

中华人民共和国国家标准

GB/T 22985—2008

牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、 环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、 二氟沙星和麻保沙星残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin,
orbifloxacin, difloxacin and marbofloxacin in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 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：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈瑞春、吕红英、段文仲、郭春海、艾连峰、邢军、马育松、姚春毅、庞国芳。

牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、 环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、 二氟沙星和麻保沙星残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星残留量的测定和确证。

本标准的方法检出限：牛奶中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星均为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星均为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD）

3 原理

用乙腈和磷酸盐缓冲溶液提取试样中残留的恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星，Oasis HLB 固相萃取柱¹⁾净化，5%氨水甲醇溶液洗脱，液相色谱-串联质谱测定，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：色谱纯。
- 4.4 甲酸：色谱纯。

1) Oasis HLB 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

- 4.5 磷酸氢二钠, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。
- 4.6 磷酸二氢钾, KH_2PO_4 。
- 4.7 氨水。
- 4.8 磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L):称取 5.68 g 磷酸氢二钠(4.5)和 1.36 g 磷酸二氢钾(4.6),放入 1 000 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 1 000 mL。
- 4.9 5%氨水甲醇溶液:吸取 50 mL 氨水(4.7)与 950 mL 甲醇(4.1)混合。
- 4.10 甲酸溶液($\text{pH}=3.0$):量取 500 mL 水,用甲酸(4.4)调 pH 值到 3.0。
- 4.11 25%甲醇溶液:量取 250 mL 甲醇(4.1)用水稀释到 1 000 mL。
- 4.12 甲醇-甲酸溶液(15+85):量取 30 mL 甲醇(4.1)与 170 mL 甲酸溶液(4.10)混合。
- 4.13 标准物质:恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星、麻保沙星标准物质,纯度大于等于 95%。
- 4.14 标准储备溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的每种标准物质,用甲醇(4.1)配成 0.1 mg/mL 的标准储备溶液,该溶液在 4 °C 保存。
- 4.15 混合标准中间溶液:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别吸取 1 mL 标准储备溶液(4.14)放入 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1)定容至刻度。该溶液在 4 °C 保存。
- 4.16 混合标准工作溶液:根据需要用空白样品提取液配不同浓度的混合标准工作溶液,混合标准工作溶液在 4 °C 保存。
- 4.17 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:60 mg,3 mL。使用前分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水和 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.8)活化,保持柱体湿润。
- 4.18 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 涡旋振荡器。
- 5.4 固相萃取装置。
- 5.5 氮气吹干仪。
- 5.6 真空泵:最大负压 80 kPa。
- 5.7 pH 计:测量精度 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。
- 5.8 贮液器:通过转接头连接于 Oasis HLB 固相萃取柱上。
- 5.9 离心机。
- 5.10 旋转蒸发仪。
- 5.11 具刻度离心管:10 mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将牛奶从冰箱中取出,放置至室温,摇匀,备用。

6.2 试样保存

牛奶置于 4 °C 冰箱中避光保存,奶粉常温避光保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶

称取 2 g 试样,精确到 0.01 g,置于 50 mL 具塞塑料离心管中,加入 10 mL 乙腈,于涡旋振荡器振

荡提取 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 上清液过滤到鸡心瓶中, 在残渣中加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液 (4.8), 10 mL 乙腈, 重复以上步骤, 合并上清液, 于 50 °C 旋转蒸发, 至乙腈全部蒸出。加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液, 混匀。

7.1.2 奶粉

称取 0.5 g 试样, 精确到 0.01 g, 置于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 6 mL 磷酸盐缓冲溶液 (4.8), 涡旋混匀, 再加入 10 mL 乙腈, 于涡旋振荡器振荡提取 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 上清液过滤到鸡心瓶中, 在残渣中加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液, 10 mL 乙腈, 重复以上步骤, 合并上清液, 于 50 °C 旋转蒸发, 至乙腈全部蒸出。加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液, 混匀。

7.2 净化

将 7.1 的样液转移到贮液器中, 再用 5 mL 磷酸盐缓冲溶液洗鸡心瓶, 洗液合并到贮液器, 以约 1 mL/min 的流速全部过 HLB 固相萃取小柱 (4.17), 待样液完全流出后, 先后以 4 mL 水、4 mL 25% 甲醇水溶液淋洗, 抽干, 用 4 mL 5% 氨水甲醇溶液 (4.9) 洗脱于 10 mL 具刻度离心管中, 洗脱液于 50 °C, 氮气吹至约 0.2 mL 时停止浓缩, 用甲醇-甲酸溶液 (4.12) 定容至 1 mL, 5 000 r/min 离心 5 min, 过 0.2 μm 滤膜, 供液相色谱串联质谱分析。

7.3 空白基质溶液的制备

将取牛奶阴性样品 2 g, 奶粉阴性样品 0.5 g, 按 7.1 和 7.2 操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C₁₈, 5 μm, 150 mm × 2.1 mm (内径) 或相当者;
- 色谱柱温度: 30 °C;
- 进样量: 15 μL;
- 流动相梯度及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	0.1%乙酸水溶液/%	甲醇/%
0.00	200	80	20
5.00	200	40	60
9.00	200	40	60
9.10	200	80	20
11.00	200	80	20

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子化模式: 电喷雾正离子模式 (ESI+);
- 质谱扫描方式: 多反应监测 (MRM);
- 鞘气压力: 104 kPa;
- 辅助气压力: 138 kPa;
- 正离子模式电喷雾电压 (IS): 4 000 V;
- 毛细管温度: 320 °C;
- 源内诱导解离电压: 10 V;
- Q1, Q3 分辨率: Q1 为 0.4, Q3 为 0.7;
- 碰撞气: 高纯氩气;
- 碰撞气压力: 0.2 Pa;

k) 其他质谱参数及 7 种喹诺酮的 CAS 号、保留时间见表 2。

表 2 七种喹诺酮类药物保留时间、CAS 号、定性离子对、定量离子对和裂解能量

化合物中文名称	化合物英文名称	保留时间/ min	CAS 号	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	裂解能量/ eV
恩诺沙星	enrofloxacin	5.66	93106-60-6	360.10/315.97	360.14/316.08	19
				360.10/244.86		24
达氟沙星	danofloxacin	6.18	119478-55-6	358.14/339.83	358.14/340.00	22
				358.14/313.80		32
环丙沙星	ciprofloxacin	6.51	93107-08-5	332.30/288.14	332.30/288.14	15
				332.30/244.88		23
沙拉沙星	sarafloxacin	6.17	98105-99-8	386.11/341.77	386.10/341.77	19
				386.11/298.83		25
奥比沙星	orbifloxacin	6.71	113617-63-3	396.05/352.01	396.05/352.01	20
				396.05/394.98		25
二氟沙星	difloxacin	7.06	124858-35-1	400.12/355.71	400.12/355.71	18
				400.12/298.85		30
麻保沙星	marbofloxacin	7.05	115550-35-1	363.15/319.91	363.15/319.91	17
				363.15/344.95		20

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 在相同实验条件下, 样品中待测物质的保留时间, 与混合基质标准校准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内; 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为样品中存在对应的待测物。

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 <i>K</i>	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 对混合基质标准校准溶液进样, 以峰面积为纵坐标, 混合基质校准溶液浓度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, 样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。标准品多反应监测色谱图参见附录 A 中图 A.1。

7.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

除不称取样品外, 均按上述步骤进行。

7.7 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液, 用空白基质溶液(7.3)稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液, 按 7.1 和 7.2 操作, 测定后计算样品添加的回收率。样品添加回收率实验数据参见附录 B 中的表 B.1。

8 结果计算

试样中每种喹诺酮残留量按式(1)计算:

$$X_i = c_i \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

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

c_i ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

i 表示第*i*种喹诺酮,计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

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,重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.2 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),牛奶和奶粉中七种喹诺酮的添加浓度范围及重复性方程见表 4、表 5。

表 4 牛奶中七种喹诺酮的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
恩诺沙星	1.0~10.0	$r=0.131\ 3m-0.098\ 5$	$R=0.201\ 8m-0.150\ 0$
达氟沙星	1.0~10.0	$r=0.094\ 2m-0.035\ 1$	$\lg R=1.163\ 7\ \lg m-0.912\ 2$
环丙沙星	1.0~10.0	$r=0.073\ 7m+0.016\ 8$	$R=0.122\ 1m+0.109\ 9$
沙拉沙星	1.0~10.0	$r=0.078\ 3m-0.028\ 1$	$R=0.124\ 0m+0.058\ 4$
奥比沙星	1.0~10.0	$r=0.069\ 0m-0.008\ 7$	$\lg R=1.039\ 8\ \lg m-0.837\ 7$
二氟沙星	1.0~10.0	$r=0.090\ 5m-0.034\ 3$	$R=0.171\ 0m-0.061\ 2$
麻保沙星	1.0~10.0	$\lg r=1.099\ 2\ \lg m-1.094\ 0$	$\lg R=1.016\ 2\ \lg m-0.804\ 6$

表 5 奶粉中七种喹诺酮的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
恩诺沙星	4.0~40.0	$\lg r=0.931\ 9\ \lg m-0.935\ 6$	$\lg R=1.069\ 5\ \lg m-0.945\ 6$
达氟沙星	4.0~40.0	$\lg r=1.035\ 8\ \lg m-1.043\ 8$	$R=0.178\ 2m-0.034\ 6$
环丙沙星	4.0~40.0	$\lg r=0.792\ 8\ \lg m-0.823\ 7$	$\lg R=0.927\ 5\ \lg m-0.722\ 8$
沙拉沙星	4.0~40.0	$r=0.074\ 6m+0.178\ 5$	$\lg R=0.888\ 3\ \lg m-0.649\ 1$
奥比沙星	4.0~40.0	$r=0.071\ 2m+0.061\ 0$	$R=0.110\ 9m+0.260\ 2$
二氟沙星	4.0~40.0	$\lg r=0.940\ 1\ \lg m-0.908\ 4$	$\lg R=0.905\ 1\ \lg m-0.638\ 3$
麻保沙星	4.0~40.0	$\lg r=0.928\ 5\ \lg m-0.899\ 8$	$\lg R=0.844\ 8\ \lg m-0.574\ 2$

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

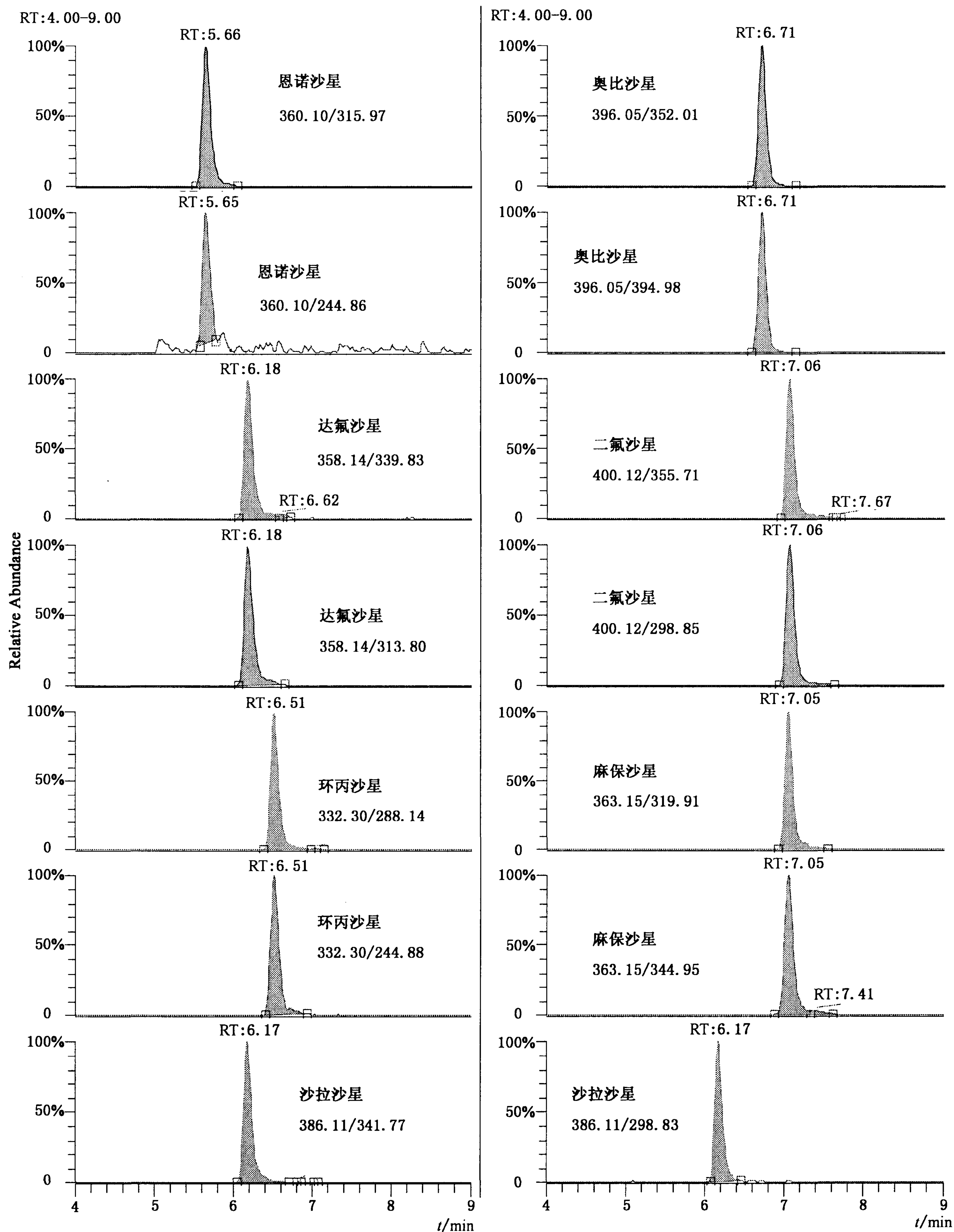
9.3 再现性

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)牛奶和奶粉中七种喹诺酮的添加浓度范围及再现性方程见表 4、表 5。

附录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

七种喹诺酮标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。



注: 图中前面的为定量色谱图,后面的为定性色谱图。

图 A.1 七种喹诺酮标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附录 B
(资料性附录)
回收率

七种喹诺酮添加浓度及其回收率范围的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 七种喹诺酮添加浓度及其回收率范围的试验数据

化合物名称	牛奶		奶粉	
	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%
麻保沙星	1	80.8~108.0	4	76.0~101.2
	2	86.6~100.6	8	86.9~101.5
	5	77.3~95.0	20	78.8~96.0
	10	81.2~92.0	40	83.8~93.4
环丙沙星	1	76.8~90.1	4	89.0~100.3
	2	73.2~92.6	8	75.2~95.3
	5	73.8~100.2	20	76.0~98.6
	10	79.1~92.3	40	82.5~94.6
达氟沙星	1	87.4~109.4	4	70.4~101.3
	2	84.0~97.6	8	81.6~90.7
	5	77.0~102.1	20	74.6~93.9
	10	78.5~92.1	40	81.8~94.0
恩诺沙星	1	85.9~102.0	4	75.2~93.8
	2	76.1~91.1	8	77.1~100.1
	5	80.8~101.1	20	78.6~101.5
	10	79.4~92.2	40	81.8~92.7
奥比沙星	1	83.9~105.0	4	80.9~101.7
	2	81.5~96.0	8	82.4~100.5
	5	77.2~98.2	20	77.2~100.2
	10	79.7~93.6	40	79.2~90.4
沙拉沙星	1	72.1~97.1	4	78.6~100.9
	2	78.2~95.5	8	81.1~94.8
	5	84.6~103.7	20	77.1~97.8
	10	84.5~93.8	40	80.5~94.0
二氟沙星	1	88.9~108.1	4	82.3~96.0
	2	88.1~99.3	8	84.1~96.1
	5	85.9~101.3	20	81.3~108.0
	10	84.4~94.6	40	80.9~92.2