

# DB4107

新 乡 市 地 方 标 准

DB 4107/T 434—2019

---

## 鸡蛋中四种氟喹诺酮类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法

Determination of quinolones residues in muscle of egg

by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019 - 10 - 12 发布

2019 - 11 - 01 实施

---

新乡市市场监督管理局 发布

## 前 言

本标准依据GB/T 21312-2007 的要求，根据新乡市生产实际而制定。

本标准附录A为资料性附录。

本标准由新乡市农业农村局、新乡市市场监督管理局提出。

本标准起草单位：新乡市畜产品质量监测检验中心、辉县市农业农村局。

本标准主要起草人：李杰、高素敏、常守海、姚型鑫、王永梅。

本标准于2019年10月12 日首次发布。

# 鸡蛋中四种氟喹诺酮类药物残留检测液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本标准规定了鸡蛋中恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星及达氟沙星单个或混合药物残留的制样、超高效液相色谱-串联质谱法的原理、试剂和溶液、仪器与设备、方法步骤、仪器参数与测定、方法灵敏度和精密度。

本标准适用于鸡蛋中的恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星及达氟沙星单个或混合药物残留量的检测。

## 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

农牧发(2003)1号 兽药残留试验技术规范(试行)

## 3 制样

### 3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试样品,搅拌并使均匀。

### 3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

## 4 原理

供试样品中残留的喹诺酮类药物经磷酸盐缓冲液提取后,经HLB固相萃取柱去除杂质,浓缩后供液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量测定。

## 5 试剂和溶液

除非另有规定,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂盒符合GB/T 6682规定的一级用水。

5.1 恩诺沙星 : enrofloxacin, CAS:93106-60-6 中国兽医药品监察所。

5.2 环丙沙星 : ciprofloxacin, CAS:85721-33-1 中国兽医药品监察所。

5.3 沙拉沙星 : sarafloxacin, CAS:98105-99-8 中国兽医药品监察所。

5.4 达氟沙星 : danofloxacin, CAS:74011-58-8 中国兽医药品监察所。

- 5.5 摩尔数计数： $13.6/136.09/1000 \text{ mL}=0.1 \text{ mol/L}$ 。
- 5.6 氢氧化钠溶液（ $5.0 \text{ mol/L}$ ）：取氢氧化钠 20 g 或饱和溶液 28 mL，加水稀释至 100 mL。
- 5.7 氢氧化钠溶液（ $0.03 \text{ mol/L}$ ）：取氢氧化钠溶液  $5.0 \text{ mol/L}$  0.6 mL，加水稀释至 100 mL。
- 5.8 磷酸盐缓冲液  $0.1 \text{ mol/L}$ （提取液）：取磷酸二氢钾 6.8 g，加水溶解并稀释至 500 mL（ $\text{pH}\approx 4.4$ ），用  $5.0 \text{ mol/L}$  氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0。
- 5.9 磷酸二氢钾：分析纯。
- 5.10 磷酸/三乙胺（ $0.05 \text{ mol/L}$ ）：取 85%磷酸 3.4 mL，用水稀释至 1000 mL（ $\text{pH}\approx 1.7$ ），用三乙胺调节 pH 值至 2.4。
- 5.11 洗脱液： $0.05 \text{ mol/L}$  磷酸溶液/三乙胺-乙腈（80+25）
- 5.12 乙腈：色谱纯。
- 5.13 正己烷：分析纯。
- 5.14 甲酸：分析纯。
- 5.15 HLB 固相萃取柱：规格 60 mg，3 mL。
- 5.16 微孔滤头：孔径  $0.22 \mu\text{m}$ 。
- 5.17 喹诺酮类药物标准储备液：分别称取恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星标准品各 0.0100 g，精密称定，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  $1 \text{ mg/mL}$ ， $-20^\circ\text{C}$  保存，可保存 3 个月。
- 5.18 喹诺酮类药物混合标准工作液：准确量取喹诺酮类药物标准储备液各 0.1 mL，置 10.0 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释混匀，定容至刻度，浓度分别为  $10 \mu\text{g/mL}$  的混合标准工作液。

## 6 仪器与设备

- 6.1 液相色谱—串联质谱仪：美国 Waters 公司 Waters Acquity UPLC-Xevo TQ-S。
- 6.2 天平：感量 0.01 g。
- 6.3 分析天平：感量 0.00001 g。
- 6.4 酸度计（0.01）
- 6.5 涡旋混合器
- 6.6 振荡器
- 6.7 低温离心机
- 6.8 氮吹仪
- 6.9 固相萃取装置

## 7 方法步骤

### 7.1 试料的制备

试料的制备包括：取搅拌均匀后的供试样品，作为供试试料；取搅拌均匀后的空白样品，作为空白试料；取搅拌均匀后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

### 7.2 提取

称取 $(2 \pm 0.02)$  g匀质样品，置于50 mL离心管内，加入磷酸缓冲液18.0 mL，涡旋混匀，中速振荡30 min，14000 r/min离心10 min，倾取上清液，往上清液中加入10 mL正己烷（脱脂），涡旋混匀，中速振荡2 min，14000 r/min离心5 min，取下清液10 mL待净化。

### 7.3 净化

7.3.1 HLB 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、再加磷酸盐缓冲液 3 mL 预洗。

7.3.2 鸡蛋下层提取液 10 mL 过柱。

7.3.3 用 3 mL 水淋洗，挤干。

7.3.4 洗脱液 2.0 mL 洗脱，挤干，混匀，过滤。待上机。

### 7.4 标准工作液的制备

准确吸取浓度为1000 ng/mL的喹诺酮类药物混合标准溶液0.01 mL，加入空白洗脱液中，同样品同步处理，即工作液。

## 8 仪器参数与测定

### 8.1 色谱条件

8.1.1 色谱柱：Waters Acquity BEH C18 (2.1 mm×50mm, 1.7 $\mu$ m)

8.1.2 柱温：30 °C

8.1.3 流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱（梯度洗脱程序见表1）

表1 色谱梯度洗脱程序

时间(min)	流速(mL/min)	A%	B%	曲线类型
/	0.3	10	90	/
4	0.3	30	70	6
9	0.3	10	90	1

注：1为即时变化，6为线性变化。

8.1.4 进样量：2 $\mu$ L

## 8.2 质谱条件

8.2.1 离子源：电喷雾 ESI+

8.2.2 扫描方式：正离子扫描

8.2.3 采集模式：多反应监测 MRM；

8.2.4 毛细管电压：3.3 kV；

8.2.5 锥孔电压：25.00 V；

8.2.6 离子源温度：150 ℃；

8.2.7 雾化温度：500 ℃；

8.2.8 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞电压见表 2。

表2 喹诺酮类定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞电压

目标化合物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
恩诺沙星	360.3>316.4	360.3>316.4	38.0	19.0
	360.3>342.3			23.0
环丙沙星	332.2>314.3	332.2>314.3	36.0	19.0
	332.2>288.3			17.0
沙拉沙星	386.3>342.3	386.3>342.3	40.0	18.0
	386.3>299.3			28.0
达氟沙星	358.3>340.3	358.3>340.3	38.0	25.0
	358.3>82.0			42.0

注：准确质量数在每次实验前进行调谐确认。

## 8.3 测定法

### 8.3.1 进样顺序

- a) 试剂空白进 1 针；
- b) 标准工作液进 3 针，其 RSD<10%；
- c) 试剂空白进 1 针；
- d) 样品空白进 1 针；
- e) 样品 1-1 进 1 针；
- f) 样品 1-2 进 1 针……
- g) 样品 4-1 进 1 针；

- h) 样品 4-2 进 1 针；
- i) 阳性添加各进 1 针；
- j) 标准工作液进 2 针……

### 8.3.2 定性需同时满足下列条件：

- a) 试剂空白和样品空白不能出现与阳性添加相同的离子峰；
- b) 所有离子色谱峰的信噪比(S/N)都在 3:1 以上，信噪比以峰对峰(PtP)计算；
- c) 试样色谱峰的相对保留时间，应与标准溶液的相对保留时间一致，容许偏差为±2.5%；
- d) 检测到的离子的相对丰度与标准溶液的相对丰度一致，容许偏差符合表 4 的要求。响应弱的离子与响应强的离子丰度比即为相对丰度。

表 4 试样溶液中离子丰度比的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

### 8.3.3 定量方法

采用单点校准，按外标法以峰面积比计算，即得。

### 8.4 结果计算

按下式计算供试组织中喹诺酮类药物的残留量 (μg/kg)：

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \times n$$

式中：

X——试料中喹诺酮类的残留量(μg/kg)；

A——试样溶液中喹诺酮类的峰面积；

A<sub>s</sub>——标准工作液中喹诺酮的峰面积；

C<sub>s</sub>——标准工作液中喹诺酮的浓度(ng/mL)；

V——样品定容体积(mL)；

m——供试试料的称样量(g)；

n——试样溶液稀释倍数。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

## 9 方法灵敏度和精密度

### 9.1 灵敏度

恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星在鸡蛋中的检测限为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 9.2 准确度

本方法回收率为 60%~120%。

### 9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

---