



中华人民共和国国家标准

GB 29688—2013

食品安全国家标准 牛奶中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

食品安全国家标准

牛奶中氯霉素残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中氯霉素残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶中氯霉素残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中残留的氯霉素,用乙酸乙酯提取,正己烷除脂, C_{18} 柱净化,液相色谱-串联质谱测定,内标法定量。

4 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。

- 4.1 氯霉素标准品:含量 $\geq 97\%$ 。
- 4.2 内标物:氘代氯霉素标准品:含量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (作为内标物标准贮备液)。
- 4.3 甲醇:色谱纯。
- 4.4 乙腈:色谱纯。
- 4.5 乙酸乙酯。
- 4.6 氯化钠。
- 4.7 正己烷。
- 4.8 C_{18} 固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。
- 4.9 4%氯化钠溶液:取氯化钠 4 g,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.10 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素标准贮备液:精密称取氯霉素标准品 10 mg,于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素标准贮备液。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 1 年。
- 4.11 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 氯霉素标准工作溶液:精密量取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素标准贮备液 100 μL ,于 100 mL 量瓶中,用 50%乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准工作液。 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。
- 4.12 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 氘代氯霉素标准工作溶液:精密量取氘代氯霉素标准品 20 μL ,于 1 000 mL 量瓶中,用 50%乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的氘代氯霉素标准工作液。 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效

期 3 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平: 感量 0.000 01 g。
- 5.3 天平: 感量 0.01 g。
- 5.4 旋涡振荡器。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 组织匀浆机。
- 5.7 冷冻离心机。
- 5.8 旋转蒸发器。
- 5.9 离心管: 50 mL。
- 5.10 鸡心瓶: 50 mL。
- 5.11 固相萃取装置。
- 5.12 氮吹仪。
- 5.13 滤膜: 0.22 μm 。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶, 混合, 并使均质。

——取均质后的供试样品, 作为供试试料。

——取均质后的空白样品, 作为空白试料。

——取均质后的空白样品, 添加适宜浓度的标准工作液, 作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料 10 g \pm 0.05 g, 于 50 mL 离心管中, 加氘代氯霉素内标工作液 250 μL , 再加乙酸乙酯 20 mL, 振荡 15 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 取乙酸乙酯层液于鸡心瓶中。再加乙酸乙酯 20 mL 重复提取一次, 合并两次提取液于鸡心瓶中, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至干。用 4% 氯化钠溶液 5 mL 溶解残留物, 加正己烷 5 mL 振荡混合 1 min, 静置分层, 弃正己烷液。再加正己烷 5 mL, 重复提取一次。取下层液备用。

7.2 净化

C_{18} 柱依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化, 取备用液过柱, 控制流速 1 滴/(3 s~4 s), 用水 5 mL 淋洗, 抽干, 用甲醇 5 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干。用 50% 乙腈 1.0 mL 溶解残余物, 涡旋混匀, 滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 标准曲线的制备

精密量取 100 $\mu\text{g/L}$ 氯霉素标准工作溶液和 20 $\mu\text{g/L}$ 氘代氯霉素内标工作溶液适量,用流动相稀释,配制成氯霉素浓度为 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/L}$,氘代氯霉素浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液,供液相色谱-串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,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。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- 7.4.1.1 色谱柱: C_{18} (150 mm \times 2.1 mm, 粒径 5 μm), 或相当者。
 7.4.1.2 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。
 7.4.1.3 流速: 0.2 mL/min。
 7.4.1.4 进样量: 20 μL 。
 7.4.1.5 运行时间: 8 min。
 7.4.1.6 流动相: 乙腈+水(50+50, 体积比)。

7.4.2 质谱条件

- 7.4.2.1 电离模式: ESI。
 7.4.2.2 扫描方式: 负离子扫描。
 7.4.2.3 检测方式: 多反应检测。
 7.4.2.4 电离电压: 2.8 kV。
 7.4.2.5 源温: 120 $^{\circ}\text{C}$ 。
 7.4.2.6 雾化温度: 350 $^{\circ}\text{C}$ 。
 7.4.2.7 锥孔气流速: 50 L/h。
 7.4.2.8 雾化气流速: 450 L/h。
 7.4.2.9 数据采集窗口: 8 min。
 7.4.2.10 驻留时间: 0.3 s。
 7.4.2.11 定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞电压: 见表 1。

表 1 氯霉素定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞电压

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞电压 V
氯霉素(CAP)	321/151.6	321/151.6	30	15
	321/256.8			13
氘代氯霉素 (D_5 -CAP)	325.8/156.6	325.8/156.6	30	15

7.4.3 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按内标法以峰面积比计算。对照溶液及试样溶液中氯霉素和氘代氯霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与标准溶液的离子相对丰度比符合表 2 的要求。标准溶液和空白组织添加试样溶液的总离子流和选择离子

流程图见附录 A。

表 2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 %	允许偏差 %
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

7.5 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

计算 $A_{321/151.6}/A_{325.8/156.6}$ 峰面积比值,标准曲线校准。

由标准曲线方程:

$$A_s/A'_{is} = a \times c_s/c'_{is} + b \quad \dots\dots\dots(1)$$

求得 a 和 b , 则

$$c = \frac{c'_{is}}{a} \left(\frac{A}{A_{is}} - b \right) \quad \dots\dots\dots(2)$$

试料中氯霉素残留量按式(3)计算:

$$X = \frac{c \times V}{m} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- A_s ——对照溶液中氯霉素的峰面积;
- A'_{is} ——对照溶液中内标氘代氯霉素的峰面积;
- c_s ——对照溶液中内标氘代氯霉素的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c'_{is} ——对照溶液中氯霉素的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c ——供试溶液中氯霉素的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A ——试样中氯霉素的峰面积;
- A_{is} ——试样中内标氘代氯霉素的峰面积;
- X ——供试试料中氯霉素的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- V ——溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);
- m ——供试试料质量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法检测限为 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $0.02 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 50%~120%。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 17\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
色谱图

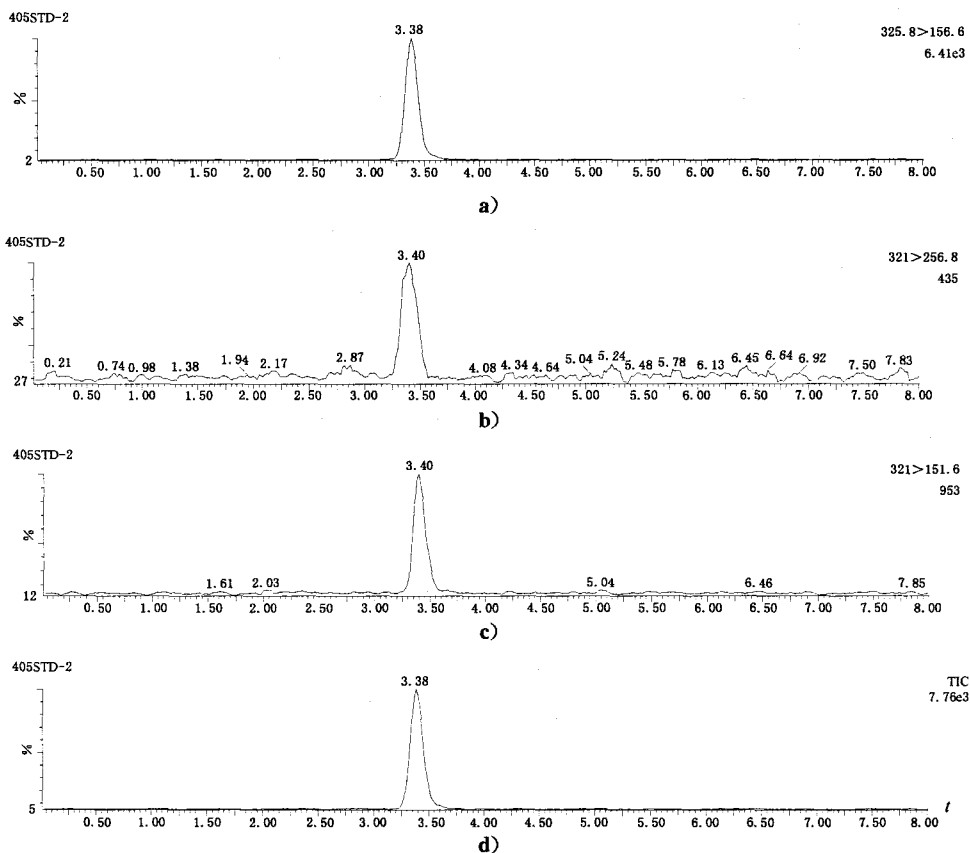


图 A.1 氯霉素标准溶液总离子和特征离子质量色谱图(0.25 µg/L)

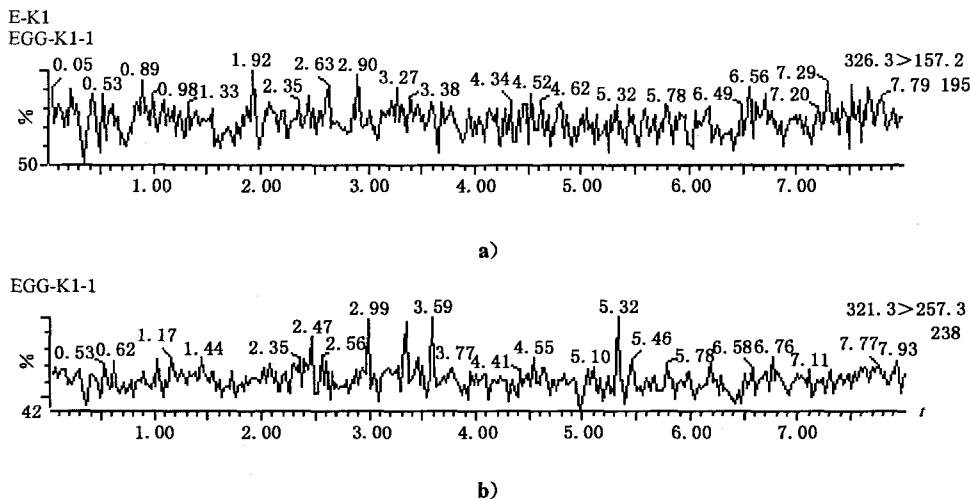


图 A.2 牛奶空白试样特征离子质量色谱图

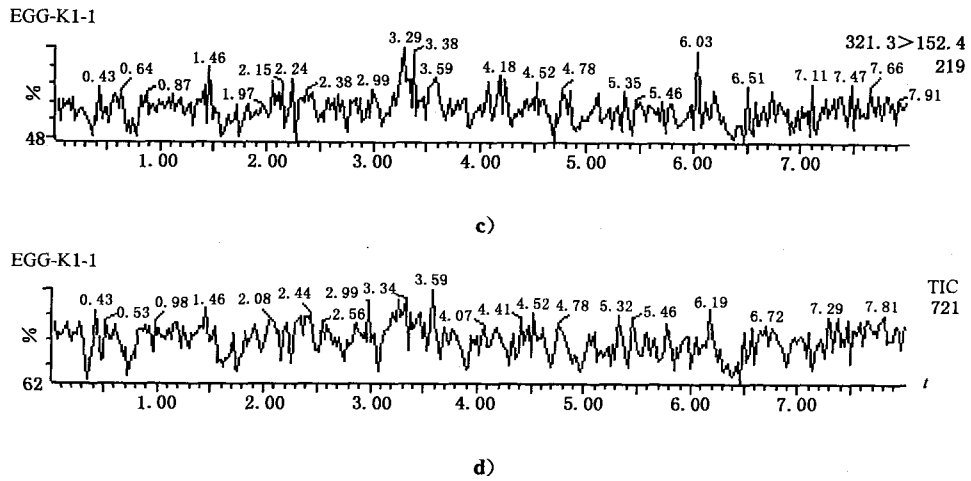


图 A.2 (续)

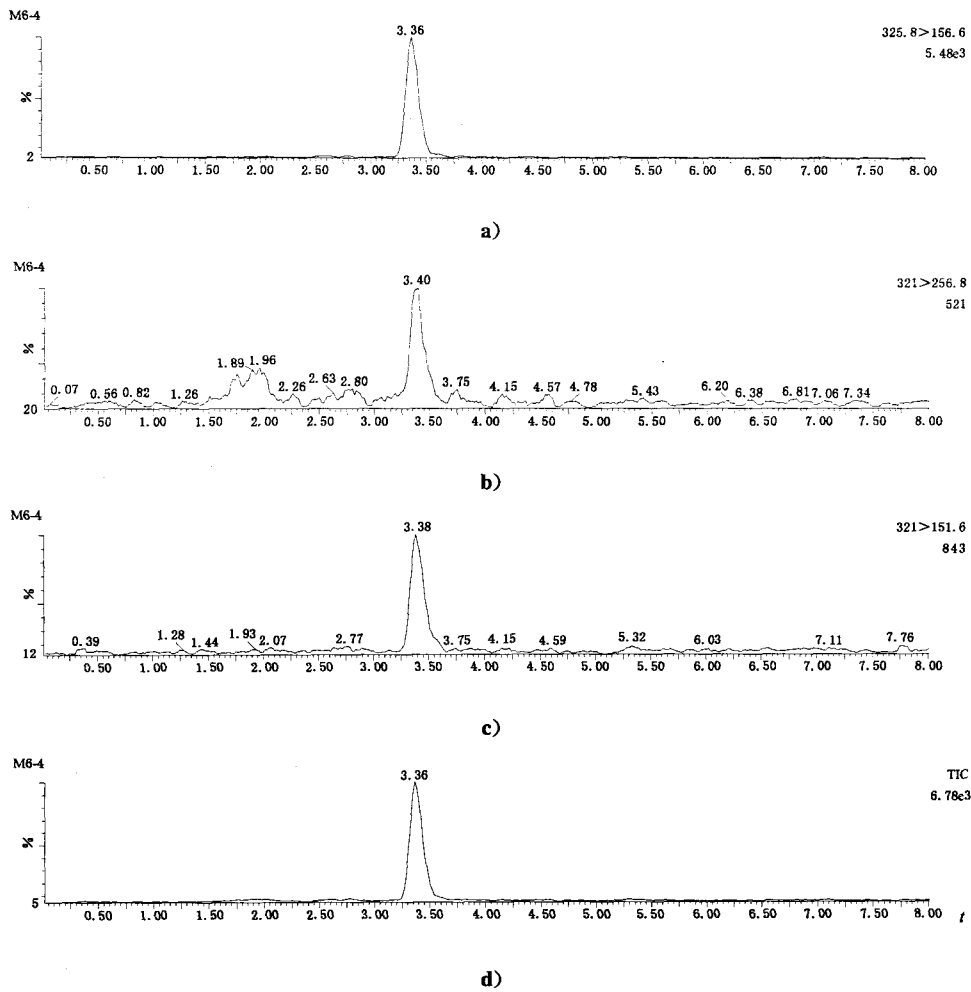


图 A.3 牛奶空白添加氯霉素试样总离子和特征离子质量色谱图(0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$)