



猪肝组织中氯霉素残留检测 方法——高效液相色谱 - 串联质谱法

1 安全要求

实验操作时穿工作服、戴口罩和手套；提取和净化操作都应在通风橱中进行，避免溶剂气体吸入和皮肤接触；废弃的化学试剂收集到专用容器中集中处理。

2 急救措施

皮肤接触到有机溶剂或酸、碱溶液后用清水清洗，有机溶剂或酸、碱溶液溅入眼中用清水灌洗。

3 适用范围

该标准操作规程适用于猪肝组织中氯霉素残留量的确证检测。

4 职责

进行该项检验的检验员必须按该标准操作规程进行检验，质量监督员负责监督该标准操作规程的正确执行。

5 检测原理

采用间位氯霉素或氯霉素 - D₅ 作内标，试料依次用乙腈、4% 氯化钠去蛋白，正己烷脱脂，乙酸乙酯提取，固相萃取柱净化，氮气吹干。用高效液相色谱 - 串联质谱法测定，内标法定量。

6 方法灵敏度

氯霉素在猪肝组织中的检测限为 0.1 μg/kg，定量限为 0.2 μg/kg。

7 注意事项

除特别说明外，预洗、淋洗和洗脱过程中应避免萃取柱柱床干涸。

8 材料、仪器、试剂的准备及基本要求

除特别注明外，以下所用试剂均为分析纯；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

8.1 对照品、试剂和药物储备液、工作液准备

8.1.1 氯霉素标准品 (CAP)

8.1.2 内标间位氯霉素 (m-CAP) 或氯霉素-D₅ 标准品



- 8.1.3 乙腈 色谱纯
- 8.1.4 氯化钠
- 8.1.5 正己烷
- 8.1.6 乙酸乙酯
- 8.1.7 甲醇 色谱纯
- 8.1.8 C₁₈固相萃取柱 (500mg/3mL)
- 8.1.9 4%氯化钠溶液 称取氯化钠 4.0g, 用水溶解并稀释至 100mL, 临用前配制。
- 8.1.10 水饱和乙酸乙酯溶液 取乙酸乙酯 400mL 于 500mL 棕色试剂瓶中, 加水 50mL, 加盖、振摇, 静置, 使用时取上层溶液。
- 8.1.11 氯霉素标准储备液 (100 μ g/mL) 取氯霉素约 10mg, 精密称定, 置 100mL 量瓶中, 用甲醇超声溶解并稀释成浓度为 100 μ g/mL 的标准储备液。置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 有效期为 6 个月。
- 8.1.12 间位氯霉素 (或氯霉素-D₅) 内标储备液 (100 μ g/mL) 取间位氯霉素 10mg (或氯霉素-D₅ 10.15mg), 精密称定, 置 100mL 量瓶中, 用甲醇超声溶解并稀释成浓度为 100 μ g/mL 的内标储备液。置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 有效期为 6 个月。
- 8.1.13 氯霉素标准工作液 (10ng/mL) 准确量取标准储备液 0.1mL, 置一 10mL 量瓶中, 用流动相稀释成浓度为 1 μ g/mL 的标准工作液; 从中准确量取 0.1mL, 置一 10mL 量瓶中, 用流动相稀释成浓度为 10ng/mL 的标准工作液。置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 有效期为 3 个月。
- 8.1.14 内标工作液 (10ng/mL) 准确量取内标储备液 0.1mL, 置一 10mL 量瓶中, 用流动相稀释成浓度为 1 μ g/mL 的内标工作液; 从中准确量取 0.1mL, 置一 10mL 量瓶中, 用流动相稀释成浓度为 10ng/mL 的内标工作液。置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 有效期为 3 个月。
- 8.2 仪器和设备
- 8.2.1 高效液相色谱 - 串联质谱仪 (带电喷雾离子源)
- 8.2.2 天平 感量 0.01g
- 8.2.3 分析天平 感量 0.000 01g
- 8.2.4 涡旋振荡器
- 8.2.5 组织匀浆器
- 8.2.6 低温离心机
- 8.2.7 样品浓缩仪
- 8.2.8 固相萃取装置
- 8.2.9 微孔滤头 0.45 μ m

9 检验步骤

9.1 试料的制备

- 9.1.1 取匀浆后的供试样品, 作为供试试料。
- 9.1.2 取匀浆后的空白样品 (5 \pm 0.05) g, 作为空白试料 (阴性对照)。
- 9.1.3 取匀浆后的空白样品 (5 \pm 0.05) g, 添加 10ng/mL 的标准工作液 150 μ L 和 10ng/





mL 的内标工作液 250 μ L, 作为空白添加试料 (阳性对照)。

9.2 提取

9.2.1 取供试试料 (5 ± 0.05) g 置 50mL 离心管中, 加 10ng/mL 的内标工作液 250 μ L, 加乙腈 5mL, 4% 氯化钠溶液 5mL, 涡旋混匀, 5 000r/min 离心 10min, 取上清液至另一 50mL 离心管中。

9.2.2 残余物中再用乙腈 5mL 重复提取 1 次, 合并提取液。

9.2.3 提取液中加入正己烷 5mL, 涡旋振荡 1min, 2 000r/min 离心 10min, 弃去上层液, 再重复提取 1 次。

9.2.4 加水饱和乙酸乙酯溶液 5mL, 涡旋振荡 1min, 2 000r/min 离心 10min, 将上层液转移到 15mL 离心管中。

9.2.5 重复提取 1 次, 合并提取液氮气吹干, 用水-乙腈 (95+5, v/v) 3mL 溶解, 备用。

9.3 净化

9.3.1 固相萃取柱依次用甲醇 10mL, 水 10mL 预洗。

9.3.2 取上述备用液过柱。

9.3.3 用水 3mL 淋洗柱子。

9.3.4 用流动相 4mL 以 1mL/min 的速度将样品洗脱入 15mL 离心管中。

9.3.5 洗脱液中加入水饱和乙酸乙酯溶液 4mL, 涡旋振荡 1min, 2 000r/min, 离心 5min。取上层液于 10mL 玻璃试管中。

9.3.6 再用水饱和乙酸乙酯溶液 4mL, 重复提取 1 次, 合并提取液, 氮气流下吹干, 用流动相 1.0mL 溶解后, 供高效液相色谱-串联质谱测定。

9.4 测定条件

9.4.1 色谱条件

9.4.1.1 色谱柱: Alltech Altima C₁₈ 150mm \times 3.2mm (i. d.), 粒径 5 μ m。

9.4.1.2 流动相: 甲醇-水 (50+50, v/v)。

9.4.1.3 流速: 0.4mL/min。

9.4.1.4 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

9.4.1.5 进样量: 20 μ L。

9.4.2 质谱条件

9.4.2.1 离子源参考参数, 见表 1。

表 1 离子源参考参数

离子源参数	参考数值
离子源类型	ESI -
毛细管电压	2.8kV
萃取电压	2.0V
RF 透镜电压	0.5V
源温	120 $^{\circ}$ C
雾化温度	350 $^{\circ}$ C
锥孔气流速	20L/h
雾化气流速	450L/h



9.4.2.2 质量分析器参考参数见表2。

表2 质量分析器参考参数

质量分析器参数	参考数值
低质量数分辨率 LM1	13.0
高质量数分辨率 HM1	13.0
离子能量 1	2.0
入口电压	3V
出口电压	8V
低质量数分辨率 LM2	14.0
高质量数分辨率 HM2	14.0
离子能量 2	0.5
氦气示数	3.7e-3mbar

9.4.2.3 光电倍增器电压：650V。

9.4.2.4 定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表3。

表3 氯霉素和内标的定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

目标化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氯霉素 (CAP)	320.6 > 152.2	320.6 > 152.2	28	18
	320.6 > 256.9		28	11
间位氯霉素 (m-CAP)	320.6 > 207.0	320.6 > 207.0	28	18
氯霉素-D ₅	325.6 > 157.2	325.6 > 157.2	28	15

注：准确质量数在每次试验前进行调谐确认。

9.5 检测数据的质量控制

9.5.1 线性考察

精密量取氯霉素标准工作液和氯霉素内标工作液适量，用流动相稀释成氯霉素浓度分别为 0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、10ng/mL 的系列对照溶液，从低浓度到高浓度测定，每一浓度进样 3 针，按其所得峰面积与相应内标峰面积的比值与相应的对照溶液浓度作标准曲线，并依次计算回归方程及相关系数。

9.5.2 空白试验和添加试验

空白试料、阳性添加试料的提取和净化采用与样品相同的方法操作。空白溶液、对照溶液和试样溶液中各特征离子的质量色谱图分别见附录中图 1、图 2 和图 3。

9.5.3 序列表的编制

试剂空白进 1 针；

样品空白进 2 针；





对照溶液进3针，其RSD < 10%；

样品1-1进1针；

样品1-2进1针；

.....

样品4-1进1针；

样品4-2进1针；

阳性添加各进1针；

对照溶液进2针；

.....

(注：顺序的任何调整应有充分理由证明其合理性)

9.5.4 定性需同时满足下列条件：

9.5.4.1 试剂空白和样品空白不能出现与阳性对照相同的离子峰。

9.5.4.2 所有离子色谱峰的信噪比(S/N)都在3:1以上，信噪比以峰对峰(PtP)计算。

9.5.4.3 试样色谱峰的保留时间，应与溶液的保留时间一致，容许偏差为±2.5%。

9.5.4.4 试样溶液中的离子丰度比应与校正溶液的一致，容许偏差符合表4的要求。

表4 试样溶液中离子丰度比的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
> 10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

9.5.5 定量方法

采用单点校准或标准曲线校准，按内标法以峰面积比计算，即得。采用标准曲线校准时试样溶液及对照溶液中氯霉素及相应内标的峰面积比均应在仪器检测的线性范围之内。

9.6 记录与计算

9.6.1 记录项目

9.6.1.1 逐项填写中国兽医药品监察所“检验记录”首页。

9.6.1.2 对照品名称、来源、批号、含量。

9.6.1.3 储备液、工作液及对照溶液制备及制备日期。

9.6.1.4 试料制备、提取、净化、测定(包括测定过程中涉及的计量仪器编号)。

9.6.1.5 原始数据(包括仪器测定图谱和打印的数据)。

9.6.1.6 计算公式及计算过程(软件计算除外)。

9.6.2 计算

$$\text{单点校准: } X = \frac{AA'_{is} C_S C_{is}}{A_{is} A_S C'_{is}} \times \frac{V}{m}$$



或标准曲线校准：由 $\frac{A_s}{A'_{is}} = a \frac{C_s}{C'_{is}} + b$

求得 a 和 b ，则 $C = \frac{C_{is}}{a} \left(\frac{A}{A_{is}} - b \right)$

按下式计算试料中氯霉素残留量：

$$X = \frac{CV}{m}$$

式中：

A_s ——对照溶液中氯霉素的峰面积；

A'_{is} ——对照溶液中内标的峰面积；

C_s ——对照溶液中氯霉素标准品的浓度 ($\mu\text{g/L}$)；

C'_{is} ——对照溶液中氯霉素内标的浓度 ($\mu\text{g/L}$)；

C ——供试溶液中氯霉素浓度 ($\mu\text{g/L}$)；

C_{is} ——供试溶液中氯霉素内标的浓度 ($\mu\text{g/L}$)；

A ——试样溶液中氯霉素的峰面积；

A_{is} ——试样溶液中氯霉素内标的峰面积；

X ——试料中氯霉素的残留量 ($\mu\text{g/kg}$)；

V ——溶解残余物所用溶液体积 (mL)；

m ——组织样品的质量 (g)。

(注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字)

9.6.3 结果判定

9.6.3.1 线性范围 氯霉素在 0.5 ~ 10ng/mL 范围内考察线性。计算回归方程，其相关系数 $R^2 > 0.990$ 。

9.6.3.2 准确度 本方法在 0.1 ~ 10 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为 70% ~ 120%。

9.6.3.3 精密度 本方法的批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

若方法学考察符合以上规定，则供试组织中药物的残留量 $< 0.1\mu\text{g/kg}$ ，判为未检出； $0.1\mu\text{g/kg} \leq$ 供试组织中药物的残留量 $< 0.3\mu\text{g/kg}$ ，判定为符合规定；供试组织中药物的残留量 $\geq 0.3\mu\text{g/kg}$ ，判定为不符合规定。

10 附加说明

10.1 本标准操作规程依据农业部 781 号公告制定。

10.2 氯霉素的最高残留限量：

药物名称	禁用动物种类	靶组织	残留监控要求
氯霉素	所有食品动物	所有可食组织	0.3 $\mu\text{g/kg}$





附录

China Institute of Veterinary Drug Control

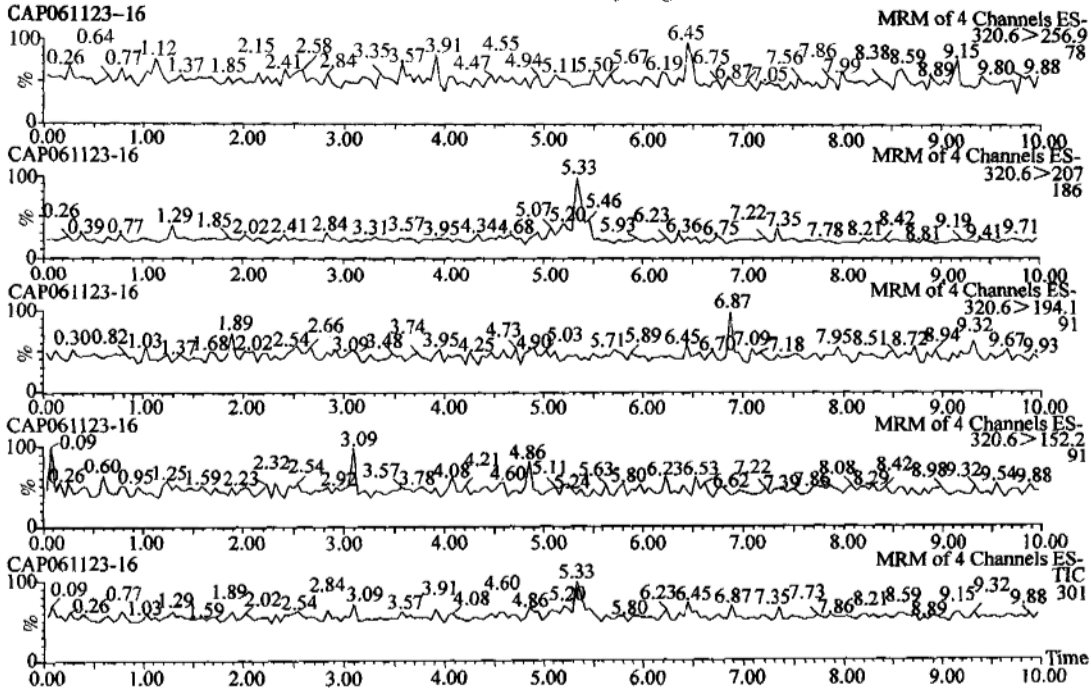


图 1 空白猪肝中氯霉素及内标特征离子质量色谱图



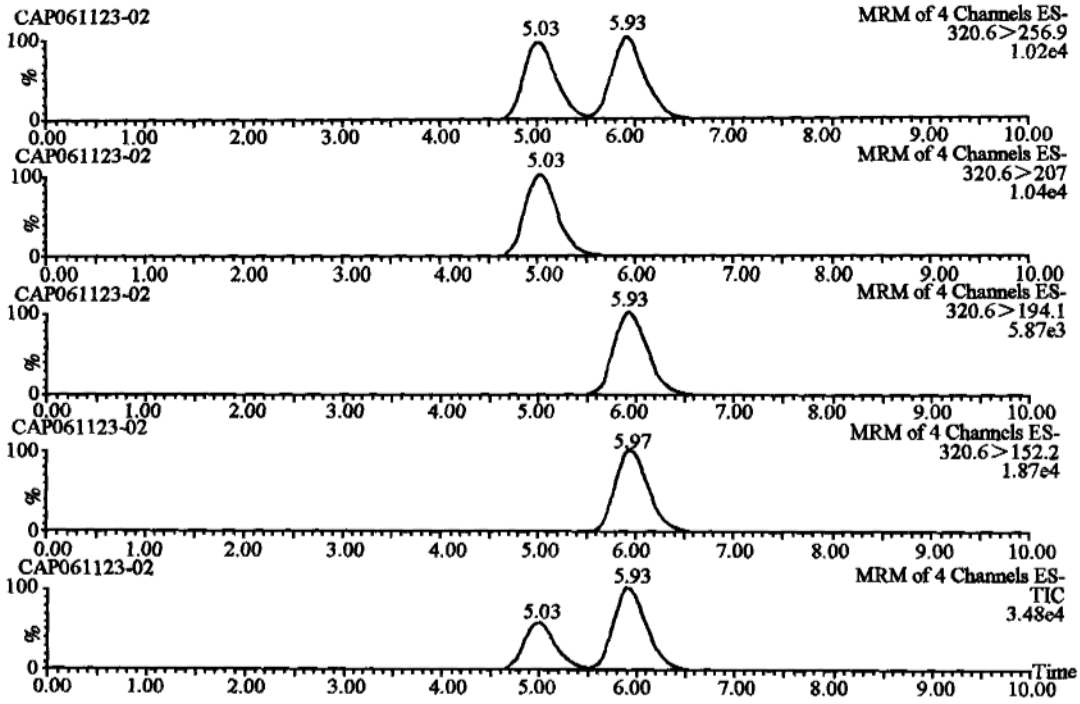


图2 标准溶液中氟霉索及内标特征离子质量色谱图

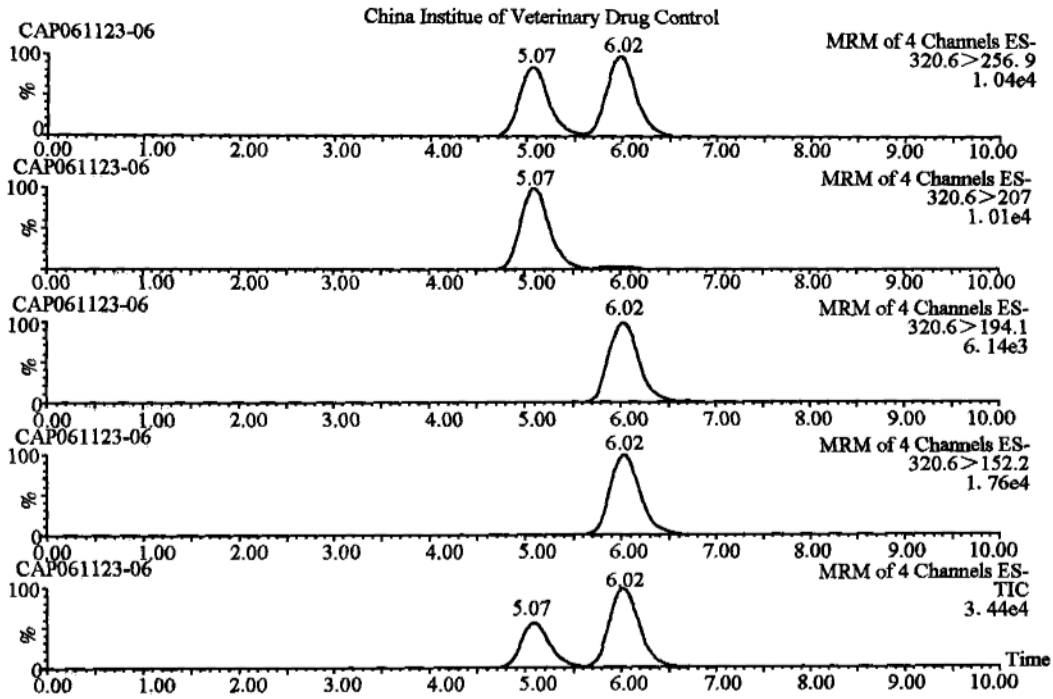


图3 猪肝试样溶液中氯霉素及内标特征离子质量色谱图

质量色谱图中:

- 320.6 > 152.2, 320.6 > 194.1 和 320.6 > 256.9 为氯霉素特征离子质量色谱图;
- 320.6 > 207 为内标氯霉素特征离子质量色谱图。

