3: 多拉菌素; 峰4: 乙酰氨基阿维菌素)

待测药物标准溶液特征离子质量色谱图见图B₂。



说明：1-阿维菌素特征离子质量色谱图（895.5>751.4）

2-伊维菌素特征离子质量色谱图（897.4>753.4）

3-多拉菌素特征离子质量色谱图（921.5>777.4）

4-乙酰氨基阿维菌素特征离子质量色谱图（936.5>490.2）

图 B₂ 阿维菌素类药物标准溶液特征离子质量色谱图(1 μg/L)

附录 8

动物性食品中头孢噻呋残留量的测定

第一法 动物性可食组织中头孢噻呋残留量测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性可食组织中头孢噻呋残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于猪、牛肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中头孢噻呋残留量的测定。

2 规范性应用文件

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

试料中残留的头孢噻呋，经二硫赤藓醇（DTE）作用，使头孢噻呋及去呋喃甲酰头孢噻呋（DFC）有关代谢物从蛋白或含硫化合物中分离，与碘乙酰胺反应，生成稳定的乙酰胺衍生物（DCA），经提取、纯化、净化，高效液相色谱测定，外标法定量。

4 试剂和材料

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 ）。

4.1.3 二硫赤藓醇（ $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTE）。

4.1.4 碘乙酰胺（ $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ ）。

4.1.5 无水氯化钙（ CaCl_2 ）。

4.1.6 冰醋酸（ CH_3COOH ）。

- 4.1.7 磷酸 (H_3PO_4): 85%。
- 4.1.8 氯化钾 (KCl)。
- 4.1.9 氢氧化钾 (NaOH)。
- 4.1.10 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。
- 4.1.11 四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.1.12 氯化钠 (NaCl)。
- 4.1.13 氢氧化钠 (NaOH)。
- 4.1.14 三氟乙酸 (CF_3COOH , TFA)。

4.2 标准品

盐酸头孢噻呋 (Ceftiofur Hydrochloride, $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3 \text{HCl}$), 以 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3$ 计, 含量 $\geq 87.5\%$, 或相当者。

4.3 溶液配制

- 4.3.1 硼酸缓冲液 (0.05mol/L): 取四硼酸钠19g、氯化钾3.7g, 加水使溶解并稀释至1000mL。
- 4.3.2 磷酸盐缓冲液 (0.025 mol/L): 取磷酸二氢钾 3.4 g, 加水溶解并稀释至 1000 mL, 用 45%氢氧化钾溶液调 pH 值至 7.0。
- 4.3.3 提取液 (0.4% DTE): 取 DTE 1g, 加硼酸缓冲液适量使溶解并稀释至 250mL, 现用现配。
- 4.3.4 碘乙酰胺溶液 (14%): 取碘乙酰胺 7g 溶于 50mL 磷酸盐缓冲液中, 现用现配。
- 4.3.5 氢氧化钠溶液 (0.01mol/L): 取氢氧化钠 0.4g, 加水使溶解并稀释至 1000mL。
- 4.3.6 氯化钠溶液 (0.1mol/L): 取氯化钠 5.9 g, 加水溶解并稀释至 1000 mL。
- 4.3.7 氯化钙溶液 (0.1mol/L): 取无水氯化钙 11.1 g, 加水溶解并稀释至 1000 mL。
- 4.3.8 磷酸溶液 (25%): 取磷酸 25 mL, 加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.3.9 醋酸溶液 (5%): 取冰醋酸 5 mL, 加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.3.10 C_{18} 洗脱液: 乙腈-水 (15:85)
- 4.3.11 SAX 预洗液: 甲醇-氯化钠溶液 (25:75)。
- 4.3.12 SAX 洗脱液: 乙腈-醋酸溶液 (5:95)。
- 4.3.13 SCX 预洗液: 甲醇-氯化钙溶液 (25:75)。
- 4.3.14 SCX 洗脱液 I: 乙腈-氯化钠溶液 (5:95)。

4.3.15 流动相:

A (0.1%TFA 水溶液): 取 1mL 三氟乙酸, 加水至 1000mL。

B (0.1%TFA 乙腈溶液): 取 1mL 三氟乙酸, 加乙腈至 1000mL。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准储备液 (100 μ g/mL): 取盐酸头孢噻呋标准品约11mg, 精密称定, 于100mL量瓶中, 加磷酸盐缓冲液适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。-20 $^{\circ}$ C保存, 有效期6个月。

4.4.2 标准工作液 (10 μ g/mL): 精密量取标准储备液5mL于50mL量瓶中, 加磷酸盐缓冲液至刻度, 摇匀, 即得。2~8 $^{\circ}$ C保存, 有效期1个月。

4.5 材料

4.5.1 C₁₈固相萃取柱: 1g/6mL, 或相当者。

4.5.2 SAX固相萃取柱: 500mg/10mL, 或相当者。

4.5.3 SCX 固相萃取柱: 100mg/10mL, 或相当者。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器。

5.2 分析天平: 感量0.00001g和0.01g。

5.3 恒温水浴振荡器。

5.4 匀浆机。

5.5 涡旋混合器。

5.6 冷冻离心机

5.7 固相萃取装置。

5.8 pH计。

5.9 离心管: 50mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

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 试样的保存

-18℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料 2 g(准确至±20mg),加提取液 30.0 mL,中速振荡 5 min,4000 r/min 离心 5 min。取 15.0 mL 于另一 50 mL 离心管,20~30 r/min 转速、50℃恒温水浴振摇 15 min,备用。

7.2 衍生

在上述备用液加碘乙酰胺溶液 3 mL,混匀,室温下放置 30 min。4℃、10000 r/min 离心 20 min。取上清液,备用。

7.3 净化

7.3.1 C₁₈柱:依次用甲醇 4 mL、磷酸盐缓冲液 5 mL 预洗柱。备用液过柱。依次用磷酸缓冲液 5 mL、氢氧化钠溶液 3 mL 洗柱,挤干。加入 C₁₈洗脱液 3 mL,洗脱,收集洗脱液。加水 15 mL 稀释至总体积为 18 mL,混匀,备用。

7.3.2 SAX 柱:依次用甲醇、SAX 预洗液和水各 2 mL 预洗柱。取 7.3.1 备用液过柱,加水 1 mL 洗柱,挤干。加 SAX 洗脱液 3 mL,洗脱,收集洗脱液。加水 10 mL 使总体积为 13mL,混匀,备用。

注:脂肪组织稀释提取液经 SAX 固相萃取柱净化后,用 1 mL 水洗,挤干。加 SAX 固相萃取柱洗脱液 2.0 mL,收集洗脱液,混匀,供高效液相色谱进行分析。

7.3.3 SCX 柱:依次用甲醇 1 mL、SCX 预洗液 2 mL 和水 2 mL 预洗柱。取 7.3.2 备用液,过柱,用水 1 mL 淋洗,挤干或真空抽干。加 SCX 洗脱液 2.0 mL,洗脱,挤干,收集洗脱液,供高效液相色谱测定。

7.4 标准曲线的制备

精密量取标准储备液适量,用磷酸盐缓冲液稀释制成浓度为 0.2、0.4、0.8、4.0、20.0 和 40.0 μg/mL 的溶液,分别精密量取 0.5 mL,按 7.2 衍生测定步骤起同法处理制成头孢噻吩浓度为 25、50、100、500、2500 和 5000 ng/mL 的标准溶液,供高效液相色谱测定。以峰面积为纵坐标,对应的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。

注：用于脂肪组织检测的标准曲线的制备：经过 SAX 固相萃取柱净化后，加入水 1 mL 洗柱，挤干。

加 SAX 洗脱液 2.0 mL，收集洗脱液，混匀，供高效液相色谱测定。

7.5 测定

7.5.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm,5μm），或相当者；
- b) 检测波长：266nm；
- c) 柱温：30℃；
- d) 进样量：40μL；
- e) 流速：1.0 mL/min；
- f) 流动相：A：0.1% 三氟乙酸水溶液
B：0.1% 三氟乙酸乙腈溶液；
- g) 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A%	流动相 B%
0-10	100	0
10-35	100→75	0→25
35-40	50	50
40-45	100	0

0~10min, 流动相 A 比例保持 100%; 10~35min, 流动相 A 比例由 100% 线性变化至 75%; 35~40min, 流动相 A 比例保持 50%; 40~45min, 流动相 A 比例保持 100%。

7.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，做单点或多点校正，按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中 DCA 的响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 A。

7.6 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试料中头孢噻吩的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \times 2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试料中头孢噻吩的残留量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

A —试料溶液中头孢噻吩的峰面积；

A_s —对照溶液中头孢噻吩的峰面积；

C_s —对照溶液中头孢噻吩的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V —SCX（脂肪为SAX）洗脱液体积，单位为毫升（ mL ）。

m —供试试料的质量，单位为克（ g ）；

注：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，结果保留3位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法在牛、猪肌肉、脂肪、肾脏和猪肝脏中的定量限为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛肝脏中的定量限为 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

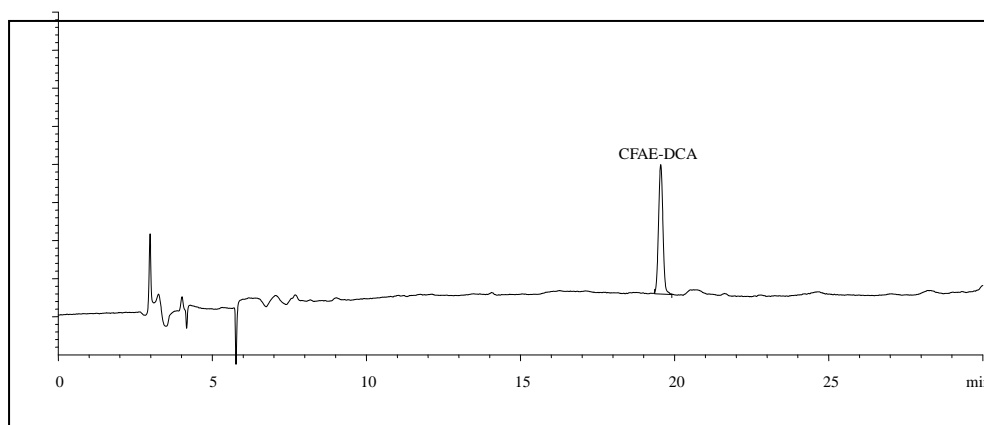
9.2 准确度

本方法在 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 6000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $80\% \sim 110\%$ 。

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)
色谱图



图A.1 0.5 μg/mL头孢噻吩对照溶液色谱图

第二法 牛奶中头孢噻呋残留量测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中头孢噻呋残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于牛奶中头孢噻呋残留量的测定。

2 规范性应用文件

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

试料中残留的头孢噻呋，经二硫赤藓醇（DTE）作用，使头孢噻呋及去呋喃甲酰头孢噻呋（DFC）有关代谢物从蛋白或含硫化合物中分离，与碘乙酰胺反应，生成稳定的乙酰胺衍生物（DCA），再经强阳离子交换柱净化，高效液相色谱测定，外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明外均为分析纯试剂；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 ）。

4.1.3 冰醋酸（ CH_3COOH ）。

4.1.4 醋酸铵（ $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ）。

4.1.5 二硫赤藓醇（ $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$,DTE）。

4.1.6 碘乙酰胺（ $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ ）。

4.1.7 氢氧化钠（ NaOH ）。

4.1.8 三氟乙酸（ CF_3COOH ,TFA）。

4.2 标准品

盐酸头孢噻呋 (Ceftiofur Hydrochloride, $C_{19}H_{16}N_5O_7S_3 \cdot HCl$), 以 $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$ 计, 含量 $\geq 87.5\%$ 。

4.3 溶液配制

4.3.1 醋酸铵溶液 I (1.0mol/L): 取醋酸铵77.1g, 加水使溶解并稀释至1000ml。

4.3.2 醋酸铵溶液 II (0.1mol/L): 取醋酸铵7.71g, 加水使溶解并稀释至1000ml。

4.3.3 氢氧化钠溶液 I (1mol/L): 取氢氧化钠4g, 加水使溶解并稀释至100ml。

4.3.4 氢氧化钠溶液 II (0.01mol/L): 取氢氧化钠0.4g, 加水适量使溶解并稀释至1000ml。

4.3.5 醋酸溶液: 取冰醋酸20ml, 加水至1000ml。

4.3.6 提取液 (2.0% DTE): 取二硫赤藓醇5 g, 加醋酸铵溶液 II 溶解并稀释至250 mL, 用氢氧化钠溶液 I 调节pH值至9.0, 现用现配。

4.3.7 碘乙酰胺溶液 (4.0%): 取碘乙酰胺4 g, 用醋酸铵缓冲液 II 溶解并稀释至100 mL, 现用现配。

4.3.8 C_{18} 洗脱液: 乙腈-醋酸溶液 (20:80)

4.3.9 SCX洗脱液: 甲醇-醋酸铵溶液 I (15:85)

4.3.10 流动相:

A (0.1%TFA水溶液): 取三氟乙酸1ml, 加水至1000ml。

B (0.1%TFA乙腈溶液): 取三氟乙酸1ml, 加乙腈至1000ml。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准储备液 (100 μ g/mL): 取盐酸头孢噻呋标准品约11mg, 精密称定, 于100mL量瓶中, 加醋酸铵溶液 II 使溶解并稀释至刻度, 即得。-20 $^{\circ}$ C 保存, 有效期6个月。

4.4.2 标准工作液 (5 μ g/mL): 精密量取标准储备液0.5mL, 于10mL量瓶中, 用醋酸铵溶液 II 稀释至刻度, 即得。2~8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期1个月。

4.5 材料

4.5.1 C_{18} 固相萃取柱: 1g/6mL, 或相当者。

4.5.2 SCX固相萃取柱: 100mg/10mL, 或相当者。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器。

5.2 分析天平: 感量0.00001g和0.01g。

- 5.3 恒温水浴振荡器。
- 5.4 匀浆机（10000r/min）。
- 5.5 漩涡混合器。
- 5.6 冷冻离心机。
- 5.7 pH计。
- 5.8 离心管：50mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶，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。

7 测定步骤

7.1 提取

取试样5.0ml，加提取液5.0ml，充分混合，于20~30 r/min、50℃水浴振摇15min，4℃、10000r/min离心20min，取上清液（尽量完全转移上清液，如上清液中有漂浮的固状凝结物，将其除去），备用。

C₁₈柱依次用甲醇 5 mL、醋酸铵溶液 II（2次，每次 5ml）预洗，保持湿润。备用液过柱，并保持溶液缓慢流出。用醋酸铵溶液 II 洗柱 2 次，每次 5ml，排干洗液，备用。

7.2 衍生

取碘乙酰胺溶液 5 mL 于上述 C₁₈柱，使溶液至少在 30min 内流完，保证衍生化反应充分进行。用醋酸铵溶液 II 冲洗 2 次，每次 5ml，再用醋酸溶液 5ml 洗涤，保持柱子湿润。

7.3 净化

SCX 柱依次用甲醇、乙腈-2%醋酸溶液（20:80）各 2ml 预洗。将 C₁₈ 柱直接放在相应的 SCX 柱上，用 C₁₈ 洗脱液 3mL 洗脱 2 次，使溶液以适当速度缓慢流过 SCX 固相萃取柱。依次用甲醇 1 mL、醋酸溶液 2 mL 淋洗 SCX 柱，挤干柱子和连接口的溶液。用 SCX 洗脱液 2.0 mL，洗脱，收集洗脱液，混匀，供高效液相色谱测定。

7.4 标准曲线的制备

精密量取头孢噻吩标准工作液适量，用醋酸铵溶液 II 稀释成浓度为 0.02、0.05、0.1、0.3 和 0.6 μ g/mL 的溶液，分别精密量取 5.0 mL，按 7.2 衍生测定步骤起同法处理制成浓度为 50、125、250、750 和 1500 ng/mL 的 DCA 衍生物标准溶液，供高效液相色谱测定。

7.5 测定

7.5.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈（250 mm \times 4.6 mm,5 μ m），或相当者。
- b) 检测波长：266 nm。
- c) 柱温：30 $^{\circ}$ C。
- d) 进样量：40 μ L。
- e) 流速：1.0 mL/min；
- f) 流动相：A：0.1% 三氟乙酸水溶液
B：0.1% 三氟乙酸乙腈溶液；
- g) 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A%	流动相 B%
0-8	90	10
8-21	90 \rightarrow 60	10 \rightarrow 40
21-23	40	60
23-25	90	10

0~8min，流动相 A 比例保持 90%；8~21min，流动相 A 比例由 90%线性变化至 60%；
21~23min，流动相 A 比例保持 40%；23~25min，流动相 A 比例保持 90%。

7.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，做单点或多点校正，按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中头孢噻吩的响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 A。

7.6 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试样中头孢噻吩的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V_1}{A_s \times V} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试样中头孢噻吩的残留量，单位为纳克每毫升（ng/ml）；

C_s —对照溶液中头孢噻吩的浓度，单位为纳克每毫升（ng/ml）；

A —试样溶液中头孢噻吩色谱峰峰面积；

A_s —标准溶液中头孢噻吩色谱峰峰面积；

V_1 —SCX 洗脱液体积，单位为毫升（ml）；

V —试料中的取样量，单位为毫升（ml）。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法在牛奶中的定量限为 50 ng/ml。

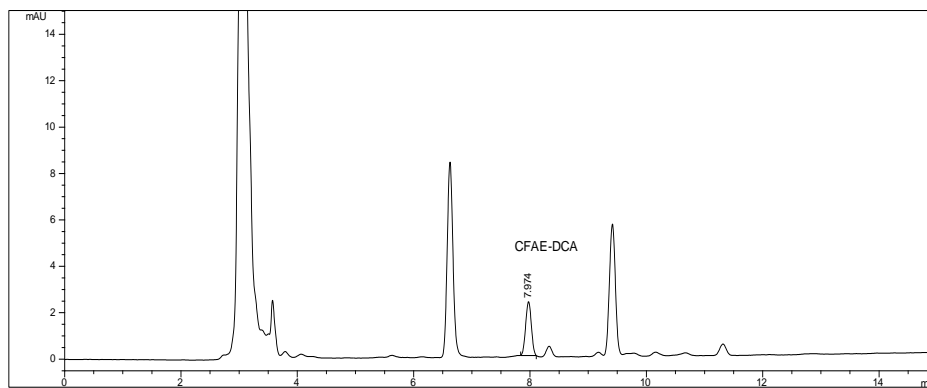
9.2 准确度

本方法在 50 ng/ml~200 ng/ml 添加浓度的回收率为 80%~110%。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤15%。

附录A
(资料性附录)
色谱图



图A.1 0.2 µg/mL头孢噻吩标准溶液色谱图