

中华人民共和国国家标准

农业部 781 号公告—2—2006

动物源食品中氯霉素残留量的测定 高效液相色谱—串联质谱法

Determination of chloramphenicol residues in animal derived food
by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2006-12-16 发布

2006-12-16 实施

中华人民共和国农业部 发布

目 次

前言

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 制样	1
3.1 样品的制备	1
3.2 样品的保存	1
4 测定方法	1
4.1 方法提要或原理	1
4.2 试剂和材料	1
4.3 仪器和设备	2
4.4 测定步骤	2
4.5 结果计算	3
5 检测方法灵敏度、准确度和精密度	4
5.1 灵敏度	4
5.2 准确度	4
5.3 精密度	4
附录 A	5
附录 B	6

前 言

本标准附录 A、附录 B 是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：王树槐、门立强、孙雷、汪霞、张建强。

动物源食品中氯霉素残留量的测定 高效液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中氯霉素残留确认检测的制样和高效液相色谱—串联质谱测定方法。本标准适用于猪、鸡肝脏、肌肉、鱼和虾组织中氯霉素残留量的检测。

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—1992 分析实验室用水规则和试验方法。

农业部农牧发[2003]1号 兽药残留试验技术规范(试行)。

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

3.2 样品的保存

-20℃以下贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

采用间位氯霉素作内标,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,间位氯霉素内标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 氯霉素标准品(CAP)

4.2.2 内标:间位氯霉素(m-CAP)或氘代氯霉素(CAP-D₅)。

4.2.3 乙腈 色谱纯。

4.2.4 氯化钠

4.2.5 正己烷

4.2.6 乙酸乙酯

4.2.7 甲醇 色谱纯。

4.2.8 C18 固相萃取柱(500 mg/3 cc)。

4.2.9 4%氯化钠溶液 称取氯化钠 4.0 g,用水溶解并稀释至 100 mL,临用前配制。

4.2.10 水饱和的乙酸乙酯溶液 取 400 mL 乙酸乙酯于 500 mL 棕色试剂瓶中,加水 50 mL,加盖、振摇,静置,使用时取上层溶液。

4.2.11 氯霉素标准储备液 取氯霉素约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并稀释成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 年。

4.2.12 间位氯霉素内标储备液 取间位氯霉素 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并稀释成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 年。

4.2.13 氯霉素标准工作液 准确量取标准储备液适量,用流动相稀释成浓度为 10 ng/mL、50 ng/mL 的标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

4.2.14 间位氯霉素内标工作液 准确量取内标储备液适量,用流动相稀释成浓度为 20 ng/mL 的内标工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱—串联质谱仪(配电喷雾离子源)

4.3.2 天平 感量 0.01 g。

4.3.3 分析天平 感量 0.000 01。

4.3.4 涡旋振荡器

4.3.5 组织匀浆器

4.3.6 低温离心机

4.3.7 样品浓缩仪

4.3.8 固相萃取装置

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品,作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品,作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

4.4.2 提取

取 10 000 r/min 匀浆 1 min 的试料(5 ± 0.02)g 置 50 mL 离心管中,加间位氯霉素内标工作液 250 μL ,加乙腈 5 mL,4% 氯化钠溶液 5 mL,涡旋振荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一 50 mL 离心管中,重复提取 1 次,合并提取液。提取液中加入正己烷 5 mL,涡旋振荡 1 min,2 000 r/min 离心 10 min,弃去上层液,重复 1 次。加水饱和乙酸乙酯溶液 5 mL,涡旋振荡 1 min,2 000 r/min 离心 10 min,将上层液转移到 15 mL 离心管中,重复提取 1 次,合并提取液氮气吹干,用水-乙腈(95:5)3 mL 溶解,备用。

4.4.3 净化

固相萃取柱依次用甲醇 10 mL,水 10 mL 预洗,取备用液过柱。用水 3 mL 洗柱,洗 2 次后,用流动相 4 mL 以 1 mL/min 的速度将样品洗脱入 15 mL 离心管中。洗脱液中加入水饱和乙酸乙酯溶液 4 mL,涡旋振荡 1 min,2 000 r/min,离心 5 min,取上层液,重复提取 1 次,合并提取液,氮气流下吹干。

用流动相 1.0 mL 溶解残余物后,过滤膜后供高效液相色谱—串联质谱测定。

4.4.4 标准曲线的制备

精密量取氯霉素标准工作液和间位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 0.5、1.0、2.0、5.0、10 ng/mL,间位氯霉素内标浓度为 5.0 ng/mL。按表 1 添加供高效液相色谱—串联质谱测定。

表 1

	0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	2.0 ng/mL	5.0 ng/mL	10.0 ng/mL
10 ng/mL CAP	50 μ L	100 μ L	—	—	—
50 ng/mL CAP	—	—	40 μ L	100 μ L	200 μ L
20 ng/mL m-CAP	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

色谱柱: Alltech Altima C₁₈ 150 mm×3.2 mm(i.d.), 粒径 5 μ m;

流动相: 甲醇-水(50+50)用前过 0.45 μ m 滤膜, 脱气。

流速: 0.4 mL/min。

柱温: 30℃。

进样量: 20 μ L。

运行时间: 10 min。

4.4.5.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源。

扫描方式: 负离子扫描。

检测方式: 多反应监测。

电离电压: 2.8 kV。

源温: 120℃。

碰撞气: 氩气 3.0×10^{-3} mbar

脱溶剂气速: 500 L/hr。

锥孔气速: 20 L/hr。

数据采集窗口: 10 min。

驻留时间: 0.6 s。

定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞电压见表 2。

表 2

目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压	碰撞电压(eV)
氯霉素(CAP)	320.60	152.20	28	18
	320.60	256.90	28	11
	320.60	194.15	28	13
间位氯霉素(m-CAP)	320.60	207.25	28	18
氘代氯霉素(CAP-D ₃)	326.30	157.20	28	18

注: 准确质荷比在每次实验前进行确认, 内标可任选一种。

4.4.5.3 测定法

取试样溶液和相应的对照溶液, 作标准曲线校准, 按内标法以峰面积比计算, 即得。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 B 中图 B.1、图 B.2 和图 B.3。

4.4.6 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算

随行标准曲线制备:计算 $A_{320.60>152.20}/A_{320.60>207.25}$ 峰面积比值,标准曲线校准。

由标准曲线方程
$$\frac{A_s}{A'_{is}} = a \times \frac{c_s}{c'_{is}} + b \dots\dots\dots (1)$$

求得 a 和 b , 则
$$c = \frac{c'_{is}}{a} \left(\frac{A_s}{A'_{is}} - b \right) \dots\dots\dots (2)$$

然后按下式计算供试组织中氯霉素残留量:

$$X = \frac{cV}{m} \dots\dots\dots (3)$$

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(ng/mL);
- c'_{is} ——对照溶液中氯霉素内标的浓度(ng/mL);
- c ——供试溶液中氯霉素浓度(ng/mL);
- c_{is} ——供试溶液中氯霉素内标的浓度(ng/mL);
- 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($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- 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。

5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

5.1 灵敏度

氯霉素在猪肝组织中的检测限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

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

5.3 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 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
氯霉素特征离子质谱图

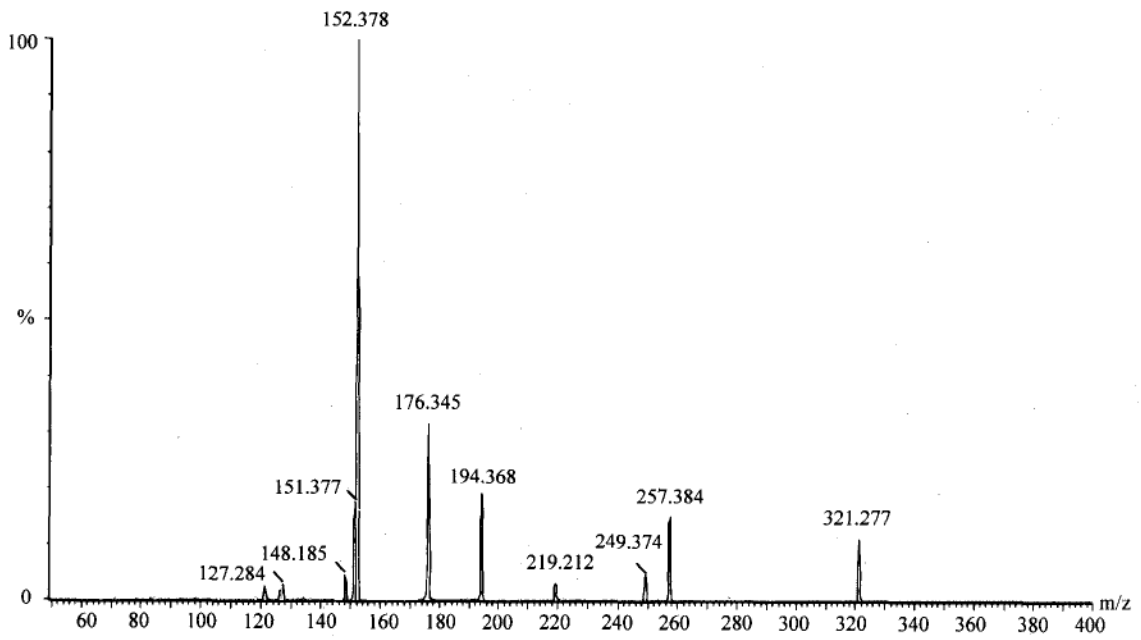


图 A

附录 B

(资料性附录)

氯霉素特征离子质量色谱图

China Institute of Veterinary Drug Control

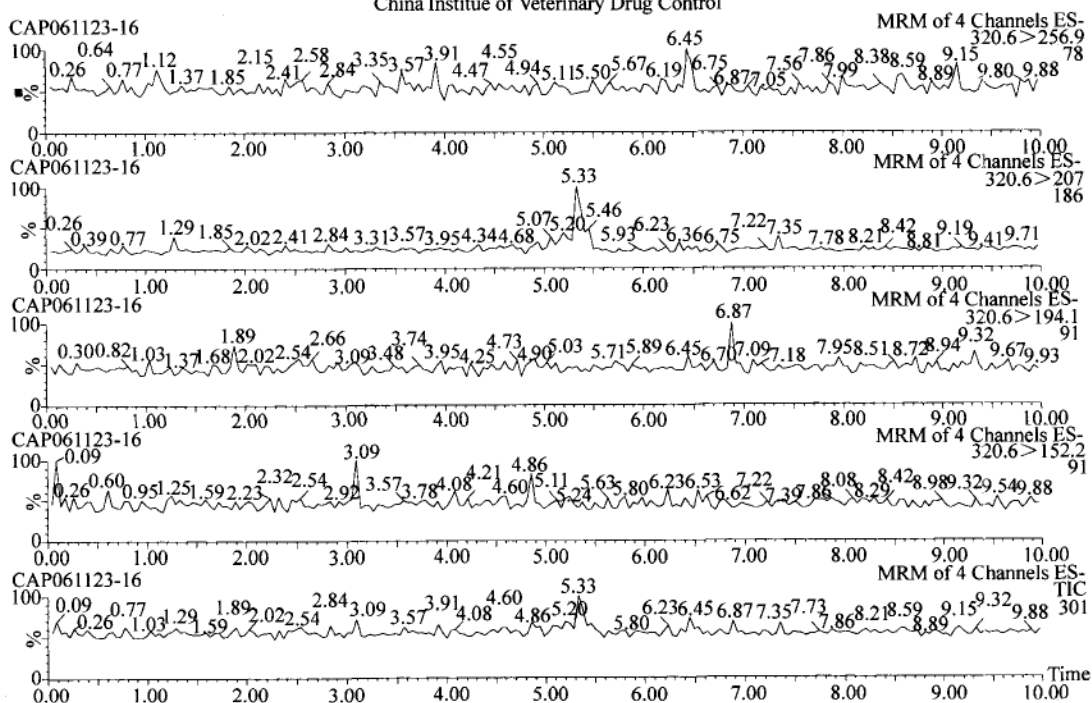


图 B.1 空白猪肝中氯霉素及内标特征离子质量色谱图

China Institute of Veterinary Drug Control

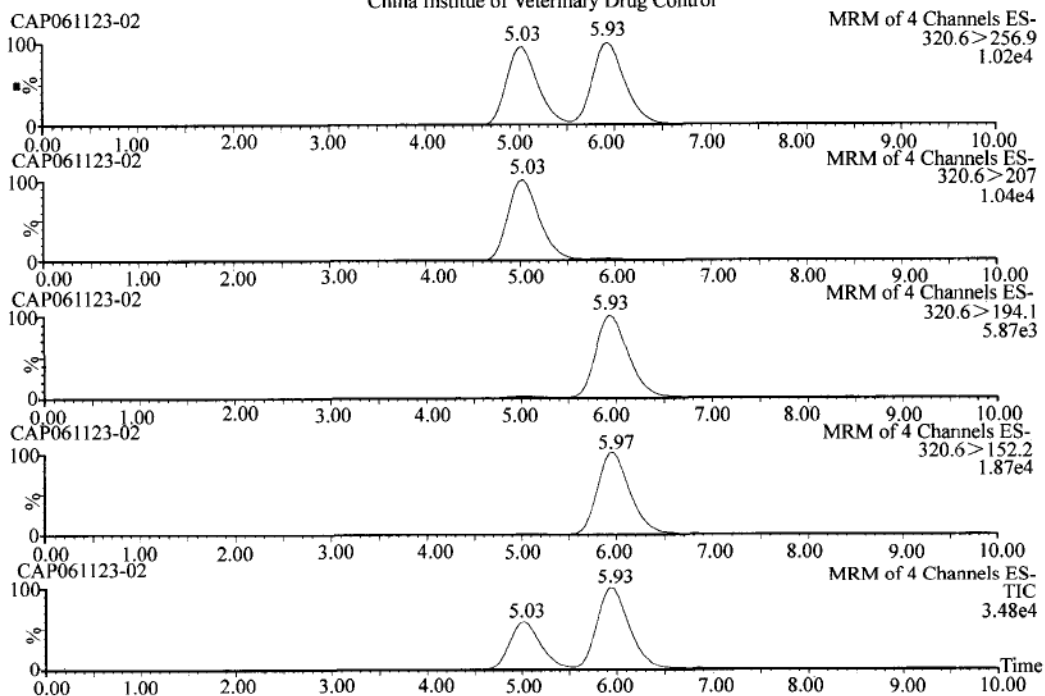


图 B.2 标准溶液中氯霉素及内标特征离子质量色谱图

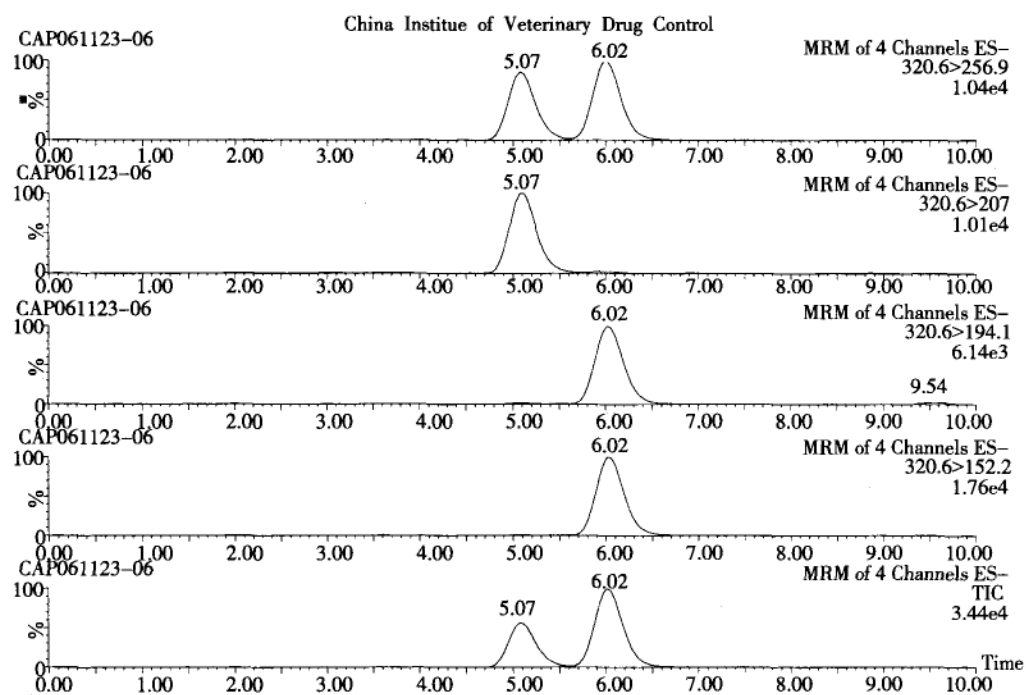


图 B.3 猪肝试样溶液中氯霉素及内标特征离子质量色谱图

质量色谱图中：

- 320.6>152.2, 320.6>194.1 和 320.6>256.9 为氯霉素得到的特征离子质量色谱图；
- 320.6>207 为间位氯霉素得到的特征离子质量色谱图。

