

中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 动物性食品中泰乐菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of tylosin residue in animal derived food by liquid
chromatography-tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

动物性食品中泰乐菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中泰乐菌素残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛、猪、鸡、火鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏，牛奶和鸡蛋中泰乐菌素A残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的泰乐菌素A用乙腈提取，混合型阳离子交换固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

5 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。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₄OH）。

5.1.5 磷酸二氢钾（KH₂PO₄）。

5.1.6 氢氧化钠（NaOH）。

5.2 溶液配制

5.2.1 10%氢氧化钠溶液：取氢氧化钠10 g，加90 mL水溶解，并稀释至100 mL，混匀。

5.2.2 磷酸二氢钾溶液（0.1 mol/L）：取磷酸二氢钾13.61g，加水900 mL溶解，用10%氢氧化钠溶液调pH至5.0±0.02，加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.2.3 5%氨化甲醇溶液：取5 mL氨水，用甲醇稀释至100 mL，混匀。

5.2.4 50%甲醇溶液：取甲醇50 mL，用水稀释至100 mL，混匀。

5.2.5 0.1%甲酸溶液：取1 mL甲酸，用水稀释至1000 mL，混匀。

5.3 标准品

泰乐菌素A、泰乐菌素A-D₃，含量均大于≥96.0%，见附录A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 泰乐菌素A标准储备液：取泰乐菌素A标准品适量，精密称定，用甲醇溶解并稀释定容至10 mL容量瓶，配制成浓度为1 mg/mL的泰乐菌素A标准储备液。-18°C以下避光保存，有效期6个月。

5.4.2 泰乐菌素A标准中间液：准确量取1 mg/mL泰乐菌素A标准储备液1 mL，于10 mL容量瓶中，用甲醇稀释并定容，配制成浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的泰乐菌素A标准中间液。-18°C以下保存，有效期6个月。

5.4.3 泰乐菌素A标准工作液：准确量取100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 泰乐菌素A标准中间液0.1 mL，于10 mL容量瓶中，用甲醇稀释并定容，配制成浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的泰乐菌素A标准工作液。现配现用。

5.4.4 泰乐菌素A-D₃内标储备液：取泰乐菌素A-D₃标准品适量，精密称定，用甲醇溶解并稀释定容至10 mL容量瓶，配制成浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的泰乐菌素A-D₃内标储备液。-18°C以下避光保存，有效期6个月。

5.4.5 泰乐菌素A-D₃内标工作液：准确量取100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 泰乐菌素A-D₃内标储备液0.1 mL，于10 mL容量瓶中，用甲醇稀释并定容，配制成浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的泰乐菌素A-D₃内标工作液。现配现用。

5.5 材料

5.5.1 混合型阳离子交换固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.22 μm ，尼龙材质。

5.5.3 陶瓷均质子。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量0.01 g和 0.000 01 g。

6.3 组织匀浆器。

6.4 涡旋混合器。

6.5 涡旋振荡器。

6.6 高速冷冻离心机：最大转速10000 r/min或以上。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

6.9 pH计

7 试样的制备与保存

7.1 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。

取适量新鲜或解冻的空白或供试奶样品，混合均匀。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

a) 取匀浆后的供试样品，作为供试试样。

b) 取匀浆后的空白样品，作为空白试样。

c) 取匀浆后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18°C以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

肌肉、肝脏、肾脏、鸡蛋：准确称取试料（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中（肌肉样品加入一粒陶瓷均质子），加入泰乐菌素A-D₃内标工作液100 μL ，涡旋混匀，准确加入乙腈20.0 mL，涡动10 s，涡旋振荡20 min，10000 r/min 4°C离心10 min。准确移取上清液1.0 mL，加入5 mL磷酸二氢钾溶液，涡旋混匀5 s，备用。

脂肪：准确称取试料（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，加入泰乐菌素A-D₃内标工作液100 μ L，涡旋混匀后60°C水浴加热10 min，准确加入20.0 mL 乙腈，涡动10 s，涡旋振荡20 min，10000 r/min 4°C离心10 min。准确移取上清液1.0 mL，加入5 mL 磷酸二氢钾溶液，涡旋混匀5 s，备用。

牛奶准确：移取试料（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，加入泰乐菌素A-D₃内标工作液100 μ L，涡旋混匀，准确加入18.0 mL乙腈，涡动10 s，涡旋振荡20 min，10000 r/min 4°C离心10 min。准确移取上清液1.0 mL，加入5 mL磷酸二氢钾溶液，涡旋混匀5 s，备用。

8.2 净化

固相萃取小柱经依次用甲醇、水、磷酸二氢钾溶液各5 mL活化后，取备用液过柱，待全部备用液流出后，依次用水、磷酸二氢钾溶液、甲醇各4 mL淋洗后，抽干30 s，用5%氨化甲醇5 mL洗脱，收集洗脱液40°C水浴氮气吹干，准确移取1.0 mL50%甲醇溶液溶解残余物，涡旋10 s后过滤膜上机测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取泰乐菌素A标准工作液和泰乐菌素A-D₃内标工作液适量，用50%甲醇溶液稀释配制成泰乐菌素A浓度为2 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L，泰乐菌素A-D₃浓度均为5 μ g/L的系列标准工作溶液，现配现用，供液相色谱-串联质谱仪测定。以泰乐菌素A和泰乐菌素A-D₃的特征离子质量色谱峰面积的比值为纵坐标，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。

8.4 测定

8.4.1 色谱参考条件

- 色谱柱：C18柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.7 μ m，或相当者；
- 柱温：40 °C；
- 进样量：2 μ L；
- 流速：0.3 mL/min；
- 流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液，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	A, %	B, %	曲线
0	5	95	6
0.5	5	95	6
2.5	95	5	6
5.0	95	5	6
5.1	5	95	6
7.0	5	95	6

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源：电喷雾（ESI）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：150 °C；
- 脱溶剂气温度：500°C；
- 锥孔气流速：150 L/h；
- 脱溶剂气流速：1000 L/h
- 定性离子对、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量见表2。

表2 泰乐菌素 A 和泰乐菌素 A-D₃ 特征离子参考质谱条件

化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
泰乐菌素 A	916.6>174.0	916.6>174.0	18	36
	916.6>772.4		18	32
泰乐菌素 A-D ₃	919.6>177.1	919.6>177.1	18	36

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中泰乐菌素A与其同位素内标（泰乐菌素A-D₃）的保留时间之比与标准溶液中泰乐菌素A与其同位素内标（泰乐菌素A-D₃）的保留时间之比偏差在1%以内；且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按内标法定量，试样溶液及标准溶液中泰乐菌素A与泰乐菌素A-D₃的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。对于试样中泰乐菌素A残留量超过仪器测定线性范围的，在提取时根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量，使试样溶液稀释后泰乐菌素A的响应在仪器线性范围内，对应泰乐菌素A-D₃浓度与标准曲线制备中的泰乐菌素A-D₃浓度一致。在上述色谱-质谱条件下，泰乐菌素A-D₃及泰乐菌素A标准溶液的特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加标准溶液外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times A_{is} \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times A_i \times V_2 \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

式中：

ω —试样中待测药物残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

ρ_s —标准溶液中待测药物浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

A —试样溶液中待测药物的峰面积；

A_{is} —标准溶液中内标的峰面积；

A_s —标准溶液中待测药物的峰面积；

A_i —试样溶液中内标的峰面积；

V_1 —试样提取溶液的总容积，单位为毫升（mL）；

V_2 —吸取出用于净化的提取溶液体积值，单位为毫升（mL）；

V_3 —最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m —试样的质量，单位为克（g）。

注：计算结果不小于1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的保留3位有效数字。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法鸡蛋、牛奶、牛、猪、鸡、火鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏的检出限为15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

本方法鸡蛋在25~600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为80%~120%；

本方法牛奶，牛、猪、鸡、火鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏在25~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为80%~120%。

10.3 精密度

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

征求意见稿

附 录 A

(规范性)

泰乐菌素 A 及其内标信息

泰乐菌素A及其内标的中英文名称、CAS号、化学分子式及相对分子质量参见表A.1。

表A.1 泰乐菌素 A 及其内标的信息

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	泰乐菌素 A	Tylosin A	8026-48-0	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916.6
2	泰乐菌素 A-D ₃	Tylosin A-D ₃	1401-69-0	$C_{46}H_{74}D_3NO_{17}$	919.6

附录 B

(资料性)

特征离子质量色谱图

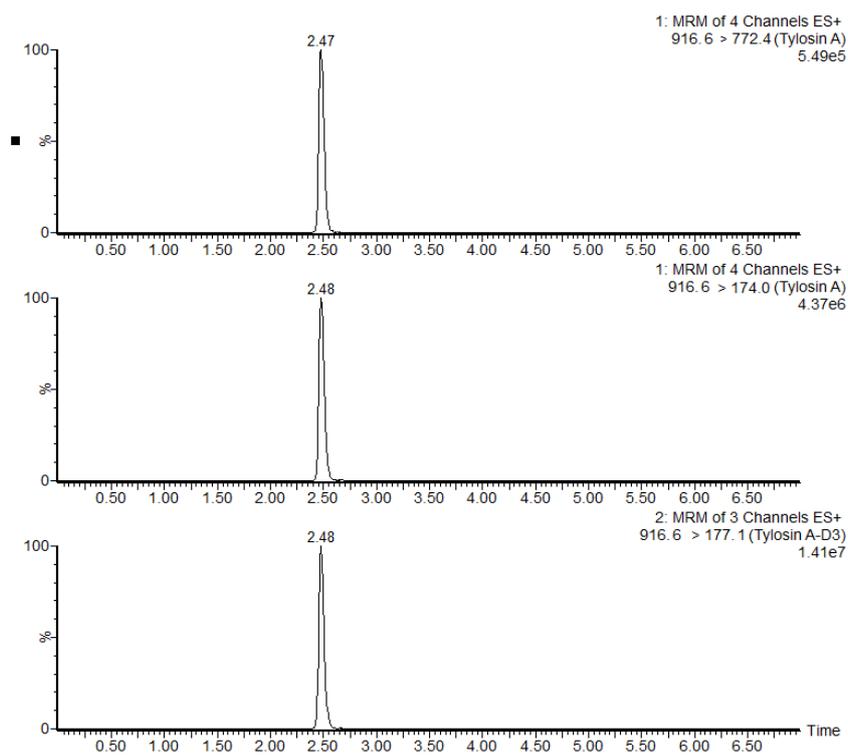
泰乐菌素A及泰乐菌素A-D₃标准溶液特征离子质量色谱图见图B.1。

图 B.1 5 $\mu\text{g/L}$ 泰乐菌素 A 标准溶液特征离子质量色谱图 (内标浓度为 5 $\mu\text{g/L}$, 从上到下离子对依次为 916.6>772.4、916.6>174.0、919.6>177.1)