

中华人民共和国国家标准

农业部 2483 号公告—8—2016

饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的 测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of chloramphenicol , thiamphenicol and florfenicol in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2016-12-23 发布

2017-04-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:南京农业大学动物医学院、天津市兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:江善祥、张伟、彭麟、陈小秋。

饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考含量测定的液相色谱—串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料及水产饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考含量的测定。

本标准方法的检出限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料中的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考在碱性条件下，用乙酸乙酯提取，提取液用氮气吹干，残渣以正己烷液液分配除脂，经 C_{18} 固相萃取柱净化后，以乙腈—水作为流动相，用高效液相色谱—串联质谱检测，内标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

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 氨水。

4.6 氯霉素对照品：含量为 99.5%。

4.7 甲矾霉素对照品：含量为 99.7%。

4.8 氟苯尼考对照品：含量为 99.0%。

4.9 氘代氯霉素(d_5 -氯霉素)标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

4.10 氘代甲矾霉素(d_3 -甲矾霉素)标准品(1 mg)。

4.11 氘代氟苯尼考(d_3 -氟苯尼考)标准品(1 mg)。

4.12 氯霉素类药物标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：称取适量的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考对照品，分别用甲醇溶解定容配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液， -20°C 保存可使用 6 个月。

4.13 氯霉素类药物标准工作液：移取适量 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素类药物标准储备液，用甲醇进行稀释，配制成 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准工作液，现配现用。

- 4.14 混合内标工作液:将购得的 3 种内标标准物质用甲醇进行溶解稀释得到 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合内标工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,可使用 3 个月。
- 4.15 乙腈—水溶液:乙腈(4.1)和水按体积比 17+83 混匀。
- 4.16 甲醇—水溶液:甲醇(4.2)和水按体积比 5+95 混匀。
- 4.17 甲醇—水溶液饱和的正己烷:足够的甲醇—水(4.16)和正己烷充分振荡混合,静置分层,上层即为甲醇—水(5+95)溶液饱和的正己烷。
- 4.18 有机滤膜:0.22 μm 。
- 4.19 C_{18} 固相萃取柱: C_{18} (200 mg,3 mL)或与之性能相当者。

5 仪器

- 5.1 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。
- 5.2 分析天平:感量 0.000 01 g。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 高速冷冻离心机:转速为 6 000 r/min 或以上。
- 5.5 涡旋混合仪。
- 5.6 超声波清洗器。
- 5.7 氮吹浓缩仪。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的样品,用四分法缩减取样,按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎过 0.45 mm 孔径筛,混合均匀,装入磨口瓶中备用。

7 测定

7.1 提取

取试样 2 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 混合内标工作液(4.14),再加入 0.3 mL 氨水(4.5)和 10 mL 乙酸乙酯(4.3),涡旋混匀 2 min,振荡提取 10 min,6 000 r/min 离心 10 min,转移上清液于 50 mL 离心管中,再加 10 mL 乙酸乙酯(4.3)重复提取 1 次后合并上清液,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干。

7.2 净化

向 7.1 项下残渣中加 4 mL 甲醇—水溶液(4.16)复溶,再加 4 mL 经甲醇—水溶液饱和过的正己烷(4.17),涡旋 1 min,6 000 r/min 离心 10 min,弃去上层正己烷,重复除脂 1 次。取固相萃取柱(4.19),依次用 3 mL 甲醇(4.2)、3 mL 水活化,上样后用 3 mL 水淋洗,3 mL 甲醇(4.2)洗脱,收集洗脱液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干。用 1 mL 乙腈—水(4.15)溶液复溶,混匀,0.22 μm 有机滤膜(4.18)过滤,待测。

7.3 液相色谱—质谱/质谱测定

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm ;或与之相当者。
流速:0.4 mL/min。
进样量:10 μL 。
柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	水, %	乙腈, %
0.0	83	17
3.0	17	83
4.0	17	83
4.1	83	17
5.0	83	17

7.3.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源(ESI)。

扫描方式:负离子模式。

检测方式:多反应监测(MRM)。

毛细管电压:2500 V。

离子源温度:500℃。各个分析物的质谱参数见表 2。

表 2 各个分析物的质谱参数

分析物	母离子, m/z	子离子, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV	
氯霉素	321	152 [*] / 257	40	18	12
甲砒霉素	354	185 [*] / 290	40	23	12
氟苯尼考	356	336 [*] / 185	40	9	20
氘代氯霉素(d_3 -氯霉素)	326	157	40	20	
氘代甲砒霉素(d_3 -甲砒霉素)	357	188	40	22	
氘代氟苯尼考(d_3 -氟苯尼考)	359	339	40	10	
* 为定量离子					

7.4 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子、2 个子离子。在相同实验条件下,样品中待测物和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与标准溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可以判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度, %	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差, %	±20	±25	±30	±50

7.5 定量测定

本标准采用内标法定量。取适量试样溶液和相应浓度的标液,做单点或多点校准。氯霉素类药物标准溶液的特征离子色谱图参见附录 A。

8 结果计算

饲料中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的含量 X_i ,以质量分数计,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(1)计算。

$$X_i = \frac{c_s \times c_i \times A \times A_s \times V}{c_s \times A_s \times A_i \times m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c_s ——标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

农业部 2483 号公告—8—2016

- A —— 试样溶液中被测物的色谱峰面积；
- A_{si} —— 标准工作溶液中内标物的色谱峰面积；
- V —— 样液最终定容体积,单位为毫升(mL)；
- c_{si} —— 标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- A_s —— 标准工作溶液中被测物的色谱峰面积；
- A_i —— 试样溶液中内标物的色谱峰面积；
- m —— 试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)；
- 1 000—— 换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的 2 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)

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和相应内标的多反应监测(MRM)色谱图

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和相应内标的多反应监测(MRM)色谱图见图 A. 1。

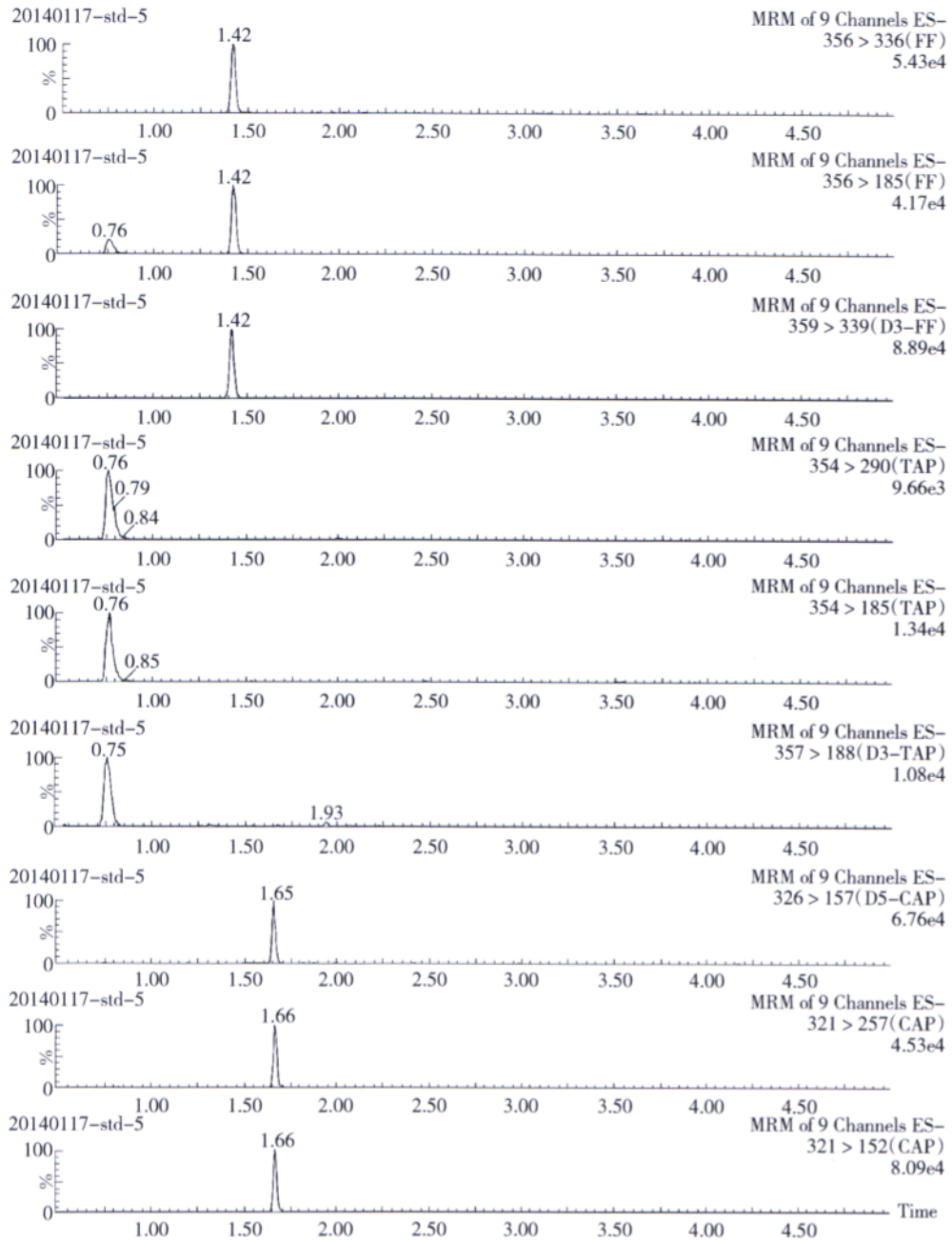


图 A. 1 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和相应内标(5 μg/L)的多反应监测(MRM)色谱图

