



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 动物性食品中喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of quinolones residues in animal-derived food
by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 21312-2007《动物源性食品中14种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》，与 GB/T 21312-2007 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术内容变化如下：

a) 更改了标准适用范围，扩大至牛奶、羊奶、乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋及猪、牛、羊和家禽的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪（皮+脂肪）；

b) 更改了部分测定步骤；

c) 降低了方法的检测限和定量限，本方法在牛奶、羊奶、乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋中的检测限均为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 1 $\mu\text{g/kg}$ ；在猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪和皮+脂肪等组织中诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、氧氟沙星、恩诺沙星和环丙沙星的检测限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 1 $\mu\text{g/kg}$ ；噁喹酸、氟甲喹、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星和达氟沙星的检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

本文件及其代替文件的历次版本发布情况为：

——GB/T 21312-2007；

食品安全国家标准

动物性食品中喹诺酮类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中喹诺酮类药物残留量检测的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛、羊、牛奶及其乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋及猪、牛、羊和家禽的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪（皮+脂肪）中噁喹酸、氟甲喹、诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星、达氟沙星和环丙沙星残留量的测定。其他类型乳粉及禽蛋可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的，凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

牛、羊、牛奶及其乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋试样中残留的喹诺酮类药物，用甲酸乙腈溶液提取，亲水亲脂平衡固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液内标法定量。

肌肉、肝脏、肾脏、脂肪（皮+脂肪）试样中残留的喹诺酮类药物，用三氯乙酸-乙腈溶液提取，亲水亲脂平衡固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液内标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。

5.1.3 甲酸 (HCOOH): 色谱纯。

5.1.4 氨水 ($\text{NH}_3 \text{H}_2\text{O}$): 色谱纯。

5.1.5 三氯乙酸 (CCl_3COOH)。

5.1.6 正己烷 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$)。

5.1.7 无水硫酸钠 (Na_2SO_4)。

5.1.8 异丙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸溶液: 取甲酸 1 mL, 用水稀释至 1000 mL。

5.2.2 0.1%甲酸乙腈溶液: 取甲酸 1 mL, 用乙腈稀释至 1000 mL。

5.2.3 10%三氯乙酸溶液: 取三氯乙酸 10 g, 用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.4 2%甲酸乙腈溶液: 取甲酸 2 mL, 用乙腈稀释至 100 mL, 混匀。

5.2.5 10%三氯乙酸-乙腈溶液 (8:2, V/V): 取乙腈 20 mL、10%三氯乙酸溶液 80 mL, 混匀。

5.2.6 10%甲醇溶液: 取甲醇 10 mL, 用水稀释至 100 mL, 混匀。

5.2.7 5%甲酸甲醇溶液: 取 5 mL 甲酸, 用甲醇稀释至 100 mL, 混匀。

5.2.8 乙腈饱和正己烷溶液: 取正己烷和乙腈, 按体积比 1:1 混匀振荡, 静置分层后, 取上层正己烷液。

5.2.9 复溶液: 取 0.1%甲酸水溶液 95 mL、0.1%甲酸乙腈溶液 5 mL, 混匀, 备用。

5.3 标准品

噁喹酸、氟甲喹、诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星、达氟沙星、环丙沙星、噁喹酸-D5、氟甲喹- $^{13}\text{C}_3$ 、诺氟沙星-D5、培氟沙星-D5、盐酸洛美沙星-D5、盐酸恩诺沙星-D5、盐酸氧氟沙星-D3、盐酸沙拉沙星-D8、盐酸二氟沙星-D3、马波沙星-D8、达氟沙星-D3、盐酸环丙沙星-D8, 含量均 $\geq 92\%$, 具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液 (1 mg/mL): 取各标准品约 10 mg, 精密称定, 用 0.5 mL 氨水溶解后置于 10 mL 棕色容量瓶中, 甲醇稀释定容, -18°C 以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标标准储备液 (100 $\mu\text{g/mL}$): 取各标准品约 1.0 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 棕色容量瓶中, -18°C 以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准中间液 (10 $\mu\text{g/mL}$): 准确移取喹诺酮类药物标准储备液各 0.1 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶, 甲醇稀释定容, -18°C 以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.4.4 混合内标中间液 (1 $\mu\text{g/mL}$): 准确移取喹诺酮类药物对应同位素内标的标准储备液各 0.1 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶, 甲醇稀释定容, -18°C 以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.4.5 混合标准工作液：准确移取适量混合标准中间液，用复溶液（5.2.9）按需稀释成系列混合标准工作液，现配现用。

5.4.6 混合内标工作液：准确移取混合内标中间液适量，用复溶液（5.2.9）按需稀释成混合内标工作液，现配现用。

5.5 材料

5.5.1 反相混合型亲水亲脂通过式固相萃取小柱：PRiME HLB SPE 60 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 反相混合型亲水亲脂平衡固相萃取小柱：Poly-Sery HLB Pro SPE 200 mg/6 mL，或相当者。

5.5.3 针头式过滤器（通用型滤膜）：尼龙材质，孔径 0.22 μm ，或性能相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 组织匀浆机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 振荡器。

6.6 高速冷冻离心机：-2℃、最高转速不低于 14000 r/min。

6.7 旋转蒸发仪。

6.8 氮吹仪。

6.9 超声仪。

6.10 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，去壳，并使均质。

取适量新鲜或解冻的空白或供试奶样品，混合均匀。

取适量乳粉样品，混合均匀。

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

a) 取均质的供试样品，作为供试试样。

b) 取均质的空白样品，作为空白试样。

c) 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

奶样 4℃以下保存，乳粉常温保存，其余组织-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 牛羊奶、乳粉、禽蛋

称取试样（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中（乳粉按体积比1：6加水还原为复原乳），加入混合内标工作液，涡旋，静置15 min，加入5 g无水硫酸钠，涡旋，加入10 mL 2%甲酸乙腈溶液，涡旋，水浴超声10 min，300 r/min振荡5 min，4℃、12000 r/min离心10 min。取上清液转移至梨形瓶中，加入2 mL异丙醇于梨形瓶中，45℃旋蒸近干，取2 mL 2%甲酸乙腈溶液充分润洗梨形瓶，溶液转入15 mL离心管，加入5 mL乙腈饱和正己烷溶液，涡旋，4℃、6000 r/min离心5 min，转移下清液于另一离心管，待净化。

8.1.2 肌肉、肝脏、肾脏

称取试样（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，加入混合内标工作液，涡旋。加入10 mL 10%三氯乙酸-乙腈溶液（8：2，V/V），涡旋，300 r/min振荡5 min，水浴超声10 min，4℃、12000 r/min离心10 min，取上清液。加入10 mL乙腈饱和正己烷，涡旋，4℃、6000 r/min离心5 min，转移下清液于另一离心管，加入10 mL一级水混匀，待净化。

8.1.3 脂肪（皮+脂肪）

称取试样（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，加入混合内标工作液，涡旋。加入20 mL乙腈饱和正己烷，充分涡旋，加入10 mL 10%三氯乙酸-乙腈溶液（8：2，V/V），涡旋，4℃、6000 r/min离心5 min，除上层正己烷。-2℃、12000 r/min离心10 min，转移上清液于另一离心管，加入10 mL一级水，待净化。

8.2 净化

8.2.1 牛羊奶、乳粉、禽蛋

取待净化液全部过HLB小柱（5.5.1），收集流出液，再用3 mL 2%甲酸乙腈溶液洗脱，收集洗脱液，合并同一离心管，于45℃水浴，氮气吹至近干；加入2 mL复溶液，涡旋，超声5 min，4℃、12000 r/min离心1 min；取上清液过0.22 μ m微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.2.2 肌肉、肝脏、肾脏、脂肪（皮+脂肪）

HLB小柱（5.5.2）用3 mL甲醇活化、3 mL纯水平衡，取待净化液全部过柱，加入3 mL 10%甲醇溶液淋洗，抽干小柱中残余液体；加入5 mL 5%甲酸甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，于45℃水浴，氮气吹至近干；加入2 mL复溶液，涡旋，超声5 min，4℃、12000 r/min离心1 min；取上清液过0.22 μ m微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密吸取喹诺酮类药物混合标准工作液和混合内标工作液适量,用经提取净化后的空白样品溶液稀释配制浓度为分别为0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL,内标含量为10 ng/mL的系列基质匹配标准溶液,供液相色谱-串联质谱测定。以目标分析物与相应同位素内标物特征离子峰面积比值为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线,求线性回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈柱(50 mm × 2 mm i.d., 粒径5.0 μm)或性能相当者;
- b) 流速: 0.3 mL/min;
- c) 进样量: 3 μL;
- d) 柱温: 35°C;
- e) 流动相: A相为0.1%甲酸水溶液, B相为0.1%甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	95	5
1.0	95	5
4.0	80	20
5.0	20	80
6.5	20	80
7.0	95	5
10.0	95	5

8.4.2 串联质谱参考条件

- 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) 离子源接口温度: 300°C;
- e) 脱溶剂管温度: 530°C;
- f) 加热模块温度: 400°C;
- g) 雾化气: 3 L/min;
- h) 干燥气: 10 L/min;
- i) 加热气: 10 L/min;
- j) 定性、定量离子对和碰撞能量见表2。

表2 待测药物定性、定量离子对和碰撞能量参考值

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 CE eV
噁嗪酸	262.0>243.9	262.0>243.9	30	16
	262.0>216.0			28
氟甲喹	262.3>244.1	262.3>244.1	10	18
	262.3>201.9			33
诺氟沙星	320.1>302.0	320.1>302.0	10	21
	320.1>233.1			25
培氟沙星	334.3>316.1	334.3>316.1	13	22
	334.3>290.1			20
洛美沙星	352.0>265.0	352.0>265.0	11	24
	352.0>308.1			18
恩诺沙星	360.1>316.0	360.1>316.0	17	21
	360.1>245.1			28
氧氟沙星	362.0>318.0	362.0>318.0	19	20
	362.0>260.9			30
沙拉沙星	386.0>367.9	386.0>367.9	14	20
	386.0>342.1			21
二氟沙星	400.1>356.2	400.1>356.2	26	22
	400.1>382.1			45
马波沙星	363.0>72.1	363.0>72.1	14	23
	363.0>320.1			16
达氟沙星	358.1>82.0	358.1>82.0	24	47
	358.1>283.2			26
环丙沙星	332.0>231.1	332.0>231.1	27	39
	332.0>288.2			19
噁嗪酸-D5	267.0>249.0	267.0>249.0	10	21
氟甲喹- ¹³ C3	265.0>247.0	265.0>247.0	14	18
诺氟沙星-D5	325.1>307.2	325.1>307.2	15	22
培氟沙星-D5	339.2>321.2	339.2>321.2	14	22
洛美沙星-D5	357.2>270.1	357.2>270.1	16	25
恩诺沙星-D5	364.9>245.1	364.9>245.1	10	28
氧氟沙星-D3	365.2>261.2	365.2>261.2	13	29
沙拉沙星-D8	394.2>376.2	394.2>376.2	20	23
二氟沙星-D3	403.1>385.2	403.1>385.2	14	22
马波沙星-D8	371.0>79.1	371.0>79.1	19	25
达氟沙星-D3	361.2>85.0	361.2>85.0	13	42
环丙沙星-D8	340.30>235.10	340.30>235.10	10	38

8.4.3 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中待测组分与其对应内标的保留时间之比与基质匹配标准溶液中待测组分与其对应内标的保留时间之比偏差在 1%以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致，其允许偏差为±40%。

8.4.4 定量测定

取试样溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积定量，基质匹配标准溶液及试样溶液中喹诺酮类药物及内标的峰面积均应在仪器检测的线性范围内。对于超过标准曲线最高点浓度的样品，将样品稀释至线性范围进行定量。喹诺酮类药物及其同位素内标基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加标准溶液外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中喹诺酮类药物的残留量按标准曲线法或公式（1）计算。

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试样中喹诺酮类药物残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_{is} —试样溶液中内标的浓度，单位为微克每升（ ng/mL ）；

C_s —标准工作溶液中被测物质的浓度，单位为微克每升（ ng/mL ）；

C'_{is} —标准工作溶液中内标的浓度，单位为微克每升（ ng/mL ）；

A_i —试样溶液中被测物质的峰面积；

A_{is} —试样溶液中内标的峰面积；

A_s —标准工作溶液中被测物质的峰面积；

A'_{is} —标准工作溶液中内标的峰面积；

V —溶解残余物复溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试样质量的数值，单位为克（ g ）。

注：计算结果不小于 $1 \mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1 \mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛奶、羊奶、乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋中的检出限均为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ ；在猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪（皮+脂肪）中诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、氧氟沙

星、恩诺沙星和环丙沙星的检测限均为0.5 µg/kg，噁嗪酸、氟甲喹、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星和达氟沙星的检出限均为2 µg/kg。

本方法在牛奶、羊奶、乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋中的定量限均为1 µg/kg；在猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪和皮+脂肪中诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、氧氟沙星、恩诺沙星和环丙沙星的定量限均为1 µg/kg，噁嗪酸、氟甲喹、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星和达氟沙星的定量限均为5 µg/kg。

10.2 正确度

本方法在牛奶、羊奶、乳粉、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋1 µg/kg~100 µg/kg添加浓度的回收率为60%~120%；诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星和氧氟沙星在猪、鸡、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪和皮+脂肪1 µg/kg~100 µg/kg添加浓度的回收率为60%~120%，恩诺沙星和环丙沙星在1 µg/kg~300 µg/kg添加浓度的回收率为60%~120%，噁嗪酸、氟甲喹、沙拉沙星、二氟沙星、马波沙星和达氟沙星在5 µg/kg~300 µg/kg添加浓度的回收率为60%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤20%。

附 录 A

(资料性)

喹诺酮类药物及其同位素内标物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

喹诺酮类药物及其同位素内标物中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表 A.1。

表A.1 喹诺酮类药物及其同位素内标物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

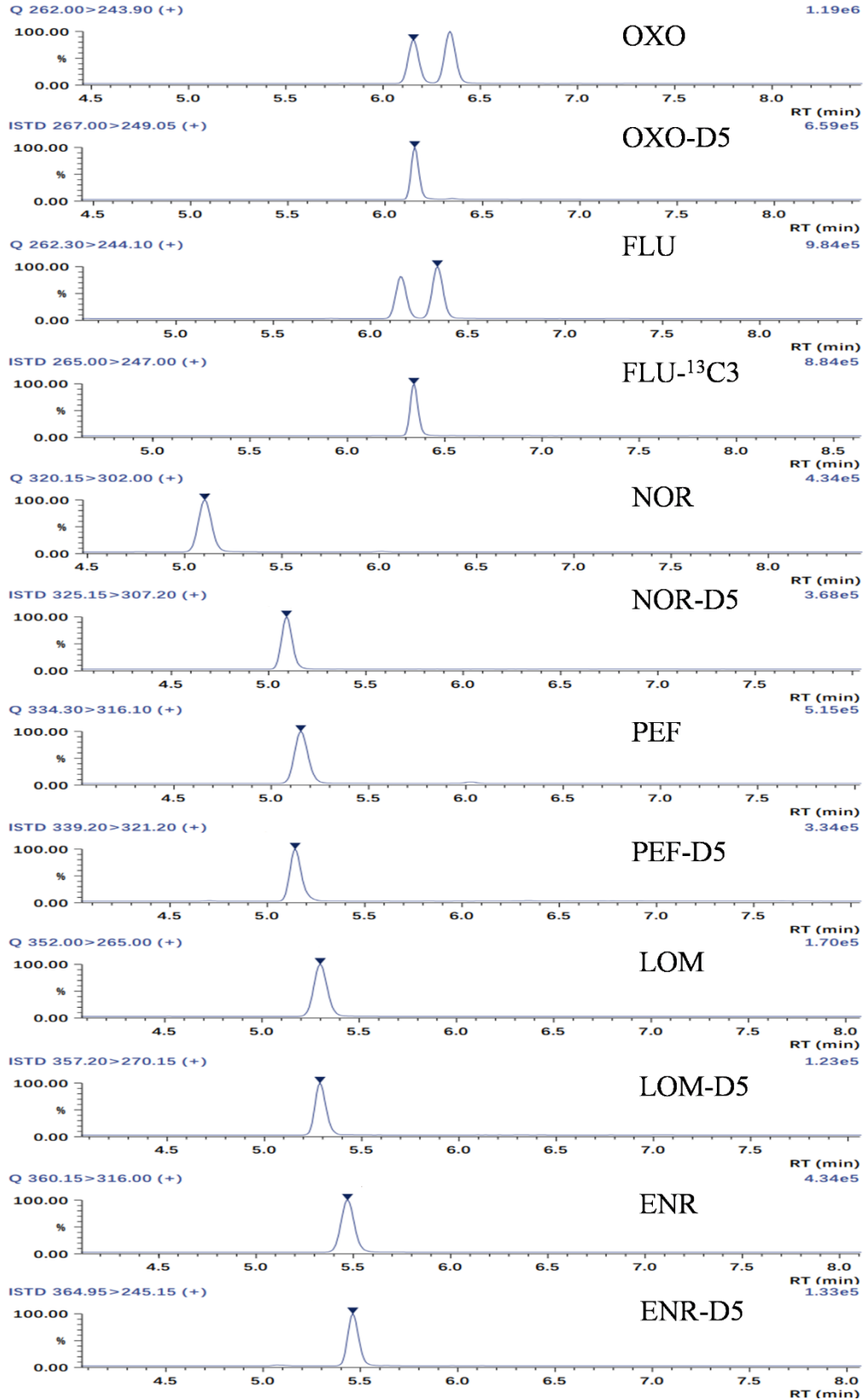
化合物名称	英文通用名称	化学分子式	CAS号	含量 (%)
噁喹酸	Oxolinic Acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	14698-29-4	98.2
氟甲喹	Flumequine	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	42835-25-6	99.3
诺氟沙星	Norfloxacin	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	70458-96-7	99.8
培氟沙星	Pefloxacin	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	70458-92-3	92.1
洛美沙星	Lomefloxacin	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	98079-51-7	99.4
恩诺沙星	Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	93106-60-6	99.4
氧氟沙星	Ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	82419-36-1	99.3
沙拉沙星	Sarafloxacin	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	98105-99-8	98.0
二氟沙星	Difloxacin	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	98106-17-3	96.1
马波沙星	Marbofloxacin	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	115550-35-1	99.9
达氟沙星	Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	112398-08-0	99.0
环丙沙星	Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₂₁ ClFN ₃ O ₄	85721-33-1	92.3
噁喹酸-D5	Oxolinic acid-D5	C ₁₃ H ₆ D ₅ NO ₅	1189890-98-9	99.5
氟甲喹- ¹³ C3	Flumequine- ¹³ C3	C ₁₁ ¹³ C ₃ H ₁₂ FNO ₃	1185049-09-5	99.1
诺氟沙星-D5	Norfloxacin-D5	C ₁₇ D ₈ H ₁₀ FN ₃ O ₃ ·HCl	1216659-54-9	98.0
培氟沙星-D5	Pefloxacin-D5	C ₁₇ H ₂₀ N ₃ O ₃ F	1228182-51-1	98.0
盐酸洛美沙星-D5	Lomefloxacin-D5 Hydrochloride	C ₁₇ H ₁₄ D ₅ F ₂ N ₃ O ₃ ·HCl	98079-52-8	99.4
盐酸恩诺沙星-D5	Enrofloxacin-D5 Hydrochloride	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃ ·HCl	1173021-92-5	98.0
盐酸氧氟沙星-D3	Ofloxacin-D3 Hydrochloride	C ₁₈ H ₁₈ ClD ₃ FN ₃ O ₄ ·HCl	1173021-78-7	99.4
盐酸沙拉沙星-D8	Sarafloxacin-D8 Hydrochloride	C ₂₀ H ₉ D ₈ F ₂ N ₃ O ₃ · HCl	1352879-52-7	98.0
盐酸二氟沙星-D3	Difloxacin-D3 Hydrochloride	C ₂₁ H ₂₀ ClF ₂ N ₃ O ₃ ·HCl	1173021-89-0	98.0
马波沙星-D8	Marbofloxacin-D8	C ₁₇ H ₁₁ D ₈ FN ₄ O ₄	1185053-37-5	99.7
达氟沙星-D3	Danofloxacin-D3	C ₁₉ H ₁₇ D ₃ FN ₃ O ₃	1217683-55-0	98.0
盐酸环丙沙星-D8	Ciprofloxacin-D8 Hydrochloride	C ₁₇ D ₈ H ₁₀ FN ₃ O ₃ · HCl	1216659-54-9	98.0

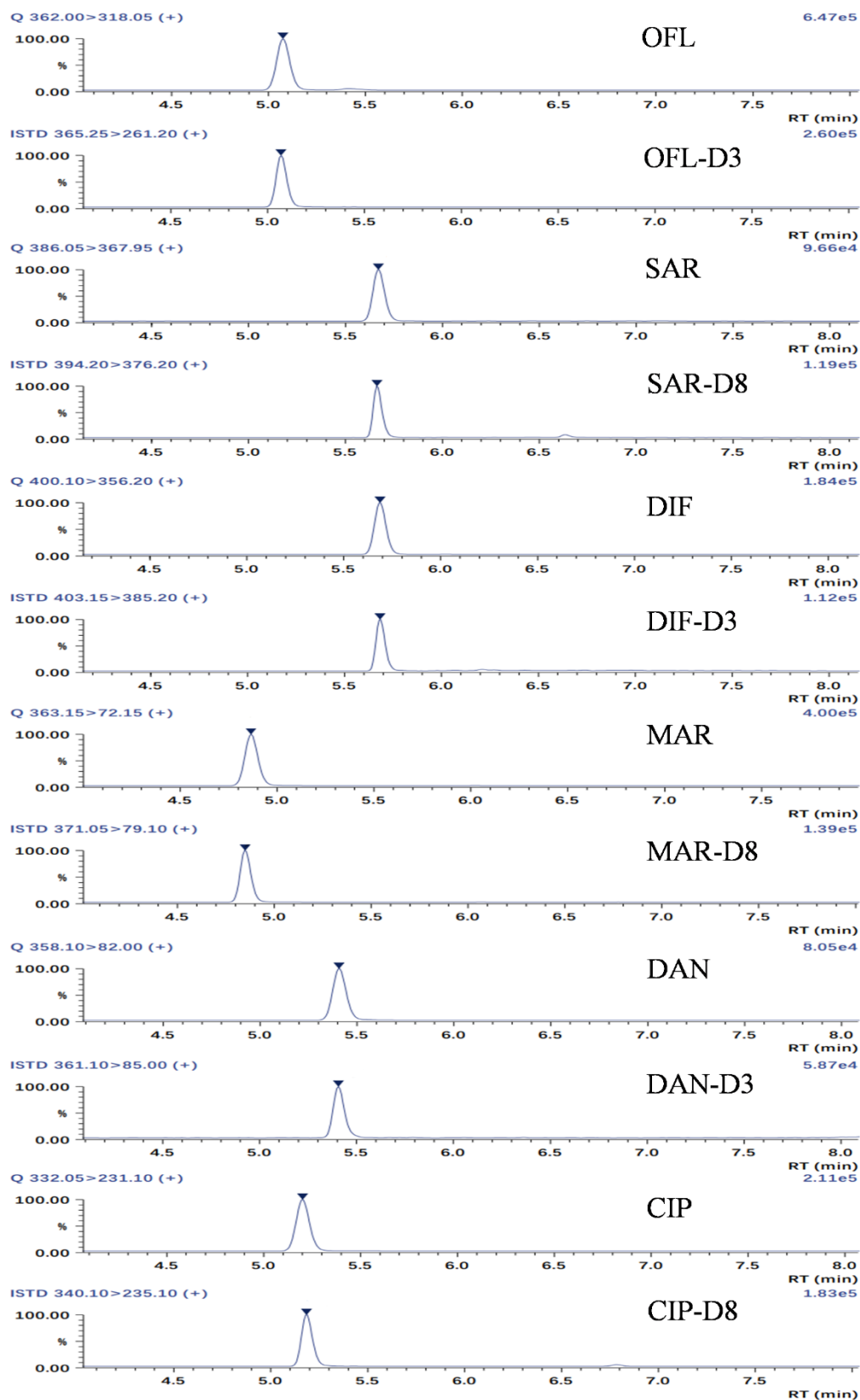
附录 B

(资料性)

喹诺酮类药物及其同位素内标物特征离子质量色谱图

喹诺酮类药物及其同位素内标物特征离子质量色谱图 B.1。





图B.1 喹诺酮类药物及其同位素内标标准溶液特征离子质量色谱图 (10 ng/mL)