



中华人民共和国国家标准

GB 31658.5—2021

食品安全国家标准 动物性食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留 量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of florfenicol and florfenicol amine residues in animal
derived food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method

2021-09-16 发布

2022-02-01 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 发布

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

动物性食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡、猪、牛、羊的肌肉、皮+脂肪、肝脏和肾脏组织中氟苯尼考及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

试料中残留的氟苯尼考与氟苯尼考胺,用碱化的乙酸乙酯提取,正己烷除脂,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

5 试剂与材料

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 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.4 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)。

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

5.1.6 乙酸(CH_3COOH)。

5.2 溶液配制

5.2.1 5%乙酸水溶液:取乙酸 5 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.2 10%氨甲醇溶液:取氨水 5 mL,用甲醇溶解并稀释至 50 mL,现用现配。

5.2.3 30%乙腈水溶液:取乙腈 30 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.4 乙酸乙酯-氨水溶液:取乙酸乙酯 98 mL,加氨水 2 mL,混匀。

5.3 标准品

5.3.1 氟苯尼考(Florfenicol, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{FNO}_4\text{S}$, CAS 号:73231-34-2):含量 $\geq 99.0\%$ 。

5.3.2 氟苯尼考胺(Florfenicol amine, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FNO}_3\text{S}$, CAS 号:76639-93-5):含量 $\geq 97.6\%$ 。

5.3.3 氘代氯霉素(Chloramaphenicol D₅, d₅-CAP, CAS 号:202480-68-0):含量为 100 ng/mL。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 氟苯尼考、氟苯尼考胺标准储备液:取氟苯尼考、氟苯尼考胺标准品各 25 mg,精密称定,加乙腈适量使溶解并稀释定容至 25 mL 容量瓶,分别制成氟苯尼考和氟苯尼考胺标准储备液。-18℃以下保存,有效期 6 个月。

5.4.2 10 μg/mL 混合标准工作液:分别精密量取氟苯尼考、氟苯尼考胺标准储备液各 1 mL,于 100 mL 容量瓶,用乙腈稀释至刻度,制成浓度为 10 μg/mL 混合标准工作液。2℃~8℃保存,有效期 1 个月。

5.4.3 1 μg/mL 混合标准工作液:精密量取 10 μg/mL 混合标准工作液 1 mL,于 10 mL 容量瓶,用乙腈稀释至刻度,制成浓度为 1 μg/mL 混合标准工作液。2℃~8℃保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

MCX 固相萃取柱 60 mg/3 mL,或相当者。

6 仪器和设备

6.1 超高效液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 高速离心机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 水平振荡器。

6.6 均质机。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

6.9 滤膜:有机相,0.22 μm。

6.10 鸡心瓶:100 mL。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质的空白样品,作为空白试料;

c) 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 试料的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料 2 g(准确到±0.02 g),于 50 mL 离心管中,加氘代氯霉素内标溶液 100 μL,涡动混匀,静置 15 min。加乙酸乙酯-氨水溶液 10 mL,涡动 1 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 100 mL 鸡心瓶中,残渣重复提取 2 次,合并 3 次提取液。鸡心瓶中加 5%乙酸 2 mL,振摇混匀,于 40℃水浴中浓缩至 1.5 mL。转至另一 50 mL 离心管中,用 5%乙酸 2 mL 洗涤鸡心瓶,洗涤液转至同一离心管,加正己烷 5 mL 脱脂,涡动 1 min,3 000 r/min 离心 5 min,弃上层,下层提取液重复脱脂一次,备用。

8.2 净化

MCX 固相萃取柱依次用甲醇 2 mL 和水 2 mL 活化。备用液过柱,用 5%乙酸 2 mL 淋洗,用 10%氨

甲醇 5 mL 洗脱。收集洗脱液,于 40 °C 氮气吹干。用 30% 乙腈水溶液 500 μ L 溶解残余物,滤膜过滤,供超高效液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取 1 μ g/mL 混合标准工作液 5 μ L、25 μ L 和 50 μ L,10 μ g/mL 混合标准工作液 10 μ L、25 μ L 和 50 μ L,依次加入 6 份经提取和净化处理的空白试料浓缩液中,同时分别加入 100 ng/mL 氘代氯霉素内标溶液 100 μ L,加 30% 乙腈水溶液溶解并稀释至 0.5 mL,配制成浓度为 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL 的基质匹配系列标准溶液,滤过,供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 色谱条件

- 色谱柱: C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m), 或相当者;
- 流动相: A: 水溶液, B: 乙腈溶液;
- 梯度洗脱: 梯度洗脱条件见表 1;

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	A %	B %
0	0.25	95	5
0.5	0.25	95	5
2.0	0.25	0	100
2.5	0.25	0	100
3.5	0.25	95	5

- 流速: 0.25 mL/min;
- 柱温: 30 °C;
- 进样量: 10 μ L。

8.4.2 质谱条件

- 离子源: 电喷雾离子源;
- 扫描方式: 正离子扫描(氟苯尼考胺)和负离子扫描(氟苯尼考和氘代氯霉素);
- 检测方式: 多反应监测;
- 电离电压: 2.8 kV;
- 源温: 80 °C;
- 雾化温度: 300 °C;
- 锥孔气流速: 30 L/h;
- 雾化气流速: 600 L/h;
- 测试药物定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 氟苯尼考、氟苯尼考胺和 d_5 -CAP 的定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
氟苯尼考	356>185	356>336	25	20
	356>336			15
氟苯尼考胺	248>130	248>230	15	15
	248>230			10
d_5 -CAP	326>157	326>157	35	15

8.4.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液,作单点或多点校准,按内标法以色谱峰面积定量。试样溶液和基质匹配标准溶液中氟苯尼考和氟苯尼考胺的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的相对离子丰度与基质匹配标准溶液中的相对离子丰度相比,符合表 3 的要求。标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

8.5 空白试验

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按公式(1)计算。

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

式中:

- X —— 试样中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 标准溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- C_{is} —— 试样溶液中相应氘代氯霉素内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- C'_{is} —— 标准溶液中相应氘代氯霉素内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- A —— 试样溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的峰面积;
- A_{is} —— 试样溶液中相应氘代氯霉素内标的峰面积;
- A_s —— 标准溶液中相应氟苯尼考和氟苯尼考胺的峰面积;
- A'_{is} —— 标准溶液中相应氘代氯霉素内标的峰面积;
- V —— 试样定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 供试试料质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 3 μg/kg,定量限为 10 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 10 μg/kg~300 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%,批间相对标准偏差≤20%。

附 录 A
(资料性)

氟苯尼考、氟苯尼考胺和氘代氯霉素的英文名称、分子式、CAS 号

氟苯尼考、氟苯尼考胺和氘代氯霉素的英文名称、分子式、CAS 号见表 A.1。

表 A.1 氟苯尼考、氟苯尼考胺和氘代氯霉素的英文名称、分子式、CAS 号

化合物	英文名称	分子式	CAS 号
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
氘代氯霉素	Chloramaphenicol D ₅	d ₅ -CAP	202480-68-0

附录 B

(资料性)

标准溶液特征离子质量色谱图

氟苯尼考和氟苯尼考胺标准溶液特征离子质量色谱图见图 B. 1。

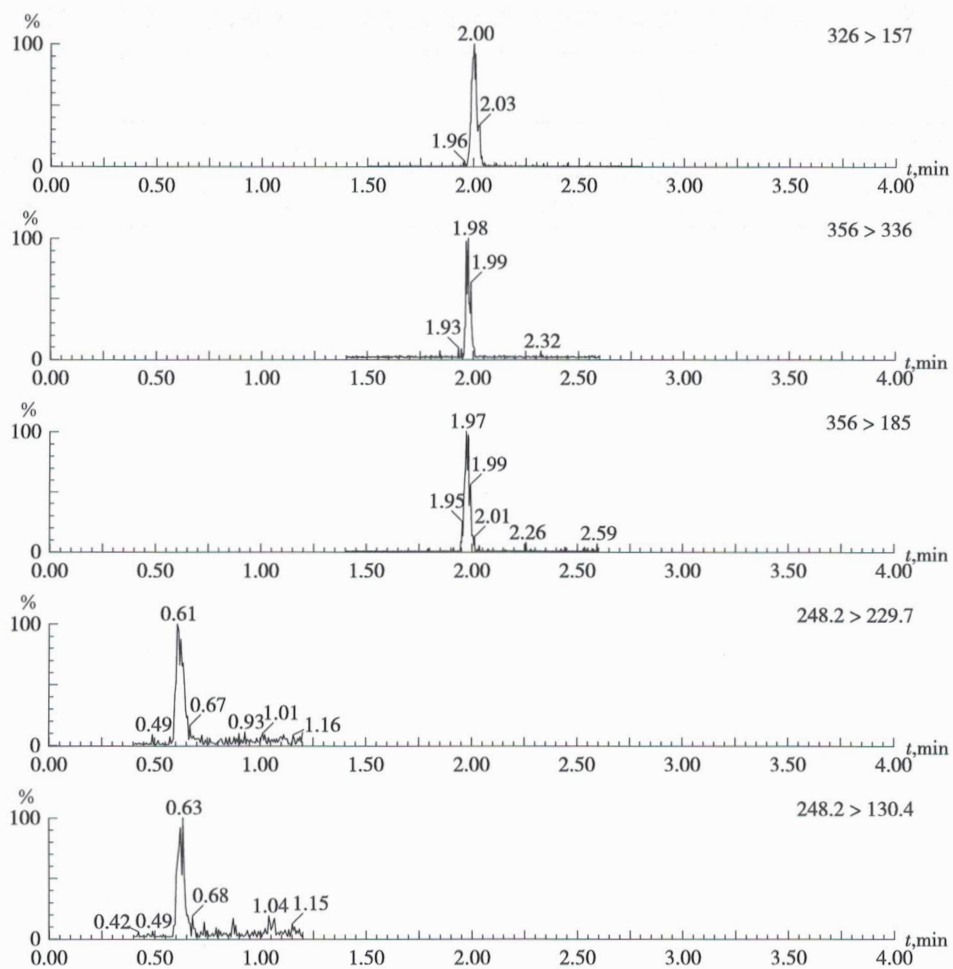


图 B. 1 氟苯尼考和氟苯尼考胺标准溶液特征离子质量色谱图(10 ng/mL)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食 品 安 全 国 家 标 准
动 物 性 食 品 中 氟 苯 尼 考 及 氟 苯 尼 考 胺 残 留 量 的 测 定
液 相 色 谱 - 串 联 质 谱 法

GB 31658.5—2021

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北 京 印 刷 一 厂 印 刷
新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 销

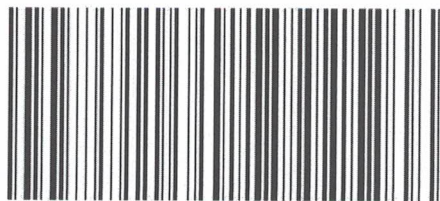
* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 0.75 字 数 15 千 字

2022 年 1 月 第 1 版 2022 年 1 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109·8756

定 价: 24.00 元



GB 31658.5—2021

版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话: (010) 59194261