



中华人民共和国国家标准

GB/T××××—××××

食品安全国家标准

蜂蜜和蜂王浆中酰胺醇类药物残留量测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of amphenicol residues in honey and royal jelly by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××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》的规定起草编制。

征求意见稿

食品安全国家标准

蜂蜜和蜂王浆中酰胺醇类药物残留量的测定

液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂产品中酰胺醇类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中氯霉素，甲砒霉素，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 分析实验室用水规则和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

蜂蜜和蜂王浆中残留的药物分别用水和氨化乙腈提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。
- 5.1.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。
- 5.1.3 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。
- 5.1.4 氨水（NH₄OH）
- 5.1.5 胰蛋白酶（C₆H₁₅O₁₂P₃）：1000-2000 U/mg。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 50%乙腈溶液：取 50mL 乙腈，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.2 2%氨化乙腈溶液：取 2 mL 氨水，用乙腈稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.3 8%氨化甲醇溶液：取 8 mL 氨水，用甲醇稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.4 10%乙腈溶液：取 10 mL 乙腈，用水稀释至 100mL，混匀。

- 5.3 标准品及其纯度：氟苯尼考、甲砒霉素和氯霉素，含量均≥98%，具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 酰胺醇类药物标准储备溶液：依次准确称取适量氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准品，用 50% 乙腈溶液溶解，配制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 酰胺醇类药物混合标准中间溶液：依次吸取 4 种酰胺醇类药物标准储备液 100 μL ，于 10 mL 容量瓶中，用 50% 乙腈溶液定容至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酰胺醇类药物混合标准中间液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 6 个月。

5.4.3 酰胺醇类药物混合标准工作溶液：吸取酰胺醇类药物混合标准中间液 1.0 mL，于 10 mL 容量瓶中，用 50% 乙腈溶液定容至刻度，配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酰胺醇类药物混合标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 混合型强阳离子交换固相萃取柱或相当者：500 mg，6 mL。

5.5.2 尼龙滤膜：0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

6.2 涡动仪。

6.3 高速冷冻离心机：转速 8000 r/min 或以上。

6.4 水浴振荡器。

6.5 氮吹仪。

6.6 分析天平：感量 0.01 mg 和 0.01 g。

6.7 移液器：10 μL 、20 μL 、200 μL 、1000 μL 、5000 μL 。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂产品，将其搅拌均匀。对有结晶的蜂蜜样品，在密闭情况下，置于不超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中解晶，待样品全部融化后搅匀，冷却至室温。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

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

蜂蜜样品于室温下避光保存；蜂王浆样品于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取蜂蜜试料(5±0.05) g于50 mL具塞塑料离心管中,加入20 mL水,振荡1 min,于4 °C下8000 r/min离心10 min,全部液体转移至另一塑料离心管中,备用。

称取蜂王浆试料(2±0.05) g于50 mL具塞塑料离心管中,加入0.25 g胰蛋白酶,2 mL水,振荡1 min,37 °C水浴反应2 h,加入8 mL 2%氯化乙腈,涡旋振荡1 min,于4 °C下8000 r/min离心10 min,全部液体转移至另一塑料离心管中,于40 °C下氮吹至体积不变,吸取到离心管中用水定容至5 mL,备用。

8.2 净化

混合型强阳离子交换固相萃取柱(500 mg, 6 mL)预先用10 mL甲醇和10 mL水活化,备用液全部过固相萃取柱,12 mL水淋洗,7 mL 8%氯化甲醇洗脱,洗脱液于40 °C下氮吹至近干,1.0 mL 10%乙腈溶液复溶,经0.22 μm尼龙滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量,分别加入经提取和净化的蜂蜜或蜂王浆空白试料残渣中,40 °C水浴氮气吹干,加入10%乙腈溶液1.0 mL涡旋溶解残余物,配制成浓度为0.1 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、10.0 μg/L、50.0 μg/L和100 μg/L的基质匹配系列混合标准溶液,微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积的平均值作为纵坐标,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 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱(100 × 2.1 mm, 2.7 μm) 或相当者;
- b) 流动相: A相: 纯水, B相: 乙腈, 洗脱梯度条件见表1;
- c) 流速: 0.4 mL/min;
- d) 柱温: 40 °C;
- e) 进样量: 5 μL。

表1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
2.0	70	30
4.0	25	75
4.1	0	100
7.0	0	100
7.1	90	10
10.0	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: 负离子模式;
- c) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- d) 干燥气温度: 250 °C;
- e) 干燥气流速: 7 L/min;

- f) 雾化器压力：40 psi；
 g) 鞘气温度：370 °C；
 h) 鞘气流速：12 L/min；
 i) 毛细管电压：2500 V (-)；
 选择离子参数设定见表2。

表 2 离子参数设定

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
氟苯尼考	356.0>335.9 (8) 356.0>184.9 (15)	356.0>335.9 (8)
甲砒霉素	353.9>184.9 (15) 353.9>289.9 (10)	353.9>184.9 (15)
氯霉素	321.0>152.0 (15) 321.0>257.0 (10)	321.0>152.0 (15)

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液中酰胺醇类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中对应的保留时间的偏差在±0.1 min 以内，且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质匹配标准溶液中对应的定性离子的相对丰度一致，其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液，作单点校准或多点校准，以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。4种酰胺醇类药物标准溶液的多反应监测色谱图参见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，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

试样中酰胺醇类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算：

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

式中：

X — 试样中相应的酰胺醇类药物残留量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_S — 基质匹配标准溶液中相应的酰胺醇类药物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A_S — 基质匹配标准溶液中相应的酰胺醇类药物峰面积；

A — 试样中相应的酰胺醇类药物峰面积；

V — 溶解残留物溶液体积，单位为毫升(mL)；

m — 试料质量，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

本方法蜂蜜和蜂王浆中氯霉素检测限为 $0.05\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ；甲矾霉素、氟苯尼考检测限为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上，氯霉素回收率范围为85%~110%；甲矾霉素回收率范围为80%~100%；氟苯尼考回收率范围为75%~100%。

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)

酰胺醇类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

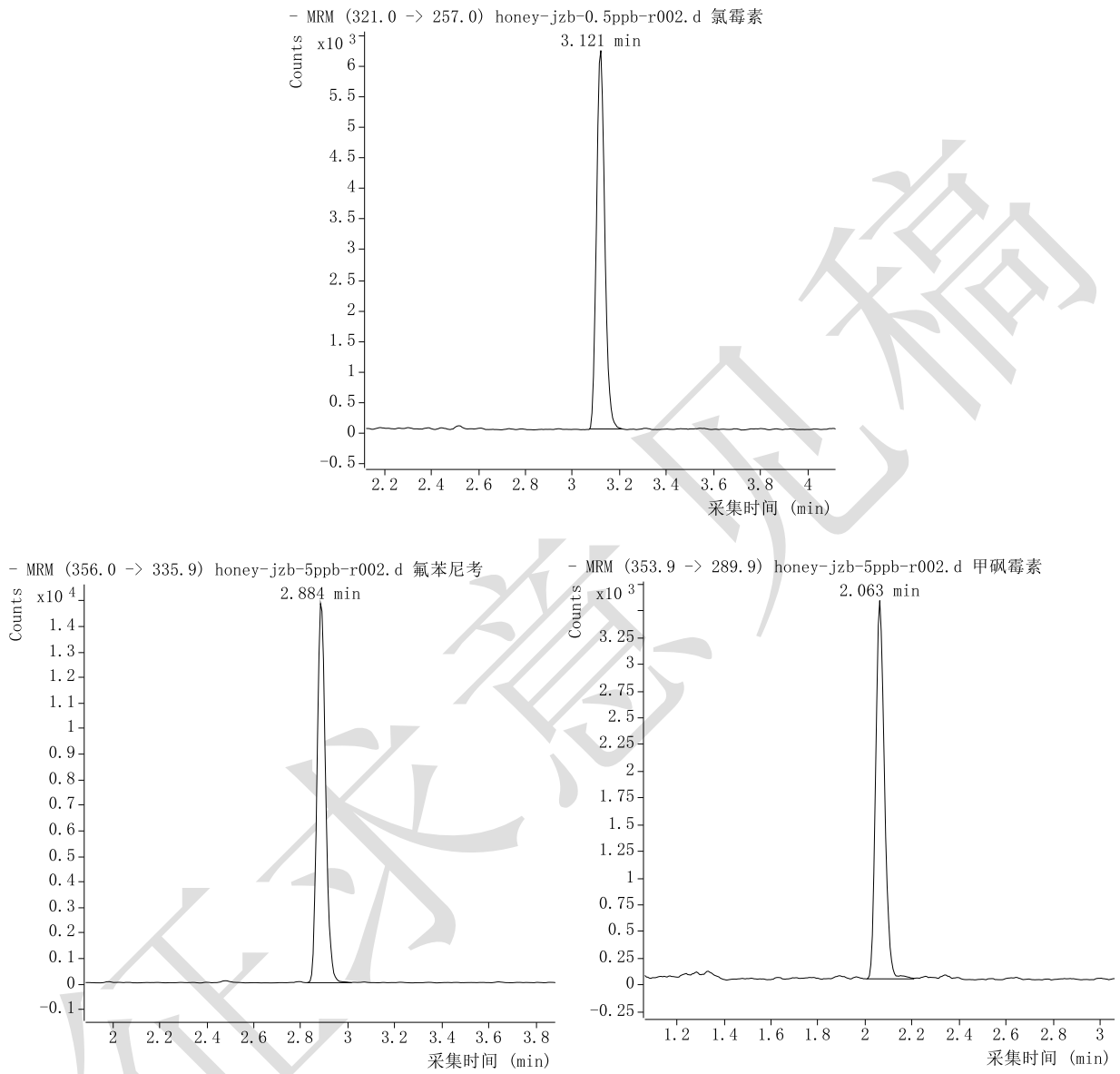
酰胺醇类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 酰胺醇类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

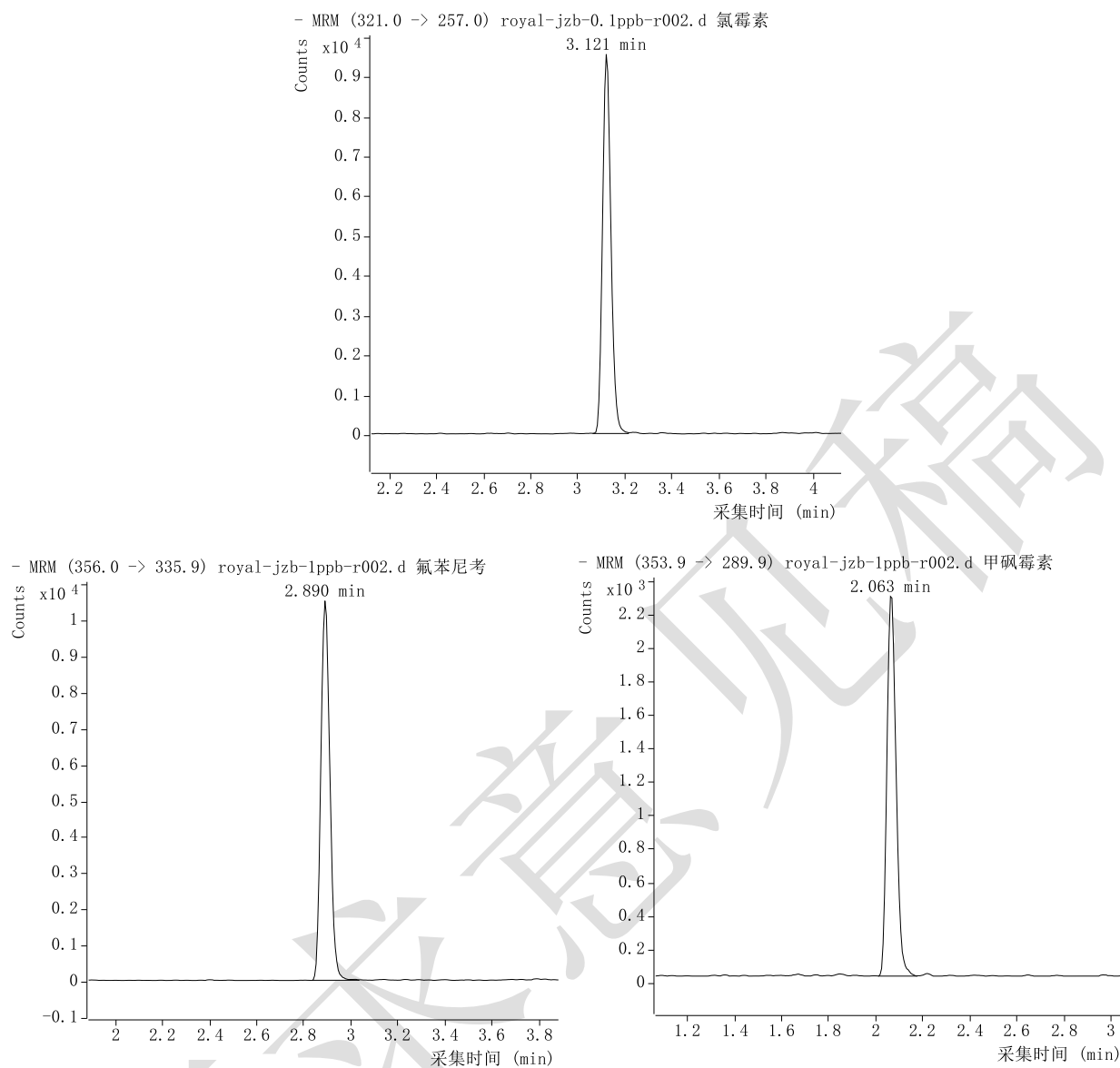
化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
氟苯尼考	Florfenicol	$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$	73231-34-2
甲砒霉素	Thiamphenicol	$C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$	15318-45-3
氯霉素	Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	56-75-7

附录 B
(资料性)

4 种酰胺醇类药物基质匹配标准溶液的质量色谱图见图 B. 1



4 种酰胺醇类药物在蜂蜜基质匹配标准溶液特征离子色谱图 (氯霉素浓度为 0.5 ng/mL, 甲砒霉素、氟苯尼考浓度为 5 ng/mL)



4 种酰胺醇类药物在蜂王浆基质匹配标准溶液特征离子色谱图（氯霉素浓度为 0.1 ng/mL，甲砒霉素、氟苯尼考浓度为 1 ng/mL）