



中华人民共和国国家标准

GB 31656.3—2025

代替 GB 31656.3—2021

食品安全国家标准 水产品中环 丙沙星、恩诺沙星、噁啉酸、氟甲喹 残留量的测定 高效液相色谱法

National food safety standard—
Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin, oxolinic acid and flumequine
residues in aquatic products by high performance liquid chromatography

2025-06-03 发布

2025-09-01 实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布
国家市场监督管理总局

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。

本文件代替 GB 31656.3—2021《水产品中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、噁唑酸、氟甲喹残留量的测定 高效液相色谱法》，与 GB 31656.3—2021 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

a) 删除了定量限不满足限量要求的诺氟沙星和氧氟沙星。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——GB 31656.3—2021；

——本文件为第一次修订。

食品安全国家标准

水产品中环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹残留量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了水产品中环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于鱼类肌肉和皮等可食组织,虾、蟹、贝类的可食组织中环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹残留量的检测。其他水产品的检测可参照执行。

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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹,经酸化乙腈提取,正己烷脱脂, C_{18} 固相萃取柱净化,液相色谱-荧光检测法测定,外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.3 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

5.1.4 盐酸(HCl)。

5.1.5 磷酸(H_3PO_4)。

5.1.6 氨水($NH_3 \cdot H_2O$)。

5.1.7 氢氧化钠(NaOH)。

5.1.8 二水合磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)。

5.1.9 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

5.1.10 四丁基溴化铵($C_{16}H_{36}BrN$)。

5.2 标准品

环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹:含量 $\geq 98.0\%$,详见附录 A。

5.3 溶液配制

- 5.3.1 盐酸溶液:取盐酸 50 mL,加水稀释至 100 mL,混匀。
- 5.3.2 磷酸溶液:取磷酸 1 mL,加水稀释至 10 mL,混匀。
- 5.3.3 酸化乙腈溶液:取乙腈 250 mL,加盐酸溶液 2 mL,充分混匀。
- 5.3.4 乙腈饱和正己烷溶液:取正己烷 200 mL 于 250 mL 分液漏斗中,加适量乙腈后,剧烈振摇,待分配平衡后,弃去乙腈层,即得。
- 5.3.5 0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 9 mL,用水稀释至 1 000 mL。
- 5.3.6 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 4 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.3.7 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液:取二水合磷酸二氢钠 1.56 g,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 79 mL 溶解,用水稀释至 200 mL。
- 5.3.8 0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液(pH 3.0):取四丁基溴化铵 3.22g,加水 900 mL 使溶解,用磷酸溶液调节 pH 到 3.0,用水稀释至 1 000 mL。
- 5.3.9 洗脱液:取氨水 25 mL,用甲醇稀释至 100 mL。

5.4 标准溶液制备

- 5.4.1 环丙沙星、恩诺沙星标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):取环丙沙星、恩诺沙星各约 10 mg,精密称定,用甲醇溶解并稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶中,摇匀,即得。—18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。
- 5.4.2 噁喹酸、氟甲喹标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):取噁喹酸、氟甲喹各约 10 mg,精密称定,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL 使溶解,加乙腈稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶中,摇匀,即得。—18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。
- 5.4.3 混合标准工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精密量取环丙沙星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹标准储备液各 1 mL,于 10 mL 棕色容量瓶中,用流动相 A 稀释至刻度,摇匀,配制浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

C_{18} 固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。
- 6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.3 氮吹仪。
- 6.4 超声波振荡器。
- 6.5 均质器:15 000 r/min。
- 6.6 离心机:4 000 r/min。
- 6.7 尼龙微孔滤膜:0.22 μm 。
- 6.8 梨形瓶:100 mL。
- 6.9 分液漏斗:250 mL。
- 6.10 旋转蒸发器。
- 6.11 分液漏斗振摇器。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 中附录 B 的要求制样。

- a) 取均质的供试样品,作为供试试样;
- b) 取均质的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

−18℃以下保存,3个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料(5±0.05)g,加酸化乙腈溶液 20 mL、无水硫酸钠 10 g,高速均质 1 min~2 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液至分液漏斗,用酸化乙腈溶液 20 mL,清洗刀头并溶解沉淀,重复提取 2 次,合并上清液。加乙腈饱和正己烷溶液 60 mL,置分液漏斗振荡器(150 r/min)上振荡 20 min,静置,取下层乙腈至梨形瓶,40℃旋转蒸发至干。加磷酸盐缓冲液 4 mL,超声振荡 1 min,静置 30 s,溶液转移至 15 mL 离心管。再重复提取残余物 2 次,溶液转移至同一离心管,合并 3 次残余物溶解液,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

8.2 净化

取 C₁₈ 固相萃取柱,依次用甲醇、水、磷酸盐缓冲液各 3 mL 活化。取上述备用液过柱,流速控制为每秒 1 滴。水 3 mL 淋洗,抽干,加洗脱液 5 mL,收集洗脱液,50℃氮气吹干,加流动相 A 1.0 mL 使溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,高效液相色谱测定。

8.3 标准曲线的制备

分别精密量取混合标准工作液适量,用流动相 A 稀释成浓度分别为 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL 的系列标准溶液,供高效液相色谱分析;现用现配。以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标,制作标准曲线。

8.4 测定

8.4.1 色谱参考条件

- 色谱柱:C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),或相当者;
- 流动相:A 为 0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液-乙腈(94:6,V/V),B 为乙腈,梯度洗脱程序见表 1;

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	100	0
14	100	0
15	60	40
24	60	40
25	100	0
30	100	0

- 流速:0.9 mL/min;
- 柱温:35℃;
- 进样量:10 μL;
- 检测波长:时间程序见表 2。

表 2 检测波长时间程序

时间 min	激发波长 nm	发射波长 nm
0	280	480
18.5	325	365

8.4.2 测定法

取试料溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,以相应药物的保留时间定性,被测试样中环丙沙

星、恩诺沙星、噁喹酸、氟甲喹色谱峰保留时间与相应标准溶液色谱峰的保留时间相比,相差应在±0.1 min内。按外标法以峰面积计算。标准溶液及试料溶液中4种喹诺酮类药物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,标准溶液高效液相色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中被测组分残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_s —— 标准工作液测得的相应被测组分溶液浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A —— 试料溶液中相应被测组分峰面积;

A_s —— 标准溶液中相应被测组分峰面积;

V —— 试料溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m —— 试料质量的数值,单位为克(g)。

注:计算结果以平行测定结果的算术平均值表示,保留3位有效数字。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法环丙沙星、恩诺沙星的检出限为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,噁喹酸、氟甲喹的检出限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$;环丙沙星、恩诺沙星的定量限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,噁喹酸、氟甲喹的定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

标准添加浓度 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 $60\% \sim 120\%$;标准添加浓度 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 $70\% \sim 120\%$;标准添加浓度 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 $80\% \sim 110\%$ 。

10.3 精密度

10.3.1 重复性精密度

标准添加浓度 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 20\%$;标准添加浓度 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 15\%$;标准添加浓度 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

10.3.1 再现性精密度

标准添加浓度 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 30\%$;标准添加浓度 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 20\%$;标准添加浓度 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A

(资料性)

药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 喹诺酮类药物的中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
环丙沙星	Ciprofloxacin	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	85721-33-1
恩诺沙星	Enrofloxacin	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	93106-60-6
噁啉酸	Oxolinic acid	$C_{13}H_{11}NO_5$	14698-29-4
氟甲喹	Flumequine	$C_{14}H_{12}FNO_3$	42835-25-6

附录 B
(资料性)
标准溶液高效液相色谱图

标准溶液高效液相色谱图(1 000 ng/mL)见图 B.1。

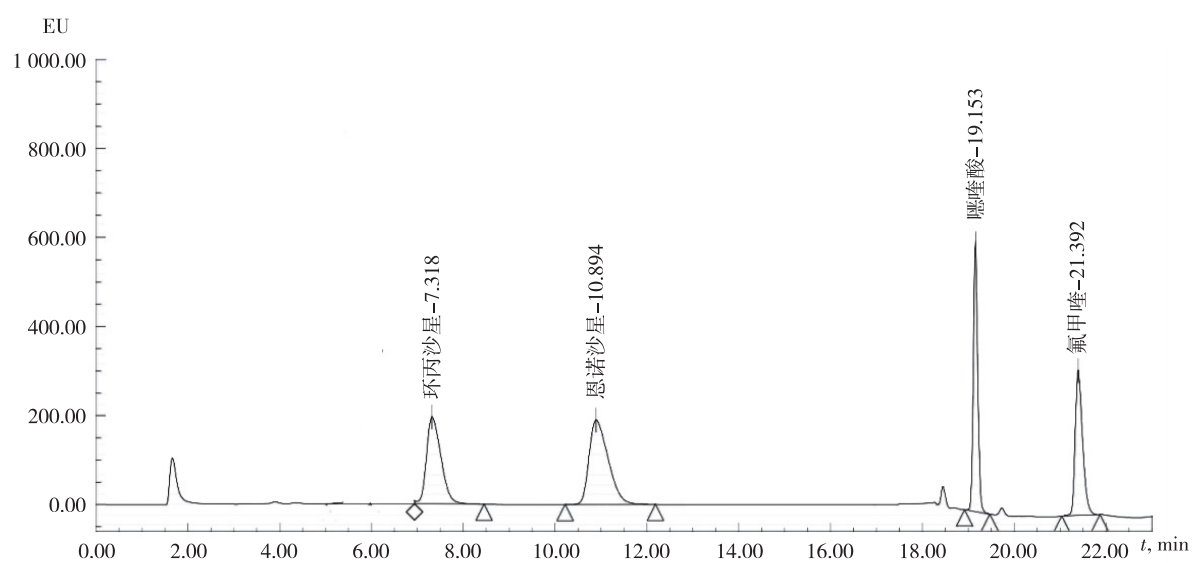


图 B.1 标准溶液高效液相色谱图(1 000 ng/mL)