

附件 2

消毒产品中抗生素（ antibiotics）测定-

液相色谱-串联质谱法

Method for determination of antibiotics

in disinfection product-

LC-MS-MS method

1 范围

本方法规定了膏霜类消毒产品中七种抗生素残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于膏霜类消毒产品中七种抗生素残留量的测定。

取样量为 0.2g 时，本方法对七种抗生素的检出限见表 1。

表 1 LC/MS/MS 法测定的消毒产品中七种抗生素的检出限、保留时间和特征离子

中文名称	英文名称	检出限 (mg/kg)	保留时间 (min)	特征离子(m/z)
甲硝唑	Metronidazole	0.09	12.86	172. 1/128. 0
盐酸金霉素	Chlorotetracycline hydrochloride	2.7	17.05	479. 0/444. 1/462. 2
土霉素二水合物	Oxytetracycline dihydrate	0.50	14.11	461. 0/426. 2/443. 1
盐酸米诺环素	Minocycline hydrochloride	2.7	16.12	458. 2/441. 3
红霉素	Erythronycin	0.01	21.08	734. 4/158. 1/576. 5
头孢拉定	Cephadrine	1.5	12.92	350. 1/305. 4/331. 1
盐酸四环素	Tetracycline hydrochloride	0.16	14.64	445. 0/410. 0/427. 2

2 规范性引用文件

3 原理

试样中抗生素用甲醇提取，提取液经 0.45μm 滤膜过滤，用 C₁₈ 柱分离后，用液相色谱-串联质谱仪测定，正离子扫描，离子对定性，峰面积定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为不含有机物的纯水，纯水中干扰物的浓度需低于方法中待测物的检出限。

4.1 甲醇：农药残留级。

4.2 乙腈：农药残留级。

4.3 乙酸铵：分析纯。

4.4 乙酸：分析纯。

4.5 标准品：红霉素购自 BBI 公司 (纯度 $\geq 99\%$)，盐酸四环素购自北京利科生化科贸有限公司(纯度 $\geq 99\%$)，甲硝唑、盐酸金霉素、土霉素二水合物、盐酸米诺环素、头孢拉定均购自 SIGMA 公司。

4.6 标准溶液：分别准确称取红霉素、盐酸四环素、甲硝唑、盐酸金霉素、土霉素二水合物、盐酸米诺环素和头孢拉定适量，用甲醇（4.1）配制成 1.00mg/mL 标准贮备溶液。准确量取上述标准贮备溶液适量，用甲醇稀释配制成浓度为 100 μ g/mL 的混合标准中间溶液，将标准中间溶液转移到安瓿瓶中于 4 $^{\circ}$ C 保存。临用前，再根据需要用甲醇配制成不同浓度的标准使用溶液。

4.7 乙酸铵缓冲溶液(5mmol/L, pH = 3.34)：称取 0.385g 乙酸铵，用约 900mL 纯水溶解，乙酸调 pH = 3.34，纯水定容至 1000mL。

4.8 0.45 μ m 滤膜。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱联用仪：HP1100 高效液相色谱仪(Agilent) - API 4000 质谱仪(Applied Biosystems)，电喷雾离子化源(ESIMS，NI/PI 模式)。

5.2 分析天平：感量 0.1mg 和 0.001g。

5.3 实验室纯水机：Barnstead 纯水机。

5.4 涡旋振荡器：Scientific Industries 涡流振荡器。

5.5 具塞试管：10mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取有代表性样品 5g，搅拌均匀，制成实验室样品。

6.2 试样保存

制备好的试样置于室温保存。

7 测定步骤

7.1 样品前处理

称取 0.1~0.2g 样品（精确到 0.001 g），置于 10mL 试管中，加入 3.00mL 甲醇溶液，涡旋振摇使样品分散后，超声振荡 10min。静置，吸取上清液经滤膜（4.8）过滤后，供液相色谱-串联质谱测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱：Waters Atlantis®C₁₈, 5 μm, 3.9×150mm;
- b) 柱温：25℃;
- c) 流动相：流动相为乙酸铵缓冲溶液（4.7）、甲醇和乙腈，洗脱梯度见表2。
- d) 流速：300 μL/min;
- e) 进样量：10μL。

表 2 分离七种抗生素的洗脱梯度

时间(min)	乙酸铵缓冲溶液(%)	甲醇(%)	乙腈(%)
0	90.0	5.0	5.0
5	70.0	10.0	20.0
10	50.0	20.0	30.0
17	50.0	20.0	30.0
20	90.0	5.0	5.0
25	90.0	5.0	5.0

7.4.2 质谱条件

- a) 离子化方式：热喷雾电离(TSI);
- b) 扫描方式：正离子扫描;
- c) 检测方式：多反应监测（MRM);
- d) 碰撞气(CAD): 11.0 psi;
- e) 气帘气(CUR): 22.0 psi;
- f) 雾化气(GS1): 35.0 psi;

- g) 加热气(GS2): 20.0 psi;
- h) 喷雾电压(IS): 5500V;
- i) 去溶剂温度(TEM): 500°C;
- j) 碰撞室射出电压 (CXP): 16V
- k) 定性离子对、定量离子对、扫描时间、碰撞气能量和去簇电压, 见表 3。

表 3 抗生素的定性离子对、定量离子对、扫描时间、碰撞气能量和去簇电压

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	扫描时间 Dwell time (ms)	碰撞气能 量 CE (eV)	去簇电 压 DP (V)
甲硝唑	172.1/128.0	172.1/128.0	100	16.0	25.0
金霉素	479.0/444.1/462.2	479.0/444.1	100	20.0	42.0
土霉素	461.0/426.2/443.1	461.0/426.2	100	20.0	35.0
米诺环素	458.2/441.3	458.2/441.3	100	18.0	45.0
红霉素	734.4/158.1/576.5	734.4/158.1	100	22.0	40.0
头孢拉定	350.1/305.4/331.1	350.1/305.4	100	18.0	25.0
四环素	445.0/410.0/427.2	445.0/410.	100	29.0	25.0

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

用抗生素的定性离子对 (见表 3) 进行定性。

7.4.3.2 定量测定

将混合标准中间溶液用甲醇稀释配制成 0-800ng/mL 的标准使用溶液, 在仪器最佳工作条件下, 标准使用溶液分别进样, 以使用溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线。采用外标法进行定量测定。样品溶液中抗生素的响应值应在标准工作曲线线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下, 抗生素标准物质液相色谱-串联质谱的多反应监测 (MRM) 色谱图参见图 A.1。

7.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定, 七种抗生素的平行测定相对偏差应小于 20%。

7.6 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

样品中抗生素的质量分数可按式（1-1）计算：

$$\varphi = \frac{\rho_1 \times V_1}{1000 \times m} \dots\dots\dots (1-1)$$

式中， φ —— 消毒产品中抗生素的质量分数，mg/kg；

ρ_1 —— 从回归方程中查出测试溶液中抗生素的质量浓度，ng/mL；

V_1 —— 提取溶液体积，mL；

m —— 称样量，g。

9 精密度和准确度

同一实验室对加标样品重复测定，七种抗生素的相对标准偏差和平均回收率数据参见附录 C。

附录 A
(资料性附录)
七种抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图

七种抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图，见图 A. 1。

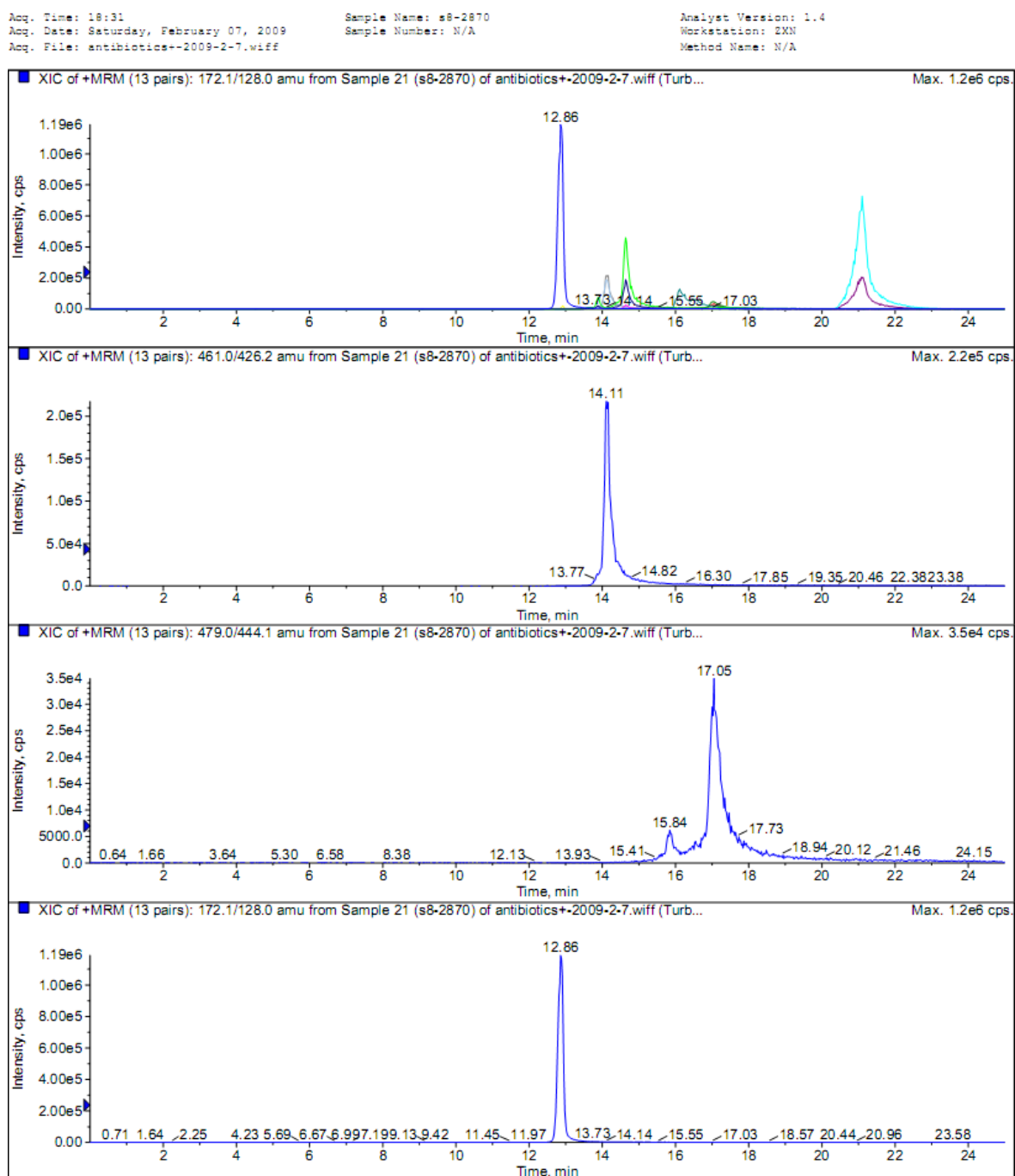
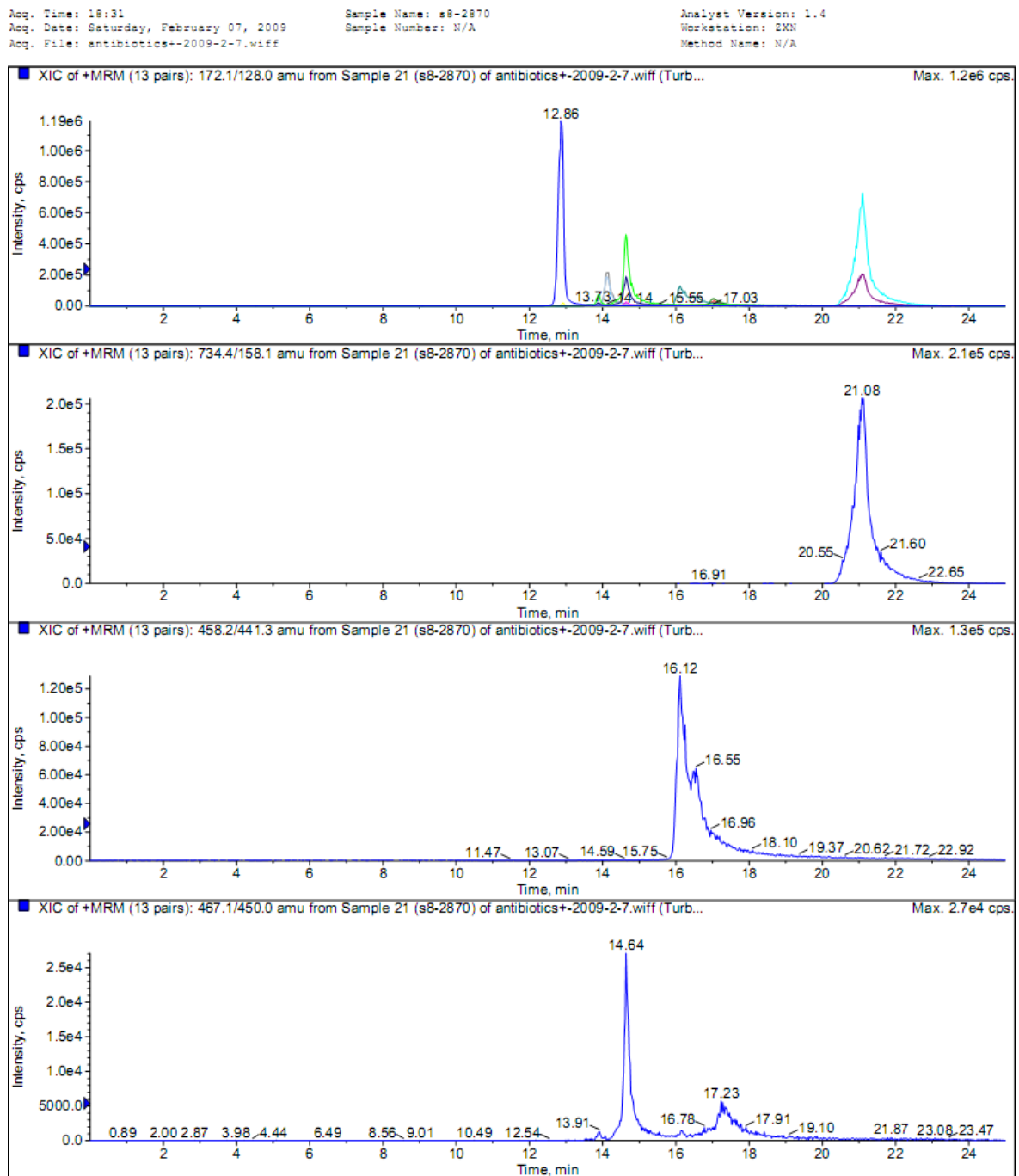


图 A. 1 抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图

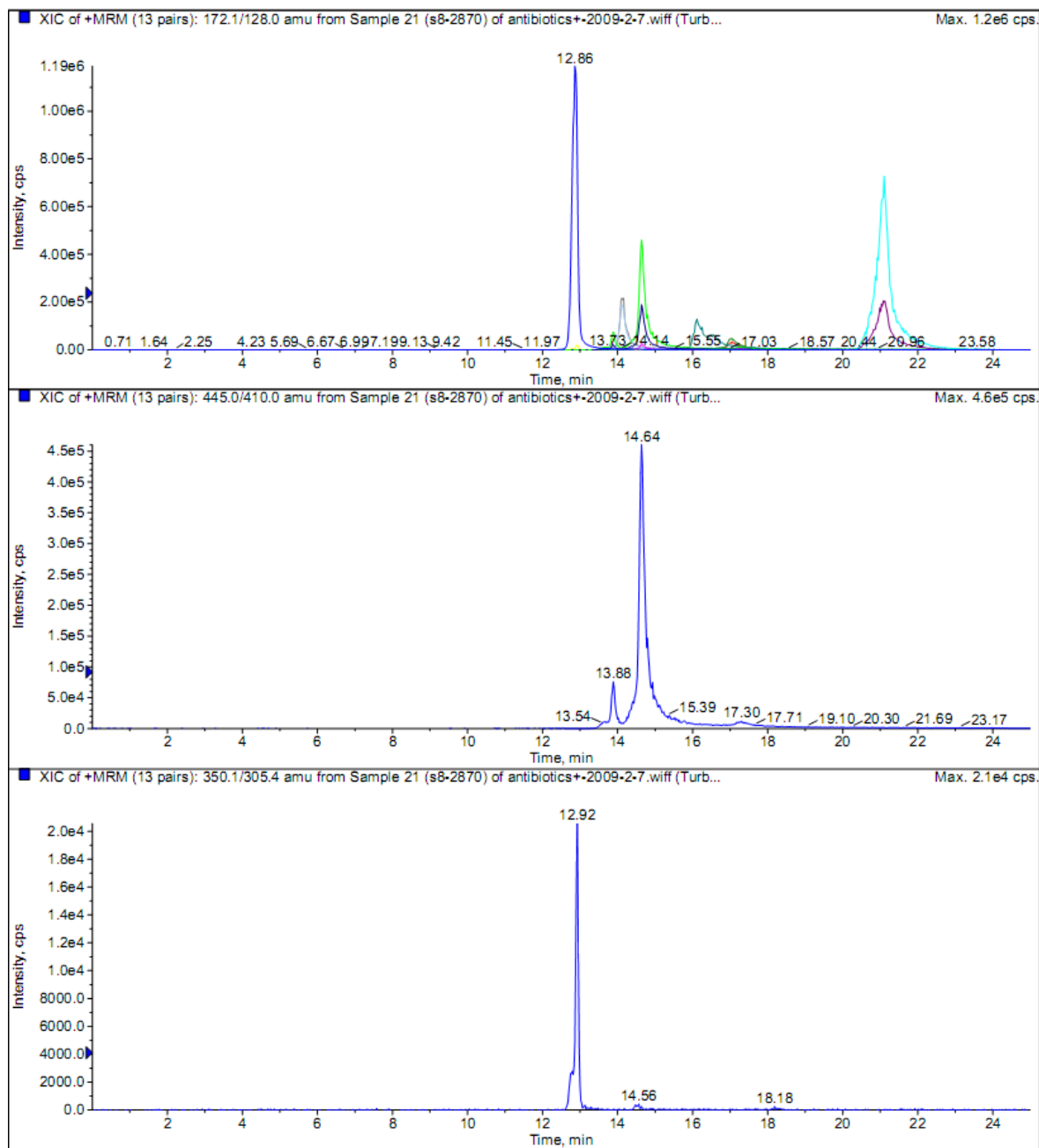


续图 A. 1 抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图

Acq. Time: 18:31
Acq. Date: Saturday, February 07, 2009
Acq. File: antibiotics--2009-2-7.wiff

Sample Name: s8-2870
Sample Number: N/A

Analyst Version: 1.4
Workstation: 2XN
Method Name: N/A



续图 A. 1 抗生素标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附录 B
(资料性附录)
标准曲线

消毒产品中七种抗生素的线性回归方程，见表 B. 1。

表 B. 1 消毒产品中七种抗生素的线性回归方程

化合物	线性范围 (ng/mL)	a	b	γ
甲硝唑	0-800	8.50×10^4	4.60×10^3	0.9996
金霉素	0-800	2.71×10^2	4.80×10^3	0.9975
土霉素	0-800	9.46×10^2	1.02×10^3	0.9996
盐酸米诺环素	0-800	1.10×10^4	8.23×10^2	0.9957
红霉素	0-800	2.94×10^4	2.73×10^3	0.9978
头孢拉定	0-800	-4.76×10^2	4.31×10^1	0.9996
四环素	0-800	2.01×10^3	2.09×10^3	0.9989

附录 C
(资料性附录)

回收率和重复性

消毒产品中七种抗生素的添加回收率和重复性，见表C. 1。

表C.1 消毒产品中七种抗生素的添加回收率(%)和重复性(n=6)

化合物	添加水平 (μg/g)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
甲硝唑	6.00	98.5	1.7
	12.0	98.5	1.6
金霉素	6.00	107	12.5
	12.0	97.9	20.2
土霉素	6.00	98.3	15.7
	12.0	109	7.9
米诺环素	6.00	96.9	11.9
	12.0	84.8	10.1
红霉素	6.00	87.0	2.0
	12.0	74.7	16.4
头孢拉定	6.00	88.3	6.2
	12.0	85.8	2.4
四环素	6.00	84.9	16.8
	12.0	114	3.0