

鸡蛋和鸡肉中氟喹诺酮类药物及金刚烷胺残留测定操作细则

1 范围

本标准规定了鸡蛋和鸡肉中8种氟喹诺酮类药物及金刚烷胺残留量的液相色谱-串联质谱检测方法。

本标准适用于鸡蛋和鸡肉中恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、洛美沙星、丹诺沙星8种氟喹诺酮类药物及金刚烷胺的液相色谱-串联质谱法测定和确证。

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 603 化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

鸡蛋和鸡肉样品用1%乙酸乙腈溶液提取，经正己烷去脂后，旋蒸浓缩，磷酸盐缓冲液复溶后经C18固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，同位素内标法定量。

4 试剂与材料

除另有说明，试验中所用制剂按 GB/T 603 的规定制备。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 正己烷：色谱纯。

4.3 乙酸：色谱纯。

4.4 甲酸：色谱纯。

4.5 氢氧化钠：分析纯。

4.6 5.0mol/L 氢氧化钠溶液：称取 100g 氢氧化钠，溶解于 500mL 水中。

4.7 1%乙酸乙腈溶液：取 5mL 乙酸(4.3)，用乙腈(4.1)稀释至 500 mL。

4.8 0.1%甲酸乙腈溶液：取 0.5mL 甲酸 (4.4)，用乙腈(4.1)稀释至 500 mL。

4.9 0.1%甲酸水溶液：取 0.5mL 甲酸 (4.4)，用水稀释至 500 mL。

4.10 0.1%甲酸乙腈/水溶液：取 0.5mL 甲酸 (4.4)，用乙腈(4.1)/水 (3/7, v/v) 稀释至 500mL。

4.11 磷酸盐缓冲溶液：0.1mol/L。称取 6.8g 磷酸二氢钾，用水溶解，定容至 500mL，用 5.0mol/L 氢氧化钠溶液(4.6)调节 pH 至 7.0±0.05。

4.12 标准品：恩诺沙星 (Enrofloxacin)、诺氟沙星 (Norfloxacin)、培氟沙星 (Pefloxacin)、环丙沙星 (Ciprofloxacin)、氧氟沙星 (Ofloxacin)、沙拉沙星 (Sarafloxacin)、洛美沙星 (Lomefloxacin)、丹诺沙星 (Danofloxacin)、金刚烷胺 (Amantadine)、恩诺沙星-D5 (Enrofloxacin-D5)。

4.13 标准储备液：分别称取 0.01g (精确至 0.1mg) 标准品(4.12)置于 10mL 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 1mg/mL，-20℃冰箱保存。

4.14 混合标准工作溶液：将各标准储备溶液(4.13)稀释，配成混合标准工作液，各组分浓度为 10mg/L。

4.15 同位素内标：恩诺沙星-D5 (Enrofloxacin-D5)、金刚烷胺-D15 (Amantadine-D15)。(纯度>99%)。

4.16 同位素内标储备溶液：分别称取 0.01g (精确至 0.1mg) 标准品(4.15)置于 10mL 棕色容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，标准储备溶液浓度为 1mg/mL，-20℃冰箱保存。

4.17 混合内标工作溶液：将同位素内标准储备溶液(4.16)稀释，配成混合内标工作溶液，各组分浓度为各组分浓度为 1.0mg/L。

4.18 混合标准系列：准确移取适量混合标准工作溶液 (4.14) 和混合工作溶液 (4.17)，用 0.1%甲酸乙腈/水 (3/7,v/v) 溶液 (4.10) 配置成目标药物浓度为 1μg/L、2μg/L、5μg/L、10μg/L、20μg/L、50μg/L、100μg/L、200μg/L，同位素内标浓度均为 20μg/L 的混合标准系列溶液。

5 仪器和耗材

- 5.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）；
- 5.2 电子天平：感量 0.01 g；
- 5.3 电子天平：感量 0.00001 g；
- 5.4 旋涡混合器；
- 5.5 冷冻离心机：最高转速大于 10000r/min；
- 5.6 pH 计；
- 5.7 旋转蒸发仪；
- 5.8 固相萃取仪；
- 5.9 C18 固相萃取柱（100mg/3mL）

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 鸡肉

取适量新鲜或冷冻解冻的鸡肉组织样品捣碎均匀。

6.1.2 鸡蛋

取适量新鲜样品，去壳后混合均匀。

6.2 提取

准确称取 2.0g（精确至 0.01g）均质的鸡蛋或鸡肉样品于 50mL 离心管中，加入 10mL 1%乙酸乙腈（4.7），涡旋提取 2min，10000r/m 离心 5min（建议温度设为 4℃），上清液转入另一 50mL 离心管中。重复提取一次，离心后合并上清液，加入 20mL 正己烷，涡旋混合 1min，10000r/m 离心 1min（建议温度设为 4℃），移去正己烷，将乙腈层转入于鸡心瓶中，40℃水浴旋蒸至干，用 2×1mL 磷酸盐缓冲液（4.11）溶解残渣，待净化。

6.3 净化

C18 固相萃取柱（100mg/3mL），分别用 2mL 乙腈、2mL 磷酸盐缓冲液活化和平衡，将 6.2 待净化的溶液以自然滴液速度过柱，用 2mL 水淋洗，真空抽干。用 1 mL 0.1%乙腈/水（3/7，v/v）溶液（4.10）洗脱，真空抽干，收集洗脱液，过 0.22μm 滤膜后上机测定。

6.4 测定

6.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：Phenomenex Kinetex F5，规格 50×3.0mm，粒径 2.6μm，或其他等效柱；
- b) 流速：0.4 mL/min；
- c) 进样体积 10μL；
- d) 流动相：A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为 0.1%甲酸乙腈溶液，参考梯度洗脱条件见下表 1。

表 1 液相色谱参考条件

时间（min）	A	B
0	97	3
0.5	97	3
2.0	50	50
2.1	10	90

3.5	10	90
3.6	97	3
5.0	97	3

6.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI+）；
 - b) 扫描方式：多反应离子监测（MRM）；
 - c) 离子源温度：600 °C；
 - d) 离子源喷雾电压：5500 V；
 - e) 气帘气：30 psi；
 - f) 雾化气：50 psi；
 - g) 干燥气：60 psi；
- 质谱参数见下表2。

表3 目标药物及内标的MRM特征离子参考质谱条件（AB SCIEX Qtrap6500+）

中文名称	RT/min	母离子	子离子	DP/V	CE/eV
恩诺沙星 (Enrofloxacin)	2.42	360	316.1	80	25
		360	245.1	80	35
诺氟沙星 (Norfloxacin)	2.32	320.1	276.1	80	25
		320.1	233.1	80	35
培氟沙星 (Pefloxacin)	2.34	334.1	316.1	80	27
		334.1	290.2	80	25
环丙沙星 (Ciprofloxacin)	2.34	332.1	288.1	80	25
		332.1	245.1	80	33
氧氟沙星 (Ofloxacin)	2.32	362.2	318.1	80	26
		362.2	261.1	80	38
沙拉沙星 (Sarafloxacin)	2.53	386.0	342.3	80	25
		386.0	299.0	80	38
洛美沙星 (Lomefloxacin)	2.37	352.0	265.0	80	33
		352.0	308.1	80	28
丹诺沙星 (Danofloxacin)	2.35	358.1	340.1	77	30
		358.1	314.1	77	24
金刚烷胺 (Amantadine)	2.11	152.1	135.1	54	23
		152.1	93.1	50	38
恩诺沙星-D5 (Enrofloxacin-D5)		365.0	321.1	85	27
金刚烷胺-D15 (Amantadine-D15)	2.09	167.3	150.3	50	23

6.4.3 定性测定

在上述液相色谱-串联质谱条件下进行测定。待测物在样品中的保留时间与标准工作溶液中的保留时间偏差在±2.5%之内，各离子对的相对丰度应与校正溶液的相对丰度一致，误差不超过表3中规定的范围。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度	>50%	50%~20%	20%~10%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.4.4 定量测定

取试样溶液、溶剂标准溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积比定量，标准溶液及试样溶液中目标药物与同位素内标（恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、洛美沙星、丹诺沙星用恩诺沙星-D5 校准，金刚烷胺用金刚烷胺-D15 校准）的峰面积比均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下，典型药物特征离子的质量色谱图分别见附录 A。

按以上步骤对同一试样进行平行测定。

7 结果计算

单点校准：
$$C_i = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is}}{C'_{is} \times A_s \times A_{is}} \dots\dots\dots(1)$$

或标准曲线校准，由：
$$\frac{A_s}{A'_{is}} = a \times \frac{C_s}{C'_{is}} + b \dots\dots\dots(2)$$

求得a和b，则
$$C_i = \frac{\frac{A_i}{A_{is}} - b}{a} \times C_{is} \dots\dots\dots(3)$$

试料中目标药物的残留量（μg/kg）按下式计算：

$$X = \frac{C_i V}{m} \dots\dots\dots(4)$$

式中：

- X ——供试试样中目标药物残留量，μg/kg。
- C_i ——试样溶液中目标药物浓度，μg/L。
- C_{is} ——试样溶液中相应同位素内标浓度，μg/L。
- C_s ——标准溶液中目标药物浓度，μg/L。
- C'_{is} ——标准溶液中相应同位素内标浓度，μg/L。
- A_i ——试样溶液中目标药物峰面积。
- A_{is} ——试样溶液中相应同位素内标峰面积。
- A_s ——标准溶液中目标药物峰面积。
- A'_{is} ——标准溶液中相应同位素内标峰面积。
- V ——固相萃取小柱洗脱溶液体积，mL。
- m ——供试试样的质量，g。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

8 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

8 种氟喹诺酮类药物的定量限均为 1.0 μg/kg，金刚烷胺的定量限为 2.0μg/kg。

9.2 准确度

本方法在 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 60%~120%。

9.3 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%。