

# 中华人民共和国国家标准

GB 29685—2013

---

## 食品安全国家标准

### 动物性食品中林可霉素、克林霉素和大观 霉素多残留的测定 气相色谱-质谱法

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

---

中华人民共和国农业部  
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

# 食品安全国家标准

## 动物性食品中林可霉素、克林霉素和大观霉素多残留的测定 气相色谱-质谱法

### 1 范围

本标准规定了动物性食品中林可霉素、克林霉素和大观霉素残留量检测的制样和气相色谱-质谱测定方法。

本标准适用于猪、牛和鸡的肌肉和肾脏以及牛奶和鸡蛋中林可霉素、克林霉素和大观霉素单个或多个药物残留量的检测。

### 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

试料中残留的林可霉素、克林霉素和大观霉素,用磷酸缓冲液提取,3%三氯乙酸沉淀蛋白,离子对原理反相 SPE 柱净化,*N,O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺衍生,气相色谱-质谱法测定,外标法定量。

### 4 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/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 盐酸林可霉素标准品:含量 $\geq 99\%$ ;盐酸克林霉素和盐酸大观霉素标准品:含量 $\geq 95\%$ 。
- 4.2 *N,O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺。
- 4.3 乙酸:优级纯。
- 4.4 甲醇:色谱纯。
- 4.5 乙腈:色谱纯。
- 4.6 正己烷:色谱纯。
- 4.7 磷酸二氢钾:优级纯。
- 4.8 磷酸:优级纯。
- 4.9 氢氧化钾:优级纯。
- 4.10 三氯乙酸:优级纯。
- 4.11 十二烷基磺酸钠:色谱纯。
- 4.12 HLB 固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。
- 4.13 提取液:取磷酸二氢钾 1.36 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL,用磷酸调节 pH 至 4.0。

- 4.14 3%三氯乙酸溶液:取三氯乙酸 3.0 g,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.15 2 mol/L 氢氧化钾溶液:取氢氧化钾 11.6 g,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.16 十二烷基磺酸钠溶液:取十二烷基磺酸钠 2.78 g,用水溶解并稀释至 50 mL。
- 4.17 十二烷基磺酸钠缓冲液:取十二烷基磺酸钠 2.78 g,用水溶解,加乙酸 1 mL,用水稀释至 500 mL。
- 4.18 1 mg/mL 林可霉素、克林霉素和大观霉素标准贮备液:精密称取林可霉素、克林霉素和大观霉素标准品各 10 mg,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 的林可霉素、克林霉素和大观霉素标准贮备液。2 ℃~8 ℃避光保存,有效期 6 个月。
- 4.19 100 μg/mL 标准工作液:精密量取 1 mg/mL 林可霉素、克林霉素和大观霉素标准贮备液各 1.0 mL,分别于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 100 μg/mL 的林可霉素、克林霉素和大观霉素标准工作液。2 ℃~8 ℃避光保存,有效期 1 周。

## 5 仪器和设备

- 5.1 气相色谱-质谱联用仪:配 EI 源。
- 5.2 分析天平:感量 0.000 01 g。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 冷冻高速离心机。
- 5.5 电热恒温水浴锅。
- 5.6 旋涡混合器。
- 5.7 均质机。
- 5.8 聚四氟乙烯离心管:50 mL。

## 6 试料的制备与保存

### 6.1 试料的制备

#### 6.1.1 猪、牛和鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织

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。

#### 6.1.2 牛奶和鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶和鸡蛋,混合,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

组织试料—20 ℃以下保存。鸡蛋和牛奶试料 2 ℃~8 ℃以下保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 基质匹配标准曲线的制备

分别精密量取 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  林可霉素、克林霉素和大观霉素标准工作液适量,用甲醇稀释,配制成浓度为 50、100、200、400、800、1 600 和 3 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  的系列混合标准溶液,各取 1.0 mL,分别溶解经提取、净化及吹干的空白试料残余物,充分混匀,室温吹干,加 *N,O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 500  $\mu\text{L}$  和乙腈 100  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 1 min,密封,于 75  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱衍生反应 1 h,于室温氮气吹干,加正己烷 0.5 mL 溶解残余物,涡旋混匀,供气相色谱-质谱测定。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。

### 7.2 提取

#### 7.2.1 肌肉和肾脏组织

称取试料 5  $\text{g}\pm 0.05 \text{ g}$ ,于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加提取液 10 mL,振荡 5 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液于另一离心管中,残渣中加提取液 10 mL,重复提取一次,合并两次上清液,加 3%三氯乙酸溶液 5 mL,混匀,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 至  $5.8\pm 0.2$ ,加十二烷基磺酸钠溶液 2 mL,涡旋混匀,静置 15 min,备用。

#### 7.2.2 牛奶和鸡蛋组织

称取试料 5  $\text{g}\pm 0.05 \text{ g}$ ,于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加提取液 10 mL,振荡 5 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液于另一离心管中,残渣中加提取液 10 mL,重复提取一次,合并两次上清液,加正己烷 5 mL,混匀,5 000 r/min 离心 15 min,取下层液,用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 至  $5.8\pm 0.2$ ,加十二烷基磺酸钠溶液 2 mL,涡旋混匀,静置 15 min,备用。

### 7.3 净化

HLB 柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 和十二烷基磺酸钠缓冲液 3 mL 活化,取备用液过柱,用水淋洗两次,每次 3 mL,用甲醇 4 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴氮气吹至近干,室温吹干,加 *N,O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 500  $\mu\text{L}$  和乙腈 100  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 1 min,密封,于 75  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱衍生反应 1 h,室温氮气吹干,用正己烷 0.5 mL 溶解残余物,涡旋混匀,供气相色谱-质谱测定。

### 7.4 测定

#### 7.4.1 色谱条件

- 7.4.1.1 色谱柱:毛细管色谱柱 Rtx-5(5%苯基甲基聚硅氧烷,30 m $\times$ 0.25 mm),或相当者。
- 7.4.1.2 进样口温度:280  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.4.1.3 进样方式:不分流。
- 7.4.1.4 进样体积:1  $\mu\text{L}$ 。
- 7.4.1.5 模式:恒流。
- 7.4.1.6 载气:氮气(99.999%)。
- 7.4.1.7 柱流速:1 mL/min。
- 7.4.1.8 柱温升温程序见表 1。

表 1 柱温升温程序

起始温度 ℃	终止温度 ℃	升温速率 ℃/min	保持时间 min	总时间 min
150	150	—	2.0	2.0
150	300	20	10	19.5

7.4.2 质谱条件

7.4.2.1 离子源温度:200 ℃。

7.4.2.2 接口温度:280 ℃。

7.4.2.3 质谱采集(SIM):林可霉素和克林霉素扫描离子:126(定量离子),127,73。  
大观霉素扫描离子:145(定量离子),171,187,201。

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 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,相对丰度偏差不超过表 2 的规定,则可判断样品中存在相应的被测物。

表 2 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	±10%	±15%	±20%	±50%

将供试试样和标准溶液的定量离子面积之比作单点校正定量。

7.4.3.2 定量测定

取试样溶液和标准溶液,按外标法,以峰面积定量,标准溶液及试样溶液中林可霉素、克林霉素和大观霉素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,林可霉素、克林霉素和大观霉素标准溶液和空白添加试样溶液中特征离子质量色谱图见附录 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 结果计算与表述

单点校准:

$$c = \frac{c_s A}{A_s} \dots\dots\dots(1)$$

基质匹配标准曲线校准:由  $A_s = ac_s + b$ ,求得  $a$  和  $b$ ,则

$$c = \frac{A - b}{a} \dots\dots\dots (2)$$

试料中林可霉素、克林霉素和大观霉素的残留量按式(3)计算:

$$X = \frac{cV}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $c$  —— 供试试料溶液中相应的林可霉素、克林霉素或大观霉素浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );
- $c_s$  —— 标准溶液中相应的林可霉素、克林霉素或大观霉素浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );
- $A$  —— 供试试料溶液中相应的林可霉素、克林霉素或大观霉素的衍生物的峰面积;
- $A_s$  —— 标准溶液中相应的林可霉素、克林霉素或大观霉素的衍生物的峰面积;
- $X$  —— 供试试料中相应的林可霉素、克林霉素或大观霉素的残留量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );
- $V$  —— 溶解残余物体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $m$  —— 供试试料质量,单位为克( $\text{g}$ )。

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,林可霉素和克林霉素为  $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,大观霉素为  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法林可霉素和克林霉素在肌肉、牛奶和鸡蛋中的定量限为  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,在肾脏中定量限为  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ;大观霉素的定量限为  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 9.2 准确度

本方法克林霉素在  $20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、林可霉素在  $20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 3\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$  和大观霉素在  $50 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 4\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$  添加浓度水平上回收率为  $70\% \sim 110\%$ 。

### 9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差  $\leq 15\%$ ,批间相对标准偏差  $\leq 20\%$ 。

附录 A  
离子色谱图

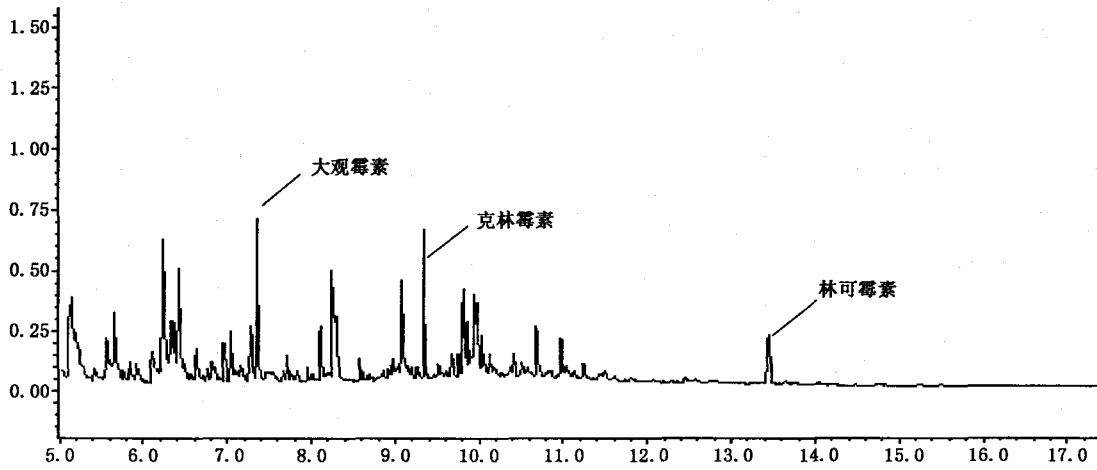


图 A.1 标准溶液衍生物离子色谱图  
(林可霉素和克林霉素 100  $\mu\text{g/L}$ 、大观霉素 250  $\mu\text{g/L}$ )

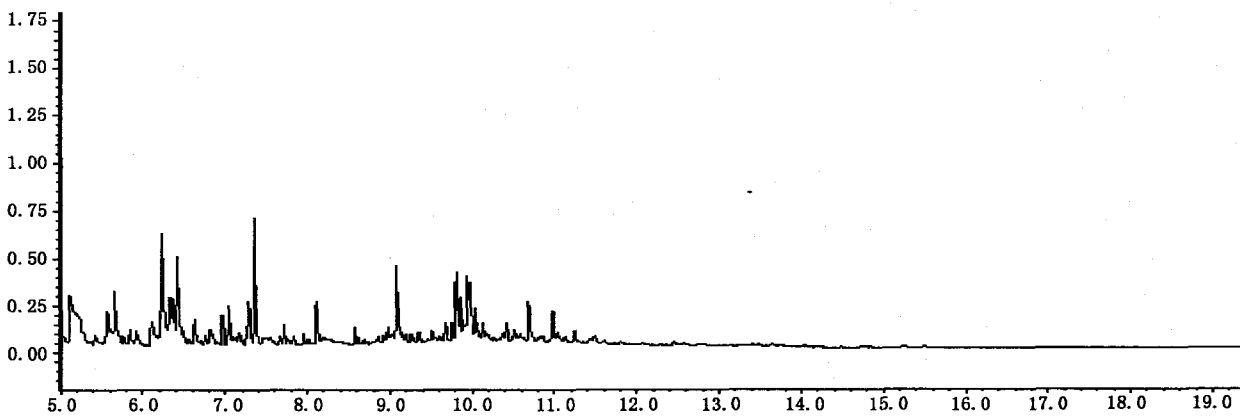


图 A.2 猪肌肉组织空白试样离子色谱图

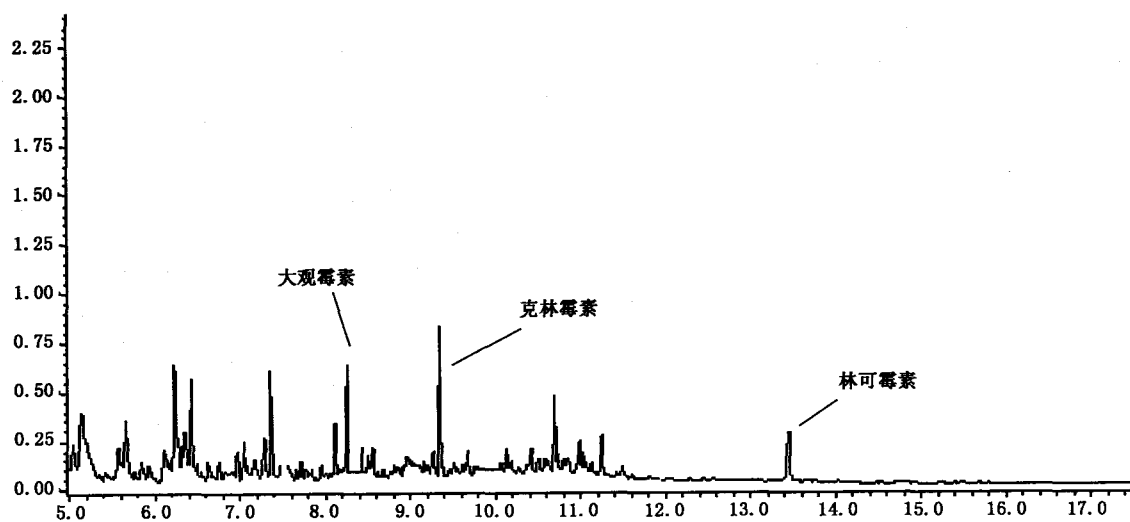


图 A.3 猪肌肉组织空白添加林可霉素、克林霉素和大观霉素试样离子色谱图  
(林可霉素和克林霉素 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )