

T/HBIQA

河北省检验检疫学会团体标准

T/HBIQA 0001.17—2023

兽药制剂中非法添加 19 种喹诺酮类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of illegally adulterated nineteen quinolones in
veterinary drug preparations

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

2024-02-01 发布

2024-05-01 实施

河北省检验检疫学会 发布

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。

本文件为T/HBIQA 0001的第17部分。T/HBIQA 0001已经发布了以下部分：

- T/HBIQA 0001.1-2023：兽药制剂中非法添加3种氯霉素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.2-2023：兽药制剂中非法添加5种硝基咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.3-2023：兽药制剂中非法添加22种 β -受体激动剂类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.4-2023：兽药制剂中非法添加8种硝基咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.5-2023：兽药制剂中非法添加14种蛋白同化激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.6-2023：兽药制剂中非法添加5种雌激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.7-2023：兽药制剂中非法添加9种糖皮质激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.8-2023：兽药制剂中非法添加药物安眠酮和唑吡坦的测定；
- T/HBIQA 0001.9-2023：兽药制剂中非法添加4种吩噻嗪类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.10-2023：兽药制剂中非法添加4种巴比妥类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.11-2023：兽药制剂中非法添加19种非甾体类抗炎药物的测定；
- T/HBIQA 0001.12-2023：兽药制剂中非法添加4种喹噁啉类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.13-2023：兽药制剂中非法添加9种抗病毒类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.14-2023：兽药制剂中非法添加22种 β -内酰胺类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.15-2023：兽药制剂中非法添加4种四环素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.16-2023：兽药制剂中非法添加25种磺胺类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.17-2023：兽药制剂中非法添加19种喹诺酮类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.18-2023：兽药制剂中非法添加7种大环内酯类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.19-2023：兽药制剂中非法添加5种多肽类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.20-2023：兽药制剂中非法添加6种聚醚类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.21-2023：兽药制剂中非法添加药物泰妙菌素和沃尼妙林的测定；
- T/HBIQA 0001.22-2023：兽药制剂中非法添加8种苯并咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.23-2023：兽药制剂中非法添加可乐定和赛庚啶的测定；
- T/HBIQA 0001.24-2023：兽药制剂中非法添加3种林可酰胺类药物的测定。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河北省检验检疫学会提出并归口。

本文件起草单位：石家庄海关技术中心、河北科星药业有限公司、河北省动物微生态制剂产业技术研究院。

本文件主要起草人：项佳林、张亦琴、张婧雯、艾连峰、王建昌、梁春雷。

兽药制剂中非法添加 19 种（氟）喹诺酮类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了兽药制剂中非法添加 19 种（氟）喹诺酮类药物的液相色谱-串联质谱检测和确证方法。本文件适用于兽药制剂中非法添加药物恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、丹诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、司帕沙星、依诺沙星、西诺沙星、吡哌酸、奥比沙星、麻保沙星、氟罗沙星和萘定酸的测定。

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
中华人民共和国兽药典

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的喹诺酮类药物用酸性乙腈提取，氮吹浓缩后用氢氧化钠溶液溶解残渣，经阴离子交换固相萃取柱富集净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 乙腈（ CH_3CN ），色谱纯。

5.1.2 甲醇（ CH_4O ），色谱纯。

5.1.3 甲酸（ CH_2O_2 ），色谱纯。

5.1.4 氢氧化钠（ NaOH ）。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.2%甲酸乙腈：取 499 mL 的乙腈（5.1.1），与 1 mL 甲酸（5.1.3）混匀备用。
- 5.2.2 氢氧化钠溶液（0.15 mol/L）：取 6.0 g 氢氧化钠（5.1.4），溶解于 1000 mL 水中。
- 5.2.3 甲酸-甲醇溶液（5+95, v/v）：取 5 mL 甲酸（5.1.3），溶解于 95 mL 甲醇（5.1.2）中。
- 5.2.4 0.1%甲酸水溶液：量取 1.0 mL 甲酸（5.1.3），用水定容至 1000 mL。
- 5.2.5 0.1%甲酸水-乙腈（90+10, v/v）：取 180 mL 0.1%甲酸水溶液（5.2.4），与 20 mL 乙腈（5.1.1），混匀备用。

5.3 标准品

5.3.1 恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、丹诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、司帕沙星、依诺沙星、西诺沙星、吡哌酸、奥比沙星、麻保沙星、氟罗沙星和萘定酸标准品：纯度大于等于 99%。

5.4 标准溶液的配制

- 5.4.1 标准储备液（1 mg/mL）：分别称取喹诺酮类标准品（5.3.1）10 mg（精确至 0.1 mg），于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）溶解，并定容至刻度，2 °C~8 °C 冷藏保存。
- 5.4.2 混合标准中间液（5 µg/mL）：准确吸取标准储备液（5.4.1）各 0.25 mL，置于 50 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）稀释至刻度，摇匀，2 °C~8 °C 冷藏保存。
- 5.4.3 基质工作溶液：准确量取混合标准中间液（5.4.2），用 8.2 中得到的基质空白溶液稀释至合适浓度，现用现配。

5.5 材料

- 5.5.1 阴离子交换柱（PAX）：60 mg，3 mL，或相当者。
- 5.5.2 微孔滤膜：0.22 µm，有机系。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 离心机：转速不低于 4 000 r/min。
- 6.3 超声波清洗器。
- 6.4 涡旋振荡器。
- 6.5 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 氮吹仪。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

从原始样品中取出部分有代表性样品，片剂、颗粒等固体样品，经捣碎混匀后全部过三号筛，然后用四分法缩分出适量试样，均分成两份，装入清洁容器内，密封后作出标记，一份作为试样，一份作为留样。液体样品混匀后取出部分作为试样，其余样品作为留样。

7.2 试样保存

药品按产品说明书规定的条件保存。

注 1：在取样、制样的操作过程中，应防止样品受到污染或发生分析物含量的变化。

8 分析步骤

8.1 提取

8.1.1 固体样品

称取 1.0 g 样品（精确至 0.01 g）于具塞离心管中，加入 15 mL 甲酸乙腈溶液（5.2.1），涡旋混匀 2 min，超声提取 10 min，以 4 000 r/min 离心 5 min，转移上层清液至 25 mL 容量瓶中，再次加入 10 mL 甲酸乙腈溶液（5.2.1）重复提取一次，合并提取液并用甲酸乙腈溶液（5.2.1）定容至刻度。取 0.5 mL 于 40 °C 水浴氮吹至近干。加入 3 mL 氢氧化钠溶液（5.2.2）溶解残渣，待净化。

8.1.2 液体样品

称取 1.0 g 样品（精确至 0.01 g）于具塞离心管中，加入 15 mL 甲酸乙腈溶液（5.2.1），涡旋混匀 2 min，超声提取 10 min，以 4 000 r/min 离心 5 min，转移上层清液至 25 mL 容量瓶中，再次加入 8 mL 甲酸乙腈溶液（5.2.1）重复提取一次，合并提取液并用甲酸乙腈溶液（5.2.1）定容至刻度。取 0.5 mL 于 40 °C 水浴氮吹至近干。加入 3 mL 氢氧化钠溶液（5.2.2）溶解残渣，待净化。

8.2 净化

固相萃取柱（5.14）依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 氢氧化钠溶液（5.2.2）活化，将上述溶液（8.1）转移至固相萃取柱上，用 3 mL 氢氧化钠溶液（5.2.2）再次溶解残渣并转移至固相萃取柱上，依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗，弃去流出液。用 3 mL 甲酸-甲醇溶液（5.2.3）洗脱，收集洗脱液于 10 mL 玻璃管中，40 °C 水浴氮吹至干，用 1 mL 0.1% 甲酸水乙腈溶液（5.2.5）涡旋溶解，溶液过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 液相色谱-串联质谱参考条件

8.3.1 参考色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈，100 mm×2.1 mm，1.7 μm，或相当者；
- b) 流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）+ 乙腈（B）；梯度洗脱，洗脱条件见表 1；
- c) 色谱柱温度：40 °C；
- d) 进样量：1 μL。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	流速(mL/min)	A	B
---------	------------	---	---

0.00	0.35	95	5
4.00	0.35	80	20
5.00	0.35	70	30
6.50	0.35	5	95
7.00	0.35	0	100
7.10	0.35	95	5
9.00	0.35	95	5

8.3.2 参考质谱条件

- a) 离子化方式：电喷雾正离子扫描模式（ESI+）；
- b) 质谱扫描方式：多反应监测（MRM）；
- c) 其他参考质谱条件见附录 A 中的表 A.1。

8.4 液相色谱-串联质谱测定

8.4.1 定性测定

在同样的测试条件下，试样溶液的保留时间在基质匹配标准溶液保留时间 ± 0.1 min之内，（保留时间小于2 min的药物，保留时间偏差在5%之内）；试样溶液中的离子相对丰度在基质匹配标准溶液离子相对丰度 $\pm 40\%$ 之内。

8.4.2 定量测定

取试样溶液和相应的基质匹配标准溶液，作单点或多点校准。试样溶液中待测物的响应值应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱条件下，基质匹配标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录 B。

8.4.3 空白实验

除不加样品外，按上述相同条件和步骤进行。

注2：化学兽药制剂和非法添加的药物可能会造成相应项目的实验污染，应加强实验环境的控制以及所用器皿、仪器的维护清洗。

9 结果计算

试样中喹诺酮类药物的含量由色谱数据处理软件计算，或按式（1）计算：

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times C \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中被测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A——样品溶液中被测物的峰面积；

A_s——标准溶液中被测物的峰面积；

C ——标准溶液中被测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——提取溶剂总体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——吸取出用于净化的提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——样品溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试料的质量，单位为克（g）。

计算结果保留两位有效数字，当结果大于 1 mg/kg 时保留三位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法检出限为 0.05 mg/kg，定量限为 0.1 mg/kg。

10.2 准确度

本方法对针剂、粉剂和酞剂中 19 种（氟）喹诺酮类药物在 0.1 mg/kg~1.0 mg/kg 添加浓度的回收率范围为 80%~110%。

10.3 精密度

本方法相对标准偏差 \leq 20%。

附 录 A
(资料性)
参考质谱条件

参考质谱条件¹⁾:

- a) 正离子模式电喷雾电压 (IS): 0.5 kV;
- b) 锥孔电压: 20 V;
- c) 离子源温度: 150 °C;
- d) 雾化气温度: 500 °C;
- e) 雾化气流速: 1 000 L/Hr;
- f) 锥孔反吹气流速: 150 L/Hr;
- g) 雾化气压力: 7 Bar;
- h) 源内诱导解离电压: 60 V;
- i) 碰撞气: 高纯氩气;
- j) 碰撞气流速: 0.17 mL/min;
- k) 其他质谱参数及保留时间见表 A.1。

表A.1 被测物的参考保留时间、监测离子对和裂解能量

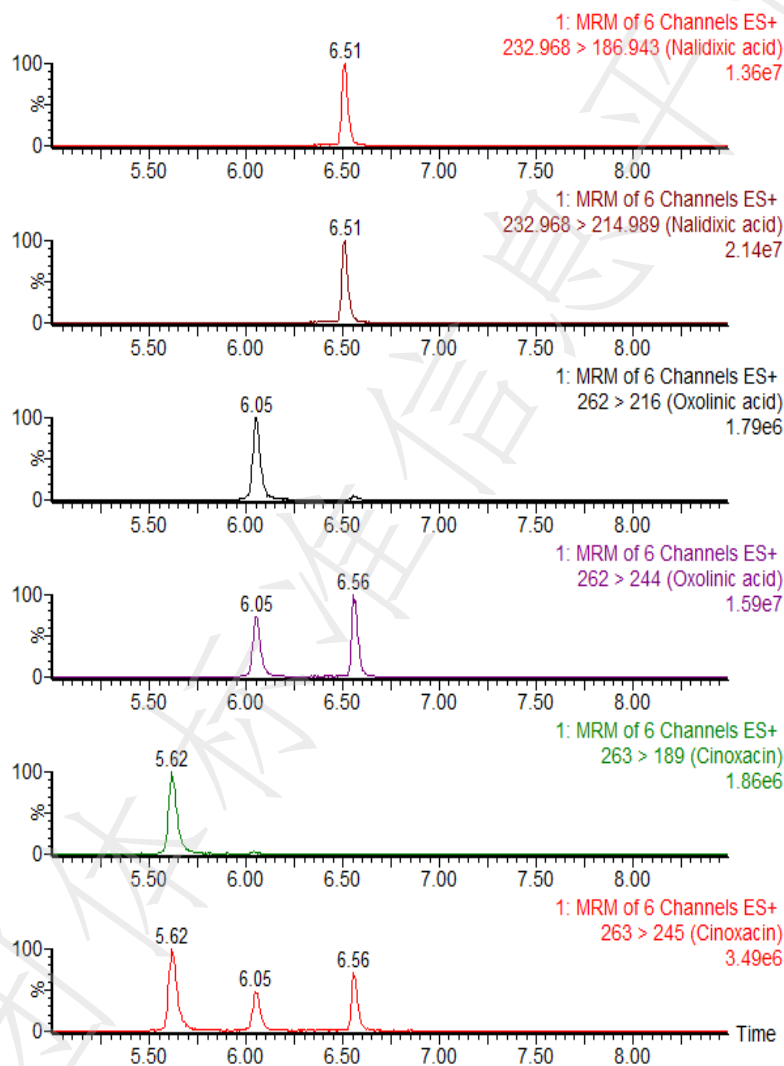
化合物名称	保留时间	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 /eV
恩诺沙星	4.40	245.0	245.0*	26
			316.2	18
环丙沙星	3.98	332.0	245.0*	21
			288.2	16
氧氟沙星	3.86	362.1	261.1	25
			318.1*	19
诺氟沙星	3.81	320.0	233.0	22
			276.2*	15
培氟沙星	3.91	334.1	290.1*	17
			316.1	19
洛美沙星	4.23	352.1	265.0*	22
			308.2	16
双氟沙星	5.09	400.1	299.1*	26
			356.2	18
沙拉沙星	5.00	386.1	299.1	26
			342.2*	16
恶喹酸	6.06	262.0	216.0*	30
			244.0	19
氟甲喹	6.56	262.1	202.0*	32
			244.0	21
吡哌酸	3.04	304.0	217.0	21

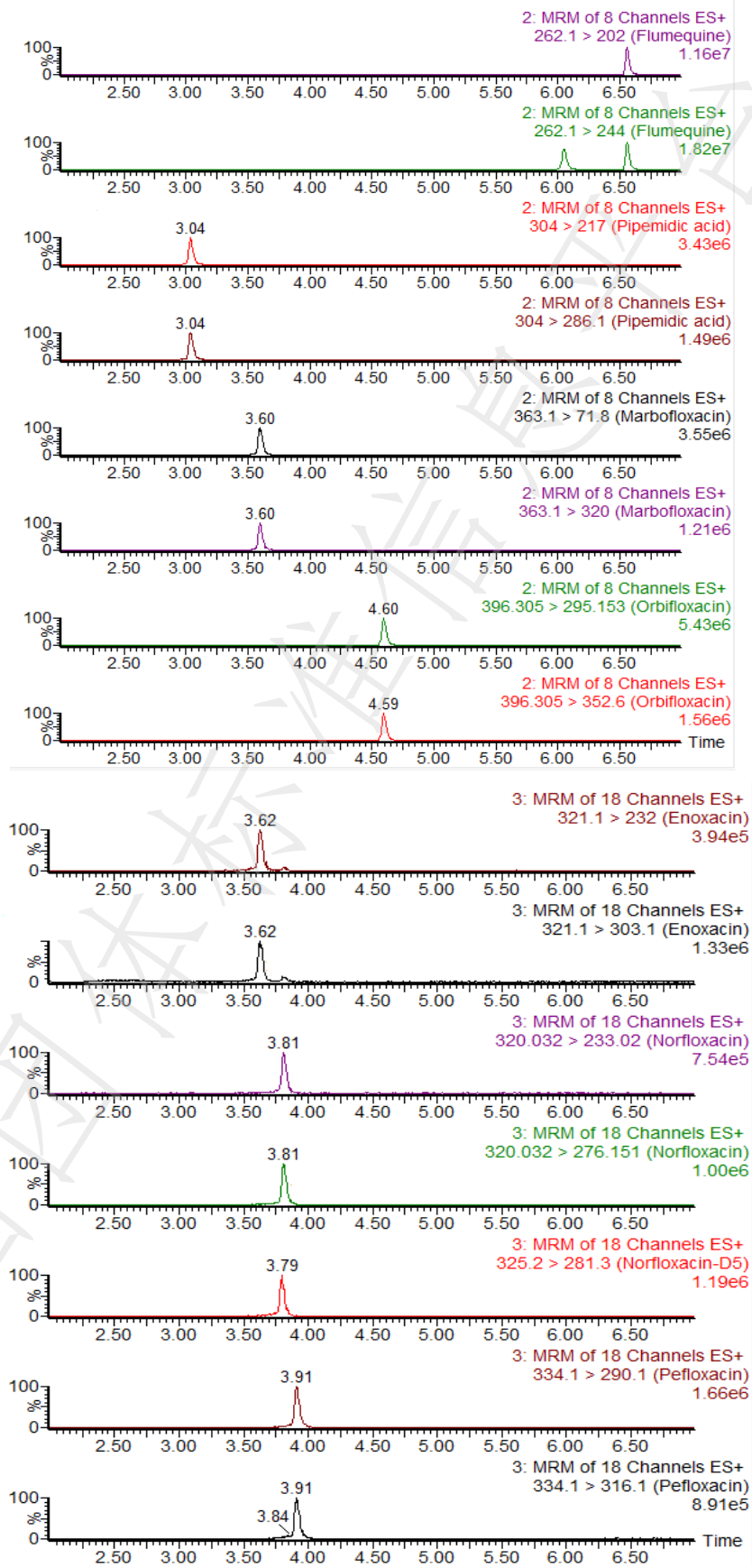
1) 非商业性声明: 附录 A 所列参考质谱条件是在 WATERS XEVO-TQS 型液质联用仪上完成的, 此处列出试验用仪器型号仅为提供参考, 并不涉及商业目的, 鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

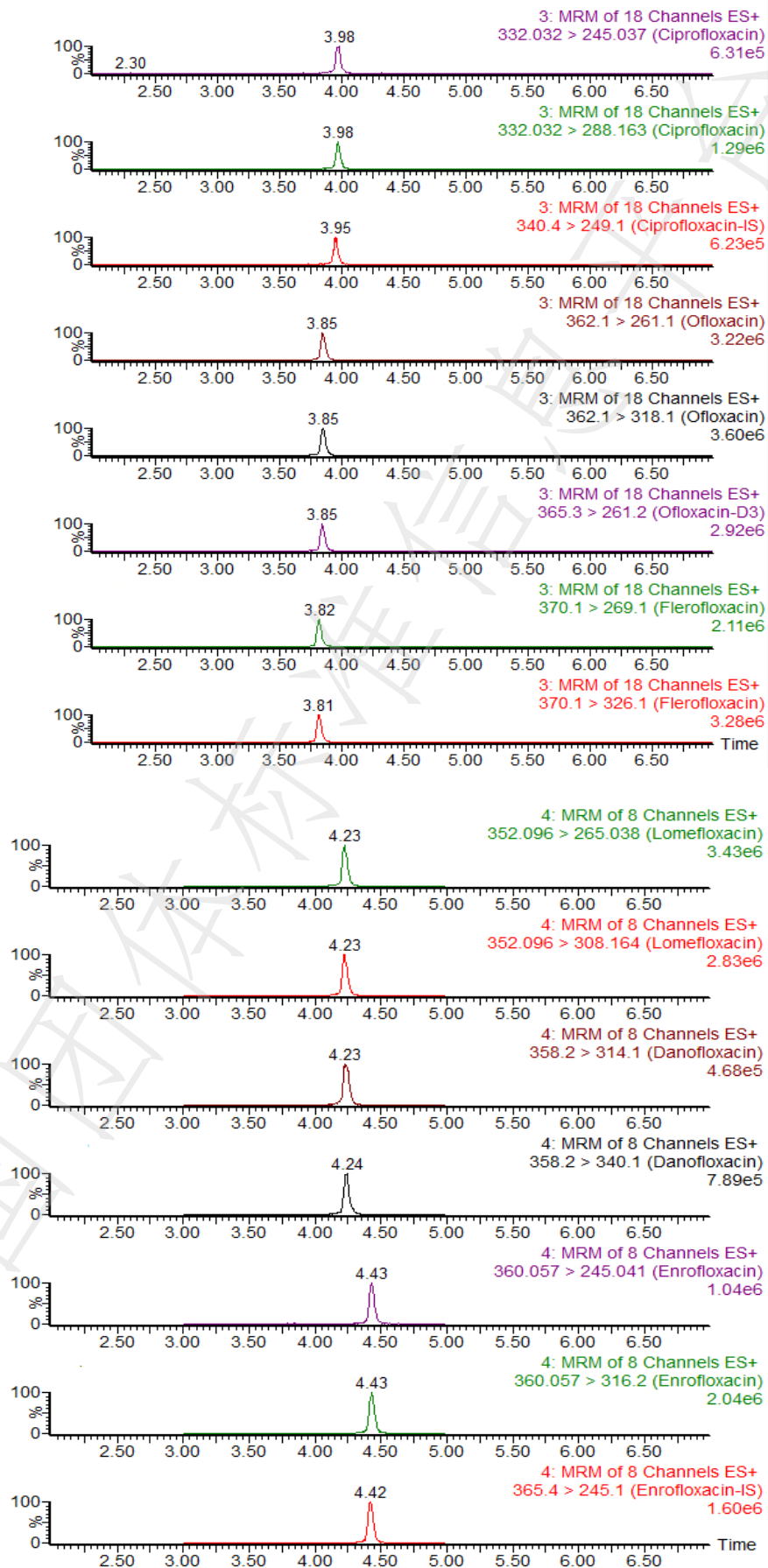
化合物名称	保留时间	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	碰撞能量 /eV
			286.1*	18
丹诺沙星	4.24	358.2	314.1	17
			340.1*	22
司帕沙星	5.14	393.1	292.1*	24
			349.2	20
依诺沙星	3.63	321.1	232.0*	36
			303.1	15
西诺沙星	5.62	263.0	189.0*	26
			245.0	15
萘啶酸	6.51	233.0	186.9*	24
			215.0	14
氟罗沙星	3.82	370.1	269.1	25
			326.1*	19
麻保沙星	3.60	363.1	71.8*	20
			320.0	15
奥比沙星	4.60	396.3	295.2*	24
			352.6	17

注：*为定量离子对，对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

附录 B
(资料性)
标准溶液多反应监测色谱图







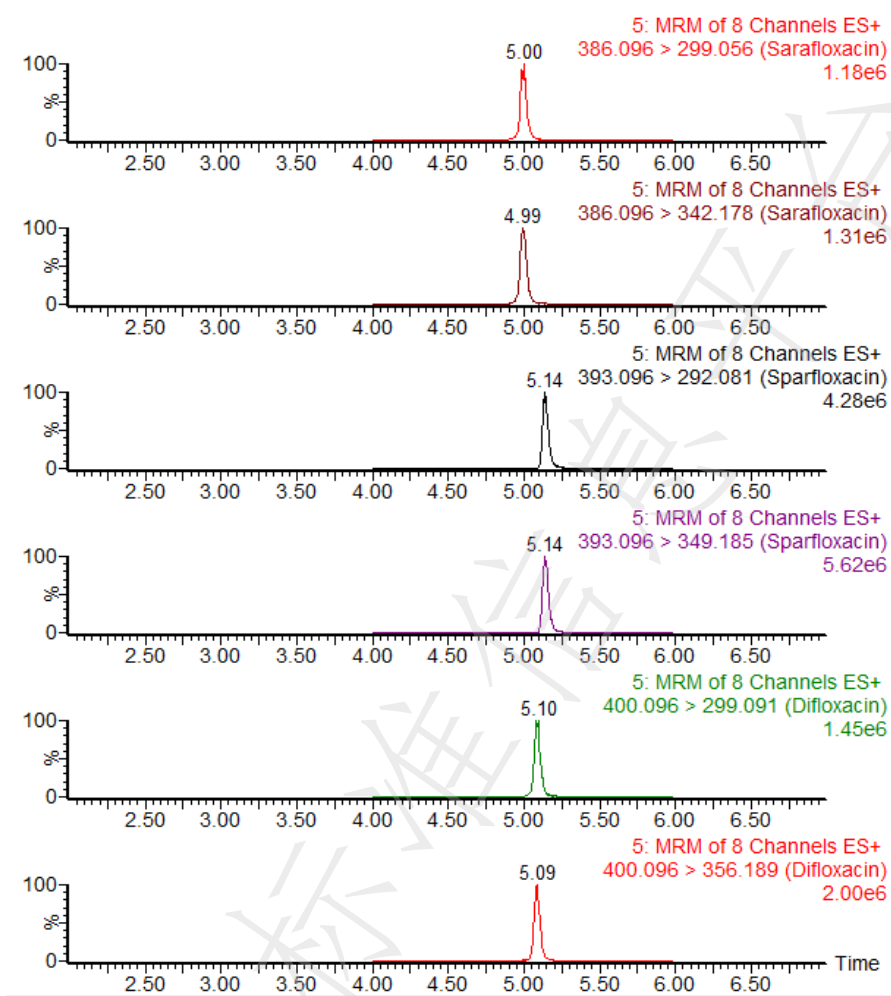


图 B.1 (氟)喹诺酮类药物标准溶液多反应监测色谱图 (10 ng/mL)