



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 水产品中沃尼妙林、泰妙菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of valnemulin, tiamulin residues in aquatic products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

(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

水产品中沃尼妙林、泰妙菌素残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中沃尼妙林、泰妙菌素及其代谢物8- α -羟基妙林残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼、虾、蟹、鳖等水产品可食组织（肌肉）中沃尼妙林、泰妙菌素及其代谢物8- α -羟基妙林残留量的检测，其他水产品可食组织参考执行。

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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的沃尼妙林、泰妙菌素及其代谢物8- α -羟基妙林，经1%乙酸乙腈提取，正己烷除脂，碱性条件下水解，再经乙酸乙酯液液萃取，液相色谱-串联质谱测定，沃尼妙林、泰妙菌素采用内标法定量，8- α -羟基妙林采用外标法定量。

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（ CH_3CN ）：色谱纯。

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

5.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）：色谱纯。

5.1.4 乙酸（ CH_3COOH ）：色谱纯。

5.1.5 盐酸（ HCl ）：35%~37%。

5.1.6 氨水（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）：25%~28%。

5.1.7 无水硫酸镁（ MgSO_4 ）。

5.1.8 氯化钠（ NaCl ）。

5.1.9 氢氧化钠（ NaOH ）。

5.2 溶液配制

5.2.1 1%乙酸乙腈溶液：取乙酸 10 mL，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

- 5.2.2 30%乙腈溶液：取乙腈 30 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.3 2%乙酸溶液：取乙酸 20 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。
- 5.2.4 0.1%氨水溶液：取氨水 1 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。
- 5.2.5 0.1%氨水乙腈溶液：取氨水 1 mL，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。
- 5.2.6 7 mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 28 g，用水溶解冷却至室温后稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准品

盐酸沃尼妙林、延胡索酸泰妙菌素、8- α -羟基妙林、延胡索酸泰妙菌素- $^{13}\text{C}_4$ 、沃尼妙林三氟乙酸盐-D₆ 标准品，含量均 \geq 90.0%，见附录 A。

5.4 标准溶液制备

- 5.4.1 标准储备液：取标准品各适量（相当于各待测组分 10 mg），精密称定，分别用乙腈溶解并稀释定容至 100 mL 容量瓶，配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备液。-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。
- 5.4.2 沃尼妙林和泰妙菌素混合标准工作液（1.0 mg/L）：分别准确量取沃尼妙林和泰妙菌素标准储备液适量，用乙腈稀释制成浓度为 1.0 mg/L 的混合标准工作液，-18℃以下避光保存，有效期 1 个月。
- 5.4.3 8- α -羟基妙林标准工作液（10 mg/L 和 1.0 mg/L）：准确量取 8- α -羟基妙林标准储备液适量，用乙腈逐级稀释，配制成浓度为 10 mg/L 和 1.0 mg/L 的 8- α -羟基妙林标准工作液。-18℃以下避光保存，有效期 1 个月。
- 5.4.4 沃尼妙林-D₆ 和泰妙菌素- $^{13}\text{C}_4$ 混合内标工作液（1.0 mg/L）：分别准确量取沃尼妙林-D₆ 和泰妙菌素- $^{13}\text{C}_4$ 标准储备液适量，用乙腈逐级稀释，配制成浓度为 1.0 mg/L 混合内标工作液。-18℃以下避光保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 具塞塑料离心管：10 mL、15 mL、50 mL。
- 5.5.2 鸡心瓶：125 mL。
- 5.5.3 微孔滤膜：0.22 μm 有机系尼龙滤膜。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。
- 6.2 离心机：8 000 r/min 或以上。
- 6.3 电子天平：感量为 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 超声波清洗器。
- 6.6 旋转蒸发仪。
- 6.7 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

- 取均质的供试样品，作为供试试料；
- 取均质的空白样品，作为空白试料；
- 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

—18 °C以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

准确称取试料（ 5 ± 0.02 ）g，于50 mL具塞离心管中，加混合内标工作液20 μ L，加1%乙酸乙腈溶液20 mL，涡旋混合1 min，超声提取2 min，再加入无水硫酸镁3 g和氯化钠0.5 g，涡旋混合30 s，8 000 r/min离心5 min，取上清液至125 mL鸡心瓶，残渣加入1%乙酸乙腈溶液10 mL重复提取一次，合并上清液至125 mL鸡心瓶，50 °C旋转蒸发至干，加入2%乙酸溶液6 mL溶解残留物，转移溶液至15 mL具塞离心管。

8.2 净化

向上述15 mL离心管中加入正己烷3 mL，涡旋振荡30 s，5 000 r/min离心5 min，弃去上层正己烷。再加入7 mol/L氢氧化钠溶液0.5 mL，混匀，45 °C水浴20 min后取出置室温备用。加入盐酸0.5 mL，混匀，加入乙酸乙酯5 mL，涡旋振荡30 s，5 000 r/min离心5 min，取上清液至10 mL离心管中，残渣加入乙酸乙酯4 mL重复提取一次，合并上清液至10 mL离心管中，40 °C氮气吹干，加入30%乙腈溶液1 mL，涡旋振荡30 s，8 000 r/min离心5 min，取上清液，过0.22 μ m滤膜，液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取沃尼妙林和泰妙菌素混合标准工作液、8- α -羟基妙林标准工作液和沃尼妙林-D₆和泰妙菌素-¹³C₄混合内标工作液适量，分别加入7份经8.1和8.2步骤处理的空白试料经氮气吹干后的残渣中，加30%乙腈溶液适量使溶解并稀释至1 mL，配制成沃尼妙林和泰妙菌素浓度为1 μ g/L、2.5 μ g/L、5 μ g/L、25 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L，8- α -羟基妙林浓度为10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、250 μ g/L、500 μ g/L、1000 μ g/L和混合内标物浓度均为20 μ g/L的系列基质匹配标准工作液，供液相色谱-串联质谱测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈柱（100 mm×2.1 mm，3 μ m）或相当者；
- 流动相：A：0.1%氨水乙腈溶液，B：0.1%氨水溶液，梯度洗脱条件见表1；
- 流速：0.4 mL/min；
- 柱温：40 °C；
- 进样量：20 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.0	20	80
0.1	20	80
5.0	90	10
6.5	20	80
10.0	20	80

8.4.2 质谱参考条件

- 电离方式：电喷雾电离；
- 扫描方式：正离子扫描、负离子扫描；

- c) 数据采集：多反应监测（MRM），质谱参数参见表 2；
- d) 喷雾电压：3500 V（正离子模式），-3000 V（负离子模式）；
- e) 蒸发气温度：300 °C；
- f) 鞘气流速：6 L/min；
- g) 辅助气流速：15 L/min；
- h) 离子传输管温度：350 °C；
- i) 碰撞气及压力：氩气，1.5 mTorr。

表 2 化合物正、负离子扫描时间、母离子及定量定性离子、碰撞能量

扫描时间 min	离子模式	化合物	定性离子对 m/z	定量离子 m/z	碰撞能量 eV
0~6.5	负离子	8- α -羟基妙林	335.1>179.1	335.1>179.1	22
			335.1>277.0		14
6.5~10.0	正离子	泰妙菌素	494.3>192.1	494.3>192.1	20
			494.3>119.1		34
		沃尼妙林	565.4>263.0	565.4>263.0	16
			565.4>164.0		29
		泰妙菌素- ¹³ C ₄	498.3>196.1	498.3>196.1	20
		沃尼妙林-D ₆	571.2>268.9	571.2>268.9	17

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试样溶液中的目标化合物的保留时间与基质匹配标准溶液中相应目标化合物的保留时间相比，8- α -羟基妙林偏差在 ± 0.1 min以内，沃尼妙林和泰妙菌素分别与其同位素内标（沃尼妙林-D₆和泰妙菌素-¹³C₄）的保留时间之比偏差在1%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8- α -羟基妙林的残留量，按内标法计算试样中沃尼妙林和泰妙菌素的残留量，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8- α -羟基妙林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，对于试样中沃尼妙林、泰妙菌素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，使试样溶液稀释后沃尼妙林、泰妙菌素的响应在仪器线性范围内，对应沃尼妙林-D₆和泰妙菌素-¹³C₄浓度一致。

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8- α -羟基妙林的残留量按标准曲线或公式（1）计算，

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

式中：

- ω —试样中8- α -羟基妙林残留量，单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)；
 ρ_s —标准溶液中8- α -羟基妙林的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；
 A —试样溶液中8- α -羟基妙林的峰面积；
 A_s —标准溶液中8- α -羟基妙林的峰面积；
 V —溶解残渣的30%乙腈溶液体积的数值，单位为毫升 (mL)；
 m —试样质量，单位为克 (g)。
 注：计算结果保留3位有效数字。

试料中沃尼妙林或泰妙菌素的残留量按标准曲线或按式 (2) 计算：

$$\omega = \frac{\rho_s \times \rho_{is} \times A \times A'_{is} \times V \times 1000}{A_{is} \times A_s \times \rho'_{is} \times m \times 1000} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

- ω —试样中沃尼妙林或泰妙菌素残留量，单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)；
 ρ_s —标准溶液中沃尼妙林或泰妙菌素的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；
 ρ_{is} —试样溶液中内标物的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；
 ρ'_{is} —标准溶液中内标物的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；
 A —试样溶液中沃尼妙林或泰妙菌素的峰面积；
 A_s —标准溶液中沃尼妙林或泰妙菌素的峰面积；
 A_{is} —试样溶液中内标物的峰面积；
 A'_{is} —标准溶液中内标物的峰面积；
 V —溶解残渣的30%乙腈溶液体积的数值，单位为毫升 (mL)；
 m —试样质量，单位为克 (g)；
 注：计算结果保留3位有效数字。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法沃尼妙林和泰妙菌素的检测限为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；8- α -羟基妙林的检测限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

本方法沃尼妙林和泰妙菌素在5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70 %~120 %；8- α -羟基妙林在20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70 %~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)
目标化合物信息

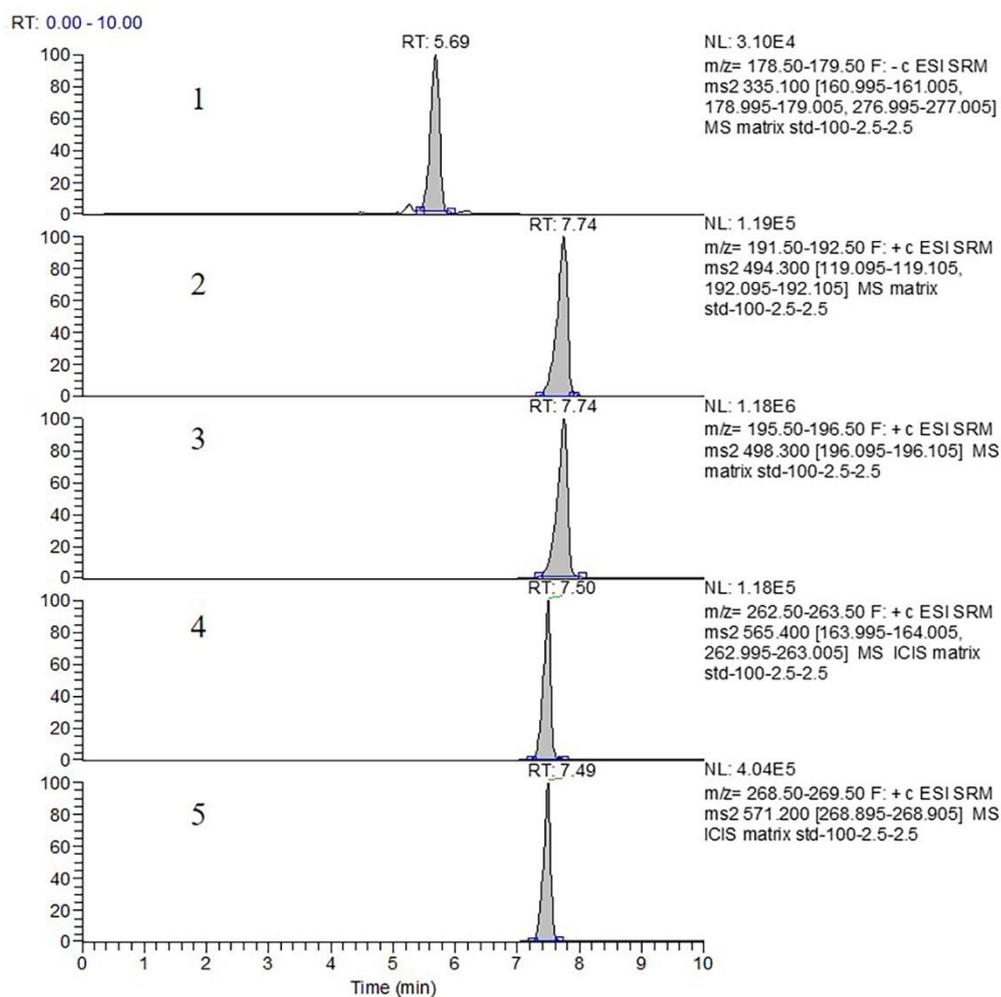
目标化合物的中英文名称、CAS号、化学分子式及相对分子质量参见表A.1。

表A.1 目标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	盐酸沃尼妙林	valnemulin hydrochloride	133868-46-9	$C_{31}H_{53}ClN_2O_5S$	601.3
2	延胡索酸泰妙菌素	tiamulin fumarate	55297-96-6	$C_{32}H_{51}NO_8S$	609.8
3	8- α -羟基妙林	8-alpha-hydroxy-mutiline	87680-55-5	$C_{20}H_{32}O_4$	320.5
4	延胡索酸泰妙菌素- $^{13}C_4$	tiamulin- $^{13}C_4$ fumarate	55297-96-6	$C_{28}^{13}C_4H_{51}NO_8S$	613.8
5	沃尼妙林三氟乙酸盐-D ₆	valnemulin trifluoroacetic acid salt-D ₆	1217627-44-5	$C_{31}H_{46}D_6N_2O_5S$	564.8

附录 B
(资料性)
标准物质特征离子质量色谱图

标准物质特征离子质量色谱图参见图B.1。



标引序号说明:

- 1- 8- α -羟基妙林特征离子质量色谱图 (335.1>179.1)
- 2- 泰妙菌素特征离子质量色谱图 (494.3>192.1)
- 3- 泰妙菌素- $^{13}\text{C}_4$ 特征离子质量色谱图 (498.3>196.1)
- 4- 沃尼妙林特征离子质量色谱图 (565.4>263.0)
- 5- 沃尼妙林-D₆特征离子质量色谱图 (571.2>268.9)

图 B.1 沃尼妙林 (2.5 $\mu\text{g/L}$)、泰妙菌素 (2.5 $\mu\text{g/L}$) 和 8- α -羟基妙林 (100 $\mu\text{g/L}$) 及内标 (20 $\mu\text{g/L}$) 混合标准溶液特征离子质量色谱图