



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21312—2007

---

## 动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留 检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Analysis of fourteen quinolones in food of animal origin by  
high performance liquid chromatography tandem mass  
spectrometry

2007-10-29 发布

2008-04-01 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

# 动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留 检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

## 1 范围

本标准规定了动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留量检测的制样方法和高效液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本标准适用于猪肉、猪肝、猪肾、牛奶、鸡蛋等动物源性食品中恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、依诺沙星、洛美沙星、吡哌酸、萘啶酸、奥索利酸、氟甲喹、西诺沙星、单诺沙星 14 种喹诺酮类兽药残留量的液相色谱-质谱/质谱法测定和确证。

## 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—1992, neq ISO 3696:1987)

## 3 方法提要

用 0.1mol/L EDTA-Mellvaine 缓冲液(pH4.0)提取样品中的喹诺酮类抗生素,经过滤和离心后,上清液经 HLB 固相萃取柱净化。高效液相色谱-质谱/质谱测定,用阴性样品基质加标外标法定量。

## 4 制样方法

制样操作过程中应防止样品受到污染或残留物含量发生变化。

### 4.1 动物肌肉和动物内脏

将现场采集的样品放入小型冷冻箱中运输到实验室,在 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下保存,一周内进行处理。取适量新鲜或冷冻解冻的动物组织样品去筋、捣碎均匀。

### 4.2 牛奶

将现场采集的样品放入小型冷冻箱中运输到实验室,在 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下保存,一周内进行处理。取适量新鲜或冷冻解冻的样品混合均匀。

### 4.3 鸡蛋

将现场采集的样品放入小型冷冻箱中运输到实验室,在 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下保存,一周内进行处理。取适量新鲜的样品,去壳后混合均匀。

## 5 试剂和材料

除特殊注明外,本法所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 柠檬酸:分析纯。

5.2 磷酸氢二钠:分析纯。

5.3 甲醇。

5.4 乙腈。

5.5 甲醇-乙腈溶液:40+60(体积比)。

- 5.6 甲酸(99%)。
- 5.7 氢氧化钠:分析纯。
- 5.8 乙二胺四乙酸二钠:分析纯。
- 5.9 磷酸氢二钠溶液:0.2 mol/L。称取 71.63 g 磷酸氢二钠,用水溶解,定容至 1 000 mL。
- 5.10 柠檬酸溶液:0.1 mol/L。称取 21.01 g 柠檬酸,用水溶解,定容至 1 000 mL。
- 5.11 McIlvaine 缓冲溶液:将 1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液(5.10)与 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液(5.9)混合,必要时用盐酸或氢氧化钠调节 pH 至  $4.0 \pm 0.05$ 。
- 5.12 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液:0.1 mol/L。称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠(5.8)放入 1625 mL McIlvaine 缓冲溶液(5.11)中,振荡使其溶解。
- 5.13 甲醇水溶液:5%(体积分数)。
- 5.14 甲酸水溶液:0.2%(体积分数)。
- 5.15 喹诺酮类药物标准物质:恩诺沙星(enrofloxacin, CAS:93106-60-6)、诺氟沙星(norfloxacin, CAS:70458-96-7)、培氟沙星(pefloxacin, CAS:6159-55-3)、环丙沙星(ciprofloxacin, CAS:85721-33-1)、氧氟沙星(ofloxacin, CAS:82419-36-1)、沙拉沙星(sarafloxacin, CAS:98105-99-8)、依诺沙星(enoxacin, CAS:74011-58-8)、洛美沙星(lomefloxacin, CAS:98079-51-7)、吡哌酸(pipemidic acid, CAS:51940-44-4)、萘啶酸(nalidixic acid, CAS:389-08-2)、奥索利酸(oxolinic acid, CAS:14698-29-4)、氟甲喹(flumequine, CAS:42835-25-6)、西诺沙星(cinoxacin, CAS:28657-80-9)、单诺沙星(danofloxacin, CAS:74011-58-8)(纯度 $>99\%$ )。
- 5.16 标准溶液
- 5.16.1 标准储备液:分别称取 0.010 0 g 标准品(5.15)置于 10.0 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,标准储备液浓度为 1 mg/mL,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存,有效期 3 个月。
- 5.16.2 标准工作液:将以上各标准储备液(5.16.1)稀释,配成混合标准溶液。各组分浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ 。此标准工作液于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,可保存 3 个月。
- 5.17 HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL)或其他等效柱。

## 6 仪器

- 6.1 高效液相色谱-串联质谱仪。
- 6.2 电子天平:感量 0.000 1 g。
- 6.3 电子天平:感量 0.01 g。
- 6.4 组织匀浆机。
- 6.5 旋涡混合器。
- 6.6 冷冻离心机(最高转速大于 1 000 r/min)。
- 6.7 聚丙烯离心管(50 mL)。
- 6.8 酸度计(0.01)。
- 6.9 氮吹仪。
- 6.10 固相萃取仪。

## 7 提取及净化

### 7.1 提取

#### 7.1.1 动物肌肉组织、肝脏、肾脏

称取均质试样 5.0 g(精确到 0.1 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 20 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(5.12),1 000 r/min 旋涡混合 1 min,超声提取 10 min,10 000 r/min 离心 5 min(温度低于  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),提取三次,合并上清液。

### 7.1.2 牛奶和鸡蛋

称取均质试样 5.0 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,用 40 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(5.12)溶解,1 000 r/min 旋涡混合 1 min,超声提取 10 min,10 000 r/min 离心 10 min(温度低于 5 ℃),取上清液。

### 7.2 净化

HLB 固相萃取柱(200 mg,6 mL),使用时用 6 mL 甲醇洗涤、6 mL 水活化。将 7.1 提取的溶液以 2 mL/min~3 mL/min 的速度过柱,弃去滤液,用 2 mL 5% 甲醇水溶液(5.13)淋洗,弃去淋洗液,将小柱抽干,再用 6 mL 甲醇洗脱并收集洗脱液。洗脱液用氮气吹干,用 1 mL 0.2% 甲酸水溶液(5.14)溶解,1 000 r/min 旋涡混合 1 min,用于上机测定。

### 7.3 基质加标标准工作曲线的制备

将混合标准工作液(5.16.2)用初始流动相逐级稀释成 2.5 μg/L~100.0 μg/L 的标准系列溶液。称取与试样基质相应的阴性样品 5.0 g,加入标准系列溶液 1.0 mL,按照 7.1、7.2 与试样同时进行提取和净化。

## 8 高效液相色谱-质谱/质谱测定

### 8.1 高效液相色谱条件

8.1.1 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)或其他等效柱。

8.1.2 流动相:A[40+60 甲醇-乙腈溶液(5.5)];B[0.2% 甲酸水溶液(5.14)]梯度淋洗,参考梯度条件见表 B.1。

8.1.3 流速:0.2 mL/min。

8.1.4 柱温:40 ℃。

8.1.5 进样体积:20 μL。

### 8.2 质谱条件

电离模式:电喷雾电离正离子模式(ESI+);质谱扫描方式:多反应监测(MRM);分辨率:单位分辨率;其他参考质谱条件见附录 A。

## 9 空白试验

除不加标准外,均按上述步骤进行测定。

## 10 结果计算与表述

### 10.1 定性标准

#### 10.1.1 保留时间

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在±2.5% 之内,参考保留时间见表 B.2。

#### 10.1.2 信噪比

待测化合物的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 3( $S/N \geq 3$ ),定量离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 10( $S/N \geq 10$ )。

#### 10.1.3 定量离子、定性离子及子离子丰度比

每种化合物的质谱定性离子必须出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检测批次,对同一化合物,样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比,其允许偏差不超过表 1 规定的范围。各化合物的参考质谱图和标准溶液色谱图见附录 C,附录 D。

表 1 定性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%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

10.2 结果计算与表述

按式(1)计算喹诺酮类药物残留量。

$$X = \frac{cV \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——样品中待测组分的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——测定液中待测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——定容体积,单位为毫升(mL);
- m——样品称样量,单位为克(g)。

11 检出限、定量限与回收率

11.1 检出限

动物组织中检出限(S/N=3):氟甲唑、萘啶酸、奥索利酸、西诺沙星、恩诺沙星、单诺沙星、洛美沙星、氧氟沙星均为 1.0 μg/kg,环丙沙星为 2.5 μg/kg,沙拉沙星、诺氟沙星、培氟沙星、吡哌酸为 2.0 μg/kg,依诺沙星为 3.0 μg/kg。

鸡蛋和牛奶中检出限:氟甲唑、萘啶酸、奥索利酸、西诺沙星、恩诺沙星、单诺沙星、洛美沙星、氧氟沙星均为 0.5 μg/kg,环丙沙星为 1.2 μg/kg,沙拉沙星、诺氟沙星、培氟沙星、吡哌酸为 1.0 μg/kg,依诺沙星为 1.5 μg/kg。

11.2 定量限

动物组织中定量限(S/N=10):氟甲唑、萘啶酸、奥索利酸、西诺沙星、恩诺沙星、单诺沙星、洛美沙星、氧氟沙星均为 3.0 μg/kg,环丙沙星为 8 μg/kg,沙拉沙星、诺氟沙星、培氟沙星、吡哌酸为 6 μg/kg,依诺沙星为 10 μg/kg。

鸡蛋和牛奶中定量限:氟甲唑、萘啶酸、奥索利酸、西诺沙星、恩诺沙星、单诺沙星、洛美沙星、氧氟沙星均为 2 μg/kg,环丙沙星为 4 μg/kg,沙拉沙星、诺氟沙星、培氟沙星、吡哌酸为 3 μg/kg,依诺沙星为 5 μg/kg。

11.3 回收率

回收率试验采用三个加标浓度,分别为检出限浓度的 1、2、5 倍。猪肉中 14 种喹诺酮的加标回收率在 86.8%~116.9%之间,相对标准偏差(RSD)在 1.9%~15.1%之间;猪肝中 14 种喹诺酮的加标回收率在 90.2%~118.5%之间,RSD 在 1.8%~14.1%之间;猪肾中 14 种喹诺酮的加标回收率在 86.8%~113.1%之间,RSD 在 2.3%~17.0%之间;牛奶中 14 种喹诺酮的加标回收率在 79.0%~119.9%之间,RSD 在 2.2%~19.4%之间;鸡蛋中 14 种喹诺酮的加标回收率在 80.5%~112.1%之间,RSD 在 2.9%~20.1%之间。具体见附录 E。

附 录 A  
(资料性附录)  
参考质谱条件<sup>1)</sup>

参考质谱条件:

- a) 电离源:电喷雾正离子模式;
- b) 毛细管电压:2.0 kV;
- c) 射频透镜电压:0 V;
- d) 源温度:110 ℃;
- e) 脱溶剂气温度:350 ℃;
- f) 脱溶剂气流量:500 L/h;
- g) 电子倍增电压:650 V;
- h) 碰撞室压力:0.28 Pa;
- i) 其他质谱参数见表 A.1。

表 A.1 14种喹诺酮的主要参考质谱参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
吡哌酸	304.3	271.1*	21	38
		189.0	32	38
培氟沙星	334.3	290.3*	17	38
		233.2	25	38
氧氟沙星	362.2	318.3*	18	38
		261.2	27	38
依诺沙星	321.4	303.3*	19	50
		233.9	22	50
诺氟沙星	320.3	302.3*	19	50
		276.3	17	50
环丙沙星	332.2	314.3*	19	36
		288.3	17	36
恩诺沙星	360.3	316.4*	19	38
		342.3	23	38
单诺沙星	358.3	340.3*	25	38
		82.0	42	38
洛美沙星	352.3	265.2*	23	36
		308.3	17	36
沙拉沙星	386.3	342.3*	18	40
		299.3	28	40

1) 所列质谱参考条件是在 Micromass<sup>®</sup>-Quattro Premier XE 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,鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

表 A.1 (续)

化合物	母离子	子离子	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
西诺沙星	263.1	244.1 <sup>a</sup>	16	35
		188.8	28	35
奥索利酸	262.1	244.1 <sup>a</sup>	16	50
		155.9	28	50
萘啶酸	233.1	215.1 <sup>a</sup>	15	26
		187.0	28	26
氟甲唑	262.2	244.1 <sup>a</sup>	17	50
		202.1	28	50
注：对不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。				
<sup>a</sup> 定量离子。				

附 录 B  
(资料性附录)  
参考液相条件

表 B.1 分离 14 种喹诺酮的参考梯度条件

时间/min	甲醇-乙腈/%	0.2%甲酸水/%
0	10	90
6	30	70
9	50	50
9.5	100	0
10.5	100	0
11	10	90
15	10	90

表 B.2 14 种喹诺酮的参考保留时间(RT)

化合物	RT/min	化合物	RT/min
恩诺沙星	5.84	洛美沙星	5.66
诺氟沙星	5.08	吡哌酸	3.93
培氟沙星	5.14	萘啶酸	10.32
环丙沙星	5.32	奥索利酸	8.67
氧氟沙星	5.04	氟甲唑	10.67
沙拉沙星	6.74	西诺沙星	7.76
依诺沙星	4.79	单诺沙星	5.64



附录 C  
(资料性附录)

14 种喹诺酮的子离子扫描质谱图

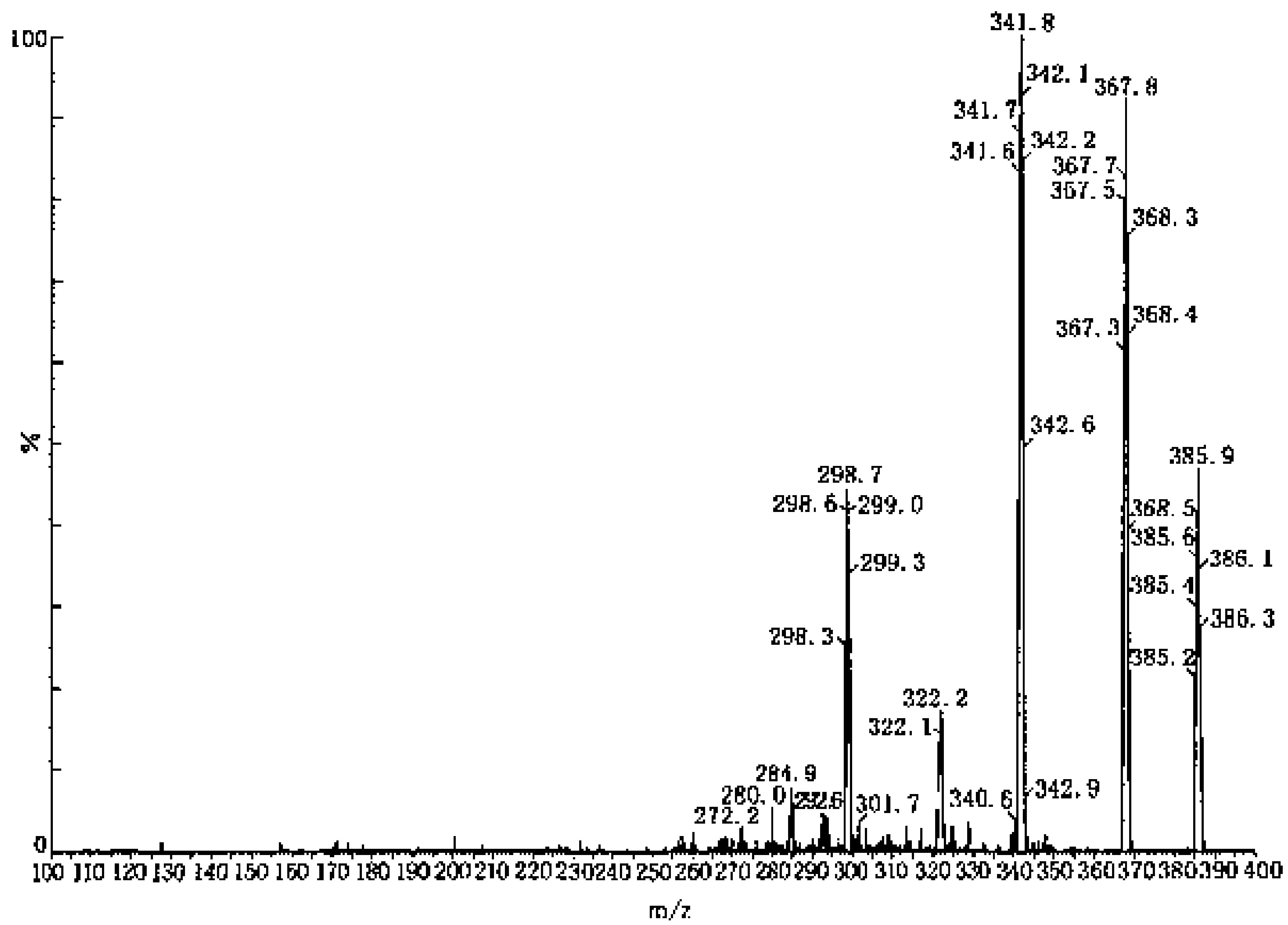


图 C.1 沙拉沙星二级质谱图

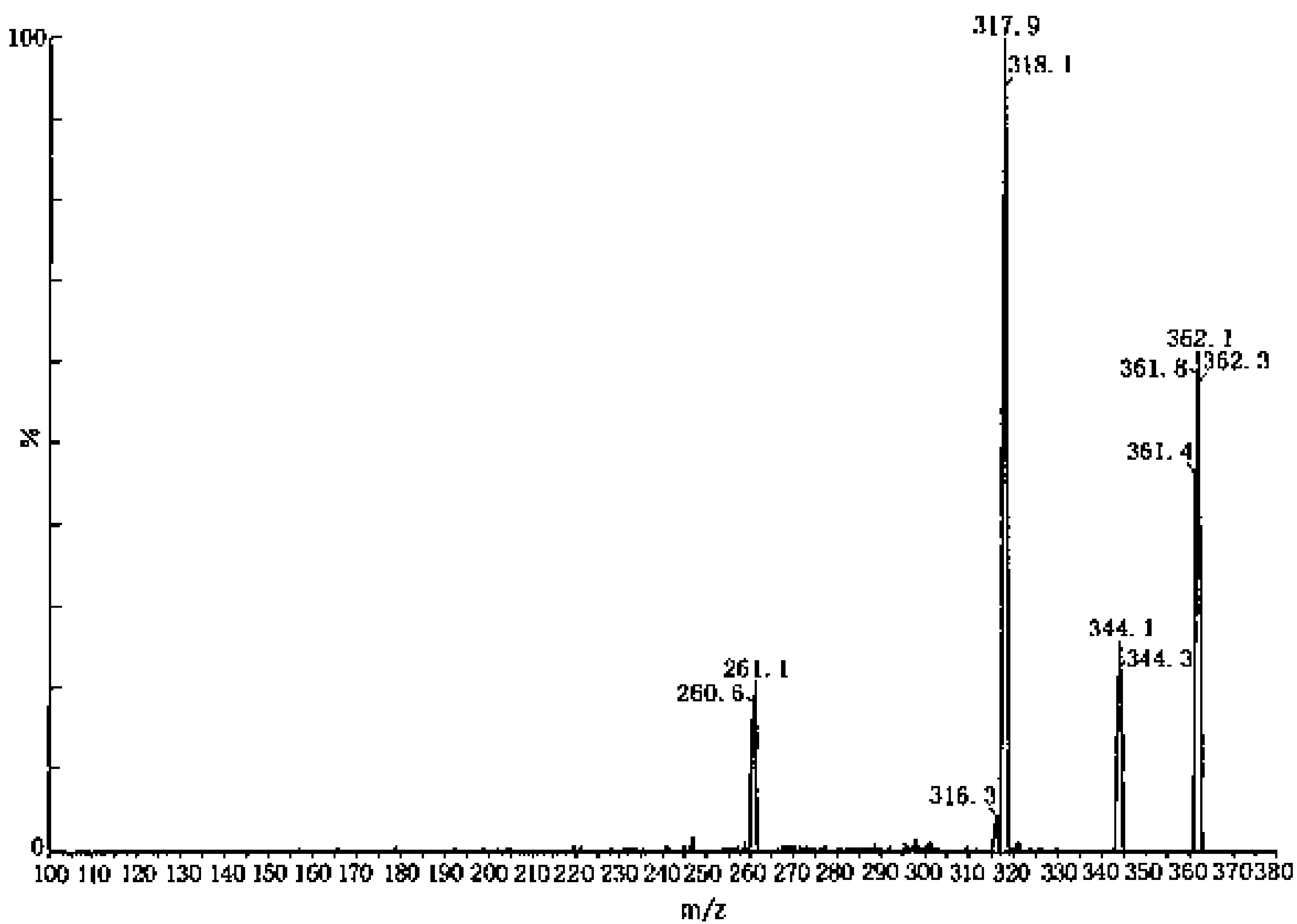


图 C.2 氧氟沙星二级质谱图

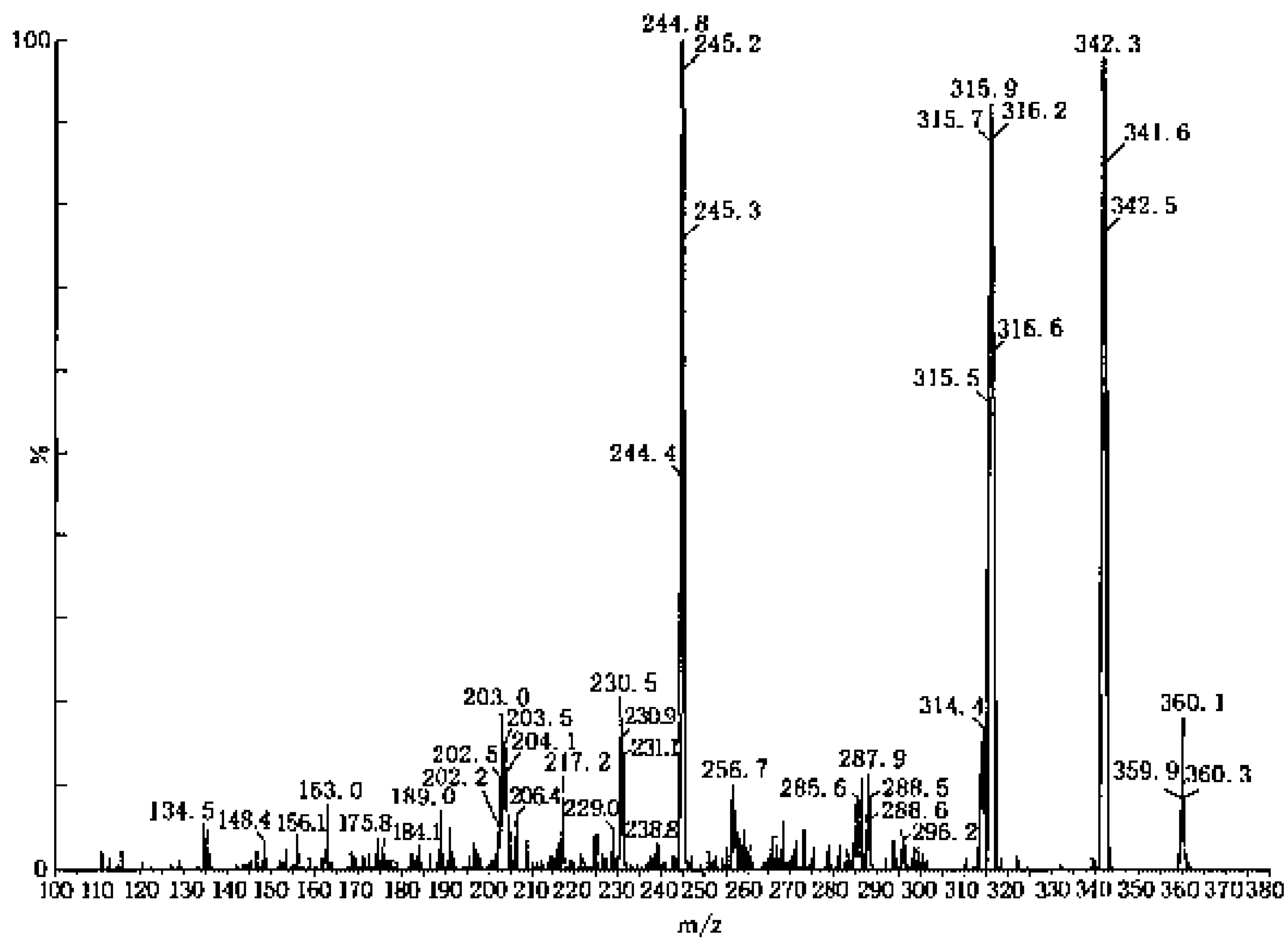


图 C.3 恩诺沙星二级质谱图

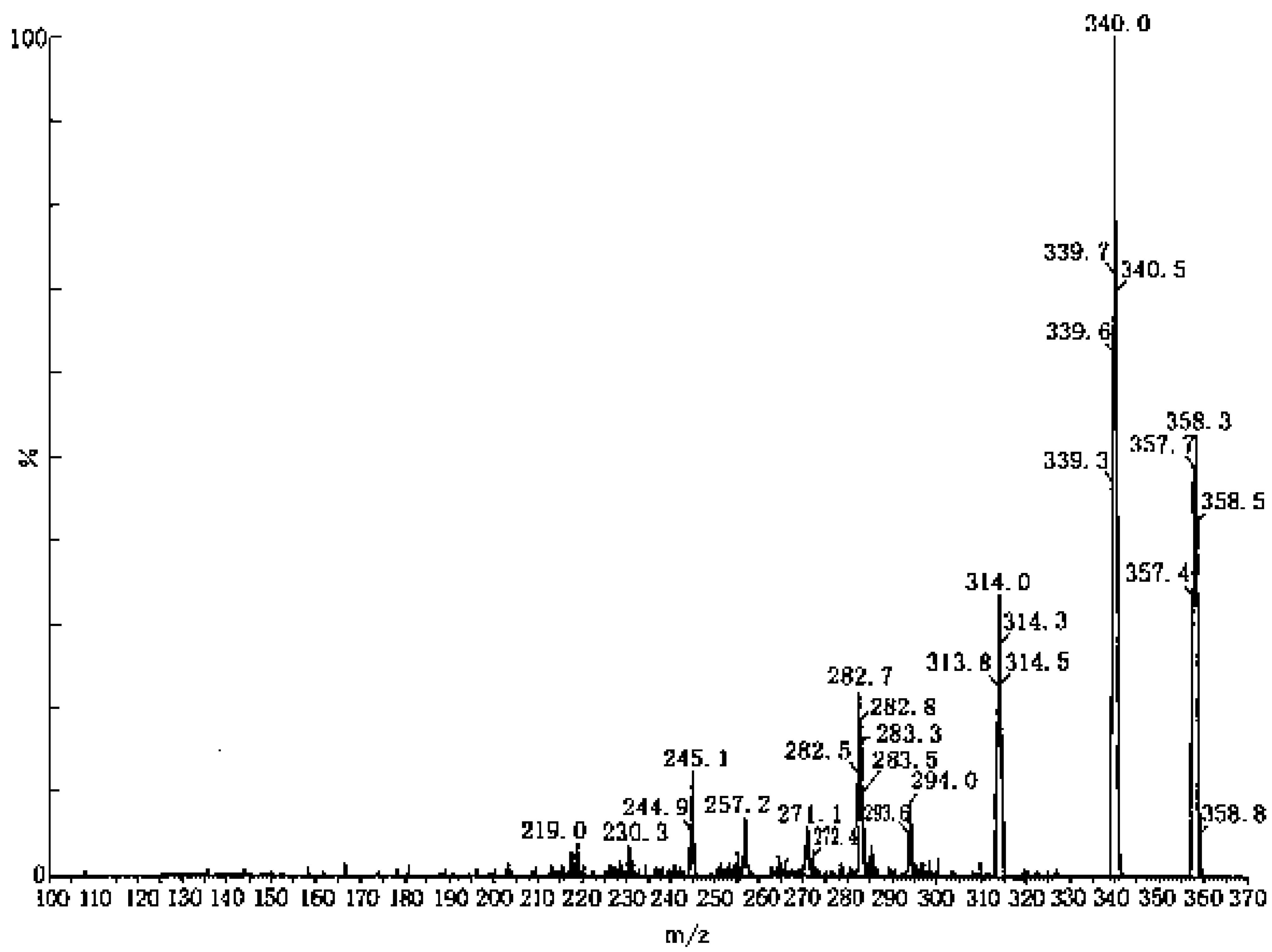


图 C.4 单诺沙星二级质谱图

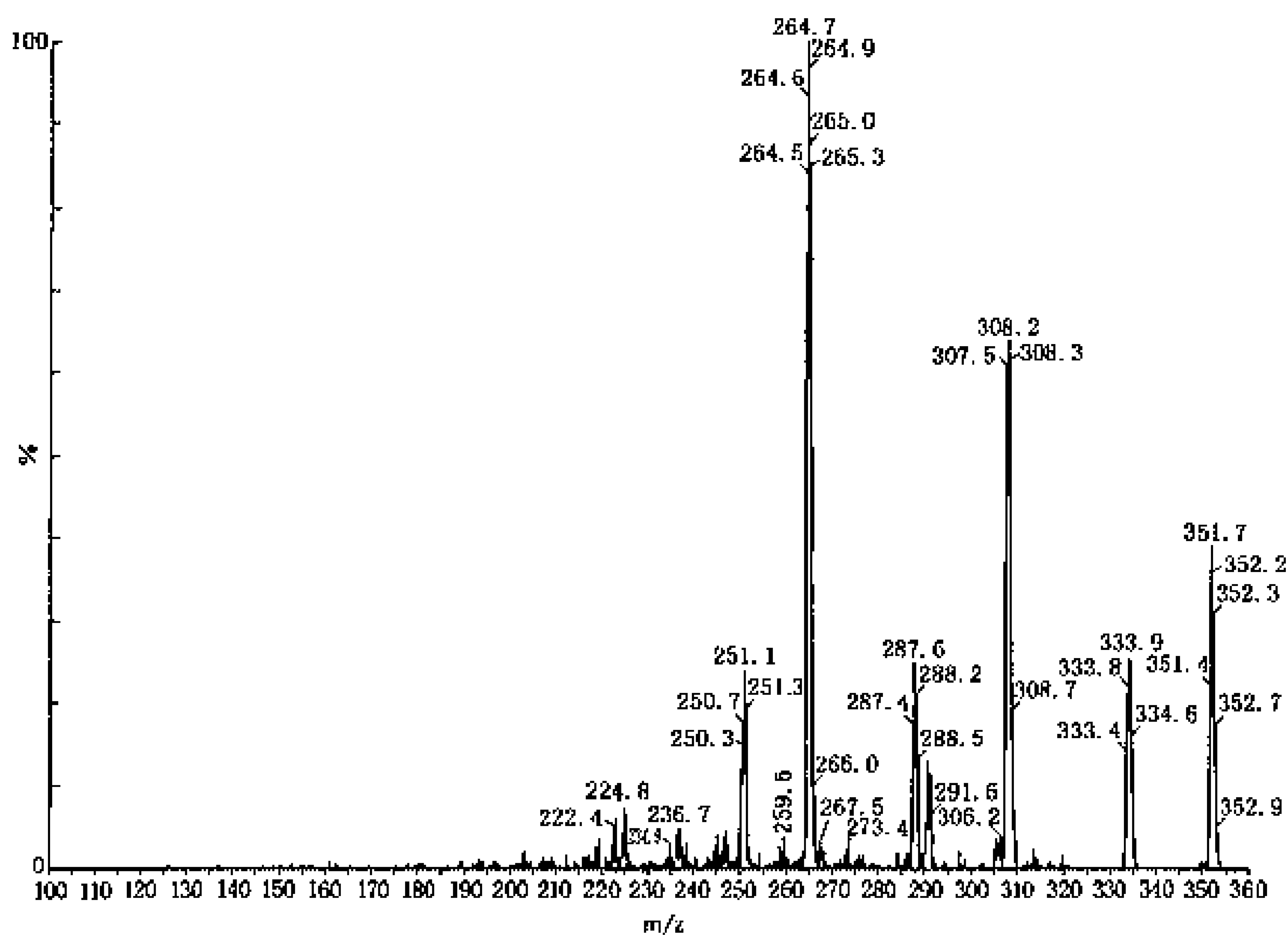


图 C.5 洛美沙星二级质谱图

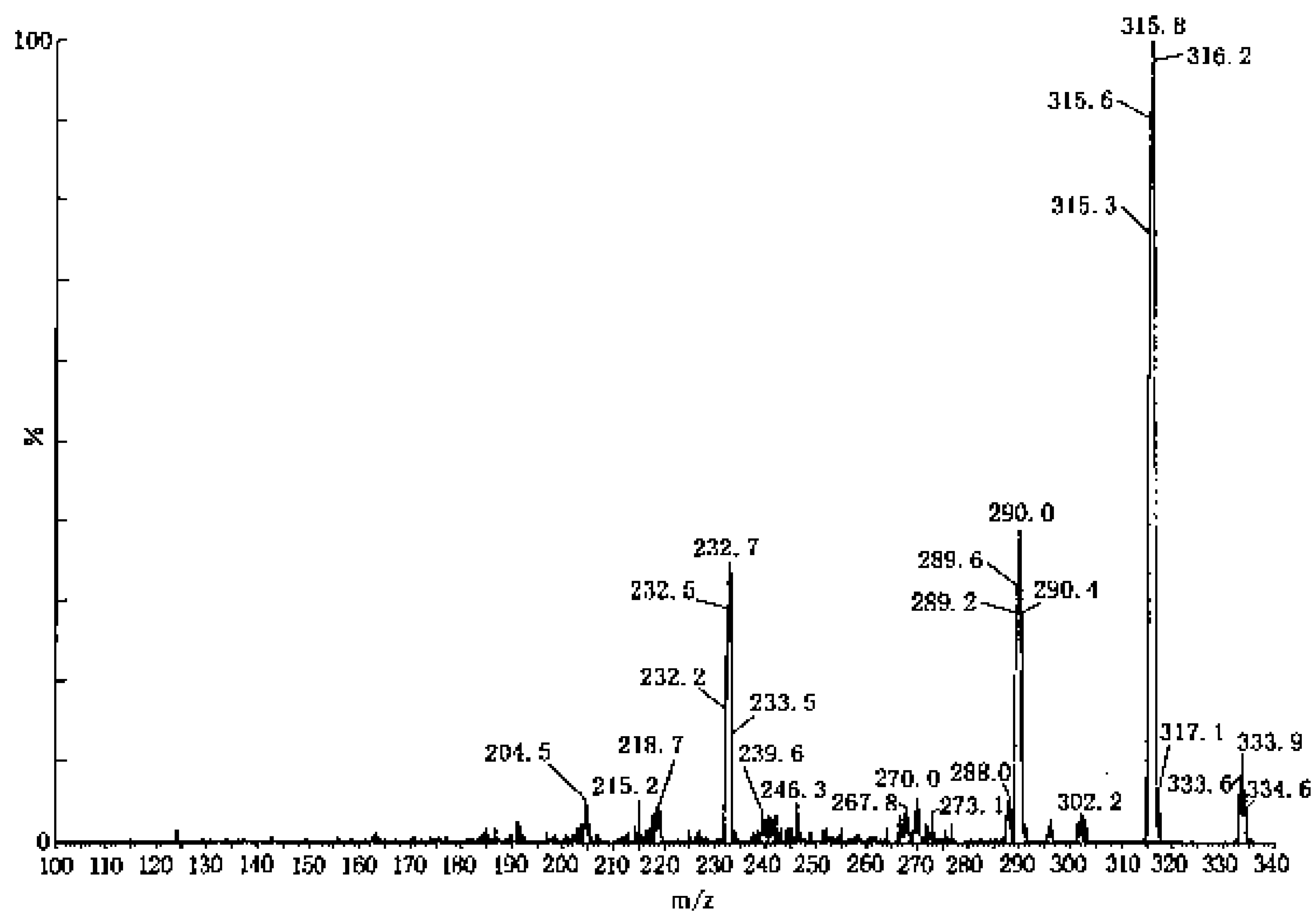


图 C.6 培氟沙星二级质谱图

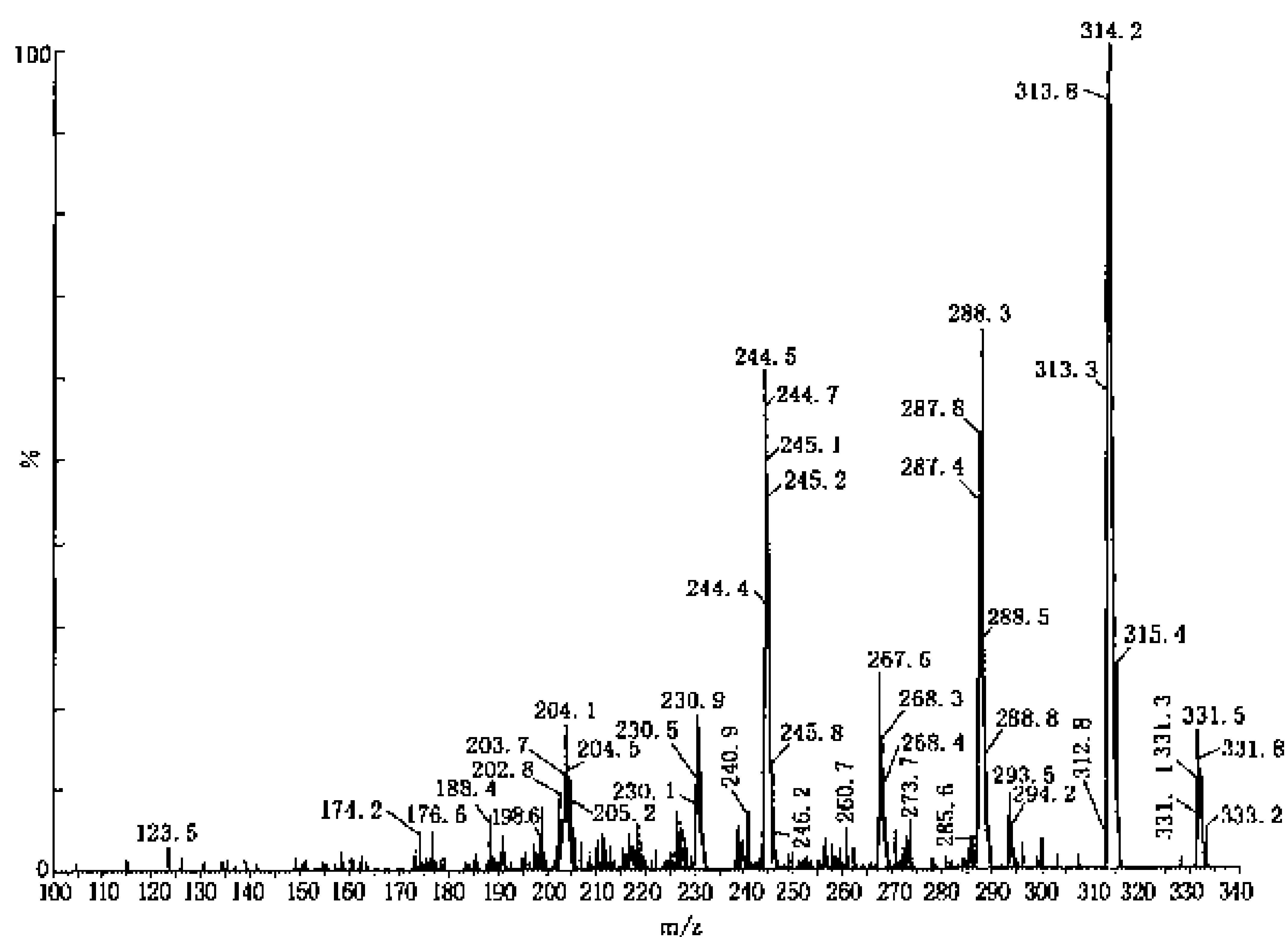


图 C.7 环丙沙星二级质谱图

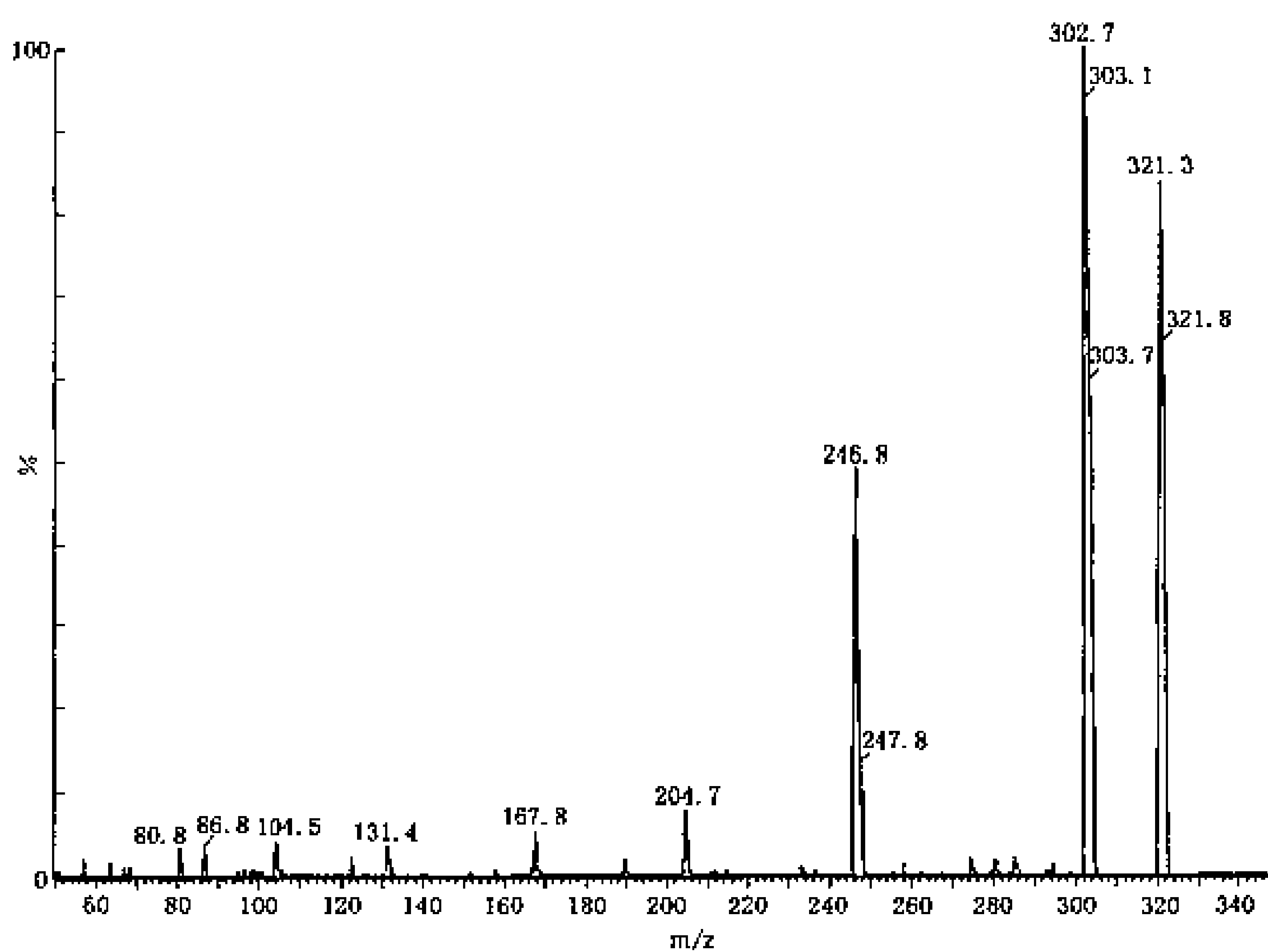


图 C.8 依诺沙星二级质谱图

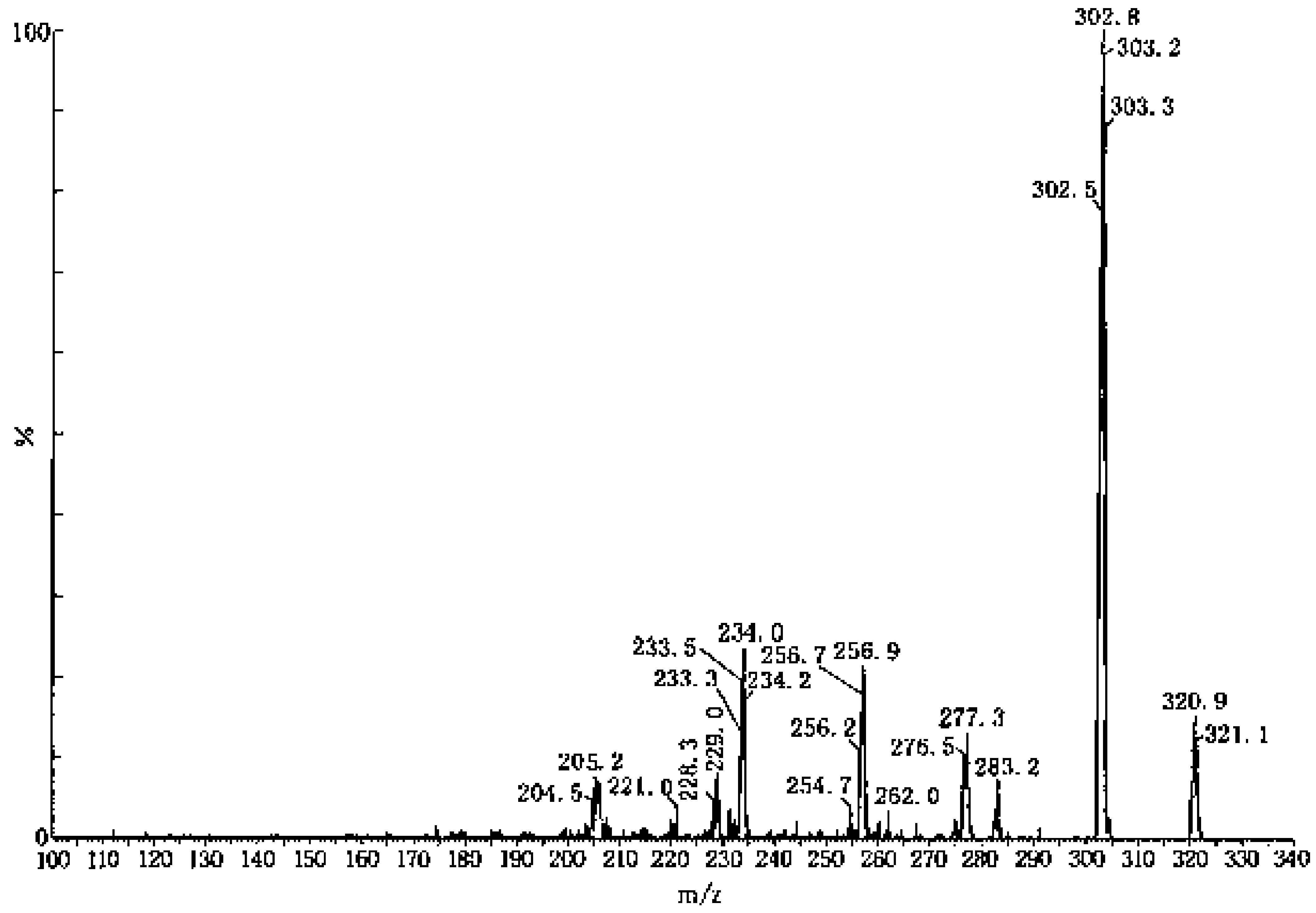


图 C.9 诺氟沙星二级质谱图

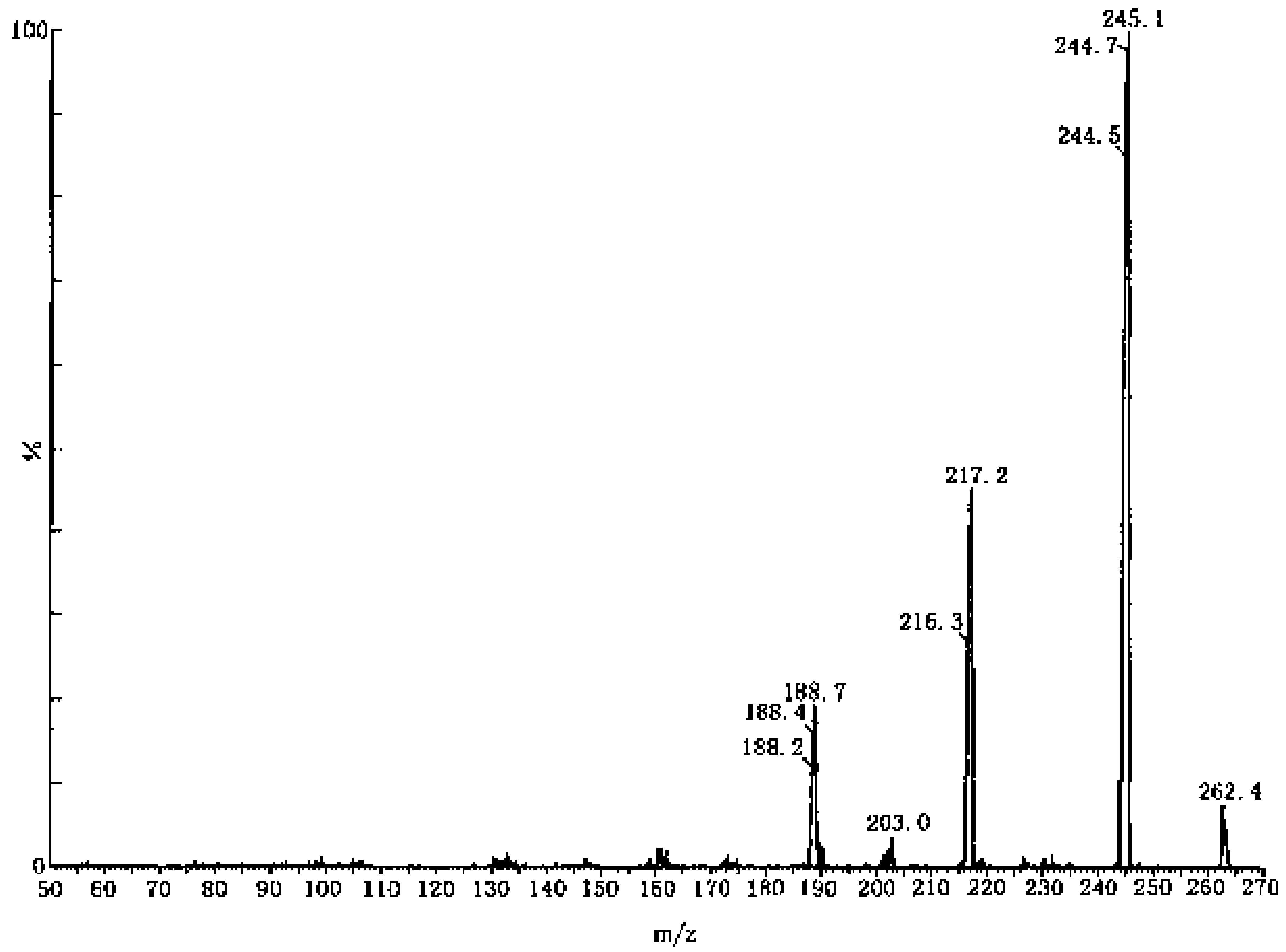


图 C.10 西诺沙星二级质谱图

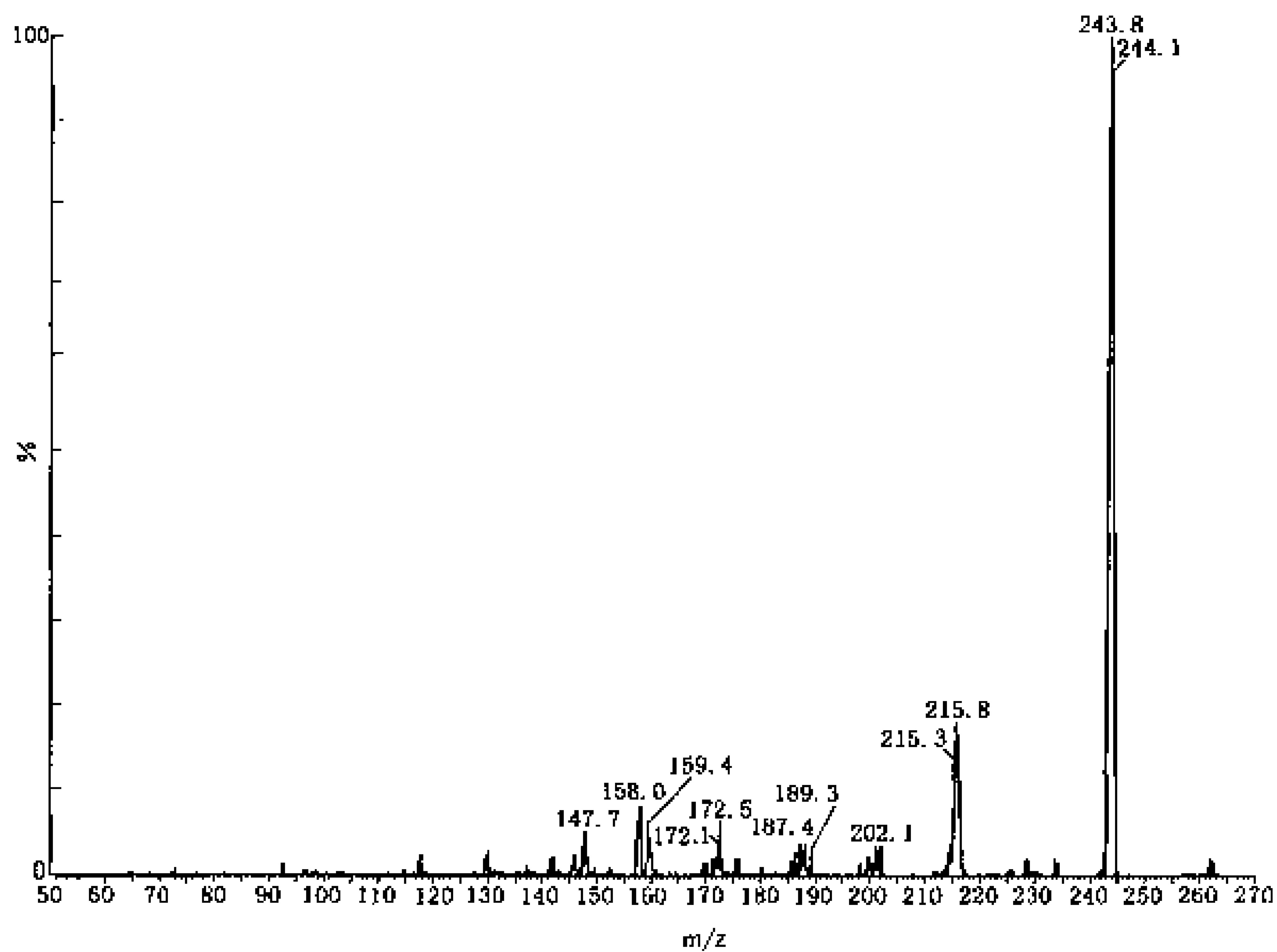


图 C. 11 奥索利酸二级质谱图

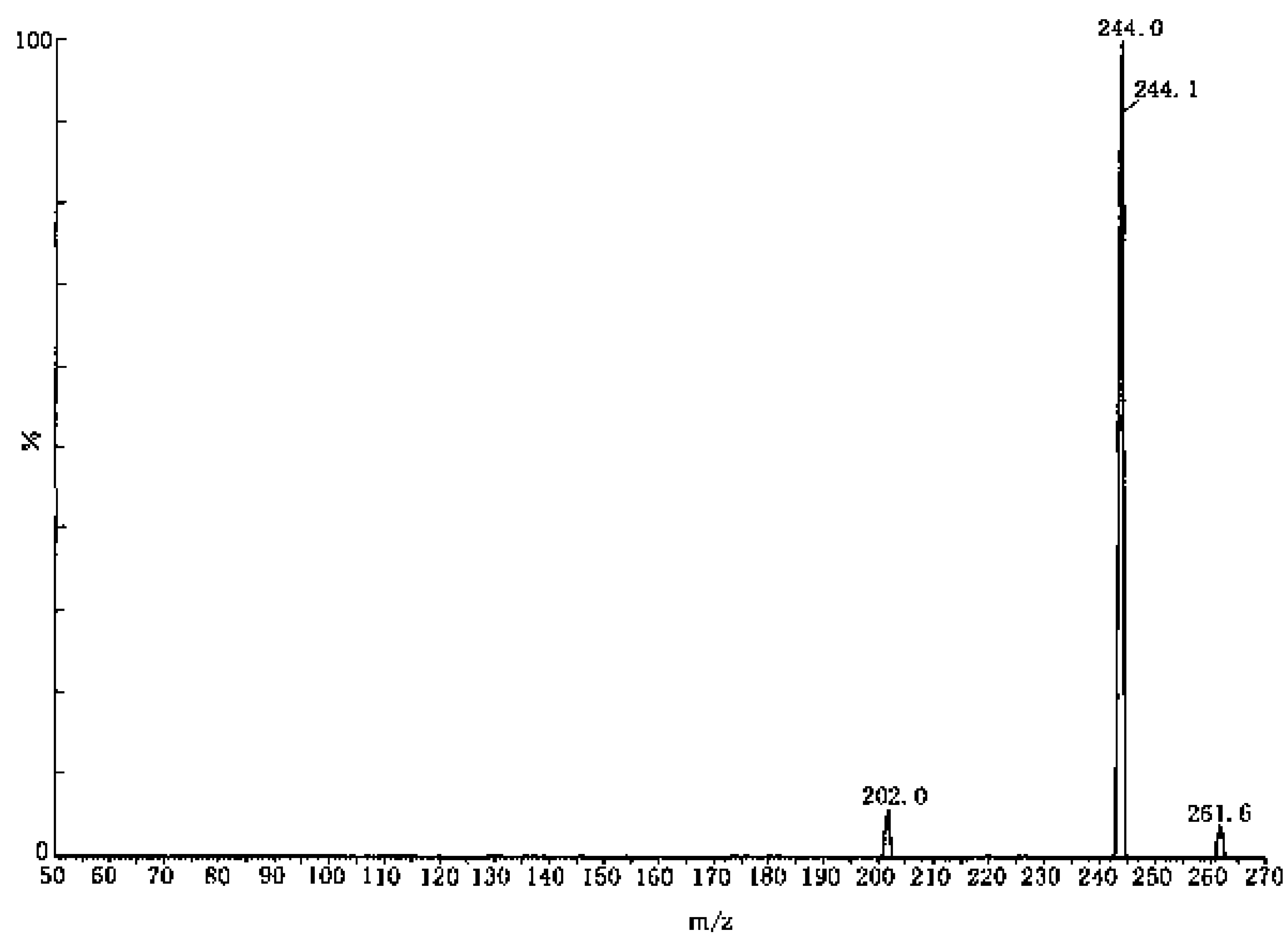


图 C. 12 氟甲隆二级质谱图

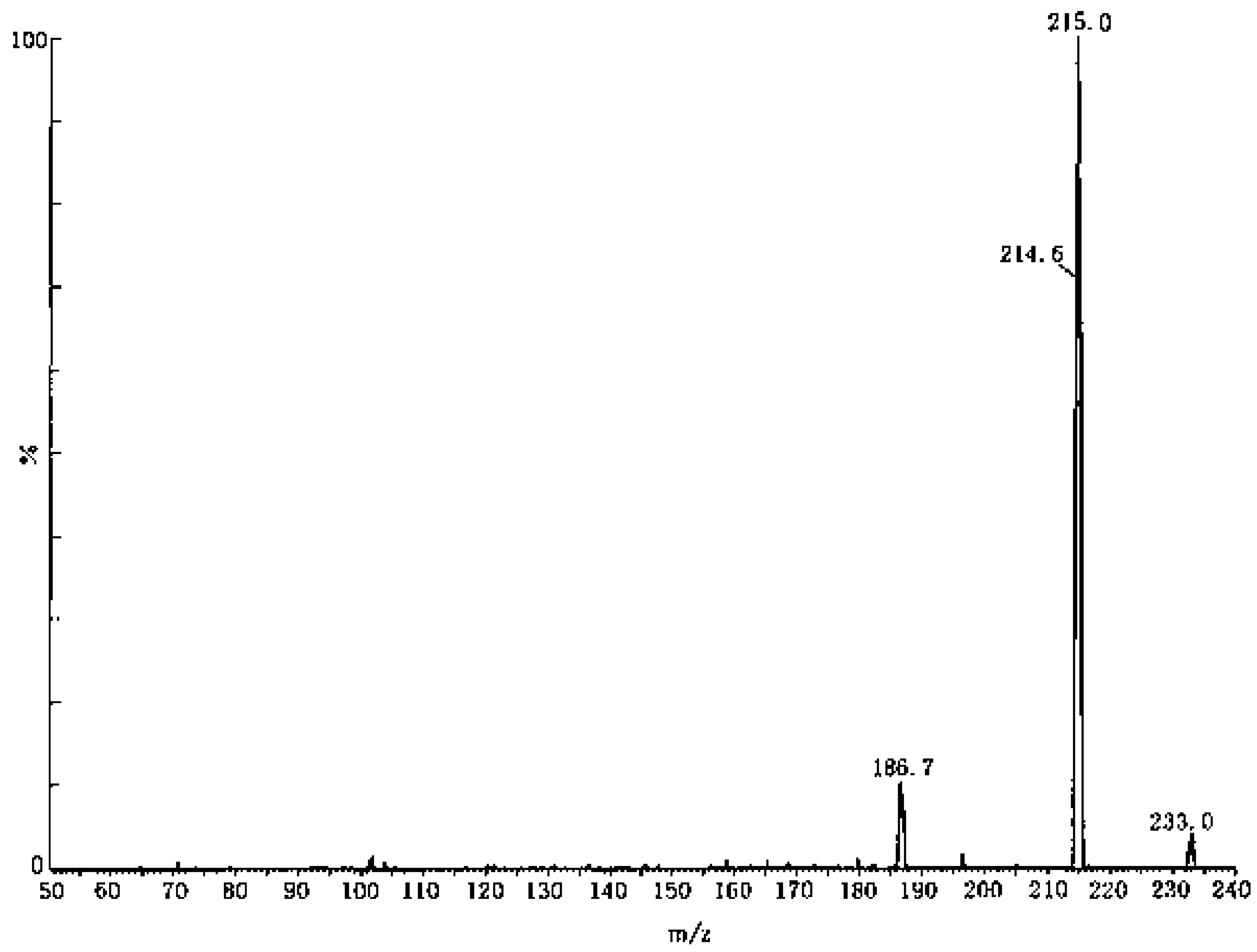


图 C.13 烟酰胺二级质谱图

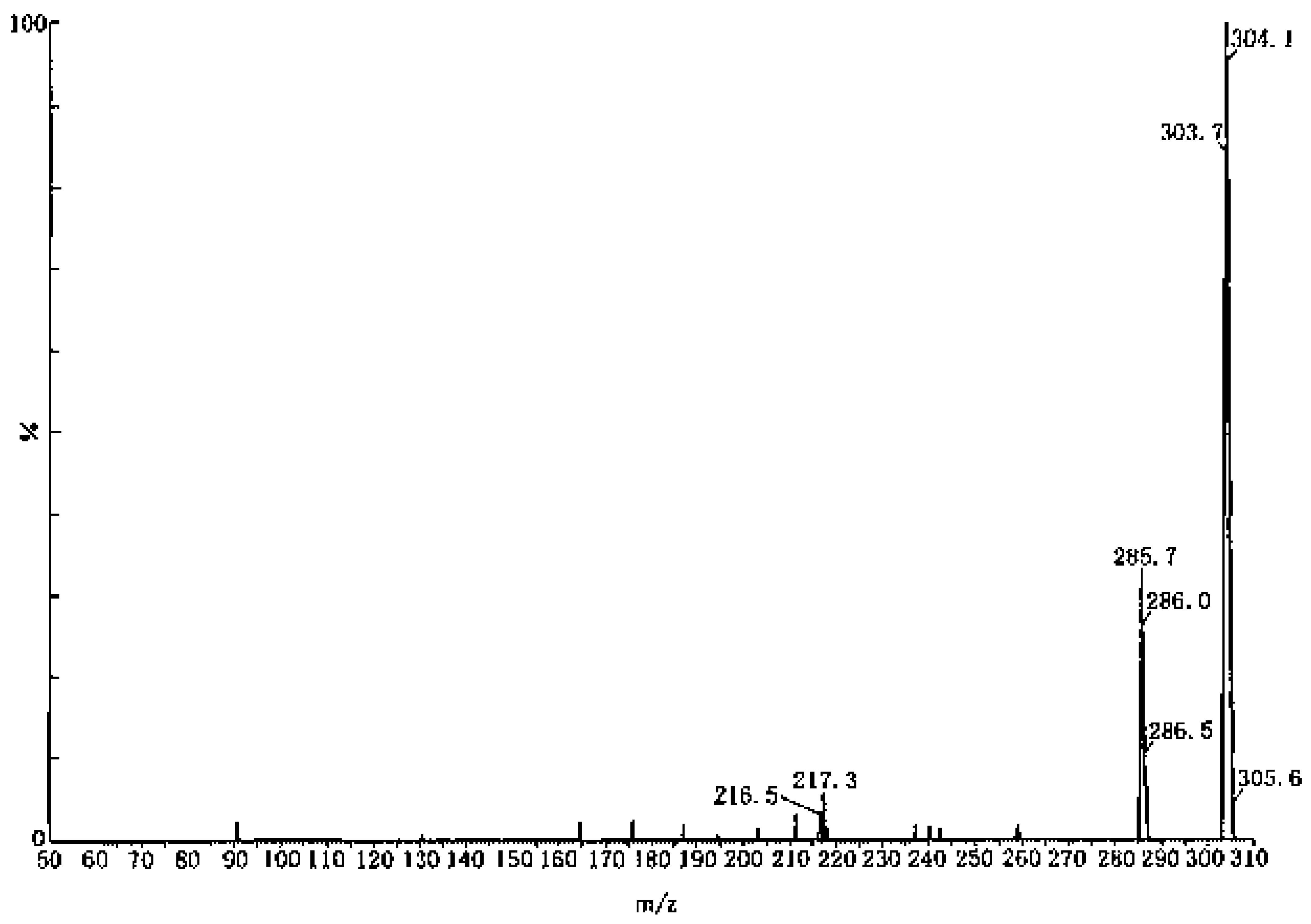


图 C.14 吡啶酸二级质谱图

附录 D  
(资料性附录)  
14 种喹诺酮标准溶液色谱图

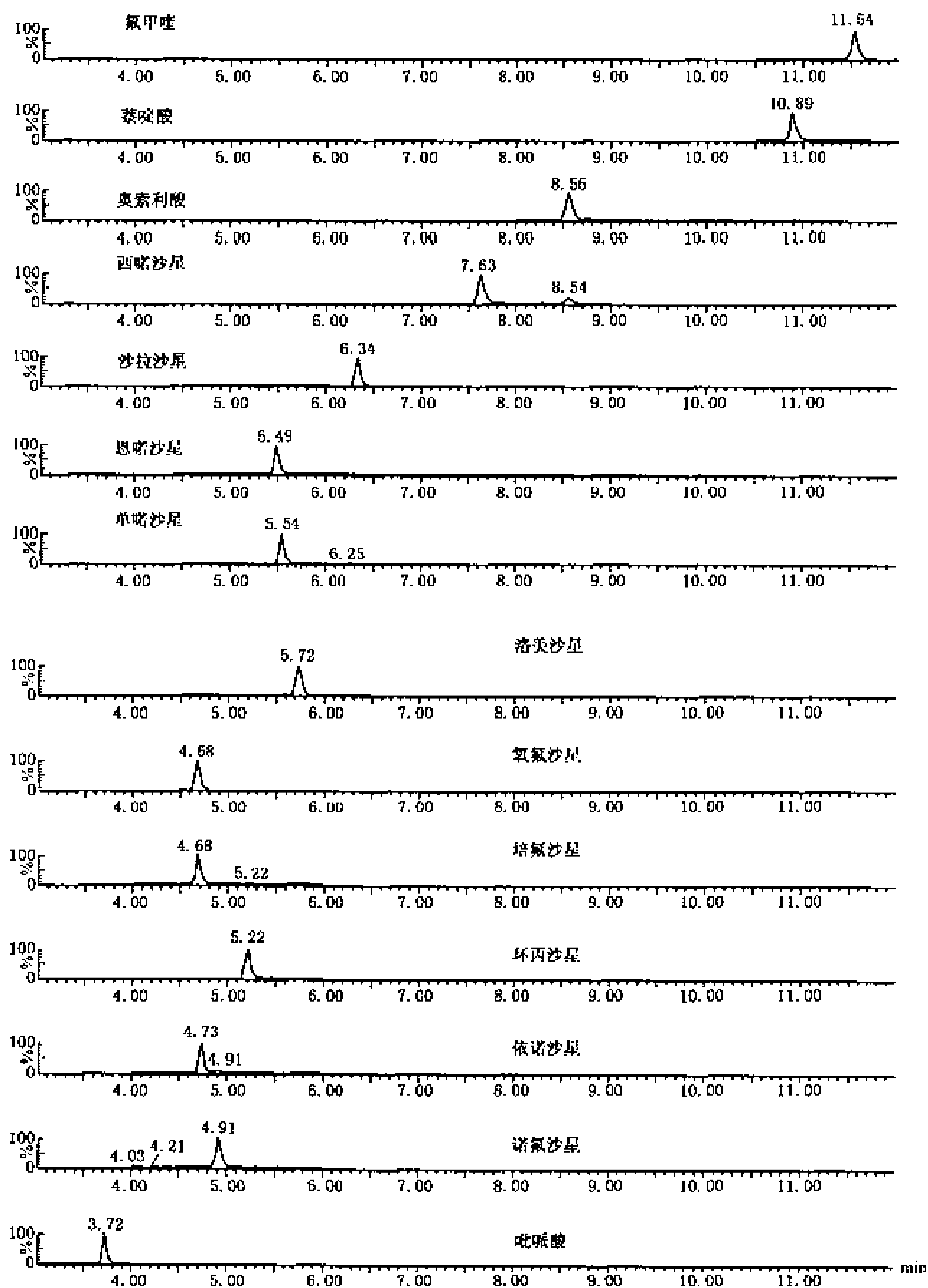


图 D.1 14 种喹诺酮标准溶液色谱图



附 录 E  
(资料性附录)

五种基质中 14 种喹诺酮的回收率和相对标准偏差

表 E.1 猪肉、猪肝、猪肾中喹诺酮的回收率及相对标准偏差( $n=6$ )

化合物	加标水平/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	猪 肉		猪 肝		猪 肾	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
氟甲唑	1	110.8	5.2	112.5	14.1	86.8	10.7
	2	105.4	1.9	108.7	10.1	102.2	4.1
	5	101.5	4.4	102.4	2.4	94.2	3.6
萘啶酸	1	113.7	7.2	116.5	4.0	88.0	12.6
	2	108.1	5.8	105.8	2.8	102.8	4.8
	5	109.3	7.3	102.1	1.8	103.4	4.0
奥索利酸	1	113.7	9.4	110.5	6.1	108.5	7.8
	2	114.2	6.5	115.3	5.8	101.2	6.3
	5	104.7	5.6	112.5	3.4	104.5	4.5
西诺沙星	1	108.3	7.4	111.2	7.5	93.2	13.0
	2	106.0	3.7	114.5	5.2	112.6	10.6
	5	104.9	3.4	113.0	5.3	107.8	6.7
沙拉沙星	2	116.0	3.4	112.5	5.7	93.8	6.3
	4	104.2	2.7	109.1	7.6	94.6	5.3
	10	111.5	6.0	109.1	10.1	90.1	10.4
恩诺沙星	1	114.3	6.0	118.5	9.5	108.0	10.3
	2	107.3	3.6	113.1	7.2	107.7	7.3
	5	100.8	3.7	111.4	5.6	90.7	8.6
单诺沙星	1	97.8	7.7	104.7	8.9	87.5	13.2
	2	96.8	4.3	109.3	5.8	106.5	6.5
	5	90.2	3.5	102.3	4.0	87.0	5.5
洛美沙星	1	108.8	10.8	115.8	8.8	89.3	14.0
	2	108.2	10.9	110.7	8.4	109.4	7.1
	5	108.5	4.4	100.2	3.8	100.7	2.3
氧氟沙星	1	87.8	15.1	114.8	7.5	90.8	17.0
	2	94.6	6.7	112.8	5.8	111.7	9.5
	5	93.9	4.6	96.0	4.6	93.2	7.8
环丙沙星	2.5	104.7	5.3	106.9	5.9	104.7	8.9
	5	97.9	4.6	106.2	4.8	106.3	3.3
	12.5	86.8	6.4	102.0	3.6	96.2	4.6

表 E.1 (续)

化合物	加标水平/ ( $\mu\text{R}/\text{kg}$ )	猪 肉		猪 肝		猪 肾	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
诺氟沙星	2	106.8	4.2	112.3	6.3	111.3	10.1
	4	93.6	6.6	99.6	5.5	105.8	6.6
	10	111.5	10.2	90.2	5.9	89.1	12.9
培氟沙星	2	116.9	10.3	107.8	3.7	96.3	11.5
	4	102.4	3.8	99.4	4.2	109.2	4.4
	10	104.9	11.6	106.3	6.3	87.7	10.6
吡嗪酸	2	107.4	4.1	104.5	5.8	102.2	7.5
	4	102.6	2.2	111.1	7.7	88.2	9.8
	10	92.3	14.7	104.4	5.1	88.9	10.5
依诺沙星	3	92.2	5.7	102.3	11.2	100.5	10.1
	6	102.2	3.2	105.8	3.1	113.1	6.4
	15	93.8	5.0	92.2	12.1	95.4	9.4

表 E.2 牛奶和鸡蛋中喹诺酮的回收率及相对标准偏差( $n=6$ )

化合物	加标水平/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	牛 奶		鸡 蛋	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
氟甲唑	0.5	98.7	13.2	101.8	5.8
	1	97.0	16.1	108.3	7.4
	2	96.8	5.9	100.3	3.8
萘啶酸	0.5	105.7	10.7	107.7	5.4
	1	95.3	10.5	105.8	4.3
	2	98.7	8.6	96.6	4.2
奥索利酸	0.5	103.7	16.0	90.0	9.6
	1	97.8	11.7	110.7	8.4
	2	97.1	5.1	100.3	4.2
西诺沙星	0.5	87.7	11.1	108.0	6.2
	1	88.3	10.0	105.7	7.6
	2	98.2	7.5	95.0	5.0
沙拉沙星	1	95.3	7.2	80.5	13.0
	2	98.3	3.7	110.8	6.3
	5	100.8	2.2	109.8	2.9
恩诺沙星	0.5	105.0	11.7	98.3	18.4
	1	97.3	9.7	104.0	9.1
	2	101.7	6.6	98.4	5.7

表 E.2 (续)

化合物	加标水平/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	牛 奶		鸡 蛋	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
单诺沙星	0.5	98.3	10.9	103.3	16.0
	1	98.7	11.8	106.5	13.1
	2	96.6	4.4	97.6	7.5
洛美沙星	0.5	80.7	9.2	102.7	12.9
	1	87.3	10.6	105.3	11.0
	2	90.3	3.2	96.3	9.5
氧氟沙星	0.5	109.7	9.9	101.7	15.4
	1	79.0	4.5	96.3	13.9
	2	87.6	9.1	97.1	9.2
环丙沙星	1.25	83.3	19.4	90.3	20.1
	2.5	80.5	10.1	88.4	18.9
	5.0	101.7	9.1	93.7	18.9
诺氟沙星	1	87.0	10.0	97.2	15.8
	2	83.6	4.4	96.5	11.1
	4	102.7	4.6	112.1	17.1
培氟沙星	1	94.8	12.1	90.5	20.0
	2	90.3	10.1	90.8	10.8
	4	104.4	7.8	91.6	19.4
吡哌酸	1	116.0	8.6	94.3	19.9
	2	110.8	4.5	86.1	10.3
	4	119.9	7.6	94.2	12.6
依诺沙星	1.5	87.2	13.3	95.2	14.8
	3	79.7	9.8	90.0	17.6
	6	84.3	5.3	91.1	8.3