



中华人民共和国国家标准

GB/T 22980—2008

牛奶和奶粉中氟胺烟酸残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

Determination of flunixin residue in bovine milk and milk powder—
LC-UV method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：宋文斌、李军、李一尘、赵景红、于一茫、李百舸、于杰、李叶、庞国芳。



牛奶和奶粉中氟胺烟酸残留量的测定

液相色谱-紫外检测法

1 范围

本标准规定了原料乳和纯奶粉中氟胺烟酸(flunixin)残留量的液相色谱-紫外检测方法。

本标准适用于原料乳和纯奶粉中氟胺烟酸残留量的测定。

本标准的方法检出限:原料乳为 5.0 $\mu\text{g/L}$,纯奶粉为 40 $\mu\text{g/kg}$ 。

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。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

样品在酸性条件下酶解用乙腈提取后,经正己烷和固相萃取柱净化,通过配置紫外检测器的高效液相色谱进行分析测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所有试剂均为分析纯。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲酸。

4.2 冰乙酸。

4.3 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase) 15 000 U/mL; β -葡萄糖苷酸酶(600 000 U/g),准确称取 0.050 0 g β -葡萄糖苷酸酶,加 2 mL 的磷酸盐(PBS)缓冲溶液溶解,用 0.45 μm 尼龙滤膜过滤。使用前现配制。

4.4 葡萄糖。

4.5 浓盐酸。

4.6 流动相 A:乙酸铵 0.05 mol/L,pH5.0(准确称取 3.90 g 乙酸铵,加水溶解并用甲酸调整至 pH5.0,转移至 1 000 mL 容量瓶中,使用前过 0.45 μm 滤膜)。

4.7 流动相 B:甲醇,色谱纯。

4.8 流动相 C:乙腈,色谱纯。

4.9 混合流动相:将 40 mL 流动相 B,30 mL 流动相 C 以及 30 mL 流动相 A 相混合。

4.10 磷酸盐(PBS)缓冲溶液:称取 0.8 g 氯化钠,0.02 g 氯化钾,0.02 g 磷酸二氢钾,0.115 g 磷酸氢二钠和 0.02 g 葡萄糖于 250 mL 烧杯中加约 90 mL 的水溶解,用 0.1 mol/L 磷酸调整 pH6.0,转移至 100 mL 容量瓶中并稀释至刻度。

- 4.11 85%磷酸。
- 4.12 乙酸钾溶液:0.04 mol/L。称取 1.95 g 乙酸钾于 500 mL 容量瓶中,加约 450 mL 水溶解并稀释至刻度。
- 4.13 氯化钾。
- 4.14 磷酸二氢钾。
- 4.15 磷酸二氢钾缓冲溶液:0.25 mol/L,pH7.0。称取 17.01 g 磷酸二氢钾溶于 400 mL 水中,定容到 500 mL,然后用 0.25 mol/L 磷酸氢二钠调节 pH 至 7.0(约 500 mL),定容到 1 L。
- 4.16 氯化钠。
- 4.17 无水磷酸氢二钠。
- 4.18 磷酸氢二钠溶液:0.25 mol/L。称取 17.75 g 磷酸氢二钠溶于 400 mL 水中,定容到 500 mL。
- 4.19 正己烷:色谱纯。
- 4.20 乙酸-正己烷溶液:乙酸+正己烷(1+9)。
- 4.21 标准物质:氟胺烟酸葡甲胺盐,纯度>99%。
- 4.22 氟胺烟酸标准储备溶液:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。称取适量的氟胺烟酸葡甲胺盐(4.21),用甲醇溶解并定容。2 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

注:称取标准物的重量是按纯度和含盐量修正过的质量。

- 4.23 氟胺烟酸标准工作溶液:2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。吸取适量的氟胺烟酸标准储备溶液(4.22),用甲醇配制成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液,2 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。
- 4.24 标准基质溶液:根据氟胺烟酸的灵敏度和仪器线性范围用空白样品提取液配制成不同浓度的标准基质溶液。

5 仪器

- 5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器。
- 5.2 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 5.3 离心机:最大转速为 10 000 r/min。
- 5.4 离心管:50 mL 聚丙烯离心管。
- 5.5 高速涡流混合器。
- 5.6 振荡器。
- 5.7 微量移液器:10 μL ~100 μL 和 1 000 μL ~5 000 μL 。
- 5.8 氮气浓缩仪。
- 5.9 酸度计:精度为 ± 0.02 。
- 5.10 样品过滤器:PTFE,0.45 μm 。
- 5.11 固相萃取柱:Bond Elut Certify II,3 mL,200 mg,或相当者。
- 5.12 真空固相萃取真空装置。
- 5.13 超声波仪。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将原料乳和纯奶粉样品分别混合均匀。各自分出 0.5 kg 作为试样,将分出的试样密封,并作上标记。

6.2 试样保存

将试样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 原料乳样品

称取原料乳试样 2.00 mL,精确到 0.01 mL 放入 50 mL 聚丙烯离心管中,加入乙酸钾溶液(4.12) 5 mL,高速涡旋混合 10 s。混合后向样品中加入 30 μ L 乙酸(4.2),调节样品 pH 至 4.5,涡旋混合。再加入 70 μ L 新配制的 β -葡萄糖苷酸酶溶液(4.3)混合,于振荡器 37 $^{\circ}$ C 条件下低速振荡 16 h。分别向样品中加入 5 mL 乙腈,涡旋混合 5 s,离心 10 min(5 000 r/min)。转移上清液至 50 mL 离心管中。在原液中加入 5 mL 乙腈和 1 mL 乙酸钾溶液(4.12)涡旋混合 5 s,离心 10 min(5 000 r/min),将上清液转移至 50 mL 离心管中,合并上清液,待净化。

7.1.2 纯奶粉样品

称取纯奶粉 0.25 g,精确到 0.01 g,放入 50 mL 聚丙烯离心管中加入 1.75 g 水超声溶解得到复原乳。加入乙酸钾溶液(4.12)5 mL,以下步骤同原料乳样品。

7.2 净化

在混合的上清液中加入 5 mL 正己烷和 50 μ L 浓盐酸,涡旋混合 15 s,在 5 000 r/min 下离心 5 min。弃去正己烷层,重复上述步骤一次。55 $^{\circ}$ C 条件下氮吹使其体积小于 5 mL。加入磷酸二氢钾缓冲液(4.15)7 mL,涡旋混合,超声 20 s,5 $^{\circ}$ C 条件下以 5 000 r/min 离心 15 min。采用固相萃取柱(5.11),用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化柱,将样品过柱,弃去过柱液,然后用 3 mL 水和 6 mL 甲醇洗柱,弃去过柱液。加大真空度抽滤 10 min。用 2 mL 正己烷淋洗柱子两次并弃去淋洗液。用 2 mL 乙酸-正己烷(4.20)洗涤柱子两次,用 15 mL 离心管收集洗涤液。在 55 $^{\circ}$ C 条件下将洗涤液氮吹至干。随后,在每个样品中加入混合流动相(4.9) 1 mL,涡旋混合 5 s,超声 5 s。样液用 0.45 μ m 的滤膜过滤到进样瓶中,待测。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:Inertsil DS-3, 5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm(内径)或相当者;
- 流速:0.4 mL/min;
- 检测波长:285 nm;
- 柱温:35 $^{\circ}$ C;
- 进样量:20 μ L;
- 运行时间:30 min。

7.3.2 液相色谱测定

用氟胺烟酸的标准基质溶液(4.24)分别进样,以峰面积和工作标准溶液浓度绘制标准工作曲线,样品溶液中氟胺烟酸的响应值应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,氟胺烟酸保留时间为 14 min,标准物质色谱图参见附录 A 中的图 A.1。氟胺烟酸的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

7.4 平行试验

按照上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中氟胺烟酸的残留量的测定按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克(mg/kg)；

c——从标准曲线上得到被测组分溶液的浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V——样品溶液定容体积，单位为毫升(mL)；

m——样品溶液所代表试样的质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的，其重复性和再现性的值是以 95%的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 *r*，原料乳和纯奶粉中氟胺烟酸添加浓度范围及重复性方程见表 1。

表 1 原料乳和纯奶粉中氟胺烟酸的添加浓度范围
及重复性和再现性方程

单位为微克每千克

样品基质	添加浓度范围	重复性限 <i>r</i>	再现性限 <i>R</i>
原料乳	5.0~40.0	lg <i>r</i> =10.16 lg <i>m</i> −11.4	lg <i>R</i> =9.55 lg <i>m</i> −10.65
纯奶粉	40.0~100.0	lg <i>r</i> =0.311 lg <i>m</i> −0.005	lg <i>R</i> =0.360 lg <i>m</i> −0.006
注： <i>m</i> 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限 *r*，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 *R*，原料乳和纯奶粉中氟胺烟酸添加浓度范围及再现性方程见表 1。



附录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

氟胺烟酸标准物质色谱图, 见图 A.1。

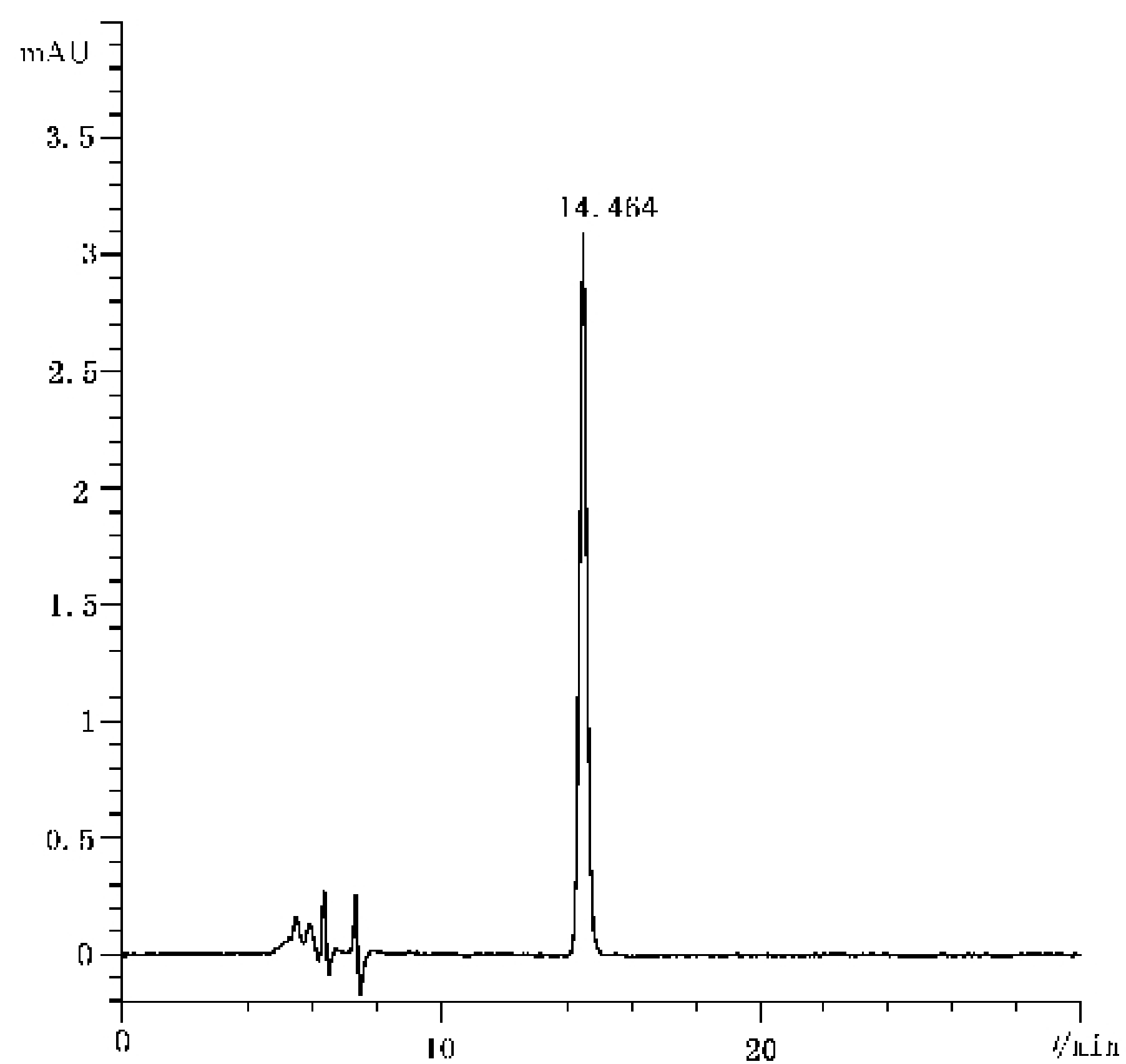


图 A.1 氟胺烟酸标准物质色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中氟胺烟酸添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 氟胺烟酸添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	原料乳		纯奶粉	
	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%
氟胺烟酸	5.0	90.99	40.0	91.77
	10.0	93.91	60.0	92.62
	20.0	94.27	80.0	95.77
	40.0	93.18	100.0	97.32