



中华人民共和国国家标准

GB/T 20756—2006

可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、 甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and
florfenicol residues in edible animal muscles, liver and aquatic products—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、林海丹、林峰、焦红、陈捷。

本标准系首次发布的国家标准。

可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、 甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了可食动物肌肉、肝脏、鱼和虾中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于可食动物肌肉、肝脏、鱼和虾中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定。

本标准方法的检出限：氯霉素为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，甲矾霉素和氟苯尼考为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 1 部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

样品中的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考在碱性条件下，用乙酸乙酯提取，提取液旋转蒸干后，残渣用水溶解，经正己烷液液分配脱脂。液相色谱-串联质谱仪检测。

4 试剂

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙酸乙酯。

4.3 正己烷。

4.4 氢氧化铵：25%~28%。

4.5 无水硫酸钠：经 650℃灼烧 4 h，置于干燥器中备用。

4.6 氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准物质：纯度 \geq 99.5%。

4.7 氘代氯霉素内标标准溶液：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4.8 标准储备溶液：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别准确称取适量的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准物质，用甲醇配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液，该溶液于-18℃保存，可使用 1 年。

4.9 混合标准储备溶液：1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别准确吸取 1 mL 氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准储备溶液（4.8）于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度。该溶液于-18℃保存，可使用 6 个月。

4.10 中间浓度混合标准溶液：20 ng/mL 。准确吸取 1 mL 混合标准储备溶液（4.9）于 50 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。该溶液于 4℃保存，可使用 3 个月。

4.11 内标标准储备溶液:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。准确吸取 100 μL 氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)标准溶液(4.7)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度。该溶液于 -18°C 保存,可使用 6 个月。

4.12 中间浓度内标溶液:20 ng/mL 。准确吸取 1 mL 内标标准储备溶液(4.11)于 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。该溶液于 4°C 保存,可使用 3 个月。

4.13 基质混合标准工作溶液:根据每种标准的灵敏度和仪器线性范围,吸取一定量的中间浓度混合标准溶液(4.10)和中间浓度内标溶液(4.12),用空白样品提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液,内标浓度均为 0.3 ng/mL 。当天配制。

4.14 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 离心机:4 000 r/min。

5.4 高速台式离心机:13 000 r/min。

5.5 组织捣碎机。

5.6 匀质器。

5.7 旋转蒸发器。

5.8 超声波。

5.9 液体混匀器。

5.10 聚丙烯离心管:50 mL,1.5 mL,具塞。

5.11 鸡心瓶:25 mL。

5.12 比色管:50 mL,具塞。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

取样品约 500 g 用肉类组织捣碎机绞碎,装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

6.2 试样的保存

将试样于 -18°C 冰箱中保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样,精确至 0.01 g。置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入中间浓度内标溶液(4.12) 75.0 μL ,加入 15 mL 乙酸乙酯,0.45 mL 氢氧化铵(4.4),5 g 无水硫酸钠,匀质提取 30 s,以 4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 比色管中。另取一个 50 mL 离心管,加入 15 mL 乙酸乙酯,0.45 mL 氢氧化铵,洗涤匀质刀头 10 s,洗涤液移入第一支离心管中,用玻棒搅动残渣,于液体混匀器(5.9)上涡旋提取 1 min,超声波提取 5 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 比色管中。残渣再加入 15 mL 乙酸乙酯,重复上述操作,合并全部上清液至 50 mL 比色管中,用乙酸乙酯定容至 50 mL。摇匀后移取 10 mL 乙酸乙酯提取液于 25 mL 鸡心瓶中,在 45°C 旋转浓缩至干。

7.2 净化

鸡心瓶中的残渣用 3 mL 水溶解,超声 5 min,加入 3 mL 正己烷涡旋混合 30 s,静置分层,弃掉上层的正己烷,再加 3 mL 正己烷涡旋混合 30 s,静置分层,移取 1 mL 水相于 1.5 mL 的聚丙烯离心管中,以 1 3000 r/min 离心 5 min,过 0.2 μm 滤膜后,供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱条件

- 色谱柱:Discovery C₁₈色谱柱,5 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温:40℃;
- 流动相:甲醇+水(40+60);
- 流速:0.30 mL/min;
- 进样量:20 μL。

7.3.2 质谱条件

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:负离子扫描;
- 检测方式:多反应监测(MRM);
- 电喷雾电压:−1 750 V;
- 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- 辅助气温度:500℃;
- 定性离子对、定量离子对、采集时间、去簇电压及碰撞能量见表 1。

表 1 氟霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氘代氟霉素(d₅-氟霉素)的质谱参数

被测物名称及内标名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	采集时间 /ms	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
氟霉素	320.9/257.0	320.9/152.0	200	−55	−16
	320.9/152.0				−26
甲砒霉素	354.0/290.0	354.0/185.0	200	−55	−18
	354.0/185.0				−27
氟苯尼考	356.0/336.0	356.0/336.0	200	−55	−14
	356.0/185.0				−27
氘代氟霉素(d ₅ -氟霉素)	326.0/157.0	326.0/157.0	200	−55	−26

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与标准溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

7.3.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准工作溶液(4.13)进样,以标准溶液中被测组分峰面积和氘代氟霉素(d₅-氟霉素)峰面积的比值为纵坐标,标准溶液中被测组分浓度与氘代氟霉素(d₅-氟霉素)浓度的比值为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。内标法定量。氟霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氘代氟霉素(d₅-氟霉素)的标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见图 A.1。氟霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B.1。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按 7.1~7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——试样中被测物残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c_s——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A——试样溶液中被测物的色谱峰面积;
- A_s——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;
- c_i——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c_{si}——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_{si}——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;
- A_i——试样溶液中内标物的色谱峰面积;
- V——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r,被测物的含量范围及重复性方程见表 3 和表 4。

表 3 氟霉索、甲磺霉索和氟苯尼考的含量范围及重复性和再现性方程(基质为动物肌肉)

化合物名称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
氟霉索	0.050 0~1.00	r=0.075m+0.018 6	R=0.114 2m+0.017 4
甲磺霉索	0.500~4.00	r=0.252m+0.103	R=0.264+0.102
氟苯尼考	0.500~4.00	lg r=0.911 6lg m-0.618	lg R=0.916lg m-0.617

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

表 4 氟霉索、甲磺霉索和氟苯尼考的含量范围及重复性和再现性方程(基质为动物肝脏)

化合物名称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
氟霉索	0.050 0~1.00	r=0.143m+0.003 4	R=0.196m+0.004 9
甲磺霉索	0.500~4.00	r=0.228m+0.187	R=0.292m+0.062 2
氟苯尼考	0.500~4.00	r=0.164m+0.051 9	R=0.205m+0.036

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R,被测物的含量范围及再现性方程见表 3 和表 4。

附录 A
(资料性附录)

氟霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准物质和内标物氘代氟霉素的多反应监测(MRM)色谱图

氟霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准物质和内标物氘代氟霉素的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

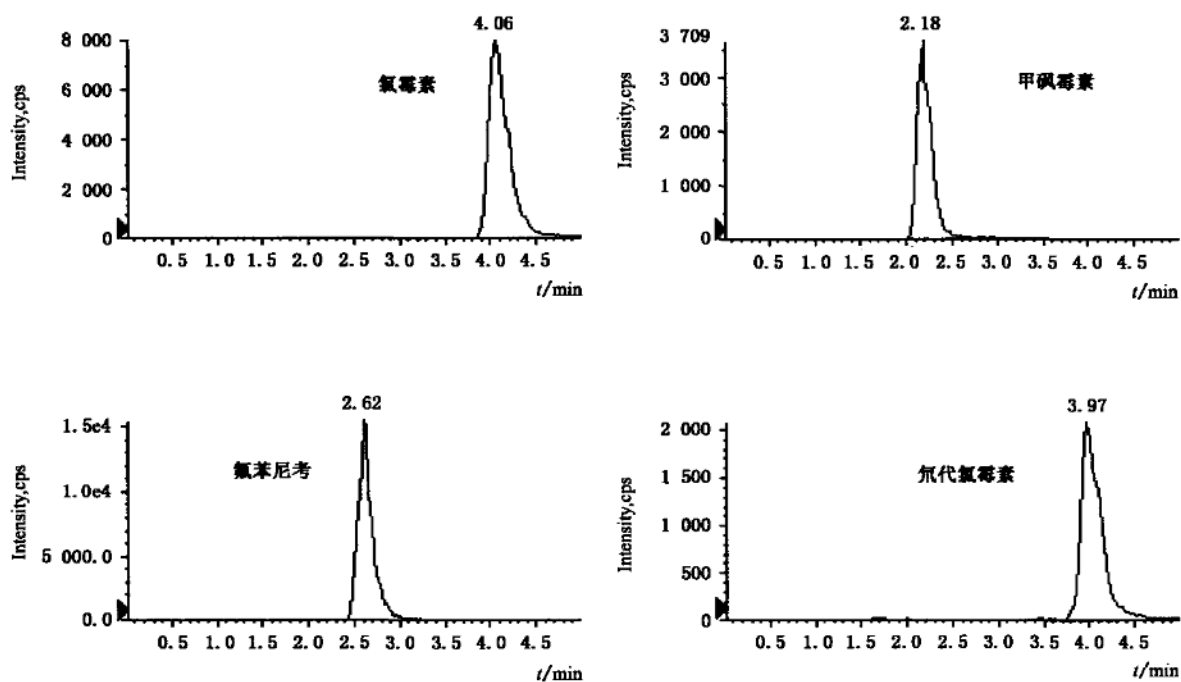


图 A.1 氟霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准物质和内标物氘代氟霉素的多反应监测(MRM)色谱图

附录 B
(资料性附录)
回收率

氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的添加浓度及其平均回收率的试验数据(n=10)

样品基质	化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
肌肉	氯霉素	0.10	97.8
		0.50	97.9
		1.00	113.0
	甲矾霉素	1.00	101.0
		2.00	104.0
		4.00	99.8
	氟苯尼考	1.00	99.0
		2.00	100.0
		4.00	108.0
肝脏	氯霉素	0.10	100.0
		0.50	98.0
		1.00	105.0
	甲矾霉素	1.00	104.0
		2.00	97.1
		4.00	77.3
	氟苯尼考	1.00	103.0
		2.00	106.0
		4.00	99.1
鱼	氯霉素	0.10	118.0
		0.50	112.0
		1.00	108.0
	甲矾霉素	1.00	97.0
		2.00	97.3
		4.00	91.7
	氟苯尼考	1.00	90.0
		2.00	92.9
		4.00	86.2

表 B.1(续)

样品基质	化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
虾	氟霉素	0.10	113.0
		0.50	107.0
		1.00	109.0
	甲砜霉素	1.00	96.4
		2.00	98.9
		4.00	96.1
	氟苯尼考	1.00	93.0
		2.00	83.9
		4.00	86.4