



中华人民共和国国家标准

GB/T 20366—2006

动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of quinolones in animal tissues—
LC-MS/MS method



2006-05-25 发布

2006-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动物源产品中喹诺酮类残留量的测定
液相色谱-串联质谱法
GB/T 20366—2006

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzchs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2006年9月第一版 2006年9月第一次印刷

*

书号: 155066·1-28122 定价 12.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 20366-2006

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国山东省质量技术监督局提出。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林黎明、张鸿伟、梁增辉、王岩、孟兆宏。

动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源产品中 11 种喹诺酮类残留量液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于禽、兔、鱼、虾等动物源产品中 11 种喹诺酮类残留的确证和定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准测试方法的重复性和再现性

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中喹诺酮类残留,采用甲酸-乙腈提取,提取液用正己烷净化。液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.2 乙腈:液相色谱级。

4.3 冰乙酸:液相色谱级。

4.4 正己烷:液相色谱级。

4.5 甲酸:优级纯。

4.6 乙腈饱和的正己烷:量取正己烷溶液 80 mL 于 100 mL 分液漏斗中,加入适量乙腈后,剧烈振摇,待分配平衡后,弃去乙腈层既得。

4.7 2%甲酸溶液:2 mL 甲酸用水稀释至 1 000 mL,混匀。

4.8 甲酸-乙腈溶液:98 mL 乙腈中加入 2 mL 甲酸,混匀。

4.9 伊诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星标准品:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.10 11 种喹诺酮类标准贮备溶液:0.1 mg/mL。分别准确称取适量的每种喹诺酮标准品,用乙腈配制成 0.1 mg/mL 的标准贮备溶液(4℃保存可使用 3 个月)。

4.11 11 种喹诺酮类标准中间溶液:10 $\mu\text{g/mL}$ 。分别准确量取适量的每种喹诺酮标准贮备溶液(4.10),用乙腈稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间溶液(4℃保存可使用 1 个月)。

4.12 11 种喹诺酮类混合标准工作溶液:准确量取适量的喹诺酮类标准中间溶液(4.11),用甲酸-乙腈溶液(4.8)配制成浓度系列为 5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、250.0 ng/mL、500.0 ng/mL 的喹诺酮类混合标准工作溶液(4℃保存可使用 1 周)。

4.13 11 种喹诺酮类混合标准添加溶液:100 ng/mL。准确量取适量的喹诺酮类标准中间溶液(4.11),用乙腈稀释成 100 ng/mL 的喹诺酮类标准添加溶液(4℃保存可使用 1 周)。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 5.2 高速组织捣碎机。
- 5.3 均质器。
- 5.4 旋转蒸发仪。
- 5.5 氮吹仪。
- 5.6 涡流混匀器。
- 5.7 离心机:转速 4 000 r/min。
- 5.8 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g 各一台。
- 5.9 移液器:200 μ L, 1 mL。
- 5.10 棕色鸡心瓶:100 mL。
- 5.11 聚四氟乙烯离心管:50 mL。
- 5.12 分液漏斗:125 mL。
- 5.13 一次性注射式滤器,配有 0.45 μ m 微孔滤膜。
- 5.14 样品瓶:2 mL,带聚四氟乙烯旋盖。

6 试样制备与保存

6.1 试样制备

样品经高速组织捣碎机均匀捣碎,用四分法缩分出适量试样,均分成两份,装入清洁容器内,加封后作出标记。一份作为试样,一份作为留样。

6.2 试样保存

试样应在-20℃条件下保存。

7 测定步骤

7.1 标准曲线制备

制备混合标准工作液(4.12),浓度系列分别为 5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、250.0 ng/mL、500.0 ng/mL(分别相当于测试样品含有 1.0 μ g/kg、2.0 μ g/kg、5.0 μ g/kg、10.0 μ g/kg、20.0 μ g/kg、50.0 μ g/kg、100.0 μ g/kg 目标化合物)。按 7.4 的规定测定并制备标准曲线。

7.2 提取

称取 5.0 g 试样,置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 20 mL 甲酸-乙腈溶液(4.8),用均质器均质 1 min,然后,于离心机上以 4 000 r/min 的速率离心 5 min,将上清液移入另一个 50 mL 聚四氟乙烯离心管中。将离心残渣用 20 mL 甲酸-乙腈溶液(4.8)再提取一次,合并上清液。

7.3 净化

将上清液转移到 125 mL 分液漏斗中,于上清液中加入 25 mL 乙腈饱和的正己烷(4.6),振摇 2 min,弃去上层溶液,将下层溶液移至 100 mL 棕色鸡心瓶中,于 40℃ 水浴中旋转蒸发至近干,用氮气流吹干。准确加入 1.0 mL 甲酸-乙腈溶液(4.8)溶解残渣,涡流混匀后,用一次性注射式滤器过滤至样品瓶中,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} 柱(可用 Intersil ODS-3,粒径 5 μ m,柱长 150 mm,内径 4.6 mm 或相当者);
- b) 流动相:乙腈+2%甲酸溶液(梯度洗脱见表 1);

表 1

时间/min	乙腈/(%)	2%甲酸溶液/(%)
0	15	85
20	17	83

- c) 流速:0.8 mL/min;
d) 进样量:20 μL。

7.4.2 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) 检测方式:多反应监测;
d) 电喷雾电压:5 500 V;
e) 雾化气压力:0.413 MPa;
f) 气帘气压力:0.344 MPa;
g) 辅助气压力:0.586 MPa;
h) 离子源温度:500℃;
i) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压,见表 2。

表 2 11 种喹诺酮类的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

名 称	定性离子对/(m/z) (母离子/子离子)	定量离子对/(m/z) (母离子/子离子)	碰撞气能量/eV	去簇电压/V
伊诺沙星	320.9/303.0	320.9/303.0	30	93
	320.9/234.0		33	76
氧氟沙星	361.9/318.0	361.9/318.0	29	89
	361.9/261.0		41	104
诺氟沙星	320.0/302.0	320.0/302.0	33	92
	320.0/233.0		36	77
培氟沙星	334.0/316.0	334.0/316.0	33	95
	334.0/290.0		28	77
环丙沙星	332.0/314.0	332.0/314.0	32	92
	332.0/230.9		53	92
洛美沙星	351.9/265.0	351.9/265.0	36	78
	351.9/334.0		30	99
丹诺沙星	358.0/340.0	358.0/340.0	36	95
	358.0/254.9		55	95
恩诺沙星	360.0/316.0	360.0/316.0	29	90
	360.0/244.9		40	90
沙拉沙星	386.0/299.0	386.0/299.0	45	83
	386.0/367.9		42	83
双氟沙星	400.0/356.0	400.0/356.0	30	90
	400.0/382.0		35	100
司帕沙星	393.0/349.0	393.0/349.0	30	109
	393.0/292.0		36	109

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

用混合标准工作溶液(4.12)分别进样,以峰面积为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标。绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中 11 种目标化合物响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,11 种目标化合物的参考保留时间见表 3。11 种目标化合物标准品的总离子流图 and 选择离子流图参见附录 A 中的图 A.1、图 A.2。

表 3 11 种喹诺酮类标准品的参考保留时间

名 称	保留时间/min	名 称	保留时间/min
伊诺沙星	6.20	丹诺沙星	10.02
氧氟沙星	7.26	恩诺沙星	11.03
诺氟沙星	7.35	沙拉沙星	16.36
培氟沙星	7.89	双氟沙星	17.22
环丙沙星	8.14	司帕沙星	17.99
洛美沙星	9.09		

8 结果计算

试样中每种喹诺酮类残留量按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000}$$

.....(1)

式中:

- X——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m——试样溶液所代表的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 检出低限(LOD)和定量限(LOQ)

9.1 检出低限(LOD)

伊诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星为 0.1 μg/kg;恩诺沙星、丹诺沙星为 0.5 μg/kg。

9.2 定量限(LOQ)

伊诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星为 1.0 μg/kg。

10 精密度

精密度数据按 GB/T 6379 的规定制定,其重复性和再现性的值以 95%的可信度计算。

10.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r),动物源产品中 11 种喹诺酮类残留含量范围及重复性方程见表 3。

如果差值超过重复性限(r),应舍弃实验结果并重新完成两次单个试验的测定。

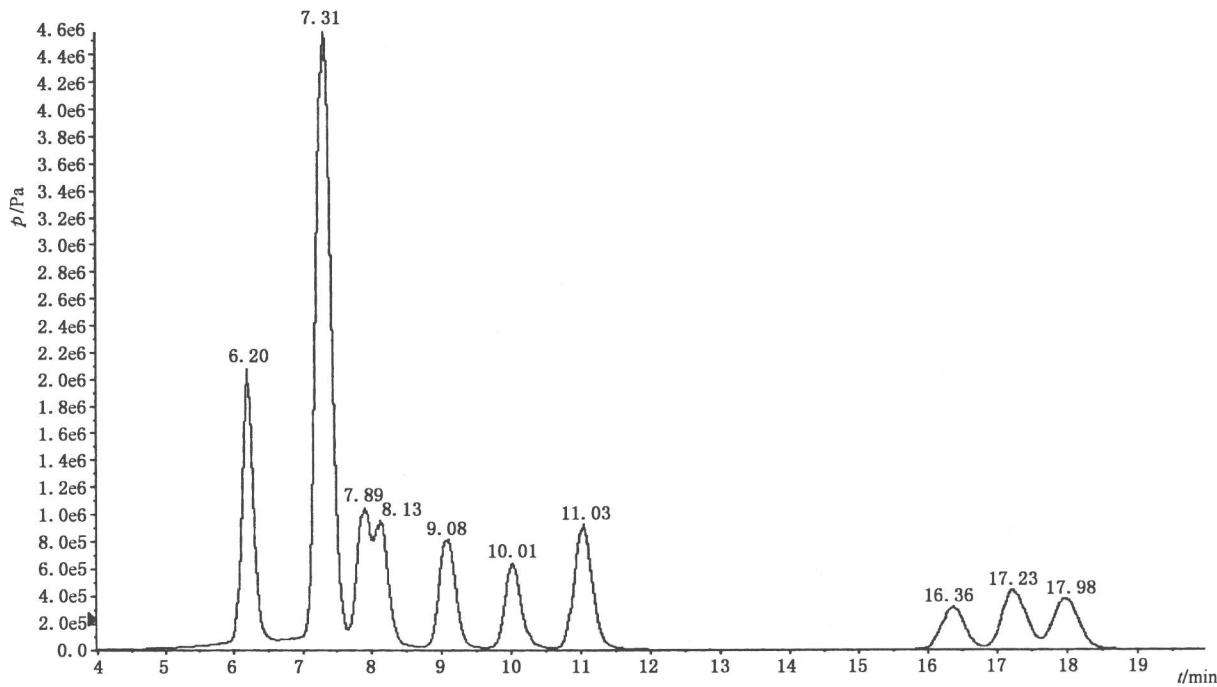
10.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限(R),动物源产品中 11 种喹诺酮类残留含量范围及再现性方程见表 4。

表 4 含量范围及重复性和再现性方程

名 称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
依诺沙星	1.0~50.0	$r=-0.067\ 00+0.192\ 1x$	$R=-0.053\ 2+0.204\ 3x$
氧氟沙星	1.0~50.0	$\lg r=-0.907\ 5+1.127\ 1\lg x$	$R=-0.052\ 3+0.225\ 0x$
诺氟沙星	1.0~50.0	$r=-0.015\ 9+0.149\ 7x$	$R=-0.116\ 9+0.262\ 4x$
培氟沙星	1.0~50.0	$r=0.022\ 4+0.102\ 1x$	$R=-0.017\ 1+0.213\ 5x$
环丙沙星	1.0~50.0	$\lg r=-0.952\ 7+1.0424\ \lg x$	$R=-0.067\ 6+0.232\ 9x$
洛美沙星	1.0~50.0	$r=-0.001\ 2+0.104\ 8x$	$\lg R=-0.909\ 6+1.150\ 6\lg x$
丹诺沙星	1.0~50.0	$r=0.014\ 0+0.111\ 7x$	$R=-0.007\ 9+0.218\ 2x$
恩诺沙星	1.0~50.0	$r=0.051\ 6+0.132\ 3x$	$R=-0.010\ 9+0.246\ 3x$
沙拉沙星	1.0~50.0	$\lg r=-1.022\ 4+1.133\ 6\lg x$	$R=-0.079\ 9+0.197\ 9x$
双氟沙星	1.0~50.0	$\lg r=-0.866\ 0+1.054\ 0\lg x$	$R=-0.034\ 7+0.199\ 6x$
司帕沙星	1.0~50.0	$r=-0.034\ 3+0.171\ 6x$	$R=-0.061\ 0+0.212\ 0x$
注： x 为两次测定值的平均值。			

附录 A
(资料性附录)
标准品串联质谱图



- 6.20 min——伊诺沙星;
- 7.26 min——氧氟沙星;
- 7.35 min——诺氟沙星;
- 7.89 min——培氟沙星;
- 8.14 min——环丙沙星;
- 9.09 min——洛美沙星;
- 10.02 min——丹诺沙星;
- 11.03 min——恩诺沙星;
- 16.36 min——沙拉沙星;
- 17.22 min——双氟沙星;
- 17.99 min——司帕沙星。

图 A.1 11 种喹诺酮类标准品总离子流图

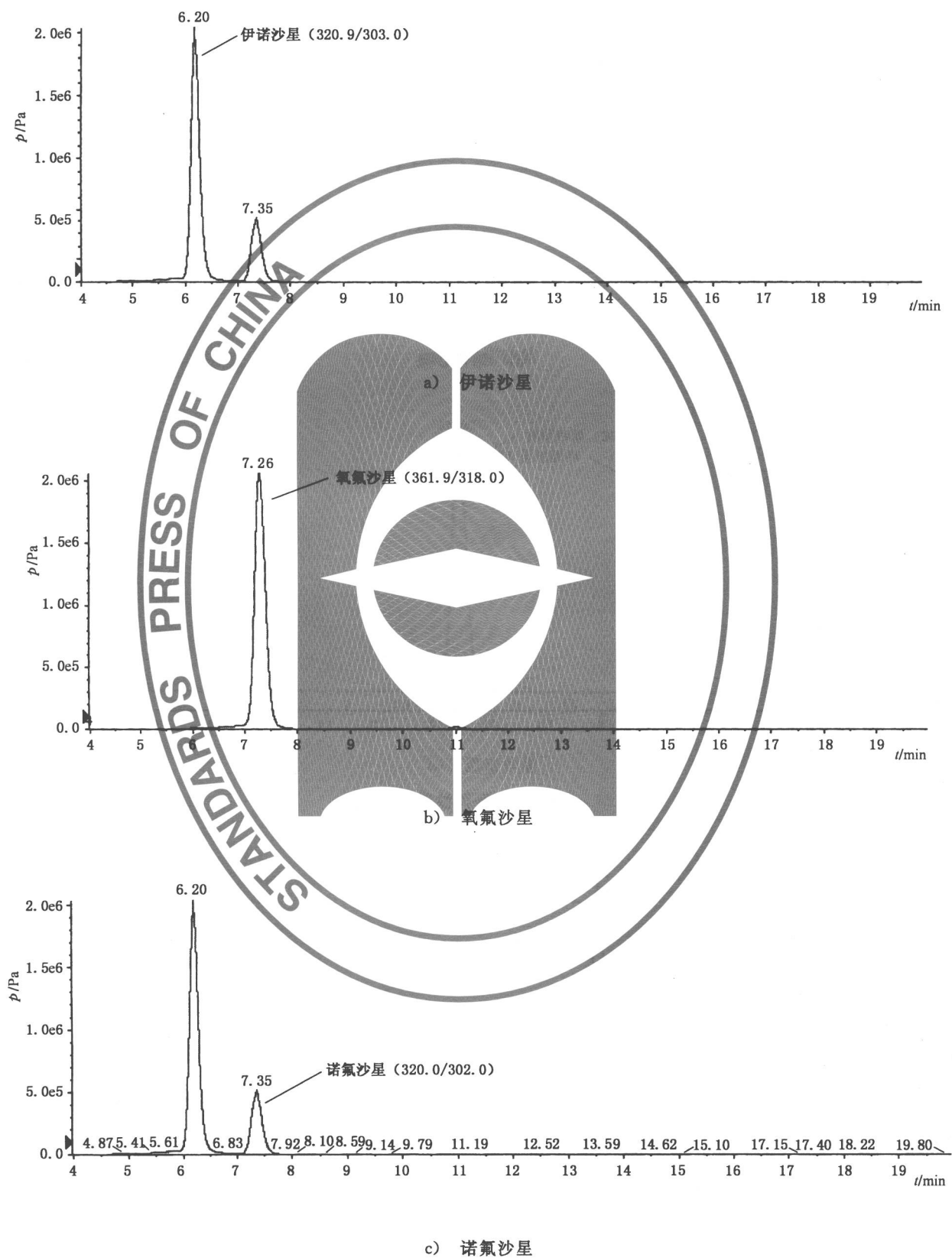
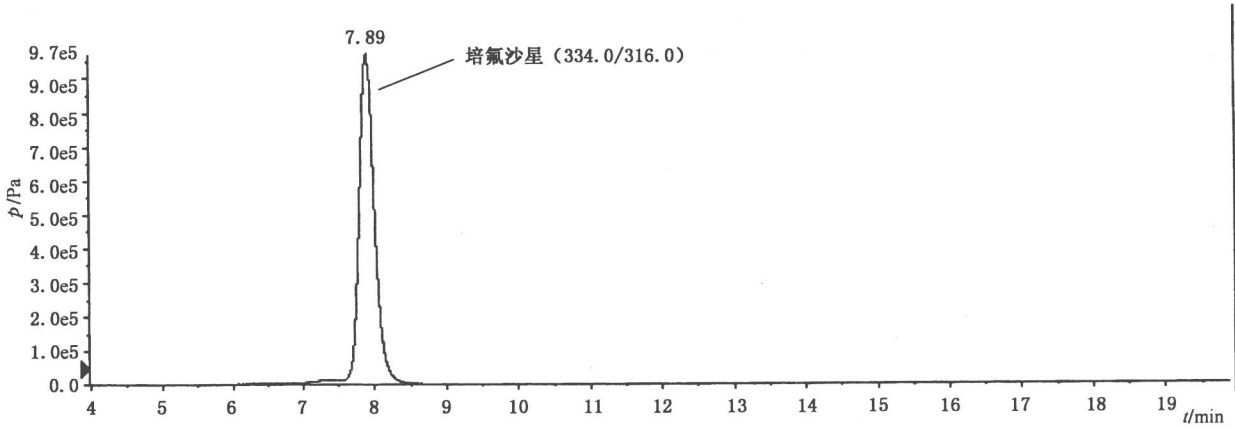
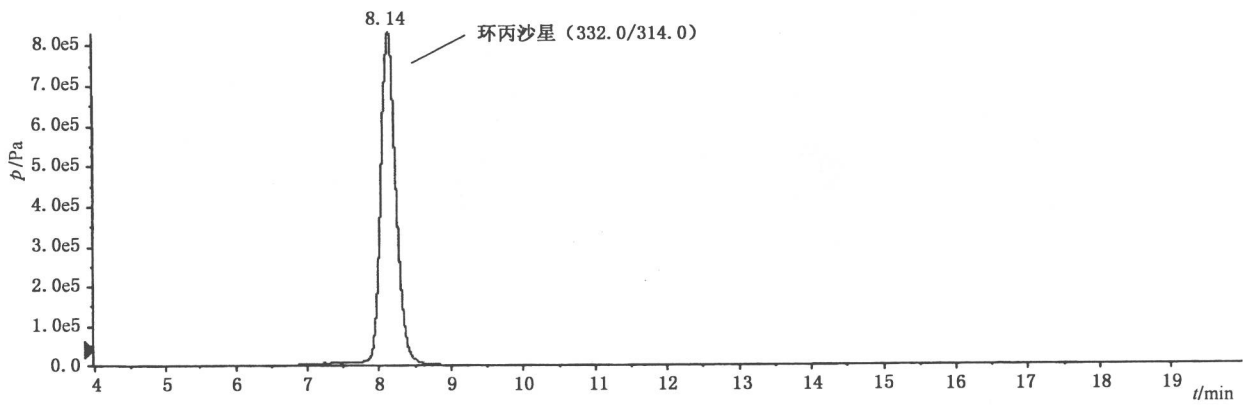


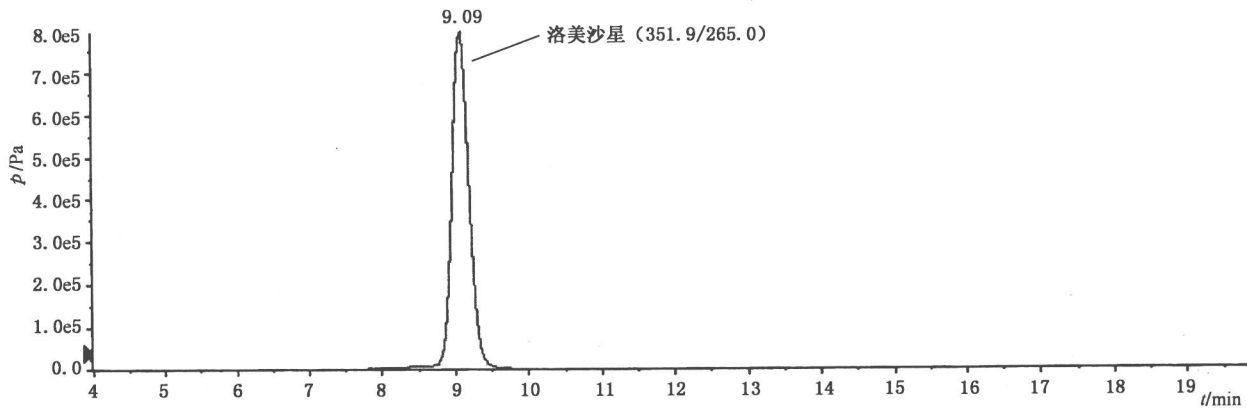
图 A.2 11 种喹诺酮类标准品选择离子流图



d) 培氟沙星

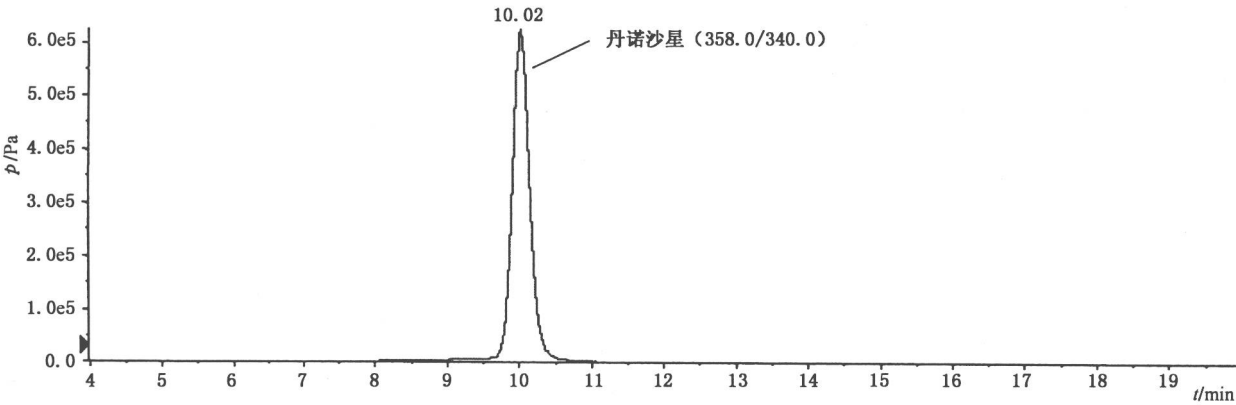


e) 环丙沙星

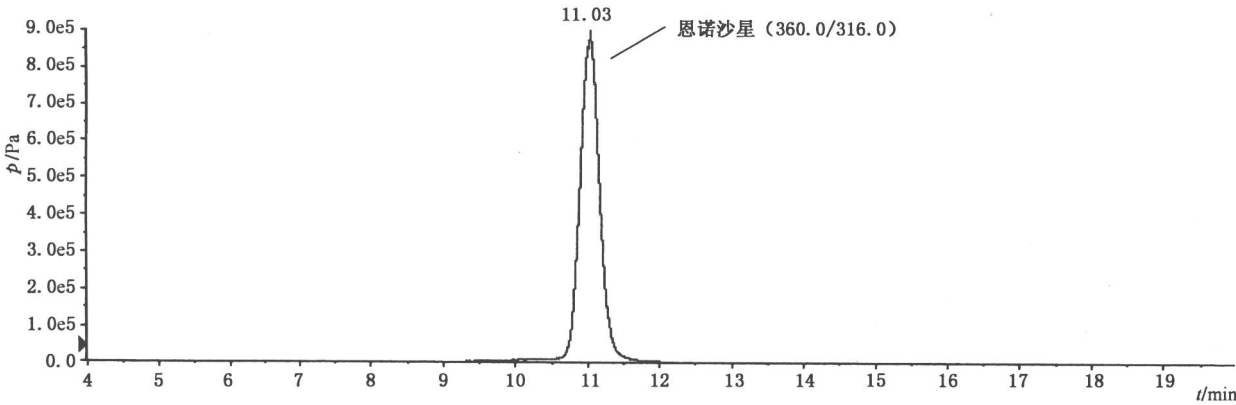


f) 洛美沙星

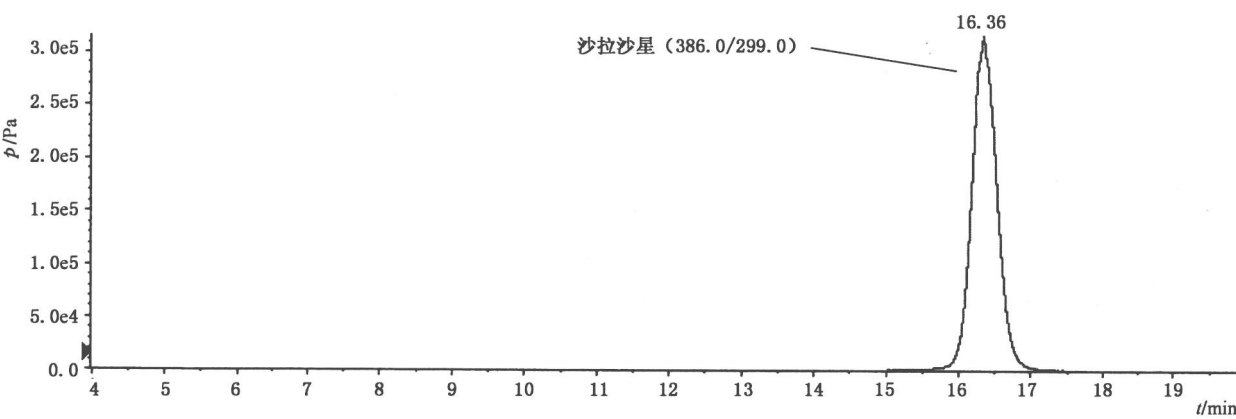
图 A.2 (续)



g) 丹诺沙星

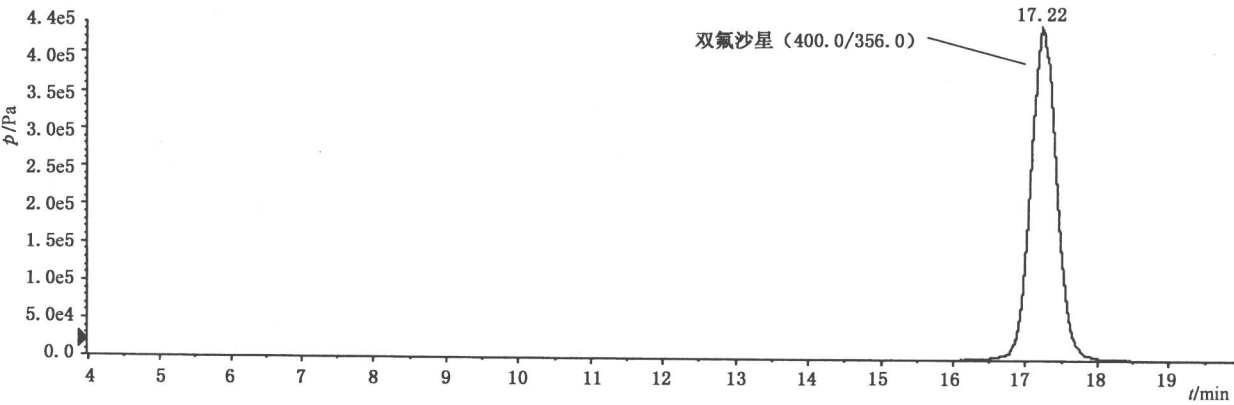


h) 恩诺沙星

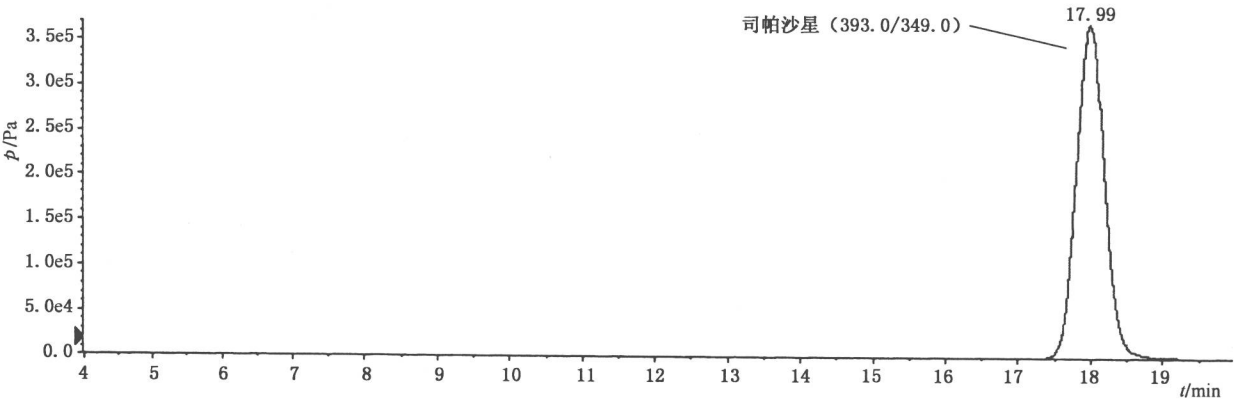


i) 沙拉沙星

图 A.2 (续)



j) 双氟沙星



k) 司帕沙星

图 A.2 (续)