

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY 484-2025

渔业水体中 18 种抗生素的测定液相色谱-串联质谱法

Determination of 18 antibiotics in fisheries water-
Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2025-12-26 发布

2025-12-26 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 方法原理	2
5 试剂与材料	2
6 仪器与设备	3
7 采样	4
8 测定步骤	4
9 结果计算	7
10 灵敏度、准确度精密度	7
附录 A 多反应监测（MRM）色谱图	8

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：长沙市农产品质量监测中心、长沙市农业科学研究院、湖南省水产科学研究院、湖南省兽药饲料监察所、长沙市动植物疫病预防控制中心、长沙市农业综合行政执法支队。

本文件起草人：徐丽君、薛爽、刘畅、丑亚琴、杨博文、罗湘、范叶、谭美英、万译文、陈玲欢、张韬、朱振、冯晚霞、谭艳林、田新凯、邓清林、杨博、郑跃莲、刘会峰、罗扬、刘雨枫、钟健、李真诚、邓均红、周玉洁、索纹纹、杨霄、吴天晓、吴运钊。

渔业水体中 18 种抗生素的测定液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了渔业水体中18种抗生素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于渔业水体中18种抗生素的测定。

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

SL 187 水质采样技术规程

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

水样中的目标物经固相萃取柱富集和净化后，用带有电喷雾离子源的液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲醇：色谱纯。

5.1.3 乙酸铵：色谱纯。

5.1.4 甲酸：色谱纯。

5.1.5 氢氧化钠：优级纯。

5.1.6 盐酸： $\rho(\text{HCl})=1.19\text{ g/mL}$ ，优级纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 氢氧化钠溶液（0.4 g/mL）：称取 40 g 氢氧化钠，用适量水溶解冷却后，用水稀释至 100 mL。

5.2.2 盐酸溶液（v: v=1: 1）：取盐酸和实验用水按 1:1 的体积比进行混合。

5.2.3 0.1%甲酸溶液（含 5 mmol/L 乙酸铵）：称取 0.19 g 乙酸铵，加入 0.5 mL 甲酸，用水溶解并稀释至 500 mL，混匀。

5.2.4 甲醇水溶液（1:1, v:v）：取 100 mL 实验用水和 100 mL 甲醇，混合均匀。

5.3 标准品

磺胺类、氟喹诺酮类、氯霉素、氟苯尼考、氘代诺氟沙星-D₅、氘代恩诺沙星-D₅、氘代氯霉素-D₅、氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D₃、氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D₆，纯度应大于 97.0%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液（100 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取适量的磺胺类、氟喹诺酮类、氯霉素、氟苯尼考、氘代诺氟沙星-D₅、氘代恩诺沙星-D₅、氘代氯霉素-D₅、氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D₃、氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D₆ 标准品，用乙腈配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液，-18℃避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准溶液（100 ng/mL）：准确移取适量磺胺类、氟喹诺酮类、氯霉素和氟苯尼考标准储备溶液，用乙腈配制成 100 ng/mL 混合标准溶液，-18℃避光保存，有效期 1 个月。

1.4.3 混合内标标准溶液（100 ng/mL）：准确移取适量氘代诺氟沙星-D₅、氘代恩诺沙星-D₅、氘代氯霉素-D₅、氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D₃ 和氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D₆ 标准储备溶液，用乙腈配制成 100 ng/mL 混合内标标准溶液，-18℃避光保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱：填料为二乙烯苯和 N- 乙烯基吡咯烷酮共聚物，规格为 500 mg/6mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜（水相）：0.45 μm ，0.22 μm 。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾（ESI）离子源。

6.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.3 固相萃取装置。

6.4 氮吹仪。

6.5 涡旋混合器。

7 采样

按照SL 187 规定的方法采集样品。

8 测定步骤

8.1 样品预处理

样品经0.45 μm滤膜过滤备用，精确移取 20.00 mL滤液至50 mL离心管中，用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节至pH为3~5，加入适量的混合内标标准溶液，涡旋混合30 s，备用。

8.2 样品富集和净化

取固相萃取柱，依次用甲醇、水各5 mL活化。取备用液过柱，依次用水5 mL和20%甲醇水溶液5 mL淋洗，抽干，用5 mL甲醇洗脱两次，收集全部洗脱液，45 °C水浴氮气吹至近干，加入甲醇水溶液（1:1, v:v）1.0 mL，涡旋1 min溶解残余物，经过0.22 μm微孔滤膜过滤，液相色谱-串联质谱测定。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

8.3.1.1 正离子模式

- a) 色谱柱：C18 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)，或相当者；
- b) 流动相：A 为甲醇，B 为0.1%甲酸溶液（含5 mmol/L醋乙酸铵），流动相梯度洗脱条件参见表 1；
- c) 流速：0.30 mL/min；
- d) 柱温：35 °C；
- e) 进样量：4.0 μL；

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间（min）	A（%）	B（%）
0	10	90
1	10	90
8	45	55
8.1	10	90
10	10	90

8.3.1.2 负离子模式

- a) 色谱柱: C18 (50×2.1 mm, 1.7 μm), 或相当者;
- b) 流动相: A为甲醇, B 为水。流动相梯度洗脱条件参见表 2;
- c) 流速: 0.30 mL/min;
- d) 柱温: 35 °C;
- e) 进样量: 4.0 μL。

表 2 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	30	70
1.5	50	50
1.6	70	30
3	70	30
3.1	30	70
5	30	70

8.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正、负离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- d) 电离电压: 3.5 kV。
- e) 雾化温度: 350 °C。
- f) 定性、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量见表 3。

表 3 定性、定量离子对和碰撞能量

药物	离子对(m/z)	锥孔电压(v)	碰撞能量(ev)	定量内标
磺胺噻唑	256>108, 256>156*	28	25, 20	氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃
磺胺嘧啶	251>108, 251>156*	27	25, 17	氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃
磺胺甲基嘧啶	265>172, 265>156*	30	20, 17	氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃
磺胺二甲基嘧啶	279>156.3, 279>186.3*	34	17, 19	氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃
磺胺甲基异噁唑	254>108, 254>156*	28	24, 18	氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃
磺胺多辛	311>108, 311>156*	40	24, 18	氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D ₆
磺胺异噁唑	268>108, 268>156*	31	22, 18	氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D ₆
磺胺喹噁啉	301>108, 301>156*	38	24, 18	氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D ₆
恩诺沙星	360.3>245.1, 360.3>316.3*	36	26, 21	氘代恩诺沙星-D ₅

药物	离子对(m/z)	锥孔电压(v)	碰撞能量(ev)	定量内标
环丙沙星	332.2>245.1, 332.2>288.3*	32	24, 19	氘代环丙沙星-D ₈
氧氟沙星	362.3>261.1, 362.3>318.2*	34	28, 20	氘代诺氟沙星-D ₅
诺氟沙星	320.2>233.2, 320.2>276.2*	34	26, 19	氘代诺氟沙星-D ₅
洛美沙星	352.2>308.2, 352.2>334.1*	36	18, 20	氘代环丙沙星-D ₈
培氟沙星	334.2>233, 334.2>290.1*	34	25, 18	氘代诺氟沙星-D ₅
沙拉沙星	386.2>299.1, 386.2>342.2*	40	26, 19	氘代恩诺沙星-D ₅
达氟沙星	358.3>314.1, 358.3>340.2*	36	17, 23	氘代诺氟沙星-D ₅
氯霉素	320.6>152.2, 320.6>194.2*	-30	-18, -13	氘代氯霉素-D ₅
氟苯尼考	356>336, 356>185*	-20	-12, -17	氘代氯霉素-D ₅
氘代诺氟沙星-D ₅	325.3>307.1	36	22	——
氘代恩诺沙星-D ₅	365.3>321.3	36	20	——
氘代环丙沙星-D ₈	340.5>322.3	32	22	——
氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D ₃	314>156	38	18	——
氘代磺胺间二甲氧嘧啶-D ₆	317>156	38	17	——
氘代氯霉素-D ₅	326>157	-30	-18	——
注：*代表定量离子				

8.3.3 定性

在同样的测试条件下，试样溶液中各待测物保留时间与标准溶液中相应物质保留时间的偏差应在±2.5%之内；试样溶液中各待测物的离子相对丰度与标准溶液中相应物质的离子相对丰度相比，符合表4的要求。

表 4 试验溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对离子丰度 K, %	K>50	20≤K≤50	10<K<20	K≤10
允许的相对偏差, %	±20	±25	±30	±50

8.3.4 定量

取试样溶液和标准工作液，作单点或多点校准，按内标法定量。系列标准工作液及试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱条件下，标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录A，18种抗生素混合标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 A 中图 A.1，空白水样的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 A 中图 A.2，空白水样中添加各化合物标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 A 中图 A.3。

8.3.5 空白试验

用实验用水替代样品，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中待测物含量按标准曲线或公式(1)计算,计算结果需扣除空白值,保留3位有效数字。

$$X_i = \frac{A \times V \times A'_{is} \times C_s \times C_{is}}{V_m \times A_{is} \times A_s \times C'_{is}} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——样品中待测物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——样品溶液中待测物的峰面积;

A_s ——标准溶液中待测物的峰面积;

A_{is} ——样品溶液中待测物对应内标的峰面积;

A'_{is} ——标准溶液中待测物对应内标的峰面积;

C_s ——标准溶液中待测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{is} ——样品溶液中待测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C'_{is} ——标准溶液中待测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——溶解最终残余物体积的数量,单位为毫升(mL);

V_m ——供试试样的体积,单位为毫升(mL)。

10 灵敏度、准确度与精密度

1.1 灵敏度

本方法中各药物的检出限为0.05 ng/mL,方法定量限为0.1 ng/mL。

1.2 准确度

本方法添加浓度为(0.1~5.0) ng/mL 时回收率为(70~120)%。

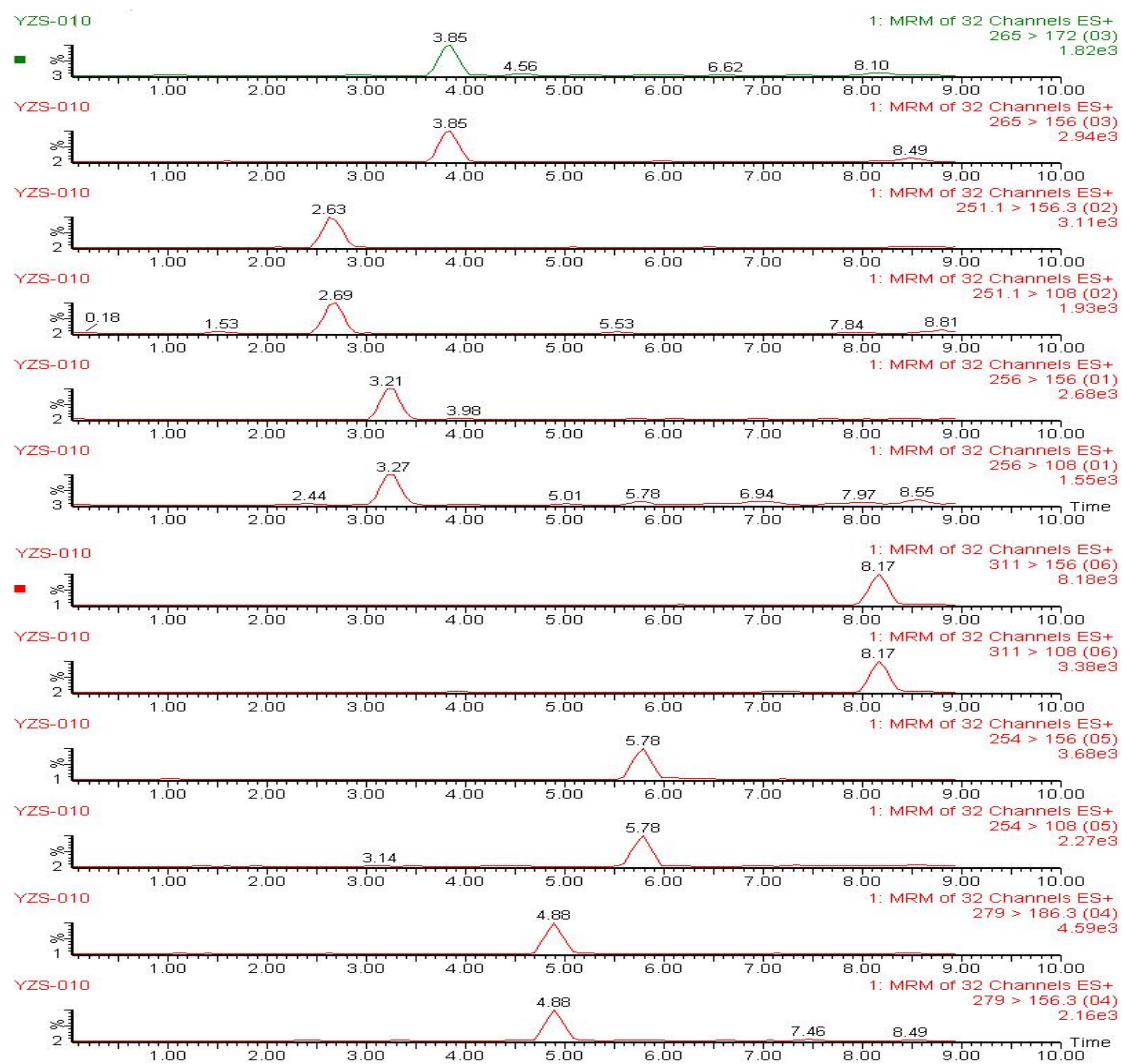
1.3 精密度

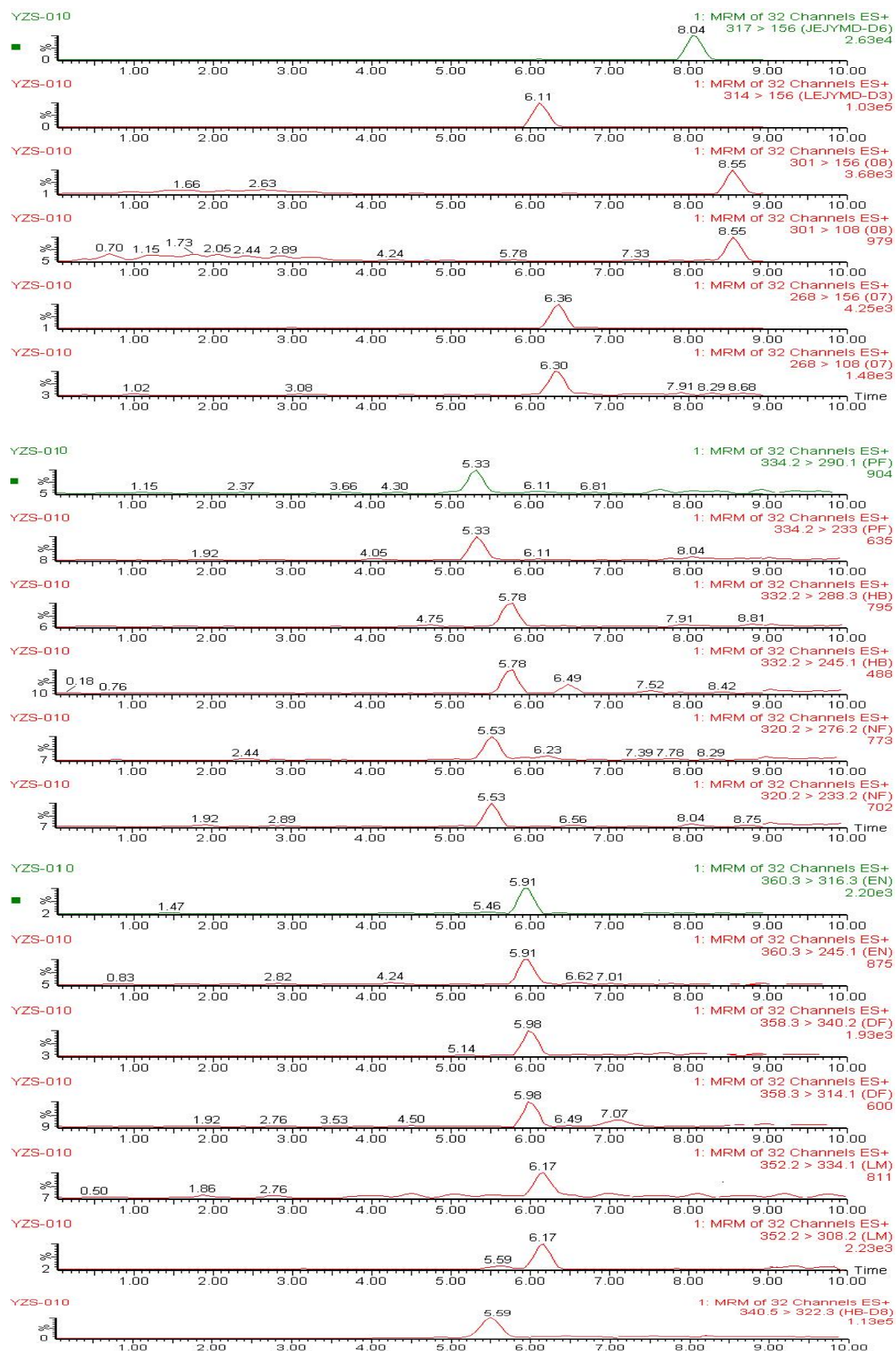
本方法的批内变异系数≤10%,批间变异系数≤15%。

附 录 A (资料性) 多反应监测 (MRM) 色谱图

A.1 18 种化合物和内标对照品

18种化合物和内标对照品的多反应监测 (MRM) 色谱图见图A.1。





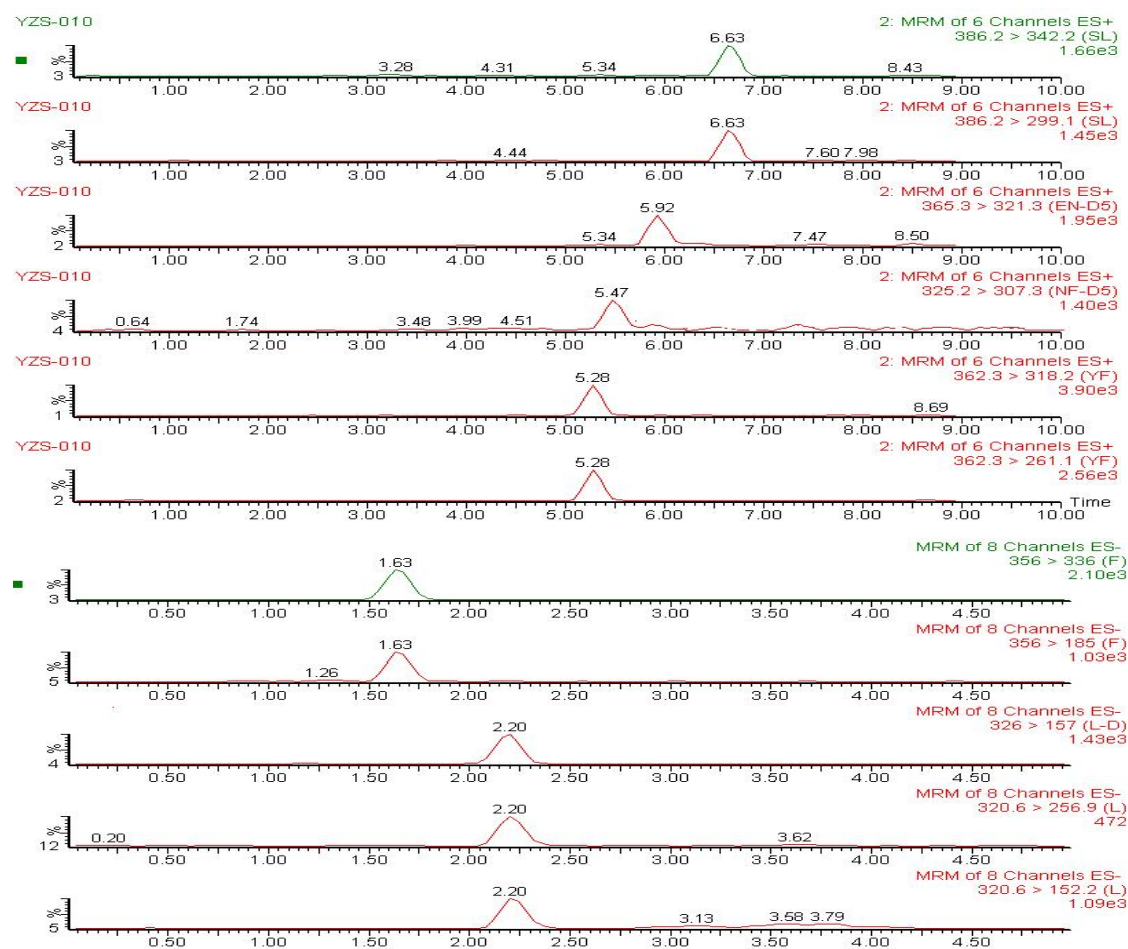
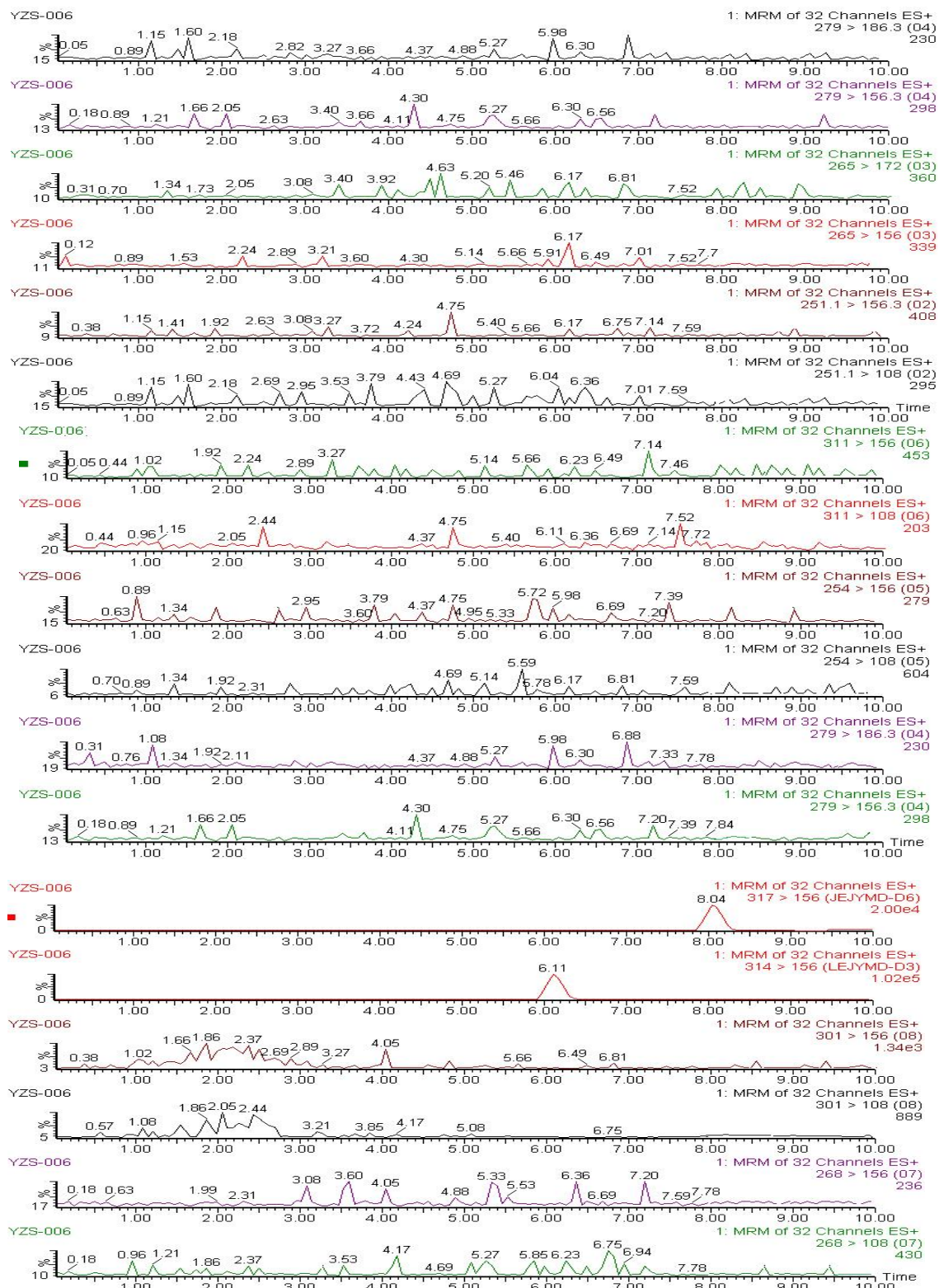
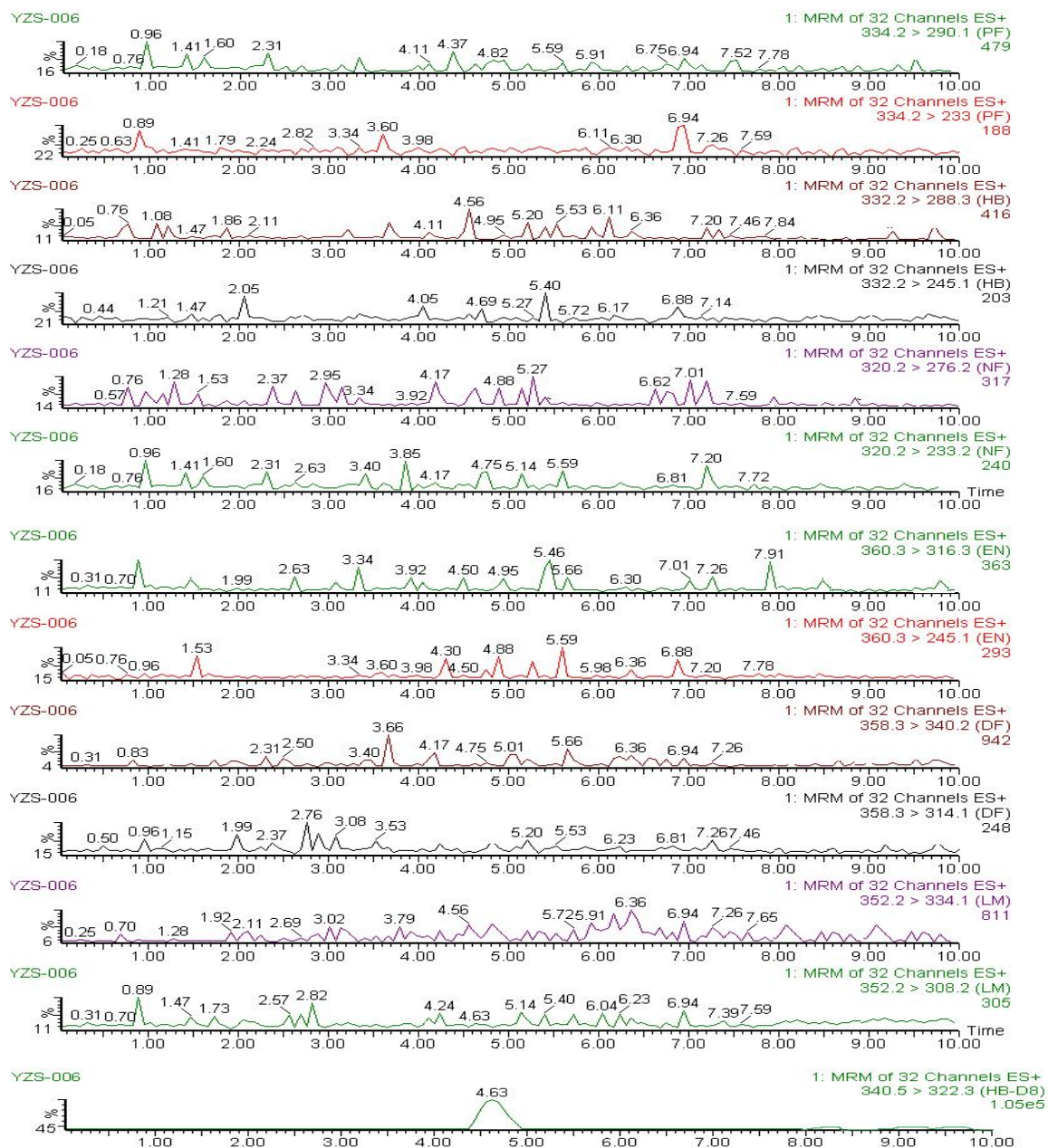


图 A.1 18 种化合物和内标对照品的多反应监测（MRM）色谱图

A.2 空白水样

空白水样的多反应监测（MRM）色谱图见图A.2。





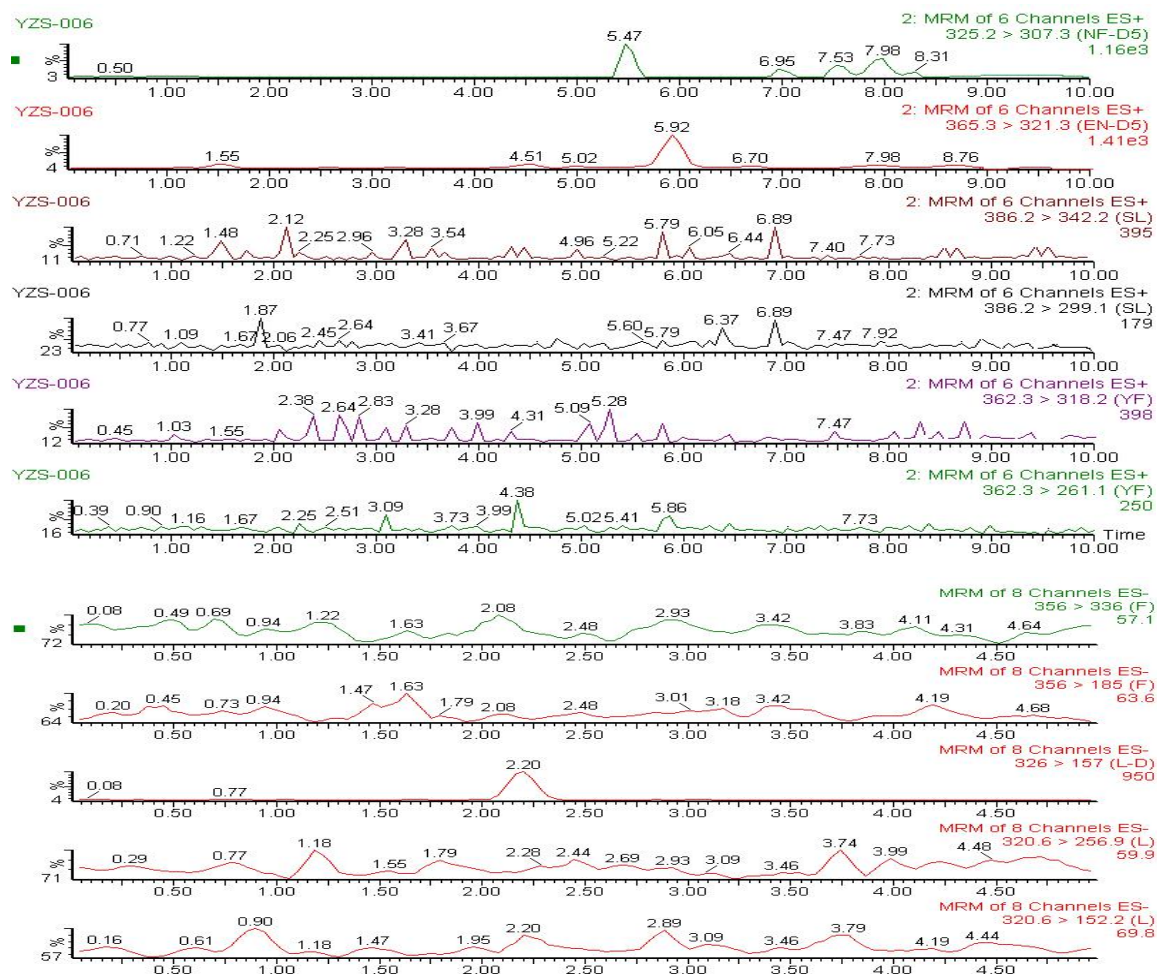
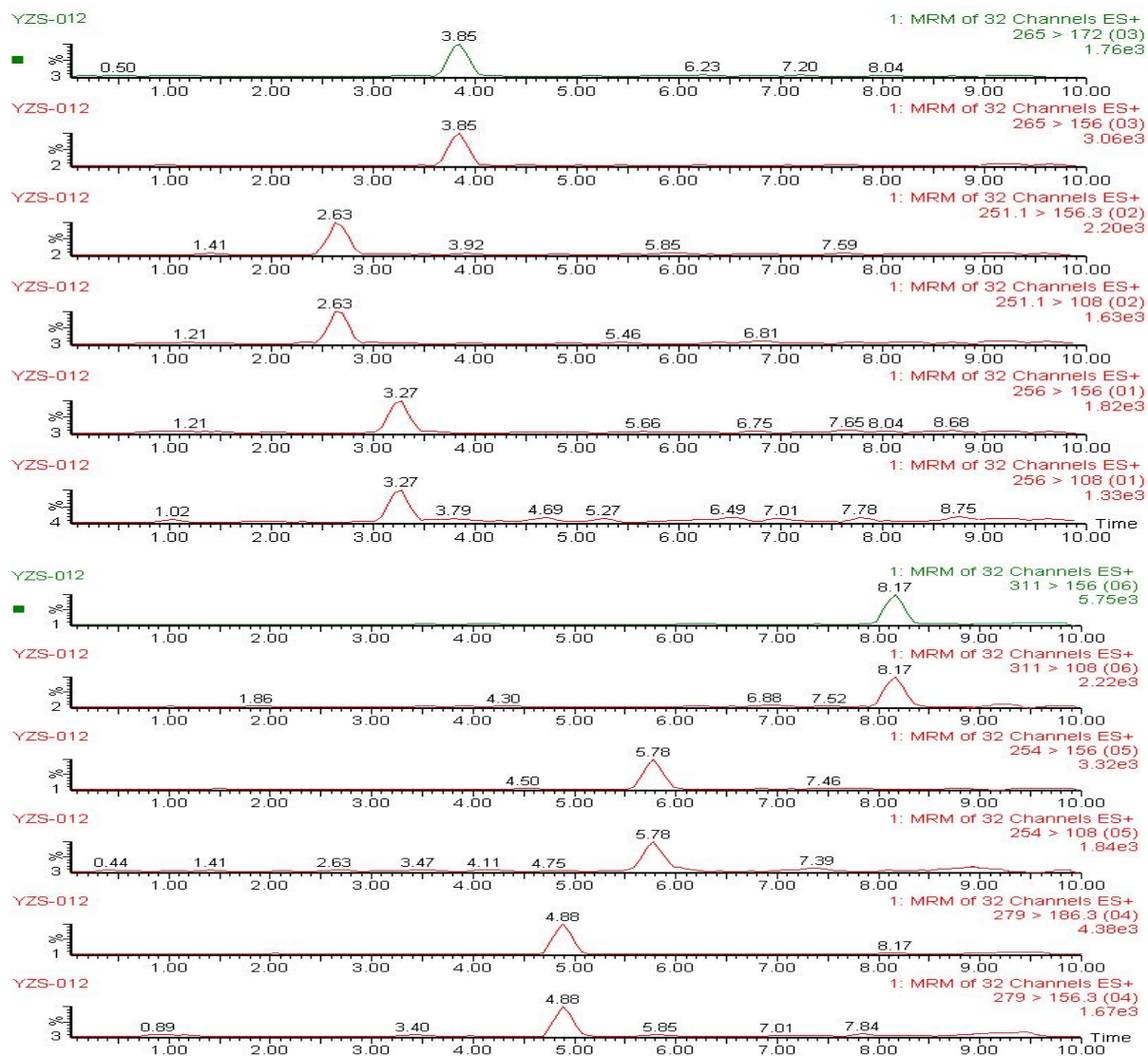
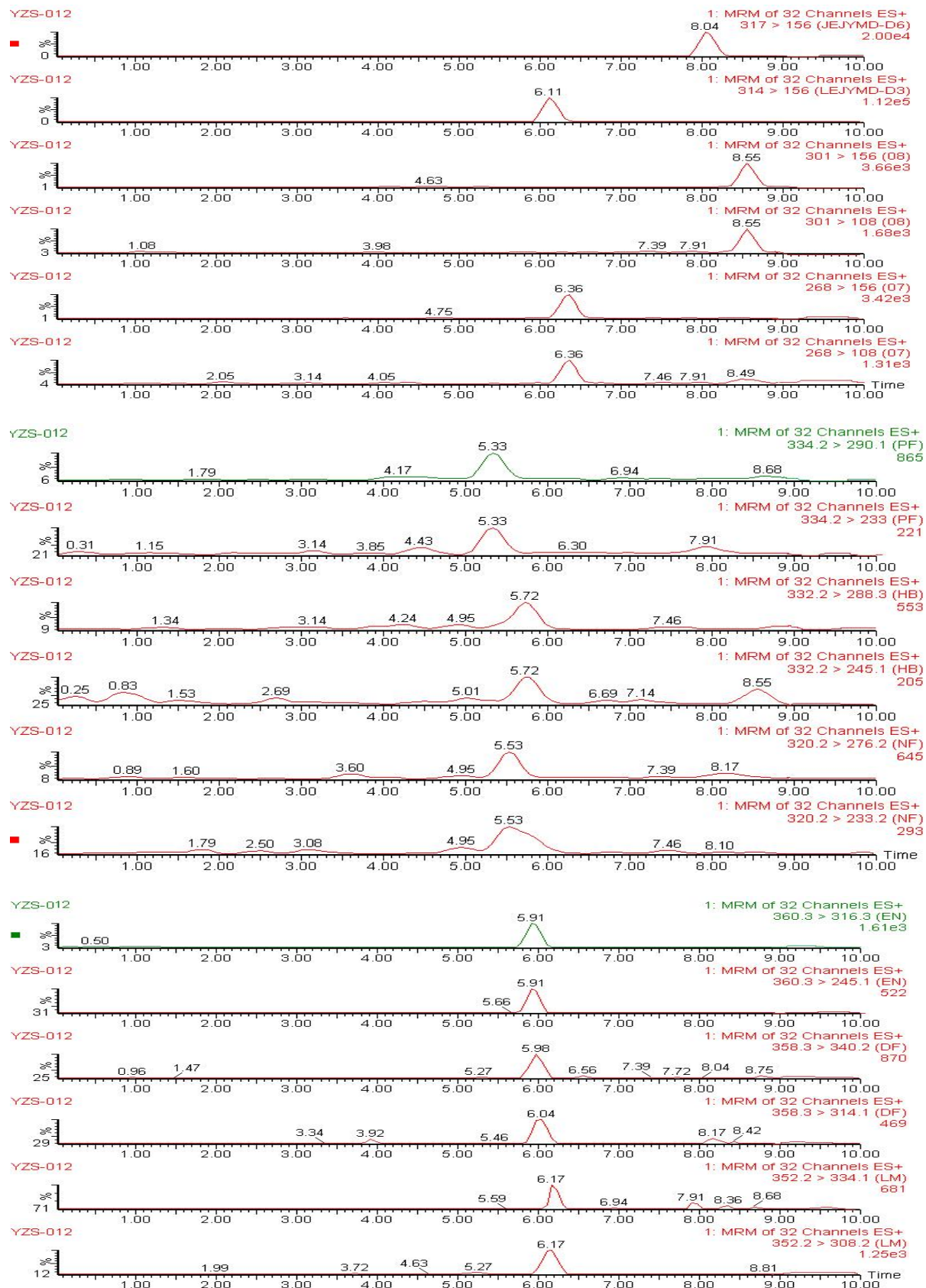


图 A.2 空白水样的多反应监测（MRM）色谱图

A.3 空白水样中添加各化合物标准溶液

空白水样中添加各化合物标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图见图A.3。





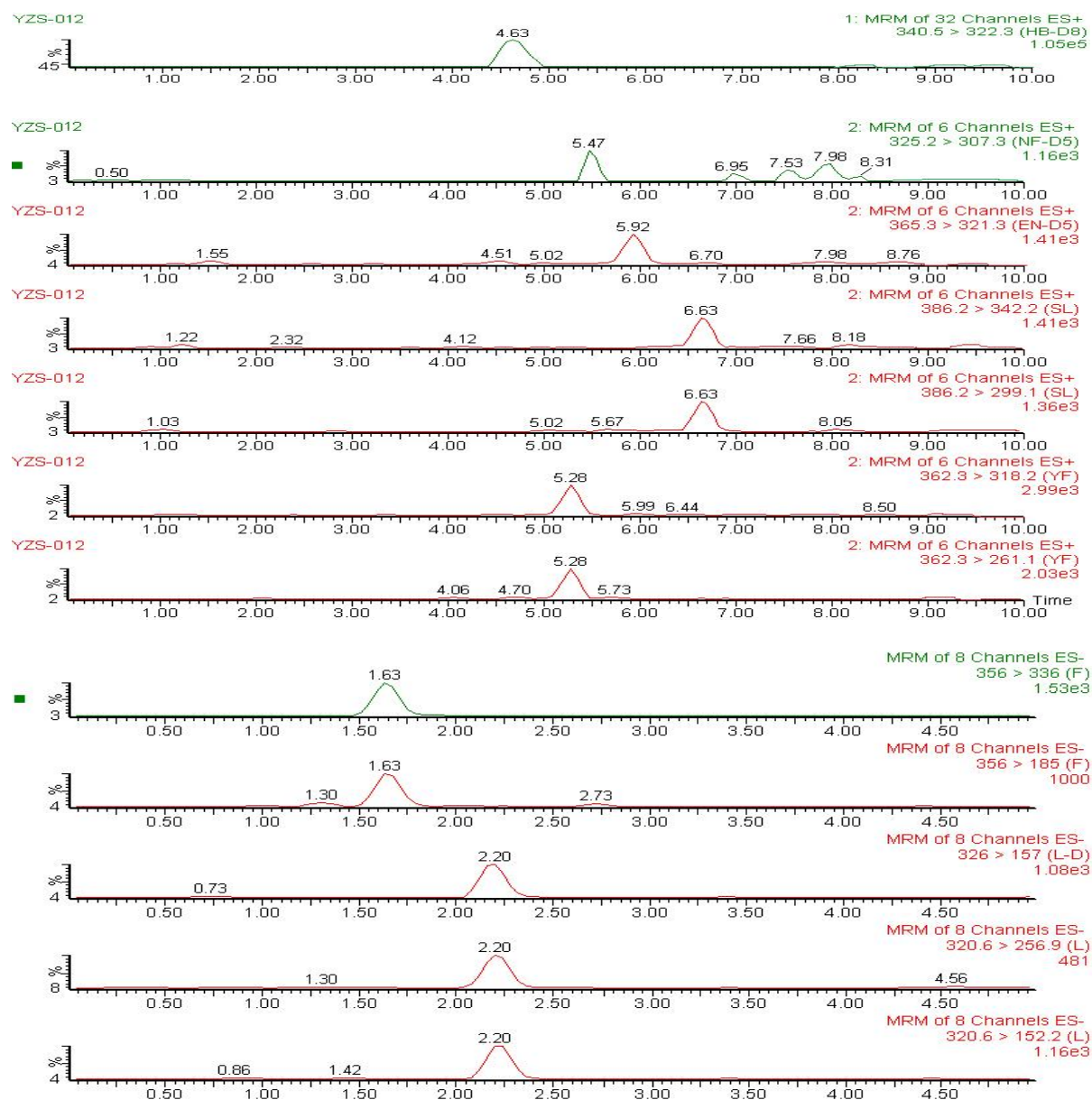


图 A.3 空白水样中添加各化合物标准溶液 (2ng/mL) 的多反应监测 (MRM) 色谱图