



中华人民共和国国家标准

GB 31656.24—2025

食品安全国家标准 水产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 aquatic products by liquid
chromatography–tandem mass spectrometric method

2025-06-03 发布

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



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。



食品安全国家标准

水产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

本文件规定了水产品中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。

本文件适用于鱼类肌肉和皮等可食组织,虾、蟹、贝、蛙、鳖、海参可食组织中噁喹酸、氟甲喹、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、沙拉沙星、司帕沙星、二氟沙星、西诺沙星、萘啶酸、奥比沙星、马波沙星、氟罗沙星、吡哌酸残留量的检测。其他水产品的检测可参照执行。

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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的喹诺酮类药物,用酸化乙腈提取,正己烷脱脂,亲水亲脂固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法测定,基质校准内标法定量。

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(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

5.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.4 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)。

5.1.5 磷酸(H_3PO_4)。

5.1.6 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

5.1.7 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.8 氢氧化钠(NaOH)。

5.1.9 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.10 无水硫酸钠(Na_2SO_4):经 550 °C 灼烧 4 h,冷却 4 h 后,储于密闭容器中备用。

5.2 溶液配制

5.2.1 酸化乙腈:99 mL 乙腈中加入 1 mL 甲酸,混合均匀。

5.2.2 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 4.00 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.2.3 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0):取二水合磷酸二氢钠 1.56 g,加入氢氧化钠溶液 79 mL,混匀,用水稀释至 200 mL。

5.2.4 氨化甲醇:取氨水 25 mL,用甲醇稀释至 100 mL。

5.2.5 乙腈饱和正己烷:取正己烷 200 mL 于 250 mL 分液漏斗中,加入适量乙腈后,剧烈振摇,待分配平衡后,弃去乙腈层,即得。

5.2.6 0.1%甲酸水溶液(含 0.002 mol/L 乙酸铵):取乙酸铵 1.54 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。从中取 100 mL 乙酸铵溶液,取甲酸 1 mL,再用水稀释至 1 000 mL。

5.2.7 复溶液:取乙腈 15 mL,取 0.1%甲酸水溶液(含 0.002 mol/L 乙酸铵)85 mL,混合均匀。

5.3 标准品

5.3.1 噁唑酸、氟甲喹、诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、司帕沙星、二氟沙星、西诺沙星、萘啶酸、奥比沙星、马波沙星、氟罗沙星、吡哌酸含量均 $\geq 97.0\%$,培氟沙星含量 $\geq 92.0\%$,详见附录 A。

5.3.2 诺氟沙星-D5、环丙沙星-D8、恩诺沙星-D5 含量均 $\geq 99.0\%$,详见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取噁唑酸、氟甲喹、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、沙拉沙星、司帕沙星、二氟沙星、西诺沙星、萘啶酸、奥比沙星、马波沙星、氟罗沙星、吡哌酸标准品各适量(相当于各活性成分 10 mg),精密称定,在加入 200 μ L 甲酸条件下,用乙腈溶解稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 μ g/mL 标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液:分别精密量取标准储备液 1 mL,于 10 mL 棕色量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 10 μ g/mL 标准中间液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 混合标准工作液:精密量取标准中间液 1 mL,于 10 mL 棕色量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 1 μ g/mL 混合标准工作液。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 1 个月。

5.4.4 内标标准储备液:取氘代诺氟沙星、氘代环丙沙星、氘代恩诺沙星各 10 mg,精密称定,在加入 200 μ L 甲酸条件下,用乙腈溶解稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 μ g/mL 内标标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.5 混合内标标准中间液:分别精密量取内标标准储备液 1 mL,于 10 mL 棕色量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 10 μ g/mL 内标标准中间液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.6 混合内标标准工作液:精密量取内标标准中间液 1 mL,于 10 mL 棕色量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 1 μ g/mL 混合内标标准工作液。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 反相混合型亲水亲脂固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 尼龙微孔滤膜:0.22 μ m。

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 0.01g。

6.3 超声波清洗仪。

6.4 低速离心机:转速可达 4 000 r/min。

6.5 高速离心机:转速可达 15 000 r/min。

6.6 移液枪:200 μ L,1 mL,5 mL。

6.7 旋转蒸发仪。

6.8 涡旋混合器。

6.9 氮吹仪。

6.10 分液漏斗:250 mL。

6.11 梨形瓶:100 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 中附录 B 的要求制样。蛙至少取 3 只,清洗后去头,从头部去皮,去内脏,用刀或剪刀将肌肉剔下,绞碎混匀后备用;试样量为 400 g,分为两份,一份用于检样,一份用于留样。

- 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

—18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料(5 ± 0.05)g,于 50 mL 离心管,加入内标标准工作溶液 25 μ L,涡旋混合 30 s,避光放置 10 min;加入无水硫酸钠 5 g,涡旋混匀,再加入酸化乙腈 20 mL,于涡旋混合器上以 2 000 r/min 涡旋 1 min,超声 8 min,以 3 500 r/min 离心 5 min,取上清液,于 100 mL 离心管内。残渣再加酸化乙腈 20 mL,重复提取 1 次,合并 2 次上清液于 100 mL 离心管,备用。

8.2 净化

8.2.1 鳗鲡、大黄鱼类等油脂含量高、虾蟹等色素含量高的水产品

100 mL 离心管中加入乙腈饱和正己烷 30 mL,剧烈振摇 2 min,静置,取下层清液于梨形瓶中,40℃下旋蒸至干。加入磷酸盐缓冲液 4 mL 溶解残余物,振荡 1 min,残余物溶解液转移至 15 mL 离心管。再重复提取残余物 2 次,溶解液转移至同一离心管。合并 3 次残余物溶解液,3 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL、磷酸盐缓冲液 3 mL 活化,取备用液过柱,流干,流速控制为每秒 1 滴;水 3 mL 淋洗,抽干,依次用氨化甲醇 6 mL、甲醇 4 mL 洗脱,收集洗脱液于 15 mL 离心管中,50℃下氮吹至干。复溶液 1.0 mL 溶解残余物,过 0.22 μ m 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.2.2 其他类水产品

100 mL 离心管中加入乙腈饱和正己烷 30 mL,剧烈振摇 2 min,静置,取下层清液于梨形瓶中;40℃下旋蒸至干,复溶液 1.0 mL 溶解残余物,加乙腈饱和正己烷 1 mL,转至 5 mL 离心管中,涡旋混合 30 s,13 000 r/min 离心 3 min,取下层清液过 0.22 μ m 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

分别取适量混合标准工作液于 5 mL 玻璃离心管中,加入内标标准工作溶液 25 μ L,50℃下氮吹至干,分别加入经 8.1 和 8.2 步骤处理所得的未加入内标的基质空白液 1.0 mL,旋涡混匀 1 min,过 0.22 μ m 滤膜,配制成喹诺酮类药物浓度为 2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 200 ng/mL 的系列基质匹配标准溶液;现用现配。以目标物和内标物的特征离子质量色谱峰面积比值为纵坐标、基质匹配标准溶液质量浓度为横坐标,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

- a) 色谱柱:端基封尾 C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm,5 μ m)或相当者;
- b) 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液(含 0.002 mol/L 乙酸铵),B 为乙腈,梯度洗脱程序应符合表 1 的要求;

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0	85.0	15.0
15.5	81.0	19.0
16.0	60.0	40.0
23.0	60.0	40.0
23.5	85.0	15.0
28.0	85.0	15.0

- c) 流速:0.25 mL/min;
- d) 柱温:35 ℃;
- e) 进样量:10 μL。

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾(ESI)离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 喷雾电压:3 500 V;
- e) 离子传输毛细管温度:350 ℃;
- f) 雾化气压力:241 kPa;
- g) 辅助气流量:2 L/min;
- h) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物名称	定性离子对(碰撞能量), <i>m/z</i> (eV)	定量离子对(碰撞能量), <i>m/z</i> (eV)
噁唑酸	262/216(29)	262/244(18)
	262/244(18)	
氟甲喹	262/202(32)	262/244(18)
	262/244(18)	
诺氟沙星	320/233(24)	320/276(18)
	320/276(18)	
依诺沙星	321/303(21)	321/303(21)
	321/232(34)	
环丙沙星	332/245(22)	332/288(17)
	332/288(17)	
培氟沙星	334/290(18)	334/316(21)
	334/316(21)	
洛美沙星	352/265(22)	352/308(16)
	352/308(16)	
达氟沙星	358/314(18)	358/340(22)
	358/340(22)	
恩诺沙星	360/245(26)	360/316(18)
	360/316(18)	
氧氟沙星	362/261(27)	362/318(18)
	362/318(18)	
沙拉沙星	386/299(26)	386/342(18)
	386/342(18)	
司帕沙星	393/292(25)	393/349(19)
	393/349(19)	
二氟沙星	400/356(19)	400/356(19)
	400/299(28)	
西诺沙星	263/217(23)	263/217(23)
	263/245(17)	

表 2（续）

化合物名称	定性离子对及碰撞能量,eV	定量离子对及碰撞能量,eV
茶啶酸	233/187(25) 233/215(14)	233/215(14)
奥比沙星	396/352(18) 396/295(23)	396/352(18)
马波沙星	363/72(23) 363/345(21)	363/72(23)
氟罗沙星	370/326(19) 370/269(25)	370/326(19)
吡哌酸	304/217(24) 304/189(31)	304/217(24)
氘代诺氟沙星	325/307(21)	325/307(21)
氘代环丙沙星	340/322(21)	340/322(21)
氘代恩诺沙星	365/321(19)	365/321(19)

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和其内标物的保留时间与基质匹配标准工作液中喹诺酮类药物和其内标物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基质匹配标准工作液相对离子丰度一致,其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和基质匹配标准工作液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,按内标法计算,其中诺氟沙星、依诺沙星、培氟沙星、氧氟沙星、马波沙星、氟罗沙星、吡哌酸以氘代诺氟沙星为内标;环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、奥比沙星以氘代环丙沙星为内标;西诺沙星、司帕沙星、噁喹酸、氟甲喹、恩诺沙星、茶啶酸以氘代恩诺沙星为内标。基质匹配标准工作液及试料溶液中喹诺酮类药物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。对于试料中喹诺酮残留量超过仪器测定线性范围的,在提取时根据药物浓度相应增加混合内标标准工作液的添加量,使试料溶液稀释后喹诺酮的响应在仪器检测的线性范围内,对应内标物浓度与基质匹配标准曲线制备中的内标物浓度一致。在上述色谱-质谱条件下,喹诺酮类药物标准溶液的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,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测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 —— 试样中被测组分残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 基质匹配标准溶液中被测组分浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_{is} —— 试料溶液中内标浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C'_{is} —— 基质匹配标准溶液中内标浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i —— 试料溶液中被测组分的峰面积;
- A_{is} —— 试料溶液中被测组分对应内标的峰面积;
- A'_s —— 基质匹配标准溶液中被测组分的峰面积;
- A'_{is} —— 基质匹配标准溶液中被测组分对应内标的峰面积;
- V —— 试料溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试料质量的数值,单位为克(g)。

注:计算结果以平行测定结果的算术平均值表示,含量不小于 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的保留 3 位有效数字, $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后 2 位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$;定量限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

标准添加浓度 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 10\text{ }\mu\text{g/kg}$,回收率为 $60\%\sim 120\%$;标准添加浓度 $10\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 100\text{ }\mu\text{g/kg}$,回收率 $70\%\sim 120\%$;标准添加浓度 $100\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 500\text{ }\mu\text{g/kg}$,回收率为 $80\%\sim 110\%$ 。

10.3 精密度

10.3.1 重复性精密度

标准添加浓度 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 10\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 20\%$;标准添加浓度 $10\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 100\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 15\%$;标准添加浓度 $100\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 500\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

10.3.2 再现性精密度

标准添加浓度 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 10\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 30\%$;标准添加浓度 $10\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 100\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 20\%$;标准添加浓度 $100\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 500\text{ }\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附 录 A
(资料性)
喹诺酮类药物的中英文名称、化学分子式和 CAS 号

喹诺酮类药物的中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 喹诺酮类药物的中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
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 ₃ O ₃	70458-96-7
依诺沙星	Enoxacin	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	74011-58-8
环丙沙星	Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	85721-33-1
培氟沙星	Pefloxacin	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	70458-92-3
洛美沙星	Lomefloxacin	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	98079-51-7
达氟沙星	Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	112398-08-0
恩诺沙星	Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	93106-60-6
氧氟沙星	Ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	82419-36-1
沙拉沙星	Sarafloxacin	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	98105-99-8
司帕沙星	Sparfloxacin	C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃	110871-86-8
二氟沙星	Difloxacin	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	98106-17-3
西诺沙星	Cinoxacin	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₅	28657-80-9
萘啶酸	Nalidixic acid	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	389-08-2
奥比沙星	Orbifloxacin	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	113617-63-3
马波沙星	Marbofloxacin	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	115550-35-1
氟罗沙星	Fleroxacin	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	79660-72-3
吡哌酸	Pipemidic acid	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₃	51940-44-4
氘代诺氟沙星	Norfloxacin-D5	C ₁₆ H ₁₃ D ₅ FN ₃ O ₃	1015856-57-1
氘代环丙沙星	Ciprofloxacin-D8	C ₁₇ H ₁₀ D ₈ FN ₃ O ₃	1130050-35-9
氘代恩诺沙星	Enrofloxacin-D5	C ₁₉ H ₁₇ D ₅ FN ₃ O ₃	1173021-92-5

附录 B

(资料性)

喹诺酮类药物标准溶液的特征离子质量色谱图

喹诺酮类药物标准溶液的特征离子质量色谱图见图 B.1。

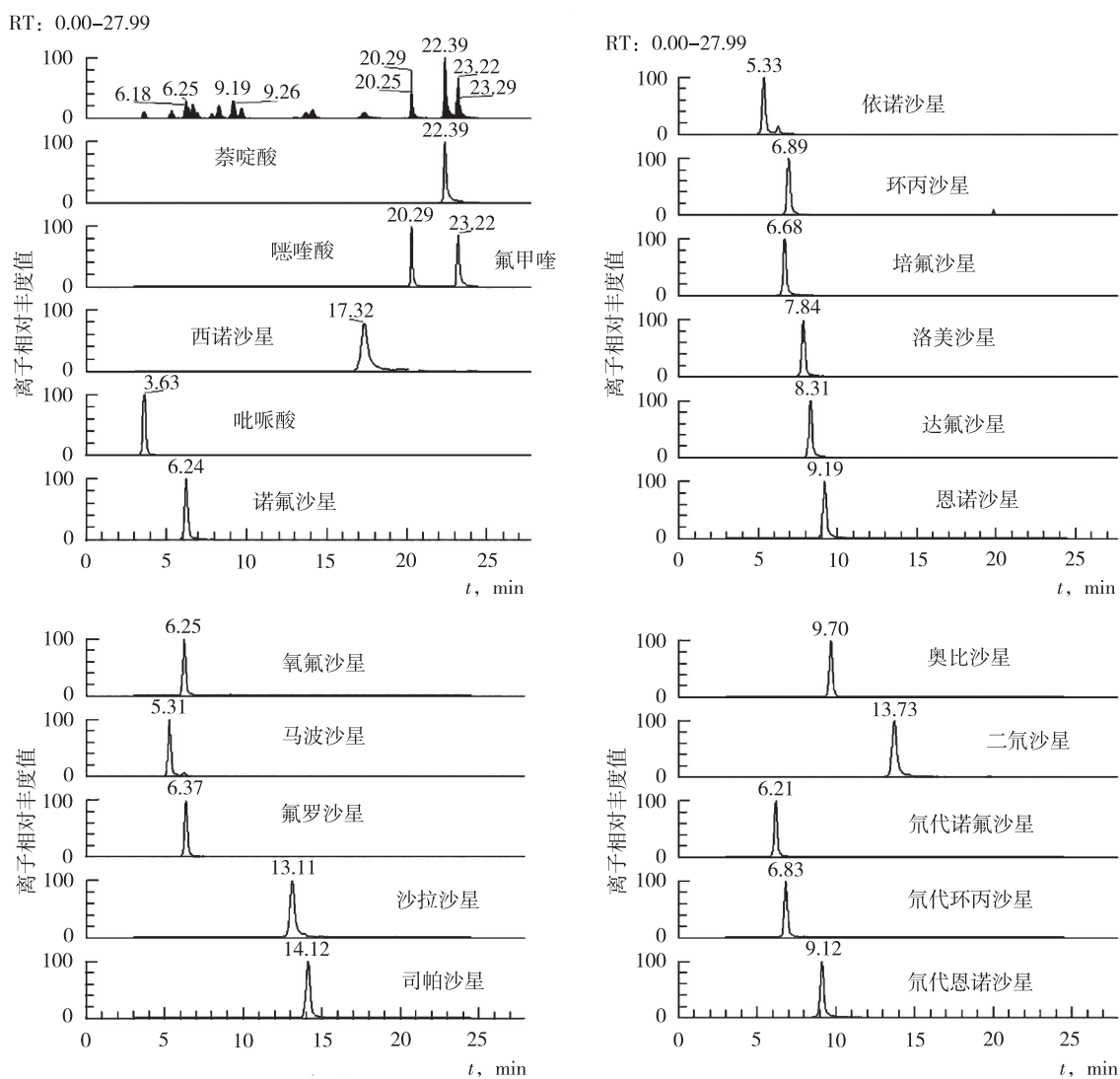


图 B.1 喹诺酮类药物标准溶液的特征离子质量色谱图(10 ng/mL)