



中华人民共和国国家标准

GB 31657.2—2021

代替 GB/T 20757—2006、GB/T 23411—2009、GB/T 23412—2009

食品安全国家标准 蜂产品中喹诺酮类药物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法

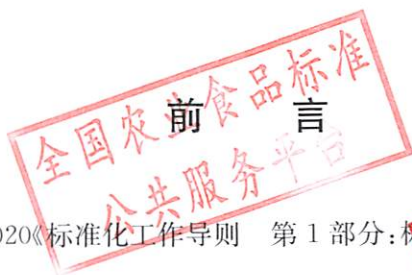
National food safety standard—
Determination of quinolones residues in bee products by
liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2021-09-16 发布

2022-02-01 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 发布
国家市场监督管理总局



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

本文件代替 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》、GB/T 23411—2009《蜂王浆中 17 种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》、GB/T 23412—2009《蜂蜜中 19 种喹诺酮类药物残留量的测定方法 液相色谱-质谱/质谱法》，与 GB/T 20757—2006、GB/T 23411—2009、GB/T 23412—2009 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要变化如下：

- a) 文本格式修订为食品安全国家标准文本格式；
- b) 适用范围扩大至蜂蜜和蜂王浆中噁喹酸、萘啶酸、氟甲喹、西诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、洛美沙星、培氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、依诺沙星、达氟沙星、马波沙星、氟罗沙星、加替沙星、奥比沙星、吡哌酸和司帕沙星等 20 种喹诺酮类药物的检测（见 1，GB/T 20757—2006 的 1，GB/T 23411—2009 的 1，GB/T 23412—2009 的 1）；
- c) 改变了前处理方法（见 8.1 和 8.2，GB/T 20757—2006 的 7.1 和 7.2，GB/T 23411—2009 的 7.1，GB/T 23412—2009 的 7.1）；
- d) 方法检测限降低为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限降低为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （见 10.1，GB/T 20757—2006 的 1，GB/T 23411—2009 的 9，GB/T 23412—2009 的 9）。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 20757—2006；
- GB/T 23411—2009；
- GB/T 23412—2009。

食品安全国家标准

蜂产品中喹诺酮类药物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂蜜和蜂王浆中喹诺酮类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中噁喹酸、萘啶酸、氟甲喹、西诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、洛美沙星、培氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、依诺沙星、达氟沙星、马波沙星、氟罗沙星、加替沙星、奥比沙星、吡哌酸和司帕沙星单个或多个药物残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 术语与定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的喹诺酮类药物经磷酸盐缓冲液提取，HLB固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准曲线校正，外标法定量。

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 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.3 甲酸(CHOOH):色谱纯。

5.1.4 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)。

5.1.5 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.6 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.7 磷酸(H_3PO_4)。

5.2 溶液配制

5.2.1 磷酸盐缓冲液:取磷酸氢二钠 7.16 g、磷酸二氢钠 3.12 g,加水 800 mL 使溶解,用磷酸调 pH 至 3.0 ± 0.05 ,用水稀释至 1 000 mL。

5.2.2 5%甲酸甲醇溶液:取甲酸 5 mL,加甲醇 95 mL,混匀。

5.2.3 0.1%甲酸溶液:取甲酸 0.5 mL,加水稀释至 500 mL,混匀。

5.2.4 20%乙腈甲酸溶液:取乙腈 20 mL,加入 0.1%甲酸溶液 80 mL,混匀。

5.3 标准品

噁喹酸、氟甲喹、西诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、洛美沙星、培氟沙星、诺氟沙星、

环丙沙星、萘啶酸、依诺沙星、达氟沙星、马波沙星、氟罗沙星、加替沙星、奥比沙星、吡哌酸和司帕沙星,含量均 $\geq 95\%$,具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(1 mg/mL):取噁喹酸、氟甲喹、西诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、洛美沙星、培氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、萘啶酸、依诺沙星、达氟沙星、马波沙星、氟罗沙星、加替沙星、奥比沙星、吡哌酸和司帕沙星对照品各 10 mg,精密称定,用 0.5 mL 氨水溶解后,用甲醇稀释定容至 10 mL 容量瓶,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):准确量取上述标准储备液各 1 mL,于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 HLB 固相萃取柱¹⁾:200 mg/6 mL,或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜:0.22 μm 。

5.5.3 玻璃纤维滤纸:1.6 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 高速冷冻离心机:转速可达 20 000 r/min。

6.6 超声波清洗机。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂产品,将其搅拌均匀。对有结晶的蜂蜜样品,在密闭情况下,置于不超过 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中解晶,待样品全部融化后搅匀,冷却至室温。制备好的试料置于样品瓶中,密封,并做上标记。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

蜂蜜样品于室温下避光保存;蜂王浆样品于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 蜂蜜

取试料 2 g(准确至 $\pm 0.02\text{ g}$),于 50 mL 聚丙烯离心管中,加磷酸盐缓冲液 20 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

1) 此处列出 HLB 固相萃取柱仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的固相萃取柱。

8.1.2 蜂王浆

取试料 2 g(准确至 ± 0.02 g),于 50 mL 聚丙烯离心管中,加磷酸盐缓冲液 10 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,4℃下 10 000 r/min 离心 10 min,移取上清液至另一离心管。残渣加磷酸盐缓冲液 10 mL 重复提取,合并 2 次上清液,玻璃纤维滤纸过滤,备用。

8.2 净化

HLB 固相萃取柱分别用甲醇 10 mL、水 10 mL 活化,备用液过柱,用水 5 mL 淋洗,抽干,依次用 5% 甲酸甲醇和乙酸乙酯各 4 mL 洗脱,抽干,收集洗脱液,40℃氮气吹干。用 20%乙腈甲酸水溶液 1.00 mL 溶解残余物,超声 1 min,涡旋混匀(蜂王浆样品溶液需在 4℃下 20 000 r/min 离心 10 min),上清液过微孔尼龙滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

准确量取混合标准工作液适量,用 20%乙腈甲酸水溶液稀释,配制成浓度为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 的系列标准溶液,各取 1.00 mL,分别加于经提取、净化步骤处理的空白试料中,溶解残余物(蜂王浆基质匹配标准溶液需在 4℃下 20 000 r/min 离心 10 min),上清液过微孔尼龙滤膜后,供液相色谱-串联质谱测定。以各药物特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μ m),或相当者;
- 柱温:35℃;
- 进样量:10 μ L;
- 流速:0.3 mL/min;
- 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为甲醇,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	95	5
1.5	80	20
4.5	60	40
6.5	5	95
7.5	5	95
7.6	95	5
10.0	95	5

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测;
- 毛细管电压:1.0 kV;
- 源温:150℃;
- 雾化温度:500℃;
- 锥孔气流速:50 L/h;
- 雾化气流速:1 000 L/h;
- 测试药物保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 2。

表2 喹诺酮类药物的保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值

药物	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
噻啉酸	4.56	262.03>159.98	262.03>159.98	2	34
		262.03>215.88			28
氟甲唑	5.71	262.05>202.00	262.05>202.00	4	30
		262.05>126.00			42
西诺沙星	4.10	263.03>188.98	263.03>188.98	4	24
		263.03>217.00			20
二氟沙星	3.30	400.11>356.07	400.11>356.07	42	18
		400.11>299.03			26
沙拉沙星	3.45	386.09>299.02	386.09>299.02	28	24
		386.09>342.06			16
氧氟沙星	2.73	362.11>261.07	362.11>261.07	4	24
		362.11>318.08			18
恩诺沙星	3.00	360.13>316.10	360.13>316.10	38	16
		360.13>245.06			24
洛美沙星	3.19	352.11>265.06	352.11>265.06	38	20
		352.11>308.09			16
培氟沙星	2.73	334.12>290.10	334.12>290.10	26	16
		334.12>316.09			20
诺氟沙星	2.85	320.10>233.04	320.10>233.04	14	22
		320.10>276.08			14
环丙沙星	2.97	332.10>231.01	332.10>231.01	2	30
		332.10>288.08			16
萘啶酸	5.58	233.05>214.98	233.05>214.98	2	14
		233.05>186.96			24
依诺沙星	2.75	321.16>303.10	321.16>303.10	4	18
		321.16>232.04			32
达氟沙星	3.10	358.18>340.13	358.18>340.13	48	22
		358.18>82.08			38
马波沙星	2.46	363.17>72.05	363.17>72.05	6	18
		363.17>320.08			14
氟罗沙星	2.54	370.16>326.16	370.16>326.16	8	18
		370.16>269.04			24
加替沙星	3.71	376.19>261.10	376.19>261.10	46	28
		376.19>332.19			16
奥比沙星	3.20	396.18>352.13	396.18>352.13	4	16
		396.18>295.09			22
吡哌酸	2.32	303.97>189.05	303.97>189.05	38	30
		303.97>217.07			20
司帕沙星	3.97	393.01>349.08	393.01>349.08	32	18
		393.01>292.07			24

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中喹诺酮类药物峰的保留时间与基质匹配标准溶液相应峰的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质匹配标准溶液,作单点或多点校准,以特征离子质量色谱峰面积定量,按外标法计算。基质匹配标准工作液及试料溶液中的喹诺酮类药物响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,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

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中喹诺酮类药物残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——试料中相应的喹诺酮类药物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 C_s ——基质标准溶液中相应的喹诺酮类药物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 A_s ——基质标准溶液中相应的喹诺酮类药物峰面积;
 A ——试料溶液中相应的喹诺酮类药物峰面积;
 V ——溶解残余物溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
 m ——试料质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

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

附 录 A

(资料性)

喹诺酮类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

喹诺酮类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 喹诺酮类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

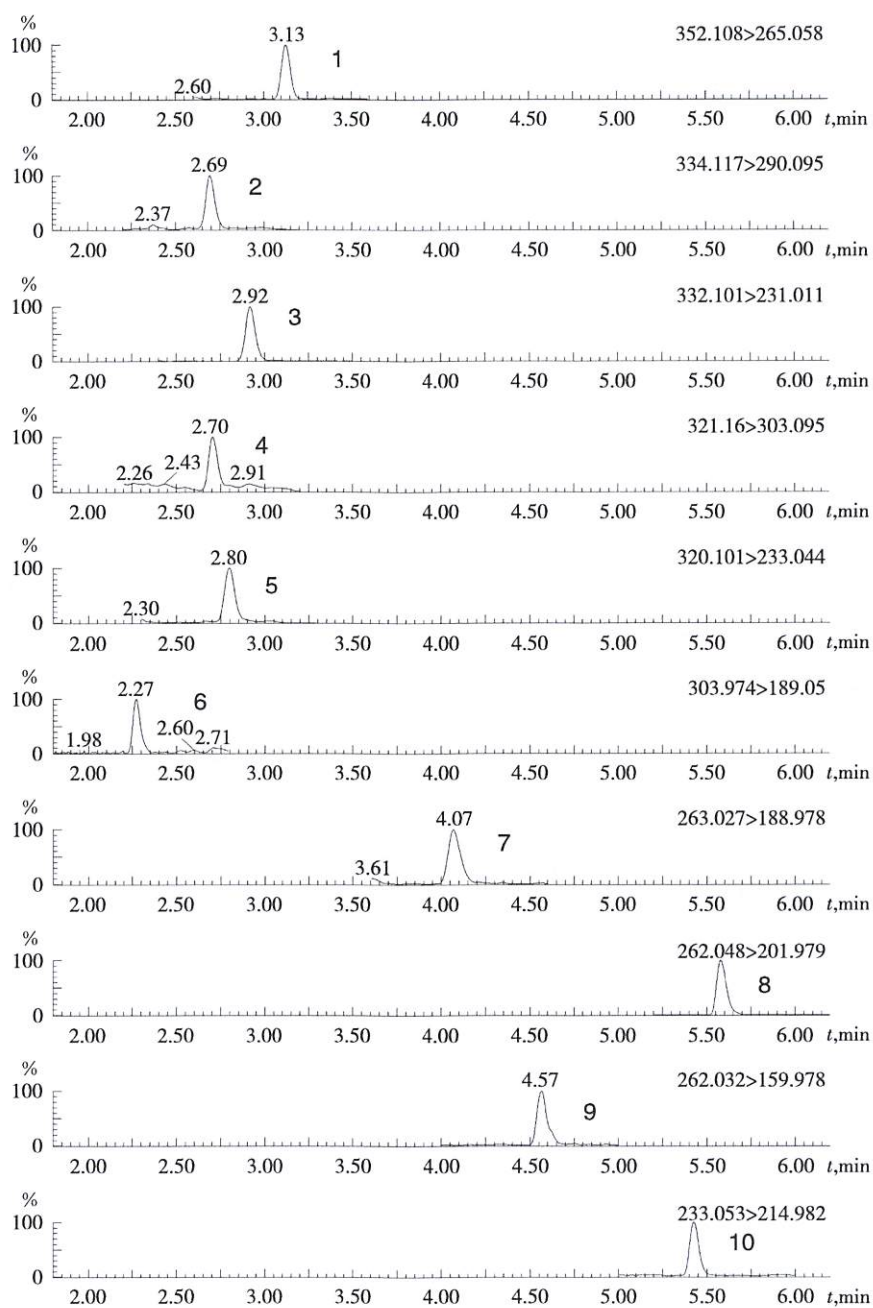
化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
噁唑酸	Oxolinic acid	$C_{13}H_{14}NO_5$	14698-29-4
氟甲喹	Flumequine	$C_{12}H_{12}FNO_3$	42835-25-6
西诺沙星	Cinoxacin	$C_{12}H_{10}N_2O_5$	28657-80-9
二氟沙星	Difloxacin	$C_{15}H_{10}F_2N_2O_3$	98106-17-3
沙拉沙星	Sarafloxacin	$C_{20}H_{14}F_3N_3O_3$	98105-99-8
氧氟沙星	Ofloxacin	$C_{18}H_{16}FN_2O_3$	82419-36-1
恩诺沙星	Enrofloxacin	$C_{19}H_{15}FN_3O_3$	93106-60-6
洛美沙星	Lomefloxacin	$C_{17}H_{14}F_2N_2O_3$	98079-51-7
培氟沙星	Pefloxacin	$C_{17}H_{14}FN_2O_3$	70458-92-3
诺氟沙星	Norfloxacin	$C_{16}H_{13}FN_2O_3$	70458-96-7
环丙沙星	Ciprofloxacin	$C_{18}H_{16}FN_2O_3$	85721-33-1
萘啶酸	Nalidixic acid	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	389-08-2
依诺沙星	Enoxacin	$C_{17}H_{17}FN_2O_3$	74011-58-8
达氟沙星	Danofloxacin	$C_{19}H_{19}FN_3O_3$	112398-08-0
马波沙星	Marbofloxacin	$C_{18}H_{19}FN_2O_3$	115550-35-1
氟罗沙星	Fleroxacin	$C_{17}H_{18}F_3N_3O_3$	79660-72-3
加替沙星	Gatifloxacin	$C_{19}H_{17}FN_3O_3$	112811-59-3
奥比沙星	Orbifloxacin	$C_{19}H_{17}F_2N_3O_3$	113617-63-3
吡哌酸	Pipemidic acid	$C_{14}H_{17}N_2O_3$	51940-44-4
司帕沙星	Sparfloxacin	$C_{16}H_{15}F_2N_2O_3$	111542-93-9

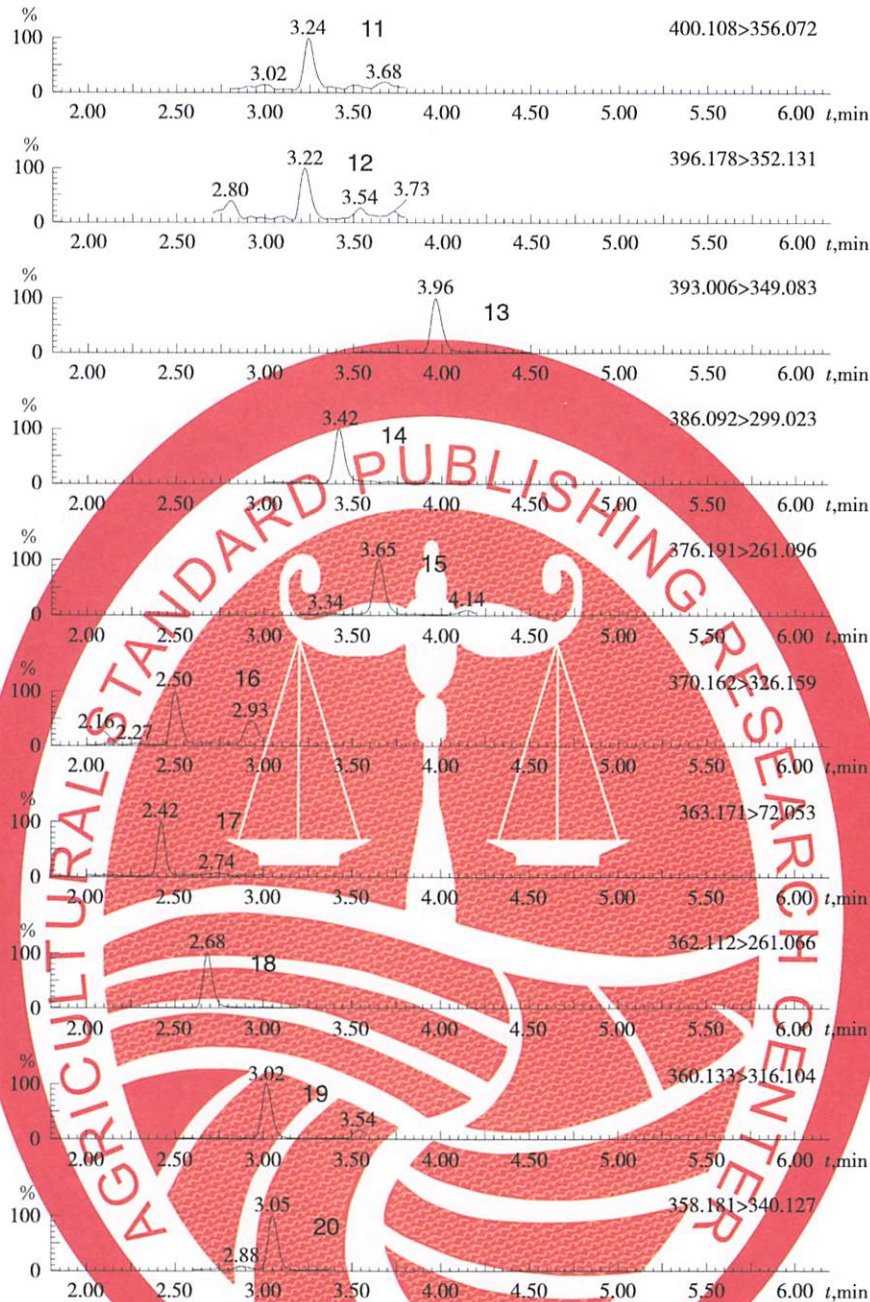
附录 B

(资料性)

喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图

喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 B.1。



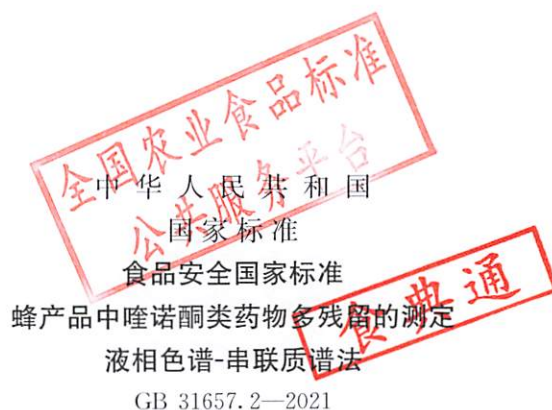


标引序号说明:

- 1——洛美沙星特征离子质量色谱图(352.11 > 265.06);
- 2——培氟沙星特征离子质量色谱图(334.12 > 290.10);
- 3——环丙沙星特征离子质量色谱图(332.10 > 231.01);
- 4——依诺沙星特征离子质量色谱图(321.16 > 303.10);
- 5——诺氟沙星特征离子质量色谱图(320.10 > 233.04);
- 6——吡哌酸特征离子质量色谱图(303.97 > 189.05);
- 7——西诺沙星特征离子质量色谱图(263.03 > 188.98);
- 8——氟甲唑特征离子质量色谱图(262.05 > 202.00);
- 9——噻唑酸特征离子质量色谱图(262.03 > 159.98);
- 10——茶啉酸特征离子质量色谱图(233.05 > 214.98);
- 11——二氟沙星特征离子质量色谱图(400.11 > 356.07);
- 12——奥比沙星特征离子质量色谱图(396.18 > 352.13);
- 13——司帕沙星特征离子质量色谱图(393.01 > 349.08);
- 14——沙拉沙星特征离子质量色谱图(386.09 > 299.02);
- 15——加替沙星特征离子质量色谱图(376.19 > 261.10);
- 16——氟罗沙星特征离子质量色谱图(370.16 > 326.16);

- 17——马波沙星特征离子质量色谱图(363.17>72.05);
18——氧氟沙星特征离子质量色谱图(362.11>261.07);
19——恩诺沙星特征离子质量色谱图(360.13>316.10);
20——达氟沙星特征离子质量色谱图(358.18>340.13)。

图 B.1 蜂王浆中喹诺酮类药物基质匹配标准溶液特征离子色谱图(2 µg/L)



蜂产品中喹诺酮类药物多残留的测定
液相色谱-串联质谱法

GB 31657.2—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8751

定价: 32.00 元



GB 31657.2—2021

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261