



中华人民共和国国家标准

GB xxxx.x—20xx

食品安全国家标准  
禽蛋中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺  
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard

Determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine  
residues in poultry eggs by liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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  
国家市场监督管理总局

发布

## 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。

征求意见稿

# 食品安全国家标准

## 禽蛋中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的测定

### 液相色谱-串联质谱法

#### 1 范围

本文件规定了禽蛋中甲砒霉素、氟苯尼考和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。

本文件适用于鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋和鸽蛋中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的测定，其他禽蛋可参照执行。

#### 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

试样中残留的甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺用碱性乙酸乙酯-乙腈溶液提取，正己烷脱脂，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

#### 5 试剂和材料

除非另有说明，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 ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )：色谱纯。
- 5.1.2 乙酸乙酯 ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )。
- 5.1.3 浓氨水 ( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
- 5.1.4 正己烷 ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )。
- 5.1.5 乙酸铵 ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )：色谱纯。

##### 5.2 溶液配制

- 5.2.1 乙腈饱和的正己烷：取正己烷 200 mL 于 250 mL 分液漏斗中，加入适量乙腈后，剧烈振摇，静置 5 min，待分配平衡后，弃去乙腈层即得。
- 5.2.2 30%乙腈溶液：取乙腈 30 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.3 10%乙腈溶液：取乙腈 10 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.4 乙酸乙酯：乙腈：氨水溶液 (49：49：2, V/V)：取乙酸乙酯 49 mL、乙腈 49 mL，加浓氨水 2 mL，混匀。
- 5.2.5 2 mmol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 0.154 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。
- 5.2.6 2 mmol/L 乙酸铵乙腈溶液：取乙酸铵 0.154 g，用乙腈溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

### 5.3 标准品

甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺，含量均 $\geq 99\%$ ，甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>、氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>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：取甲砒霉素、氟苯尼考和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，甲砒霉素和氟苯尼考用乙腈溶解，氟苯尼考胺用5 mL水溶解，均用乙腈稀释分别定容至100 mL棕色容量瓶中，配制成浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，有效期12个月。

5.4.2 内标储备液：取甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>和氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>标准品各适量（相当于各活性成分约1 mg），精密称定，分别加甲醇适量溶解并稀释定容至10 mL棕色容量瓶中，配制成浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，有效期12个月。

5.4.3 混合标准工作液：分别精密量取甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺标准储备液各 0.5 mL，于 10 mL棕色容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$ 甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺混合标准工作液。-18  $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，有效期3个月。

5.4.4 混合内标工作液：分别精密量取 100  $\mu\text{g/mL}$ 甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>、氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>内标储备液各20  $\mu\text{L}$ ，于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为200 ng/mL甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>、氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>混合内标工作液。-18  $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，有效期1个月。

### 5.5 材料

5.5.1 尼龙微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ 。

## 6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

6.2 电子天平：感量0.000 01 g和0.01 g。

6.3 高速冷冻离心机：转速可达12 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 超声波振荡器。

6.6 组织匀浆机或均质机。

6.7 氮吹仪。

## 7 试样的制备与保存

### 7.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，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  $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

取试样（ $5 \pm 0.05$ ）g，置于 50 mL离心管中，加入 200 ng/mL混合内标工作液 50  $\mu\text{L}$ ，涡旋混匀。加入 30%乙腈溶液 1 mL，涡旋振荡 1 min，沿管壁缓慢加入乙酸乙酯：乙腈：氨水溶液（49：49：2，V/V）10 mL，涡旋振荡混匀 1 min，再用超声提取 15 min，8 000 r/min

离心 10 min，上清液转入另一 50 mL 离心管中，残渣重复提取一次，合并两次上清液，50 ℃ 下氮气吹至近干，待净化。

8.2 净化

向上述待净化样品的离心管中，加入乙腈 2 mL 溶解残余物，涡旋振荡混匀 1 min，加入乙腈饱和的正己烷 10 mL，涡旋振荡 1 min，脱脂，8 000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，下层溶液重复脱脂一次，50 ℃ 下氮气吹干。用 10%乙腈溶液 2 mL 溶解残余物，涡旋振荡 1 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液过 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

精密量取混合标准工作液和混合内标工作液适量，用 10%乙腈溶液稀释，配制成甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺浓度分别为 1.25 μg/L、2.5 μg/L、5.0 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L，甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>、氟苯尼考胺-D<sub>3</sub> 浓度均为 5 μg/L 的系列标准溶液，现配现用，供液相色谱-串联质谱仪测定。以甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺与其相应内标的定量离子峰面积比为纵坐标，对应的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。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)，或相当者；
- b) 柱温：40 ℃；
- c) 进样量：10 μL；
- d) 流速：0.3 mL/min；
- e) 流动相：A：2 mmol/L乙酸铵溶液；B：2 mmol/L乙酸铵乙腈溶液，梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	90	10
0.5	90	10
3.5	10	90
4	10	90
4.1	90	10
5	90	10

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) 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
甲砒霉素	ESI-	354.1 > 185.0	354.1 > 185.0	95	24
		354.1 > 290.1			18
氟苯尼考	ESI-	356.1 > 185.0	356.1 > 336.0	95	27
		356.1 > 336.0			12

氟苯尼考胺	ESI+	248.2 > 130.2	248.2 > 230.0	69	18
		248.2 > 230.0			31
甲砒霉素-D <sub>3</sub>	ESI-	357.2 > 185.0	357.2 > 185.0	95	31
氟苯尼考-D <sub>3</sub>	ESI-	359.1 > 339.1	359.1 > 339.1	95	15
氟苯尼考胺-D <sub>3</sub>	ESI+	251.2 > 233.1	251.2 > 233.1	69	15

#### 8.4.3 测定法

##### 8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的保留时间与标准工作液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的保留时间相对偏差为±0.1 min,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,其允许偏差为±40%。

##### 8.4.3.2 定量测定

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,以待测物与内标定量离子峰面积比定量。标准溶液及试样溶液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺与其相应内标的定量离子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,使试样溶液稀释后甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的浓度在标准曲线线性范围之内,对应内标浓度与标准工作液一致。在上述色谱-质谱条件下,甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺及内标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,采用完全相同的操作步骤进行平行操作。

### 9 结果计算和表述

试样中待测物的残留量按标准曲线法或公式(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:

$X$  ——试样中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的数值,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

$C_{is}$  ——试样溶液中甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>和氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>内标浓度的数值,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );

$C_s$  ——标准溶液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺浓度的数值,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );

$C'_{is}$  ——标准溶液中甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>和氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>内标浓度的数值,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );

$A_i$  ——试样溶液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺定量离子的峰面积;

$A_{is}$  ——试样溶液中甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>和氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>内标定量离子的峰面积;

$A_s$  ——标准溶液中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺定量离子的峰面积;

$A'_{is}$  ——标准溶液中甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>和氟苯尼考胺-D<sub>3</sub>内标定量离子的峰面积;

$V$  ——溶解残余物的10%乙腈溶液体积的数值,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$m$  ——试样质量的数值,单位为克( $\text{g}$ );

注:计算结果不小于 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的保留3位有效数字, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下保留至小数点后2位。

### 10 方法灵敏度、正确度和精密度

#### 10.1 灵敏度

本方法甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的检出限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 1  $\mu\text{g/kg}$ 。

## 10.2 正确度

本方法甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺在1  $\mu\text{g/kg}$ ~20  $\mu\text{g/kg}$  添加浓度水平上的回收率均为 70%~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 $\leq 20\%$ 。

征求意见稿

附 录 A  
(资料性)

甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺标准品和内标物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺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 甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺标准品和内标物  
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
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
甲砒霉素-D <sub>3</sub>	Thiamphenicol-D <sub>3</sub>	$C_{12}H_{12}D_3Cl_2NO_5S$	1217723-41-5
氟苯尼考-D <sub>3</sub>	Florfenicol-D <sub>3</sub>	$C_{12}H_{11}D_3Cl_2FNO_4S$	2213400-85-0
氟苯尼考胺-D <sub>3</sub>	Florfenicol-D <sub>3</sub> amine	$C_{10}H_{11}D_3FNO_3S$	1217625-88-1

## 附录 B (资料性)

### 甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺及内标标准溶液特征离子质量色谱图

甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺及内标标准溶液特征离子质量色谱图见图 B. 1。

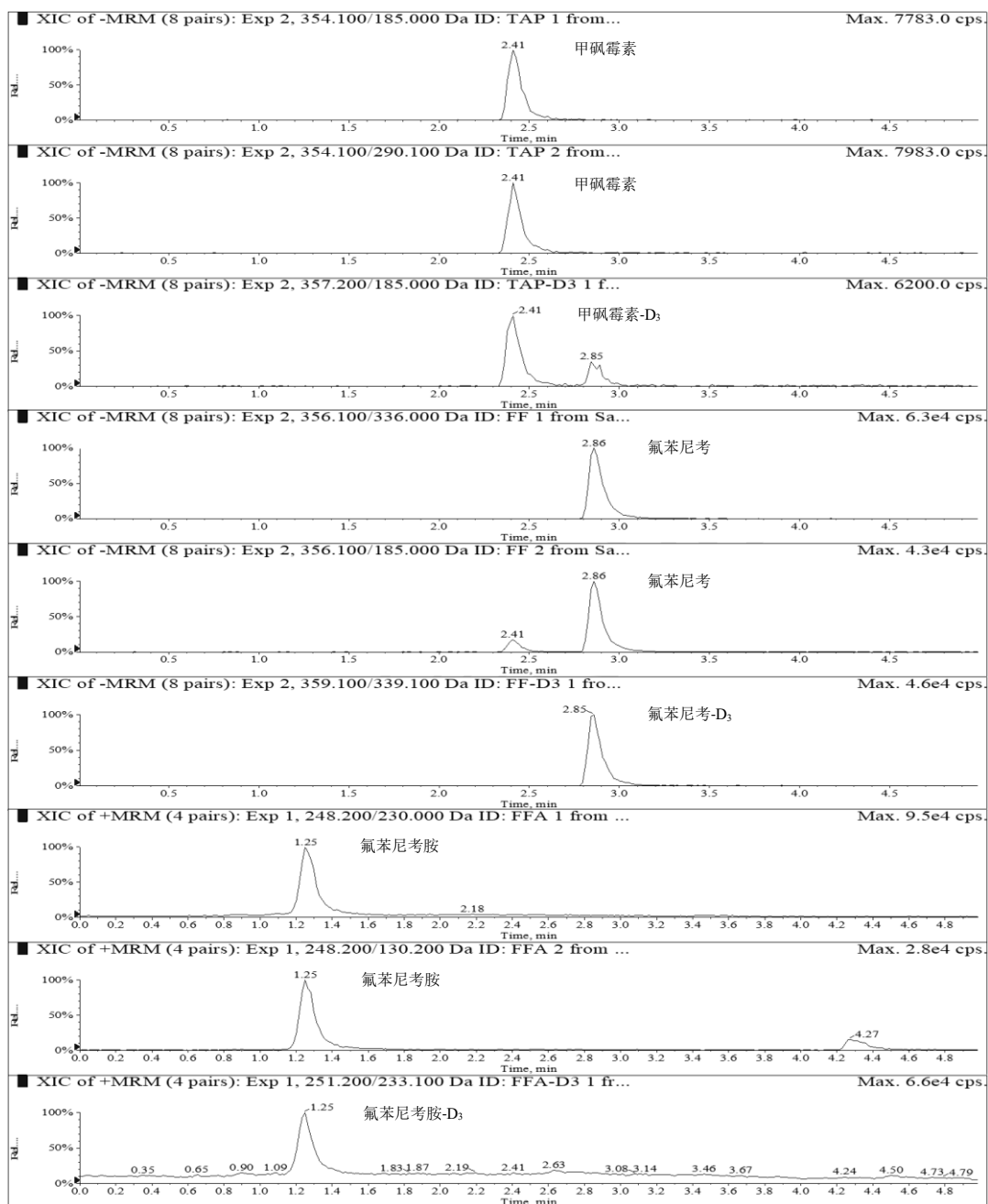


图 B. 1 甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺及内标标准溶液特征离子质量色谱图  
(甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺 2.5  $\mu\text{g/L}$ ,  
甲砒霉素-D<sub>3</sub>、氟苯尼考-D<sub>3</sub>、氟苯尼考胺-D<sub>3</sub> 5  $\mu\text{g/L}$ )