

鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定

Determination of florfenicol residues in eggs

地方标准信息服务平台

2022 - 06 - 29 发布

2022 - 07 - 29 实施

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。

本文件代替DB34/T 1376-2011《鸡蛋中氟苯尼考的残留测定-高效液相色谱法》，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- a) 增加高效液相色谱-串联质谱法（见第5章）；
- b) 更改范围为：本文件规定了鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定方法。本标准适用于鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定；
- c) 删除2规范性引用文件中GB/T 14699.1。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由安徽省兽药饲料监察所提出。

本文件由安徽省农业农村厅归口。

本文件起草单位：安徽省兽药饲料监察所、安徽赛如分析检测科技有限公司、宁国市民鸿农业科技有限公司、桐城市畜牧兽医管理中心、泗县草沟镇畜牧兽医水产站、宣城市宣州区市场监督管理局、合肥市动物疫病预防控制中心、望江县农产品质量安全中心、淮北市畜牧中心、安徽农业大学、安徽省农业科学院畜牧兽医研究所。

本文件起草人：李琿、董尚青、朱明齐、韩素珍、操军、王雨霜、吴昊、许世富、程莹、侯亚飞、郝金华、左爱民、钱志松、刘发全、祁钊、潘孝成、宋亚伟。

——2011年首次发布为DB34/T 1376-2011，2022年第一次修订。

地方标准信息服务平台

鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定

1 范围

本文件规定了鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定方法。

本文件适用于鸡蛋中氟苯尼考残留量的测定。

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 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中残留的氟苯尼考经乙酸乙酯提取，正己烷脱脂，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 氟苯尼考标准品：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙酸乙酯。

4.2.4 正己烷。

4.2.5 氢氧化铵：25%~28%。

4.2.6 无水硫酸钠：经 300℃灼烧 4 小时，置于干燥器中备用。

4.2.7 流动相：甲醇：水（40：60）。

4.2.8 聚丙烯离心管：50 mL，1.5 mL。

4.2.9 比色管：50 mL，具塞。

4.2.10 梨形瓶：25 mL。

4.2.11 滤膜：0.45 μm ，无机相。

4.2.12 氟苯尼考标准储备液（1 mg/mL）：准确称取氟苯尼考标准品 100 mg，用甲醇稀释至 100 mL，摇匀，-18℃保存，有效期 90 天。

4.2.13 氟苯尼考工作液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取（4.2.12）中氟苯尼考标准储备液 1.0 mL，用甲醇稀释配制成 100 mL，摇匀，-4℃保存，有效期 30 天。

4.2.14 氟苯尼考标准溶液：取氟苯尼考工作液（4.2.13）适量，分别用流动相（4.2.7）稀释为 0、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL 的标准溶液，摇匀，4℃ 保存，有效期 7 天。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱仪，配二极管阵列检测器或紫外检测器。

4.3.2 离心机，转速不低于 4000 r/min。

4.3.3 振荡器。

4.3.4 涡旋混合器。

4.3.5 分析天平：感量 0.0001 g，0.01 g。

4.3.6 超声波清洗器。

4.3.7 组织匀浆机。

4.3.8 旋转蒸发仪。

4.4 测定步骤

4.4.1 试样提取

称取均质后的试样 5 g（精确至 0.01 g），置于 50 mL 聚丙烯离心管中，依次加入 30 mL 乙酸乙酯（4.2.3），0.9 mL 氢氧化铵（4.2.5），5 g 无水硫酸钠，振荡提取 30 s，以 4000 r/min 离心 5 min，上清液转移至 50 mL 比色管中，用乙酸乙酯定容至刻度，摇匀后取 10 mL 乙酸乙酯提取液到 25 mL 梨形瓶中，45℃ 水浴中旋转浓缩至干。

4.4.2 试样净化

梨形瓶中的残渣用 3 mL 水溶解，超声 5 min，加入 3 mL 正己烷（4.2.4）涡旋混合 30 s，静置分层，弃掉上层的正己烷，再加 3 mL 正己烷（4.2.4）涡旋混合 30 s，静置分层，移取 1 mL 水相于 1.5 mL 的聚丙烯离心管中，以 8000 r/min 离心 5 min，经 0.45 μm 滤膜过滤，供高效液相色谱仪分析。

4.4.3 色谱测定

色谱柱：C₁₈（4.6×250 mm，5 μm），或相当者。

柱温：40℃。

进样体积：20 μL。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：365 nm。

流动相：甲醇-水（40：60）。

4.4.4 上机测定

取适量试样溶液和相应浓度的标准溶液，作单点或多点校准，以色谱峰面积积分值定量。标准溶液及试样液中氟苯尼考的相应值均在仪器检测的线性范围内，标准溶液高效液相色谱图见附录A中图 A.2。

4.5 结果计算

按照下式计算试样中各种药物的含量：

$$X = \frac{A \times C_S \times V \times 1000}{A_S \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
X —— 试样中各种药物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
A —— 试样溶液对应的色谱峰面积响应值；
A_S —— 标准溶液对应的色谱峰面积响应值；
V —— 定容体积，单位为毫升（mL）；
C_S —— 标准溶液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
m —— 试样质量，单位为克（g）。
平行测定结果用算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4.6 检测方法灵敏度、准确度、精密度

4.6.1 灵敏度

本方法在鸡蛋中的检出限为 20 μg/kg。

4.6.2 准确度

本方法在添加浓度为 80 μg/kg 添加水平的回收率均为 70%~110%。

4.6.3 精密度

本方法的批内变异系数小于等于 10%，批间变异系数小于等于 15%。

5 高效液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样经过80%乙腈水溶液提取，HLB固相萃取柱净化，高效液相色谱串联质谱法测定，外标法定量。

5.2 试剂和材料

除特殊说明外，本方法所用试剂均为分析纯，用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

- 5.2.1 乙腈：色谱纯。
- 5.2.2 甲醇：色谱纯。
- 5.2.3 乙酸铵。
- 5.2.4 5 mmol/L 乙酸铵水溶液：准确称取 0.385 g 乙酸铵，用水定容到 1 L。
- 5.2.5 80%乙腈水溶液：准确量取 800 ml 乙腈（色谱纯），用水定容至 1 L。
- 5.2.6 10%甲醇水溶液：准确量取 100 ml 甲醇（色谱纯），用水定容至 1 L。
- 5.2.7 氟苯尼考标准品：纯度 ≥ 99.0%，CAS 号：73231-34-2。
- 5.2.8 标准溶液制备如下：
 - a) 氟苯尼考标准储备液（400 μg/mL）：精确称取 20 mg 氟苯尼考标准品（精确至 0.01 mg），置于 50 mL 容量瓶中，用乙腈溶解，此溶液浓度为，-18℃ 保存，有效期 6 个月。
 - b) 氟苯尼考标准工作溶液：分别吸取氟苯尼考标准储备液（5.2.8—a）10 μL、50 μL、0.1 mL、0.25 mL、0.5 mL、1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容，标准工作溶液系列浓度分别为 0.4 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL，4℃ 保存，有效期一周。

5.3 仪器和设备

- 5.3.1 高效液相色谱串联质谱仪：配电喷雾离子源（ESI）。
- 5.3.2 分析天平：感量 0.1g、0.1 mg、0.01 mg。
- 5.3.3 离心机： ≥ 10000 r/min。
- 5.3.4 微孔滤膜：0.22 μm 有机滤膜。
- 5.3.5 涡动仪。
- 5.3.6 水平摇床。
- 5.3.7 氮吹仪。
- 5.3.8 固相萃取柱：HLB（60 mg/3 mL）或相当者。

5.4 分析步骤

5.4.1 提取

称取 2.00 g (± 0.1 g) 试样，置于 50 mL 离心管内，加入 8.0 mL 80% 乙腈水溶液（5.2.5），涡旋 1 min 混匀，振荡 10 min，10000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

5.4.2 净化

准确量取 4.0 mL 上清液（5.4.1），置于 HLB 固相萃取柱中，保持每秒一滴，收集全部的流出液。45℃ 水浴氮气吹干，用 1.0 mL 10% 甲醇水溶液（5.2.2）溶解，涡旋混匀，0.22 μm 滤膜过滤，供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

5.4.3 液相色谱参考条件

色谱柱： C_{18} （2.1 mm $\times$ 50 mm，1.8 μm ）或相当者；
流动相：A：5 mmol/L 乙酸铵水溶液，B：乙腈；采用梯度洗脱见表1；
流速：0.3 mL/min；
进样量：5 μL ；
柱温：35℃。

表1 液相色谱梯度洗脱方式

时间 (min)	A (%)	B (%)
0-2	95	5
2.01	95	5
8	5	95
8.01	95	5
10	95	5

氟苯尼考标准工作溶液和试液分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积定量。

5.4.4 质谱参考条件

检测方法：多离子反应监测（MRM），详见表2中母离子、子离子和碰撞能量。
质谱离子源参考条件：
氮气温度（Gas Temp）：260℃；
氮气流速（Gas Flow）：40 L/min；

雾化器压力 (Nebulizer) : 40 psi;
鞘气温度 (Sheath Gas Temp) : 300℃;
鞘气流速 (Sheath Gas Flow) : 17 L/min;
毛细管电压 (Capillary) : 3000 V;
喷嘴电压 (Nozzle Voltage) : 1700 V.

表2 定性、定量离子对及其他参数条件

药物名称	定性、定量离子对	扫描模式	裂解电压 (E/V)	碰撞能量 (E/V)
氟苯尼考	356.1/119*	ESI ⁺	380	23
	356.1/184.9			12

注：其中356.1/119*为定量离子对。

5.4.5 定性

试样中氟苯尼考色谱峰的保留时间与标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在 ±2.5% 之内。氟苯尼考的定性离子色谱峰的信噪比应大于等于 3 (S/N≥3), 氟苯尼考的定量离子色谱峰的信噪比应大于等于 10 (S/N≥10)。每种化合物的质谱定性离子必须出现, 至少应包括一个母离子和两个子离子, 而且同一检测批次, 对同一化合物, 样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比, 其允许偏差不超过表3规定的范围。色谱图参见附录A的图A. 4。

表3 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20 至 50%	>10 至 20%	≤10%
允许相对偏差	±20	±25%	±30%	±50%

各检测目标化合物以保留时间和两对离子 (特征离子对/定量离子对) 所对应的液相色谱串联质谱法色谱峰面积相对丰度进行定性, 要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致 (一致的条件是偏差小于 20%), 同时要求被测试样中目标化合物的两对离子对应液相色谱串联质谱法色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

5.4.6 试样测定

按照5.4.3和5.4.4确立的条件, 测定试液 (5.4.2) 和标准系列溶液 (5.2.8—b)) 中氟苯尼考的离子强度, 外标法定量, 色谱图参见附录A的图A. 5。

色谱参考保留时间: 氟苯尼考 4.34 min。

5.4.7 空白试验

不称取试样, 按5.4.5的步骤做空白实验。应确认不含有干扰被测组分的物质。

5.4.8 标准曲线绘制

将标准系列溶液 (5.2.8—b)) 由低到高浓度进样检测, 以峰面积-浓度作图, 得到标准曲线回归方程。

5.4.9 定量测定

待测样液中被测组分的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围时，则应将液样用空白基质溶液稀释后重新进样分析或减少取样量，重新按照5.4.1进行处理后再进样分析。

6 分析结果的表述

外标法定量，按式（2）计算氟苯尼考的残留量。

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- X —— 试样中氟苯尼考含量，单位为毫克/每千克（mg/kg）；
- C —— 试液色谱峰对应的氟苯尼考浓度，单位为微克/每毫升（μg/mL）；
- m —— 试样质量，单位为克（g）；
- V —— 定容体积，单位为毫升（mL）
- f —— 稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

6.1 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

6.1.1 灵敏度

本方法检出限为 0.2 μg/kg，定量限为 0.5 μg/kg。

6.1.2 准确度

本方法在添加浓度水平上的回收率为 70%~110%。

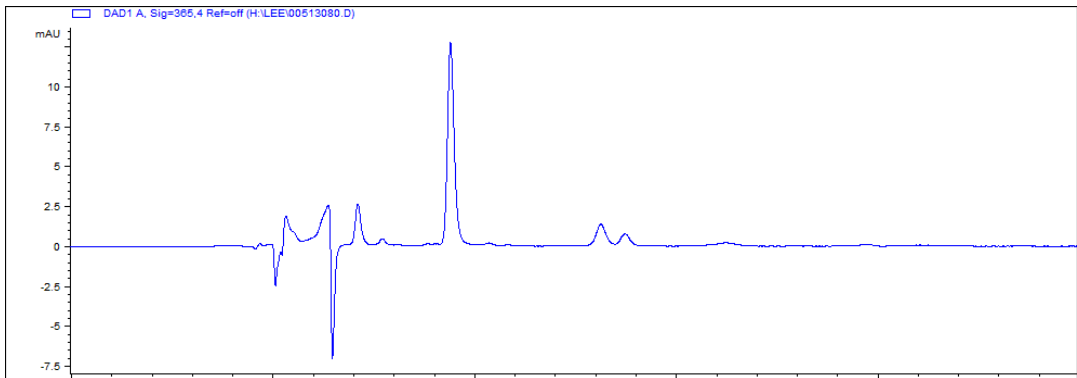
6.1.3 精密度

本方法的批内变异系数小于等于 10%，批间变异系数小于等于 15%。

地方标准信息服务平台

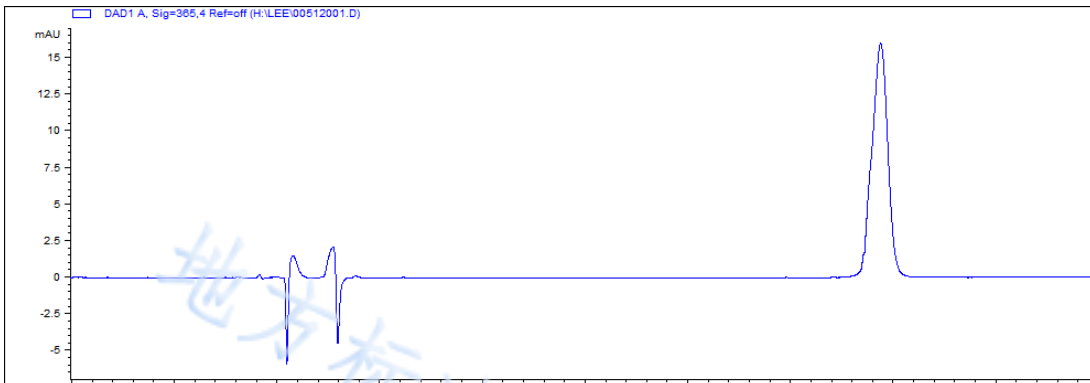
附 录 A
(资料性)
色谱图

A. 1 空白鸡蛋样品溶液色谱图



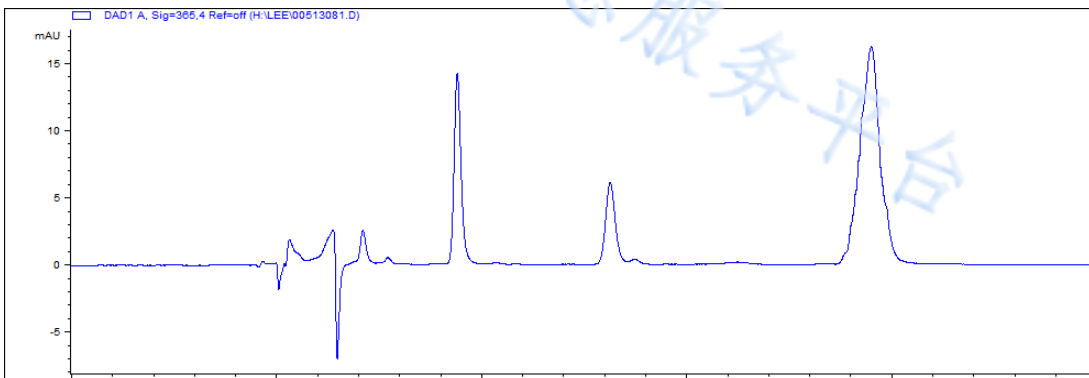
图A. 1 空白鸡蛋样品溶液色谱图

A. 2 标准物质溶液色谱图



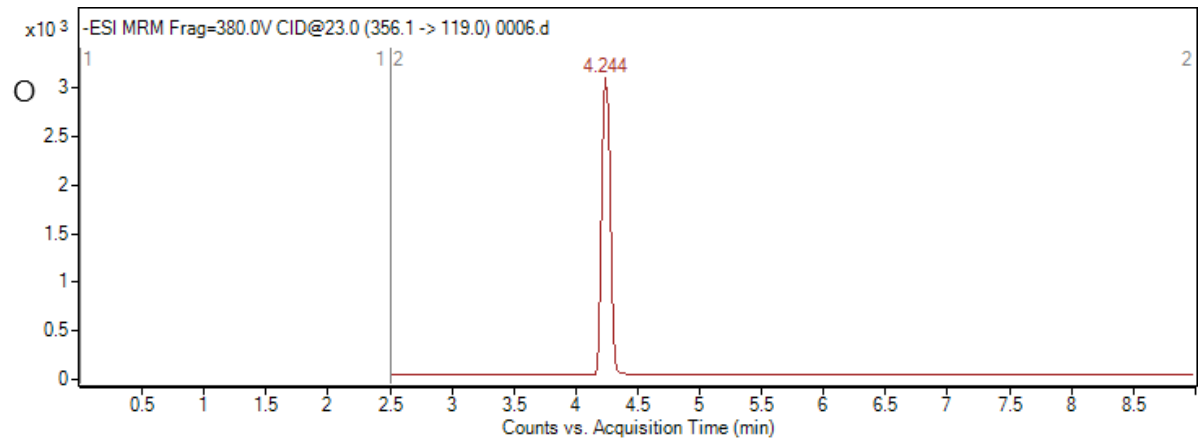
图A. 2 标准物质溶液色谱图

A. 3 空白鸡蛋中添加标准物质溶液色谱图



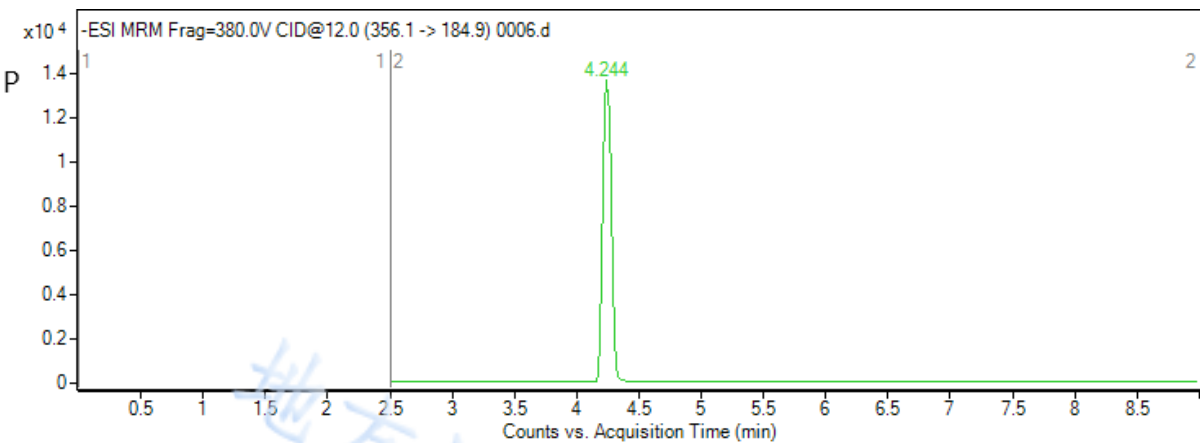
图A. 3 空白鸡蛋中添加标准物质溶液色谱图

A. 4 氟苯尼考定性离子对色谱图



图A. 4 氟苯尼考定性离子对色谱图

A. 5 氟苯尼考定量离子对色谱图



图A. 5 氟苯尼考定量离子对色谱图