

中华人民共和国国家标准

农业部 2349 号公告—5—2015

饲料中磺胺类和喹诺酮类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of sulfonamides and quinolones in feeds—
Liquid chromatography tandem mass spectrometry

2015-12-29 发布

2016-04-01 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:河南省兽药饲料监察所、农业部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)。

本标准主要起草人:班付国、吴银良、张发旺、吴宁鹏、彭丽、周红霞、宋志超、陈蔷。

饲料中磺胺类和喹诺酮类药物的测定

液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲噁唑、磺胺二甲唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲噻二唑、苯酰磺胺、磺胺二甲异嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺氯吡嗪、磺胺喹噁啉、磺胺硝苯、甲氧苄啶共 21 种磺胺类药物和萘啶酸、噁喹酸、氟甲喹、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、西诺沙星、洛美沙星、恩诺沙星、那氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星共 13 种喹诺酮类药物含量测定的液相色谱—串联质谱方法。

本标准适用于畜禽配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中磺胺类和喹诺酮类药物的测定。

本标准检出限为 0.05 mg/kg, 定量限为 0.10 mg/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

用氯化乙腈和氢氧化钠溶液提取试样中的待测物, 提取液浓缩后, 用磷酸盐缓冲液溶解, HLB 固相萃取柱净化, 液相色谱—串联质谱法测定, 外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明, 所有试剂均为分析纯, 水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 对照品: 磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲噁唑、磺胺二甲唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲噻二唑、苯酰磺胺、磺胺二甲异嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺氯吡嗪、磺胺喹噁啉、磺胺硝苯、甲氧苄啶、萘啶酸、噁喹酸、氟甲喹、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、西诺沙星、洛美沙星、恩诺沙星、那氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星对照品, 纯度均 $\geq 95\%$ 。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 甲醇: 色谱纯。

4.4 甲酸: 色谱纯。

4.5 乙酸乙酯。

4.6 2%氯化乙腈: 取氨水 2 mL, 加乙腈 98 mL, 混匀。

4.7 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L): 称取 4.0 g 氢氧化钠, 用水溶解并稀释至 1 000 mL。

- 4.8 提取液:取 2%氨化乙腈(4.6)50 mL,加氢氧化钠溶液(4.7)50 mL,混匀。
- 4.9 磷酸盐缓冲液:称取 4.0 g 磷酸二氢钾和 1.0 g 磷酸氢二钾,用水溶解并稀释至 500 mL。
- 4.10 1%甲酸甲醇溶液:取甲酸 1 mL,加甲醇 99 mL,混匀。
- 4.11 0.1%甲酸水溶液:取甲酸 500 μ L,用水定容至 500 mL,混匀。
- 4.12 乙腈—0.1%甲酸水溶液:取乙腈 20 mL,加 0.1%甲酸水溶液(4.11)80 mL,混匀。
- 4.13 标准储备液(1.0 mg/mL):分别精密称取磺胺类和喹诺酮类药物对照品(4.1)适量,置于容量瓶中,用少量二甲亚砜溶解后用甲醇稀释至刻度,分别配制成 1 mg/mL 的标准储备液。于 -20°C 下避光保存,有效期 6 个月。
- 4.14 混合标准中间工作液(20.0 $\mu\text{g/mL}$):分别准确吸取标准储备液(4.13)各 1.0 mL,置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间工作液。于 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。
- 4.15 混合标准工作液:准确量取混合标准中间工作液(4.14)适量,用乙腈—0.1%甲酸水溶液(4.12)稀释,制得浓度为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 的系列标准工作液,现配现用。
- 4.16 HLB 固相萃取柱或相当者。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱—串联质谱仪(配电喷雾离子源)。
- 5.2 分析天平:感量 0.01 mg。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 离心机。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 多管涡旋振荡器。
- 5.7 超声波清洗器。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 氮吹仪。

6 采样和试样制备

6.1 采样

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。

6.2 试样制备

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 分析步骤

7.1 提取

准确称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中。加入提取液(4.8)10.0 mL,涡旋 30 s,振荡 10 min,超声提取 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,移取上清液至另一离心管中。残渣加入提取液 10.0 mL,重复提取 1 次,合并上清液。移取上清液 1.0 mL 于 15 mL 离心管中,于 40°C 下氮气吹干。加入磷酸盐缓冲液(4.9)5 mL 溶解残余物,涡旋 30 s,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

7.2 净化

HLB 固相萃取柱(4.16)依次用甲醇 3 mL、磷酸盐缓冲液(4.9)3 mL 活化,移取全部备用液(7.1)

过柱,水 3 mL 淋洗,抽干。分别用 1%甲酸甲醇溶液(4.10)2 mL、乙酸乙酯 2 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40℃下氮气吹干。加入乙腈—0.1%甲酸水溶液(4.12)1.00 mL 溶解残余物,超声 2 min,混匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,供液相色谱—串联质谱仪测定。

注:酌情稀释后上机测定,避免造成仪器污染。

7.3 标准曲线的制备

取浓度为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 的混合标准工作液(4.15),0.22 μm 微孔滤膜过滤后供液相色谱—串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,混合标准工作液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 100 mm,柱内径 1.0 mm,粒度 1.7 μm ,或相当的分析柱。

柱温:35℃。

流动相:A 相为 0.1%甲酸溶液,B 相为甲醇,梯度洗脱,梯度见表 1。

流速:0.10 mL/min。

进样量:2 μL 。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱条件

时间, min	A 相, %	B 相, %
0	95	5
1.0	95	5
3.5	70	30
9.0	40	60
10.0	0	100
10.1	95	5
12.0	95	5

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应监测(MRM)。

电离电压:1.0 kV。

源温:150℃。

雾化温度:400℃。

锥孔气流速:50 L/h。

雾化气流速:800 L/h。

定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 2。

表 2 定性、定量离子的保留时间、锥孔电压和碰撞能量

药物名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
磺胺吡啶	4.37	250.0>92.0	250.0>156.0	2	24
		250.0>156.0			14
磺胺嘧啶	3.81	251.0>92.0	251.0>155.9	2	24
		251.0>155.9			14
磺胺甲噁唑	5.70	254.0>92.1	254.0>155.9	32	26
		254.0>155.9			14

表 2 (续)

药物名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
磺胺噻唑	5.24	256.0>92.0	256.0>155.9	2	24
		256.0>155.9			14
磺胺甲噁啉	4.55	265.1>92.0	265.1>156.0	36	26
		265.1>156.0			14
磺胺二甲唑	5.05	268.0>92.0	268.0>155.9	2	24
		268.0>155.9			12
磺胺间二甲氧嘧啶	7.10	311.0>92.0	311.0>155.9	2	28
		311.0>155.9			18
磺胺邻二甲氧嘧啶	5.92	311.1>92.0	311.1>155.9	42	28
		311.1>155.9			16
磺胺异噻唑	6.00	268.0>92.0	268.0>155.9	2	24
		268.0>155.9			12
磺胺甲噻二唑	5.15	271.1>92.0	271.1>155.9	2	24
		271.1>155.9			12
苯酰磺胺	6.31	277.0>92.0	277.0>155.9	4	24
		277.0>155.9			10
磺胺二甲异嘧啶	3.99	279.0>124.0	279.0>124.0	2	20
		279.0>186.0			14
磺胺二甲嘧啶	5.12	279.0>92.0	279.0>186.0	2	28
		279.0>186.0			16
磺胺对甲氧嘧啶	5.04	281.0>92.0	281.0>155.9	2	28
		281.0>155.9			16
磺胺甲氧哒嗪	5.33	281.0>92.0	281.0>155.9	2	28
		281.0>155.9			16
磺胺间甲氧嘧啶	5.76	281.0>92.0	281.0>155.9	2	28
		281.0>155.9			16
磺胺氯哒嗪	5.56	285.0>92.0	285.0>156.0	4	26
		285.0>156.0			12
磺胺氯吡嗪	6.77	285.0>92.0	285.0>92.0	4	26
		285.0>156.0			12
磺胺喹噁啉	7.40	301.1>92.0	301.1>155.9	2	26
		301.1>155.9			14
磺胺硝苯	9.00	336.1>156.0	336.1>156.0	20	10
		336.1>294.0			10
甲氧苄啶	5.10	291.1>230.0	291.1>230.0	6	22
		291.1>261.0			24
萘啶酸	8.62	233.0>187.0	233.0>215.0	2	24
		233.0>215.0			14
噁嗪酸	7.34	262.0>160.0	262.0>215.9	2	34
		262.0>215.9			28
氟甲唑	9.05	262.0>126.0	262.0>202.0	4	42
		262.0>202.0			30
诺氟沙星	5.41	320.1>233.0	320.1>276.1	14	22
		320.1>276.1			14
环丙沙星	5.52	332.1>231.0	332.1>231.0	2	30
		332.1>288.1			16

表 2 (续)

药物名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
培氟沙星	5.29	334.1>290.1	334.1>316.1	26	16
		334.1>316.1			20
西诺沙星	4.55	263.0>189.0	263.0>189.0	4	24
		263.0>217.0			20
洛美沙星	5.71	352.1>265.1	352.1>265.1	38	20
		352.1>308.1			16
恩诺沙星	5.69	360.1>245.1	360.1>316.1	38	24
		360.1>316.1			16
那氟沙星	9.91	361.1>316.1	361.1>343.1	28	50
		361.1>343.1			20
氧氟沙星	5.28	362.1>261.1	362.1>318.1	4	24
		362.1>318.1			18
沙拉沙星	5.99	386.1>299.0	386.1>342.1	28	24
		386.1>342.1			16
二氟沙星	5.82	400.1>356.1	400.1>356.1	42	18
		400.1>382.1			20

7.4.3 定性测定

待测物选择 1 个母离子和 2 个子离子,在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与混合标准工作液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且试样中标化合物两个子离子的相对丰度与浓度接近的混合标准工作液相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样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
允许的最大偏差, %	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.4 定量测定

取试样溶液和混合标准工作液上机分析,得到色谱峰面积响应值,作单点或多点校准,用外标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液浓度超过线性范围时,稀释后重新测定。混合标准工作液的特征离子色谱图参见附录 A。

8 结果计算与表示

试样中待测物的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \times n \quad (1)$$

式中:

X —— 试样中待测物的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A —— 试样溶液中待测物的峰面积;

A_s —— 混合标准工作液中待测物峰面积;

C_s —— 混合标准工作液中待测物浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m —— 试样的质量,单位为克(g);

V —— 溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);

V_1 —— 过固相萃取柱的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——总提取液体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数。

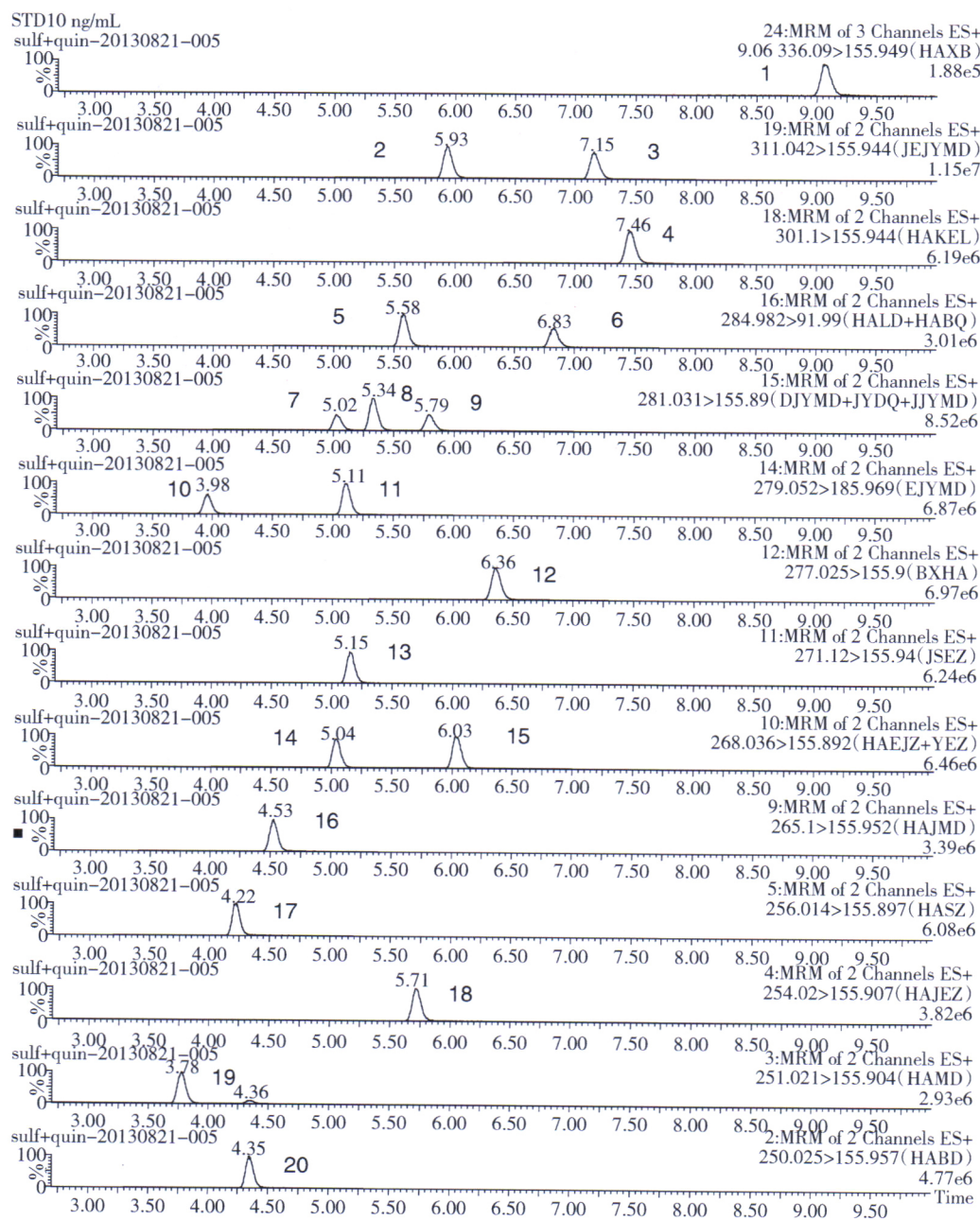
测定结果用两次平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

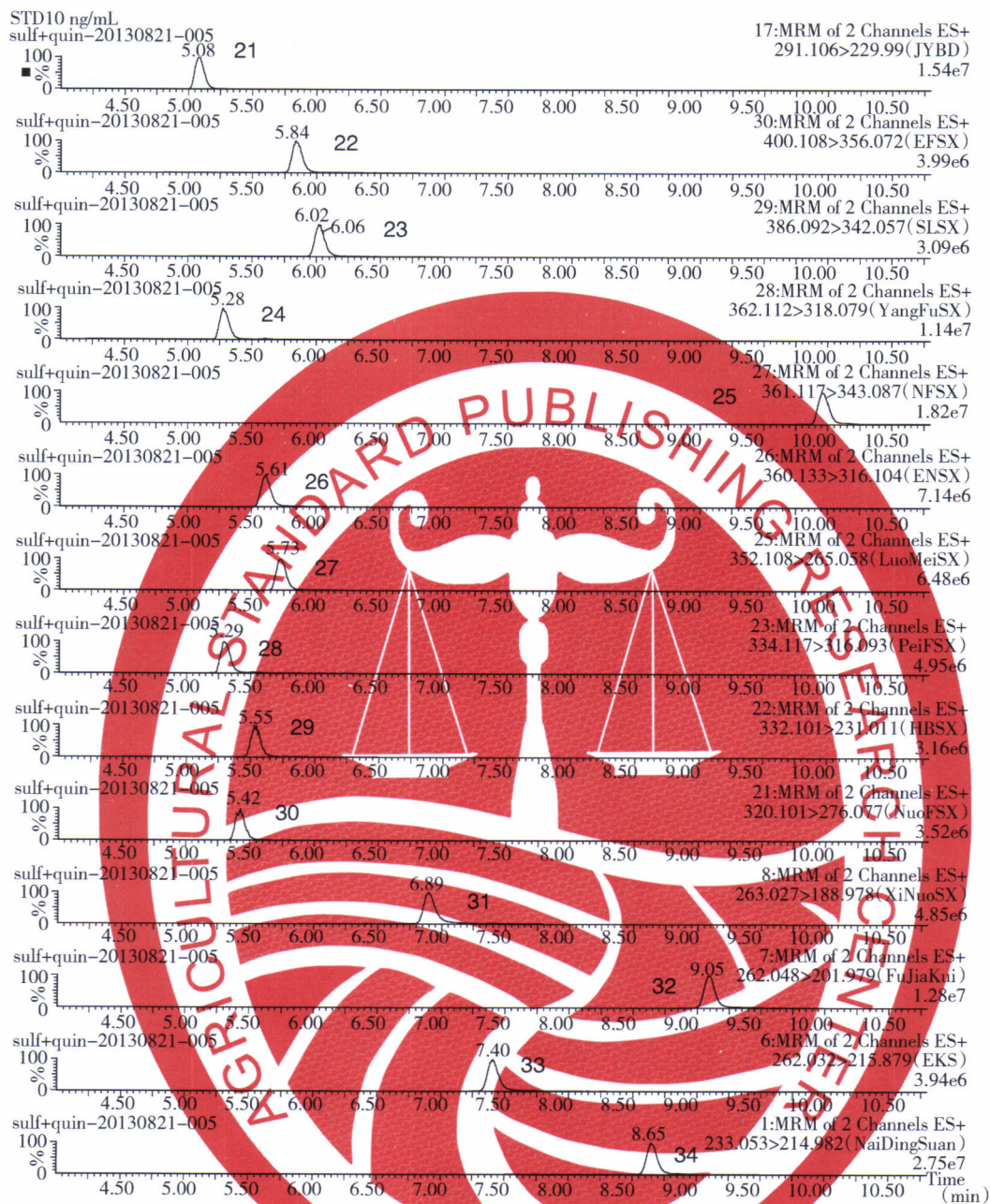
9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与这两个测定值算术平均值的绝对差值不大于该平均值的 20%。

附 录 A
(资料性附录)
混合标准工作液特征离子色谱图

21 种磺胺类药物和 13 种喹诺酮类药物混合标准工作液的特征离子色谱图见图 A. 1。





说明：

- | | | | |
|--------------|--------------|-----------|-----------|
| 1——磺胺硝苯； | 10——磺胺二甲异噻唑； | 19——磺胺噻唑； | 28——培氟沙星； |
| 2——磺胺邻二甲氧噻唑； | 11——磺胺二甲噻唑； | 20——磺胺吡啶； | 29——环丙沙星； |
| 3——磺胺间二甲氧噻唑； | 12——苯酰磺胺； | 21——甲氧苄啶； | 30——诺氟沙星； |
| 4——磺胺喹咪唑； | 13——磺胺甲噻二唑； | 22——二氟沙星； | 31——西诺沙星； |
| 5——磺胺氯噻唑； | 14——磺胺二甲唑； | 23——沙拉沙星； | 32——氟甲喹； |
| 6——磺胺氯吡唑； | 15——磺胺异噻唑； | 24——氧氟沙星； | 33——噻啉酸； |
| 7——磺胺对甲氧噻唑； | 16——磺胺甲噻唑； | 25——那氟沙星； | 34——萘啶酸。 |
| 8——磺胺甲氧噻唑； | 17——磺胺噻唑； | 26——恩诺沙星； | |
| 9——磺胺间甲氧噻唑； | 18——磺胺甲噻唑； | 27——洛美沙星； | |

图 A.1 21 种磺胺类和 13 种喹诺酮类药物混合标准工作液 (10 ng/mL) 的特征离子色谱图