



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 禽蛋中四环素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of tetracyclines residues in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry 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

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

禽蛋中四环素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了禽蛋中四环素类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋、鸽子蛋中四环素、金霉素、土霉素、多西环素残留量的测定。其他禽蛋可参照执行。

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

试样经EDTA·2Na-McIlvaine缓冲液提取，正己烷除脂，玻璃纤维滤纸过滤，亲水亲脂平衡型固相萃取柱净化，氮气吹干后，用10%乙腈甲酸水溶液溶解，液相色谱-串联质谱法测定，基质匹配外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。
- 5.1.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。
- 5.1.3 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。
- 5.1.4 柠檬酸（C₅H₈O₇·H₂O）。
- 5.1.5 磷酸氢二钠（Na₂HPO₄·12H₂O）。
- 5.1.6 乙二胺四乙酸二钠（C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O）。
- 5.1.7 氢氧化钠（NaOH）。
- 5.1.8 磷酸（H₃PO₄）。

5.1.9 正己烷 (C₆H₁₄)

5.2 溶液配制

5.2.1 1mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 4 g，加水溶解成 100 mL，即得。

5.2.2 EDTA•2Na-McIlvaine 缓冲液：分别取柠檬酸 12.9g，磷酸氢二钠 10.9g，乙二胺四乙酸二钠 39.2g，用水 900mL 溶解，用磷酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.0±0.05，加水稀释至 1000mL。

5.2.3 水饱和正己烷溶液：取水 50 mL，加正己烷 200 mL，摇匀，静置分层，取上层液。

5.2.4 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1.0 mL，加水至 1000 mL，混匀。

5.2.5 10%乙腈甲酸水溶液：取乙腈 10 mL，加 0.1%甲酸溶液稀释至 100 mL，混匀。

5.2.6 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 1 mL，加乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

5.3 标准品

四环素、金霉素、土霉素、多西环素标准品，纯度均≥98%，具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液 (100 µg/mL)：取按其药物单体含量折算为 100%质量的标准品各约 10 mg，精密称定，分别用甲醇适量使溶解并稀释定容至 100 mL，即得。-18℃以下保存，有效期 1 个月。

5.4.2 标准中间液 (1.0 µg/mL)：准确移取标准储备液 1.0 mL，用 10%乙腈甲酸水溶液稀释、定容至 100 mL，混匀。临用现配。

5.4.3 标准系列溶液：准确移取标准中间溶液适量，用 10%乙腈甲酸水溶液稀释、定容，混匀，配制成浓度分别为 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的标准系列溶液，置 2℃~8℃ 冰箱中避光保存。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 亲水亲脂平衡型固相萃取柱：200 mg/6 mL，或性能相当者。

5.5.2 玻璃纤维滤纸：1.5 µm*110 mm，或性能相当者。

5.5.3 微孔滤膜：0.2 µm，疏水系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾电离源。

6.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.3 低温离心机：温度可达 4℃，转速可达 10 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 超声波清洗器。

6.6 pH 计：精度±0.01 pH。

6.7 氮吹仪。

6.8 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜的供试禽蛋，去壳，并使均质：

a) 取均质后的供试样品，作为供试试样。

b) 取均质后的空白样品，作为空白试样。

c) 取均质后空白样品，添加适宜浓度的对照溶液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取禽蛋试料 (2 ± 0.05) g，置于50 mL离心管中，加入EDTA•2Na-McIlvaine缓冲液10 mL，涡旋混匀，超声10 min，4℃下10000 r/min离心5 min，取上清液于另一50 mL离心管中，再按上述步骤重复提取一次，合并两次上清液，加正己烷溶液20 mL，涡旋0.5 min，4℃下10000 r/min离心10 min，弃去上层正己烷，下层液用玻璃纤维滤纸过滤，用5 mL EDTA•2Na-McIlvaine缓冲液淋洗滤纸表面，收集滤液为备用液。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水各5 mL活化，备用液全部过柱，用水5 mL淋洗，挤干。用甲醇5 mL洗脱，挤干，收集洗脱液，并于40℃氮吹至干，准确量取10%乙腈甲酸水溶液1 mL溶解残余物，涡旋1 min，超声2 min，混匀后过0.2 μm微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试样，按“8.1”和“8.2”处理样品，获得试样空白基质，分别移取标准系列溶液1 mL，溶解吹至近干后的空白试料残余物，制得浓度为10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL的基质匹配标准系列溶液，过微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。以测试药物特征离子峰面积为纵坐标，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。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈柱（2.1×100 mm，1.9 μm）（填料经封端处理），或性能相当者；
- 流动相：A：0.1%甲酸溶液；B：0.1%甲酸乙腈。梯度洗脱程序见表1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：30℃；
- 进样量：5 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间	A	B
min	%	%

时间 min	A %	B %
0.0	90	10
3.0	90	10
3.1	85	15
6.0	85	15
7.5	80	20
8.0	80	20
9.0	5	95
12.0	5	95
13.0	90	10
16.0	90	10

8.4.2 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（MRM）。
- d) 离子源电压：3500V。
- e) 离子传输管温度：325℃；气化温度：350℃。
- f) 鞘气流速：4.10 L/min；辅助气流速：8.00 L/min；吹扫气流速：0.35 L/min。
- g) 测试药物多反应监测（MRM）离子对、透镜电压及碰撞能量等见表 2。

表2 化合物的母离子及定量定性离子、碰撞能量

药物	定性离子对 m/z	定量离子 m/z	透镜电压 V	碰撞能量 eV
金霉素	479.2>444.0	479.2>444.0	73	21
	479.2>462.1			18

多西环素	445.2>428.1	445.2>428.1	68	18
	445.2>321.0			31
土霉素	461.2>426.1	461.2>426.1	68	19
	461.2>443.1			11
四环素	445.2>410.1	445.2>410.1	66	19
	445.2>427.1			13

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中的四环素类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中相应组分的保留时间相比,偏差在 $\pm 0.1\text{min}$ 以内,且检测到的相对离子比率,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子比率一致,其允许相对偏差不超过 $\pm 40\%$ 。

8.4.3.2 定量测定

按8.4.1和8.4.2设定仪器条件,以基质匹配标准溶液浓度为横坐标,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,基质匹配标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均在仪器检测的线性范围内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。对于试样中四环素类药物残留量超过仪器测定线性范围的,应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加药物外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算,

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times V_1 \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

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_s —标准溶液中待测药物的峰面积；

V_1 —最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

注：计算结果不小于 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法4种四环素类药物的检出限为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ ~ $800\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%。

10.3 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
(规范性)
四环素类化合物信息

四环素类化合物的中英文名称、CAS号、化学分子式及相对分子质量参见表A.1。

表A.1 吩噻嗪类化合物标准物质的信息

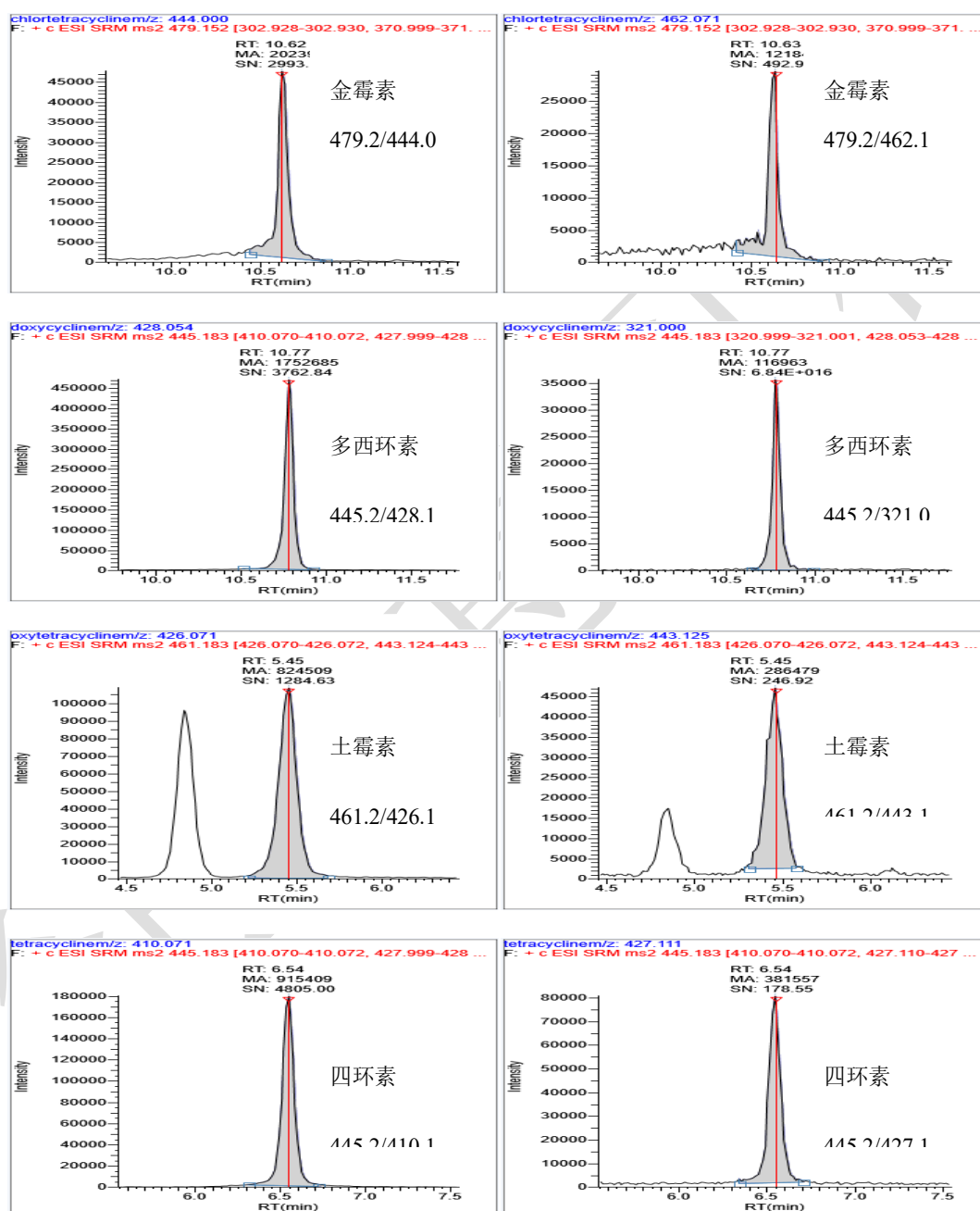
序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	金霉素	Chlortetracycline	57-62-5	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478.9
2	多西环素	Doxycycline	564-25-0	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.4
3	土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.4
4	四环素	Tetracycline	60-54-8	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.4

附录 B

(资料性)

标准物质选择离子质量色谱图

四环素类化合物标准物质选择离子质量色谱图参见图B.1。

图B.1 混合标准溶液特征离子质量色谱图 (20 $\mu\text{g/L}$)