



中华人民共和国国家标准

GB/T 21108—202×

代替 GB/T 21108—2007

GB/T 8381.9—2005

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

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 21108—2007《饲料中氯霉素的测定 高效液相色谱串联质谱法》和GB/T 8381.9-2005《饲料中氯霉素的测定 气相色谱法》，与GB/T 21108—2007和GB/T 8381.9-2005相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了甲砒霉素和氟苯尼考的测定方法（见第1章，2007年版的第1章）；
- b) 适用范围中增加了浓缩饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂（见第1章，2007年版的第1章）；
- c) 更改了检出限和定量限（见第1章，2007年版的第1章）；
- d) 更改了原理（见4，2007年版的第3章）；
- e) 更改了试验步骤（见8，2007年版的第7章）；
- f) 更改了精密度（见10，2007年版的第9章）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位： 。

本文件主要起草人： 。

本文件及其所代替文件历次版本发布情况为：

——2005年首次发布为GB/T 8381.9—2005；

——2007年首次发布为GB/T 21108—2007；

——本次为第一次修订。

饲料中氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的测定。

本文件氯霉素的检出限为 1 µg/kg、定量限为 2.0 µg/kg，甲矾霉素和氟苯尼考的检出限为 5 µg/kg、定量限为 10 µg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的待测物在碱性条件下用乙酸乙酯提取、正己烷脱脂，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 氨水。

5.4 乙酸乙酯。

5.5 正己烷。

5.6 水饱和正己烷：在正己烷（5.5）加入水（5.1），摇动数次，静置分层后取上层使用。

5.7 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取氯霉素（CAS：56-75-7，纯度不低于 98%）、甲矾

霉素（CAS：15318-45-3，纯度不低于98%）和氟苯尼考（CAS：73231-34-2，纯度不低于98%）标准品各10 mg（精确至0.01 mg），分别置于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）溶解、定容，混匀。-18℃以下贮存，有效期6个月。或购买有证标准溶液。

5.8 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：分别准确移取氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准储备溶液（5.7）各1 mL于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释、定容，混匀。-18℃以下贮存，有效期3个月。

5.9 混合标准工作溶液（1 μg/mL）：准确移取1 mL混合标准中间溶液（5.8）于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释、定容，混匀，有效期1个月。

5.10 内标标准储备溶液（1 mg/mL）：称取氘代氯霉素(d₃-氯霉素)（纯度不低于98%）、氘代甲砒霉素(d₃-甲砒霉素)（纯度不低于98%）和氘代氟苯尼考(d₃-氟苯尼考)（纯度不低于98%）标准品各10 mg（精确至0.01 mg）于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）溶解、定容，混匀。-18℃以下贮存，有效期6个月。或购买有证标准溶液。

5.11 内标中间溶液（10 μg/mL）：准确移取1 mL内标标准储备溶液（5.10）于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释、定容，混匀。-18℃以下贮存，有效期3个月。

5.12 内标工作溶液（1 μg/mL）：准确移取1 mL内标中间溶液（5.11）于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释、定容，混匀，有效期1个月。

5.13 混合标准系列溶液：准确移取适量体积的混合标准工作溶液（5.9）及内标工作溶液（5.12）于10 mL容量瓶中，用水（5.1）稀释、定容，混匀，配制成氯霉素质量浓度为0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L，甲砒霉素和氟苯尼考质量浓度为1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L，内标浓度为25 μg/L的系列标准溶液。临用现配。

5.14 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：精度为0.1 mg、0.01 mg。

6.3 涡旋混合器。

6.4 冷冻离心机：转速不低于13 000 r/min。

6.5 氮吹仪。

7 样品

按照GB/T 20195规定制备试样，至少200 g，粉碎使其全部过0.425 mm试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样约2 g（精确至0.01 g），置于50 mL离心管中，准确加入100 μL内标工作溶液（5.12）、10 mL水（5.1）、0.5 mL氨水（5.3）、20 mL乙酸乙酯（5.4），涡旋混合2 min，200 r/min水平振荡提取30 min，于4℃下10 000 r/min离心5 min。准确移

取上层清液 10 mL，于另一 50mL 离心管中，50 °C 下氮气吹干，准确加入 2 mL 水（5.1）和 5 mL 水饱和正己烷（5.6），轻轻摇动 15~20 次，静置 5 min，取下层溶液约 1 mL，13 000 r/min，离心 5 min，过微孔滤膜（5.14），滤液待测。

8.2 测定

8.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.6 μm，或性能相当者；
- 柱温：35 °C；
- 流速：0.3 mL/min；
- 进样量：5 μL；
- 流动相：A 相为水（5.1），B 相为甲醇（5.2），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A相, %	B相, %
0.0	80	20
1.0	80	20
3.0	25	75
5.0	25	75
5.1	80	20
8.0	80	20

8.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 毛细管电压：4.0 kV；
- 离子源温度：350 °C；
- 脱溶剂气温度：300 °C；
- 脱溶剂气流速：7 L/min。

多反应监测（MRM）定性离子对、定量离子对及碰撞能量见表 2。

表 2 多反应监测（MRM）离子对、碰撞能量参考值

待测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 eV
氯霉素	321>152 ^a	321>152 ^a	20
	321>257		12
甲砒霉素	354>185 ^a	354>185 ^a	21
	354>290		13
氟苯尼考	356>336 ^a	356>336 ^a	11

	356>185		20
氘代氯霉素（d5-氯霉素）	326>157 ^a		19
氘代甲砒霉素（d3-甲砒霉素）	357>293 ^a		12
氘代氟苯尼考（d3-氟苯尼考）	359>339 ^a		10
^a 为定量离子			

8.2.3 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.13）和试样溶液（8.1）上机测定。混合标准溶液中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和内标的定量离子色谱图见附录A。

8.2.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物监测离子对的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 定性测定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%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.2.5 定量

以标准溶液中待测组分的峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标，以标准溶液中待测组分的质量浓度和内标质量浓度的比值为横坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测组分质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考含量以质量分数 ω_i 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$\omega_i = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V_1 ——试样提取用乙酸乙酯总体积，单位为毫升（ mL ）；

V_3 ——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

V_2 ——净化用试样提取溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

1 000——换算系数。

$$w_i = \frac{A \times A_{si} \times \rho_s \times \rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times A_i \times \rho_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液待测物色谱峰面积；

A_{si} ——标准溶液内标物色谱峰面积；

ρ_s ——标准溶液待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

ρ_i ——试样溶液内标物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——试样提取用乙酸乙酯总体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——标准溶液待测物色谱峰面积；

A_i ——试样溶液内标物的色谱峰面积；

ρ_{si} ——标准溶液内标物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_2 ——净化用试样提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 精密度

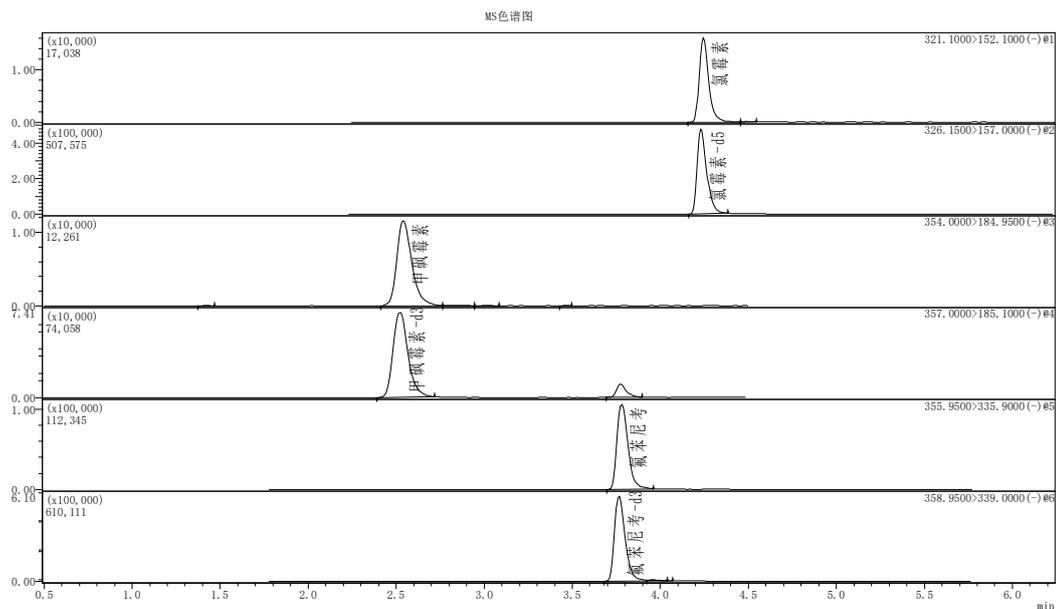
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的15%。

附录 A

(资料性)

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和内标标准溶液定量离子色谱图

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标标准溶液定量离子色谱图见图A.1。



标引序号说明:

- 1——氯霉素;
- 2——甲砒霉素;
- 3——氟苯尼考;
- 4——氯霉素-d5;
- 5——甲砒霉素-d3;
- 6——氟苯尼考-d3。

图B.1 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标标准溶液 (1.0 μg/L) 定量离子色谱图