



中华人民共和国国家标准

GB/T 9695.32—2009

肉与肉制品 氯霉素含量的测定

Meat and meat products—Determination of chloramphenicol content

2009-04-08 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准制定过程中参考了“欧盟食品分析方法 CY3.6”。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国肉禽蛋制品标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国肉类食品综合研究中心、中国商业联合会商业标准中心、武汉市疾病预防控制中心、江阴市产品质量监督所、厦门市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：宋永青、赵榕、梁高道、郭文萍、吴东雷、骆和东、靳晓蕾、刘振宇。

肉与肉制品 氯霉素含量的测定

1 范围

本标准规定了畜禽肉中氯霉素的测定方法。

本标准适用于畜禽肉中氯霉素的测定。

本标准检出限:气相色谱-质谱法,检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$;酶联免疫法为 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 9695 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法

3 气相色谱-质谱法(确证法)

3.1 原理

样品中氯霉素用乙酸乙酯提取,脂肪用正己烷去除,经 C_{18} 净化, BSTFA+TMCS(99+1) 衍生后,用 NCI 源选择 m/z 为 466 的特征离子为目标离子,在 SIM 模式下进行 GC-MS 测定。

3.2 试剂和材料

若无特别说明,所用试剂均为分析纯,所用水应符合 GB/T 6682 的要求。

3.2.1 氯霉素:标准品,纯度 $\geq 99\%$ 。

3.2.2 甲醇:色谱纯。

3.2.3 三氯甲烷。

3.2.4 正己烷:色谱纯。

3.2.5 乙酸乙酯。

3.2.6 无水硫酸钠。

3.2.7 氯化钠。

3.2.8 N、O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)。

3.2.9 三甲基氯硅烷(TMCS)。

3.2.10 丙酮:色谱纯。

3.2.11 甲苯。

3.2.12 甲醇溶液:甲醇+水=2+8。

3.2.13 氯化钠溶液(40 g/L):称取 4.00 g 氯化钠(3.2.7.7),用水溶解,定容至 100 mL。

3.2.14 甲醇-氯化钠溶液:量取甲醇溶液(3.2.12)20 mL、氯化钠溶液(3.2.13)80 mL,混匀。

3.2.15 混合衍生剂: N、O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺+三甲基氯硅烷=99+1。

3.2.16 氯霉素标准储备溶液($c=0.1 \text{ mg/mL}$):称取氯霉素标准品 0.01 g(精确至 0.000 1 g),用丙酮溶解并定容至 100 mL。储备液贮存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,可使用两个月。

3.2.17 氯霉素标准工作溶液:根据试验需要,用丙酮(2.2.10)稀释标准储备溶液(2.2.16),配成适当浓度的标准工作溶液。

3.3 仪器设备

实验室常规设备及下列仪器。

- 3.3.1 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)。
- 3.3.2 分析天平:可准确称重至 0.000 1 g。
- 3.3.3 分析天平:可准确称重至 0.01 g。
- 3.3.4 离心机:5 500 r/min。
- 3.3.5 涡旋仪。
- 3.3.6 固相萃取装置。
- 3.3.7 旋转蒸发仪。
- 3.3.8 均质器。
- 3.3.9 振荡器。
- 3.3.10 机械设备:用于试样的均质。包括:绞肉机、斩拌机等肉类组织粉碎机。
- 3.3.11 氮吹仪。
- 3.3.12 具塞离心管:50 mL、10 mL。
- 3.3.13 C_{18} 固相萃取柱或相当者:200 mg,3 mL。

3.4 分析步骤

3.4.1 试样液制备

3.4.1.1 试样的制备

按 GB/T 9695.19 规定的方法取样。至少取有代表性的试样 200 g,使用适当的机械设备(3.3.10)将试样均质。均质后的试样尽快分析,否则,应密封低温贮存,防止试样变质或成分发生变化。贮存的试样在启用时,应重新混匀。

3.4.1.2 提取

称取 10 g 样品(精确至 0.01 g)置于 50 mL 具塞离心管中,加入少量无水硫酸钠和 30 mL 乙酸乙酯均质 1 min,以 5 000 r/min 离心 5 min 后,用吸管吸出上层乙酸乙酯于浓缩瓶中,残渣再加入乙酸乙酯 15 mL 重复提取样品,合并提取液。提取液在 50 °C 水浴中旋转蒸发,除去乙酸乙酯,加入 1 mL 甲醇-氯化钠溶液(3.2.14)和 4 mL 正己烷,充分振摇后,转移至 10 mL 具塞离心管中,用 1 mL 甲醇-氯化钠溶液(3.2.14)清洗浓缩瓶,合并清洗液于 10 mL 具塞离心管中。涡旋 0.5 min,经 3 000 r/min 离心 3 min 后,用吸管吸去正己烷,加入 4 mL 正己烷重复上述操作。然后在离心管中加入 4 mL 乙酸乙酯,涡旋 1 min,经 3 000 r/min 离心 3 min 后,用吸管吸出乙酸乙酯,加入 4 mL 乙酸乙酯重复上述操作,合并乙酸乙酯于浓缩瓶中,在 50 °C 水浴中旋转浓缩至近干,用 5 mL 水溶解残渣。

3.4.1.3 净化

依次用 5 mL 甲醇、5 mL 三氯甲烷、5 mL 甲醇、5 mL 水活化 C_{18} 固相萃取柱(3.3.14),然后加入上述步骤得到的提取液,加 5 mL 甲醇+水(3.2.12)淋洗色谱柱,用 25 mL 甲醇洗脱于浓缩瓶中,洗脱液在 50 °C 下浓缩至近干。用 100 μ L 甲醇溶解残渣,并转移至 10 mL 具塞离心管中,再用甲醇冲洗浓缩瓶,合并洗液,于 50 °C 下用氮气吹干。

3.4.1.4 衍生化

于吹干的试样残渣中加入 100 μ L 甲苯和 100 μ L 混合衍生剂(3.2.15),盖紧塞后,涡旋混匀 1 min,60 °C 下反应 30 min,然后在 50 °C 下用氮气吹干,加入 1 mL 正己烷溶解残渣。

3.4.2 标准工作液制备

配制好的标准工作液按 3.4.1.4 步骤进行操作。

3.4.3 空白液制备

除不称取试样外,均按 3.4.1 步骤进行操作。

3.4.4 测定

3.4.4.1 气相色谱-质谱法测定条件

色谱柱: DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)石英毛细管柱或相当者;

载气: 氦气, 纯度≥99.999%;

流速: 1.65 mL/min;

进样口温度: 250 °C;

进样量: 1 μL;

进样方式: 无分流(保持 1 min)进样;

柱温程序: 初始 55 °C, 保持 1 min, 以 25 °C/min 速度升至 280 °C, 保持 6 min;

NCI 源: 70 eV;

离子源温度: 150 °C;

接口温度: 280 °C;

溶剂延迟: 7 min;

反应气: 甲烷, 纯度≥99.99%;

选择离子检测:

保留时间/min	目标物	检测离子 <i>m/z</i>
12.58	CAP-TMS	466, 468, 376, 378

3.4.4.2 定性测定

进行样品测定时, 如果检出的色谱峰保留时间与标准样品相一致, 并且在扣除背景后的样品质谱图中, 所选择的离子均出现, 而且所选择的离子比与标准样品衍生物的离子比相一致(各相关离子比在相关标准品的 10% 之内), 则可判断样品中存在氯霉素。

3.4.4.3 定量测定

吸取 1 μL 衍生的试样液、标准液或空白液注入气相色谱-质谱联用仪中, 以 *m/z* 466 为定量离子, 标准工作液中氯霉素的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。根据试样液的峰面积, 从标准曲线上查出溶液中对应的氯霉素浓度值。用标准工作曲线对试样进行定量, 样品溶液中氯霉素衍生物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, 氯霉素衍生物的参考保留时间为 12.58 min。氯霉素标准物质衍生物总离子流图和质谱图以及氯霉素标准物质衍生物选择离子质谱图参见附录 A 中的图 A.1、图 A.2、图 A.3。

3.4.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

3.5 结果计算

按式(1)计算样品中氯霉素的含量:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 10^{-3}}{m \times 10^{-3}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中氯霉素的含量, 单位为微克每千克(μg/kg);

c —— 从标准工作曲线上查得试样液中氯霉素的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

*c*₀ —— 从标准工作曲线上查得空白液中氯霉素的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 试样定容体积, 单位为毫升(mL);

m —— 称取试样的质量, 单位为克(g)。

结果取算术平均值, 保留三位有效数字。

3.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

4 酶联免疫法(ELISA 筛选法)

4.1 原理

采用间接竞争 ELISA 方法,在酶标板微孔条上包被偶联抗原,样本中残留的氯霉素和微孔条上包被的偶联抗原竞争抗氯霉素抗体,加入酶标二抗后,加入底物显色,样本吸光值与其残留物氯霉素的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中氯霉素的含量。

4.2 试剂

若无特别说明,所用试剂均为分析纯,所用水应符合 GB/T 6682 的要求。

4.2.1 乙酸乙酯。

4.2.2 正己烷。

4.2.3 氯霉素酶联免疫试剂盒:2℃~8℃冰箱中保存。

注:试剂盒应选用国家有关行政管理部门备案的生产商的合格产品。

4.2.3.1 酶标板:8孔×12条,包被有偶联抗原。

4.2.3.2 氯霉素系列标准液:0 μg/L、0.05 μg/L、0.15 μg/L、0.45 μg/L、1.35 μg/L、4.05 μg/L。

4.2.3.3 酶标二抗。

4.2.3.4 抗体工作液。

4.2.3.5 底物液(A液)。

4.2.3.6 底物液(B液)。

4.2.3.7 终止液。

4.2.3.8 洗涤液(浓缩液)。

4.2.3.9 复溶液(浓缩液)。

4.2.3.10 复溶工作液:将浓缩复溶液 20 mL 用水稀释至 40 mL。

4.2.3.11 洗涤工作液:将浓缩洗涤液 40 mL 用水稀释至 800 mL。

4.3 仪器设备

实验室常规设备及下列仪器。

4.3.1 酶标仪:配备 450 nm、630 nm 滤光片。

4.3.2 微量移液器:单道 20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL,多道 250 μL。

4.3.3 恒温箱。

4.3.4 离心管:50 mL。

4.4 分析步骤

4.4.1 样本制备

样本用均质器均质后,称取 3.0 g±0.05 g 至 50 mL 离心管中,加入 6 mL 乙酸乙酯(4.2.1),用振荡器振荡 10 min,于室温(20℃~25℃)、5 500 r/min 离心 10 min,移取 4 mL 上层有机相至 10 mL 干净的玻璃试管中,于 50℃~60℃水浴氮气流下吹干,加入 1 mL 正己烷(4.2.2),用涡旋仪涡动 30 s,再加 1 mL 复溶工作液(4.2.3.10),用涡旋仪涡动 1 min,于室温(20℃~25℃)、5 500 r/min 离心 15 min;除去上层有机相,取下层 100 μL 用于分析。稀释倍数为 0.5 倍。

4.4.2 空白对照样本

取空白试样,按 4.4.1 步骤进行操作。

4.4.3 测定步骤

4.4.3.1 微孔板及试剂的准备:从冷藏环境中取出需要数量的微孔板和其他所需试剂,置于室温(20℃~25℃)平衡 30 min 以上,并将不用的微孔板放入自封袋中,保存于 2℃~8℃。

4.4.3.2 编号:将样本、标准品、空白对照样本对应微孔按序编号,记录样本孔、标准孔和空白样本孔所在的位置。注意所有试剂及样本溶液使用前均应摇匀。

4.4.3.3 加样:加 100 μL 标准品、样本、空白样本到对应的微孔中,再加入抗体工作液(3.2.3.4) 50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min。

4.4.3.4 洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液(3.2.3.11)250 μL /孔,充分洗涤 4 次~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干。

4.4.3.5 加酶标二抗:加入酶标二抗(3.2.3.3)100 μL 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中 30 min,取出重复洗板步骤(3.5.4)。

4.4.3.6 显色:加入底物液 A 液(3.2.3.5)50 μL /孔,再加底物液 B 液(3.2.3.6)50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境反应 15 min。

4.4.3.7 测定:加入终止液(3.2.3.7)50 μL /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪 450 nm 及 630 nm 双波长检测,测定每孔的吸光度值。

4.5 结果计算

按式(2)计算百分吸光度值:

$$\text{相对吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

B ——标准溶液或样本溶液的平均吸光度值;

B_0 ——0ppb 标准溶液的平均吸光度值。

将式(2)计算得到的相对吸光度值(%)对应氯霉素($\mu\text{g}/\text{L}$)的自然对数,作半对数坐标校正曲线,根据样本的相对吸光度值,从校正曲线上查出溶液中对应的氯霉素浓度值。

按式(3)计算样品中氯霉素的含量:

$$X = \frac{(A - A_0) \times f}{m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X ——试样中氯霉素的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A ——试样的相对吸光度值(%)对应的氯霉素含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A_0 ——空白样本的相对吸光度值(%)对应的氯霉素含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

f ——试样稀释倍数;

m ——称取试样的质量,单位为克(g)。

结果保留三位有效数字。阳性结果应经过气相色谱-质谱法确证。

4.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

标准物质衍生物总离子流图、质谱图 and 选择离子质谱图

A.1 氯霉素标准物质衍生物的总离子流, 见图 A.1。

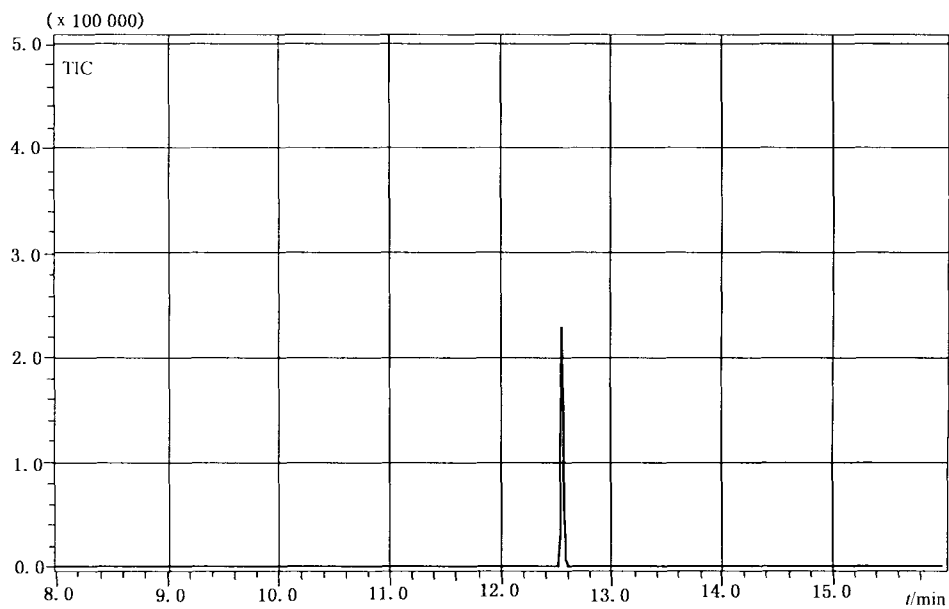


图 A.1

A.2 氯霉素标准物质衍生物的质谱图, 见图 A.2。

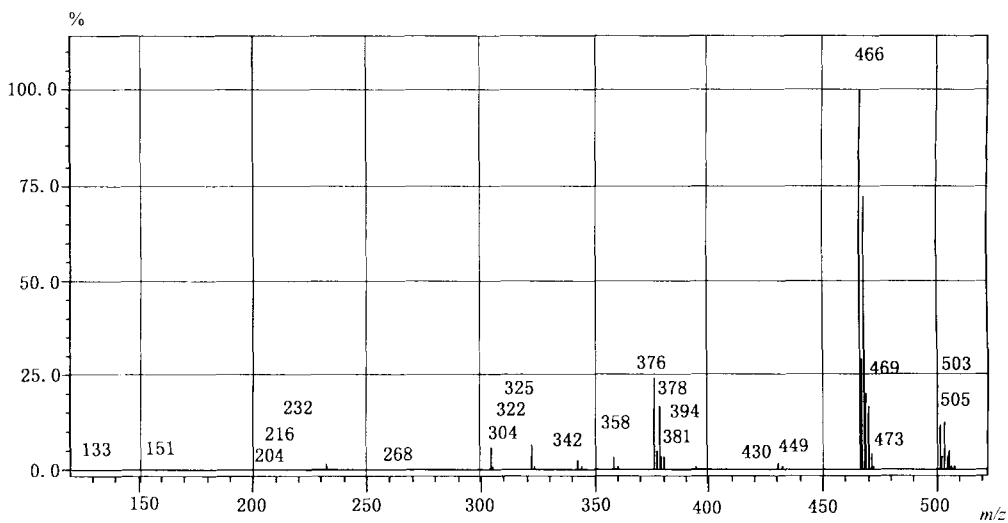


图 A.2

A.3 氯霉素标准物质衍生物的选择离子质谱图,见图 A.3。

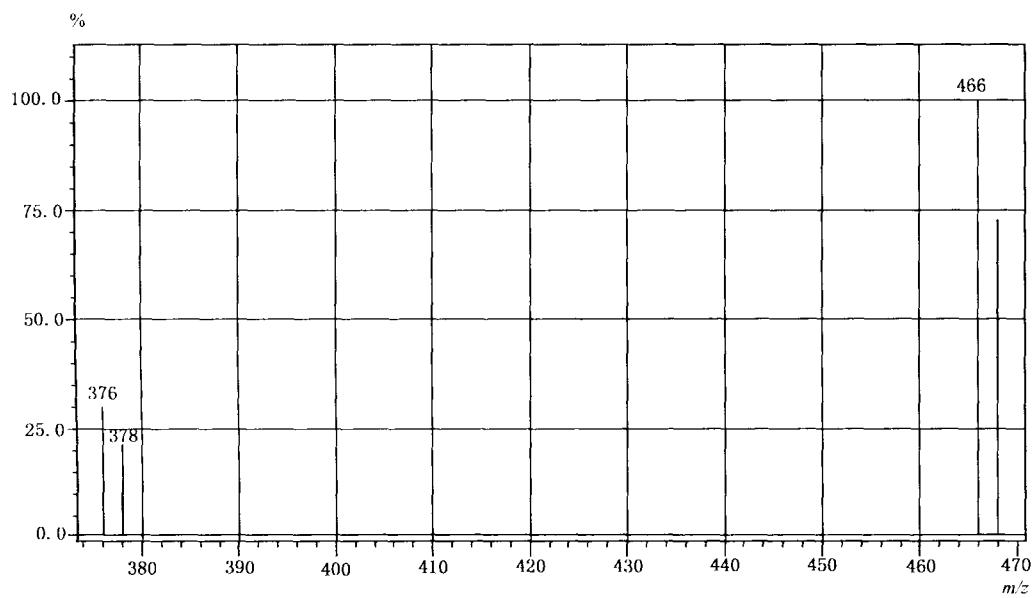


图 A.3