



中华人民共和国国家标准

GB 31658.17—2021

食品安全国家标准

动物性食品中四环素类、磺胺类和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 tetracyclines, sulfonamides and fluoroquinolones residues in animal derived food 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

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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中四环素类、磺胺类和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四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛、羊、猪和鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织中四环素类(四环素、金霉素、土霉素、多西环素)、磺胺类(乙酰磺胺、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲噁唑、磺胺二甲异噁唑、磺胺甲噁二唑、苯甲酰磺胺、磺胺二甲异嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑)和喹诺酮类(诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、麻保沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸、氟甲喹)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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物,用 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液提取,亲水亲脂平衡型固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量。

5 试剂与材料

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(CH₃CN):色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH₃OH):色谱纯。
- 5.1.3 乙酸乙酯(C₄H₈O₂):色谱纯。
- 5.1.4 甲酸(HCOOH):色谱纯。
- 5.1.5 乙二胺四乙酸二钠·二水(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O)。
- 5.1.6 浓氨水(NH₃H₂O)。
- 5.1.7 磷酸氢二钠·十二水(Na₂HPO₄·12H₂O)。
- 5.1.8 磷酸二氢钠·二水(NaH₂PO₄·2H₂O)。
- 5.1.9 柠檬酸·一水(C₆H₈O₇·H₂O)。
- 5.1.10 氢氧化钠(NaOH)。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液:取磷酸二氢钠·二水 7.8 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.2.2 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液:取磷酸氢二钠·十二水 17.9 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.2.3 磷酸盐缓冲液:取 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液 190 mL,用 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液稀释至 1 000 mL。
- 5.2.4 1 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 4 g,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 5.2.5 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液:取 1 mol/L 氢氧化钠溶液 3 mL,用水稀释至 100 mL。
- 5.2.6 Mcllvaine- Na_2 EDTA 缓冲液:取柠檬酸·一水 12.9 g、磷酸氢二钠·十二水 10.9 g、乙二胺四乙酸二钠·二水 39.2 g,加水 900 mL,用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 至 5.0 ± 0.2 ,用水稀释至 1 000 mL。
- 5.2.7 洗脱液:取甲醇 150 mL,加乙酸乙酯 150 mL、浓氨水 6 mL,混匀。
- 5.2.8 复溶液:取水 40 mL,加甲醇 5 mL、乙腈 5 mL、甲酸 0.05 mL,混匀。

5.3 标准品

- 5.3.1 四环素类:四环素、金霉素、土霉素、多西环素含量均 $\geq 95.0\%$ 。具体见附录 A。
- 5.3.2 磺胺类:乙酰磺胺、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲嘧啶、磺胺二甲异噁唑、磺胺甲噻二唑、苯甲酰磺胺、磺胺二甲异嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑含量均 $\geq 95.0\%$ 。具体见附录 A。
- 5.3.3 喹诺酮类:诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、麻保沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁唑酸、氟甲喹含量均 $\geq 95.0\%$ 。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):取标准品各适量(相当于各活性成分约 10 mg),精密称定,于 10 mL 容量瓶中,四环素类、磺胺类药物加甲醇溶解并稀释至刻度;喹诺酮类药物加 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度,配制成浓度均为 1 mg/mL 的标准储备液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期 6 个月。
- 5.4.2 混合标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):分别取 1 mg/mL 的标准储备液各 0.1 mL,于 10 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。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期 1 个月。
- 5.4.3 混合标准工作液(1 $\mu\text{g/mL}$):精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期 1 个月。
- 5.4.4 混合标准工作液(0.1 $\mu\text{g/mL}$):精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液 0.1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 亲水亲脂平衡型固相萃取柱:200 mg/6 mL,或相当者。
- 5.5.2 微孔尼龙滤膜:0.22 μm 。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.3 高速冷冻离心机: $-2\text{ }^\circ\text{C}$ 、14 000 r/min。
- 6.4 组织匀浆机。
- 6.5 涡旋混合器。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 氮吹仪。
- 6.8 超声波清洗仪。

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组织,绞碎,并使均质。

- 取均质后的供试样品,作为供试试料;
- 取均质后的空白样品,作为空白试料;
- 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

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料 1 g (准确至 ±0.01 g),加 McIlvaine Na₂EDTA 缓冲液 8 mL,涡旋 1 min,超声 20 min, -2℃、10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。残渣中加磷酸盐缓冲液 8 mL,重复提取 1 次,合并 2 次提取液,混匀,备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化,取备用液过柱,依次用水 5 mL 和 20% 甲醇水溶液 5 mL 淋洗,抽干,用洗脱液 10 mL 洗脱。收集洗脱液,45℃ 水浴氮气吹干。加入复溶液 1.0 mL,涡旋 1 min 溶解残余物,14 000 r/min 离心 5 min,微孔滤膜过滤,液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量,分别加入 6 份经提取和净化的空白试样残渣中,45℃ 水浴氮气吹干,加入复溶液 1.0 mL,涡旋溶解残余物,配制成浓度为 2 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、250 μg/L 和 500 μg/L 的基质匹配系列混合标准溶液,微孔滤膜过滤,液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,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: C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 或相当者;
- 柱温: 35℃;
- 进样量: 10 μL;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 甲醇: 乙腈 (2: 8, 含 0.1% 甲酸, 体积比) 溶液, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	0.1% 甲酸水溶液	甲醇: 乙腈 (2: 8, 含 0.1% 甲酸, 体积比)
	%	%
0	95	5
2.0	85	15
5.0	60	40
7.0	5	95
7.1	95	5
9.0	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;

- c) 检测方式:多反应监测;
d) 离子源温度:100 ℃;
e) 雾化温度:450 ℃;
f) 电离电压:3.0 kV;
g) 锥孔气流速:30 L/h;
h) 雾化气流速:1 000 L/h;
i) 定性离子对、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对、定量离子对和锥孔电压、碰撞能量

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 eV
四环素	445.1>410.2	445.1>410.2	25	19
	445.1>427.2			13
金霉素	479.1>444.2	479.1>444.2	27	23
	479.1>462.2			19
土霉素	461.1>426.2	461.1>426.2	23	20
	461.1>443.2			13
多西环素	445.1>410.2	445.1>428.2	26	24
	445.1>428.2			19
乙酰磺胺	215.0>108.0	215.0>156.0	17	18
	215.0>156.0			11
磺胺吡啶	250.0>108.0	250.0>156.0	27	25
	250.0>156.0			16
磺胺嘧啶	251.0>92.0	251.0>156.0	23	27
	251.0>156.0			15
磺胺甲噁唑	254.0>92.0	254.0>92.0	27	26
	254.0>156.0			16
磺胺噻唑	256.0>92.0	256.0>156.0	26	25
	256.0>156.0			15
磺胺甲噁啉	265.0>92.0	265.0>156.0	24	28
	265.0>156.0			15
磺胺二甲异噁唑	268.0>92.0	268.0>156.0	22	28
	268.0>156.0			16
磺胺甲噻二唑	271.0>92.0	271.0>92.0	19	30
	271.0>156.0			15
苯甲酰磺胺	277.0>108.0	277.0>156.0	14	22
	277.0>156.0			10
磺胺二甲异噁啉	279.0>124.0	279.0>124.0	30	21
	279.0>186.0			17
磺胺二甲噁啉	279.0>92.0	279.0>186.0	30	28
	279.0>186.0			16
磺胺间甲氧噁啉	281.0>92.0	281.0>156.0	28	31
	281.0>156.0			22
磺胺甲氧哒嗪	281.0>92.0	281.0>156.0	26	30
	281.0>156.0			17
磺胺对甲氧噁啉	281.0>92.0	281.0>156.0	25	29
	281.0>156.0			17
磺胺氯哒嗪	285.0>92.0	285.0>156.0	22	28
	285.0>156.0			15
磺胺邻二甲氧噁啉	311.0>92.0	311.0>156.0	28	32
	311.0>156.0			17

表 2 (续)

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 eV
磺胺间二甲氧嘧啶	311.0>92.0	311.0>156.0	28	32
	311.0>156.0			21
磺胺苯吡唑	315.0>92.0	315.0>158.0	32	42
	315.0>158.0			28
酞磺胺噻唑	404.0>149.0	404.0>256.0	27	32
	404.0>256.0			15
噁喹酸	262.0>216.0	262.0>244.0	24	28
	262.0>244.0			18
氟甲喹	262.0>202.0	262.0>244.0	26	32
	262.0>244.0			18
诺氟沙星	320.1>233.0	320.1>302.0	33	25
	320.1>302.0			19
依诺沙星	321.1>234.0	321.1>303.0	32	22
	321.1>303.0			20
环丙沙星	332.1>231.1	332.1>231.1	31	38
	332.1>314.1			22
培氟沙星	334.1>290.1	334.1>316.1	34	18
	334.1>316.1			20
洛美沙星	352.1>265.1	352.1>265.1	31	22
	352.1>308.1			16
达氟沙星	358.2>96.0	358.2>340.2	34	25
	358.2>340.2			23
恩诺沙星	360.2>245.0	360.2>316.1	34	26
	360.2>316.1			20
氧氟沙星	362.1>261.1	362.1>318.1	30	26
	362.1>318.1			20
麻保沙星	363.1>72.0	363.1>320.0	24	21
	363.1>320.0			15
沙拉沙星	386.2>299.1	386.2>299.1	33	27
	386.2>342.1			20
二氟沙星	400.2>299.0	400.2>356.1	37	30
	400.2>356.1			19

8.4.3 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中相应四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的保留时间,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离子丰度一致。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允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

8.4.4 定量测定

按 8.4.1 和 8.4.2 设定仪器条件,以基质匹配标准溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准

工作曲线,作单点或多点校准,按外标法计算试样中药物的残留量,基质匹配标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均应在仪器检测的线性范围内。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,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

试样中四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

- X —— 试样中四环素类、磺胺类、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 —— 基质匹配标准溶液中四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
- A —— 试样溶液中四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的色谱峰面积;
- A_s —— 基质匹配标准溶液中四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物的色谱峰面积;
- V —— 试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 110\%$ 。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。



附录 A

(资料性)

四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物中英文通用名称、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
四环素	tetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	60-54-8
金霉素	chlortetracycline	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	57-62-5
土霉素	oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	79-57-2
多西环素	doxycycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	564-25-0
乙酰磺胺	sulfacetamide	$C_8H_{10}N_2O_3S$	144-80-9
磺胺吡啶	sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	144-83-2
磺胺嘧啶	sulfadiazine	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	68-35-9
磺胺甲噁唑	sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	723-46-6
磺胺噻唑	sulfathiazole	$C_9H_9N_3O_2S_2$	72-14-0
磺胺甲噁啶	sulfamerazine	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$	127-79-7
磺胺二甲异噁唑	sulfisoxazole	$C_{11}H_{13}N_3O_3S$	127-69-5
磺胺甲噁二唑	sulfamethizole	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	144-82-1
苯甲酰磺胺	sulfabenzamide	$C_{13}H_{12}N_2O_3S$	127-71-9
磺胺二甲异噁啶	sulfisomidine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	515-64-0
磺胺二甲噁啶	sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	57-68-1
磺胺间甲氧噁啶	sulfamonomethoxine	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	1220-83-3
磺胺甲氧吡嗪	sulfamethoxyipyridazine	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	80-35-3
磺胺对甲氧噁啶	sulfameter	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	651-06-9
磺胺氯吡嗪	sulfachloropyridazine	$C_{10}H_9ClN_4O_2S$	80-32-0
磺胺邻二甲氧噁啶	sulfadoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	2447-57-6
磺胺间二甲氧噁啶	sulfadimethoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	122-11-2
磺胺苯吡唑	sulfaphenazole	$C_{15}H_{14}N_4O_2S$	526-08-9
酞磺胺噻唑	phthalylsulfathiazole	$C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$	85-73-4
噁喹酸	oxolinic acid	$C_{13}H_{11}NO_5$	14698-29-4
氟甲喹	flumequine	$C_{14}H_{12}FNO_3$	42835-25-6
诺氟沙星	norfloxacin	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	70458-96-7
依诺沙星	enoxacin	$C_{15}H_{17}FN_4O_3$	74011-58-8
环丙沙星	ciprofloxacin	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	85721-33-1
培氟沙星	pefloxacin	$C_{17}H_{20}FN_3O_3$	70458-92-3
洛美沙星	lomefloxacin	$C_{17}H_{19}F_2N_3O_3$	98079-51-7
达氟沙星	danofloxacin	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$	112398-08-0
恩诺沙星	enrofloxacin	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	93106-60-6
氧氟沙星	ofloxacin	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	82419-36-1
麻保沙星	marbofloxacin	$C_{17}H_{19}FN_4O_4$	115550-35-1
沙拉沙星	sarafloxacin	$C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$	98105-99-8
二氟沙星	difloxacin	$C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$	98106-17-3

附录 B

(资料性)

四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物特征离子质量色谱图

四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物特征离子质量色谱图见图 B.1。

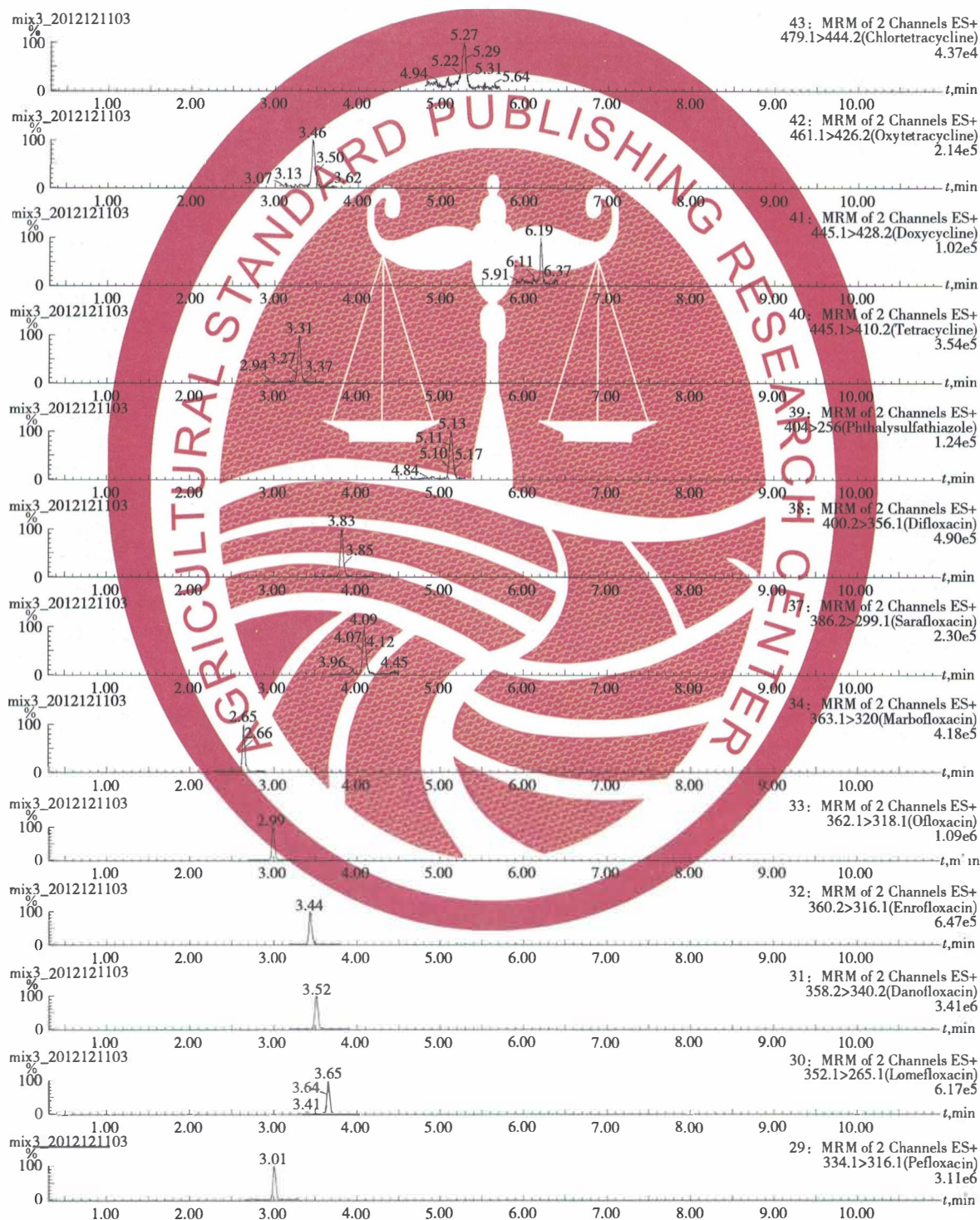


图 B.1 猪肝基质匹配四环素类、磺胺类和喹诺酮类标准溶液特征离子质量色谱图 (10 μg/L)

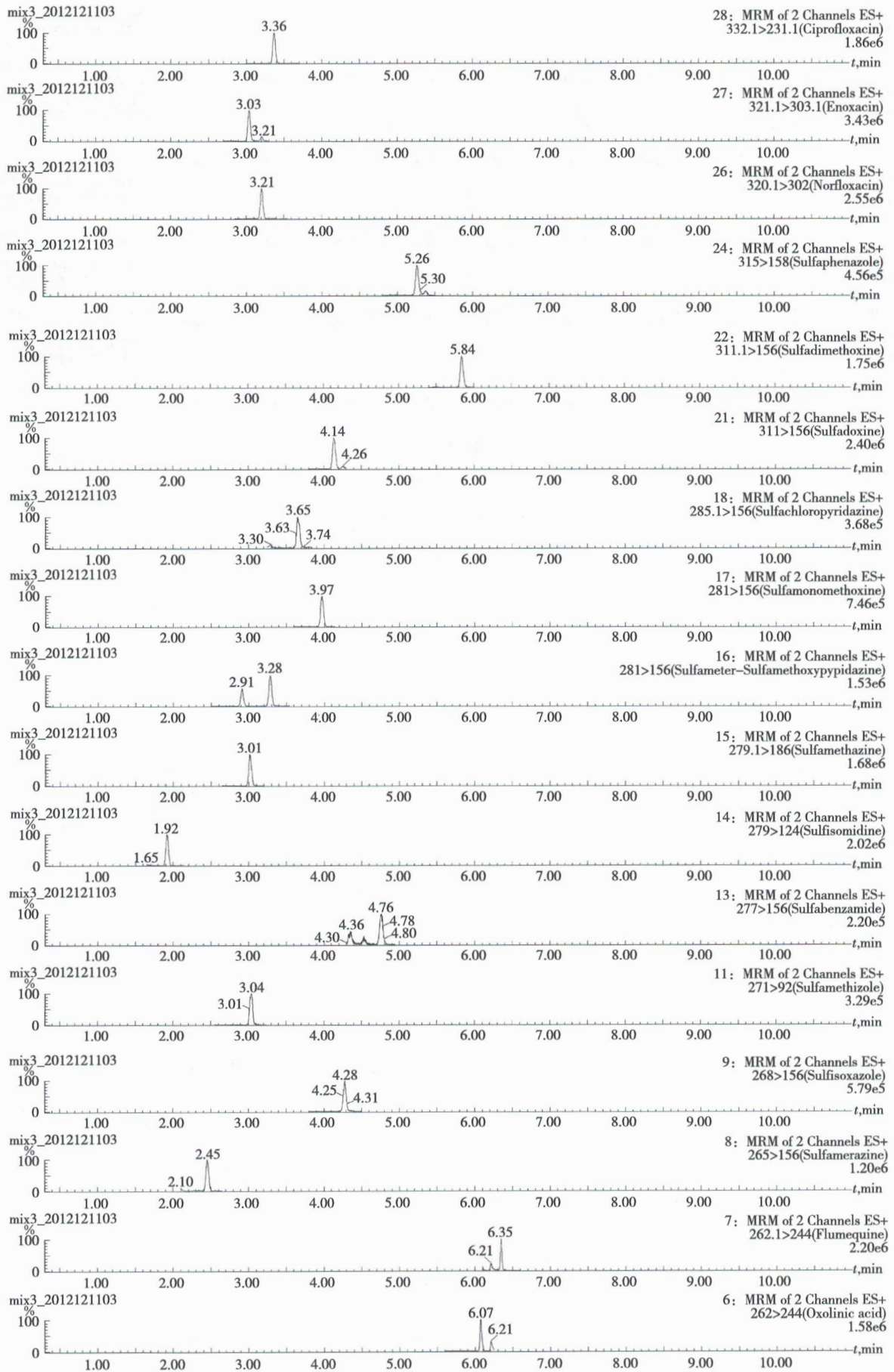


图 B.1 (续)

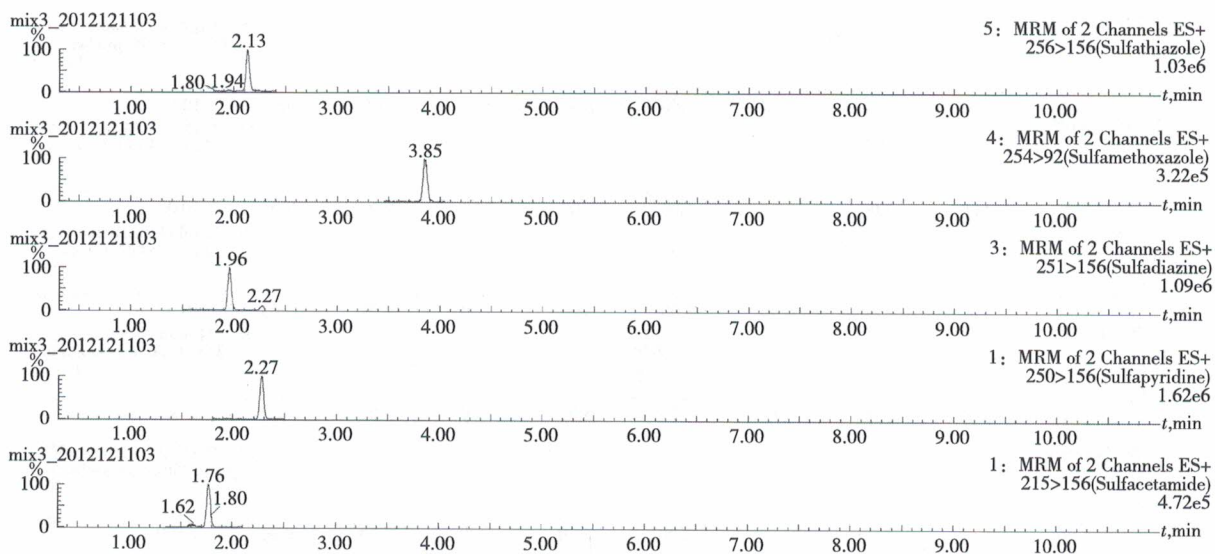


图 B.1 (续)

中华人民共和国
国家标准

食品安全国家标准

动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类
药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

GB 31658.17—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: 16109·8768

定价: 32.00元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31658.17—2021