



中华人民共和国国家标准

GB/T 23412—2009

蜂蜜中 19 种喹诺酮类药物残留量的 测定方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of residues of 19 quinolones in honey—
LC-MS/MS method

2009-03-28 发布

2009-07-01 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

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：沈崇钰、陈惠兰、丁涛、张晓燕、刘艳、张婧、黄娟、蒋原、陶宏锦、沈东旭。

蜂蜜中 19 种喹诺酮类药物残留量的 测定方法 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中恩诺沙星(简称 ENR,下同),环丙沙星(简称 CIP,下同),诺氟沙星(简称 NOR,下同),氧氟沙星(简称 OFL,下同),双氟沙星(简称 DIF,下同),噁喹酸(简称 OXO,下同)、氟甲喹(简称 FLU,下同),沙拉沙星(简称 SAR,下同),司帕沙星(简称 SPA,下同),丹氟沙星(简称 DAN,下同),氟罗沙星(简称 FLE,下同),马波沙星(简称 MAR,下同),伊诺沙星(简称 ENO,下同),奥比沙星(简称 ORB,下同),吡哌酸(简称 PIP,下同),培氟沙星(简称 PEF,下同),洛美沙星(简称 LOM,下同),西诺沙星(简称 CIN,下同)和萘啶酸(简称 NAL,下同)19 种喹诺酮残留量的液相色谱-质谱/质谱的测定方法。上述 19 种喹诺酮类药物中英文名称、结构式、CAS 号和相对分子质量参见附录 A。

本标准适用于蜂蜜中喹诺酮类残留量的测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 方法提要

试样加入内标后,氢氧化钠溶液溶解蜂蜜样品,离子化的喹诺酮类残留物经过阴离子交换固相萃取柱富集净化,用液相色谱-质谱/质谱法测定,梯度洗脱,内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:HPLC 级。

4.2 氢氧化钠。

4.3 甲酸(85%)。

4.4 阴离子交换柱(PAX):60 mg,3 mL,或相当者。

4.5 同位素内标:NOR-D₃:纯度≥98%。

4.6 ENR、CIP、NOR、OFL、DIF·HCl、SAR·HCl、SPA、DAN、OXO、FLU、FLE、MAR、ENO、ORB、PIP、PEF、LOM、CIN 和 NAL 标准品:纯度≥99%。

4.7 喹诺酮类标准储备溶液:1 mg/mL。准确称取适量的喹诺酮类标准品(4.6),用甲醇(4.1)配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。储备液贮存在 4℃ 冰箱中,可保存 6 个月。

4.8 氘代诺氟沙星(NOR-D₃)内标储备溶液:100 μg/mL。称取适量的 NOR-D₃ 内标物(4.5),用甲醇(4.1)配成 100 μg/mL 储备液,储备液贮存在 4℃ 冰箱中。

4.9 氘代诺氟沙星(NOR-D₃)内标工作溶液:1 μg/mL。取适量内标储备液(4.8)用甲醇(4.1)稀释成 1 μg/mL 工作溶液,内标工作溶液在 4℃ 保存。

4.10 喹诺酮类标准工作溶液:用甲醇-水(2+8,体积比)分别配成浓度范围为 1 ng/mL~60 ng/mL 标

准工作溶液,其中内标溶液浓度为 50 ng/mL,现配。

4.11 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L):取 4 g 氢氧化钠,溶解于 1 L 水中。

4.12 甲酸-甲醇溶液(5+95,体积比):取 5 mL 甲酸(4.3),溶解于 95 mL 甲醇(4.1)中。

4.13 甲醇-水(2+8,体积比):量取 20 mL 甲醇(4.1)于 80 mL 水中,混合均匀。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.1 mg 各一台。

5.3 旋转蒸发器。

5.4 固相萃取装置。

5.5 涡旋混匀器。

5.6 真空泵:真空度不低于 80 kPa。

5.7 滤膜:有机系,0.45 μm 。

5.8 离心管:50 mL,具塞。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将实验室样品搅拌均匀,分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品袋中,密封,并做上标记。在制样的操作过程中,应防止样品污染或发生残留含量变化。

6.2 试样的保存

将试样于冷藏状态下保存(4 $^{\circ}\text{C}$)。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取 5 g(精确到 0.01 g)试样,置于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标溶液(4.9) 50 μL ,加入 5 mL 氢氧化钠溶液(4.11),于涡旋混匀器上快速混合至蜂蜜完全溶解。依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化固相萃取小柱(4.4),将样品溶液转移到小柱上,依次用水、甲醇淋洗,弃去上述滤液。用甲酸-甲醇溶液(4.12) 3 mL 洗脱。40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至干,用甲醇-水(4.13)定容 1.0 mL,过 0.45 μm 的滤膜到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

7.2 测定

7.2.1 参考液相色谱条件

- 色谱柱: C_{18} , 3 μm , 150 mm \times 2.0 mm(内径)或相当者;
- 流动相:甲醇+0.1%甲酸水溶液;
- 流速:0.20 mL/min;
- 梯度洗脱程序:参见附录 B;
- 柱温:室温;
- 进样量:25 μL 。

7.2.2 串联质谱条件

参见附录 C。

7.3 液相色谱-质谱/质谱测定

7.3.1 定性测定

进行样品测定时,如果检出的质量色谱峰保留时间与标准样品一致,并且在扣除背景后的样品谱图中,各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,最大允许相对偏差不超

过表 1 中规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许相对偏差

| | | | | |
|---------|------|----------|----------|------|
| 相对离子丰度 | >50% | >20%~50% | >10%~20% | ≤10% |
| 允许的相对偏差 | ±20% | ±25% | ±30% | ±50% |

7.3.2 定量测定

标准工作溶液(4.10)在液相色谱-串联质谱设定条件下分别进样,以标准与内标物峰面积比值为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制标准工作曲线(1 ng/mL~60 ng/mL),用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液响应值均在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,其相应的标准物质和内标离子流色谱图参见附录 D。

7.4 空白试验

除不加入试样外,按上述(7.1~7.3)步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$c_x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c_x ——样品中喹诺酮的浓度,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A_x ——样品中喹诺酮的峰面积与相应内标峰面积比值;

m_s ——喹诺酮的质量,单位为纳克(ng);

A_s ——标准品中喹诺酮的峰面积与相应内标峰面积比值;

m ——样品质量,单位为克(g)。

9 检测低限、回收率范围和精密度

本标准中 19 种喹诺酮类检测低限均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蜂蜜中喹诺酮添加浓度及回收率范围(内标校正)的试验数据($n=10$):

添加水平为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,19 种喹诺酮回收率范围为 71%~118%;

添加水平为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,19 种喹诺酮回收率范围为 71%~117%;

添加水平为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,19 种喹诺酮回收率范围为 70%~117%。

在 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上,相对标准偏差(RSD)为 4.2%~10.9%。

附录 A
(资料性附录)

喹诺酮类药物及其代谢物中英文名称、化学结构式、CAS 号和相对分子质量

表 A.1 喹诺酮类药物及其代谢物中英文名称、化学结构式、CAS 号和相对分子质量

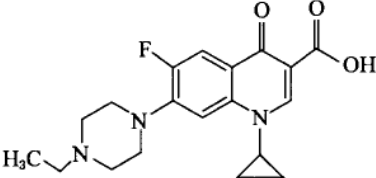
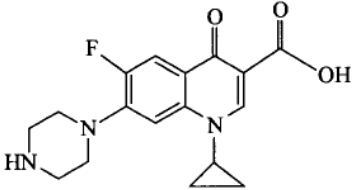
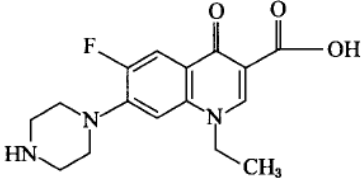
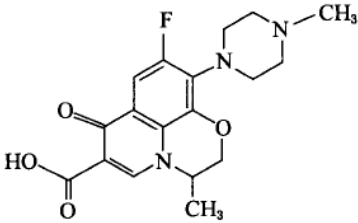
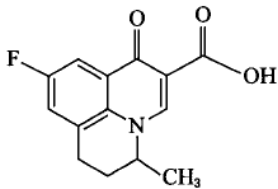
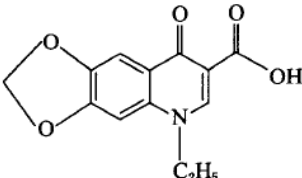
| 序号 | 中文名称/ 英文名称/简称 | 化学结构式 | 相对分子 质量 | CAS 号 |
|----|--------------------------------|---|------------|------------|
| 1 | 恩诺沙星 Enrofloxacin (ENR) |  | 359 | 93106-60-6 |
| 2 | 环丙沙星 Ciprofloxacin (CIP) |  | 331 | 85721-33-1 |
| 3 | 诺氟沙星 Norfloxacin (NOR) |  | 319 | 70458-96-7 |
| 4 | 氧氟沙星 Ofloxacin (OFL) |  | 361 | 82419-36-1 |
| 5 | 氟甲喹 Flumequine (FLU) |  | 261 | 42835-25-6 |
| 6 | 噁唑酸 Oxolinic acid (OXO) |  | 261 | 14698-29-4 |

表 A.1 (续)

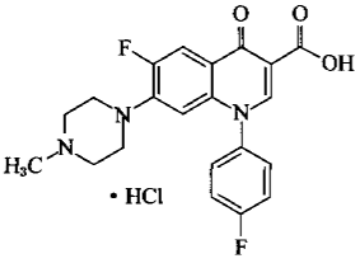
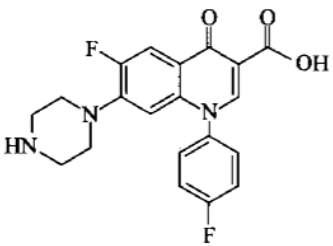
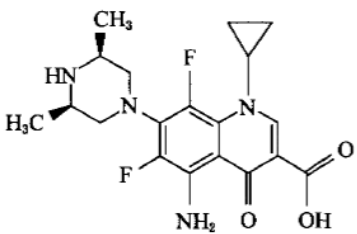
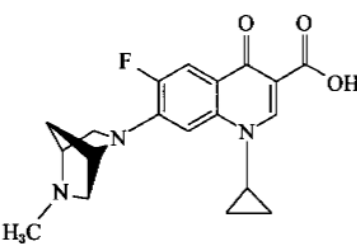
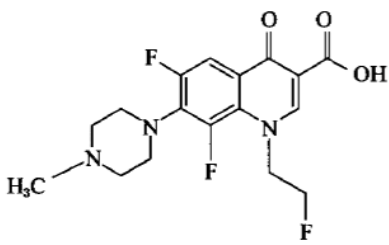
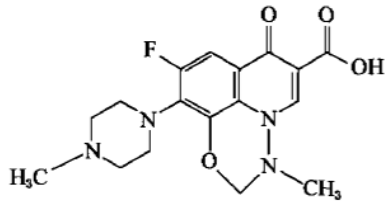
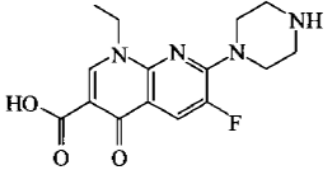
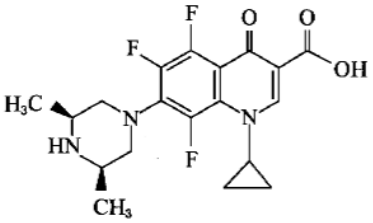
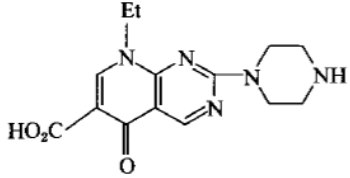
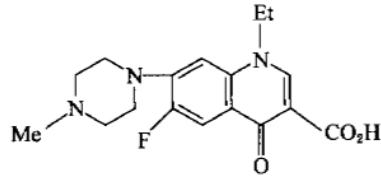
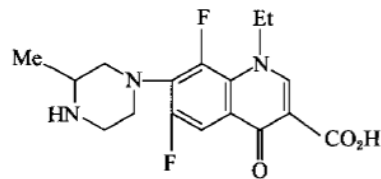
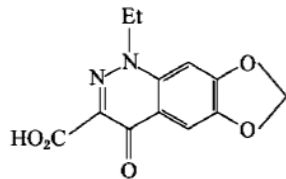
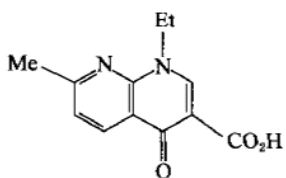
| 序号 | 中文名称/ 英文名称/简称 | 化学结构式 | 相对分子 质量 | CAS 号 |
|----|--------------------------------------|---|------------|-------------|
| 7 | 双氟沙星盐酸盐 Difloxacin HCl (DIF) |  | 436 | 98106-17-3 |
| 8 | 沙拉沙星盐酸盐 Sarafloxacin HCl (SAR) |  | 422 | 98105-99-8 |
| 9 | 司帕沙星 Sparfloxacin (SPA) |  | 392 | 110871-86-8 |
| 10 | 丹诺沙星 Danofloxacin (DAN) |  | 357 | 112398-08-0 |
| 11 | 氟罗沙星 Fleroxacin (FLE) |  | 369 | 79660-72-3 |
| 12 | 马波沙星 Marbofloxacin (MAR) |  | 362 | 115550-35-1 |

表 A.1 (续)

| 序号 | 中文名称/ 英文名称/简称 | 化学结构式 | 相对分子 质量 | CAS号 |
|----|--------------------------------|---|------------|-------------|
| 13 | 伊诺沙星 Enoxacin (ENO) |  | 320 | 74011-58-8 |
| 14 | 奥比沙星 Orbifloxacin (ORB) |  | 395 | 113617-63-3 |
| 15 | 吡哌酸 Pipemidic acid (PIP) |  | 303 | 51940-44-4 |
| 16 | 培氟沙星 Pefloxacin (PEF) |  | 333 | 70458-92-3 |
| 17 | 洛美沙星 Lomefloxacin (LOM) |  | 351 | 98079-51-7 |
| 18 | 西诺沙星 Cinoxacin (CIN) |  | 262 | 28657-80-9 |
| 19 | 萘啶酸 Nalidixic acid (NAL) |  | 232 | 389-08-2 |

附录 B
(资料性附录)
流动相梯度洗脱程序

表 B.1 流动相梯度洗脱程序

| 时间/min | 甲醇/% | 0.1%甲酸水溶液/% |
|--------|------|-------------|
| 0.00 | 10 | 90 |
| 2.00 | 10 | 90 |
| 4.00 | 90 | 10 |
| 8.00 | 90 | 10 |
| 9.00 | 10 | 90 |
| 12.00 | 10 | 90 |

附录 C

(资料性附录)

质谱/质谱条件及选择离子参数设定表

离子源:电喷雾离子化电离源(ESD),正离子监测;

扫描方式:选择离子检测(SRM);

雾化气、鞘气为高纯氮气,碰撞气为高纯氩气;

喷雾电压:4 100 V;

加热毛细管温度:350 ℃。

表 C.1 选择离子参数设定表

| 序号 | 测定物质 | 母离子 (m/z) | 定性离子 (m/z) | 碰撞电压/ V | 定量离子 (m/z) |
|----|--------------------|--------------|---------------|------------|---------------|
| 1 | ENR | 360 | 316 245 | 17 25 | 316 |
| 2 | CIP | 332 | 231 288 | 16 34 | 231 |
| 3 | NOR | 320 | 276 302 | 22 16 | 276 |
| 4 | OFL | 362 | 261 318 | 35 26 | 261 |
| 5 | DIF | 400 | 299 382 | 31 26 | 299 |
| 6 | SAR | 386 | 299 368 | 31 23 | 299 |
| 7 | SPA | 393 | 292 375 | 24 22 | 292 |
| 8 | DAN | 358 | 340 283 | 23 27 | 340 |
| 9 | FLU | 262 | 202 244 | 29 18 | 202 |
| 10 | FLE | 370 | 326 332 | 21 16 | 326 |
| 11 | MAR | 363 | 72 345 | 21 14 | 72 |
| 12 | ENO | 321 | 232 303 | 35 18 | 232 |
| 13 | ORB | 396 | 352 295 | 19 25 | 352 |
| 14 | PIP | 304 | 217 189 | 30 22 | 217 |
| 15 | PEF | 334 | 233 290 | 25 20 | 233 |
| 16 | LOM | 352 | 308 334 | 30 22 | 308 |
| 17 | NAL | 233 | 187 215 | 28 24 | 187 |
| 18 | CIN | 263 | 217 245 | 32 23 | 217 |
| 19 | OXO | 262 | 216 244 | 23 28 | 216 |
| 20 | NOR-D ₅ | 325 | 281 | 18 | 281 |

附录 D

(资料性附录)

喹诺酮类药物及其内标离子流色谱图

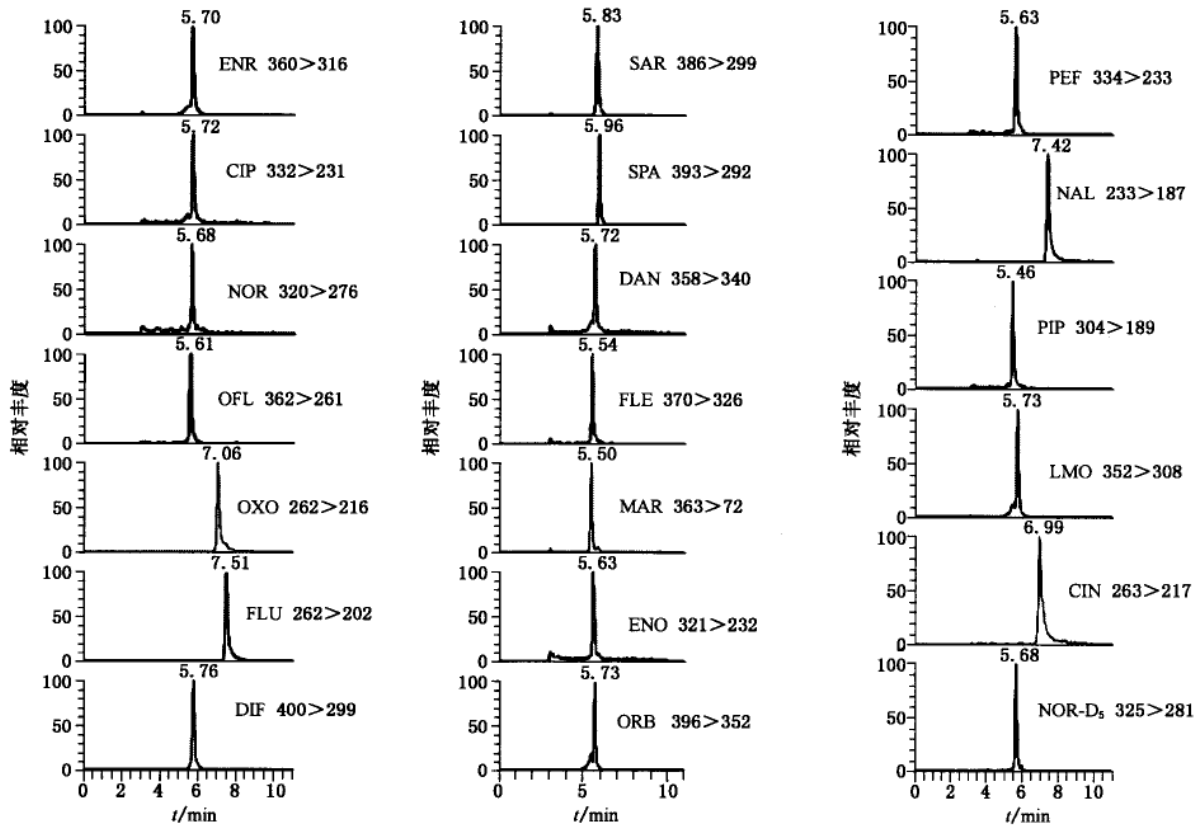


图 D.1 喹诺酮类药物及其内标离子流色谱图