

中华人民共和国国家标准

农业部 783 号公告—2—2006

水产品中诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星残留量的测定 液相色谱法

Determination of norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin in fishery products
—Liquid chromatography method

2006-12-19 发布

2006-12-19 实施



中华人民共和国农业部 发布



前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部渔业局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会归口。

本标准起草单位：上海水产大学、中国水产科学研究院东海水产研究所。

本标准主要起草人：杨先乐、胡鲲、杨勇、李怡、房文红、于慧娟。

水产品中诺氟沙星、盐酸环丙沙星、 恩诺沙星残留量的测定 液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星的测定方法——液相色谱测定方法。
本标准适用于水产品可食部分中诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星残留量的测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

样品经无水硫酸钠脱水,酸化乙腈提取,离心,取上清液加正己烷除脂肪。蒸干萃取液,流动相溶解残渣,离心取上清液,并经微孔滤膜过滤,用带荧光检测器的高效液相色谱仪测定,外标法定量。

4 试剂

除特殊说明以外,试验用水均符合 GB/T 6682 一级水的要求。

- 4.1 乙腈:色谱纯。
- 4.2 正己烷:分析纯。
- 4.3 四丁基溴化铵:分析纯。
- 4.4 盐酸:分析纯。
- 4.5 酸化乙腈:乙腈:50%盐酸(盐酸与水按照 1:1 的体积比混合配制) = 2 500:20。
- 4.6 无水硫酸钠:分析纯;经 640℃灼烧 4 h 后,存于密闭容器中备用。
- 4.7 诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星标准品:纯度高于 99.0%。
- 4.8 诺氟沙星标准储备液:精确称取 10.0 mg 诺氟沙星,用流动相定容至 100 mL 棕色容量瓶中,于 2℃~8℃保存(保存期不超过 3 个月)。该诺氟沙星标准储备液浓度为 100 μg/mL。
- 4.9 盐酸环丙沙星标准储备液:精确称取 10.0 mg 盐酸环丙沙星,用流动相定容至 100 mL 棕色容量瓶中,保存于 2℃~8℃(保存期不超过 3 个月)。该盐酸环丙沙星标准储备液浓度为 100 μg/mL。
- 4.10 恩诺沙星标准储备液:精确称取 10.0 mg 恩诺沙星,用流动相定容至 100 mL 棕色容量瓶中,保存于 2℃~8℃(保存期不超过 3 个月)。该恩诺沙星标准储备液浓度为 100 μg/mL。
- 4.11 诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星标准工作液:检测前,分别取诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星标准储备液,用流动相稀释成浓度为 0.001 μg/mL~10.00 μg/mL 的标准工作液。
- 4.12 四丁基溴化铵溶液:精确称取 3.22 g 四丁基溴化铵,用水溶解并稀释定容至 1 000 mL 棕色容量瓶中,用磷酸调 pH 3.1,配制成 0.01 mol/L 的四丁基溴化铵溶液,保存于 2℃~8℃(保存期不超过 3 d)。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪,带荧光检测器。

- 5.2 高速组织捣碎机。
- 5.3 旋转蒸发仪。
- 5.4 离心机,4 500 r/min。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 离心管:10 mL,具塞并带刻度。
- 5.7 三角烧瓶:150 mL。
- 5.8 分液漏斗:100 mL。
- 5.9 微孔滤膜:0.45 μm。

6 测定

6.1 制备

鱼,去鳞、去皮,沿脊背取肌肉;虾,去壳,取肌肉部分;贝类,去壳,取可食用部分(包括体液)。样品均质混匀,备用。

6.2 提取

准确称取样品 5 g(精确到 0.01 g),依次加入 30 g 无水硫酸钠和 30 mL 酸化乙腈,用高速组织捣碎机匀浆。将匀浆样品置于带玻璃珠的三角瓶中(2 粒~3 粒/瓶),经摇床振荡 15 min(120 r/min),再转入离心管中,4 500 r/min 离心 15 min,取上清液。往残渣中加入 30 mL 酸化乙腈,重复上述操作一次,合并上清液。

6.3 净化和浓缩

将上清液置于分液漏斗中,加入 25 mL 正己烷,振荡 5 min,充分静置,取下层乙腈层移入烧瓶,55℃ 旋转蒸发至干。用 1.0 mL 流动相充分溶解残渣,移入 1.5 mL 离心管,4 500 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液供高效液相色谱仪测定。

6.4 色谱条件

- 6.4.1 色谱柱:反相色谱柱 C₁₈柱(150 mm×4.6 mm)或相当性能。
- 6.4.2 流动相:乙腈:四丁基溴化铵溶液=5:95(V/V)。
- 6.4.3 流速:1.5 mL/min。
- 6.4.4 激发波长:280 nm,发射波长 450 nm。
- 6.4.5 柱温:40℃。
- 6.4.6 进样量:20 μL。

6.5 色谱测定

根据样品中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量,选定标准工作溶液浓度范围。对标准工作溶液和样液等体积参插进样进行测定。在 6.4 规定的条件下,诺氟沙星保留时间约为 4.8 min,环丙沙星保留时间约为 5.5 min,恩诺沙星 9.4 min(参见附录 A)。

6.6 空白对照试验

除不加试样外,均按测定步骤进行。

7 结果计算与表述

根据标准工作液和样液的峰面积,按式(1)计算样品中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量,计算结果需扣除空白值:

$$C = C_s \times \frac{(\epsilon - \epsilon_0) \times V \times 1\,000}{\epsilon_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C ——样品中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ϵ ——样液中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的峰面积;

ϵ_s ——标准工作溶液中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星峰面积;

ϵ_0 ——空白试验的峰面积;

C_s ——标准工作溶液中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——样品最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品的称取量,单位为克(g)。

8 线性范围、检出限、回收率、精密度

8.1 线性范围

诺氟沙星标准工作液线性范围为 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 5.00 \mu\text{g}/\text{mL}$;环丙沙星标准工作液线性范围为 $0.004 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 4.00 \mu\text{g}/\text{mL}$;恩诺沙星标准工作液线性范围为 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 5.00 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

8.2 检出限

诺氟沙星的最低检出浓度可达到 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,环丙沙星的最低检出浓度可达到 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,恩诺沙星的最低检出浓度可达到 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

8.3 回收率

诺氟沙星的回收率为 $68.5\% \sim 81.3\%$;环丙沙星的回收率为 $65.0\% \sim 83.4\%$;恩诺沙星的回收率为 $70.0\% \sim 80.5\%$ 。

8.4 精密度

诺氟沙星的精密度为 $2.62\% \sim 7.09\%$;环丙沙星的精密度为 $2.63\% \sim 5.95\%$;恩诺沙星的精密度为 $1.24\% \sim 7.95\%$ 。

附录 A

(资料性附录)

诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星色谱图

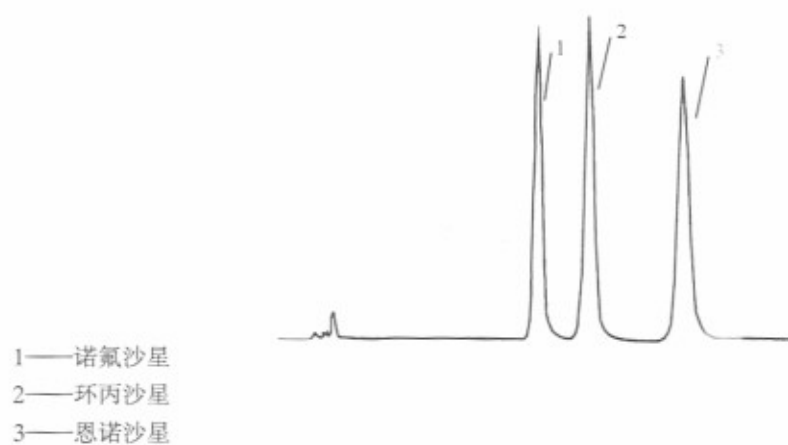


图 A.1 诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星色谱图