

中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

食品安全国家标准

蜂蜜和蜂王浆中红霉素及其降解物残留量
的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—

Determination of erythromycin and its degradation products in honey and royal jelly

-Liquid chromatography tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会

中华人民共和国农业农村部

发布

国家市场监督管理总局

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

蜂蜜和蜂王浆中红霉素及其降解物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂蜜和蜂王浆中红霉素A及其降解物（脱水红霉素A）的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中红霉素A及其降解物（脱水红霉素A）残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中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

试样中的红霉素A及其降解物用乙腈-水溶液提取，分散固相萃取净化，液相色谱-串联质谱测定，基质校正外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

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 氯化钠（NaCl）。

5.1.5 无水硫酸镁（MgSO₄）。

5.1.6 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

5.1.7 红霉素 A（英文名：Erythromycin A，分子式：C₃₇H₆₇NO₁₃，CAS 号：114-07-8）、脱水红霉素 A（英文名：Anhydroerythromycin A，分子式：C₃₇H₆₅NO₁₂，CAS 号：23893-13-2），纯度均≥99.0%。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1% 甲酸溶液：取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL。

5.2.2 红霉素 A 及其降解物混合标准贮备溶液（1 mg/mL）：分别准确称取 10 mg（精确至 0.01 mg）的红霉素 A、脱水红霉素 A，用甲醇溶解并定容至 10 mL，混匀。-20℃ 避光保存，有效期 3 个月。

5.2.3 红霉素 A 及其降解物混合标准工作液（10 µg/mL）：精密量取 0.1 mL 标准贮备溶液用甲醇稀释。

5.3 材料

5.3.1 N-丙基-乙二胺（PSA）：40~60 µm。

5.3.2 有机系滤膜：0.2 µm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 天平：感量0.01 mg和0.01 g。

6.3 高速离心机：转速不低于10000 r/min。

7 试样的制备与保存

a) 蜂蜜：将样品（若有结晶，低于45℃水浴融化）搅拌均匀，取0.5 kg置于样品瓶中，4℃密封保存。

b) 蜂王浆：将样品室温解冻并搅拌均匀，取0.5 kg置于样品瓶中，4℃密封保存。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

称取蜂蜜试料（ 5 ± 0.05 ）g，蜂王浆试料（ 2 ± 0.02 ）g于分别至于50 mL离心管中，加入5 mL 水，涡旋30 s，再加入10 mL乙腈，于超声波清洗器中超声10 min，加入4 g 无水MgSO₄和1 g NaCl，涡旋1 min，9000 r离心10 min，取5 mL上清液，用 400 mg PSA和1200 mg MgSO₄ 净化，涡旋30 s，8000 r离心5 min后取上清过0.22 µm滤膜到样品瓶中，LC-MS/MS测定。

8.2 基质匹配混合标准系列溶液的制备

精密量取混合标准工作液适量，分别加入经提取和净化的蜂蜜或蜂王浆空白试料残渣中，40 ℃水浴氮气吹干，加入乙腈涡旋溶解残余物，配制成浓度为2 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL的基质匹配系列混合标准溶液，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积为纵坐标，相应的标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线，计算回归方程和相关系数。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈，柱长 100 mm，内径 3.0 mm，粒度 2.7 µm 或性能相当者；
- 流动相：A：0.1%甲酸溶液（4.2.1），B：甲醇（4.1.1），梯度洗脱程序参见表 1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 进样量：2 µL；
- 柱温：30℃。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	55	45
1	40	60
4	25	75
5	2	98
7	2	98
7.1	55	45
9.0	55	45

8.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子模式（ESI+）；
- 干燥气温度：250℃；
- 干燥器流速：15 L/min；
- 毛细管电压：3500 V；
- 定性、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量、保留时间见表2。

表 2 红霉素 A 及降解物的定性、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量和保留时间

化合物	母离子	子离子	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)	保留时间 (min)
红霉素 AA	734.5	158*	380	30	4.01
		576	380	14	
脱水红霉素 AA	716	558*	380	14	4.24
		158	380	30	

注：*为定量离子对

8.3.3 测定法

8.3.3.1 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液中红霉素类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中对应的保留时间的偏差在 ± 0.1 min以内，且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质匹配标准溶液中对应的定性离子的相对丰度一致，其允许偏差为 $\pm 40\%$ 。

8.3.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液，作单点校准或多点校准，以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。红霉素类药物标准溶液的特征离子色谱图参见附录A。

8.4 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 试验数据处理

试样中红霉素类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X 一试样中相应的红霉素类药物残留量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_s 一基质匹配标准溶液中相应的红霉素类药物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A_s 一基质匹配标准溶液中相应的红霉素类药物峰面积；

A 一试样中相应的红霉素类药物峰面积；

V 一试样最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m 一试样质量，单位为克(g)；

f 一稀释因子。

10 方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在蜂蜜和蜂王浆中的检测限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内，红霉素A及降解物在蜂蜜和蜂王浆中的回收率为 65% ~ 120% 。

10.3 精密度

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

附录 A
(资料性)

红霉素 A 及其降解物混合标准溶液定量离子色谱图

红霉素 A 及其降解物混合标准溶液 (10 $\mu\text{g/L}$) 的定量离子色谱图见图 A.1

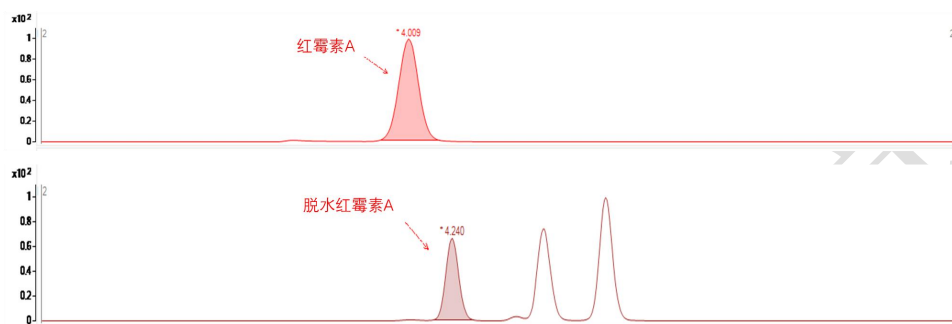


图 A.1 红霉素 A 及其降解物混合标准溶液 (10 $\mu\text{g/L}$) 的 MRM 色谱图