

中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—4—2014

饲料中氟喹诺酮类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of fluoroquinolones in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2014-04-01 发布

2014-07-01 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:中国农业大学动物医学院。

本标准主要起草人:沈建忠、程林丽、张素霞、王战辉、吴聪明、肖希龙。

饲料中氟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氟喹诺酮类药物含量测定的液相色谱—串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中盐酸环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、甲磺酸达氟沙星、盐酸沙拉沙星含量的测定。

本方法在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中 6 种药物的检测限为 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 200.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

用甲酸甲醇溶液提取饲料中的氟喹诺酮类药物，HLB 固相萃取柱净化，滤膜过滤后液相色谱—串联质谱法测定，基质匹配标准曲线校正，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

- 4.1 盐酸环丙沙星(Ciprofloxacin hydrochloride, CPFX): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.2 恩诺沙星(Enrofloxacin, EFLX): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.3 诺氟沙星(Norfloxacin, NFLX): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.4 氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.5 甲磺酸达氟沙星(Danofloxacin mesylate, DANO): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.6 盐酸沙拉沙星(Sarafloxacin hydrochloride, SALX): 纯度 $\geq 99.7\%$ 。
- 4.7 甲醇: 色谱纯。
- 4.8 HLB 固相萃取柱: 规格为 500 mg/6 mL。
- 4.9 乙腈: 色谱纯。
- 4.10 氢氧化钠溶液(30 mmol/L): 称取 0.12 g 氢氧化钠, 用 100 mL 水溶解。
- 4.11 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L): 称取 6.8 g 磷酸氢二钾, 加 500 mL 水溶解, 用 30 mmol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 7.0。
- 4.12 1% 甲酸甲醇溶液: 量取 10 mL 甲酸于 990 mL 甲醇中, 混匀。
- 4.13 5% 甲醇溶液: 量取 5 mL 甲醇和 95 mL 水, 混匀。
- 4.14 氟喹诺酮类药物标准储备液(2.5 mg/mL): 准确称取盐酸环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙

星、甲磺酸达氟沙星、盐酸沙拉沙星各 25 mg, 分别用 30 mmol/L 氢氧化钠溶液溶解定容至 10 mL, 2°C~8°C 保存, 有效期为 12 个月。

4.15 氟喹诺酮类药物混合标准储备液 I (250 μg/mL): 准确量取 6 种 2.5 mg/mL 单个标准储备液 (4.14) 各 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释定容至 10 mL, 2°C~8°C 保存, 有效期为 6 个月。

4.16 氟喹诺酮类药物混合标准储备液 II (10 μg/mL): 准确量取 250 μg/mL 混合标准储备液 I (4.15) 400 μL, 用乙腈稀释定容至 10 mL, 2°C~8°C 保存, 有效期为 6 个月。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱—串联质谱仪: 带电喷雾离子源。

5.2 涡旋混合仪。

5.3 离心机。

5.4 天平: 感量 0.01 g。

5.5 分析天平: 感量 0.000 1 g。

5.6 固相萃取装置。

5.7 0.22 μm 有机相滤膜。

6 采样和试样制备

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

7 测定步骤

7.1 配合饲料、浓缩饲料或精料补充料样品前处理

7.1.1 提取

称取试样 5 g (精确到 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 10.0 mL, 充分涡旋提取约 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 转移上清液至 50 mL 刻度管中, 残余物用 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 10.0 mL 重复提取 1 次, 合并 2 次上清液, 混匀, 为提取液。准确量取 5.0 mL 提取液于试管中, 50°C 氮气吹至 1 mL 左右, 加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 (4.11), 涡动 1 min, 为上样溶液。

7.1.2 净化

取 HLB 固相萃取柱 (4.8), 先依次用 5 mL 甲醇 (4.7)、5 mL 磷酸盐缓冲液 (4.11) 活化小柱。上样溶液全部过柱, 用 5% 甲醇 (4.13) 5 mL 淋洗, 挤干。用 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 5 mL 洗脱, 挤干, 收集洗脱液, 涡旋混匀, 过滤膜后供上机检测。

7.2 预混合饲料的样品前处理

7.2.1 提取

称取试样 2.5 g (精确到 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 10 mL, 充分涡旋提取约 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移至 50 mL 刻度管中, 残余物用 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 再提取 2 次, 每次 10 mL, 合并 3 次上清液, 混匀, 为总提取液。准确量取 7.5 mL 总提取液 (为分取液) 于试管中, 50°C 氮气吹至约 1 mL, 加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 (4.11), 涡动 1 min, 为上样溶液。

7.2.2 净化

取 HLB 固相萃取柱 (4.8), 先依次用 5 mL 甲醇 (4.7)、5 mL 磷酸盐缓冲液 (4.11) 活化小柱。将上样溶液全部通过小柱, 用 5% 甲醇 (4.13) 5 mL 淋洗, 挤干。用含 1% 甲酸甲醇溶液 (4.12) 5 mL 洗脱, 挤干, 收集洗脱液 (为净化液), 涡旋混匀, 过滤膜后供上机检测。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

称取 6 个空白饲料样品,按 7.1~7.2 步骤进行样品前处理后制得多个空白基质样品溶液。准确移取 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟喹诺酮类混合标准储备液 II (4.16) 适量,用空白基质样品溶液稀释定容至 5 mL,配制成浓度为 20 ng/mL 、50 ng/mL 、100 ng/mL 、200 ng/mL 、500 ng/mL 、1 000 ng/mL 、2 000 ng/mL 的基质匹配标准溶液,过 0.22 μm 滤膜后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 50 mm,内径 4.6 mm,粒径 1.7 μm ;或相当者。

柱温:室温。

流动相:A 为 0.1% 甲酸;B 为含 0.1% 甲酸的乙腈。梯度洗脱程序见表 1。

流速:0.3 mL/min 。

进样体积:10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

序号	时间, min	A, %	B, %
1	0.0	92	8
2	2.5	85	15
3	3.5	70	30
4	4.0	92	8
5	5.0	92	8

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源,正离子模式。

检测方式:多反应检测(MRM)。

毛细管电压:2.8 kV。

源温度:80 $^{\circ}\text{C}$ 。

去溶剂温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。

锥孔气流:氮气,26 L/h。

去溶剂气流:氮气,600 L/h。

各药物的特征离子对及其相应的锥孔电压、碰撞电压见表 2。

表 2 氟喹诺酮类药物测定的特征离子对、锥孔电压和碰撞能量

序号	药物名称	特征离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能, eV
1	氧氟沙星	362.1 > 261.0	362.1 > 261.0	35	25
		362.1 > 318.1			20
2	诺氟沙星	320.0 > 276.0	320.0 > 276.0	35	20
		320.0 > 302.0			20
3	盐酸环丙沙星	332.1 > 244.7	332.1 > 244.7	35	20
		332.1 > 287.8			20
4	甲磺酸达氟沙星	358.1 > 314.0	358.1 > 340.0	35	20
		358.1 > 340.0			20
5	恩诺沙星	360.1 > 245.0	360.1 > 316.2	35	25
		360.1 > 316.2			20
6	盐酸沙拉沙星	386.0 > 342.0	386.0 > 342.0	40	20
		386.0 > 368.0			25

7.4.3 定性测定

目标药物选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,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

单位为百分率

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

在仪器最佳工作条件下,对基质匹配标准溶液进样,以峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标绘制工作曲线,用单点或多点校正对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,基质匹配标准溶液特征离子色谱图参见图 A. 1。

8 结果计算

试样中目标药物含量 X_i 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X_i = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——试样溶液中对应目标药物的峰面积;

A_s ——基质匹配标准溶液中对应目标药物的峰面积;

C_s ——基质匹配标准溶液中对应目标药物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——净化液体积,单位为毫升(mL);

m ——样品的质量,单位为克(g);

V_1 ——分取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——总提取液体积,单位为毫升(mL)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

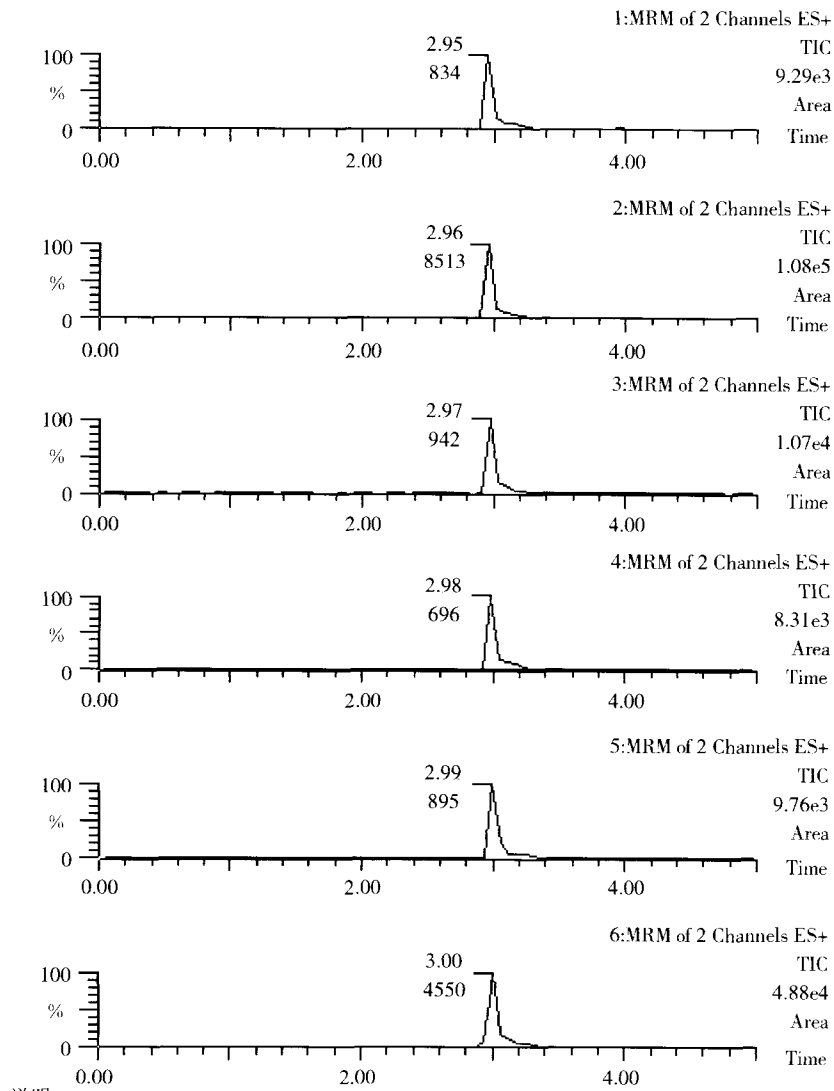
9 重复性

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)

氟喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图

氟喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 A.1。



说明:

- | | |
|-----------|------------|
| 1—氧氟沙星; | 4—甲磺酸达氟沙星; |
| 2—诺氟沙星; | 5—恩诺沙星; |
| 3—盐酸环丙沙星; | 6—盐酸沙拉沙星。 |

图 A.1 50 ng/mL 氟喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图