

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4440—2023

畜禽液体粪污中四环素类、磺胺类和 喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of tetracyclines, sulfonamides and quinolones residues in liquid
manure of livestock and poultry—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部

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。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国农业科学院都市农业研究所。

本文件主要起草人：陈刚、陶秀萍、王安如、贾曼、薛毅、胡剑。



畜禽液体粪污中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了畜禽液体粪污中 4 种四环素类(四环素、土霉素、金霉素和多西环素)、15 种磺胺类(磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噁唑、磺胺甲氧嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺苯吡唑、磺胺脒、磺胺醋酐钠、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉)和 14 种喹诺酮类(诺氟沙星、氟罗沙星、司帕沙星、奥比沙星、恩诺沙星、达氟沙星、培氟沙星、二氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、洛美沙星、氧氟沙星、氟甲喹、噁喹酸)药物残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、鸡等畜禽液体粪污中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定。

本文件畜禽液体粪污中四环素类、磺胺类和喹诺酮类 33 种药物残留量的测定方法检出限为 2 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 5 $\mu\text{g/L}$ 。

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 27522 畜禽养殖污水采样技术规范

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本文件。

3.1

畜禽液体粪污 liquid manure of livestock and poultry

畜禽养殖过程中产生的粪便、尿液、污水、养殖垫料和少量散落饲料等组成的液体混合物。

注:一般指干物质(DM)含量 $\leq 15\%$ 的畜禽粪污。

4 原理

试样中待测物经 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲液和乙腈-甲醇溶液提取,QuEChERS 方法净化,用液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配标准溶液校准,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有说明,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 乙腈:色谱纯。

5.4 萃取盐包:每份含 4 g 无水硫酸钠及 1 g 氯化钠。

5.5 分散净化剂:每份含 900 mg 无水硫酸钠、150 mg C_{18} 及 50 mg N-丙基乙二胺(PSA)。

5.6 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲液:准确称取无水磷酸氢二钠 10.9 g、乙二胺四乙酸二钠 3 g、柠檬酸 12.9 g,加水溶解并定容至 1 000 mL。

- 5.7 乙腈-甲醇溶液:量取 750 mL 乙腈(5.3)与 250 mL 甲醇(5.2),混匀。
- 5.8 80%甲醇溶液:量取 800 mL 甲醇(5.2),加水定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.9 0.2%甲酸溶液:量取 2 mL 甲酸,加水定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.10 0.2%甲酸甲醇溶液:量取 2 mL 甲酸,用甲醇(5.2)定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.11 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取标准品(见附录 A 中表 A.1)各 10 mg(精确至 0.01 mg),分别用表中标明的溶剂溶解,并用甲醇(5.2)定容至 10 mL,混匀。置于-18℃以下避光保存。磺胺类和喹诺酮类标准储备溶液有效期为 6 个月,四环素类标准储备溶液有效期为 1 个月。
- 5.12 混合标准中间溶液(5 μg/mL):准确吸取标准储备溶液(5.11)各 50 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.2)稀释至刻度,现用现配。
- 5.13 混合标准系列工作溶液:准确移取混合标准中间溶液(5.12)适量,用 80%甲醇溶液(5.8)稀释成 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 200 ng/mL 混合标准系列工作溶液,现用现配。
- 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:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 6.2 分析天平:感量 0.01 mg 和 0.01 g。
- 6.3 涡旋混合仪。
- 6.4 冷冻离心机:转速不低于 10 000 r/min。
- 6.5 氮吹仪。
- 6.6 超声波清洗器。

7 样品

- 7.1 按照 GB/T 27522 的规定取样。取样后,样品应在-18℃以下保存。试验前,取适量恢复至室温的样品,混匀备用。
- 7.2 空白样品:选取类型相同、均匀一致且在待测物保留时间处、仪器响应值小于方法定量限 30%的畜禽液体粪污样品,作为空白试样。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做 2 份试验。准确移取样品 2 mL 于 50 mL 离心管中,加入 2 mL Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液(5.6),涡旋混匀 1 min,加入 8 mL 乙腈-甲醇溶液(5.7)提取,涡旋混匀后超声提取 15 min,于 4℃条件下 10 000 r/min 离心 10 min。取全部上层清液于 50 mL 离心管中,加入萃取盐包(5.4),涡旋混匀 1 min,静置 10 min 盐析分层,于 4℃条件下 10 000 r/min 离心 10 min,取上层有机相,备用。

8.2 净化

取 5 mL 有机相(8.1)于 15 mL 离心管中,加入一份分散净化剂(5.5),涡旋混匀 1 min,于 4℃条件下 10 000 r/min 离心 5 min。取 4 mL 上层清液于 40℃水浴条件下氮气吹干,用 80%甲醇溶液(5.8)定容至 1 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜(5.14),供液相色谱-串联质谱仪分析测定。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品若干份,按 8.1 和 8.2 处理,氮气吹干,得到空白基质。分别准确加入混合标准系列工作溶液各 1 mL(5.13)复溶,配制成 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈柱, 柱长 150 mm, 内径 3.0 mm, 粒径 1.8 μm, 或性能相当者;
柱温: 30 ℃;
流速: 0.3 mL/min;
进样量: 5 μL;
流动相 A: 0.2% 甲酸溶液(5.9);
流动相 B: 0.2% 甲酸甲醇溶液(5.10);
梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	90	10
0.50	90	10
0.60	65	35
1.00	65	35
6.00	10	90
10.00	10	90
10.10	90	10
15.00	90	10

8.4.2 串联质谱参考条件

电离方式: 电喷雾离子源, 正离子模式(ESI⁺);
监测方式: 多反应监测(MRM);
碰撞气(CAD): 34.475 kPa(5 psi);
雾化气(GS1): 413.7 kPa(60 psi);
辅助气(GS2): 413.7 kPa(60 psi);
喷雾电压(IS): 5 000 V;
离子源温度(TEM): 500 ℃;
多反应监测(MRM)离子对、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2 33 种药物的多反应监测(MRM)离子对、去簇电压及碰撞能量的参考值

类别	被测物名称	监测离子对, m/z	去簇电压, V	碰撞能量, eV
四环素类	四环素	445.1>410.1 ^a	90	30
		445.1>427.7		30
	土霉素	461.0>426.3 ^a	110	28
		461.0>443.0		19
	金霉素	479.1>443.9 ^a	120	30
		479.1>462.0		25
	多西环素	445.4>427.6 ^a	90	27
		445.4>410.3		29
磺胺类	磺胺嘧啶	251.5>155.9 ^a	72	21
		251.5>108.1		34
	磺胺二甲基嘧啶	278.9>108.2 ^a	85	27
		278.9>156.2		38
	磺胺氯吡嗪	285.0>156.1 ^a	70	23
		285.0>108.0		33
	磺胺甲噁唑	254.2>156.1 ^a	72	23
		254.2>108.1		32
	磺胺甲氧嗪	281.0>156.0 ^a	75	25
		281.0>108.0		27
	磺胺对甲氧嘧啶	281.1>156.0 ^a	70	25
		281.1>108.0		30

表 2 （续）

类别	被测物名称	监测离子对, m/z	去簇电压,V	碰撞能量,eV
磺胺类	磺胺间甲氧嘧啶	281.1>156.1 ^a	75	25
		281.1>108.1		30
	磺胺噻唑	256.1>156.1 ^a	62	22
		256.1>108.1		34
	磺胺间二甲氧嘧啶	311.2>108 ^a	90	39
		311.2>156		44
	磺胺甲噻二唑	271.1>156.1 ^a	40	21
		271.1>107.8		34
	磺胺苯吡唑	315.0>158.0 ^a	90	40
		315.0>108.0		40
	磺胺脒	214.8>155.9 ^a	60	21
		214.8>108		30
	磺胺醋酰钠	215.0>107.9	60	27
		215.0>156.0 ^a		15
	磺胺邻二甲氧嘧啶	311.1>155.9 ^a	120	30
		311.1>108		37
磺胺喹噁啉	301.0>156.1 ^a	73	24	
	301.0>108.1		37	
喹诺酮类	诺氟沙星	320.1>302.2 ^a	100	29
		320.1>276		25
	氟罗沙星	370.3>326.4 ^a	117	27
		370.3>269.1		37
	司帕沙星	393.4>292.2	74	34
		393.4>349.2 ^a		29
	奥比沙星	396.4>295.2	90	35
		396.4>352.0 ^a		27
	恩诺沙星	360.1>342.5	120	30
		360.1>316.0 ^a		30
	达氟沙星	358.3>340.3 ^a	80	31
		358.3>314.1		25
	培氟沙星	334.3>290.3 ^a	94	25
		334.3>233.4		41
	二氟沙星	400.2>356.3 ^a	70	31
		400.2>299.5		36
	环丙沙星	332.1>314.0 ^a	110	30
		332.1>288.0		27
	沙拉沙星	386.1>368.1 ^a	70	30
		386.1>342.2		30
	洛美沙星	352.2>265.5 ^a	80	30
		352.2>334.6		30
	氧氟沙星	362.5>261.4	112	38
		362.5>318.2 ^a		27
	氟甲喹	262.0>202.0	85	45
		262.0>244.2 ^a		40
	噁喹酸	262.2>216.1 ^a	90	33
		262.2>244.2		10
^a 为定量离子。				

8.4.3 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差应在±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定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹

配系列标准溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,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

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.4 定量

以基质匹配标准系列溶液(8.3)的浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。所测试样中药物的响应值应均在标准曲线的线性范围内。如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差应不超过 30%。33 种药物的标准溶液定量离子色谱图见附录 B。

9 试验数据处理

试样中药物的残留量 ω 以质量分数计,数值以微克每升($\mu\text{g/L}$)表示。单点校准按公式(1)计算,多点校准按公式(2)计算。

$$\omega = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_3 \times v \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- A —— 试样溶液中待测物的色谱峰面积;
- C_s —— 基质匹配标准系列溶液中待测物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 —— 提取溶液中有有机相体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 氮吹所用净化溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- A_s —— 基质匹配系列标准溶液中待测物的峰面积;
- V_3 —— 氮气吹干后复溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- v —— 试样体积的数值,单位为毫升(mL)。

$$\omega = \frac{C_i \times V_1 \times V_2 \times 1000}{V_3 \times v \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- C_i —— 从基质匹配标准曲线查得的试样溶液中待测物 i 的浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 —— 提取溶液中有有机相体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 氮吹所用净化溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_3 —— 氮吹吹干后复溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- v —— 试样体积的数值,单位为毫升(mL)。

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。

10 精密度

在重复性条件下,2 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)

四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准品纯度和配制溶剂信息

四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准品纯度和配制溶液信息见表 A.1。

表 A.1 四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准品纯度和配制溶剂信息

类别	序号	中文名称	英文名称	CAS号	纯度,%	溶剂
四环素类	1	四环素	Tetracycline	60-54-8	≥97.6	甲醇
	2	土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	≥98.0	甲醇
	3	金霉素	Chlortetracycline	57-62-5	≥94.5	甲醇
	4	多西环素	Doxycycline	564-25-0	≥98.5	甲醇
磺胺类	5	磺胺嘧啶	Sulfadiazine	68-35-9	≥98.5	甲醇
	6	磺胺二甲基嘧啶	Sulfadimidine	57-68-1	≥98.5	甲醇
	7	磺胺氯吡嗪	Sulfachloropyridazine	80-32-0	≥98.0	甲醇
	8	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	≥98.0	甲醇
	9	磺胺甲氧嘧啶	Sulfamethoxypyridazine	80-35-3	≥98.5	甲醇
	10	磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	651-06-9	≥98.0	甲醇
	11	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	1220-83-3	≥98.5	甲醇
	12	磺胺噻唑	Sulfathiazole	72-14-0	≥98.5	甲醇
	13	磺胺间二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxypyrimidine	155-91-9	≥98.5	甲醇
	14	磺胺甲噻二唑	Sulfamethizole	144-82-1	≥98.5	甲醇
	15	磺胺苯吡唑	Sulfaphenazolum	526-08-9	≥98.5	甲醇
	16	磺胺脒	Sulfaguanidine	57-67-0	≥98.5	甲醇
	17	磺胺醋酐钠	Sulfacetamide Sodium	127-56-0	≥98.5	90%甲醇溶液
	18	磺胺邻二甲氧嘧啶	sulfadimoxine	2447-57-6	≥98.5	甲醇
	19	磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	59-40-5	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
喹诺酮类	20	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	≥98.5	甲醇
	21	氟罗沙星	Fleroxacin	79660-72-3	≥98.5	甲醇
	22	司帕沙星	Sparfloxacin	110871-86-8	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
	23	奥比沙星	Orbifloxacin	113617-63-3	≥97.7	5%氨水甲醇溶液
	24	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	≥98.5	甲醇
	25	达氟沙星	Danofloxacin	112398-08-0	≥94.2	甲醇
	26	培氟沙星	Pefloxacin	149676-40-4	≥98.5	甲醇
	27	二氟沙星	Difluoxacin	98106-17-3	≥98.5	甲醇
	28	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
	29	沙拉沙星	Sarafloxacin	98105-99-8	≥97.0	5%氨水甲醇溶液
	30	洛美沙星	Lomefloxacin	98079-51-7	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
	31	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
	32	氟甲喹	flumequine	42835-25-6	≥98.5	5%氨水甲醇溶液
	33	噁喹酸	Oxolinic Acid	14698-29-4	≥98.0	5%氨水甲醇溶液

附 录 B
(资料性)

四环素类、磺胺类和喹诺酮类 33 种药物的标准溶液定量离子色谱图

四环素类、磺胺类和喹诺酮类 33 种药物的标准溶液(50 ng/mL)定量离子色谱图见图 B. 1～图 B. 33。

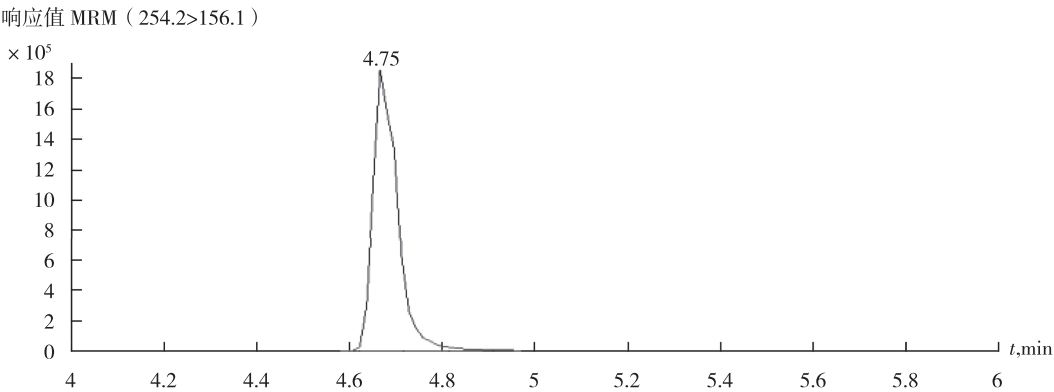


图 B. 1 磺胺甲噁唑标准溶液定量离子色谱图(RT=4.75 min)

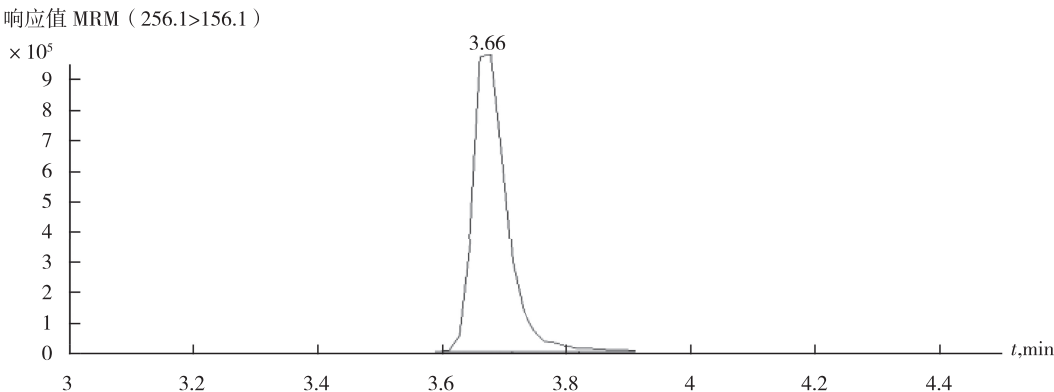


图 B. 2 磺胺噻唑标准溶液定量色谱图(RT=3.66 min)

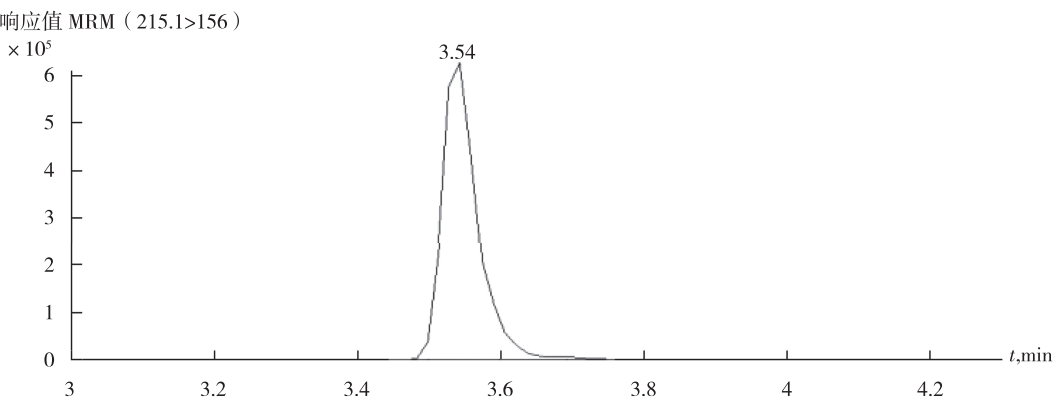


图 B. 3 磺胺醋酰钠标准溶液定量离子色谱图(RT=3.54 min)

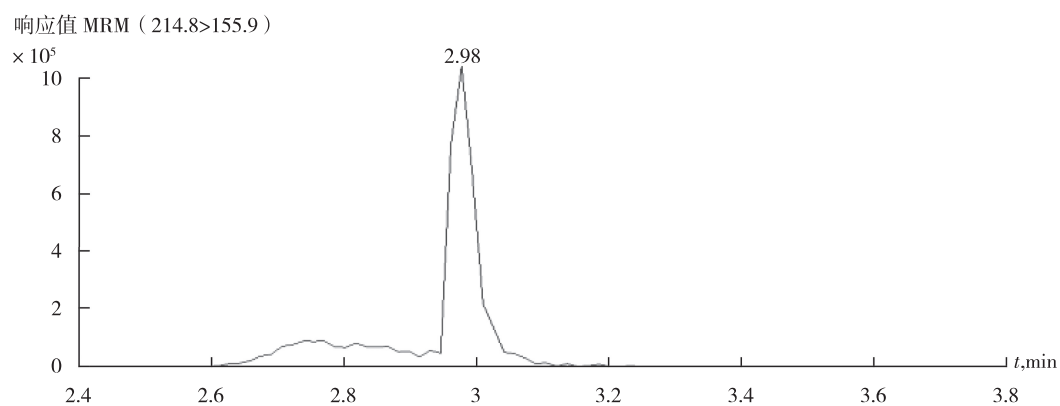


图 B.4 磺胺脒标准溶液定量离子色谱图(RT=2.98 min)

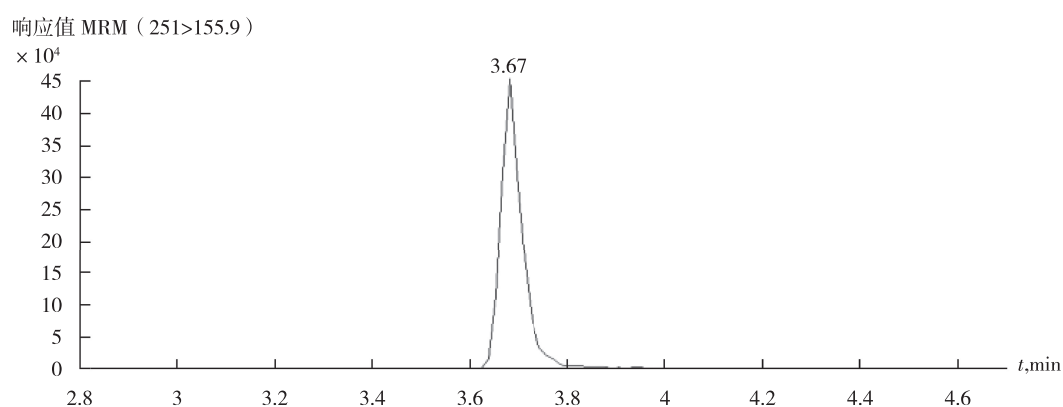


图 B.5 磺胺嘧啶标准溶液定量离子色谱图(RT=3.67 min)

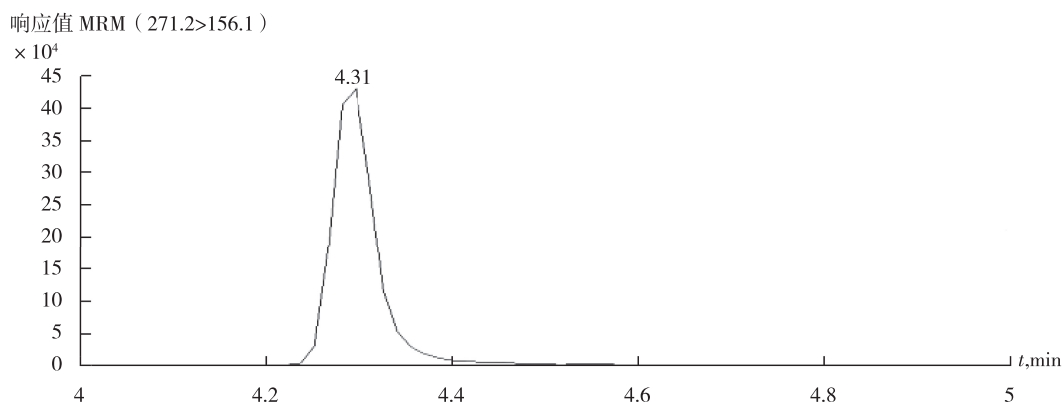


图 B.6 磺胺甲噻二唑标准溶液定量离子色谱图(RT=4.31 min)

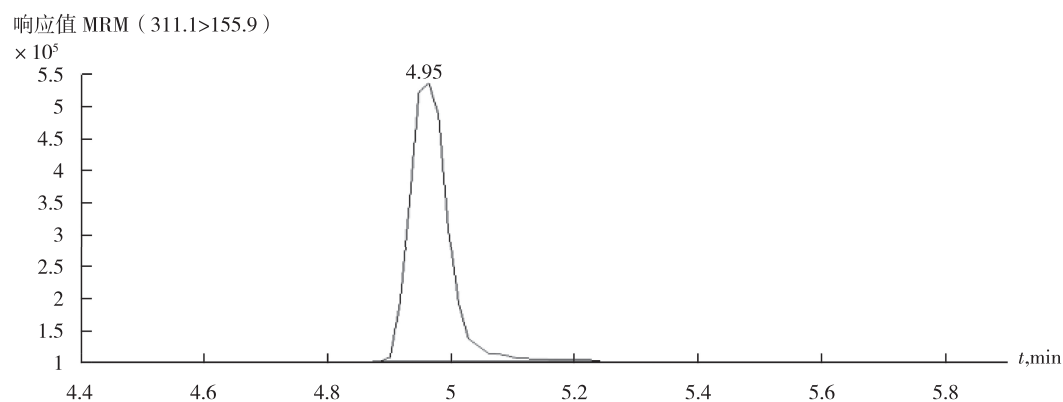


图 B.7 磺胺邻二甲氧嘧啶标准溶液定量离子色谱图(RT=4.95 min)

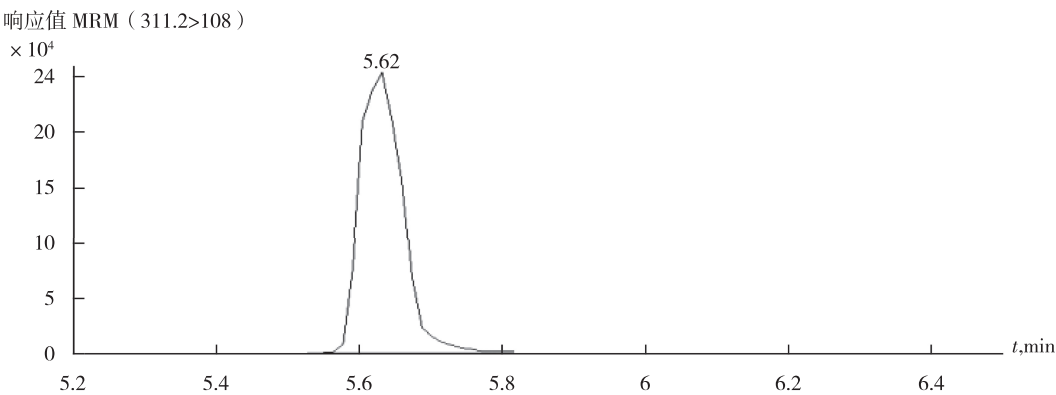


图 B.8 磺胺间二甲氧嘧啶标准溶液定量离子色谱图 (RT=5.62 min)

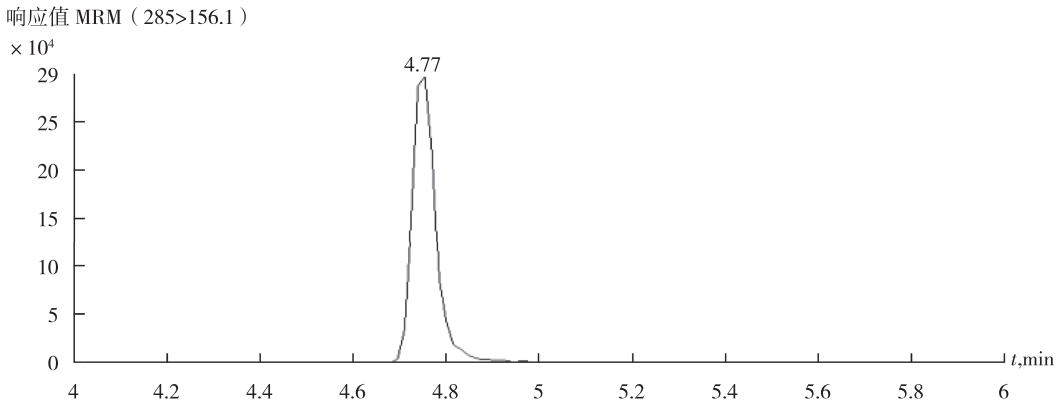


图 B.9 磺胺氯哒嗪标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.77 min)

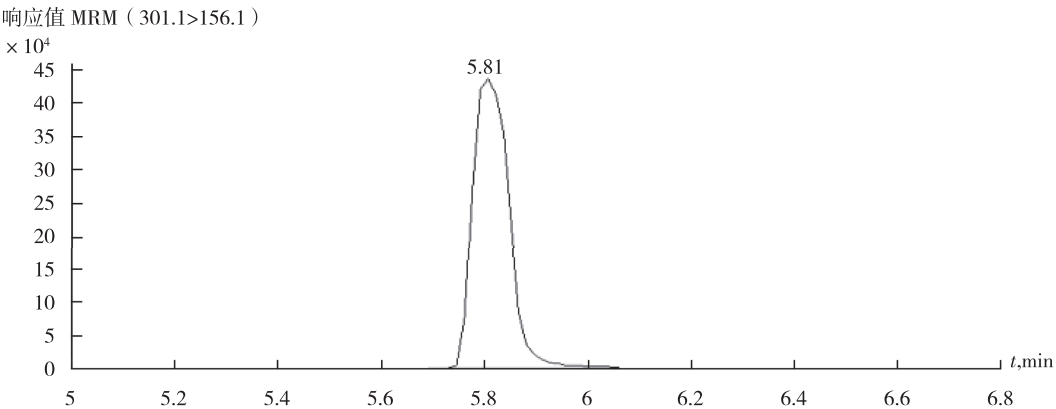


图 B.10 磺胺喹噁啉标准溶液定量离子色谱图 (RT=5.81 min)

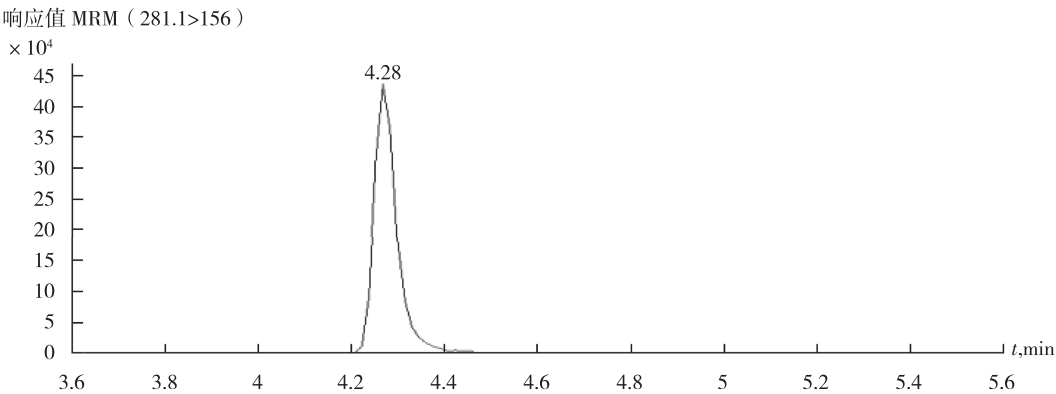


图 B.11 磺胺对甲氧嘧啶标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.28 min)

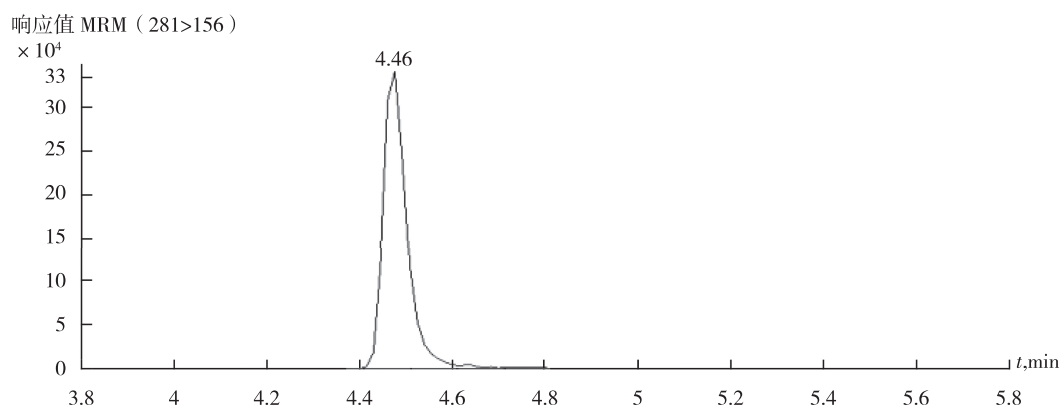


图 B.12 磺胺甲氧嗪标准溶液定量离子色谱图(RT=4.46 min)

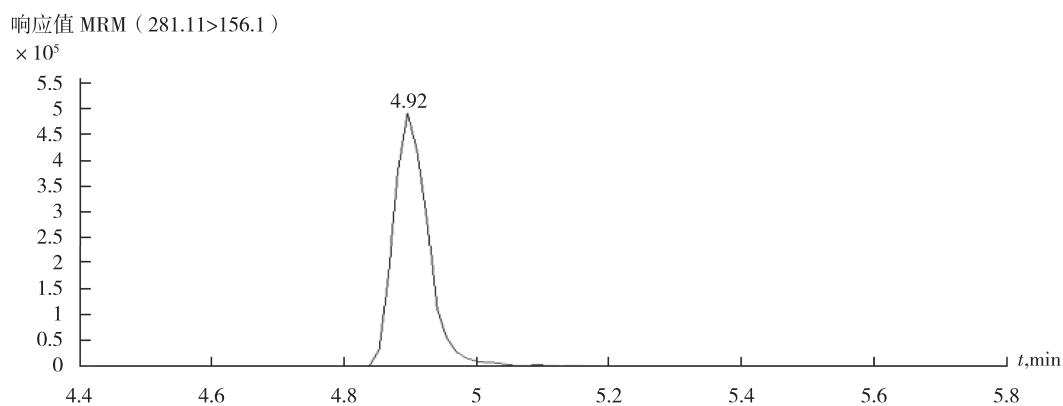


图 B.13 磺胺间甲氧嘧啶标准溶液定量离子色谱图(RT=4.92 min)

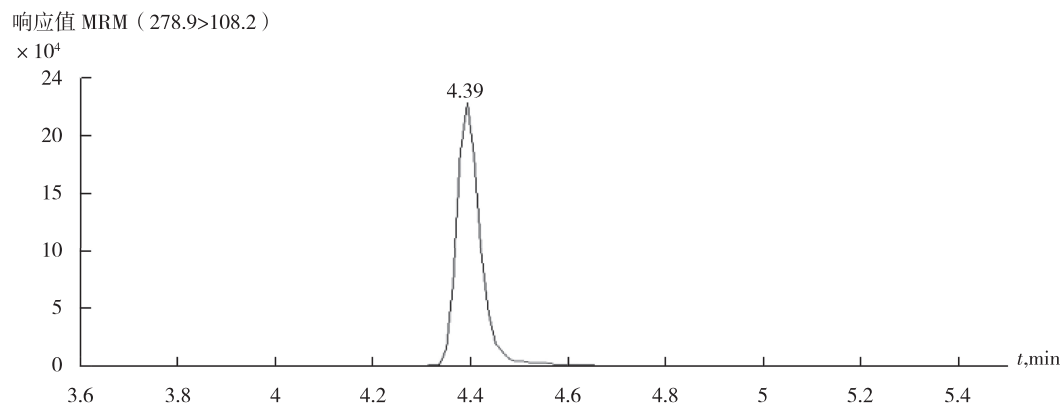


图 B.14 磺胺二甲基嘧啶标准溶液定量离子色谱图(RT=4.39 min)

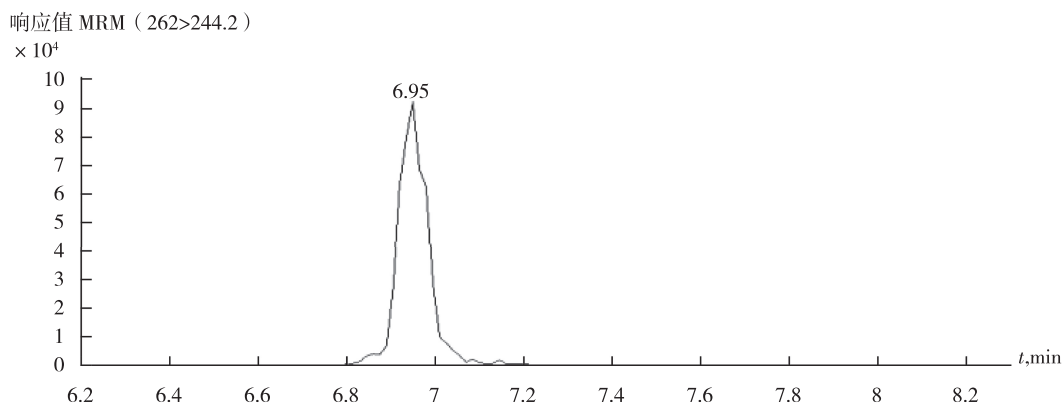


图 B.15 氟甲喹标准溶液定量离子色谱图(RT=6.95 min)

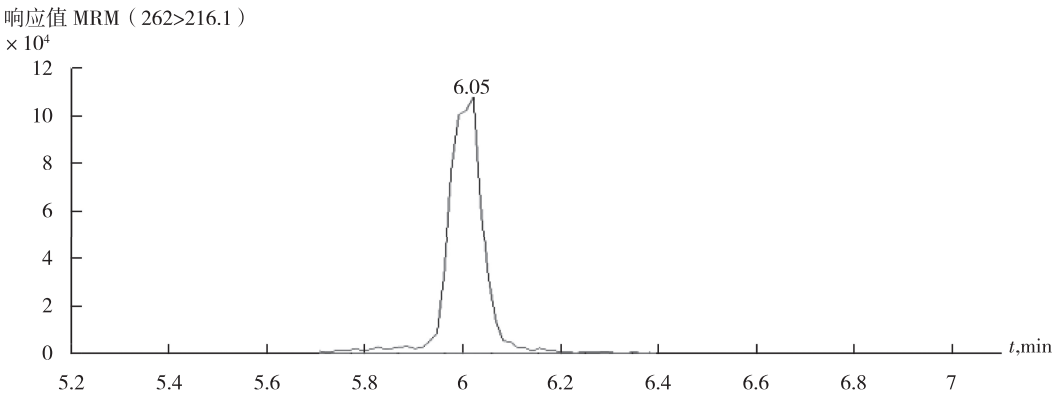


图 B. 16 噻嗪酸标准溶液定量离子色谱图 (RT=6.05 min)

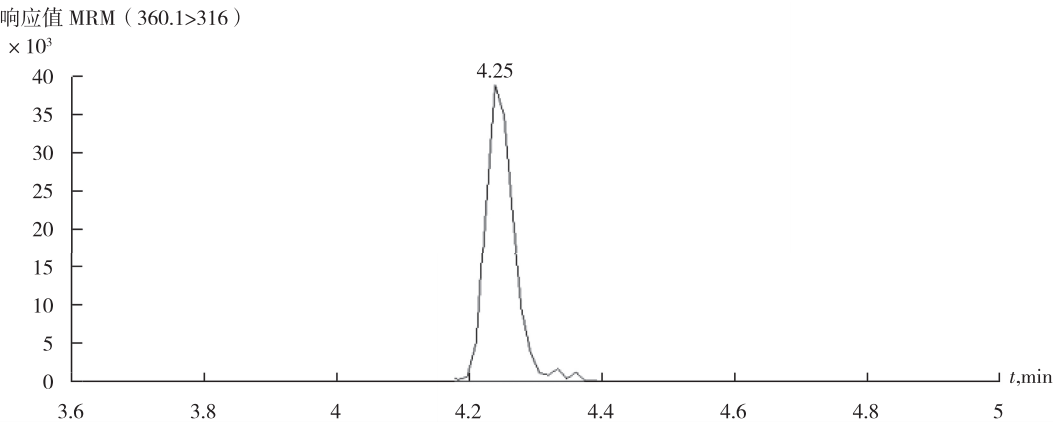


图 B. 17 恩诺沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.25 min)

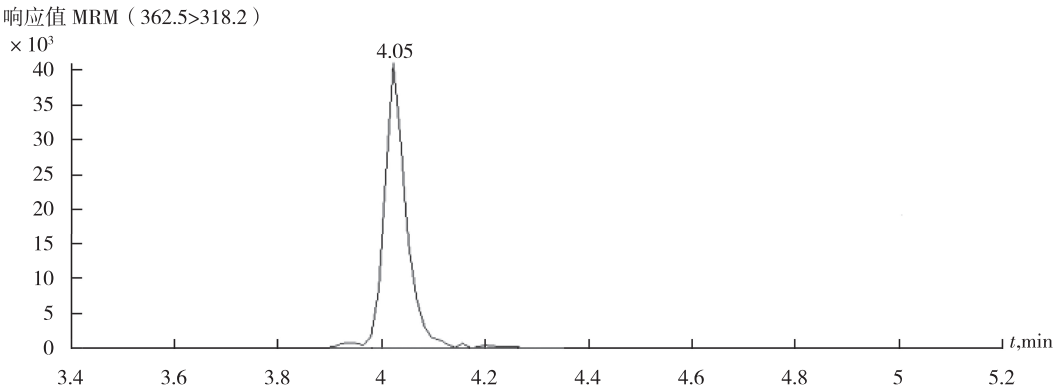


图 B. 18 氧氟沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.05 min)

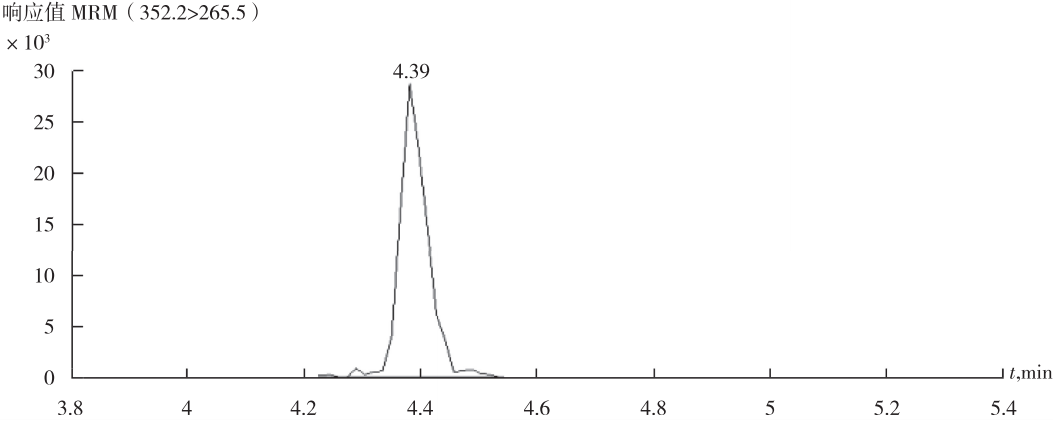


图 B. 19 洛美沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.39 min)

响应值 MRM (358.3>340.1)

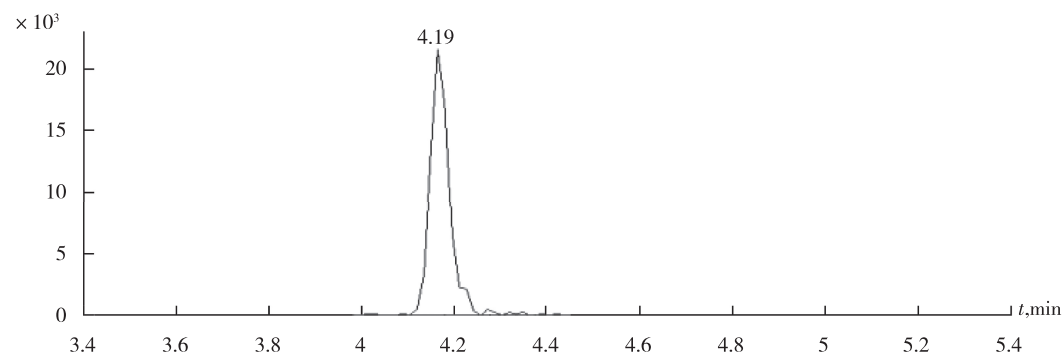


图 B.20 达氟沙星标准溶液定量离子色谱图(RT=4.19 min)

响应值 MRM (332.1>314)

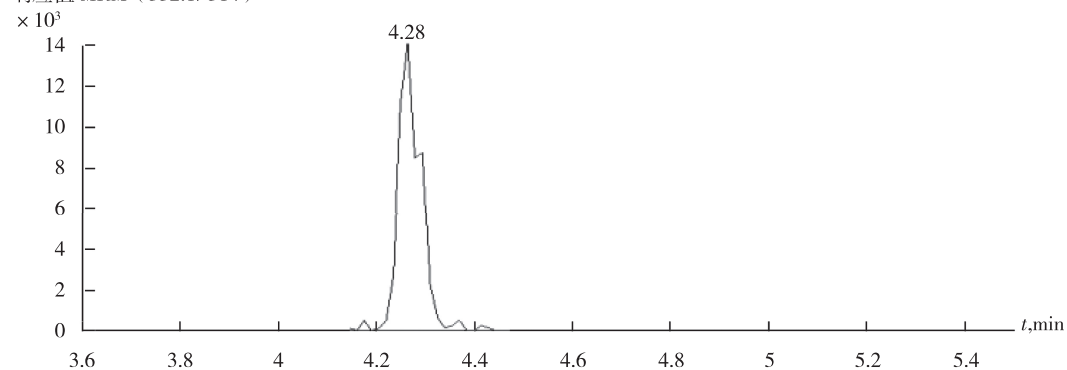


图 B.21 环丙沙星标准溶液定量离子色谱图(RT=4.28 min)

响应值 MRM (334.3>290.3)

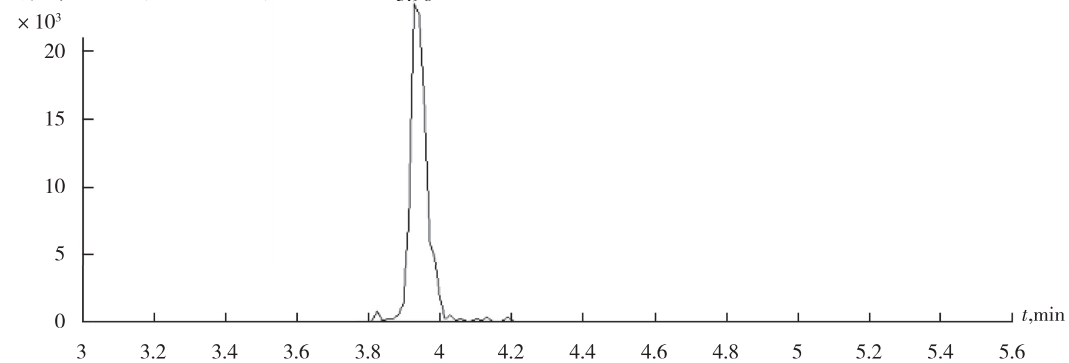


图 B.22 培氟沙星标准溶液定量离子色谱图(RT=3.96 min)

响应值 MRM (315>158)

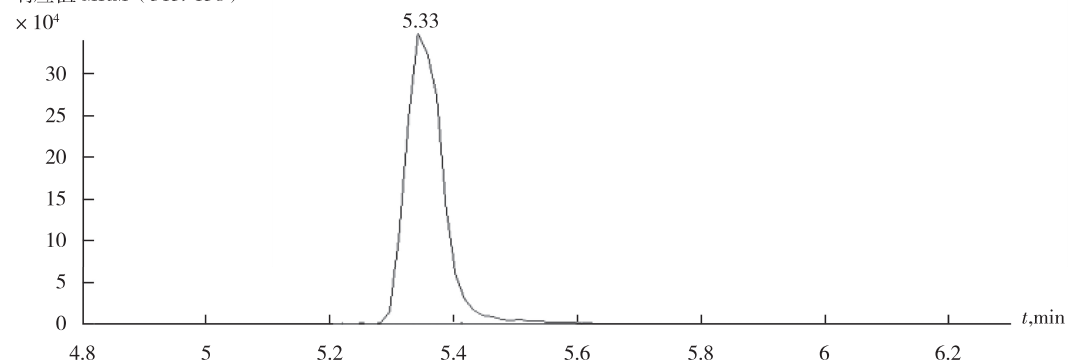


图 B.23 磺胺苯吡唑标准溶液定量离子色谱图(RT=5.33 min)

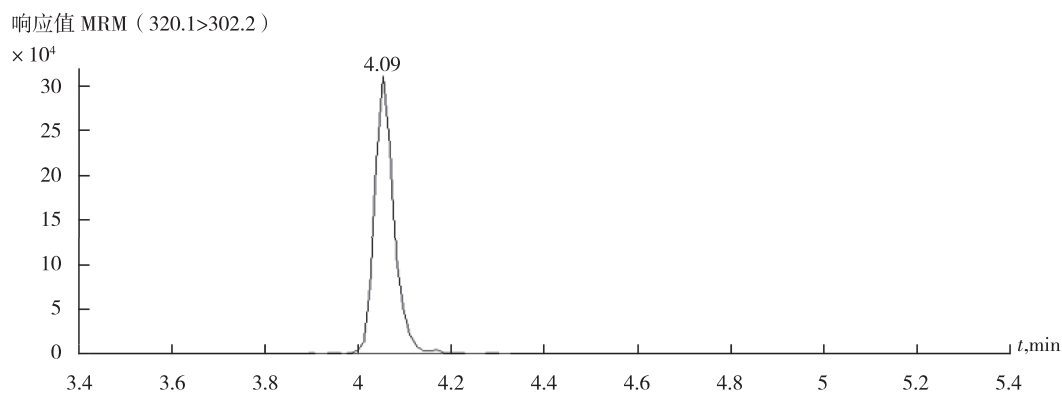


图 B.24 诺氟沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.09 min)

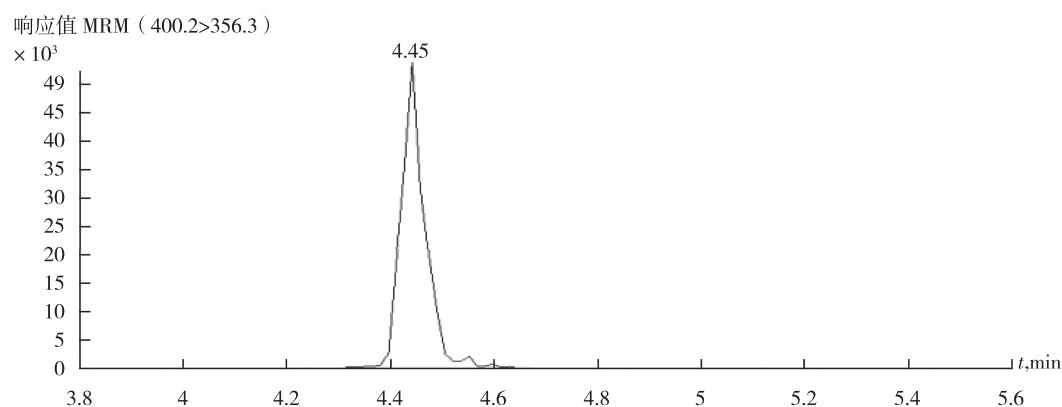


图 B.25 二氟沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.45 min)

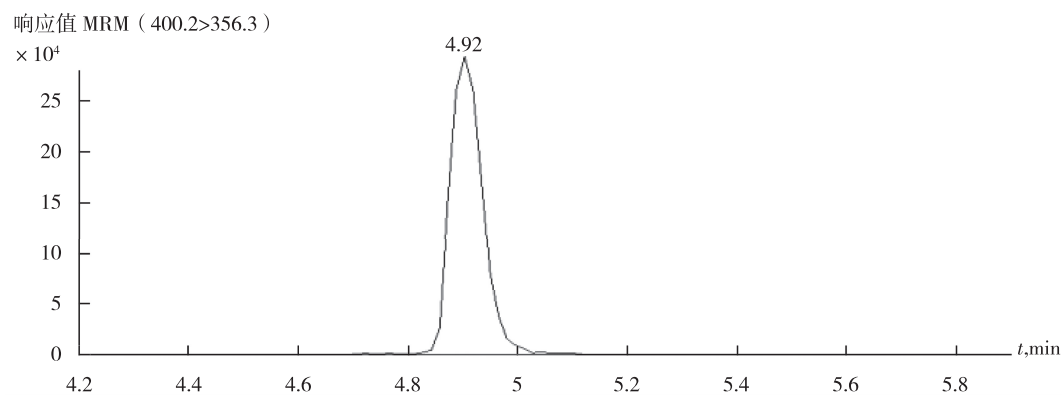


图 B.26 司帕沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.92 min)

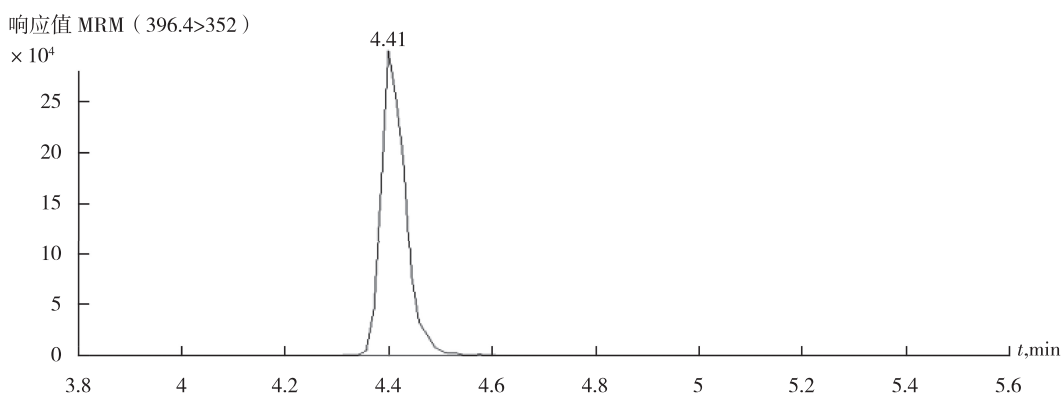


图 B.27 奥比沙星标准溶液定量离子色谱图 (RT=4.41 min)

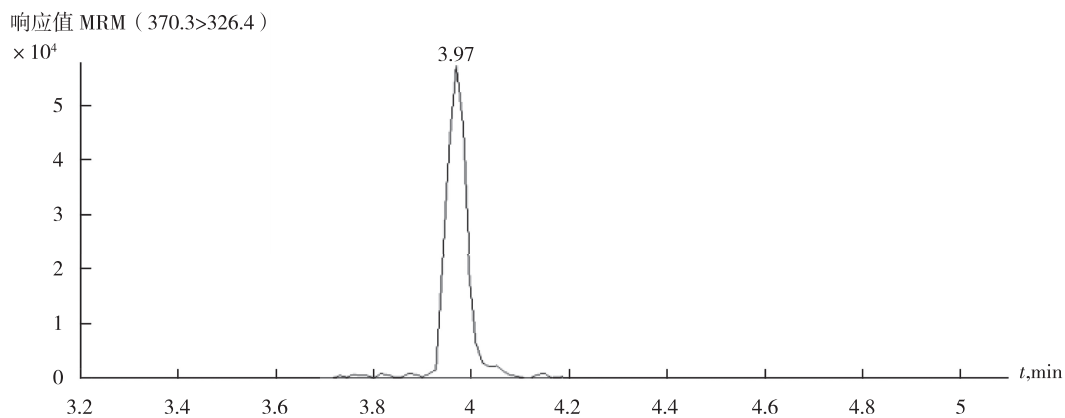


图 B. 28 氟罗沙星标准溶液定量离子色谱图(RT=3. 97 min)

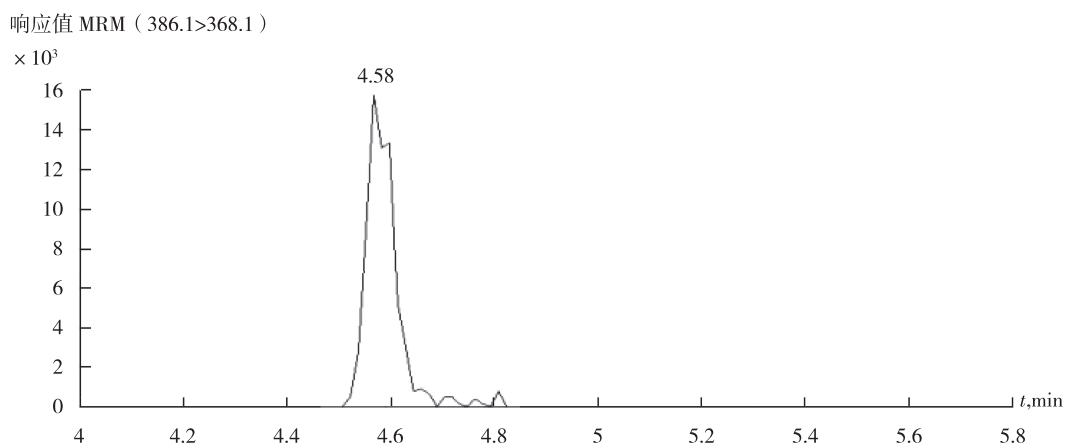


图 B. 29 沙拉沙星标准溶液定量离子色谱图(RT=4. 58 min)

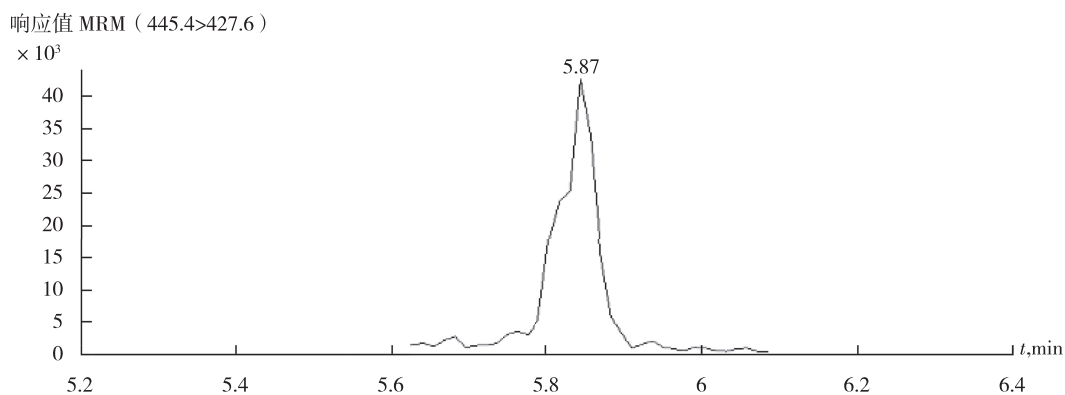


图 B. 30 多西环素标准溶液定量离子色谱图(RT=5. 87 min)

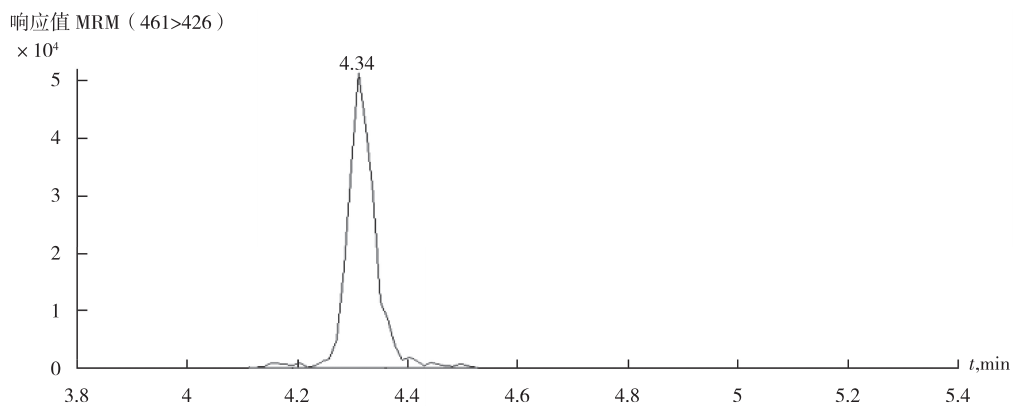


图 B. 31 土霉素标准溶液定量离子色谱图(RT=4. 34 min)

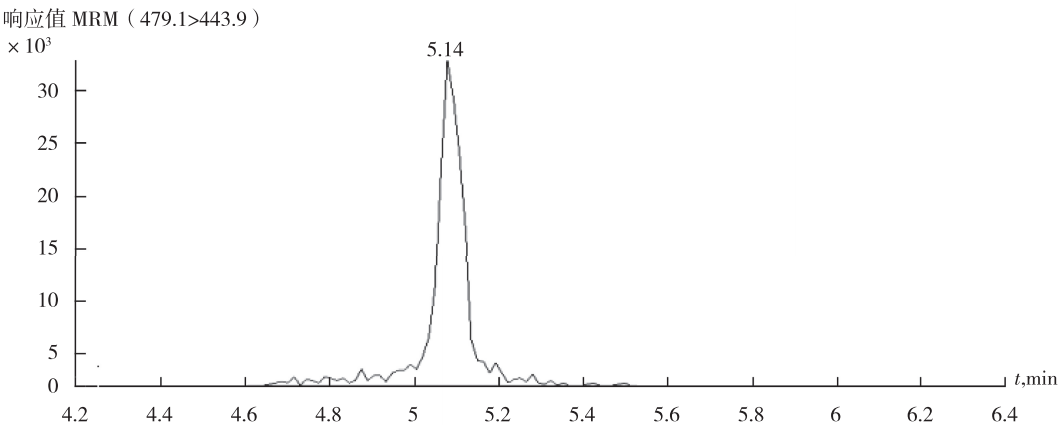


图 B. 32 金霉素标准溶液定量离子色谱图(RT=5. 14 min)

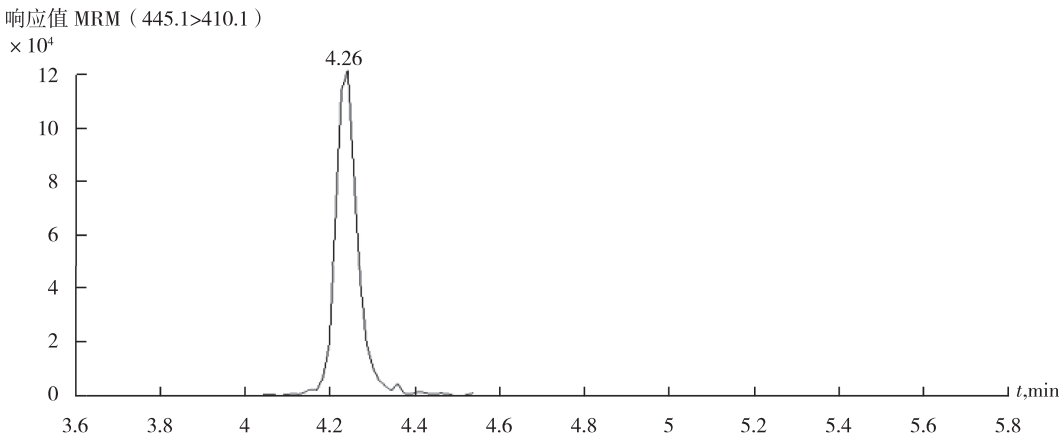


图 B. 33 四环素标准溶液定量离子色谱图(RT=4. 26 min)