

中华人民共和国国家标准

GB/T 20757—2006

蜂蜜中十四种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of fourteen quinolone
residues in honey—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华全国供销合作总社归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、曹彦忠、张进杰、石玉秋、贾光群、李学民、范春林、刘永明、郭彤彤。

本标准系首次发布的国家标准。

蜂蜜中十四种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中十四种喹诺酮类药物残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于蜂蜜中十四种喹诺酮类药物残留量的测定。

本标准的方法检出限：十四种喹诺酮类药物均为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

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

3 原理

蜂蜜中喹诺酮类药物残留用磷酸盐缓冲溶液（ $\text{pH}=3$ ）提取，过滤后，经 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱净化，用氢氧化铵甲醇溶液洗脱并蒸干，残渣用定容液溶解，过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜后，样品溶液供液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 磷酸。

4.4 乙酸。

4.5 氢氧化铵。

4.6 磷酸氢二钠。

4.7 磷酸二氢钾。

4.8 磷酸盐缓冲液： 0.05 mol/L 。称取 5.68 g 磷酸氢二钠（4.6）和 1.36 g 磷酸二氢钾（4.7），放入 1000 mL 烧杯中，加入 800 mL 水溶解，用磷酸（4.3）调至 $\text{pH}=3.0$ ，再用水定容至 1000 mL 。

4.9 氢氧化铵甲醇溶液： $(1+19)$ 。吸取 10 mL 氢氧化铵（4.5）与 190 mL 甲醇（4.1）混合。

4.10 定容液：乙腈 + 0.01 mol/L 乙酸溶液 $(1+4)$ 。量取 100 mL 乙腈与 400 mL 0.01 mol/L 乙酸溶液混合。

4.11 依诺沙星、诺氟沙星、麻保沙星、氟罗沙星、环丙沙星、氧氟沙星、单诺沙星、恩诺沙星、奥比沙星、沙拉沙星、司帕沙星、双氟沙星、噻嗪酸、氟甲喹标准物质：纯度 $\geq 95\%$ 。

4.12 喹诺酮标准储备溶液:1 mg/mL。准确称取适量的每种喹诺酮标准物质,用氢氧化铵甲醇溶液(4.9)配成1 mg/mL的标准储备溶液,该溶液在4℃保存可使用6个月。

4.13 中间浓度喹诺酮混合标准储备溶液:10 mg/L。分别吸取0.1 mL标准储备溶液(4.12)放入10 mL容量瓶中,用定容液(4.10)定容至刻度。

4.14 喹诺酮基质混合标准工作溶液:吸取不同体积中间浓度混合标准储备溶液(4.13),用空白样品提取液配成5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL不同浓度的基质混合标准工作溶液。当天配制。

4.15 Oasis HLB固相萃取柱或相当者:500 mg,6 mL。用前分别用6 mL甲醇、10 mL水和5 mL磷酸盐缓冲溶液(4.8)处理。保持柱体湿润。

4.16 滤膜:0.2 μm。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 固相萃取装置。

5.3 氮气浓缩仪。

5.4 液体混匀器。

5.5 分析天平:感量0.1 mg,0.01 g。

5.6 真空泵:最大负压80 kPa。

5.7 pH计:测量精度±0.02。

5.8 玻璃贮液器:50 mL。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,在密闭情况下,置于不超过60℃的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,冷却至室温。分出0.5 kg作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样的保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取5 g试样,精确至0.01 g。置于150 mL三角瓶中,加入30 mL磷酸盐缓冲溶液(4.8),于液体混匀器上快速混匀1 min,使试样完全溶解。

7.2 净化

将塞有玻璃棉的玻璃贮液器连到Oasis HLB固相萃取柱(4.15)上,把样液倒入玻璃贮液器(5.8)中,调节流速≤3 mL/min使样液通过Oasis HLB固相萃取柱,待样液完全流出后,分别用5 mL水和5 mL甲醇+水(3+7)洗柱,弃去全部流出液。固相萃取柱在65 kPa负压下,减压抽干30 min,然后用5 mL氢氧化铵甲醇溶液(4.9)洗脱,收集洗脱液于10 mL锥形试管中。在50℃用氮气浓缩仪吹干。准确加入1.0 mL定容液溶解残渣,过0.2 μm滤膜后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

按7.1和7.2操作步骤,制备用于配制系列基质标准工作溶液的样品空白提取液。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱:Inertsil ph-3,5 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;

b) 柱温:40℃;

- c) 进样量:40 μL ;
 d) 流动相:A:乙腈,B:0.01 mol/L 乙酸溶液。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	A:乙腈/(%)	B:0.01 mol/L 乙酸溶液/(%)
0.00	0.3	85.0	15.0
4.00	0.3	5.0	95.0
8.00	0.3	5.0	95.0
8.01	0.3	85.0	15.0
18.00	0.3	85.0	15.0

7.3.2 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:0.083 MPa;
 f) 气帘气压力:0.069 MPa;
 g) 辅助气流速:6 L/min;
 h) 离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$;
 i) 去簇电压:45 V;
 j) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和碰撞池出口电压见表 2。

表 2 十四种喹诺酮的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和碰撞池出口电压

药物名称	英文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞气能量/ V	碰撞池出口电压/ V
依诺沙星	enoxacin	321/234 321/257	321/234	32 28	18
诺氟沙星	norfloxacin	320/276 320/233	320/276	26 36	18
麻保沙星	marbofloxacin	363/320 363/277	363/320	23 27	18
氟罗沙星	fleroxacin	370/326 370/269	370/326	29 39	19
环丙沙星	ciprofloxacin	332/288 332/245	332/288	27 35	19
氧氟沙星	ofloxacin	362/318 362/261	362/318	29 40	19
单诺沙星	danofloxacin	358/314 358/283	358/314	27 35	21
恩诺沙星	enrofloxacin	360/316 360/245	360/316	29 39	19

表 2(续)

药物名称	英文名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞气能量/ V	碰撞池出口电压/ V
奥比沙星	orbifloxacin	396/352 396/295	396/352	27 35	21
沙拉沙星	sarafloxacin	386/342 386/299	386/342	28 40	20
司帕沙星	sparfloxacin	393/349 393/292	393/349	29 36	20
双氟沙星	difloxacin	400/356 400/299	400/356	29 42	19
噁喹酸	oxolinic acid	262/244 262/216	262/244	27 41	13
氟甲喹	flumequin	262/202 262/244	262/202	46 28	13

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

用基质混合标准工作溶液(4.14)分别进样,以工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中十四种喹诺酮的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,十四种喹诺酮的参考保留时间见表3。十四种喹诺酮的标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见图A.1。

表 3 十四种喹诺酮参考保留时间

药物名称	保留时间/min
依诺沙星	3.85
诺氟沙星	4.21
麻保沙星	4.65
氟罗沙星	4.98
环丙沙星	5.10
氧氟沙星	5.19
单诺沙星	5.52
恩诺沙星	5.65
奥比沙星	5.70
沙拉沙星	5.86
司帕沙星	5.91
双氟沙星	5.93
噁喹酸	6.57
氟甲喹	7.01

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

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

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 ——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.1 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 ,蜂蜜中十四种喹诺酮含量范围及重复性方程见表 4。

表 4 含量范围及重复性和再现性方程

药物名称	含量范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	重复性限 r	再现性限 R
依诺沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.010\ 0 \lg m - 0.839\ 8$	$\lg R = 1.1213 \lg m - 0.617\ 3$
诺氟沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.982\ 4 \lg m - 1.298\ 2$	$\lg R = 0.998\ 4 \lg m - 0.694\ 5$
麻保沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.937\ 6 \lg m - 1.265\ 5$	$\lg R = 1.006\ 8 \lg m - 0.562\ 1$
氟罗沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.234\ 2 \lg m - 1.433\ 2$	$\lg R = 1.085\ 4 \lg m - 0.865\ 7$
环丙沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.054\ 4 \lg m - 1.381\ 2$	$\lg R = 0.799\ 9 \lg m - 0.586\ 3$
氧氟沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.826\ 4 \lg m - 1.208\ 8$	$\lg R = 1.311\ 1 \lg m - 0.988\ 8$
单诺沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.081\ 2 \lg m - 1.374\ 2$	$\lg R = 0.856\ 9 \lg m - 0.719\ 8$
恩诺沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.814\ 0 \lg m - 1.068\ 3$	$\lg R = 1.100\ 2 \lg m - 0.932\ 1$
奥比沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.003\ 2 \lg m - 1.336\ 6$	$\lg R = 1.290\ 2 \lg m - 0.926\ 5$
沙拉沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.914\ 6 \lg m - 1.204\ 6$	$\lg R = 0.767\ 5 \lg m - 0.589\ 4$
司帕沙星	2.0~20.0	$\lg r = 1.084\ 4 \lg m - 1.344\ 4$	$\lg R = 0.856\ 2 \lg m - 0.605\ 2$
双氟沙星	2.0~20.0	$\lg r = 0.706\ 7 \lg m - 1.033\ 6$	$\lg R = 0.933\ 9 \lg m - 0.598\ 6$
噁唑酸	2.0~20.0	$\lg r = 1.099\ 8 \lg m - 1.439\ 8$	$\lg R = 0.857\ 0 \lg m - 0.613\ 9$
氟甲喹	2.0~20.0	$\lg r = 0.941\ 1 \lg m - 1.166\ 8$	$\lg R = 1.073\ 3 \lg m - 0.779\ 2$

注: m 为两次测定值的算术平均值。

如果差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 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 ,蜂蜜中十四种喹诺酮的含量范围及再现性方程见表 4。

附录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

十四种喹诺酮多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

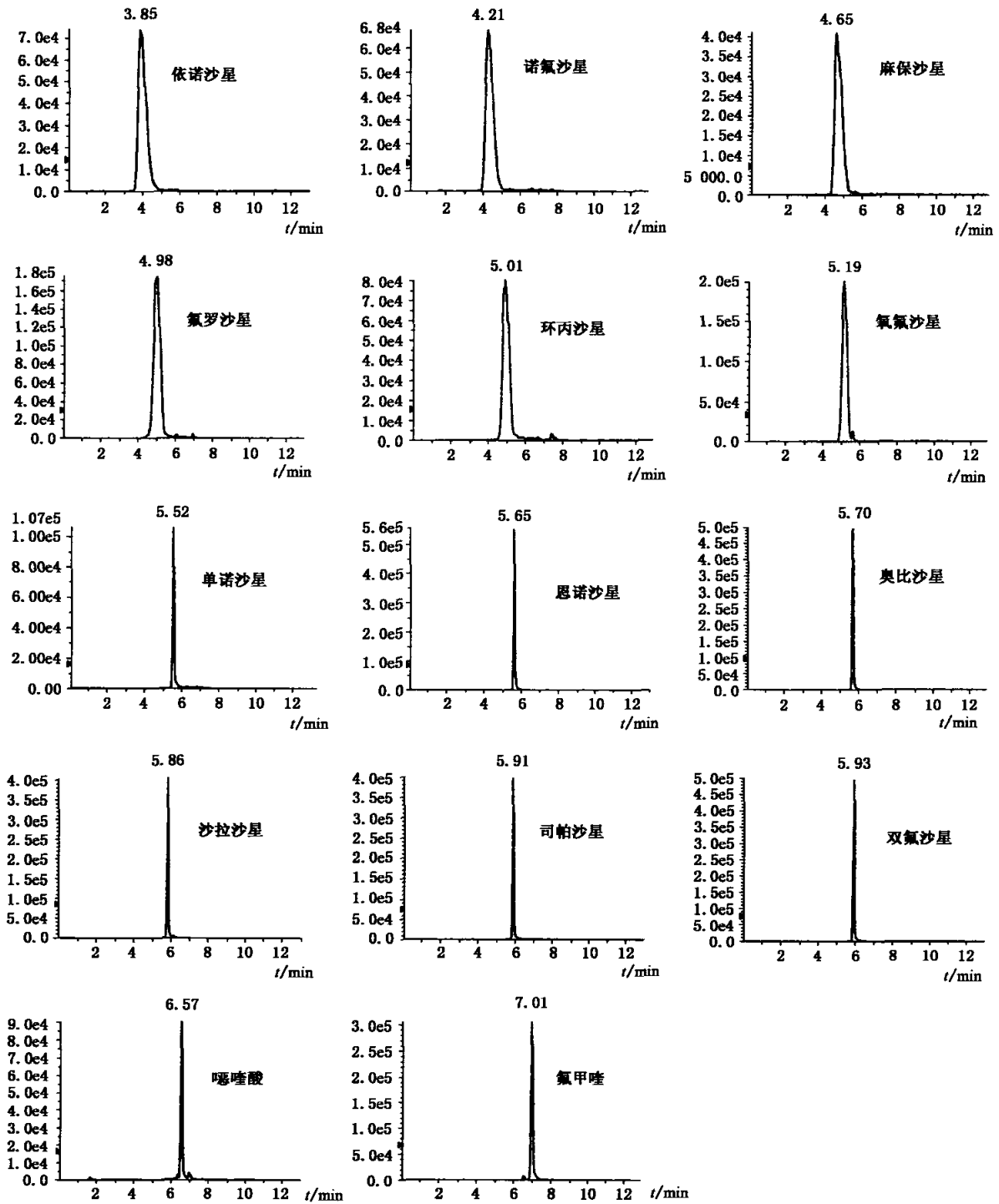


图 A.1 十四种喹诺酮多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中十四种喹诺酮添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 十四种喹诺酮添加浓度及其平均回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
依诺沙星	2.0	110.9
	5.0	87.4
	20.0	85.3
	50.0	71.3
诺氟沙星	2.0	80.2
	5.0	76.1
	20.0	82.9
	50.0	84.9
麻保沙星	2.0	88.4
	5.0	89.2
	20.0	86.7
	50.0	89.0
氟罗沙星	2.0	102.4
	5.0	102.6
	20.0	78.6
	50.0	80.4
环丙沙星	2.0	85.7
	5.0	79.9
	20.0	84.3
	50.0	80.5
氧氟沙星	2.0	103.2
	5.0	102.5
	20.0	86.0
	50.0	80.7
单诺沙星	2.0	104.8
	5.0	94.6
	20.0	86.2
	50.0	76.7
恩诺沙星	2.0	97.1
	5.0	90.2
	20.0	91.3
	50.0	91.4

表 B. 1(续)

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
奥比沙星	2.0	90.1
	5.0	91.0
	20.0	78.3
	50.0	82.4
沙拉沙星	2.0	92.9
	5.0	77.7
	20.0	84.9
	50.0	84.7
司帕沙星	2.0	82.7
	5.0	94.0
	20.0	66.3
	50.0	79.1
双氟沙星	2.0	94.8
	5.0	86.1
	20.0	91.6
	50.0	93.3
噁嗪酸	2.0	100.8
	5.0	89.8
	20.0	101.6
	50.0	95.2
氟甲唑	2.0	100.1
	5.0	87.6
	20.0	101.6
	50.0	97.6