



中华人民共和国国家标准

GB/T 21108—2007

饲料中氯霉素的测定 高效液相色谱串联质谱法

Determination of chloramphenicol in feeds—
High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

2007-10-24 发布

2008-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、国家饲料质量监督检验中心（北京）。

本标准主要起草人：赵根龙、高牛、宋荣、张发旺。

本标准首次发布。



饲料中氯霉素的测定

高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了测定饲料中氯霉素的高效液相色谱串联质谱法(LC/MS/MS)。

本标准适用于配合饲料和预混合饲料中氯霉素的测定,其最低定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,最低检测浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。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标准,然而,鼓励根据本标准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标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

3 原理

饲料中的氯霉素用乙酸乙酯提取,取部分提取液用氮气吹干。残渣溶于甲醇氯化钠溶液,用正己烷萃取除去脂溶性杂质。再将氯霉素回提至乙酸乙酯,吹干。用乙腈水溶液溶解,过 C_{18} 小柱净化。最后用 LC/MS/MS 法分离、检测和定量。

4 试剂与材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。水为蒸馏水,色谱用水符合 GB/T 6682 的一级用水的规定。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 乙酸乙酯。

4.4 正己烷。

4.5 三氯甲烷。

4.6 乙腈溶液

4.6.1 乙腈溶液 I:取 5.0 mL 乙腈加水 95 mL。

4.6.2 乙腈溶液 II:吸取乙腈 50 mL 加水 50 mL。

4.7 氯化钠。

4.8 氯化钠溶液:浓度为 40 g/L,称取 40.0 g 氯化钠(4.7)加水溶解定容到 1 000 mL。

4.9 氯化钠甲醇溶液:取 200 mL 甲醇(4.2)加氯化钠溶液(4.8)800 mL。

4.10 氯霉素标准品:纯度大于 98%。

4.11 氯霉素标准液

4.11.1 标准贮备液:准确称取 100 mg $\pm$ 0.1 mg 氯霉素标准品(4.10)用乙腈溶解,定容到 100 mL,该溶液氯霉素浓度为 1 mg/mL,密封贮于冰箱内,有效期为一年。

4.11.2 标准中间液 I:吸取标准贮备液(4.11.1)5.00 mL,于 50 mL 容量瓶内,用乙腈溶液 II(4.6.2)定容至 50 mL,该溶液氯霉素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,密封贮于冰箱内,有效期 3 个月。

4.11.3 标准中间液Ⅱ:吸取标准中间液Ⅰ(4.11.2)1.00 mL于100 mL容量瓶内,用乙腈溶液Ⅱ(4.6.2)定容至100 mL,该溶液氯霉素浓度为1.0 μg/mL,密封贮于冰箱内,有效期为3个月。

4.11.4 标准中间液Ⅲ:吸取标准中间液Ⅱ(4.11.3)10.00 mL于100 mL容量瓶内,用乙腈溶液Ⅱ(4.6.2)定容至100 mL。该溶液氯霉素浓度为100 ng/mL,密封贮于冰箱内,有效期为7天。

4.11.5 标准工作溶液:用移液管分别吸取标准中间液Ⅲ(4.11.4)1、5、10、50 mL于4个100 mL容量瓶内,用乙腈溶液Ⅱ(4.6.2)定容至刻度。该溶液氯霉素浓度为1.0、5.0、10、50 ng/mL。

4.12 C₁₈固相萃取(SPE)小柱:载体200 mg、承载液体体积3 mL。

5 仪器

5.1 离心机:转速为4 000 r/min以上。

5.2 超声波提取器。

5.3 涡旋混合器。

5.4 密封盖塑料离心管:50 mL。

5.5 液相色谱串联质谱仪:配备电喷雾离子源(ESI)的液相色谱串联质谱仪。

6 试样的制备

按GB/T 14699.1选取有代表性的实验室样品,用四分法缩分至约200 g,粉碎过0.45 mm孔径筛,混合均匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取一定量的试样(配合饲料5 g,预混合饲料1 g,精确至0.001 g),置于50 mL塑料离心管内(5.4)加40.0 mL乙酸乙酯(4.3)盖好密封盖于涡旋混合器上混合2 min。放入超声波提取器中提取20 min,其间用手摇动两次。将离心管取出,置离心机上(5.1)4 000 r/min离心分离4 min。用移液管取上清液20 mL,于50℃加热器上用氮气吹至近干,待净化。

7.2 净化

7.2.1 液-液分配净化

用氯化钠甲醇溶液(4.9)2、1、1 mL分三次溶解残渣(7.1),均转移到同一个10 mL具塞试管内。加4 mL正己烷,涡旋混合2 min,放入离心机于4 000 r/min离心4 min,弃去上层正己烷,重复上述操作一次。水相加乙酸乙酯(4.3)3 mL,涡旋混合2 min,放入离心机4 000 r/min离心4 min。吸取上层乙酸乙酯,水相置另一个5 mL具塞试管内,加乙酸乙酯(4.3)2 mL重复上述操作一次。吸取上层乙酸乙酯,置于上述同一个水相具塞试管内,置加热器上50℃下,用氮气吹干。用3 mL乙腈溶液Ⅰ(4.6.1)溶解,待SPE小柱净化。

7.2.2 SPE柱净化

每一试样各准备一支C₁₈小柱(4.12),顺序用5 mL甲醇,5 mL三氯甲烷,5 mL甲醇和10 mL水预清洗C₁₈柱。将样液(7.2.1)过此小柱(流速<1 mL/min),用5 mL乙腈溶液Ⅰ(4.6.1)淋洗,最后用3 mL乙腈溶液Ⅱ(4.6.2)洗脱,收集洗脱液于10 mL具塞试管内。洗脱液加5 mL乙酸乙酯涡旋混合1 min,2 000 r/min离心,下层水相用乙酸乙酯重复萃取一次,合并乙酸乙酯提取液于5 mL具塞试管内。在加热器上(50℃)用氮气吹干,用2 mL乙腈溶液Ⅱ(4.6.2)溶解,调节试样溶液浓度,使上机浓度不高于100 ng/mL。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长150 mm,柱内径2.1 mm,粒度3.5 μm或性能类似的分析柱。

柱温：室温。
流动相组成：乙腈+水=30+70(V₁+V₂)。
流动相流速：250 μL/min。
进样量：10 μL。

7.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)负离子方式检测。
喷雾电压：3 500 V。
壳气流速：0.68 L/min。
辅助气流速：3.6 L/min。
毛细管温度：300℃。
母离子 321，二级子离子为 257、152、121。碰撞电压如表 1：

表 1 氯霉素的子离子及其碰撞电压

母离子	子离子	碰撞压力/eV
321	257	23
321	152	18
321	121	12

7.3.3 试样的测定

在上述仪器条件下，分别注入标准工作液(4.11.5)和试样溶液(7.2.2)10 μL，以保留时间和二级子离子(m/z)257、152、121 进行定性，其相对丰度比见表 2。以 152 作为定量子离子，并用氯霉素标准工作液做单点或多点校准，以峰面积比较进行定量计算。

表 2 氯霉素的子离子及相对丰度比

子离子(m/z)	257	152	121
相对丰度/%	100	90±18	8±4

8 结果计算与表述

8.1 结果计算

试样中氯霉素的含量 X，以质量分数微克每千克(μg/kg)表示，单点校准时可用式(1)计算：

$$X = \frac{P_2 \times V_1 \times c \times V_2 \times n}{P_1 \times m \times V_3}$$
(1)

式中：

- P₂——试样溶液对应的色谱峰面积响应值；
- V₁——加入定容液的体积，单位为毫升(mL)；
- c——氯霉素标准溶液的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- V₂——氯霉素标准溶液的进样体积，单位为微升(μL)；
- n——稀释倍数；
- P₁——氯霉素标准溶液对应的色谱峰面积响应值；
- m——试样质量，单位为克(g)；
- V₃——试样溶液的进样体积，单位为微升(μL)。

多点校准时可用式(2)计算：

$$X = \frac{V_1 \times c_x \times V_2 \times n}{m \times V_3}$$
(2)

式中：

V_1 ——加入定容液的体积，单位为毫升(mL)；

c_x ——标准曲线上查得的试样中氯霉素的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V_2 ——氯霉素标准溶液的进样体积，单位为微升(μ L)；

n ——稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克(g)；

V_3 ——试样溶液的进样体积，单位为微升(μ L)。

8.2 结果表示

结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 重复性

在同一实验室由同一操作人员使用同一仪器完成的两个平行测定的相对偏差不大于10%。



附录 A
(资料性附录)
氯霉素一级质谱图

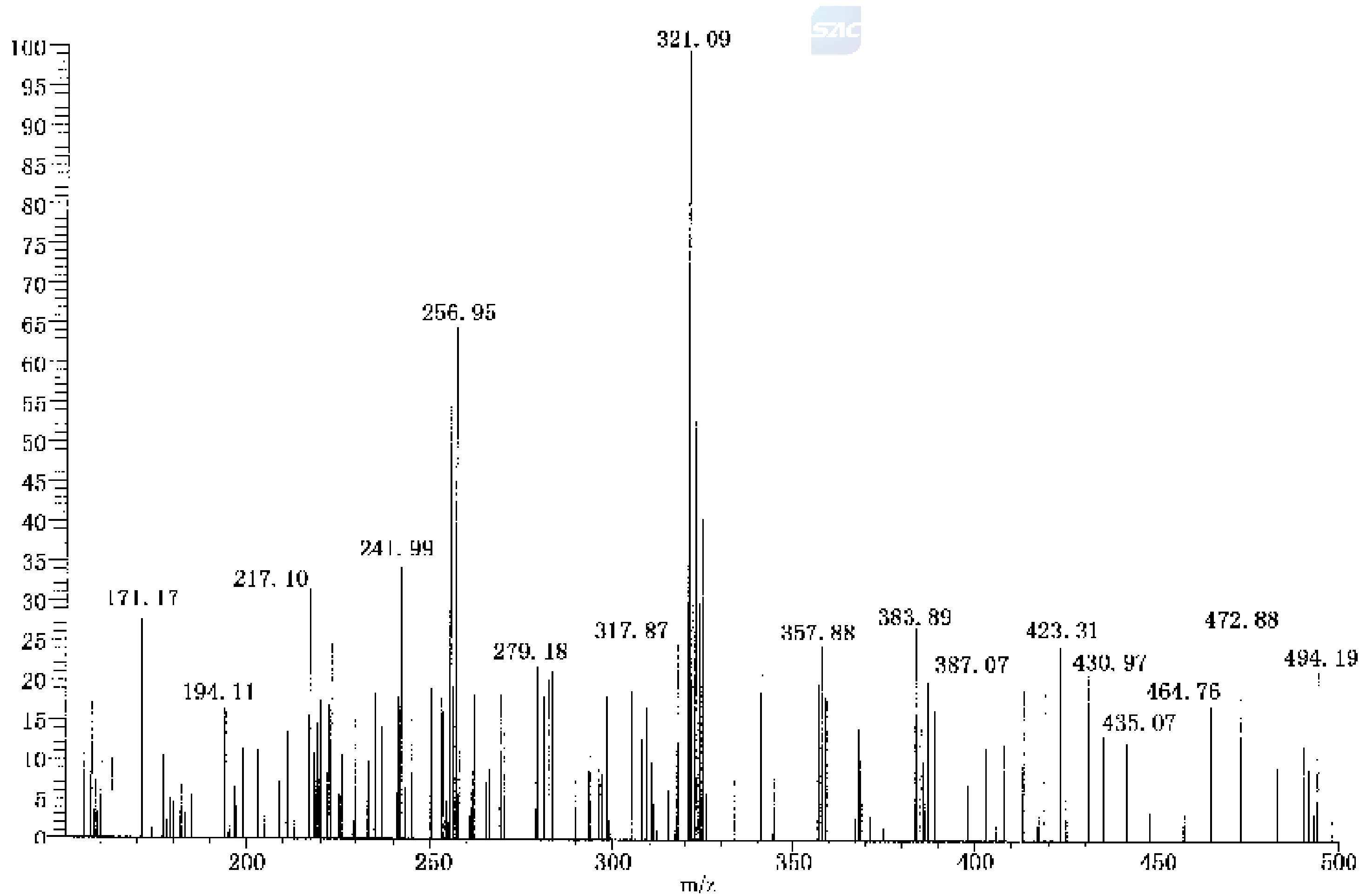
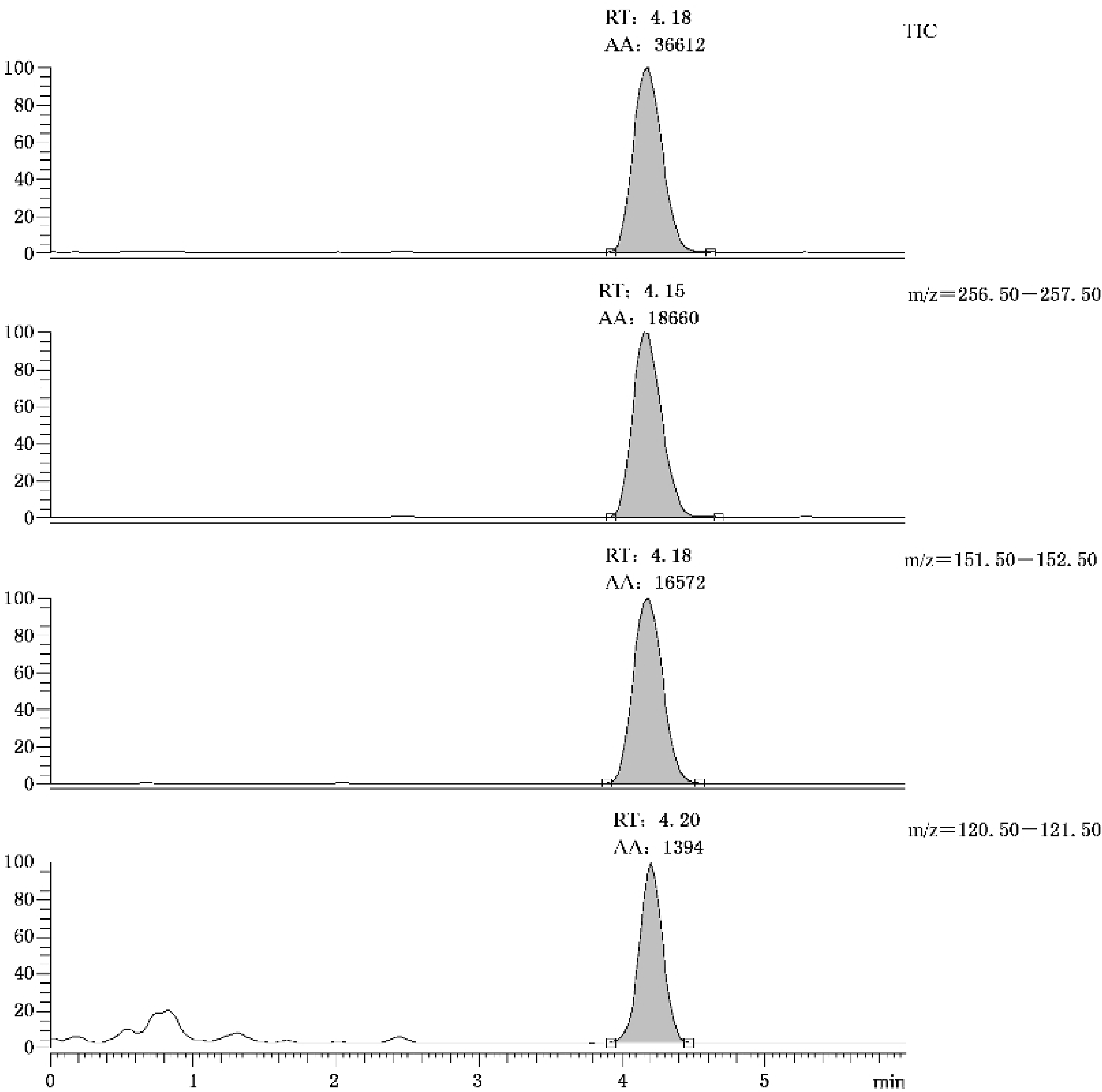


图 A.1 氯霉素一级质谱图

附录 B
(资料性附录)
氯霉素特征离子色谱图



注：RT 为保留时间，单位为分钟(min)；AA 为峰面积。

图 B.1 氯霉素特征离子色谱图