



中华人民共和国国家标准

GB/T 22959—2008

河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中氯霉素、甲砒霉素 和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and
florfenicol residues in fugu, eel and baked eel—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 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、附录 B 为资料性附录。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

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：林海丹、李宪华、谢守新、林峰、黄华军、邵琳智、庞国芳。

河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中氯霉素、甲砒霉素 和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中氯霉素(chloramphenicol)、甲砒霉素(thiamphenicol)和氟苯尼考(flurfenicol)及其代谢物氟苯尼考胺(flurfenicol amine)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的测定。

本标准的方法检出限:河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中氯霉素为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$,甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的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(正确度与精密性) 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(正确度与精密性) 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—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

样品中的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺在碱性条件下,用乙酸乙酯提取,提取液旋转蒸发挥发干,残渣以水溶解,经正己烷液液分配脱脂。液相色谱-串联质谱仪检测,氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考以内标法峰面积定量,氟苯尼考胺以外标法峰面积定量。

4 试剂

所用试剂除注明外均为分析纯,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 氨水:25%~28%。

4.5 无水硫酸钠:使用前经 $650 \text{ }^\circ\text{C}$ 灼烧4 h。

4.6 标准物质:氯霉素(CAS:56-75-7)、甲砒霉素(CAS:15318-45-3)和氟苯尼考(CAS:76639-94-6),纯度 $\geq 99.5\%$;氟苯尼考胺,纯度 $\geq 98.0\%$ 。

4.7 内标标准液:氘代氯霉素(d_5 -氯霉素), $100 \mu\text{g}/\text{mL}$,溶剂为乙腈,氘化度 $\geq 98\%$ 。

4.8 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液:分别准确称取适量的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺标准物质(4.6),用甲醇分别配成 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。该溶液于 $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

4.9 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合标准储备液:分别准确吸取 1.00 mL 氯霉素、甲砒霉

素和氟苯尼考标准储备液(4.8),移至100 mL容量瓶中,用甲醇配成1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合标准储备液。该溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.10 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟苯尼考胺标准储备液:准确吸取1.00 mL 氟苯尼考胺标准储备液(4.8),移至100 mL容量瓶中,用甲醇配成1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟苯尼考胺标准储备液。该溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.11 20 ng/mL 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合标准中间液:准确吸取1.00 mL 混合标准储备液(4.9),移至50 mL容量瓶中,用水配成20 ng/mL 的氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合标准中间液。该溶液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.12 20 ng/mL 氟苯尼考胺标准中间液:准确吸取1.00 mL 氟苯尼考胺标准储备液(4.10),移至50 mL容量瓶中,用水配成20 ng/mL 的氟苯尼考胺标准中间液。该溶液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.13 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标标准储备液:准确吸取1.00 μL 内标标准液(4.7),移至10 mL容量瓶中,用甲醇配成1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标标准储备液。该溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.14 20 ng/mL 内标标准中间液:准确吸取1.00 mL 内标标准储备液(4.13),移至50 mL容量瓶中,用水配成20 ng/mL 的内标标准中间液。该溶液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.15 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合基质标准工作溶液:根据每种标准的灵敏度和仪器线性范围,临用时吸取一定量的混合标准中间液(4.11)和内标标准中间液(4.14),用空白基质溶液配成适当浓度的混合基质标准工作液,每毫升该混合基质标准工作溶液含有0.15 ng 氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)。

4.16 氟苯尼考胺基质标准工作溶液:根据标准的灵敏度和仪器线性范围,临用时吸取一定量的标准中间液(4.12),用空白基质溶液配成适当浓度的氟苯尼考胺基质标准工作液。

4.17 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:转速 $\geq 4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

5.4 小型台式离心机:转速 $\geq 13\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

5.5 组织捣碎机。

5.6 匀浆机。

5.7 减压旋转蒸发仪。

5.8 超声波水浴。

5.9 旋涡振荡器。

5.10 聚丙烯离心管:带盖,50 mL,1.5 mL。

5.11 鸡心瓶:25 mL。

5.12 具塞比色管:50 mL。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

从所取全部样品中取出有代表性样品可食部分约500 g,用组织捣碎机充分捣碎均匀,装入洁净容器,密封,并标明标记。

制样操作过程中应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样的保存

将试样于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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,加入内标标准中间液(4.14)75.0 μL ,加入 25 mL 乙酸乙酯,0.75 mL 氨水(4.4),3 g 无水硫酸钠,匀浆提取 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 比色管中。另取一 50 mL 离心管加入 20 mL 乙酸乙酯,0.60 mL 氨水,洗涤匀浆刀头 10 s,洗涤液移入第一支离心管中,用玻棒搅动残渣,旋涡振荡提取 1 min,超声波振荡提取 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 比色管,乙酸乙酯定容至 50.0 mL。摇匀后移取 10.0 mL 乙酸乙酯提取液于 25 mL 鸡心瓶,45 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转浓缩至干。

7.2 净化

鸡心瓶中的残渣用 2.00 mL 水溶解,旋涡振荡混匀,超声 5 min,加入 3 mL 正己烷旋涡振荡混合 30 s,静置分层,弃掉上层的正己烷,再加 3 mL 正己烷旋涡振荡混合 30 s,静置分层,移取部分下层的水相于 1.5 mL 的聚丙烯离心管中,13 000 r/min 离心 5 min,经 0.2 μm 滤膜过滤后,供液相色谱-串联质谱测定氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考。另吸取 100 μL 滤液于液相进样瓶,加入 400 μL 水,混匀,供液相色谱-串联质谱测定氟苯尼考胺。

7.3 空白基质溶液的制备

称取 5 g 空白样品,精确至 0.01 g,除不加入内标标准中间液,其他按 7.1 和 7.2 步骤操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

7.4.1.1 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考测定

- 色谱柱:SUPELCO Discovery C_{18} , 5 μm , 150 mm \times 2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;
- 流动相:甲醇-水(2+3);
- 流速:0.30 mL/min;
- 进样量:20 μL 。

7.4.1.2 氟苯尼考胺测定

- 色谱柱:Intersil C_8 -3, 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm(内径)或相当者;
- 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;
- 流动相:甲醇-水(4+1);
- 流速:0.30 mL/min;
- 进样量:10 μL 。

7.4.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- 扫描方式:负离子扫描(氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考测定),正离子扫描(氟苯尼考胺测定);
- 检测方式:多反应选择离子检测(MRM);
- 电喷雾电压(IS):-4 200 V(氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考测定),4 500 V(氟苯尼考胺测定);
- 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(TEM):600 $^{\circ}\text{C}$;
- 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 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)和氟苯尼考胺的质谱参数

化合物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	采集时间/ ms	去簇电压/ V	碰撞能量/ V
氯霉素	320.9/257.0	320.9/152.0	200	-55	-16
	320.9/152.0				-26
甲砒霉素	353.9/290.3	353.9/185.2	200	-55	-17
	353.9/185.2				-27
氟苯尼考	356.0/336.0	356.0/336.0	200	-55	-14
	356.0/185.0				-27
氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)	326.0/157.0	326.0/157.0	200	-55	-26
氟苯尼考胺	248.3/230.2	248.3/130.2	200	45	18
	248.3/130.2				33

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 在相同试验条件下, 样品中待检测物质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 $\pm 2.5\%$ 之内; 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 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

以 % 表示

相对离子丰度 K	$K > 50$	$20\% < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.3.2 定量测定

氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考测定以内标法定量: 在仪器最佳工作条件下, 对基质标准工作溶液 (4.15) 进样, 以标准溶液中被测组分峰面积和氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)峰面积的比值为纵坐标, 标准溶液中被测组分浓度与氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)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。

氟苯尼考胺测定以外标法定量: 在仪器最佳工作条件下, 对基质标准工作溶液 (4.16) 进样, 以标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标, 标准溶液中被测组分浓度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。

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)和氟苯尼考胺标准物质的多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 A 中的图 A.1~图 A.3。

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

7.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

除不称取样品外, 均按上述步骤进行。

8 结果计算

氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定结果按式(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)。

计算结果应扣除空白值。

氟苯尼考胺残留量的测定结果按式(2)计算：

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- X——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——从基质标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——样品溶液所代表最终试样的质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

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。

9.2 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r,被测物的添加浓度范围及重复性方程见表 3。

表 3 添加浓度范围及重复性和再现性方程

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	样品基质	重复性限 r	再现性限 R
氯霉素	0.100~1.00	河豚鱼	lgr=1.13 lgm+0.691	lgR=1.07 lgm+0.677
		鳗鱼	lgr=0.979 lgm+0.762	lgR=1.00 lgm+0.762
		烤鳗	lgr=1.11 lgm+0.635	lgR=1.01 lgm+0.632
甲砒霉素	1.00~10.0	河豚鱼	lgr=0.753 lgm-0.033 1	lgR=1.08 lgm-0.062 2
		鳗鱼	lgr=0.99 lgm-0.170	lgR=0.996 lgm-0.150
		烤鳗	lgr=0.883 lgm-0.096 9	lgR=1.04 lgm-0.111

表 3 (续)

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	样品基质	重复性限 r	再现性限 R
氟苯尼考	1.00~10.0	河豚鱼	$\lg r = 0.985 \lg m - 0.146$	$\lg R = 0.997 \lg m - 0.127$
		鳗鱼	$\lg r = 0.956 \lg m - 0.159$	$\lg R = 0.981 \lg m - 0.130$
		烤鳗	$\lg r = 0.973 \lg m - 0.115$	$\lg R = 1.01 \lg m - 0.148$
氟苯尼考胺	1.00~8.00	河豚鱼	$\lg r = 1.09 \lg m - 0.179$	$\lg R = 0.974 \lg m - 0.143$
		鳗鱼	$\lg r = 1.12 \lg m - 0.190$	$\lg R = 0.983 \lg m - 0.170$
		烤鳗	$\lg r = 1.17 \lg m - 0.200$	$\lg R = 0.969 \lg m - 0.177$
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 r , 应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性试验条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R , 被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)

标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准物质的多反应监测色谱图见图 A.1, 氘代氯霉素的多反应监测色谱图见图 A.2, 氟苯尼考胺标准物质的多反应监测色谱图见图 A.3。

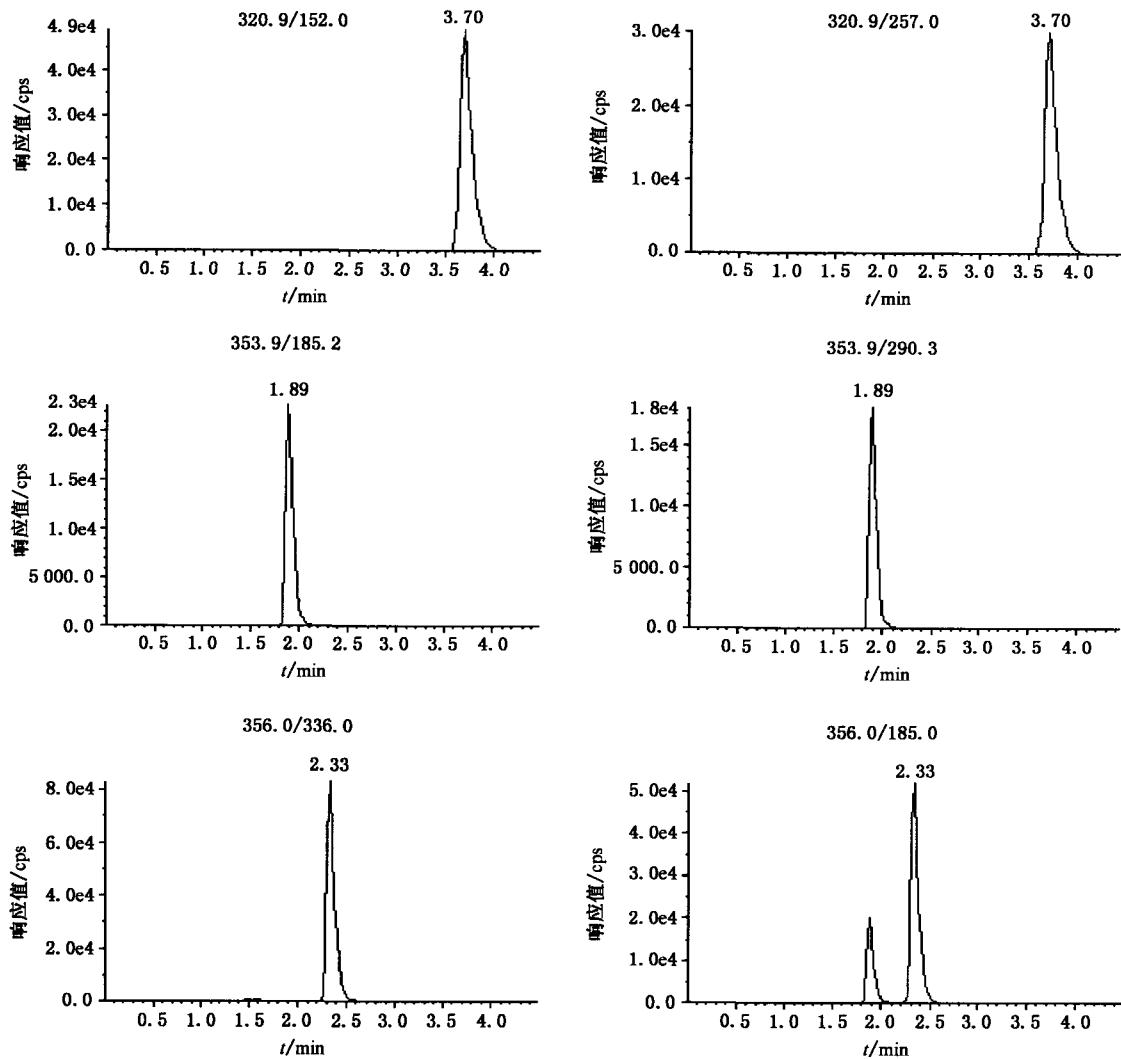


图 A.1 氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

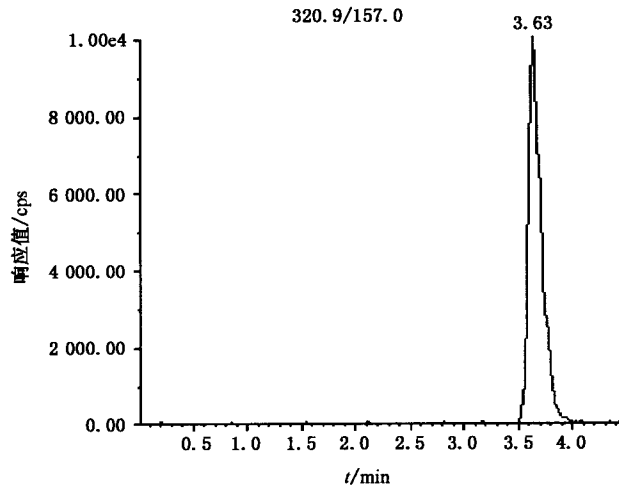


图 A.2 氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

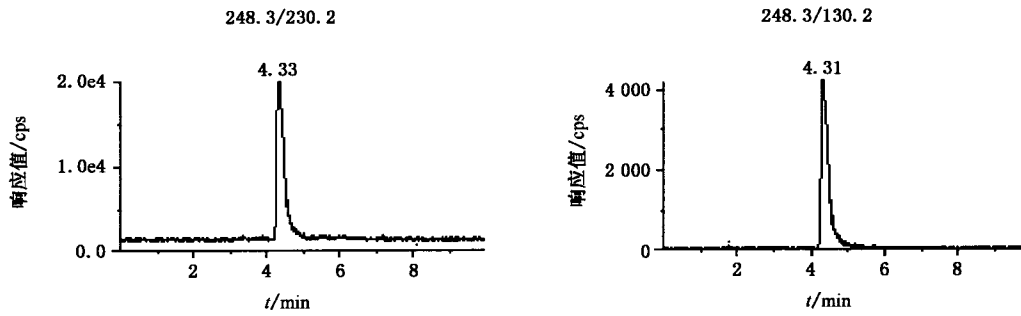


图 A.3 氟苯尼考胺标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附录 B
(资料性附录)
回收率

氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的添加浓度及平均回收率的试验数据见表 B.1。

表 B.1 氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的添加浓度及平均回收率的试验数据

样品基质	化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
鳗鱼	氯霉素	0.100	92.0
		0.200	96.2
		0.500	99.0
		1.00	92.0
	甲矾霉素	1.00	102
		2.00	92.6
		4.00	96.4
		10.0	94.3
	氟苯尼考	1.00	95.0
		2.00	95.2
		4.00	98.0
		10.0	98.0
	氟苯尼考胺	1.00	97.7
		2.00	95.7
		4.00	95.4
		8.00	102
河豚鱼	氯霉素	0.100	93.2
		0.200	96.7
		0.500	95.6
		1.00	95.1
	甲矾霉素	1.00	91.6
		2.00	91.3
		4.00	88.9
		10.0	88.2
	氟苯尼考	1.00	92.6
		2.00	102
		4.00	92.5
		10.0	89.4
	氟苯尼考胺	1.00	96.1
		2.00	91.3
		4.00	94.4
		8.00	93.5

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/%
烤鳗	氟霉素	0.100	96.7
		0.200	97.9
		0.500	97.6
		1.00	95.9
	甲砒霉素	1.00	85.7
		2.00	91.2
		4.00	92.1
		10.0	87.8
	氟苯尼考	1.00	97.0
		2.00	97.1
		4.00	95.9
		10.0	91.8
	氟苯尼考胺	1.00	93.7
		2.00	93.4
		4.00	95.7
		8.00	96.3