

中华人民共和国国家标准

GB 29692—2013

食品安全国家标准 牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定 高效液相色谱法

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定 高效液相色谱法

方法一

1 范围

本方法规定了牛奶中喹诺酮类药物残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本方法适用于牛奶中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星单个或多个药物残留量检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中残留的喹诺酮类药物,用乙腈提取,旋转蒸发至近干,流动相溶解。高效液相色谱-荧光测定,外标法定量。

4 试剂与材料

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 规定的一级水。

4.1 达氟沙星、恩诺沙星、盐酸环丙沙星、盐酸沙拉沙星和盐酸二氟沙星对照品:含量 $\geqslant 99.0\%$ 。

4.2 磷酸。

4.3 氢氧化钠。

4.4 乙腈:色谱纯。

4.5 三乙胺。

4.6 氢氧化钠饱和溶液:取氢氧化钠适量,加水振摇使成饱和溶液,冷却后,置聚乙烯塑料瓶中,静置,澄清。

4.7 5 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠饱和溶液 28 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

4.8 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液:取 5 mol/L 氢氧化钠溶液 0.6 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

4.9 0.05 mol/L 磷酸三乙胺溶液:取磷酸 3.4 mL,用水溶解并稀释至 1 000 mL。用三乙胺调 pH 至 2.4。

4.10 喹诺酮类药物混合标准贮备液:精密称取达氟沙星对照品 10 mg,恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星和二氟沙星对照品各 50 mg,于 50 mL 量瓶中,用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度,配制成达氟沙星浓度为 0.2 mg/mL,环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星浓度为 1 mg/mL 的喹诺酮类

药物混合标准贮备液。2 ℃~8 ℃保存,有效期3个月。

4.11 喹诺酮类药物混合标准工作液:精密量取喹诺酮类药物混合标准贮备液1.0 mL,于100 mL量瓶中,用流动相稀释,配制成达氟沙星浓度为2 μg/mL,环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星浓度为10 μg/mL的喹诺酮类药物混合标准工作液。2 ℃~8 ℃保存,有效期1周。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

5.2 分析天平:感量0.000 01 g。

5.3 天平:感量0.01 g。

5.4 振荡器。

5.5 离心机。

5.6 聚四氟乙烯离心管:50 mL。

5.7 鸡心瓶:25 mL。

5.8 滤膜:0.45 μm。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶,混合均匀。

——取均质后的供试样品,作为供试试料。

——取均质后的空白样品,作为空白试料。

——取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试料2 g±0.05 g,于50 mL离心管中,加磷酸100 μL,乙腈4 mL,涡旋混匀,中速振荡5 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液于另一离心管中,加正己烷5 mL,涡旋1 min,静置,取下层清液于25 mL鸡心瓶中。残渣中加乙腈4 mL,重复提取一次,上清液经同一份正己烷分配,合并两次提取液,于50℃旋转蒸发至仅剩余不易蒸干的黄色油滴。用流动相1.0 mL溶解残余物,滤膜过滤,供高效液相色谱法测定。

7.2 标准曲线制备

精密量取喹诺酮类药物混合标准工作液适量,用流动相稀释,配制成浓度环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星为5、10、50、100、300和500 μg/L,达氟沙星浓度为1、2、10、20、60和100 μg/L的系列标准溶液,供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.3 测定

7.3.1 色谱条件

- 7.3.1.1 色谱柱: C₁₈(250 mm×4.6 mm, 粒径 5 μm), 或相当者。
 - 7.3.1.2 流动相: 0.05 mol/L 磷酸溶液-三乙胺+乙腈(90+10, 体积比), 滤膜过滤。
 - 7.3.1.3 流速: 1.8 mL/min。
 - 7.3.1.4 检测波长: 激发波长 280 nm; 发射波长 450 nm。
 - 7.3.1.5 柱温: 30 °C。
 - 7.3.1.6 进样量: 20 μL。

7.3.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法，以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液和空白组织添加试样溶液的高效液相色谱图见附录 A。

7.4 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。

8 结果计算和表述

试料中喹诺酮类药物残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$)按式(1)计算:

式中：

X ——供试物料中相应的喹诺酮类药物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——试样溶液中相应的喹诺酮类药物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V——溶解残渣所用流动相体积,单位为毫升(mL);

m ——供试试料质量,单位为克(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。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星的检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 达氟沙星的检测限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 60%~100%。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

方法二

10 范围

本方法规定了牛奶中 11 种喹诺酮类药物残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本方法适用于牛奶中恩诺沙星、环丙沙星、达氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、氟甲喹和噁唑酸单个或多个药物残留检测。

11 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 6682 分析实验室用水规格和实验方法

12 原理

试料中残留的喹诺酮类药物，用 10% 三氯乙酸-乙腈提取，反相聚合物 SPE 柱净化，流动相溶解，高效液相-荧光法测定，外标法定量。

13 试剂和材料

以下所有试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

13.1 恩诺沙星、盐酸环丙沙星、甲磺酸达氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、甲磺酸培氟沙星、盐酸洛美沙星、氟甲喹和噁唑酸对照品：含量 $\geq 98.0\%$ 。

13.2 乙腈：色谱纯。

13.3 甲醇：色谱纯。

13.4 无水乙醇。

13.5 乙酸。

13.6 柠檬酸。

13.7 乙酸铵。

13.8 三乙胺。

13.9 氢氧化钠。

13.10 三氯乙酸。

13.11 SPE 反相聚合物柱：Strata-X 填料，60 mg/3 mL，或相当者。

13.12 10% 乙酸溶液：取乙酸 10 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

13.13 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 2 g，用水溶解并稀释至 100 mL。

13.14 10% 三氯乙酸溶液：取三氯乙酸 100 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL。

13.15 乙腈-10% 三氯乙酸溶液：取乙腈 10 mL，用 10% 三氯乙酸溶液溶解并稀释至 100 mL。

13.16 10% 甲醇水溶液：取甲醇 10 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

13.17 柠檬酸/乙酸铵缓冲液：取柠檬酸 10.56 g、乙酸铵 7.87 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL，用三乙胺调 pH 至 4.0，滤膜过滤。

13.18 乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液：取乙腈 8 mL，用柠檬酸/乙酸铵缓冲液溶解并稀释至 100 mL。

13.19 1 mg/mL 诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星标准贮备液:精密称取诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星对照品各适量,分别于 10 mL 量瓶中,用乙酸溶液 200 μL 溶解,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的喹诺酮类药物标准贮备液。-20℃以下保存,有效期 6 个月。

13.20 1 mg/mL 环丙沙星、洛美沙星、培氟沙星和达氟沙星标准贮备液:精密称取盐酸环丙沙星、盐酸洛美沙星、甲磺酸培氟沙星和甲磺酸达氟沙星对照品各适量,分别于 10 mL 量瓶中,用水 200 μL 溶解,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的喹诺酮类药物标准贮备液。-20℃以下保存,有效期 6 个月。

13.21 1 mg/mL 噻唑酸和氟甲喹标准贮备液:精密称取噻唑酸和氟甲喹对照品适量,分别于 10 mL 量瓶中,用氢氧化钠溶液 400 μL 溶解,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的喹诺酮类药物标准贮备液。-20℃以下保存,有效期 6 个月。

13.22 喹诺酮类药物混合标准工作液:精密量取喹诺酮类药物标准贮备液各适量,于量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,配制成诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星和噻唑酸浓度为 8 μg/mL,氟甲喹浓度为 4 μg/mL,达氟沙星浓度为 2.4 μg/mL 的混合标准工作液。2℃~8℃保存,有效期 1 个月。

14 仪器和设备

14.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

14.2 分析天平:感量 0.000 01 g。

14.3 天平:感量 0.01 g。

14.4 均质机。

14.5 旋涡混合仪。

14.6 超声波水浴。

14.7 高速冷冻离心机。

14.8 氮气吹干浓缩仪。

14.9 固相萃取装置。

14.10 滤膜:0.45 μm。

14.11 聚丙烯离心管。

15 试样的制备与保存

15.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶,混合均匀。

——取均质后的供试样品,作为供试试料。

——取均质后的空白样品,作为空白试料。

——取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

15.2 试料的保存

-20℃以下保存。

16 测定步骤

16.1 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量,用水稀释,旋涡混匀,使达氟沙星浓度为15、30、60、120、240和480 μg/L,氟甲喹浓度为25、50、100、200、400和800 μg/L,其他喹诺酮类药物浓度为50、100、200、400、800和1 600 μg/L的系列标准溶液,供高效液相色谱测定。以峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

16.2 提取

称取试料1 g±0.02 g,于15 mL聚丙烯离心管中,加乙腈-10%三氯乙酸溶液5 mL,旋涡混匀,超声5 min,于4 ℃ 8 000 r/min离心6 min,取上清液,备用。

16.3 净化

SPE柱依次用甲醇3 mL和水3 mL活化,取备用液过柱,控制流速1 mL/min,用10%甲醇水溶液3 mL淋洗,抽干,用甲醇3 mL洗脱,抽干。收集洗脱液,于60 ℃~70 ℃氮气吹干,用乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液500 μL溶解残余物,涡旋混匀,于4℃以下12 000 r/min离心6 min,取上清液,供高效液相色谱测定。

16.4 测定

16.4.1 色谱条件

16.4.1.1 色谱柱:C₁₈(250 mm×4.6 mm,粒径5 μm),或相当者。

16.4.1.2 流动相:乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液,梯度洗脱见表1。

表 1 流动相梯度洗脱变化设置

时间 min	流量 mL/min	乙腈 %	柠檬酸/乙酸铵缓冲液 %	曲线
0.01	2.0	8	92	—
30.0	2.0	55	45	9
32.0	2.0	8	92	—
35.0	2.0	8	92	—

16.4.1.3 柱温:50 ℃。

16.4.1.4 进样量:20 μL。

16.4.1.5 荧光检测器:程序波长变化设置见表2。

16.4.1.6 延迟5 min后进下一试样。

表 2 荧光波长程序变化设置

时间 min	激发波长 Ex nm	发射波长 Em nm
0	278	465
23.4	312	366
32.0	278	465

16.4.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按外标法,以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中喹诺酮类药物响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液和空白组织添加试样溶液的高效液相色谱图分别见附录 B。

16.5 空白试验

除不加试剂外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

17 结果计算和表述

17.1 标准曲线校准

将标准曲线的浓度和对应峰面积进行回归分析,然后按式(2)计算:

式中：

X——供试物料中相应的喹诺酮类药物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A——供试试料中相应的喹诺酮药物处理后试样溶液中被测喹诺酮类药物的色谱峰面积；

b——标准曲线回归方程中截距；

a ——标准曲线回归方程中斜率。

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。

17.2 单点校准

试料中喹诺酮药物残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$)按式(3)计算:

式中：

X_i ——供试物料中相应的喹诺酮类药物的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c_s —标准溶液中相应的喹诺酮类药物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_i —试样溶液中相应的喹诺酮类药物的色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中相应的喹诺酮类药物的色谱峰面积；

V——溶解残余物所用乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液体积,单位为毫升(mL);

m——供试试料质量,单位为克(g)。

18 检测方法灵敏度、准确度与精密度

18.1 灵敏度

本方法诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星和噁唑酸检测限为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$; 达氟沙星的检测限为 $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$; 氟甲喹检测限为 $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

18.2 准确度

本方法诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁唑酸在 $50 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 200 \mu\text{g}/\text{kg}$, 达氟沙星在 $15 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 氟甲喹在 $25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 110\%$ 。

18.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
色谱图

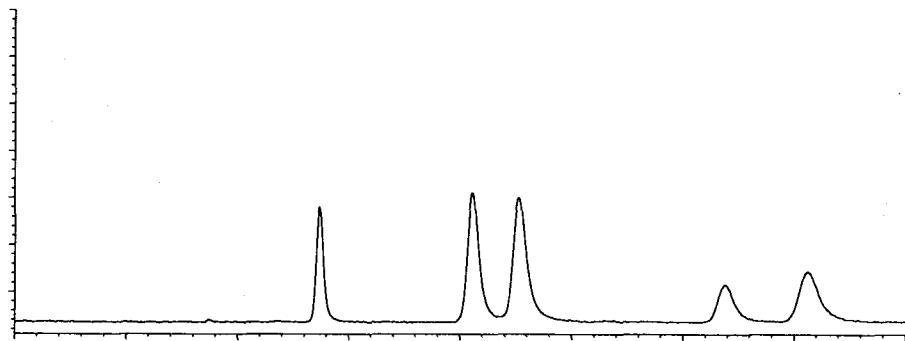


图 A.1 喹诺酮类药物对照溶液色谱图($20 \mu\text{g}/\text{L}$)

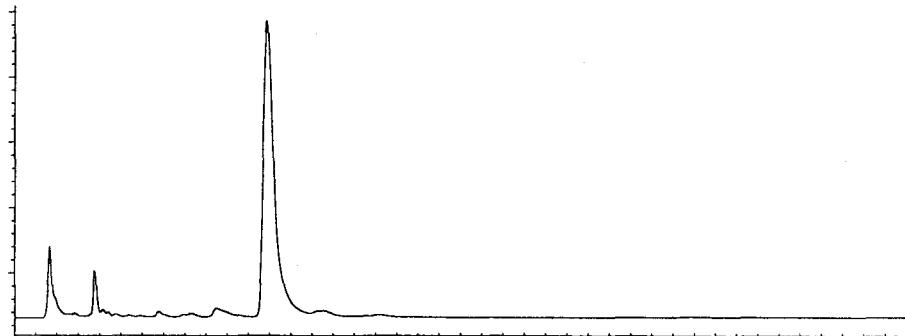
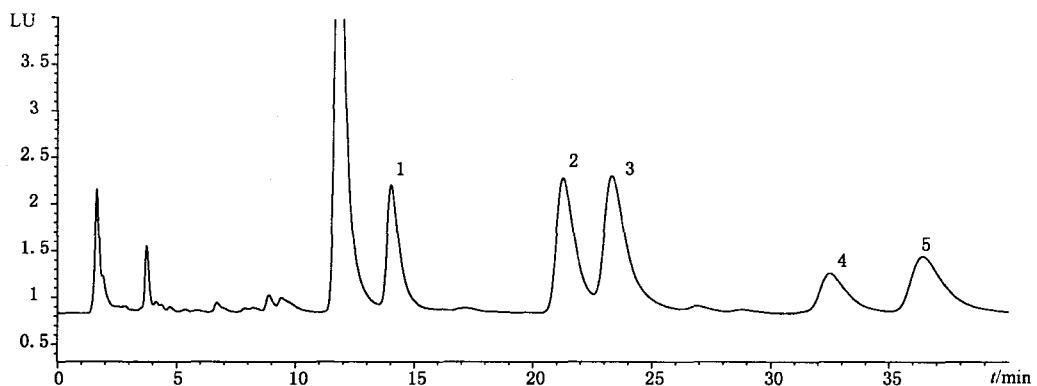


图 A.2 牛奶空白试样色谱图



说明：

- 1——环丙沙星；
- 2——达氟沙星；
- 3——恩诺沙星；
- 4——沙拉沙星；
- 5——二氟沙星。

图 A.3 牛奶空白添加喹诺酮类药物试样色谱图($100 \mu\text{g}/\text{kg}$)

附录 B
色谱图

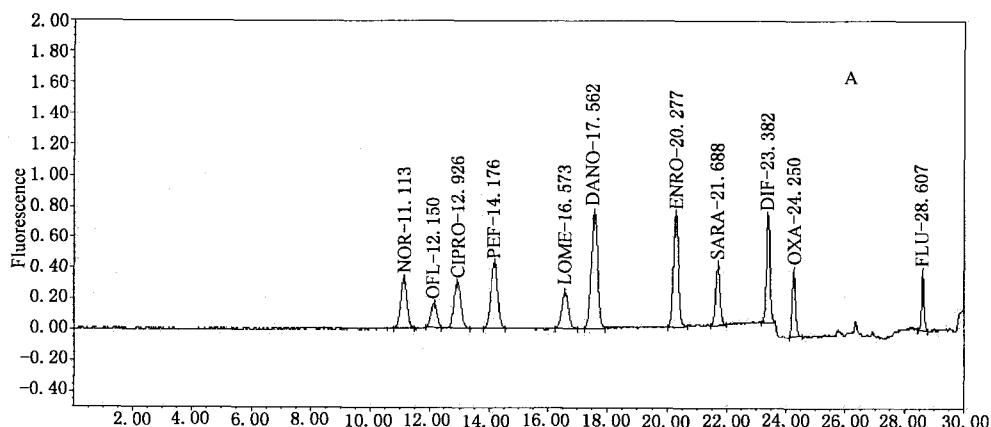


图 B.1 喹诺酮类药物基质匹配标准溶液色谱图

(诺氟沙星 NOR、氧氟沙星 OFL、环丙沙星 CIPRO、培氟沙星 PEF、洛美沙星 LOME、恩诺沙星 ENRO、沙拉沙星 SARA、二氟沙星 DIF 和噁喹酸 OXA 的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、达氟沙星 DANO 为 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、氟甲喹 FLU 为 50 $\mu\text{g}/\text{L}$)

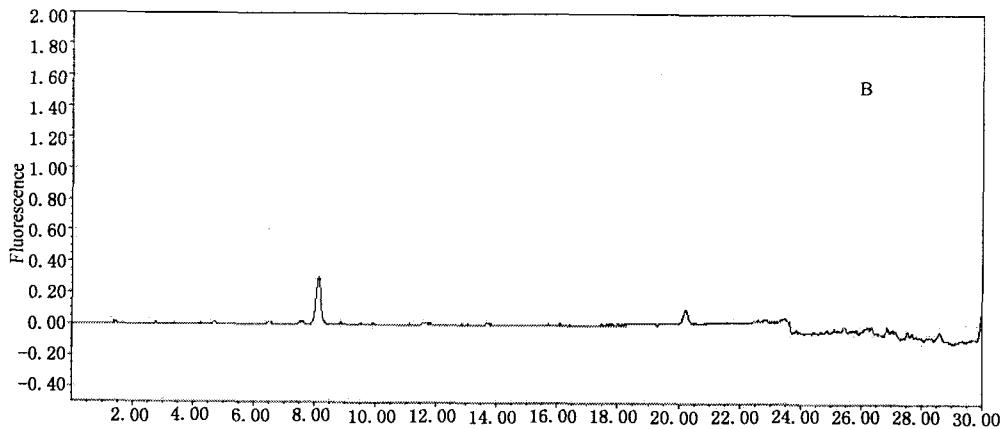


图 B.2 牛奶空白试样色谱图

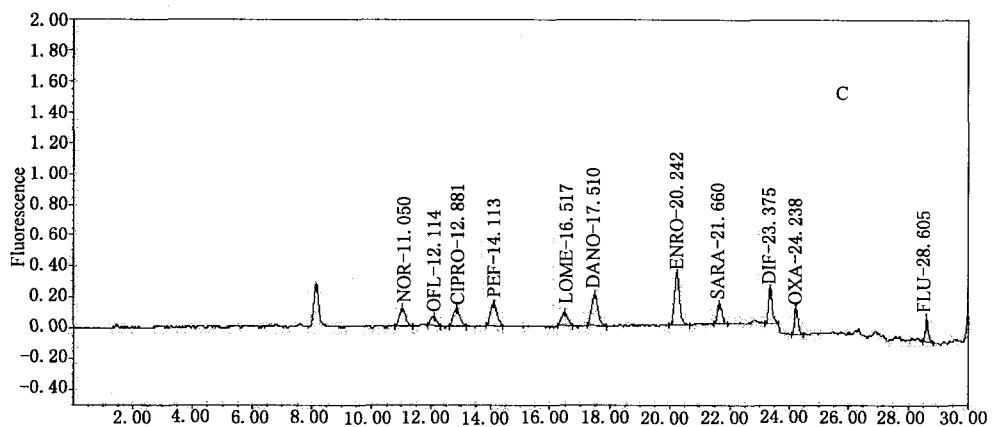


图 B.3 牛奶空白添加喹诺酮类药物试样色谱图

(NOR、OFL、CIPRO、PEF、LOME、ENRO、SARA、DIF 和 OXA 为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$, DANO 为 $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, FLU 为 $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$)