



中华人民共和国国家标准

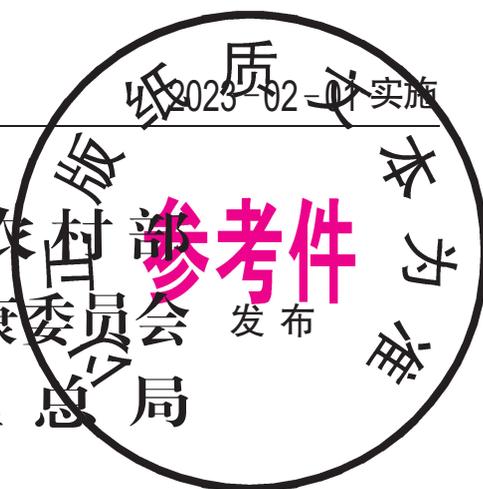
GB 31658.20—2022

食品安全国家标准 动物性食品中酰胺醇类药物及其代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of amphenicols and metabolite residues in animal
derived food 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

动物性食品中酰胺醇类药物及其代谢物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中酰胺醇类药物及其代谢物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪组织,以及鸡蛋、牛奶、羊奶中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的测定。

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

试样中残留的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺用2%氯化乙酸乙酯溶液提取,正己烷脱脂,氯化乙酸乙酯反萃取,液相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.3 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

5.1.4 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)。

5.1.5 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

5.1.6 氯化钠(NaCl)。

5.1.7 甲酸铵(HCOONH_4)。

5.1.8 正己烷(C_6H_{14})。

5.2 溶液配制

5.2.1 2%氯化乙酸乙酯溶液:取氨水20 mL,用乙酸乙酯稀释至1 000 mL。

5.2.2 4%氯化钠溶液:取氯化钠4 g,用水溶解并稀释至100 mL。

5.2.3 4%氯化钠饱和的正己烷:取4%氯化钠溶液适量,加入过量的正己烷,混合,静置分层,取上层正己烷。

5.2.4 20%甲醇溶液:取甲醇20 mL,用水稀释至100 mL。

5.2.5 10 mmol/L 甲酸铵溶液:取甲酸铵 0.63 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3 标准品

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺,含量均 $\geq 99\%$,氯霉素-D₅、甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃内标,含量均 $\geq 98\%$,具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺标准品各适量(相当于各活性成分约 10 mg),精密称定,分别加甲醇适量使溶解并稀释定容至 100 mL 容量瓶中,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 12 个月。

5.4.2 内标储备液:取氯霉素-D₅、甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃内标各适量(相当于各活性成分约 1 mg),精密称定,分别加甲醇适量使溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶中,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 12 个月。

5.4.3 混合标准中间液:分别精密量取氯霉素标准储备液 0.1 mL,甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺标准储备液各 0.5 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成氯霉素浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 3 个月。

5.4.4 混合内标中间液:分别精密量取氯霉素-D₅内标储备液 0.1 mL,甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃内标储备液各 0.5 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成氯霉素-D₅浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合内标中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 3 个月。

5.4.5 混合内标工作液:取混合内标中间液,用 20%甲醇溶液稀释成氯霉素-D₅浓度为 10 ng/mL,甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃浓度为 50 ng/mL 混合内标工作液,现配现用。

5.5 材料

尼龙微孔滤膜:0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪,带电喷雾离子源(ESI)。

6.2 天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 均质机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 多管涡旋振荡器。

6.6 高速冷冻离心机:转速可达 8 000 r/min。

6.7 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.1.2 奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶或羊奶,混合均匀。

a) 取混合均匀后的供试样品,作为供试试样;

b) 取混合均匀后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.1.3 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋,去壳,并均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,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

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g(准确至±0.05 g),置于 50 mL 离心管中,加混合内标工作液 100 μL,涡旋混匀,再加 2%氯化乙酸乙酯溶液 10 mL(牛奶、羊奶样品需另加无水硫酸钠 3 g),涡旋 30 s,涡旋振荡 10 min,8 000 r/min离心 5 min。上清液转入另一 50 mL 离心管中,残渣中加 2%氯化乙酸乙酯溶液 10 mL,重复提取一次。合并两次提取液,于 50℃氮气吹干,待净化。

8.2 净化

取待净化残渣,加 4%氯化钠溶液 3 mL,涡旋使溶解,再加 4%氯化钠饱和的正己烷 5 mL,涡旋 30 s,8 000 r/min离心 5 min,弃去上层正己烷层,用 4%氯化钠饱和的正己烷重复脱脂一次。加 2%氯化乙酸乙酯溶液 5 mL,涡旋振荡 5 min,8 000 r/min离心 5 min,取上层有机相。用 2%氯化乙酸乙酯溶液 5 mL 重复萃取一次,合并有机相,50℃氮气吹干,加 20%甲醇溶液 1.0 mL,涡旋 30 s,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取混合标准中间液和混合内标工作液适量,用 20%甲醇溶液稀释,配制成氯霉素浓度分别为 0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L,甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺浓度分别为 1 μg/L、2.5 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L,氯霉素-D₅浓度均为 1 μg/L,甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃浓度均为 5 μg/L 的系列标准溶液,临用现配,供液相色谱-串联质谱仪测定。以定量离子峰面积比为纵坐标、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 液相色谱参考条件

a) 色谱柱:C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),或相当者;

b) 柱温:30℃;

c) 进样量:5 μL;

d) 流速:0.3 mL/min;

e) 流动相:A 为 10 mmol/L 甲酸铵溶液;B 为乙腈;梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间, min | 10 mmol/L 甲酸铵溶液, % | 乙腈, % |
|---------|--------------------|-------|
| 0 | 98 | 2 |
| 0.5 | 98 | 2 |
| 3.5 | 40 | 60 |
| 4 | 98 | 2 |
| 5 | 98 | 2 |

8.4.2 质谱参考条件

a) 离子源:电喷雾离子源;

b) 扫描方式:正离子扫描/负离子扫描;

- c) 检测方式:多反应离子监测(MRM);
- d) 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体;
- e) 喷雾电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度;
- f) 待测物离子源、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表2。

表2 待测物离子源、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值

| 药物 | 离子源 | 定性离子对 <i>m/z</i> | 定量离子对 <i>m/z</i> | 锥孔电压 V | 碰撞能量 eV |
|----------------------|------|---------------------|---------------------|-----------|------------|
| 氯霉素 | ESI- | 321.1>151.9 | 321.1>151.9 | 48 | 18 |
| | | 321.1>257.0 | | | 10 |
| 甲砜霉素 | ESI- | 354.1>185.0 | 354.1>185.0 | 48 | 20 |
| | | 354.1>290.0 | | | 12 |
| 氟苯尼考 | ESI- | 356.1>185.0 | 356.1>336.0 | 50 | 18 |
| | | 356.1>336.0 | | | 8 |
| 氟苯尼考胺 | ESI+ | 248.2>130.3 | 248.2>230.1 | 26 | 20 |
| | | 248.2>230.1 | | | 10 |
| 氯霉素-D ₅ | ESI- | 326.1>156.9 | 326.1>156.9 | 46 | 18 |
| 甲砜霉素-D ₅ | ESI- | 357.2>293.0 | 357.2>293.0 | 48 | 10 |
| 氟苯尼考-D ₅ | ESI- | 359.2>339.0 | 359.2>339.0 | 22 | 6 |
| 氟苯尼考胺-D ₅ | ESI+ | 251.2>233.1 | 251.2>233.1 | 18 | 12 |

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中酰胺醇类药物及其代谢物的保留时间与标准工作液中酰胺醇类药物及其代谢物的保留时间相对偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。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允许偏差

单位为百分号

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

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按内标法以色谱峰面积比定量。标准溶液及试样溶液中酰胺醇类药物及其代谢物与其相应内标峰面积比均应在仪器检测的线性范围内。对于残留量超出仪器线性范围的,在提取时根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量,使试样溶液稀释后酰胺醇类药物及其代谢物的浓度在曲线范围之内,对应内标浓度与标准工作液一致。标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行测定。

9 结果计算和表述

试样中酰胺醇类药物及其代谢物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中酰胺醇类药物及其代谢物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);

- C_{is} —— 试样溶液中酰胺醇类药物及其代谢物内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 C_s —— 标准溶液中酰胺醇类药物及其代谢物浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 C'_{is} —— 标准溶液中酰胺醇类药物及其代谢物内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 A_i —— 试样溶液中酰胺醇类药物及其代谢物的峰面积;
 A_{is} —— 试样溶液中酰胺醇类药物及其代谢物内标的峰面积;
 A_s —— 标准溶液中酰胺醇类药物及其代谢物的峰面积;
 A'_{is} —— 标准溶液中酰胺醇类药物及其代谢物内标的峰面积;
 V —— 溶解残渣的 20% 甲醇溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
 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

本方法氯霉素的检测限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $0.2 \mu\text{g/kg}$;甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺的检测限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $1 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法氯霉素在 $0.2 \mu\text{g/kg} \sim 1 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平,甲砒霉素在 $1 \mu\text{g/kg} \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平,氟苯尼考、氟苯尼考胺在 $1 \mu\text{g/kg} \sim 6\,000 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率均为 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

酰胺醇类药物及其代谢物标准品和内标物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

酰胺醇类药物及其代谢物标准品和内标物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 酰胺醇类药物及其代谢物标准品和内标物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

| 中文通用名称 | 英文通用名称 | 化学分子式 | CAS 号 |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 氯霉素 | Chloramphenicol | $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ | 56-75-7 |
| 甲砒霉素 | Thiamphenicol | $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$ | 15318-45-3 |
| 氟苯尼考 | Florfenicol | $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ | 73231-34-2 |
| 氟苯尼考胺 | Florfenicol amine | $C_{10}H_{14}FNO_3S$ | 76639-93-5 |
| 氯霉素-D ₅ 内标 | Chloramphenicol-D ₅ | $C_{11}H_7D_5Cl_2N_2O_5$ | 202480-68-0 |
| 甲砒霉素-D ₃ 内标 | Thiamphenicol-D ₃ | $C_{12}H_{12}D_3Cl_2NO_5S$ | 1217723-41-5 |
| 氟苯尼考-D ₃ 内标 | Florfenicol-D ₃ | $C_{12}H_{11}D_3Cl_2FNO_4S$ | 2213400-85-0 |
| 氟苯尼考胺-D ₃ 内标 | Florfenicol-D ₃ Amine | $C_{10}H_{11}D_3FNO_3S$ | — |

附录 B

(资料性)

酰胺醇类药物及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图

酰胺醇类药物及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。

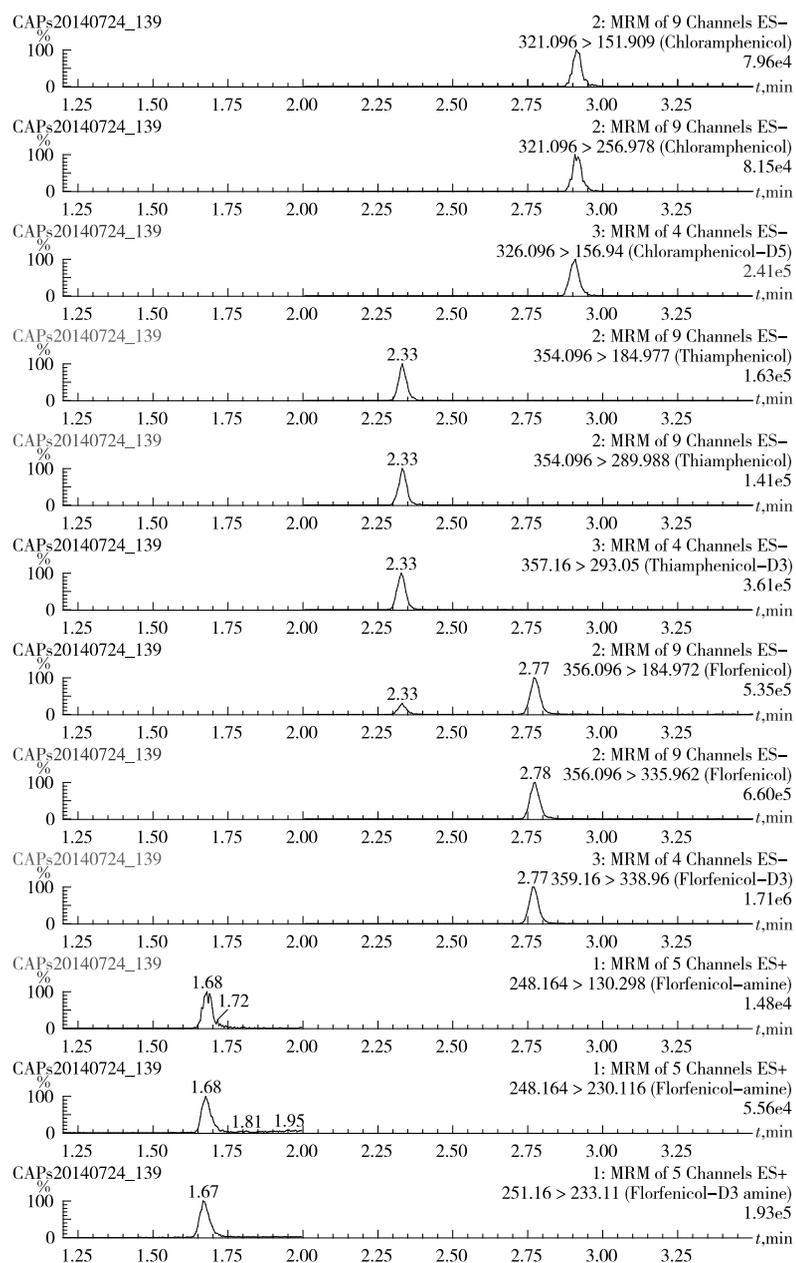


图 B.1 酰胺醇类药物及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图
(氯霉素 0.4 μg/L, 氯霉素-D₅ 1 μg/L, 甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺 2 μg/L,
甲砒霉素-D₃、氟苯尼考-D₃、氟苯尼考胺-D₃ 5 μg/L)