

水产品养殖水中 21 种磺胺类、氯霉素类、四环素类、硝基呋喃类、喹诺酮类和孔雀石绿的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of
21 Sulfonamides, Chloroamphenicols, Tetracyclines, Nitrofurans, Quinolones and
Malachite Green in Aquaculture Water by HPLC-MS/MS Method

2018-08-21 发布

2018-09-01 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 试剂和材料	1
4.1 试剂及试剂的配制	1
4.2 标准品及标准溶液的配制	2
5 仪器和设备	3
6 分析步骤	3
6.1 样品富集浓缩与净化	3
6.2 空白试验	3
6.3 仪器参考条件	3
6.4 确证	4
7 结果计算	4
8 精密度	5
9 其他	5
附录 A（资料性附录）参考色谱条件	6
附录 B（资料性附录）参考质谱条件	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本文件由深圳市食品药品监督管理局归口。

本文件主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院、深圳市农产品质量安全检验检测中心

本文件主要起草人：刘奕雄、杜业刚、钟仕花、梁莱刚、李意、李碧芳、张兵、闫清华、黄敏通、杨国武。

本文件为首次发布。

水产品养殖水中 21 种磺胺类、氯霉素类、四环素类、硝基呋喃类、 喹诺酮类和孔雀石绿的测定 高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了磺胺类、氯霉素类、四环素类、硝基呋喃类、喹诺酮类和孔雀石绿测定。

本文件适用于水产品养殖水中磺胺类、氯霉素类、四环素类、硝基呋喃类、喹诺酮类和孔雀石绿的测定。

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，仅所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。

3 原理

水样中的磺胺类、四环素类、硝基呋喃类、喹诺酮类和孔雀石绿经固相萃取柱富集净化后，用超高效液相色谱-串联质谱法测定，氯霉素类、孔雀石绿为内标法定量，其他药物外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 试剂及试剂的配制

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1.1 水，GB/T 6682 规定，一级。

4.1.2 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

4.1.3 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

4.1.4 丙酮（ CH_3COCH_3 ）：色谱纯。

4.1.5 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

4.1.6 盐酸（ HCl ）。

4.1.7 氨水（ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.1.8 乙二胺四乙酸二钠（ $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.1.9 柠檬酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.1.10 磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.1.11 三氯甲烷（ CHCl_3 ）。

4.1.12 HLB 固相萃取柱：60 mg,3 mL，MCX 固相萃取柱：60 mg,3 mL；或者性能相当者。

- 4.1.13 一次性微孔滤头：带 0.45 μm 微孔滤膜，水系；带 0.22 μm 微孔滤膜，有机系。
- 4.1.14 0.1 mol/L 柠檬酸溶液：称取 21 g 柠檬酸，用水溶解，定容至 1 L。
- 4.1.15 Mcllvaine 缓冲溶液：将 1000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 625 mL 磷酸氢二钠 45 g 溶液混合，必要时用氢氧化钠或盐酸调节 pH 值至 4.0。
- 4.1.16 0.1 mol/L Na₂EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液：称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠加入到 1625 mL Mcllvaine 缓冲溶液中，超声溶解，混匀。
- 4.1.17 80%甲醇水溶液：量取 80 mL 甲醇与 20 mL 水混合。
- 4.1.18 20%甲醇/丙酮溶液：量取 10 mL 甲醇与 40 mL 丙酮混合。
- 4.1.19 0.1%甲酸水溶液：移取 1.00 mL 甲酸加入到水中，定容至 1000 mL。
- 4.1.20 5%甲酸/乙腈溶液：量取 5 mL 甲酸与 95 mL 乙腈混合。
- 4.1.21 5%氨水/乙腈溶液：量取 5 mL 氨水与 95 mL 乙腈混合。
- 4.1.22 0.02 mol/L 盐酸溶液：移取 1.7 mL 浓盐酸加入到水中，定容至 1 L。
- 4.1.23 80%乙腈水溶液：量取 80 mL 乙腈与 20 mL 水混合。

4.2 标准品及标准溶液的配制

- 4.2.1 标准物质：盐酸四环素（CAS：64-75-5）、盐酸金霉素（CAS：64-74-2）、盐酸土霉素（CAS：2058-46-0）、盐酸强力霉素（CAS：24390-14-5）、孔雀石绿草酸盐（CAS：2437-29-8）、氘代孔雀石绿苦味酸盐（CAS：1258668-21-1）、隐性孔雀石绿（CAS：129-73-7）、氘代隐性孔雀石绿（CAS：1173021-13-0）、氯霉素（CAS：56-75-7）、氘代氯霉素（CAS：202480-68-0）、甲矾霉素（CAS：15318-45-3）、氟苯尼考（CAS：73231-34-2）、磺胺甲噁二唑（CAS：144-82-1）、磺胺氯吡啶（CAS：80-32-0）、磺胺噻唑（CAS：72-14-0）、磺胺邻二甲氧嘧啶（CAS：2447-57-6）、磺胺对甲氧嘧啶（CAS：651-06-9）、磺胺甲氧吡啶（CAS：80-35-3）、磺胺二甲嘧啶（CAS：57-68-1）、磺胺苯吡啶（CAS：526-08-9）、盐酸环丙沙星（CAS：93107-08-5）、诺氟沙星（CAS：70458-96-7）、呋喃西林（CAS：59-87-0）、呋喃妥因（CAS：67-20-9）、呋喃唑酮（CAS：67-45-8）、盐酸呋喃它酮（CAS：3759-92-0）；纯度大于 98.0%。
- 4.2.2 试剂及试剂的配制准确称取适量标准物质，用甲醇配制成 100 mg/L 储备液，储备液在-18℃以下储备于棕色瓶中。
- 4.2.3 各药物混合标准中间溶液（1.00 mg/L）：将标准储备液（4.2.2）逐级稀释成 1.00 mg/L 标准中间溶液，在-18℃以下储备于棕色瓶中。
- 4.2.4 用 80%甲醇水溶液将氯霉素类药物配置成 0.400 ng/mL~10.0 ng/mL 标准系列溶液。
- 4.2.5 用 80%甲醇水溶液将四环素类药物配置成 4.00 ng/mL~60.0 ng/mL 标准系列溶液。
- 4.2.6 用 80%甲醇水溶液将喹诺酮类药物配置成 4.00 ng/mL~60.0 ng/mL 标准系列溶液。
- 4.2.7 用 80%甲醇水溶液将磺胺类药物配置成 2.00 ng/mL~40.0 ng/mL 标准系列溶液。
- 4.2.8 用 80%甲醇水溶液将硝基呋喃类药物配置成 1.00 ng/mL~20.0 ng/mL 标准系列溶液。
- 4.2.9 用 80%乙腈水溶液将孔雀石绿配置成 1.00 ng/mL~20.0 ng/mL 标准系列溶液。

5 仪器和设备

- 5.1 超高效液相色谱-串联质谱仪，配电喷雾离子源。
- 5.2 可控温氮吹浓缩仪。
- 5.3 电子天平 (感量 0.01 g、感量 0.0001 g)。
- 5.4 固相萃取装置。
- 5.5 pH 计。
- 5.6 旋涡振荡器。

6 分析步骤

6.1 样品富集浓缩与净化

6.1.1 磺胺类、氯霉素类、硝基呋喃类测定

水样经 0.45 μm 滤膜过滤后，量取 40.0 mL 水样，加入适量的氯霉素内标，以 1 滴/s 的速度过 HLB 固相萃取柱（预先用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化），待试样完全流出后，以 2 mL 水淋洗、减压抽干，以 6 mL 甲醇洗脱，减压抽干。将洗脱液在 40 度氮吹浓缩近干，用 1.00 mL 80% 甲醇水溶液溶解残渣，经 0.22 μm 滤膜过滤，待上机测定。

6.1.2 四环素类和喹诺酮类测定

水样经 0.45 μm 滤膜过滤后，量取 40.0 mL 与 10 mL $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液混匀，用盐酸溶液调节 pH=4，然后以 1 滴/s 的速度过 HLB 固相萃取柱（预先用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化），待试样完全流出后，以 2 mL 水淋洗，减压抽干，以 6 mL 20% 甲醇/丙酮溶液洗脱。将洗脱液在 40 度氮吹浓缩近干，用 1.00 mL 80% 甲醇水溶液溶解残渣，经 0.22 μm 滤膜过滤，待上机测定。

6.1.3 孔雀石绿测定

水样经 0.45 μm 滤膜过滤后，量取 40.0 mL 水样，用盐酸溶液调节 pH=4，加入适量的内标溶液。以 1 滴/s 的速度过 MCX 固相萃取柱（预先用 5 mL 5% 甲酸/乙腈、5 mL 0.1% 甲酸水活化），待试样完全流出后，以 2 mL 水和 2 mL 乙腈依次淋洗，减压抽干，以 8 mL 5% 氨水/乙腈溶液，洗脱减压抽干。将洗脱液在 40 度氮吹浓缩近干，用 1.00 mL 80% 乙腈水溶液溶解残渣，经 0.22 μm 滤膜过滤，待上机测定。

6.2 空白试验

量取不含目标物空白水样，以下实验步骤与样品操作相同（6.1）。

6.3 仪器参考条件

6.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱：C18（1.7 μm ，2.1 mm \times 50 mm）或相当者；
- b) 流动相：不同药物梯度洗脱程序参见附录 A；

- c) 流速：300 μL/min；
- e) 柱温：30°C±5°C；
- f) 进样量：5 μL。

6.3.2 质谱操作条件

- a) 电离模式：电喷雾离子源（ESI）。
- b) 质谱扫描方式：多反应离子监测（MRM）。
- c) 药物其它详细质谱条件参见附录 B。

6.4 确证

每种被测组分选择 1 个母离子，2 个以上子离子，在相同实验条件下，样品中待测物和内标物的相对保留时间，与标准溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内；且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度相近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较，若偏差不超过表 1 规定的范围，则可判断样品中存在对应的待测物。

表 1 定性确证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 结果计算

该方法中标准工作溶液和样液中药物残留的响应值均应在仪器的检测线性范围内。

按下列公式(1)计算出水样中的磺胺类、四环素类、硝基呋喃类、喹诺酮类药物的含量：

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X ——水样中待测组分的含量（μg/L）；
- A ——测定液中待测组分的峰面积；
- C_s ——标准溶液中待测组分的浓度（μg/L）；
- V ——定容体积（mL）；
- A_s ——标准溶液中待测组分的峰面积；
- V₀ ——测定水样的体积（mL）。

按下列公式(2)计算出水样中的氯霉素类、孔雀石绿的含量：

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times A_{si}}{A_s \times V_0 \times A_i} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- X ——水样中待测组分的含量 ($\mu\text{g/L}$);
- A ——测定液中待测组分的峰面积;
- C_s ——标准溶液中待测组分的浓度 ($\mu\text{g/L}$);
- V ——定容体积 (mL);
- A_i ——样液中内标的峰面积;
- A_{si} ——标准工作液中内标峰面积;
- A_s ——标准溶液中待测组分的峰面积;
- V_0 ——测定水样的体积 (mL)。

计算结果扣除空白, 结果保留二位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

9 其他

磺胺类定量限为 $0.050 \mu\text{g/L}$, 氯霉素类中氯霉素定量限为 $0.010 \mu\text{g/L}$, 氟苯尼考和甲砒霉素定量限为 $0.025 \mu\text{g/L}$, 四环素类定量限为 $0.10 \mu\text{g/L}$, 硝基呋喃类定量限为 $0.025 \mu\text{g/L}$, 喹诺酮类定量限为 $0.10 \mu\text{g/L}$, 孔雀石绿和隐色孔雀石绿定量限为 $0.025 \mu\text{g/L}$ 。 $0.010 \mu\text{g/L}$ ~ $1.0 \mu\text{g/L}$ 回收率在60%~120%。

附录 A
(资料性附录)
参考色谱条件

表 A.1 孔雀石绿梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (0.1%甲酸水溶液)	流动相 B (乙腈)	曲线
-----	0.300	80%	20%	-----
1.00	0.300	20%	80%	6
2.00	0.300	20%	80%	6
2.10	0.300	5%	95%	6
3.00	0.300	5%	95%	6
3.50	0.300	80%	20%	6
6.00	0.300	80%	20%	6

表 A.2 四环素类药物和喹诺酮类药物梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (0.1%甲酸水溶液)	流动相 B (甲醇)	曲线
-----	0.300	85%	15%	-----
2.50	0.300	50%	50%	6
2.60	0.300	20%	80%	6
3.50	0.300	20%	80%	6
3.60	0.300	85%	15%	6
5.00	0.300	85%	15%	6

表 A.3 磺胺类药物梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (0.1%甲酸水溶液)	流动相 B (甲醇)	曲线
-----	0.300	95%	5%	-----
0.20	0.300	95%	5%	6
4.00	0.300	50%	50%	6
4.20	0.300	50%	50%	6
4.80	0.300	95%	5%	6
6.00	0.300	95%	5%	6

表 A.4 氯霉素类和硝基呋喃类梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (5mmol/L 乙酸铵)	流动相 B (甲醇)	曲线
-----	0.300	95%	5%	-----

表A.4 (续)

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (5mmol/L 乙酸铵)	流动相 B (甲醇)	曲线
1.00	0.300	95%	5%	6
2.00	0.300	5%	95%	6
4.00	0.300	95%	5%	6
5.00	0.300	95%	5%	6

附录B
(资料性附录)
参考质谱条件

B.1 孔雀石绿质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 电喷雾电压 (IS)：5500 V；
- d) 气帘气 (CUR)：35 psi；
- e) 雾化气 (GS1)：50 psi；
- f) 辅助气 (GS2)：60 psi；
- g) 离子源温度 (TEM)：500℃；
- h) 其他质谱参数见表 B.1。

表 B.1 孔雀石绿药物质谱参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
孔雀石绿 Malachite Green	329.2	313.2*	48	35
		208.1	48	35
隐色孔雀石绿 Leucomalachite Green	331.2	239.2	45	35
		315.2*	45	35
孔雀石绿-D ₅ Malachite Green-D ₅	334.2	318.2	48	35
隐色孔雀石绿-D ₆ Leucomalachite Green-D ₆	337.2	321.2	45	35

注：*为定量离子

B.2 四环素类药物质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 电喷雾电压 (IS)：5500 V；
- d) 气帘气 (CUR)：40 psi；
- e) 雾化气 (GS1)：60 psi；
- f) 辅助气 (GS2)：70 psi；
- g) 离子源温度 (TEM)：600℃；
- h) 其他质谱参数见表 B.2。

表 B.2 四环素类和喹诺酮类药物质谱参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
四环素 Tetracycline	445.2	410.2*	27	40
		427.3	17	40
金霉素 Chlortetracycline	479.2	444.2*	28	40
		462.2	22	40
土霉素 Oxytetracycline	461.2	443.2*	17	40
		426.1	25	40
强力霉素 Doxycycline	445.2	428.2*	25	40
		154.2	35	40
恩诺沙星 Enrofloxacin	360.2	316.2*	27	80
		245.2	35	80
环丙沙星 Ciprofloxacin	332.1	288.2*	34	40
		245.2	24	40
诺氟沙星 Norfloxacin	320.2	276.2*	23	40
		233.2	33	40

注：*为定量离子

B.3 磺胺类药物质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 电喷雾电压 (IS)：5500 V；
- d) 气帘气 (CUR)：45 psi；
- e) 雾化气 (GS1)：50 psi；
- f) 辅助气 (GS2)：80 psi；
- g) 离子源温度 (TEM)：550℃；
- h) 其他质谱参数见表 B.3。

表 B.3 磺胺类药物质谱参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
磺胺甲噁二唑 Sulfamethizole	271.2	156.2*	18	20
		108.2	31	20

表 B.3 (续)

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
磺胺氯吡嗪 Sulfachloropyridazine	285.2	156.1*	19	20
		108.2	31	20
磺胺噻唑 Sulfathiazole	256.2	156.1*	21	20
		107.2	29	20
磺胺邻二甲氧嘧啶 Sulfadoxine	311.1	156.2*	27	20
		108.2	34	20
磺胺对甲氧嘧啶 Sulfamer	281.2	156.2*	23	20
		108.2	24	20
磺胺甲氧吡嗪 Sulfamethoxy pyridazine	281.2	156.2*	23	20
		215.2	24	20
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	279.1	156.2*	26	20
		204.2	22	20
磺胺苯吡唑 Sulfaphenazole	315.1	156.2*	27	20
		160.2	29	20

注：*为定量离子

B.4 氯霉素类和硝基呋喃类药物质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描/负离子扫描；
- c) 电喷雾电压 (IS)：4000 V / -4500 V；
- d) 气帘气 (CUR)：40 psi；
- e) 雾化气 (GS1)：60 psi；
- f) 辅助气 (GS2)：70 psi；
- g) 离子源温度 (TEM)：550℃；
- h) 其他质谱参数见表 B.4。

表 B.4 氯霉素类、硝基呋喃类药物质谱参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
氯霉素 Chloroamphenicol	321.0	152.0*	-21	-60
		257.0	-16	-60
甲砒霉素 Thiamphenicol	354.0	185.1*	-27	-60
		290.0	-17	-60

表 B.4 (续)

化合物	母离子	子离子	碰撞能量 CE (V)	去簇电压 DP (V)
氟苯尼考 Florfenicol	356.0	185.0*	-24	-60
		336.0	-12	-60
呋喃唑酮 Furazolidone	226.1	95.0*	20	70
		139.0	20	70
呋喃西林 Nitrofurazone	199.1	182.0*	16	80
		156.1	16	70
呋喃妥因 Nitrofurantoin	237.0	151.9*	-15	-40
		124.1	-19	-40
呋喃它酮 Furaltadone	325.1	281.2*	16	20
		252.2	20	20
氯霉素-D ₅ Chloroamphenicol-D ₅	326.0	157.0	-21	-60

注：*为定量离子