



中华人民共和国国家标准

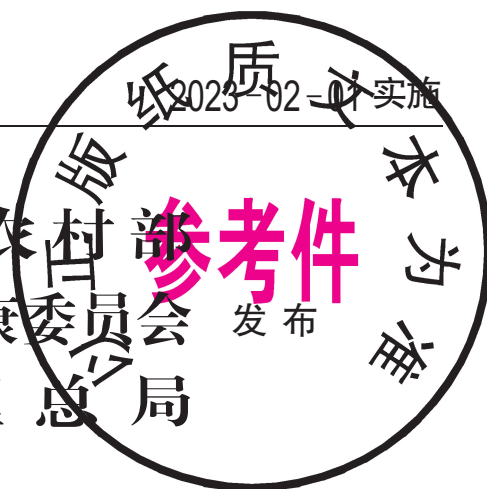
GB 31613.6—2022

食品安全国家标准 猪和家禽可食性组织中 维吉尼亚霉素M₁残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of virginiamycin M₁ residue in edible tissues
of swine and poultry by liquid chromatography tandem
mass spectrometry method

2022-09-20 发布

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。

本文件系首次发布。



食品安全国家标准

猪和家禽可食性组织中维吉尼亚霉素 M₁ 残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了猪和家禽可食性组织中维吉尼亚霉素 M₁ 残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪和家禽(包括鸡、鸭和鹅)的肌肉、肝脏、肾脏及皮+脂中维吉尼亚霉素 M₁ 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

试料中残留的维吉尼亚霉素 M₁,用乙腈提取,正己烷除脂,液相色谱-串联质谱检测,外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 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 乙腈(CH₃CN)。

5.1.4 正己烷(C₆H₁₄)。

5.2 溶液配制

5.2.1 乙腈溶液:取乙腈 600 mL、水 400 mL,混匀。

5.2.2 0.1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.3 标准品

维吉尼亚霉素 M₁(Virginiamycin M₁, C₂₈H₃₅N₃O₇, CAS 号:21411-53-0)含量≥90%。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取维吉尼亚霉素 M₁ 标准品 10 mg,精密称定,用乙腈适量使溶解并稀释定容至 200 mL棕色容量瓶,配制成浓度为 50 μg/mL 的维吉尼亚霉素 M₁ 标准储备液。4 °C 以下保存,有效期 7 d。

5.4.2 标准中间液:准确量取标准储备液 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL 和 3 mL,分别置 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL 和 3 μg/mL 的维吉尼亚霉素 M₁ 标准中间液。4 °C 以下保存,有效期 7 d。

5.5 材料

5.5.1 刻度试管:10 mL。

5.5.2 有机滤膜:0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾电离源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 均质机。

6.4 超声仪。

6.5 离心机: $\geq 4\ 000$ r/min。

6.6 涡旋振荡器。

6.7 移液器。

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,绞碎并均质。

a) 取均质的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质的空白样品,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

-40 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,避免反复冻融。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g(准确至 ± 0.05 g),加乙腈 4 mL(肌肉组织先加水 2 mL),涡旋 2 min,超声 30 min,4 000 r/min离心 10 min,取上清液转移至 15 mL 具塞离心管中。残渣加乙腈 2 mL 重复提取 1 遍,合并上清液,备用,得到提取液。

8.2 净化

取上述提取液,加水至约 9.5 mL,涡旋混合 30 s 加正己烷 3 mL,涡旋 30 s,4 000 r/min 离心 10 min,弃去上层正己烷,重复除脂 1 次。将下层溶液转移至 10 mL 刻度试管中,加水至 10 mL,涡旋混合 30 s,备用。取备用液(肝脏:取备用液 2.0 mL,加乙腈溶液 4.0 mL,混匀;肾脏、皮脂:取备用液 2.0 mL,加乙腈溶液 6.0 mL,混匀),过滤,供液相色谱-串联质谱法测定。

8.3 标准曲线的制备

8.3.1 家禽肌肉、肝脏基质匹配标准曲线的制备

准确量取浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维吉尼亚霉素 M_1 标准中间液各 200 μL ,分别加于按 7.1 和 7.2 正己烷除脂处理后的空白组织提取液中,加水至 10 mL,混匀,同法处理。制备成维吉尼亚霉素 M_1 浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 和 60 ng/mL 的系列基质匹配标准溶液,过滤,临用现配,供液相色谱联用质谱仪测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标、对应的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。

8.3.2 其他组织标准曲线的制备

分别准确量取浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维吉尼亚霉素 M_1 标准中间液各 200 μL ,加乙腈溶液至 10.0 mL,配制成维吉尼亚霉素 M_1 浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 和 60 ng/mL 系列标准工作液,临用现配,供液相色谱联用质谱仪测定。以测得特

征离子峰面积为纵坐标、对应的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 色谱条件

- 色谱柱: C_{18} (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 或相当者;
- 柱温: 30 $^{\circ}$ C;
- 进样量: 5 μ L;
- 流速: 0.2 mL/min;
- 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	30	70
1	30	70
3	42	58
6	42	58
6.5	95	5
8.5	95	5
9	30	70
10	30	70

8.4.2 质谱条件

- 离子源: 电喷雾离子源;
- 扫描方式: 正离子扫描;
- 检测方式: 多反应监测(MRM);
- 离子源温度: 150 $^{\circ}$ C;
- 脱溶剂温度: 200 $^{\circ}$ C;
- 毛细管电压: 3.0 kV;
- 脱溶剂气流速: 800 L/h。
- 锥孔反吹气流速: 150 L/h。
- 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 药物的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量的参考值

化合物	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	碰撞能量 eV	锥孔电压 V
维吉尼亚霉素 M_1	526.3>355.1	526.3>355.1	18	20
		526.3>337.1	22	20

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在相同的测试条件下, 试料溶液中维吉尼亚霉素 M_1 色谱图的保留时间与相应标准工作液中保留时间偏差应不大于 $\pm 2.5\%$; 且检测到的离子的相对丰度, 应当与浓度相当的标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质匹配标准工作液/标准工作液,作单点或多点校准,按外标法以峰面积定量,基质匹配标准工作液/标准工作液及试料溶液中的维吉尼亚霉素 M₁ 响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,维吉尼亚霉素 M₁ 基质匹配标准溶液的特征离子质量色谱图见附录 A。

8.6 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用完全相同的步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中维吉尼亚霉素 M₁ 残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

- X —— 试样中维吉尼亚霉素 M₁ 残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 标准工作液中维吉尼亚霉素 M₁ 浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A —— 试样溶液中维吉尼亚霉素 M₁ 峰面积;
- V —— 定容后溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- A_s —— 标准工作液中维吉尼亚霉素 M₁ 峰面积;
- f —— 稀释倍数;
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法维吉尼亚霉素 M₁ 在肌肉、肝脏、肾脏和皮脂的检测限分别为 2 μg/kg、6 μg/kg、8 μg/kg 和 8 μg/kg,肌肉的定量限为 10 μg/kg,其他组织定量限为 50 μg/kg。

10.2 准确度

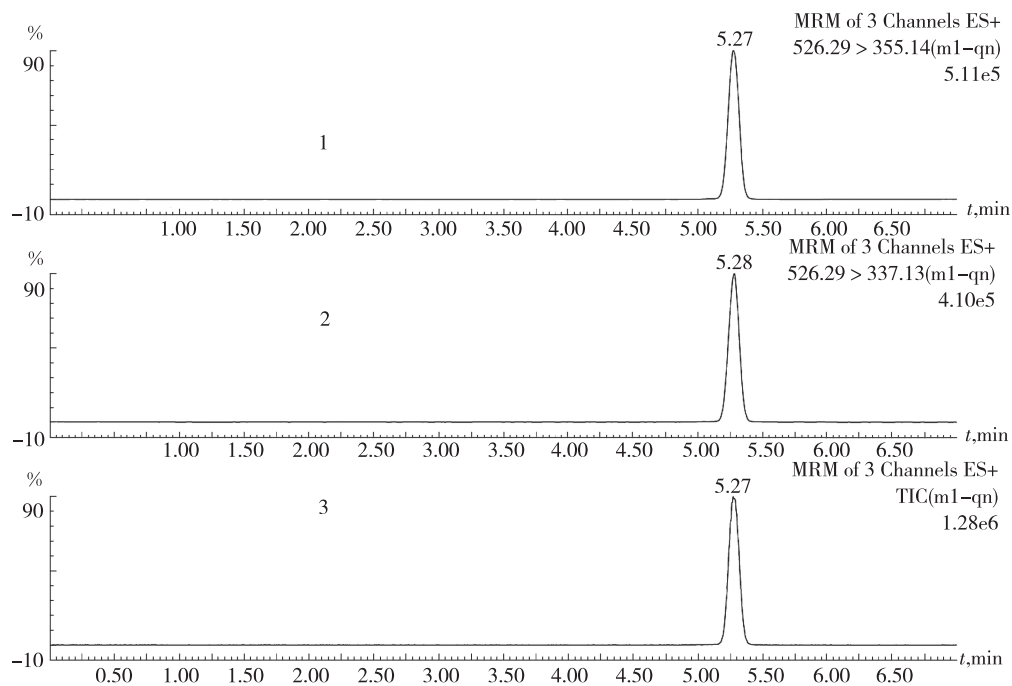
本方法维吉尼亚霉素 M₁ 在家禽和猪肌肉组织 10 μg/kg~200 μg/kg、肝脏和肾脏组织 50 μg/kg~600 μg/kg、皮脂组织 50 μg/kg~800 μg/kg 测定浓度水平上的回收率为 70%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%,批间相对标准偏差≤20%。

附录 A

(资料性)

维吉尼亚霉素 M₁ 标准溶液特征离子质量色谱图维吉尼亚霉素 M₁ 标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1。

标引序号说明:

1——M₁ 特征离子质量色谱图(526.3>355.1);2——M₁ 特征离子质量色谱图(526.3>337.1);3——M₁ 总离子质量色谱图。图 A.1 维吉尼亚霉素 M₁ 标准溶液特征离子质量色谱图(20 ng/mL)