



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 动物性食品中海南霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of Hainanmycin residue in animal derived food by liquid
chromatography-tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

动物性食品中海南霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中海南霉素残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、脂肪、肾脏、肝脏以及牛奶和鸡蛋中海南霉素的残留量测定。

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，仅所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

试样中残留的海南霉素用乙腈提取，液液萃取法净化后，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料 4.1 试剂

4.1.1 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。

4.1.2 甲酸 (CH_2O_2): 色谱纯。

4.1.3 正己烷 (C_6H_{14}): 色谱纯。

4.1.4 乙酸铵 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$)。

4.1.5 乙酸乙酯 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$): 色谱纯。

4.1.6 无水硫酸镁 (MgSO_4)。

4.1.7 无水乙酸钠 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)。

4.1.8 甲醇 (CH_3OH): 色谱纯。

4.2 溶液配制

4.2.1 乙酸铵溶液 (5 mmol/L): 称取 0.193 g 乙酸铵，用水溶解并稀释至 500 mL。

4.2.2 乙腈饱和正己烷：取正己烷 200 mL 于 250 mL 分液漏斗中，加入适量乙腈后，剧烈振荡，待分配平衡后，弃去乙腈层即得。

4.2.3 0.1%甲酸：取甲酸 0.5 mL，加上定容至 500 mL。

4.3 标准品

海南霉素钠（Hainanmycin, $C_{47}H_{79}O_{15}Na$ ）含量 $\geq 97\%$ ，暂无 CAS 号

4.4 标准溶液的配制

4.4.1 标准储备液（1 mg/mL）：取海南霉素标准品 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶，配置成浓度为 1 mg/mL 的海南霉素标准储备液。-18 °C 以下保存，有效期为 12 个月。

4.4.2 标准中间溶液 A（100 $\mu\text{g/mL}$ ）：精密量取标准储备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的海南霉素标准中间溶液 A，-18 °C 以下保存，有效期为 6 个月。

4.4.3 标准中间溶液 B（1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）：精密量取标准中间溶液 A 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的海南霉素标准中间溶液 B，-18 °C 以下保存，有效期为 6 个月。

4.5 材料

有机滤膜：孔径 0.22 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2 分析天平：感量 0.01 g，感量 0.0001 g 和感量 0.01 mg。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 离心机：不低于 8000 r/min，或相当的设备。

5.5 氮吹仪。

5.6 均质机。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

6.1.1 肌肉、脂肪、肝脏、肾脏组织和鸡蛋

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

——取均质后的供试样品，作为供试试样。

——取均质后的空白样品，作为空白试样。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

6.1.2 牛奶

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶，混合均匀。

——取均质后的供试样品，作为供试试样。

——取均质后的空白样品，作为空白试样。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

6.2 试样的保存

试样于-18℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样（ 5 ± 0.02 ）g于50 mL离心管中，加入10 mL乙腈，振摇1 min，加入2 g无水硫酸镁，0.5 g无水乙酸钠，振荡提取2 min，超声5 min，8000 r/min下离心5 min，转移上清液至另一50 mL离心管中。残渣中准确加入10 mL乙腈重复提取1次，8000 r/min下离心5 min后合并上清液，定容至20 mL，准确移取2 mL于15 mL离心管中，备用。

7.2 净化

于装有2 mL提取液的15 mL离心管中加2 mL乙腈饱和正己烷，涡旋1 min，8000 r/min离心5 min，弃去正己烷层，下层溶液于40℃氮气吹干，准确加入1.0 mL乙腈复溶；针对肝脏、肌肉类试样，于装有2 mL提取液的15 mL离心管中加2 mL乙腈饱和正己烷，涡旋1 min，8000 r/min离心5 min，弃去正己烷层，下层溶液于40℃氮气吹干，加1 mL乙腈复溶，过0.22 μm滤膜后，供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取海南霉素标准中间液B适量，用乙腈稀释，配置成浓度为0.2 ng/mL、0.5

ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的系列标准溶液，各取 1.0 mL,分别溶解经提取、净化、氮气吹干后的空白试样残余物，这步必须定容，目前的写法不对，制得海南霉素的系列基质匹配标准工作溶液，过 0.22 μm 滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。以海南霉素定量离子质量色谱峰面积为纵坐标，相对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈（2.5 μm ，2.1 mm×50 mm）或相当者；

流动相：A: 0.1%甲酸水溶液（含 5 mmol/L 乙酸铵），B:0.2%甲酸乙腈；

进样体积：3 μL ；

柱温：45℃；

流速：0.45 mL/min；

流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	60.0	40.0
0.5	60.0	40.0
4.0	2.0	98.0
6.0	2.0	98.0
6.1	60.0	40.0
8.0	60.0	40.0

7.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

喷雾电压：5500 V；

去簇电压 DP：80 V；

射入电压 EP：10 V；

碰撞室射出电压 CXP：13 V；

气帘气压力：30 Psi；

离子源温度：550℃；

检测离子参数情况见表 2。

注：可根据不同仪器的实际情况对仪器条件进行调整。

表 2 多反应监测模式（MRM）参数

名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 V	碰撞能量, eV
海南霉素	907.5/845.3	907.5/845.3	100	48
	907.5/863.5		100	48

注：离子加和方式 M+Na⁺ 907.5/845.3、907.5/863.5

7.4.3 定性测定

通过对比样品与标准品色谱图的保留时间、色谱峰的特征离子进行定性。样品中待测物质的保留时间与标准品的保留时间偏差≤5%，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度，%	允许偏差，%
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

7.4.4 定量测定

取试样溶液、溶剂标准溶液或基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，按外标法计算。基质匹配标准溶液及试样溶液中海南霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内，以特征离子色谱峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制工作曲线，得到回归方程和相关系数，相关系数应≥0.99。相关特征离子质量色谱图参见附录 A。

7.5 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行测定。

8 结果计算和表述

试样中待测物的残留量按标准曲线法或公式（1）计算：

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_1}{A_s \times m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

X ——供试试样中海南霉素的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

A ——试样溶液中海南霉素的峰面积；

C_s ——基质匹配标准溶液的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——试样溶液最终复溶体积，单位为毫升（ mL ）；

V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

A_s ——基质匹配标准溶液中海南霉素的峰面积；

m ——试样的质量，单位为克（ g ）；

V_2 ——净化时所分取试样溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

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3位有效数字。

9 检测方法灵敏度、正确度、精密度

9.1 灵敏度

本方法在鸡、牛、羊、猪的肌肉、脂肪、肾脏以及肝脏、牛奶和鸡蛋中的检出限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $4.0 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 正确度

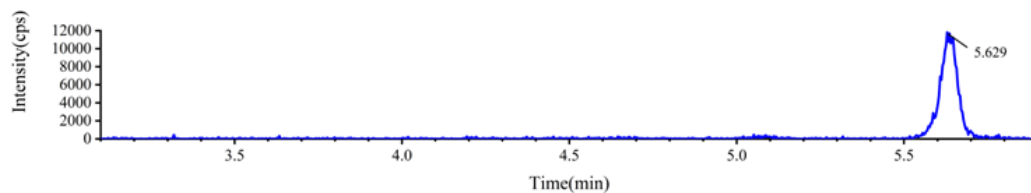
本方法在 $1 \mu\text{g/kg}$ ~ $40 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为60%~120%。

9.3 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 $\leq 15\%$ 。

附录A
(资料性附录)
特征离子质量色谱图

TIC from STD, +MRM(2 transitions)



● XIC from STD, +MRM(2 transitions): 907.4/845.3 Da

● XIC from STD, +MRM(2 transitions): 907.4/863.5 Da

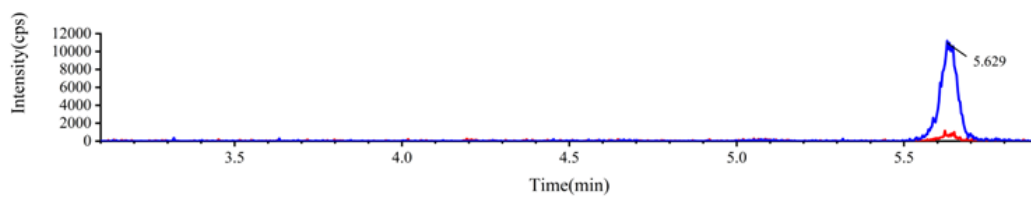


图 A 海南霉素基质匹配标准溶液总离子流图 (1 $\mu\text{g/kg}$) 以及特征离子色谱图 (1 $\mu\text{g/kg}$)