ICS 65.080

CCS B 40

**NY**

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—××××

畜禽养殖污水中四环素类、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 waste water from livestock and poultry farms - liquid chromatography tandem mass spectrometry

###

（公开征求意见稿）

××××-××-××实施

××××-××-××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。

本文件由中华人民共和国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、王晓丽、胡剑。

畜禽养殖污水中四环素类、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

本文件描述了畜禽养殖污水中4种四环素类、15种磺胺类和14种喹诺酮类药物(见附录A)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、鸡养殖污水中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定，其他畜禽养殖污水可参照执行。

本文件畜禽养殖污水中四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物残留量的测定方法检出限均为2 µg/L，定量限均为5 µg/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

畜禽养殖污水 waste water from livestock and poultry farm

畜禽养殖生产过程中产生的污水,包括尿液、冲洗水以及其他管理环节所产生的污水。

[来源: GB/T 27522-2011, 3.1]

4原理

试样中待测物经Na2EDTA-McIIvaine缓冲液提取，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 净化分散剂：每份含900 mg无水硫酸钠，150 mg C18及50 mg N-丙基乙二胺（PSA）。

5.6 Na2EDTA-McIIvaine缓冲液：准确称取无水磷酸氢二钠7.1 g，乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na2）1.95 g，柠檬酸8.4 g，溶解于650 mL水中，pH调节至4.0。

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（5.3）与200 mL水，混匀。

5.9 0.2 %甲酸溶液：量取2 mL甲酸，用水定容至1000 mL，混匀。

5.10 0.2 %甲酸甲醇溶液：量取2 mL甲酸，用甲醇（5.3）定容至1000 mL，混匀。

5.11 标准品：3类33种药物信息见附录A 表A.1。

5.12 33种药物标准储备溶液：准确称取33种药物标准品适量（精确到0.01 mg），分别按附表A.1中溶剂溶解，用甲醇（5.2）定容至刻度，配制成浓度为1 mg/mL的单标准储备溶液，置于-18 ℃以下避光保存，磺胺类和喹诺酮类药物储备溶液有效期为6个月，四环素类药物储备溶液有效期为1个月。

5.13 混合标准中间溶液：准确吸取标准储备液（5.12）各100 μL于5 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释至刻度，配制成浓度为20 μg/mL的混合标准中间液, 现用现配。

5.14 混合标准系列工作溶液：准确移取混合标准中间液（5.13）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、200 ng/mL混合标准系列工作溶液，现配现用。

5.15 [微孔滤膜](https://www.caasbuy.com/item_detail.lf?itemId=7881451)：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0.00001 g和0.01 g。

6.3 漩涡混合仪。

6.4 冷冻离心机：转速不低于10000 r/min。

6.5 氮吹仪。

6.6 超声波清洗器。

## 7样品

7.1 样品按照GB/T 27522进行取样。取样后样品应立即在-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%的畜禽养殖污水样品，作为空白试样。

## 8试验步骤

## 8.1 提取

平行做两份试验。准确移取样品2 mL置于50 mL离心管中，加入2 mL Na2EDTA-McIIvaine缓冲液（5.6），涡旋混匀1 min，加入8 mL乙腈-甲醇溶液提取（5.7），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5 mL上层清液于15 mL离心管中，备用。

## 8.2 净化

取一份净化分散剂（5.5）加入到5 mL上层清液中，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（5.15），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，按8.1和8.2处理得到氮吹吹干后的空白基质，分别取1 mL标准系列溶液（5.14）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 | A/% | B/% |
| 0.00 | 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）：5000 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 四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物的多反应监测（MRM）离子对、保留时间、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)* | 保留时间/min | 去簇电压/V | 碰撞能量/(eV) |
| 四环素类 | 四环素 | 445.1>410.1 a | 4.25 | 90 | 30 |
| 445.1>427.7 | 30 |
| 土霉素 | 461.0>426.3 a | 4.35 | 110 | 28 |
| 461.0>443.0 | 19 |
| 金霉素 | 479.1>443.9 a | 5.15 | 120 | 30 |
| 479.1>462.0 | 25 |
| 多西环素 | 445.4>427.6 a | 5.82 | 90 | 27 |
| 445.4>410.3 | 29 |
| 磺胺类 | 磺胺嘧啶 | 251.5>155.9a | 3.58 | 72 | 21 |
| 251.5>108.1 | 34 |
| 磺胺二甲基嘧啶 | 278.9>108.2 a | 4.30 | 85 | 27 |
| 278.9>156.2 | 38 |
| 磺胺氯哒嗪 | 285.0>156.1 a | 4.75 | 70 | 23 |
| 285.0>108.0 | 33 |

表2（续）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 被测物名称 | 监测离子对/(*m/z)* | 保留时间/min | 去簇电压/V | 碰撞能量/(eV) |
| 磺胺类 | 磺胺甲噁唑 | 254.2>156.1 a | 4.73 | 72 | 23 |
| 254.2>108.1 | 32 |
| 磺胺甲氧嗪 | 281.0>156.0a | 4.42 | 75 | 25 |
| 281.0>108.0 | 27 |
| 磺胺对甲氧嘧啶 | 281.1>156.0 a | 4.23 | 70 | 25 |
| 281.1>108.0 | 30 |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 281.1>156.1 a | 4.91 | 75 | 25 |
| 281.1>108.1 | 30 |
| 磺胺噻唑 | 256.1>156.1 a | 3.57 | 62 | 22 |
| 256.1>108.1 | 34 |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 311.2>108 a | 5.59 | 90 | 39 |
| 311.2>156 | 44 |
| 磺胺甲噻二唑 | 271.1>156.1 a | 4.24 | 40 | 21 |
| 271.1>107.8 | 34 |
| 磺胺苯吡唑 | 315.0>158.0 a | 5.30 | 90 | 40 |
| 315.0>108.0 | 40 |
| 磺胺脒 | 214.8>155.9a | 2.89 | 60 | 21 |
| 214.8>108 | 30 |
| 磺胺醋酰钠 | 215.0>107.9 | 3.45 | 60 | 27 |
| 215.0>156.0 a | 15 |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 311.1>155.9 a | 4.89 | 120 | 30 |
| 311.1>108 | 37 |
| 磺胺喹噁啉 | 301.0>156.1 a | 5.78 | 73 | 24 |
| 301.0>108.1 | 37 |
| 喹诺酮类 | 诺氟沙星 | 320.1>302.2 a | 4.16 | 100 | 29 |
| 320.1>276 | 25 |
| 氟罗沙星 | 370.3>326.4 a | 3.88 | 117 | 27 |
| 370.3>269.1 | 37 |
| 司帕沙星 | 393.4>292.2 | 4.85 | 74 | 34 |
| 393.4>349.2 a | 29 |
| 奥比沙星 | 396.4>295.2 | 4.33 | 90 | 35 |
| 396.4>352.0a | 27 |
| 恩诺沙星 | 360.1>342.5 | 4.19 | 120 | 30 |
| 360.1>316.0 a | 30 |
| 达氟沙星 | 358.3>340.3 a | 4.24 | 80 | 31 |
| 358.3>314.1 | 25 |
| 培氟沙星 | 334.3>290.3 a | 4.01 | 94 | 25 |
| 334.3>233.4 | 41 |
| 二氟沙星 | 400.2>356.3 a | 4.39 | 70 | 31 |
| 400.2>299.5 | 36 |

表2（续）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 被测物名称 | 监测离子对/(*m/z)* | 保留时间/min | 去簇电压/V | 碰撞能量/(eV) |
| 喹诺酮类 | 环丙沙星 | 332.1>314.0 a | 4.23 | 110 | 30 |
| 332.1>288.0 | 27 |
| 沙拉沙星 | 386.1>368.1 a | 4.54 | 70 | 30 |
| 386.1>342.2 | 30 |
| 洛美沙星 | 352.2>265.5 a | 4.34 | 80 | 30 |
| 352.2>334.6 | 30 |
| 氧氟沙星 | 362.5>261.4 | 3.98 | 112 | 38 |
| 362.5>318.2 a | 27 |
| 氟甲喹 | 262.0>202.0 | 6.94 | 85 | 45 |
| 262.0>244.2 a | 40 |
| 恶喹酸 | 262.2>216.1 a | 6.01 | 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工作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标准系列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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  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33种药物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不应低于0.99。试样溶液与基质匹配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%。四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物标准溶液的定量离子色谱图见附录B图B.1。

9 试验数据处理

试样中药物的残留量 ω 以质量分数计，单位为微克每升（μg/L）。单点校准按公式（1）计算；多点校准按公式（2）计算：

$ ω=\frac{A×C\_{S}×V×V\_{2}×1000}{A\_{S}×V\_{1}×v×1000}$………………………………………….. ………（1）

式中：

*A* ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

AS——基质匹配标准系列溶液中待测物的峰面积；

CS——基质匹配标准系列溶液中待测物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

*V*——提取液的体积，单位为毫升（mL）；

*V1*——氮吹所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

*V2*——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

*v* ——试样体积，单位为毫升（mL）。

$ ω=\frac{C×V×V\_{2}×1000}{V\_{1}×v×1000}$……………………………………………………（2）

式中:

*C*——从基质匹配标准曲线查得的试样溶液中待测物的浓度，单位为微克每升（μg/L）；

*V*——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

*V1*——氮吹所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

*V2*——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

*v* ——试样体积，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，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%。

(规范性)

**四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物的相关信息**

四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物的相关信息见表A.1

**表A.1 四环素类、磺胺类和喹诺酮类33种药物的相关信息**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 序号 | **中文名称** | **英文名称** | **CAS** | **含量/%，≥** | **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 hydrochloride | 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 | 磺胺氯哒嗪 | Sulfachloropyridazine | 80-32-0 | 98.0 | 甲醇 |
| 8 | 磺胺甲噁唑 | Sulfamethoxazole | 723-46-6 | 98.0 | 甲醇 |
| 9 | 磺胺甲氧嗪 | 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 | 磺胺醋酰钠 | 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 hydrochloride | 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 | 恶喹酸 | 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种药物的标准溶液定量离子色谱图见图B.1

****

磺胺甲噁唑（RT = 4.73 min） 磺胺噻唑（RT = 3.57 min）

****

磺胺脒（RT = 2.89 min） 磺胺嘧啶（RT = 3.58 min）

****磺胺醋酰钠（RT = 3.45 min） 磺胺甲噻二唑（RT = 4.24 min）

****

磺胺邻二甲氧嘧啶（RT = 4.89 min）磺胺间二甲氧嘧啶（RT = 5.59 min）

****

磺胺氯哒嗪（RT = 4.75 min） 磺胺喹噁啉（RT = 5.78 min）

****磺胺对甲氧嘧啶（RT = 4.23 min） 磺胺甲氧嗪（RT = 4.42 min）

****

磺胺二甲基嘧啶（RT = 4.30 min） 磺胺间甲氧嘧啶（RT = 4.91 min）

****

氟甲喹（RT = 6.94 min） 恶喹酸（RT = 6.01 min）

****

恩诺沙星（RT = 4.19 min） 氧氟沙星（RT = 3.98 min）

****

洛美沙星（RT = 4.34 min） 达氟沙星（RT = 4.24 min）

****

环丙沙星（RT = 4.23 min） 培氟沙星（RT = 4.01 min）

****

 磺胺苯吡唑（RT = 5.30 min） 诺氟沙星（RT = 4.16 min）

****

二氟沙星（RT = 4.39 min） 四环素（RT = 4.25 min）

****

司帕沙星（RT = 4.85 min） 奥比沙星（RT = 4.33 min）

****

氟罗沙星（RT = 3.88 min） 沙拉沙星（RT = 4.54 min）

****

多西环素（RT = 5.82 min） 土霉素（RT = 4.35 min）

****金霉素（RT = 5.15 min）

图B.1 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（50 ng/mL）