

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T XXXXX—XXXX

蜂胶中氯霉素残留量检测方法
——液相色谱串联质谱法

Determination of chloramphenicol residue in propolis by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华全国供销合作总社 发布

前 言

本标准遵循 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的编写规则。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中国蜂产品协会蜂胶专业委员会提出。

本标准由中华全国供销合作总社归口。

本标准起草单位：杭州碧于天保健品有限公司、秦皇岛出入境检验检疫局、中国蜂产品协会蜂胶专业委员会、杭州天厨蜜源保健品有限公司、中国计量大学、岛津企业管理（中国）有限公司。

本标准主要起草人：×××、×××、×××、×××。

蜂胶中氯霉素残留量检测方法——液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了蜂胶中氯霉素残留量的液相色谱串联质谱检测方法。

本标准适用于加工企业收购的蜂胶原料及生产加工过程中得到的蜂胶乙醇提取物中氯霉素残留量的定量测定。

本标准方法的检出限为：0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为：0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 原理

试样经蜂胶碱液溶解，水提取，酸化，过滤，调节 $\text{pH}=10.5\pm 0.2$ ，用乙酸乙酯反提取，用液相色谱串联质谱检测，内标法定量。

3 试剂与材料

除非另有规定，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定要求。

3.1 乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

3.2 4%氢氧化钠 (NaOH): 称取氢氧化钠 4g，加少量水溶解，冷却到常温后用水定容至 100mL，混匀。

3.3 40%氢氧化钠 (NaOH): 称取氢氧化钠 40g 于 500 mL 烧杯中，加 80 mL 水搅拌溶解，冷却到常温后转入 100mL 容量瓶中，用少量水洗涤烧杯，洗涤液转入容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。

3.4 高氯酸 (HClO_4)。

3.5 乙酸乙酯 ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)。

3.6 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。

3.7 甲酸 (HCOOH): 色谱纯或者优级纯。

3.8 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$): 色谱纯或者优级纯。

3.9 正己烷 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$): 色谱纯或者优级纯。

3.10 氯化钠 (NaCl)

3.11 0.1%甲酸含 0.5 mmol/L 乙酸铵溶液:准确称取 0.0385 g(精确至 ± 0.1 mg) 乙酸铵，加入 1 mL 甲酸，用水溶解定容至 1000 mL。

3.12 溶解液: 吸取 3 mL 乙腈和 97mL0.1%甲酸含 5 mmol/L 乙酸铵溶液，混合。

3.13 氯霉素 (简写 CAP, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, CAS 号: 56-75-7) 标准品溶液: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乙腈溶液, -18°C 环境下保存, 有效期为 12 个月。

3.14 氘代氯霉素 (简写 $\text{D}_5\text{-CAP}$, $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{D}_5\text{N}_2\text{O}_5$, CAS 号: 202480-68-0) 溶液: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乙腈溶液, -18°C 环境下保存, 有效期为 12 个月。

3.15 氯霉素中间液 1: 吸取氯霉素标准品溶液, 用乙腈稀释, 配制成浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素中间液 1。-18 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存, 有效期为 6 个月, 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存, 有效期为 3 个月。

3.16 氯霉素中间液 2: 吸取氯霉素 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素中间液 1, 用水稀释, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素中间液 2。现配现用。

3.17 氯霉素中间液 3: 吸取氯霉素 100 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素中间液 2, 用水稀释, 配制成浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素中间液 3。现配现用。

3.18 氯霉素中间液 4: 吸取氯霉素 10 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素中间液 3, 用水稀释, 配制成浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素中间液 4。现配现用。

3.19 氘代氯霉素中间液 1: 吸取氯霉素标准品溶液, 用乙腈稀释, 配制成浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氘代氯霉素中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存, 有效期为 6 个月, 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存, 有效期为 3 个月。

3.20 氘代氯霉素中间液 2: 吸取 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氘代氯霉素中间液 1 适量, 用水稀释至 100 $\mu\text{g/L}$ 。现配现用。

3.21 氘代氯霉素中间液 3: 吸取 100 $\mu\text{g/L}$ 的氘代氯霉素中间液 2 适量, 用水稀释至 50 $\mu\text{g/L}$ 。现配现用。

3.22 含有氘代氯霉素内标物的混合系列标准工作溶液: 吸取氯霉素中间液以及氘代氯霉素中间液, 用溶解液稀释成氯霉素浓度依次为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.3 $\mu\text{g/L}$, 0.5 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 以及氘代氯霉素浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的含有氘代氯霉素内标物的混合系列标准工作溶液, 现配现用。含有氘代氯霉素内标物的混合系列标准工作溶液配制表见表 1。

表 1 含有氘代氯霉素内标物的混合系列标准工作溶液配制表

氯霉素标准溶液配制浓度, $\mu\text{g/L}$	0.1	0.3	0.5	1	5	10
CAP-d5 标准溶液配制浓度, $\mu\text{g/L}$	5	5	5	5	5	5
吸取氯霉素中间液浓度, $\mu\text{g/L}$	1	1	1	10	10	100
吸取氯霉素中间液体积, μL	100	300	500	100	500	100
吸取 CAP-d5 中间液浓度, $\mu\text{g/L}$	50	50	50	50	50	50
吸取 CAP-d5 中间液体积, μL	100	100	100	100	100	100
吸取溶解液体积, μL	800	600	400	800	400	800
总溶液量, μL	1000	1000	1000	1000	1000	1000

4 仪器和设备

4.1 液相色谱串联质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)。

4.2 粉碎机。

4.3 氮吹仪。

4.4 超声波清洗器。

4.5 离心机, 转速 \geq 4000rpm。

4.6 分析天平, 精度 \pm 0.1mg。

4.7 滤膜: 0.22 μm , 有机相型。

5 试样制备与保存

5.1 试样的制备

试样用粉碎机粉碎（蜂胶乙醇提取物含量 $\geq 30\%$ 的样品，需 4°C 环境下保存 2h 后再粉碎）至沙粒状，混匀，将样品密封于塑料袋或者塑料瓶中。

5.2 试样保存

将试样于 4°C 环境下保存。

6 操作步骤

6.1 试样溶液的制备

称取蜂胶试样 2 g（精确至 0.01g），置于 50 mL 塑料离心瓶中，加入 100 $\mu\text{g/L}$ 氘代氯霉素工作溶液 100 μL ，静置 5min 以上，加入 4 mL 乙醇（3.1），拧紧瓶盖常温下超声 20min 至样品中蜂胶完全溶解，加 5 mL 4% NaOH 混合 1min，加入 5 mL 水摇匀稀释，混匀，加入 10 mL 5% HClO_4 酸化，充分摇匀 2min，于离心机上 3000rpm，离心 5min，分层，过滤上层液体，取滤液 12 mL 于 50 mL 离心塑料瓶，加入 10 mL 水，轻轻混匀，在旋转蒸发仪上，40°C 水浴蒸发至 8~12 mL 左右，至无乙醇味，用氢氧化钠溶液（3.2 和 3.3）调节 $\text{pH}=10.5\pm 0.2$ ，加入 12 mL 乙酸乙酯充分混合，约 3min；于离心机上 4000rpm 离心 2min，吸取乙酸乙酯层于 15 mL 塑料离心管中，40°C 下氮气吹干，加入 4 mL 正己烷超声溶解残渣，加 1M 氯化钠溶液 4 mL，充分振荡混合 1min，4000rpm 离心 2min，吸出氯化钠层澄清溶液。

加入 6mL 乙酸乙酯充分混合提取 1min，4000rpm 离心 2min，吸取上层清液于 15ml 塑料离心管中，40°C 下氮气吹干，加入 2 mL 正己烷超声溶解残渣，加入溶解液 1 mL，旋涡混合 1min，用移液枪反复吹吸样液的方式充分混合，4000rpm 离心 2min，吸取下层样液过 0.22 μm 滤膜，试样溶液待上机进样测定。

6.2 参考液相色谱参考条件

分析色谱柱：Inertsil C8-3 2.1mm \times 150mm \times 5 μm ；或性能相当的色谱柱。

梯度洗脱：洗脱程序见表 2。

流动相流速：300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

柱温：30°C。

进样量：20 μL 。

表 2 高效液相色谱法梯度洗脱程序

时间 min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	乙腈 %	0.1%甲酸含 5 mmol/L 乙酸铵溶液 %
0	300	3	97
2	300	3	97

6	300	70	30
6.01	300	97	3
8	300	97	3
8.01	300	3	97
10	300	3	97

6.3 参考质谱条件测定

所列参数是在 LCMS-8045 质谱仪上完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或者型号的仪器

电离模式：电喷雾离子源（ESI）

扫描方式：负离子扫描（Negative）

检测方式：多反应检测（MRM）

毛细管电压：-3000V

离子源温度：300°C

加热模块温度：400°C

DL 温度：250°C

雾化气：氮气，流速 3L/h

干燥气：气流：氮气，流速 10L/h

碰撞气：氩气，碰撞气压 230kPa

定性离子对、定量离子对、Q1 预杆电压、碰撞电压、驻留时间见表 3。

表 3 CAP 和 D₅-CAP 的监测离子对、Q1 预杆电压、碰撞电压、驻留时间

物质名称	监测离子对 (m/z)	Q1 Pre Bias V	碰撞电压 V	驻留时间 (ms)
氯霉素 (CAP)	321/152*	12	15	100
	321/194	14	11	100
	321/257	15	18	100
氘代氯霉素 (D ₅ -CAP)	326/157*	24	22	100

注：*表示定量离子对。

6.4 测定

用含有氘代氯霉素内标物的混合系列标准工作溶液（3.22）、试样溶液（6.1）分别进样，以氯霉素与氘代氯霉素峰面积比值为纵坐标，以标准工作溶液浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量。标准工作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。在上述色谱条件下，氯霉素的参考保留时间为 4.06min。

7 结果计算与表示

7.1 结果计算

试样中氯霉素残留量 (X) 以微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 表示, 按式 (1) 计算:

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

式中:

C_S —标准溶液的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

V —试样溶液最终稀释体积, 单位为毫升 (mL);

D —试样的稀释倍数;

A_S —标准溶液对应的氯霉素峰面积与氘代氯霉素峰面积的比值;

A —试样溶液对应的氯霉素峰面积与氘代氯霉素峰面积的比值;

m —样品质量, 单位为克 (g)。

7.2 结果表示

将符合重复性要求的两个独立测定值的算术平均值作为测定结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), 保留两位有效数字。

8 检测方法灵敏度、准确度、精密度

8.1 灵敏度

本方法检测限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

8.2 准确度

本方法在 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $50\% \sim 120\%$ 。

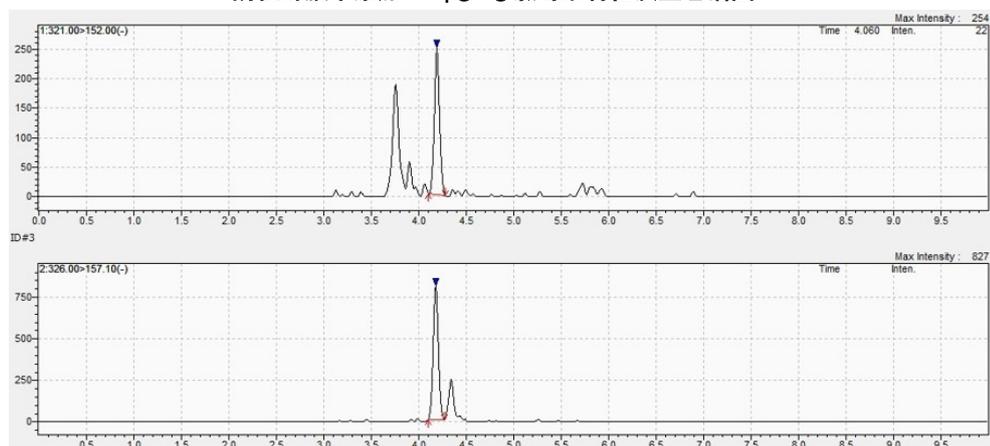
8.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差不得超过 20% 。

附录 A

(资料性附录)

色谱图

阴性蜂胶中添加 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素特征质量色谱图

蜂胶空白试样特征离子质量色谱图

