



中华人民共和国国家标准

GB/T 18932.19—2003

蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of chloramphenicol residues in honey—
LC-MS-MS method

2003-12-26 发布

2004-06-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

GB/T 18932 的本部分是修改采用加拿大标准 ACC-062-V1.0《蜂蜜中氯霉素残留量测定——液相色谱质谱法》，修改的主要内容是：

- 净化柱由 C_{18} 固相萃取柱改为 Oasis HLB 固相萃取柱；
- 淋洗液由乙腈+水(3+7)改为乙酸乙酯；
- 单四极杆质谱检测器改为串联四极杆质谱检测器；
- 内标法改为外标法。

本部分的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本部分由中华全国供销合作总社归口。

本部分起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：庞国芳、曹彦忠、张进杰、贾光群、范春林、李学民、刘永明、石玉秋。

本部分系首次发布的国家标准。

蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法

液相色谱-串联质谱法

1 范围

GB/T 18932 的本部分规定了蜂蜜中氯霉素残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本部分适用于蜂蜜中氯霉素残留量的测定。

本部分的方法检出限:氯霉素为 $0.10 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18932 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 6379 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准测试方法的重复性和再现性(GB/T 6379—1986, neq ISO 5725:1981)

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

试样用乙酸乙酯提取,提取液浓缩后再用水溶解,Oasis HLB 固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 乙酸乙酯:色谱纯。

4.5 乙腈+水(1+7):量取 20 mL 乙腈(4.3)与 140 mL 水混合。

4.6 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:60 mg, 3 mL。使用前分别用 3 mL 甲醇和 5 mL 水预处理,保持柱体湿润。

4.7 氯霉素标准物质:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.8 氯霉素标准储备溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的氯霉素标准物质(4.7),用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备液。储备液贮存在 4°C 冰箱中,可使用两个月。

4.9 氯霉素标准工作溶液:用空白样品提取液分别配成氯霉素浓度为 0.5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL 标准工作溶液,标准工作溶液在 4°C 保存,可使用一周。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01g 各一台。

5.3 自动浓缩仪或相当者。

- 5.4 氮气吹干仪。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 液体混匀器。
- 5.7 固相萃取装置。
- 5.8 贮液器:50 mL。
- 5.9 真空泵:真空度应达到 80 kPa。
- 5.10 离心机。
- 5.11 刻度离心管:10 mL,精度为 0.1 mL。
- 5.12 移液器:10 mL。
- 5.13 离心管:50 mL,具塞。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,在密闭情况下,置于不超过 60℃的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,冷却至室温。分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样,精确到 0.01 g。置于 50 mL 具塞离心管中,加入 5 mL 水,于液体混匀器上快速混合 1 min,使试样完全溶解。准确加入 15 mL 乙酸乙酯,在振荡器上振荡 10 min,以 3 000 r/min 离心 10 min,准确吸取上层乙酸乙酯 12 mL 转入自动浓缩仪的蒸发管中,用自动浓缩仪在 55℃减压蒸干,加入 5 mL 水溶解残渣,待净化。

7.2 净化

将提取液(7.1)倒入下接 Oasis HLB 柱(4.6)的贮液器中,溶液以小于等于 3 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 固相萃取柱,待溶液完全流出后,用 2×5 mL 水洗蒸发管和贮液管并过柱,然后再用 5 mL 乙腈+水(4.5)洗柱,弃去全部淋出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 10 min,最后用 5 mL 乙酸乙酯(4.4)洗脱,收集洗脱液于 10 mL 刻度离心管(5.11)中,于 50℃用氮气吹干仪吹干,用乙腈+水(20+80)定容至 0.8 mL,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Pinnacle II C₁₈, 5 μm, 150 mm×2.1 mm(i.d)或相当者;
- b) 流动相:乙腈+水(20+80);
- c) 流速:0.2 mL/min;
- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:40 μL。

7.3.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:负离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 电喷雾电压:−4 500 V;

- e) 雾化气压力:0.069 MPa;
- f) 气帘气压力:0.069 MPa;
- g) 辅助气流速:6 L/min;
- h) 离子源温度:450℃;
- i) 去簇电压:—55 V;
- j) 定性离子对、定量离子对和碰撞气能量:

定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞气能量/V
321/176	321/152	—21
321/152		—23
321/194		—20

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

氯霉素标准工作溶液(4.9)在液相色谱-串联质谱设定条件下分别进样,以峰面积为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制七点标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中氯霉素的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,氯霉素参考保留时间为 12.31 min。氯霉素标准物质总离子流图和质谱图参见附录 A 中的图 A.1、图 A.2。

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 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品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

本部分的精密度数据是按照 GB/T 6379 的规定确定的,其重复性和再现性的值是以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,蜂蜜中氯霉素的含量在 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r),本部分的重复性限按方程式(2)计算:

$$\lg r = 0.972 \lg m - 1.007 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

m ——两次测定值的平均值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

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,蜂蜜中氯霉素的含量在 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 4.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 (R),本部分再现性限按方程式(3)计算:

$$\lg R = 1.032 \lg m - 0.7979 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

m ——两次测定值的平均值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

附录 A
(资料性附录)
标准物质质谱图

A.1 氯霉素标准物质总离子流图,见图 A.1。

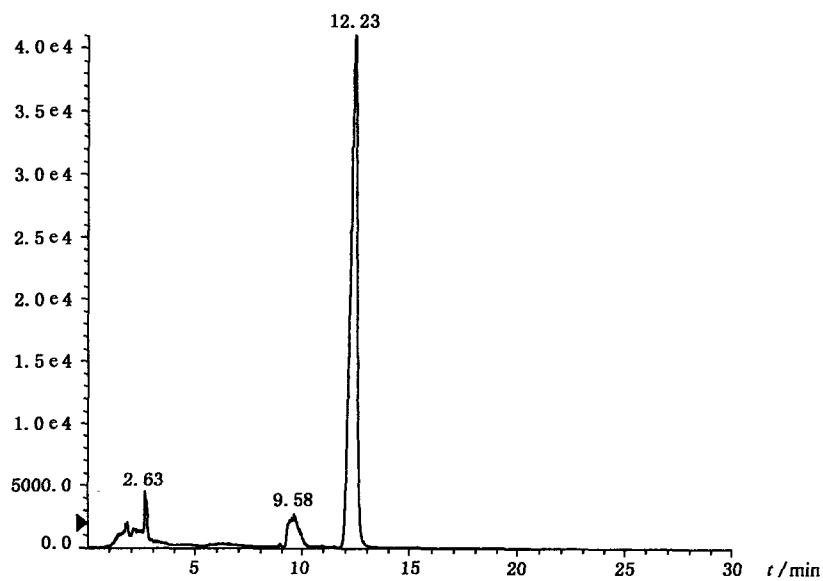


图 A.1

A.2 氯霉素标准物质质谱图,见图 A.2。

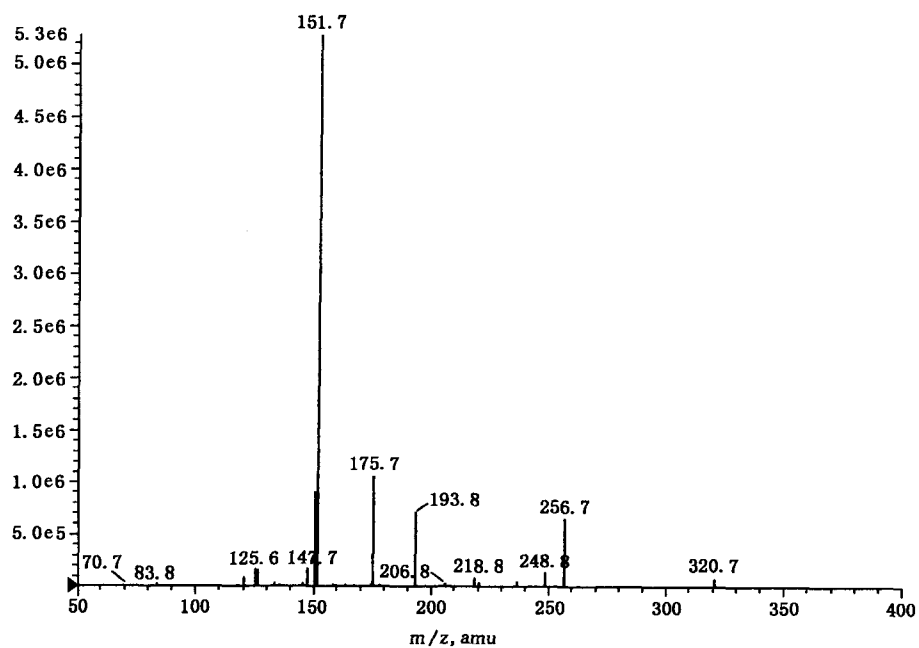


图 A.2

附 录 B
(资料性附录)

回收率

蜂蜜中氯霉素添加浓度及平均回收率的试验数据:

在添加量为 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 103.3%;

在添加量为 $0.3\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 98.2%;

在添加量为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 96.4%;

在添加量为 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 97.2%。
