

# 中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告 — 14 — 2008

---

## 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测 高效液相色谱法

Determination of fluoroquinolones residues in animal derived food  
by high performance liquid chromatography

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施

---



中华人民共和国农业部 发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 制样 .....	1
3.1 样品的制备 .....	1
3.2 样品的保存 .....	1
4 测定方法 .....	1
4.1 方法提要或原理 .....	1
4.2 试剂和材料 .....	1
4.3 仪器和设备 .....	2
4.4 测定步骤 .....	2
4.5 结果计算和表述 .....	3
5 检测方法灵敏度、准确度、精密度 .....	3
5.1 灵敏度 .....	3
5.2 准确度 .....	3
5.3 精密度 .....	3
附录 A (资料性附录) 高效液相色谱图 .....	4

## 前 言

本标准附录 A 是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：仲锋、刘艳华、汪霞、毕言锋、徐倩、董琳琳、彭莉、岳秀英、高岚。

本标准系首次发布的国家标准。

# 动物性食品中氟喹诺酮类药物 残留检测 高效液相色谱法

## 1 范围

本标准规定了动物性食品中达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星药物残留检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于猪的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏,鸡的肝脏和肾脏组织中达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星药物残留量检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 1.1—2000 标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则 (ISO/IEC Directives, Part 3, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

GB/T 6682 分析实验室用水规则和试验方法

## 3 制样

### 3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

### 3.2 样品的保存

—20℃以下冰箱中贮存备用。

## 4 测定方法

### 4.1 方法提要或原理

用磷酸盐缓冲溶液提取试料中的药物, C<sub>18</sub>柱净化, 流动相洗脱。以磷酸-乙腈为流动相, 用高效液相色谱-荧光检测法测定, 外标法定量。

### 4.2 试剂和材料

以下所用的试剂, 除特别注明者外均为分析纯试剂; 水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 达氟沙星: 含达氟沙星 (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) 不得少于 99.0%。

4.2.2 恩诺沙星: 含恩诺沙星 (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) 不得少于 99.0%。

4.2.3 环丙沙星: 含环丙沙星 (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) 不得少于 99.0%。

4.2.4 沙拉沙星: 含沙拉沙星 (C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 不得少于 99.0%。

4.2.5 磷酸。

4.2.6 氢氧化钠。

4.2.7 乙腈: 色谱纯。

4.2.8 甲醇。

4.2.9 三乙胺。

- 4.2.10 磷酸二氢钾。
- 4.2.11 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠饱和液 28 mL,加水稀释至 100 mL。
- 4.2.12 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液:取 5.0 mol/L 氢氧化钠液 0.6 mL,加水稀释至 100 mL。
- 4.2.13 0.05 mol/L 磷酸/三乙胺溶液:取浓磷酸 3.4 mL,用水稀释至 1 000 mL。用三乙胺调 pH 至 2.4。
- 4.2.14 磷酸盐缓冲溶液(用于肌肉、脂肪组织):取磷酸二氢钾 6.8 g,加水使溶解并稀释至 500 mL,用 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0。
- 4.2.15 磷酸盐溶液(用于肝脏、肾脏组织):取磷酸二氢钾 6.8 g,加水溶解并稀释至 500 mL,pH 为 4.0~5.0。
- 4.2.16 达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星标准储备液:分别取达氟沙星对照品约 10 mg,恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星对照品各约 50 mg,精密称定,用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释成浓度为 0.2 mg/mL(达氟沙星)和 1 mg/mL(恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星)的标准储备液。置 2℃~8℃ 冰箱中保存,有效期为 3 个月。
- 4.2.17 达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星标准工作液:准确量取适量标准储备液用乙腈稀释成适宜浓度的达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星标准工作液。置 2℃~8℃ 冰箱中保存,有效期为 1 周。

### 4.3 仪器和设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪(配荧光检测器)。
- 4.3.2 天平:感量 0.01 g。
- 4.3.3 分析天平:感量 0.000 01 g。
- 4.3.4 振荡器。
- 4.3.5 组织匀浆机。
- 4.3.6 离心机。
- 4.3.7 匀浆杯:30 mL。
- 4.3.8 离心管:50 mL。
- 4.3.9 固相萃取柱:Varian BondElut<sup>®</sup> C<sub>18</sub>柱(100 mg/mL)。
- 4.3.10 微孔滤膜(0.45 μm)。

Ⓢ:提及公司的信息及标识。除非做了说明,并不意味推荐使用该公司的产品。

### 4.4 测定步骤

#### 4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

- 取绞碎后的供试样品,作为供试试料;
- 取绞碎后的空白样品,作为空白试料;
- 取绞碎后空白样品,添加适宜浓度的对照溶液,作为空白添加试料。

#### 4.4.2 提取

取(2±0.05)g 试料,置 30 mL 匀浆杯中,加磷酸盐缓冲溶液 10.0 mL,10 000 r/min 匀浆 1 min。匀浆液转入离心管中,中速振荡 5 min,离心(肌肉、脂肪 10 000 r/min 5 min;肝、肾 15 000 r/min 10 min),取上清液,待用。用磷酸盐缓冲溶液 10.0 mL 洗刀头及匀浆杯,转入离心管,洗残渣,混匀,中速振荡 5 min,离心(肌肉、脂肪 10 000 r/min 5 min;肝、肾 15 000 r/min 10 min)。合并两次上清液,混匀,备用。

#### 4.4.3 净化

固相萃取柱先依次用甲醇、磷酸盐缓冲溶液各 2 mL 预洗。取上清液 5.0 mL 过柱,用水 1 mL 淋洗,挤干。用流动相 1.0 mL 洗脱,挤干,收集洗脱液。经滤膜过滤后作为试样溶液,供高效液相色谱法

测定。

#### 4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星标准工作液,用流动相稀释成浓度分别为 0.005  $\mu\text{g/mL}$ 、0.01  $\mu\text{g/mL}$ 、0.05  $\mu\text{g/mL}$ 、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.3  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$  的对照溶液,供高效液相色谱分析。

#### 4.4.5 测定

##### 4.4.5.1 色谱条件

色谱柱:  $\text{C}_{18}$  250 mm $\times$ 4.6 mm (i. d), 粒径 5  $\mu\text{m}$ , 或相当者;

流动相: 0.05 mol/L 磷酸溶液/三乙胺—乙腈(82+18, v/v), 使用前经微孔滤膜过滤;

流速: 0.8 mL/min;

检测波长: 激发波长 280 nm; 发射波长 450 nm;

柱温: 室温;

进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

##### 4.4.5.2 测定法

取试样溶液和相应的对照溶液,作单点或多点校准,按外标法以峰面积计算。对照溶液及试样溶液中达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,对照溶液和试样溶液的高效液相色谱图分别见附录 A 中图 A.1、图 A.2。

#### 4.4.6 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

#### 4.5 结果计算和表述

按式(1)计算试料中达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星或沙拉沙星的残留量:

$$X = \frac{AC_s V_1 V_3}{A_s V_2 M} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$X$ ——试料中达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星或沙拉沙星的残留量,单位为纳克每克( $\text{ng/g}$ );

$A$ ——试样溶液中相应药物的峰面积;

$A_s$ ——对照溶液中相应药物的峰面积;

$C_s$ ——对照溶液中相应药物的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );

$V_1$ ——提取用磷酸盐缓冲液的总体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$V_2$ ——过  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱所用备用液体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$V_3$ ——洗脱用流动相体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$M$ ——供试试料的质量,单位为克( $\text{g}$ )。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

#### 5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

##### 5.1 灵敏度

达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星在鸡和猪的肌肉、脂肪、肝脏及肾脏组织中的检测限为 20  $\mu\text{g/kg}$ 。

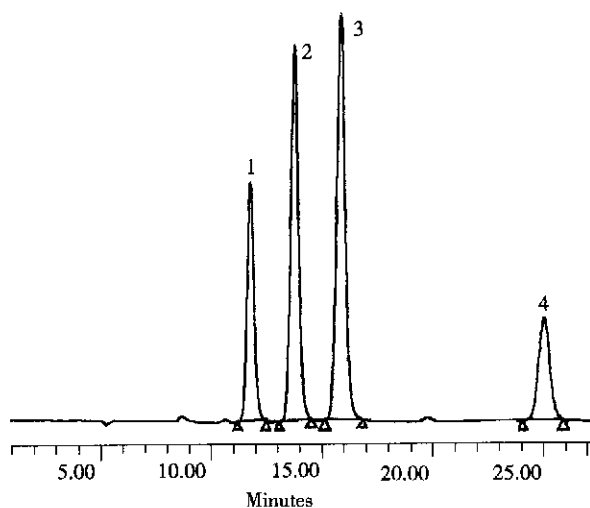
##### 5.2 准确度

本方法在 20  $\mu\text{g/kg}$ ~500  $\mu\text{g/kg}$  添加浓度的回收率为 60%~100%。

##### 5.3 精密度

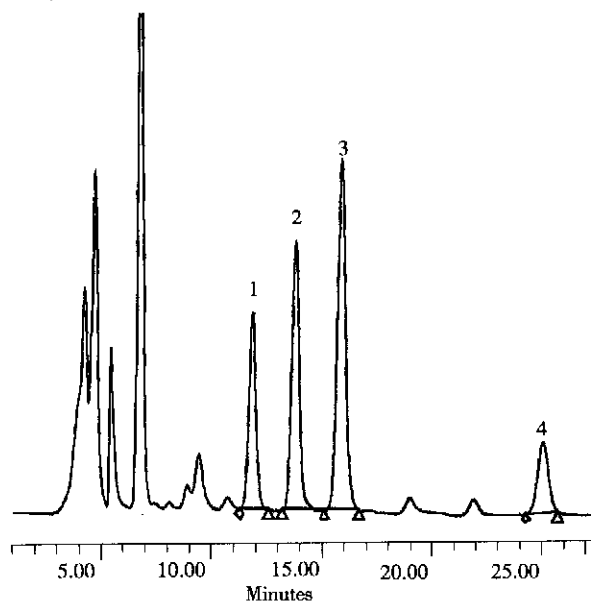
本方法的批内变异系数 $\leq$ 15%,批间变异系数 $\leq$ 20%。

附录 A  
(资料性附录)  
高效液相色谱图



色谱峰：  
1——环丙沙星；  
2——达氟沙星；  
3——恩诺沙星；  
4——沙拉沙星。

图 A. 1 氟喹诺酮类药物对照溶液色谱图



色谱峰：  
1——环丙沙星；  
2——达氟沙星；  
3——恩诺沙星；  
4——沙拉沙星。

图 A. 2 猪肝脏组织中氟喹诺酮类药物色谱图