

豆制品、火锅、麻辣烫等食品中喹诺酮类化合物的测定

BJS 201909

1 范围

本标准规定了豆腐、豆干、火锅底料、麻辣烫底料及火锅和麻辣烫的食材中诺氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、氟罗沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星的高效液相色谱-串联质谱检测法。

本标准适用于豆腐、豆干、火锅底料、麻辣烫底料及火锅和麻辣烫的食材中诺氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、氟罗沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星的测定和确证。

2 原理

采用0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液提取样品中的喹诺酮类化合物，经离心和过滤后，上清液经HLB固相萃取柱净化后，用高效液相色谱-串联质谱仪检测和确证，内标法定量。

3 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 3.1 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。
- 3.2 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。
- 3.3 甲酸 (CHOOH)：色谱纯。
- 3.4 甲醇 (CH₃OH)。
- 3.5 氨水 (NH₄OH)：浓度 25%~28%。
- 3.6 乙二胺四乙酸二钠 (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O)。
- 3.7 柠檬酸 (C₆H₈O₇·H₂O)。
- 3.8 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O)。
- 3.9 氢氧化钠 (NaOH)。
- 3.10 盐酸 (HCl)：含 HCl 38%。
- 3.11 乙酸铵 (CH₃COONH₄)：色谱纯。

3.12 磷酸氢二钠溶液 (0.2 mol/L): 称取 71.63 g 磷酸氢二钠 (3.8), 用水溶解并定容至 1000 mL。

3.13 柠檬酸溶液 (0.1 mol/L): 称取 21.01 g 柠檬酸 (3.7), 用水溶解并定容至 1000 mL。

3.14 McIlvaine 缓冲溶液: 将 1000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 (3.13) 与 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (3.12) 混合, 用盐酸或氢氧化钠调节 pH 至 4.0 ± 0.1 。

3.15 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 (0.1 mol/L): 称取 60.5g 乙二胺四乙酸二钠 (3.6) 至 1625 mL McIlvaine 缓冲溶液 (3.14) 中, 超声使其溶解。

3.16 5% 甲醇水溶液: 取 5 mL 甲醇 (3.4), 用水稀释至 100 mL。

3.17 25% 氨水甲醇溶液: 取 25 mL 氨水 (3.5), 用甲醇 (3.4) 稀释至 100 mL。

3.18 标准品: 标准品中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量见附录 A 表 A.1, 纯度 $\geq 99\%$ 。

3.19 标准储备液配制: 分别精密称取标准品 (3.18) 约 10 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加入 0.2 mL 甲酸 (3.3), 超声使溶解, 用乙腈 (3.1) 定容至刻度, 摇匀, 配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液, 转移至溶剂瓶中于 -18°C 以下避光保存, 有效期 6 个月。

3.20 混合标准溶液的配制: 准确吸取标准储备液 (3.19) 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.2) 定容至刻度, 配制成浓度为 0.01 mg/mL 的混合标准溶液 (环丙沙星、沙拉沙星浓度约 0.015 mg/mL), 于 4°C 以下避光保存, 有效期 3 个月。

3.21 混合标准中间溶液的配制: 准确吸取混合标准溶液 (3.20) 1 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.2) 定容至刻度, 配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间溶液 (环丙沙星、沙拉沙星浓度约 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 于 4°C 以下避光保存, 临用新配。

3.22 内标标准储备液配制: 分别称取氘代同位素标准品 (3.18) 约 10 mg, 至 10 mL 容量瓶中, 加入 0.2 mL 甲酸 (3.3), 超声溶解, 用乙腈 (3.1) 稀释至刻度, 配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液, 于 -18°C 以下避光保存, 有效期 6 个月。

3.23 混合内标标准中间溶液的配制: 准确吸取内标标准储备液 (3.22) 0.01 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.2) 定容至刻度, 配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合内标标准中间溶液, 于 4°C 以下避光保存, 临用新配。

3.24 固相萃取小柱 (500 mg, 6 mL): HLB 柱或相当者。使用前依次以 6 mL 甲醇、6 mL 水活化, 保持柱体湿润。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)。

4.2 分析天平：感量 0.001g 和 0.00001 g。

4.3 涡旋振荡器

4.4 超声仪

4.5 离心机：转速 \geq 8000 r/min

4.6 均质器

4.7 氮气浓缩仪

5 测定步骤

5.1 试样制备与保存

豆制品、火锅和麻辣烫的食材

从待检样品中取出样品约 500g，用组织捣碎机充分捣碎混匀，装入洁净容器中，密封，并标明标记，于-18℃冷冻存放。

火锅底料、麻辣烫底料

固体状：从待检样品中取出样品约 500g，用组织捣碎机充分捣碎混匀，装入洁净容器中，密封，并标明标记，于 4℃冷藏存放。

半固体状：从待检样品中取出样品约 500g，放入研钵中，迅速研磨均匀，装入洁净容器中，密封，并标明标记于 4℃冷藏存放。

液体状：从待检样品中取出样品约 500g，搅拌均匀后装入洁净容器中，密封，并标明标记，于 4℃冷藏存放。

5.2 样品溶液制备

提取：称取 5.0 g 均匀样品（精确至 0.001g），置 50 mL 离心管中，精密加入混合内标标准中间溶液（3.23）0.1mL，加入 20 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液（3.15），涡旋混匀 1min，超声提取 15 min，8000 r/min 离心 5 min，上清液转移至 50 mL 容量瓶中，残渣用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液（3.15）同法重复提取两次，每次 10 mL，合并上清液至同一容量瓶中，用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液（3.15）定容至刻度，混匀。用滤纸过滤（必要时 10000 r/min 离心 5 min 后过滤），续滤液待净化。

净化：精密吸取上述待净化液 25.0 mL，以约 1 mL/min 的流速全部通过固相小柱(3.24)，用 3 mL 5%甲醇水溶液（3.16）淋洗，抽干，先后以 6 mL 甲醇、3 mL 氨水甲醇（3.17）洗脱，合并甲醇及氨水甲醇洗脱液，45 ℃氮吹至近干，准确加入 2.0 mL 流动相初始比例复溶液溶解残渣，过 0.22 μ m 滤膜，续滤液供液相色谱-串联质谱仪分析。

5.3 基质标准工作溶液的制备

称取 5.0 g 空白试样（精确至 0.001g），置 50 mL 离心管中，除不加入混合内标标准中间溶液外，其余同 5.2 操作处理后得到空白基质，共制备 6 份。

分别精密吸取混合标准中间溶液（3.21）0 mL、0.010 mL、0.020 mL、0.050 mL、0.100 mL、0.200 mL 及混合内标标准中间溶液（3.23）0.025 mL 于试管中，氮吹至近干，精密加入 1.0 mL 空白基质复溶，过 0.22 μm 滤膜，制成浓度为 0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的基质标准工作溶液（环丙沙星、沙拉沙星浓度为 0 ng/mL、15 ng/mL、30 ng/mL、75 ng/mL、150 ng/mL、300 ng/mL，同位素内标浓度约 25ng/mL）。

5.4 测定

5.4.1 液相色谱参考条件

- 1) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，2.1 mm×50 mm×1.7 μm ，或性能相当者。
- 2) 柱温：40℃。
- 3) 流速：0.25 mL/min。
- 4) 进样量：2 μL 。
- 5) 流动相：A-5 mmol/L 乙酸铵水溶液（含 0.1%甲酸），B-乙腈。梯度洗脱条件见表 1。

表1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
8	70	30
10	70	30
10.5	5	95
13	5	95
13.1	90	10
15	90	10

5.4.2 质谱参考条件

- 1) 电离方式：电喷雾电离（ESI）；
- 2) 扫描方式：正离子扫描；
- 3) 检测方式：多反应监测 MRM；
- 4) 离子源参数参考条件：

离子源接口电压，4000 V；离子源接口温度，350℃；脱溶剂温度，250℃；离子源加热温度，400℃；雾化气流速，2.9 L/min；干燥气流速，10.0 L/min；加热气流速，10.0 L/min。

5) 定性离子对、定量离子对参见表 2。

表2 喹诺酮类药物主要质谱参数

序号	组分	母离子	子离子	Q1 预四极杆电压	碰撞电压	Q3 预四极杆电压
		(m/z)	(m/z)	(V)	(V)	(eV)
1	诺氟沙星	320.2	*302.0	-16	-21	-21
			231.1	-15	-39	-25
2	氧氟沙星	362.2	*318.2	-30	-18	-24
			261.1	-30	-28	-19
3	洛美沙星	352.0	*265.0	-25	-23	-29
			308.0	-25	-17	-22
4	培氟沙星	334.0	290.1	-25	-18	-20
			*316.2	-25	-21	-22
5	氟罗沙星	370.0	*326.0	-30	-20	-23
			269.0	-29	-28	-26
			342.0	-15	-19	-25
6	沙拉沙星	386.2	299.1	-29	-30	-20
			*368.1	-14	-22	-26
7	双氟沙星	400.0	*356.0	-17	-20	-25
			299.0	-17	-28	-28
8	司帕沙星	393.0	*349.0	-30	-21	-28
			292.0	-30	-21	-24
9	环丙沙星	332.1	*314.1	-25	-21	-22
			287.8	-24	-17	-30
			231.0	-25	-40	-40
			*340.1	-26	-23	-24
10	达氟沙星	358.0	283.2	-14	-24	-30
			82.1	-26	-44	-15
			*342.1	-27	-20	-25
11	恩诺沙星	360.0	316.0	-13	-20	-22
			245.2	-28	-27	-17
12	D8-环丙沙星	340.3	322.1	-10	-21	-22
13	D5-恩诺沙星	365.1	321.1	-11	-19	-22
14	D5-诺氟沙星	325.3	307.2	-10	-20	-21

注：1.“*”表示定量离子；2. 所列质谱参考条件是在岛津（LC/MS-8050）质谱仪上完成的，此处所列试验用仪器型号仅供参考，不涉及商业目的，鼓励方法使用者尝试不同厂家或型号的仪器；3. 对不同质谱仪，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳；4. 由于喹诺酮类化合物离子化受基质干扰较为显著，方法使用者可根据实际情况选择表中所列离子对进行定性定量测定。

5.4.3 标准曲线绘制

取基质标准工作溶液（5.3）按浓度由低到高依次进样检测，内标法绘制标准曲线。

5.5 定性

在相同实验条件下，试样中待测物质的保留时间与标准工作溶液中对应的保留时间偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内；且试样谱图中各组分定性离子的相对丰度与标准工作溶液定性离子的相对丰度，其允许偏差不超过表3规定的范围时，则可确定为样品中存在此种待测物。基质标准溶液多反应监测（MRM）典型图谱见附录B。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度，%	>50%	>20%~50%	>10%~20%	$\leq 10\%$
允许的相对偏差，%	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

5.6 定量

待测样液中喹诺酮药物的响应值应在标准曲线线性范围内，诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、氟罗沙星以氘代诺氟沙星为内标，洛美沙星、双氟沙星、环丙沙星、达氟沙星以氘代环丙沙星为内标，司帕沙星、沙拉沙星、恩诺沙星以氘代恩诺沙星为内标，内标法定量。本方法中所列内标能基本满足方法要求，如条件允许，可采用各化合物的对应同位素化合物作为内标。

6 结果计算

试样测定结果按公式（1）计算目标物的含量：

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \times F \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中被测组分的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

m ——试样的称样量，单位为克（ g ）；

C ——由工作曲线计算得到的试样中被测组分的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——定容体积，单位为毫升（ mL ）。

F ——稀释倍数

计算结果需扣除空白值（空白基质），并保留三位有效数字。

7 检测方法灵敏度、准确度、精密度

7.1 灵敏度

诺氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、氟罗沙星、双氟沙星、司帕沙星、达氟沙星、恩诺沙星检出限均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，环丙沙星检出限为 $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，沙拉沙星检出限为 $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

诺氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、氟罗沙星、双氟沙星、司帕沙星、达氟沙星、恩诺沙星定量限均为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，环丙沙星定量限为 22.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，沙拉沙星定量限为 22.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

7.2 准确度

本方法在 15.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加水平上的回收率范围为 65.0%~120.0%。

7.3 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%。

附录 A

标准品信息

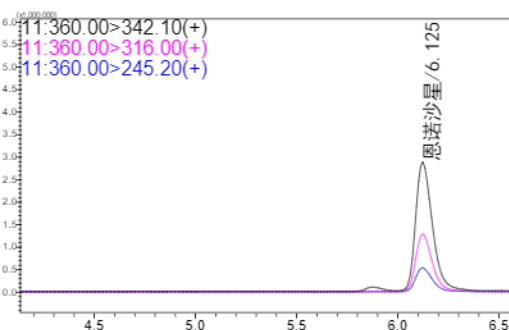
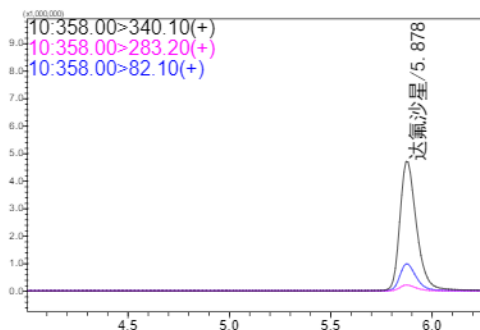
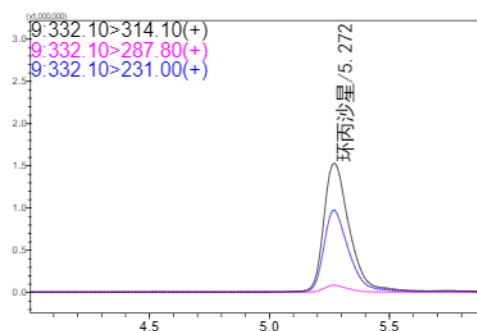
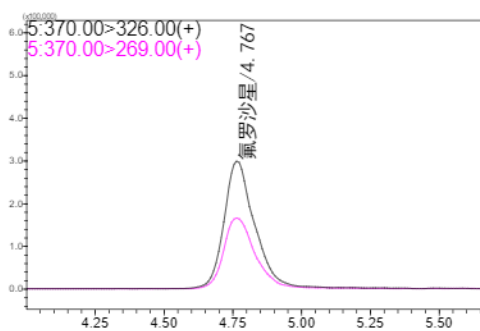
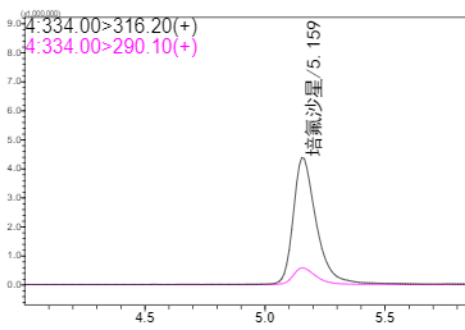
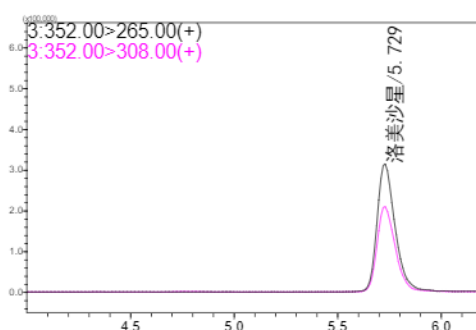
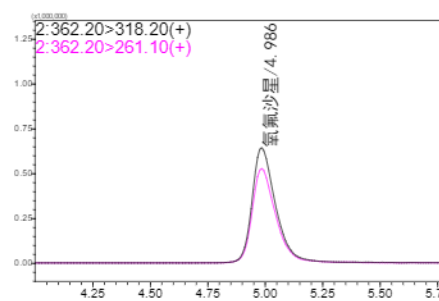
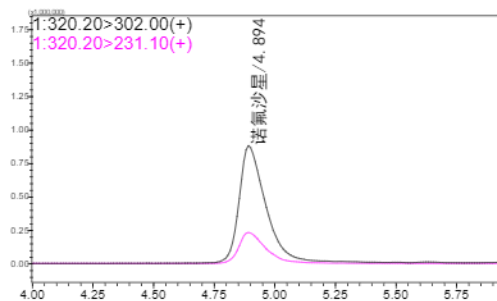
表A.1 标准品中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量

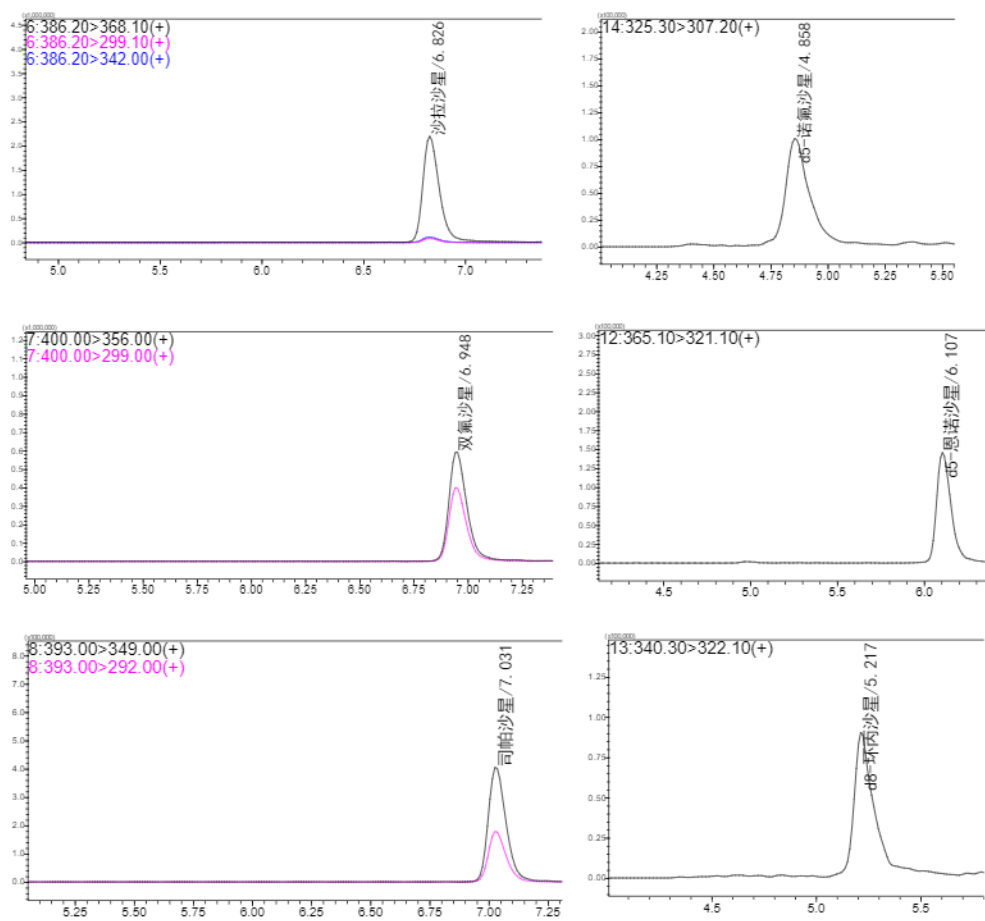
序号	化合物名称	英文名	CAS 登录号	分子式	相对分子质量
1	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33
2	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361.37
3	洛美沙星	Lomefloxacin	98079-51-7	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	351.35
4	培氟沙星	Pefloxacin	70458-92-3	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	333.36
5	氟罗沙星	Fleroxacin	79660-72-3	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	369.34
6	盐酸沙拉沙星	Sarafloxacin Hydrochloride	91296-87-6	C ₂₀ H ₁₈ ClF ₂ N ₃ O ₃	421.81
7	盐酸双氟沙星	Difloxacin Hydrochloride	91296-86-5	C ₂₁ H ₂₀ ClF ₂ N ₃ O ₃	435.85
8	司帕沙星	Sparfloxacin	110871-86-8	C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃	392.40
9	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.34
10	甲磺酸达氟沙星	Danofloxacin mesylate	119478-55-6	C ₂₀ H ₂₄ FN ₃ O ₆ S	453.48
11	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359.39
12	D ₈ -环丙沙星	Ciprofloxacin-d8	/	C ₁₇ H ₁₀ D ₈ FN ₃ O ₃	339.39
13	D ₅ -恩诺沙星	Enrofloxacin-d5	/	C ₁₉ H ₁₇ D ₅ FN ₃ O ₃	364.37
14	D ₅ -诺氟沙星	Norfloxacin-d5	/	C ₁₆ H ₁₃ D ₅ FN ₃ O ₃	324.37

注：市售标准品中部分为其盐酸盐或甲磺酸盐。

附录 B

14种喹诺酮类化合物多反应监测（MRM）谱图





14种喹诺酮类化合物火锅底料基质标准溶液(100 ng/mL, 氘代内标为25 ng/mL)多反应监测 (MRM) 谱图

本方法负责起草单位：四川省食品药品检验检测院

方法的参与验证单位：上海市食品药品检验所、辽宁省食品药品检验检测院、深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心、山东省食品药品检验研究院、湖北省食品药品监督检验研究院。

主要起草人：余晓琴，李道霞，黄丽娟，成长玉，李澍才，唐昌云