

畜禽排泄物中磺胺类药物残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of sulfonamides residues in livestock and poultry excreta
—Liquid chromatography - tandem mass spectrometry

2022-04-16 发布

2022-05-16 实施

前 言

本标准按照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。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由浙江省农业农村厅提出并组织实施。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省动物疫病预防控制中心、绿城农科检测技术有限公司。

本标准主要起草人：黄娟、裘丞军、王彬、罗成江、陈洁、侯轩、陈晓林、阮鑫、周蕾、赵月均、任玉琴。

畜禽排泄物中磺胺类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了畜禽排泄物中磺胺醋酰、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲噁唑、磺胺异噁唑、磺胺甲噻二唑、苯甲酰磺胺、磺胺二甲嘧啶、磺胺异嘧啶、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、磺胺喹噁啉、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于畜禽排泄物中上述20种磺胺类药物残留量的测定。

本标准的检出限为2 µg/kg，定量限为5 µg/kg。

注：畜禽排泄物包括畜禽排泄的粪便或粪便和尿液的混合物。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过规范性文件的引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 25169 畜禽监测技术规范

3 术语和定义

本标准没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的磺胺类药物经酸化乙腈溶液提取，氮气吹干后用磷酸盐溶液复溶，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准曲线校准，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，均使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.3 正己烷（C₆H₁₄）。

5.4 90%酸化乙腈溶液：取900 mL乙腈，加冰乙酸10 mL，加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.5 0.05 mol/L磷酸盐溶液：取1.48 g磷酸二氢钠和14.50 g磷酸氢二钠，加水溶解稀释至1 000 mL，混匀。

5.6 5%甲醇溶液：取50 mL甲醇，加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.7 5%氨化甲醇：取5 mL氨水，加甲醇稀释至100 mL，混匀。

- 5.8 0.1%甲酸溶液：取1.0 mL甲酸，加水稀释至1 000 mL，混匀。
- 5.9 乙腈甲酸溶液：取10 mL乙腈，用0.1%甲酸溶液稀释至100 mL，混匀。
- 5.10 0.1%甲酸甲醇溶液：取1.0 mL甲酸，加甲醇稀释至1 000 mL，混匀。
- 5.11 磺胺类标准品：各标准品信息见附录A，纯度 $\geq 95\%$ 。
- 5.12 标准贮备溶液(1 mg/mL)：分别称取磺胺类标准品(5.11)约10 mg(准确至0.01 mg)，分别置10 mL棕色容量瓶中，用甲醇(5.2)溶解并定容至刻度，混匀。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期6个月。
- 5.13 混合标准中间溶液I(10 $\mu\text{g/mL}$)：分别吸取标准贮备溶液(5.12)各1.00 mL，置于100 mL棕色容量瓶中，用甲醇(5.2)稀释至刻度，混匀， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期1个月。
- 5.14 混合标准中间溶液II(250 ng/mL)：准确吸取混合标准中间溶液I(5.13)250 μL ，置于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈甲酸溶液(5.9)稀释至刻度，混匀，现用现配。
- 5.15 系列混合标准工作溶液：准确吸取混合标准中间溶液II(5.14)适量，用乙腈甲酸溶液(5.9)稀释成浓度为2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、250.0 ng/mL的系列标准工作溶液，现用现配。
- 5.16 N-乙炔吡咯烷酮和二乙烯基苯混合固相萃取柱(HLB)：60 mg/3 mL或性能相当者。
- 5.17 微孔滤膜：0.22 μm ，水系。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：感量0.01 mg、0.01 g。
- 6.3 真空冷冻干燥机：冷阱温度 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，真空度10 Pa。
- 6.4 离心机：转速不低于10 000 r/min。
- 6.5 氮吹仪。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 振荡仪。
- 6.8 涡旋混合器。
- 6.9 超声提取仪。
- 6.10 样品粉碎设备。
- 6.11 分析筛：0.5 mm孔径。

7 样品制备与保存

按照GB/T 25169采集畜禽排泄物，用四分法缩减至约200 g， $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下真空冷冻干燥24 h，使样品中的水分在10%以下，粉碎，过0.5 mm孔径的分析筛(6.11)，装入密闭容器中，于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用。

取不含待测磺胺类药物的样品适量，按上述方法制备，作为空白试样。

8 测定步骤

8.1 试样溶液制备

8.1.1 提取

将装有试样的密闭容器取出，放至室温。称取试样约2 g（精确到0.01 g），置于50 mL离心管中，准确加入90%酸化乙腈溶液（5.4）10.0 mL，涡旋使试样分散，振荡10 min，超声提取10 min，10000 r/min离心5 min。准确移取上清液2 mL，置于10 mL试管中，加入0.05 mol/L磷酸盐溶液（5.5）1 mL，混匀，于30 ℃水浴中氮气吹至残余物小于1 mL。再加入0.05 mol/L磷酸盐溶液（5.5）3 mL、正己烷（5.3）2 mL，涡旋1 min、超声2 min，使残余物溶解，静置分层或10 000 r/min离心2 min，取下层水相备用。

8.1.2 净化

取HLB固相萃取柱（5.16），依次用甲醇5 mL和水5 mL活化，取全部备用液（8.1.1）过柱，控制流速在1.0 mL/min以下，依次用水3 mL，5 %甲醇溶液（5.6）3 mL淋洗，抽干。用5 %氨化甲醇（5.7）3 mL洗脱，收集洗脱液，30 ℃水浴中氮气吹干，加乙腈甲酸溶液（5.9）1.00 mL，超声2 min、涡旋60 s使残余物溶解，溶液经0.22 μm微孔滤膜（5.17）过滤，上机测定。

8.2 基质匹配混合标准曲线的制备

称取空白试样约2 g（精确至0.01 g），按8.1步骤操作，氮气吹干后分别准确加入系列混合标准工作溶液（5.15）1.00 mL，混合溶解后经微孔滤膜（5.17）过滤，制成2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、250.0 ng/mL的基质匹配系列标准溶液，用液相色谱—串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、标准工作溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线，求回归方程和相关系数。

8.3 液相色谱-质谱参考条件

8.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，柱长50 mm，内径2.1 mm，粒度1.7 μm，或性能相当者。
柱温：35 ℃。
进样量：5 μL。
流动相：A：0.1 %甲酸溶液（5.8）；B：0.1 %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 | 流速 mL/min | A % | B % |
|-----------|--------------|--------|--------|
| 0.0 | 0.3 | 95 | 5 |
| 2.0 | 0.3 | 85 | 15 |
| 5.0 | 0.3 | 60 | 40 |
| 7.0 | 0.3 | 5 | 95 |
| 7.1 | 0.3 | 95 | 5 |
| 11.0 | 0.3 | 95 | 5 |

8.3.2 质谱参考条件

离子化模式：电喷雾离子源（ESI），正离子多反应监测模式（MRM）。
喷雾电压：1.0 kV。
源温：150 ℃。
雾化温度：450 ℃。
雾化气流速：1 000 L/h。
锥孔气流速：30 L/h。

碰撞气：氦气。

定性、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量参考值见表2。

表2 定性、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量参考条件

| 名称 | 定性离子对 m/z | 定量离子对 m/z | 锥孔电压 V | 碰撞能量 eV | 保留时间 min |
|----------|--------------|--------------|-----------|------------|-------------|
| 磺胺醋酰 | 215.1>156.1 | 215.1>156.1 | 20 | 10 | 1.39 |
| | 215.1>108.1 | | 20 | 18 | |
| 磺胺吡啶 | 250.2>156.1 | 250.2>156.1 | 20 | 16 | 2.40 |
| | 250.2>108.1 | | 20 | 25 | |
| 磺胺嘧啶 | 251.2>156.1 | 251.2>156.1 | 20 | 14 | 1.86 |
| | 251.2>108.1 | | 20 | 24 | |
| 磺胺甲噁唑 | 254.1>156.1 | 254.1>156.1 | 20 | 15 | 3.90 |
| | 254.1>108.1 | | 20 | 25 | |
| 磺胺噻唑 | 256.3>156.1 | 256.3>156.1 | 20 | 14 | 2.24 |
| | 256.3>108.1 | | 20 | 22 | |
| 磺胺甲基嘧啶 | 265.2>156.1 | 265.2>156.1 | 20 | 16 | 2.61 |
| | 265.2>172.1 | | 20 | 14 | |
| 磺胺二甲噁唑 | 268.2>156.1 | 268.2>156.1 | 20 | 15 | 3.35 |
| | 268.2>113.1 | | 20 | 20 | |
| 磺胺异噁唑 | 268.2>156.1 | 268.2>156.1 | 20 | 13 | 4.24 |
| | 268.2>113.1 | | 20 | 16 | |
| 磺胺甲噻二唑 | 271.2>156.1 | 271.2>156.1 | 20 | 13 | 3.31 |
| | 271.2>108.1 | | 20 | 20 | |
| 苯甲酰磺胺 | 277.1>156.1 | 277.1>156.1 | 20 | 10 | 4.47 |
| | 277.1>108.1 | | 20 | 23 | |
| 磺胺二甲嘧啶 | 279.2>186.1 | 279.2>186.1 | 20 | 16 | 3.32 |
| | 279.2>124.1 | | 20 | 24 | |
| 磺胺异嘧啶 | 279.2>124.2 | 279.2>124.2 | 20 | 20 | 2.01 |
| | 279.2>186.1 | | 20 | 15 | |
| 磺胺对甲氧嘧啶 | 281.2>156.1 | 281.2>156.1 | 20 | 17 | 3.17 |
| | 281.2>126.2 | | 20 | 17 | |
| 磺胺甲氧哒嗪 | 281.2>156.1 | 281.2>156.1 | 20 | 17 | 3.54 |
| | 281.2>126.2 | | 20 | 17 | |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 281.2>156.1 | 281.2>156.1 | 20 | 16 | 3.94 |
| | 281.2>126.2 | | 20 | 18 | |
| 磺胺氯哒嗪 | 285.2>156.1 | 285.2>156.1 | 20 | 13 | 3.73 |
| | 285.2>108.1 | | 20 | 25 | |
| 磺胺喹噁啉 | 301.1>156.1 | 301.1>156.1 | 20 | 16 | 5.40 |
| | 301.1>108.1 | | 20 | 26 | |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 311.1>156.1 | 311.1>156.1 | 20 | 20 | 4.16 |
| | 311.1>108.1 | | 20 | 30 | |

表2（续）

| 名称 | 定性离子对 m/z | 定量离子对 m/z | 锥孔电压 V | 碰撞能量 eV | 保留时间 min |
|----------|--------------|--------------|-----------|------------|-------------|
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 311.1>156.1 | 311.1>156.1 | 20 | 17 | 5.18 |
| | 311.1>91.8 | | 20 | 30 | |
| 磺胺苯吡唑 | 315.2>158.2 | 315.2>158.2 | 20 | 30 | 4.83 |
| | 315.2>160.2 | | 20 | 22 | |

8.4 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液（8.1.2）与基质匹配系列标准溶液（8.2）中待测物的保留时间相对偏差在±2.5%之内，且样品图谱中各待测物定性离子的相对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 定性确证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 | 允许的最大偏差 |
|----------|---------|
| >50 | ±20 |
| 20~50（含） | ±25 |
| 10~20（含） | ±30 |
| ≤10 | ±50 |

8.5 定量测定

以待测药物的浓度为横坐标，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。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，应重新试验或将试样溶液作相应稀释后重新测定。20种磺胺类药物基质匹配标准溶液的特征离子色谱图见附录B。

9 试验数据处理

试样中磺胺类药物的残留量以质量分数 ω 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）表示。按(1)式计算：

$$\omega = \frac{C \times V \times V_1}{m \times V_2} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
 ω ——试样中磺胺类药物的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；
 C ——从基质匹配标准曲线查得的试样溶液中待测物的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
 V ——试样提取液总体积，单位为毫升（ mL ）；
 V_1 ——试样净化后溶解残余物的体积，单位为毫升（ mL ）；
 m ——试样质量，单位为克（ g ）；

V_2 ——移取的提取液体积，单位为毫升（mL）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

10 检测方法准确度和精密度

10.1 准确度

本方法在5.0 $\mu\text{g/kg}$ 、10.0 $\mu\text{g/kg}$ 、500 $\mu\text{g/kg}$ 三个添加浓度水平的回收率为60 %~120 %。

10.2 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20 %。

附 录 A

(资料性)

20 种磺胺类标准物质中文英文名称对照、分子式、相对分子质量和 CAS 号

20种磺胺类标准物质中文英文名称对照、分子式、相对分子质量和CAS号见表A.1。

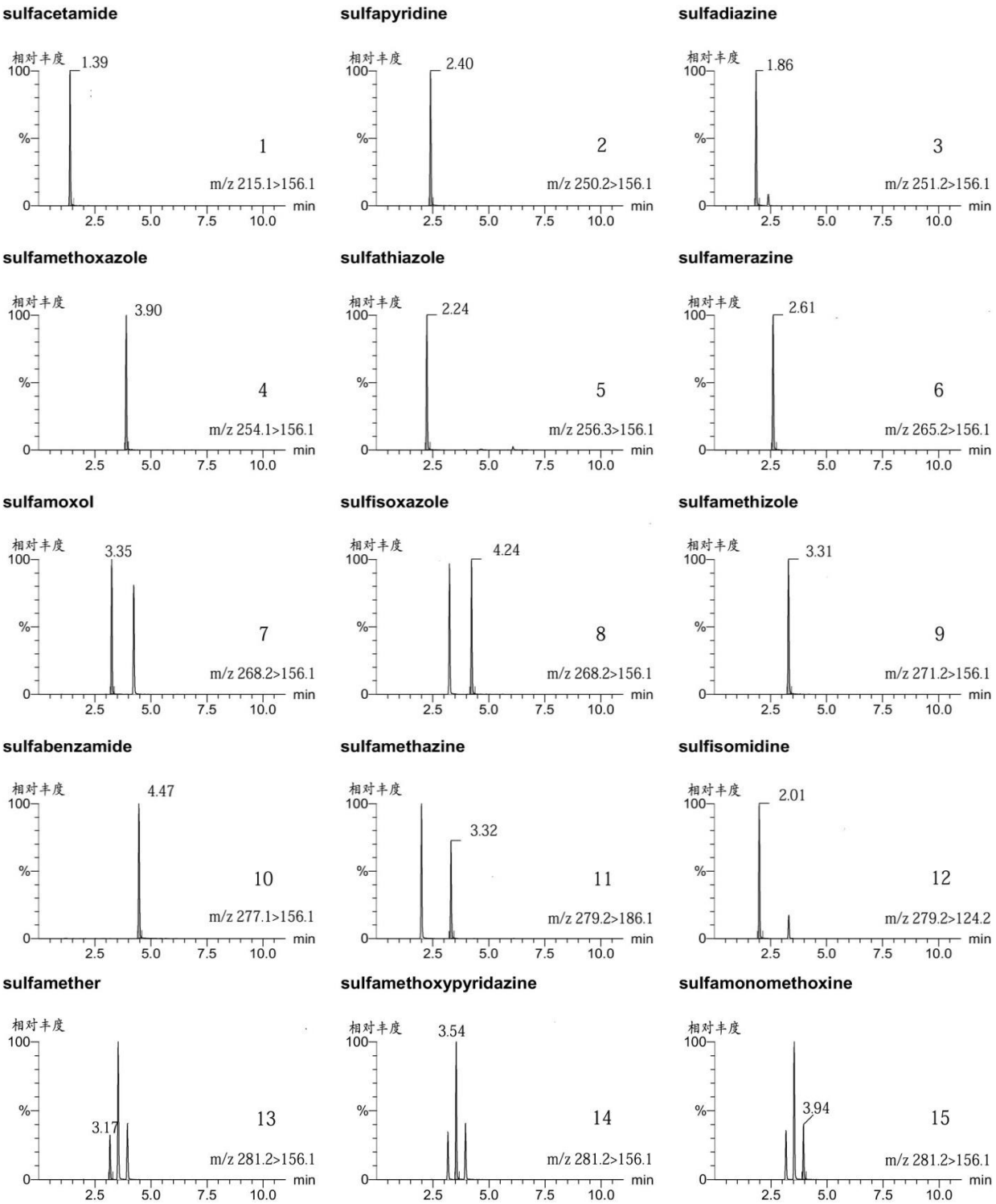
表A.1 20 种磺胺类标准物质中文英文名称对照、分子式、相对分子质量和 CAS 号

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | 分子式 | 相对分子质量 | CAS 号 |
|----|----------|------------------------|-----------------------|--------|-----------|
| 1 | 磺胺醋酰 | Sulfacetamide | $C_8H_{10}N_2SO_3$ | 214.24 | 144-80-9 |
| 2 | 磺胺吡啶 | Sulfapyridine | $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ | 249.29 | 144-83-2 |
| 3 | 磺胺嘧啶 | Sulfadiazine | $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ | 250.28 | 68-35-9 |
| 4 | 磺胺甲噁唑 | Sulfamethoxazole | $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ | 253.28 | 723-46-6 |
| 5 | 磺胺噻唑 | Sulfathiazole | $C_9H_9N_3O_2S_2$ | 255.32 | 72-14-0 |
| 6 | 磺胺甲基嘧啶 | Sulfamerazine | $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ | 264.30 | 127-79-7 |
| 7 | 磺胺二甲噁唑 | Sulfamoxole | $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ | 267.30 | 729-99-7 |
| 8 | 磺胺异噁唑 | Sulfisoxazole | $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ | 267.30 | 127-69-5 |
| 9 | 磺胺甲噻二唑 | Sulfamethizole | $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ | 270.33 | 144-82-1 |
| 10 | 苯甲酰磺胺 | Sulfabenzamide | $C_{13}H_{12}N_2O_3S$ | 276.31 | 127-71-9 |
| 11 | 磺胺二甲嘧啶 | Sulfamethazine | $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ | 278.33 | 57-68-1 |
| 12 | 磺胺异嘧啶 | Sulfisomidine | $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ | 278.33 | 515-64-0 |
| 13 | 磺胺对甲氧嘧啶 | Sulfameter | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | 280.31 | 651-06-9 |
| 14 | 磺胺甲氧吡嗪 | Sulfamethoxypyridazine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | 280.30 | 80-35-3 |
| 15 | 磺胺间甲氧嘧啶 | Sulfamonomethoxine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | 280.30 | 1220-83-3 |
| 16 | 磺胺氯吡嗪 | Sulfachloropyridazine | $C_{10}H_9ClN_4O_2S$ | 284.72 | 80-32-0 |
| 17 | 磺胺喹噁啉 | Sulfaquinoxaline | $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ | 300.34 | 59-40-5 |
| 18 | 磺胺邻二甲氧嘧啶 | Sulphadoxine | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | 310.33 | 2447-57-6 |
| 19 | 磺胺间二甲氧嘧啶 | Sulfadimethoxine | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | 310.33 | 155-91-9 |
| 20 | 磺胺苯吡唑 | Sulfaphenazole | $C_{15}H_{14}N_4O_2S$ | 314.37 | 526-28-9 |

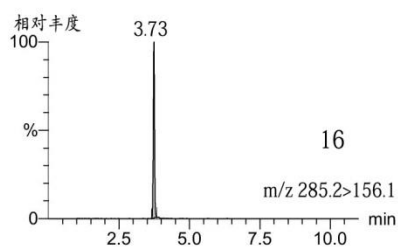
附 录 B
(资料性)

20 种磺胺类药物标准溶液特征离子质量色谱图

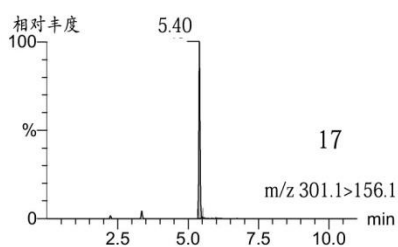
20种磺胺类药物基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图B. 1。



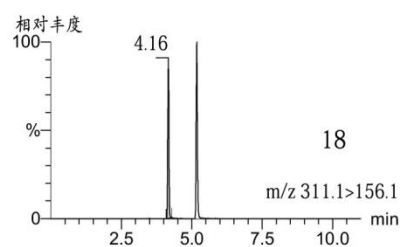
sulfachloropyridazine



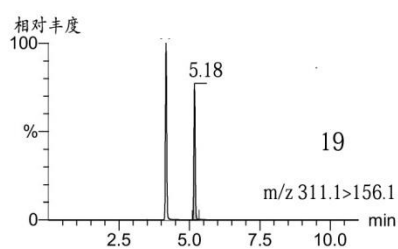
sulfaquinolaxaline



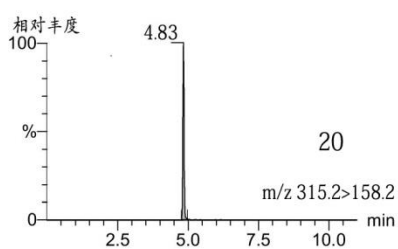
sulfadoxine



sulfadimethoxine



sulfaphenazole



标引序号说明：

- 1 ——磺胺醋酰；
- 2 ——磺胺吡啶；
- 3 ——磺胺嘧啶；
- 4 ——磺胺甲噁唑；
- 5 ——磺胺噻唑；
- 6 ——磺胺甲基嘧啶；
- 7 ——磺胺二甲噁唑；
- 8 ——磺胺异噁唑；
- 9 ——磺胺甲噻二唑；
- 10 ——苯甲酰磺胺；
- 11 ——磺胺二甲嘧啶；
- 12 ——磺胺异嘧啶；
- 13 ——磺胺对甲氧嘧啶；
- 14 ——磺胺甲氧哒嗪；
- 15 ——磺胺间甲氧嘧啶；
- 16 ——磺胺氯哒嗪；
- 17 ——磺胺喹噁啉；
- 18 ——磺胺邻二甲氧嘧啶；
- 19 ——磺胺间二甲氧嘧啶；
- 20 ——磺胺苯吡啶。

图B.1 20种磺胺类药物基质匹配标准溶液（50 ng/mL）特征离子质量色谱图