

中华人民共和国国家标准

农业部 781 号公告 — 6 — 2006

鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量的测定 高效液相色谱法

The determination of quinolones residues in egg
by HPLC method

2006-12-16 发布

2006-12-16 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位:农业部畜禽产品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人:单吉浩、王海、吴银良、刘素英、刘勇军、侯东军、蔡英华、尤华。

鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了鸡蛋中氟喹诺酮类药物(环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星)含量检测的制样和高效液相色谱法的测定方法。

本标准适用于鸡蛋中氟喹诺酮类药物(环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星)含量的检测。

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文本。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—2001 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 structure and drafting of International Standard, NEQ)。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规则实验方法。

中华人民共和国农业部公告第 235 号 动物性食品中兽药最高残留限量。

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜的鸡蛋,将蛋清和蛋黄搅拌均匀。

3.2 样品的保存

-20℃冰箱中储存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

均浆后的鸡蛋样品经提取液提取,用正己烷脱脂,再经过 C_{18} 固相萃取柱进一步净化,用合适的溶剂选择洗脱其中的氟喹诺酮类药物,供高效液相色谱定量(荧光检测器)测定。外标法定量。

4.2 试剂和材料

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

4.2.1 环丙沙星 含环丙沙星($C_{17}H_{18}FN_3O_3$)不得少于 99.0%

4.2.2 达氟沙星 含达氟沙星($C_{19}H_{20}FN_3O_3$)不得少于 99.0%

4.2.3 恩诺沙星 含恩诺沙星($C_{18}H_{20}FN_3O_3$)不得少于 99.0%

4.2.4 沙拉沙星 含沙拉沙星($C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$)不得少于 99.0%

4.2.5 乙腈:色谱纯。

4.2.6 正己烷。

4.2.7 三乙胺。

4.2.8 氢氧化钠。

4.2.9 磷酸二氢钾。

4.2.10 氢氧化钠溶液 5.0 mol/L:取氢氧化钠饱和溶液 28 mL,加水稀释到 100 mL。

4.2.11 氢氧化钠溶液 0.03 mol/L:取氢氧化钠 0.6 g,加水稀释到 500 mL。

4.2.12 磷酸/三乙胺溶液 0.05 mol/L(pH2.4):取 85%的磷酸 3.4 mL,加水稀释到 1 000 mL,搅拌下滴加三乙胺,调 pH 至 2.4。

4.2.13 乙腈(30%)—缓冲液:量取 30 mL 乙腈和 70 mL 的 0.05 mol/L 磷酸/三乙胺溶液(pH2.4),混合震荡保存。

4.2.14 磷酸盐提取液:称取磷酸二氢钾 6.8 g,加水溶解并稀释至 500 mL,用 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0。

4.2.15 环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准储备液:称取环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星约 10 mg,105℃干燥 4 h,精密称量,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加氢氧化钠溶液(0.03 mol/L)溶解并稀释至刻度,摇匀,配置成浓度为 0.2 mg/mL 的储备液,置 4℃冰箱中保存。有效期为 3 个月。

4.2.16 环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准工作液:临用前,准确量取适量环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准储备液,用流动相稀释成适宜浓度的环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准工作液。

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 分析天平 感量 0.000 01 g。

4.3.3 天平 感量 0.01 g。

4.3.4 涡旋震荡混合器。

4.3.5 组织匀浆器。

4.3.6 离心管 50 mL。

4.3.7 固相萃取装置。

4.3.8 离心机。

4.3.9 C₁₈固相萃取柱 300 mg/mL,含碳量大于 16%,或等效于。

4.3.10 滤膜(0.2 μm)。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取匀浆后的供试样品,作为供试材料。

——取匀浆后的空白样品,作为空白材料。

——取匀浆后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取(2±0.05) g 试料,置于匀浆杯中,加磷酸盐提取液 2.0 mL,搅匀振荡混合 10 min,5 000 r/min 下离心 10 min。上清液转入另一离心管中。用磷酸盐提取液 2.0 mL 洗残渣,搅匀,振荡,离心。合并上层清液于同一离心管中,加入 10 mL 水饱和的正己烷,振荡 5 min,5 000 r/min 下离心 10 min,用吸管将上层正己烷絮凝状固体仔细吸净弃去。在下层溶液中再加入 10 mL 水饱和的正己烷,振荡,离心。弃去上层正己烷,下层为备用液。

4.4.3 净化

C₁₈固相萃取柱依次用 5 mL 乙腈,5 mL 乙腈(30%)—缓冲液和 5 mL 磷酸盐提取液润洗。备用液过柱,用 5 mL 水洗,真空抽干。加 1 mL 流动相洗脱,真空抽干,收集洗脱液作为试样溶液,溶液过滤膜后,供高效液相色谱分析。

在淋洗和洗脱过程中流速控制在 1 mL/min 左右。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准工作液,用流动相稀释成浓度为 0.005、0.01、0.02、0.10、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星标准溶液,准确量取适量达氟沙星标准工作液,用流动相稀释成浓度为 0.001、0.002、0.01、0.02、0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 达氟沙星标准溶液,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: C_{18} 250 mm $\times$ 4.6 mm(i.d.), 粒径 5 μm , 或相当者。

流动相: 0.05 mol/L 磷酸/三乙胺溶液—乙腈(81+19); 用前过 0.45 μm 滤膜。

流速: 1.0 mL/min。

检测波长: 激发波长 280 nm; 发射波长 450 nm。

进样量: 20 μL 。

4.4.5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样溶液中的环丙沙星、达氟沙星、恩诺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,药物的出峰先后顺序依次为环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星,空白溶液、标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录 A 中图 A.1、图 A.2 和 A.3。

4.4.6 空白实验

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)计算供试料中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的残留量($\mu\text{g/kg}$)。

$$X = \frac{AC_S V}{A_S M} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试料中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的残留量($\mu\text{g/kg}$);

A ——试样溶液中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的峰面积;

A_S ——标准溶液中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的峰面积;

C_S ——标准工作液中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的浓度(ng/mL);

V ——试样溶液体积(mL);

M ——组织样品的质量(g)。

注:计算结果需扣除空白试料值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留至小数点后 2 位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡蛋中的环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星检测限为 10 $\mu\text{g/kg}$,达氟沙星检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。

5.2 准确度

本方法环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星在 10~50 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为 70%~100%。达氟沙星在 2~10 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为 70%~100%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\text{CV} \leq 10\%$,批间变异系数 $\text{CV} \leq 15\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

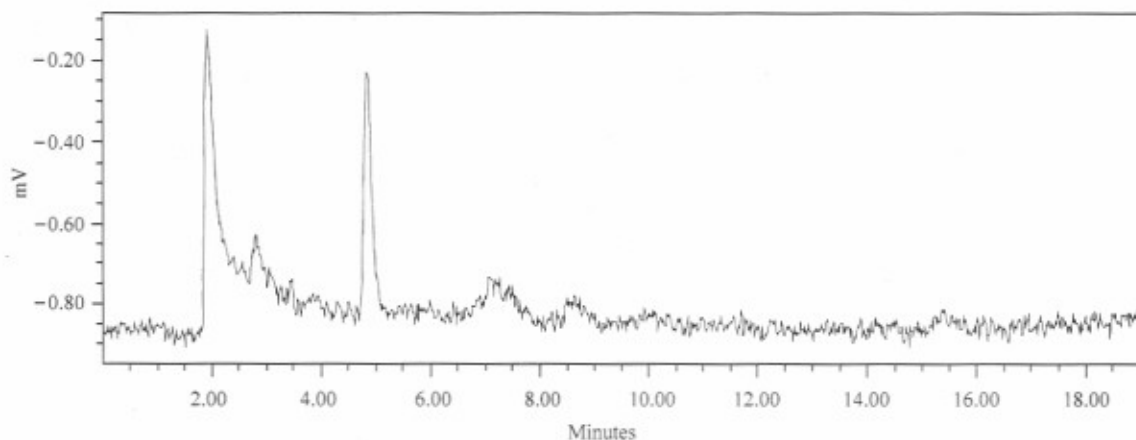


图 A.1 空白鸡蛋中的液相色谱图

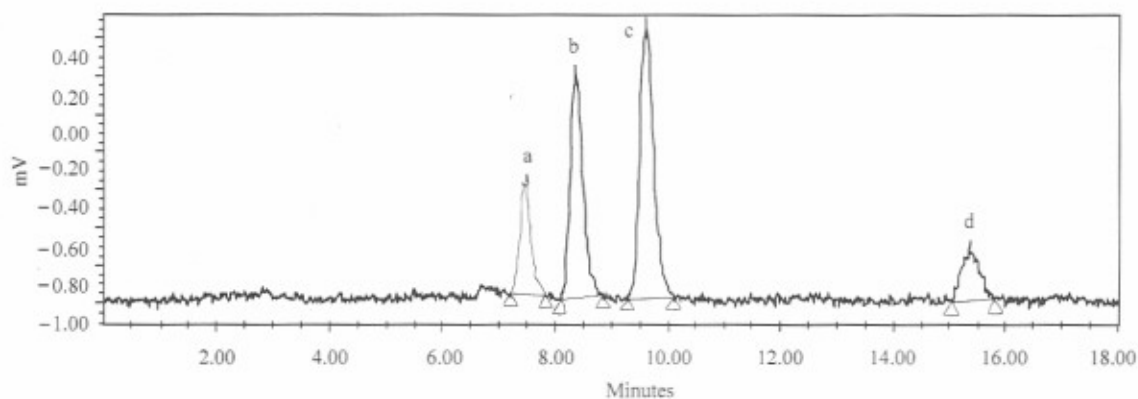


图 A.2 环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星后的标准溶液液相色谱图
(依次为 a. 环丙沙星 b. 达氟沙星 c. 恩诺沙星 d. 沙拉沙星, 环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 达氟沙星浓度为 2 $\mu\text{g/L}$)

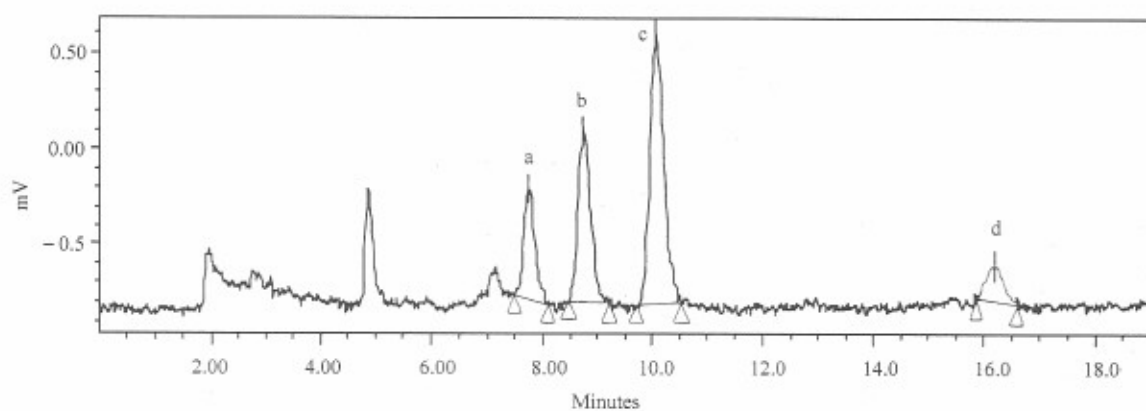


图 A.3 空白鸡蛋中添加环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星后的液相色谱图
(依次为 a. 环丙沙星 b. 达氟沙星 c. 恩诺沙星 d. 沙拉沙星, 环丙沙星、
恩诺沙星和沙拉沙星添加浓度为 $5 \mu\text{g/L}$, 达氟沙星浓度为 $2 \mu\text{g/L}$)