



中华人民共和国国家标准

GB/T 40462—2021

有机肥料中 19 种兽药残留量的测定 液相色谱串联质谱法

Determination of 19 veterinary medicines in organic fertilizer—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2021-08-20 发布

2022-03-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会(SAC/TC 105)归口。

本文件起草单位：上海海关工业品与原材料检测技术中心、上海市农业科学院、上海化工院检测有限公司、上海交通大学、成都产品质量检验研究院有限责任公司。

本文件主要起草人：孙明星、吴晓红、李思瑾、司文帅、沈国清、冷远鹏、白冰、刘倩、蔡婧、商照聪、颜坤、王鲁梅、王晨、李铭。



有机肥料中 19 种兽药残留量的测定 液相色谱串联质谱法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件描述了有机肥料中 19 种兽药残留量的液相色谱串联质谱测定方法。

本文件适用于有机肥料中金刚烷胺(AMT)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺哒嗪(SDZ)、磺胺甲恶唑(SMX)、磺胺噻唑(STZ)、磺胺甲基嘧啶(SMI)、磺胺二甲异恶唑(SIZ)、磺胺甲噻二唑(SMT)、磺胺二甲嘧啶(SMZ)、磺胺 6 甲氧嘧啶(SMM)、磺胺对甲氧嘧啶(SM)、磺胺甲氧哒嗪(SMPZ)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺邻二甲氧嘧啶(SDO)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、诺氟沙星(NFC)、环丙沙星(CFC)、恩诺沙星(EFC)、氧氟沙星(OFC)残留量的测定。

本方法检出限分别为:磺胺噻唑、磺胺 6 甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑和磺胺氯哒嗪均为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$;其余目标物均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 8571 复混肥料 实验室样品制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的兽药,用 Na_2EDTA McIlvaine 溶液及乙腈-乙酸溶液提取,经固相萃取柱净化,用高效液相色谱串联质谱仪进行测定,外标或内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯且符合残留检测要求的试剂。

5.1 水,GB/T 6682,一级。

5.2 金刚烷胺、磺胺吡啶、磺胺哒嗪、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲异恶唑、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲嘧啶、磺胺 6 甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、氘代诺氟沙星(诺氟沙星- D_5)、氘代环

丙沙星(环丙沙星-D₈)、氟代恩诺沙星(恩诺沙星 D₅)标准品:纯度不小于 95%。标准品信息见附录 A。

5.3 甲醇:色谱纯。

5.4 甲酸:色谱纯。

5.5 柠檬酸溶液(0.1 mol/L)。称取 21.01 g 柠檬酸,用水溶解,并定容至 1 000 mL。

5.6 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L)。称取 71.63 g 磷酸氢二钠,用水溶解,并定容至 1 000 mL。

5.7 McIlvaine 缓冲溶液:将 1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液(5.5)与 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液(5.6)混合,必要时用氢氧化钠或盐酸调节 pH 值至 4.00 ± 0.05 。

5.8 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(0.02 mol/L):称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠放入 1 625 mL McIlvaine 缓冲溶液(5.7)中,使其溶解,然后用纯水 5 倍稀释,混匀。

5.9 乙腈-乙酸溶液(9+1):量取 90 mL 乙腈与 10 mL 乙酸混合。

5.10 甲酸水溶液(0.1%)。准确吸取 1 mL 甲酸于 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至 1 000 mL。

5.11 混合标准储备液(100 μg/mL):分别称取 19 种适量的兽药标准品(5.2),用甲醇溶解配制成 19 种兽药浓度均为 100 μg/mL 的混合标准储备液。

混合标准储备液应在 -18 °C 冰箱中保存,有效期 3 个月。

5.12 混合标准工作液(1 μg/mL):准确吸取混合标准储备液(5.11)10 mL 转移至 1 000 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,配成 1 μg/mL 混合标准工作液。

混合标准工作液应在 4 °C 下保存,有效期 1 周。

5.13 氟代同位素内标储备液(100 μg/mL):称取氟代诺氟沙星、氟代环丙沙星、氟代恩诺沙星标准品(5.2),用甲醇溶解配制成 3 种内标物浓度均为 100 μg/mL 的标准储备液。

氟代同位素内标储备液应在 -18 °C 冰箱中保存,有效期 3 个月。

5.14 混合内标工作液(5 μg/mL 和 1 μg/mL):准确吸取适量氟代同位素内标储备液(5.13),用甲醇稀释配成 5 μg/mL 和 1 μg/mL 的内标工作液。

混合内标工作液应在 4 °C 下保存,有效期 1 周。

5.15 复溶液:准确吸取 6.6 mL 的磷酸以及 7.4 mL 的三乙胺与 1 000 mL 的水混合,取 85 mL 混合后的溶液与 15 mL 乙腈混合。

5.16 HLB(亲水/油平衡)固相萃取小柱:如 Waters Oasis PRiME HLB 60 mg, 3 mL 固相萃取柱,或功能相当者。

5.17 滤膜,0.22 μm;如亲水 PTFE 滤膜或相当者。

5.18 有机肥料空白试样:不含待测的 19 种兽药残留的有机肥料。

注:也可以是经检测空白值在检出限以下的有机肥料样品,并经过二至三次提取(见 8.2)后于 105 °C 烘干至与待测样品水分相近。

6 仪器设备

6.1 通常实验室仪器。

6.2 试验筛:孔径 1.00 mm 和 2.00 mm。

6.3 高效液相色谱串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

6.4 氮吹仪:氮气流量 1 L/min ~ 20 L/min;水温控制室温 +5 °C ~ 90 °C(可调控)。

6.5 天平:感量 0.1 mg。

6.6 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

6.7 振荡器。

6.8 pH 计:测量精度 ±0.02。

6.9 固相萃取装置。

7 试样制备

按照 GB/T 8571 规定进行。试样制备时应将样品研磨至全部通过 1.00 mm 试验筛,若样品很难研碎,可研磨至全部通过 2.00 mm 试验筛。试样置于 4℃ 下避光保存。

8 试验步骤

8.1 平行试验

样品测定和空白试验均平行做两份试验。

8.2 提取

称取 (2.00 ± 0.02) g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 100 μ L 的 5 μ g/mL 混合内标工作液(5.14)混匀,再加入 5 mL Na_2EDTA McIlvaine 缓冲溶液(5.8),混匀后再加入 20 mL 乙腈-乙酸溶液(5.9),在振荡器上振摇 20 min,在 4 000 r/min 转速下离心 10 min,保留上清液 A,用于兽药含量的测定。

8.3 净化

取 2 mL 上清液 A 过 3 mL 固相萃取小柱(5.16),保持约每秒一滴的流速,准确量取 1 mL 流出液,再过 0.22 μ m 滤膜,待上机测试。

8.4 基质匹配标准曲线的制备

8.4.1 外标基质匹配标准溶液制备

取有机肥料空白试样(5.18),按 8.2 和 8.3 规定的步骤处理,在洗脱液中加入混合标准工作液(5.12),配置浓度为 0.010 μ g/mL、0.020 μ g/mL、0.050 μ g/mL、0.100 μ g/mL、0.150 μ g/mL 及 0.200 μ g/mL 的系列标准曲线工作溶液,用液相色谱串联质谱仪测定(测定条件见 8.5)。以定量离子的峰面积为纵坐标,标准溶液质量浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

8.4.2 内标基质匹配标准曲线制备

取有机肥料空白试样(5.18),按 8.2 和 8.3 规定的步骤处理,在洗脱液中加入混合标准工作液(5.12)和混合内标工作液(5.14),配成浓度为 0.010 μ g/mL、0.020 μ g/mL、0.050 μ g/mL、0.100 μ g/mL、0.150 μ g/mL 及 0.200 μ g/mL 的系列基质匹配标准溶液(内标浓度为 0.010 μ g/mL),用液相色谱串联质谱仪测定。氧氟沙星和诺氟沙星以氘代诺氟沙星(5.2)为内标;环丙沙星以氘代环丙沙星(5.2)为内标;恩诺沙星以氘代恩诺沙星(5.2)为内标。以诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星的定量离子的峰面积和相对应内标物的定量离子峰面积的比值为纵坐标,标准溶液质量浓度为横坐标,绘制内标基质匹配标准曲线。

8.5 测定条件

8.5.1 色谱参考条件

推荐的色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,如 Thermo Hypersil GOLD aQ, 100 mm $\times$ 2.1 mm(i.d.), 1.9 μ m, 或相同分离功能色谱柱;

- b) 色谱柱温度:30 ℃;
- c) 流动相:A相为甲醇,B相为0.1%甲酸水溶液(5.10);
- d) 流速:0.4 mL/min;
- e) 梯度洗脱:梯度洗脱条件见表1。
- f) 进样体积:2 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.0	5	95
1.0	5	95
3.0	20	80
4.0	20	80
4.5	30	70
5.5	70	30
6.9	70	30
7.0	5	95
9.0	5	95

8.5.2 质谱参考条件

推荐的质谱条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:选择反应监测;
- d) 喷雾电压:3 800 V;
- e) 离子传输管温度:350 ℃;
- f) 氮气作为鞘气和辅助气,鞘气流速0.42 L/min,辅助气流速1.42 L/min;
- g) 氩气作为碰撞气,碰撞压力为0.2 Pa;
- h) 测试物质母离子、定量/定性离子及相应碰撞能量和锥孔电压见表2。

表2 19种兽药的母离子、定量/定性离子及相应碰撞能量和锥孔电压

兽药	简写	母离子(m/z)	产物离子(m/z) ^a	碰撞能量 eV	锥孔电压 V
金刚烷胺	AMT	152.0	135.1/93.1	14/24	34
磺胺吡啶	SPD	250.0	156.0/108.0	16/25	30
磺胺哒嗪	SDZ	251.0	156.0/92.0	15/27	30
磺胺甲恶唑	SMX	254.0	156.0/92.0	16/26	30
磺胺噻唑	STZ	256.0	92.0/156.0	25/15	30
磺胺甲基噻唑	SMI	265.0	156.0/92.0	15/28	30

表 2 19 种兽药的母离子、定量/定性离子及相应碰撞能量和锥孔电压 (续)

兽药	简写	母离子(m/z)	产物离子(m/z) ^a	碰撞能量 eV	锥孔电压 V
磺胺二甲异恶唑	SIZ	268.0	156.0/92.0	13/28	30
磺胺甲噻二唑	SMT	271.0	92.0/156.0	30/15	30
磺胺二甲嘧啶	SMZ	279.1	186.0/92.0	16/28	30
磺胺-6-甲氧嘧啶	SMM	281.0	156.0/92.0	22/35	30
磺胺对甲氧嘧啶	SM	281.0	156.0/92.0	18/32	30
磺胺甲氧嘧啶	SMPZ	281.0	156.0/92.0	15/30	30
磺胺氯哒嗪	SCP	285.1	156.0/92.0	15/28	30
磺胺邻二甲氧嘧啶	SDO	311.0	156.0/92.0	15/32	30
磺胺间二甲氧嘧啶	SDM	311.1	156.0/92.0	20/32	30
诺氟沙星	NFC	320.1	276.1/233.0	20/25	32
环丙沙星	CFC	332.2	314.1/288.1	22/18	32
恩诺沙星	EFC	360.1	316.1/245	22/20	32
氧氟沙星	OFC	362.1	261.1/318.1	25/20	31
诺氟沙星-d ₅	NFC-d ₅	325	307	22	
环丙沙星-d ₈	CFC-d ₈	340	322	21	
恩诺沙星-d ₅	EFC-d ₅	365	321	19	
^a 定量离子及相应碰撞电压由加粗字体标出。					

8.6 定性定量方法

8.6.1 定性方法

在相同实验条件下,被测样品中待测物的保留时间与基质匹配标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且被测样品中待测物的离子相对丰度与浓度相近的基质匹配标准溶液中的对应离子相对丰度偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 离子相对丰度的允许偏差范围

%

相对丰度 a	允许偏差
$a > 50$	± 20
$50 \geq a > 20$	± 25
$20 \geq a > 10$	± 30
$a \leq 10$	± 50

8.6.2 定量方法

取试样溶液和基质匹配标准溶液,做多点校准,外标法和内标法定量计算。诺氟沙星、环丙沙星、恩

附录 B
(资料性)
典型谱图

B.1 19 种兽药及 3 种内标混合标准溶液总离子流图

19 种兽药及 3 种内标混合标准溶液总离子流图见图 B.1。

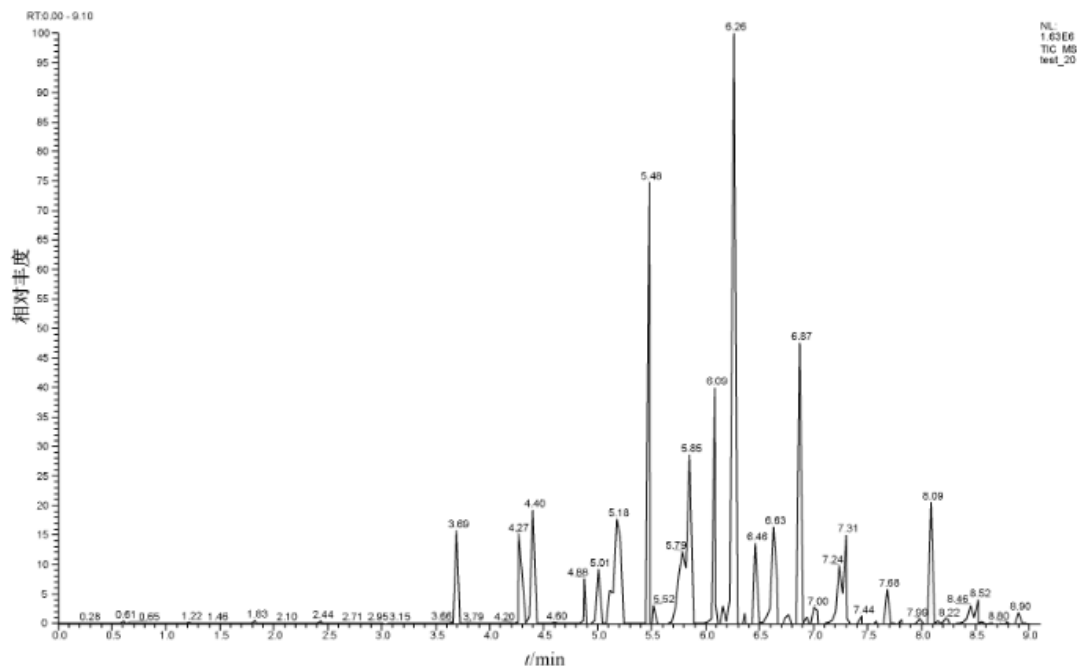


图 B.1 19 种兽药及 3 种内标混合标准溶液(0.020 $\mu\text{g/mL}$)的总离子流图

B.2 19 种兽药及三种内标混合标准溶液选择离子流图

19 种兽药及三种内标混合标准溶液选择离子流图见图 B.2。

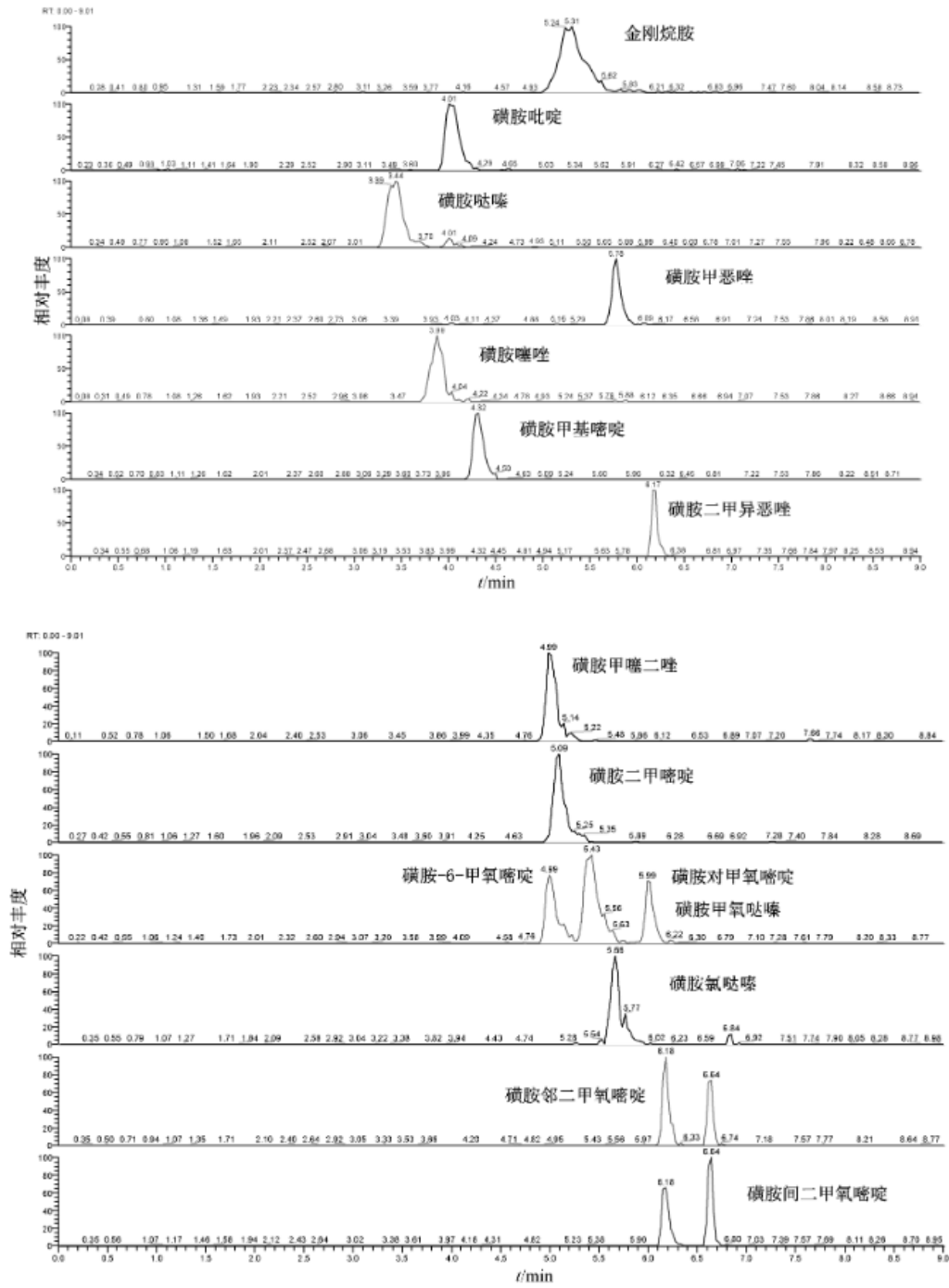


图 B.2 19 种兽药及 3 种内标混合标准溶液(0.050 $\mu\text{g/mL}$)的选择离子流图

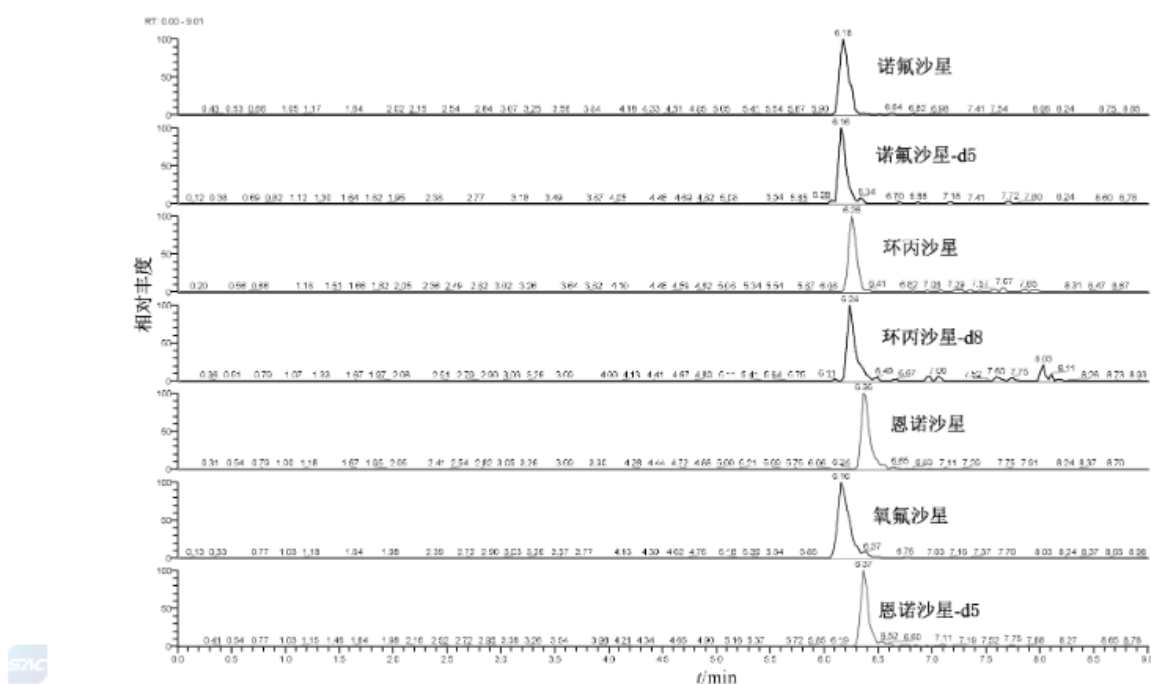


图 B.2 19 种兽药及 3 种内标混合标准溶液(0.050 $\mu\text{g/mL}$)的选择离子流图 (续)

B.3 空白有机肥料样品中添加回收的选择离子流图

空白有机肥料样品中添加回收的选择离子流图见图 B.3。

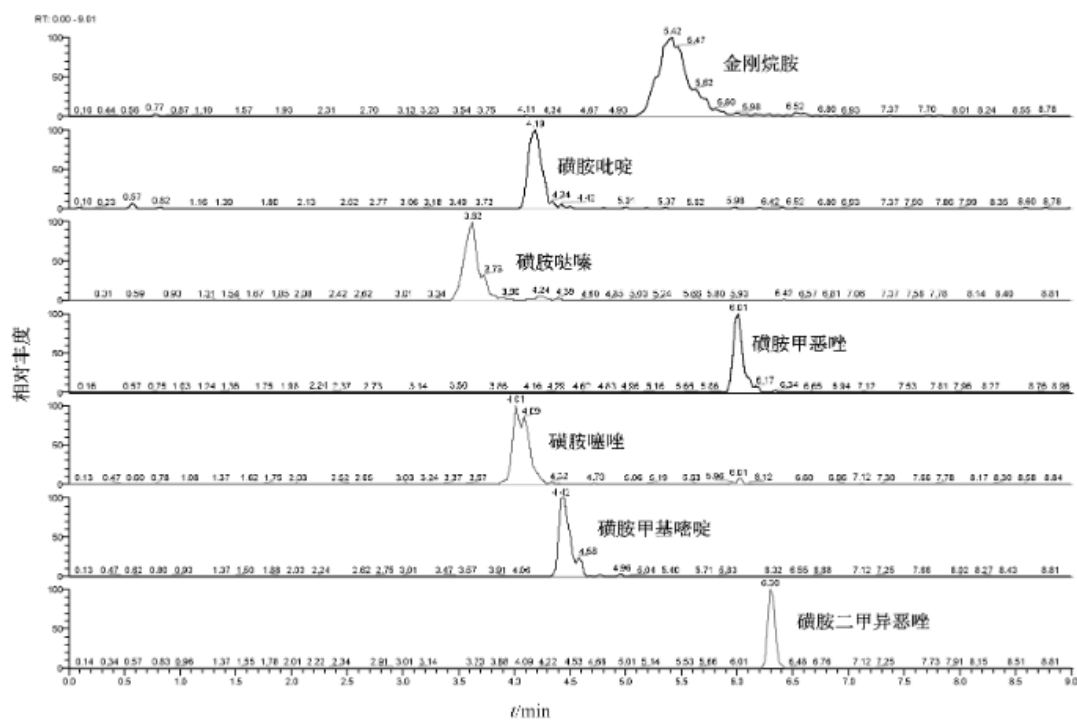


图 B.3 空白有机肥料样品中添加回收的选择离子流图(0.25 mg/kg)

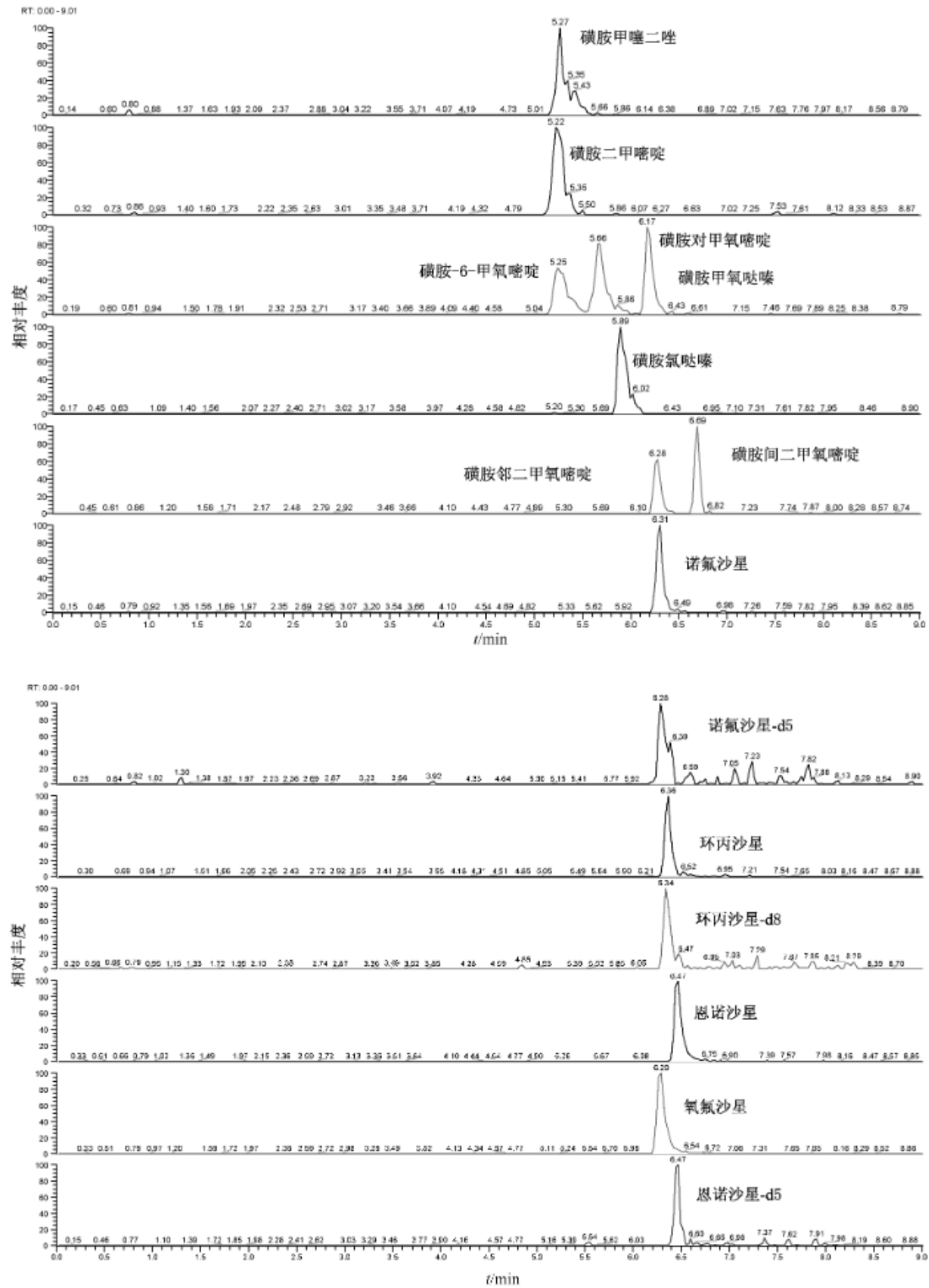


图 B.3 空白有机肥料样品中添加回收的选择离子流图(0.25 mg/kg) (续)

附录 C
(资料性)
试验报告示例

样品名称: 有机肥料
规格型号: ××××
标准名称和编号: 有机肥料中 19 种兽药残留量的测定 液相色谱串联质谱法 (GB/T ××××—××××)
检测日期: ××××年××月××日
检测条件: 仪器型号(××××)、实验室温度湿度等



兽药成分	样品名称×××		检测结果	说明
	测定值 1	测定值 2	平均值 ^a	允许差/回收率(%) ^b
金刚烷胺(AMT)				
磺胺吡啶(SPD)				
磺胺哒嗪(SDZ)				
磺胺甲恶唑(SMX)				
磺胺噻唑(STZ)				
磺胺甲基嘧啶(SMD)				
磺胺二甲异恶唑(SIZ)				
磺胺甲噻二唑(SMT)				
磺胺二甲嘧啶(SMZ)				
磺胺-6-甲氧嘧啶(SMM)				
磺胺对甲氧嘧啶(SM)				
磺胺甲氧哒嗪(SMPZ)				
磺胺氯哒嗪(SCP)				
磺胺邻二甲氧嘧啶(SDO)				
磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)				
诺氟沙星(NFC)				
环丙沙星(CFC)				
恩诺沙星(EFC)				
氧氟沙星(OFC)				
观察到的异常现象				
^a 至少两次以上的精密度范围内测定结果的算术平均值。				
^b 加标回收率或标准物质比对率。				