

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 829—2004

牛奶中氨苄青霉素残留检测方法 ——HPLC

Determination of ampicillin residue in milk:
HPLC

2004-08-25 发布

2004-09-01 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,附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量监督检验测试中心(广州)。

本标准主要起草人:罗道栩、曾平、肖田安、邓国东。

牛奶中氨苄青霉素残留检测方法

——HPLC

1 范围

本标准规定了牛奶中氨苄青霉素残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本标准适用于牛奶中氨苄青霉素的残留量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过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 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或室温下解冻的冷冻空白或供试牛奶。

3.2 样品的保存

–20℃以下冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试样先经三氯乙酸溶液沉淀蛋白,上清液中的氨苄青霉素与甲醛在酸性条件下,加热生成2-羟基-3-苯基-6-甲基吡嗪(氨苄青霉素荧光衍生物),该衍生物用带有荧光检测器的高效液相色谱在激发波长(E_x)346 nm、发射波长(E_m)422 nm条件下测定,外标法定量。

4.2 试剂和材料

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

4.2.1 氨苄青霉素标准品

含氨苄青霉素($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$)不得少于85.0%。

4.2.2 乙腈 色谱纯

4.2.3 三氯乙酸

4.2.4 甲醛溶液

4.2.5 浓磷酸

4.2.6 磷酸二氢钾

4.2.7 磷酸盐缓冲液(0.02mol/L, pH3.5)

称取2.7218 g磷酸二氢钾,置于1000 mL容量瓶中,加水900 mL使溶解,再用浓磷酸调pH至 3.5 ± 0.05 ,加水稀释至刻度,摇匀即得。

4.2.8 三氯乙酸水溶液(200 mg/mL)

称取三氯乙酸 20 g,溶于 80 mL 水中,加水稀释至 100 mL,摇匀即得。

4.2.9 三氯乙酸水溶液(750 mg/mL)

称取三氯乙酸 75 g,加水适量,使溶解,并稀释至 100 mL,摇匀即得。

4.2.10 7%甲醛水溶液

量取 37%甲醛 18.9 mL,加水至 100 mL,摇匀即得。

4.2.11 20%乙腈水溶液

量取 20 mL 乙腈至 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得。

4.2.12 氨苄青霉素标准贮备液(1 000 µg/mL)

准确称取氨苄青霉素标准品约 0.115 5 g,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制成 1 000 µg/mL 标准贮备液,置于 4℃ 冰箱中保存,存放期为 1 周。

4.2.13 氨苄青霉素标准工作液

精密量取氨苄青霉素标准贮备液适量,用水稀释成适宜浓度的标准溶液(0.001 µg/mL~0.100 µg/mL),即得。临用前配制。

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 冷冻离心机

4.3.3 分析天平(感量 0.000 1 g)

4.3.4 旋涡振荡器

4.3.5 恒温水浴锅

4.3.6 微孔滤膜(0.45 µm)

4.4 测定步骤

4.4.1 试样的制备

试样的制备包括:

- 取新鲜或室温下解冻后的牛奶,以 3 500 r/min 离心 10 min,取下层液作为供试试样;
- 取新鲜或室温下解冻后的空白牛奶,以 3 500 r/min 离心 10 min,取下层液作为空白试样;
- 取空白试样,添加适宜浓度的标准工作溶液作为空白添加试样。

4.4.2 提取

精密量取试样 5.0 mL~10 mL,置于塑料离心管中,加入三氯乙酸水溶液(750 mg/mL)0.5 mL±0.01 mL,盖紧后剧烈振摇 30 s。然后,以 6 500 r/min 的速度离心 10 min,量取上清液 1 mL±0.01 mL 于 10 mL 螺口刻度离心管中。

4.4.3 衍生化

在盛有 1.0 mL 离心上清液或标准工作液的 10 mL 螺口刻度离心管中,加入三氯乙酸水溶液(200 mg/mL)0.2 mL 和 7%甲醛溶液 0.2 mL,旋涡混匀 20 s,加盖拧紧后置于沸水浴中加热 30 min。取出,冷却至室温,用 20%乙腈水溶液定容至 2 mL,混匀后,经 0.45 µm 微孔滤膜滤过至样品瓶中,供高效液相色谱分析。

4.4.4 测定

4.4.4.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈, 250 mm×4.6 mm(i.d.), 粒径 5 µm, 或相当者;

流动相: 磷酸盐缓冲液—乙腈(75+25, v/v);

流速: 1 mL/min;

荧光检测器:激发波长 346 nm,发射波长 422 nm;

进样量:100 μL 。

4.4.4.2 测定法

取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,进行单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样溶液中的氨苄青霉素的响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,氨苄青霉素的保留时间在 8.3 min 左右,标准溶液液相色谱图见附录 A 中图 A.1~A.3,空白添加试样的色谱图见附录 A 中图 A.5~A.7。

4.4.5 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤(4.4.2~4.4.4)进行平行操作。空白试样的色谱图见附录 A 中图 A.4。

4.5 结果计算和表述

供试样品中氨苄青霉素的残留量按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times (V + 0.5)}{A_s \times V \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——供试样品中氨苄青霉素的残留量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

A ——供试试样中对应氨苄青霉素的色谱峰面积;

A_s ——标准工作液中氨苄青霉素的色谱峰面积;

C_s ——标准工作液中氨苄青霉素的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——供试样品的量,单位为毫升(mL)。

注:测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留到小数点后 2 位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在牛奶中的检测限为 1 $\mu\text{g/L}$,定量限为 2 $\mu\text{g/L}$ 。

5.2 准确度

本方法在 2 $\mu\text{g/L}$ 、4 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 添加浓度水平上的回收率范围为 70%~110%(回归试验按附录 B 操作)。

5.3 精密度

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

附 录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

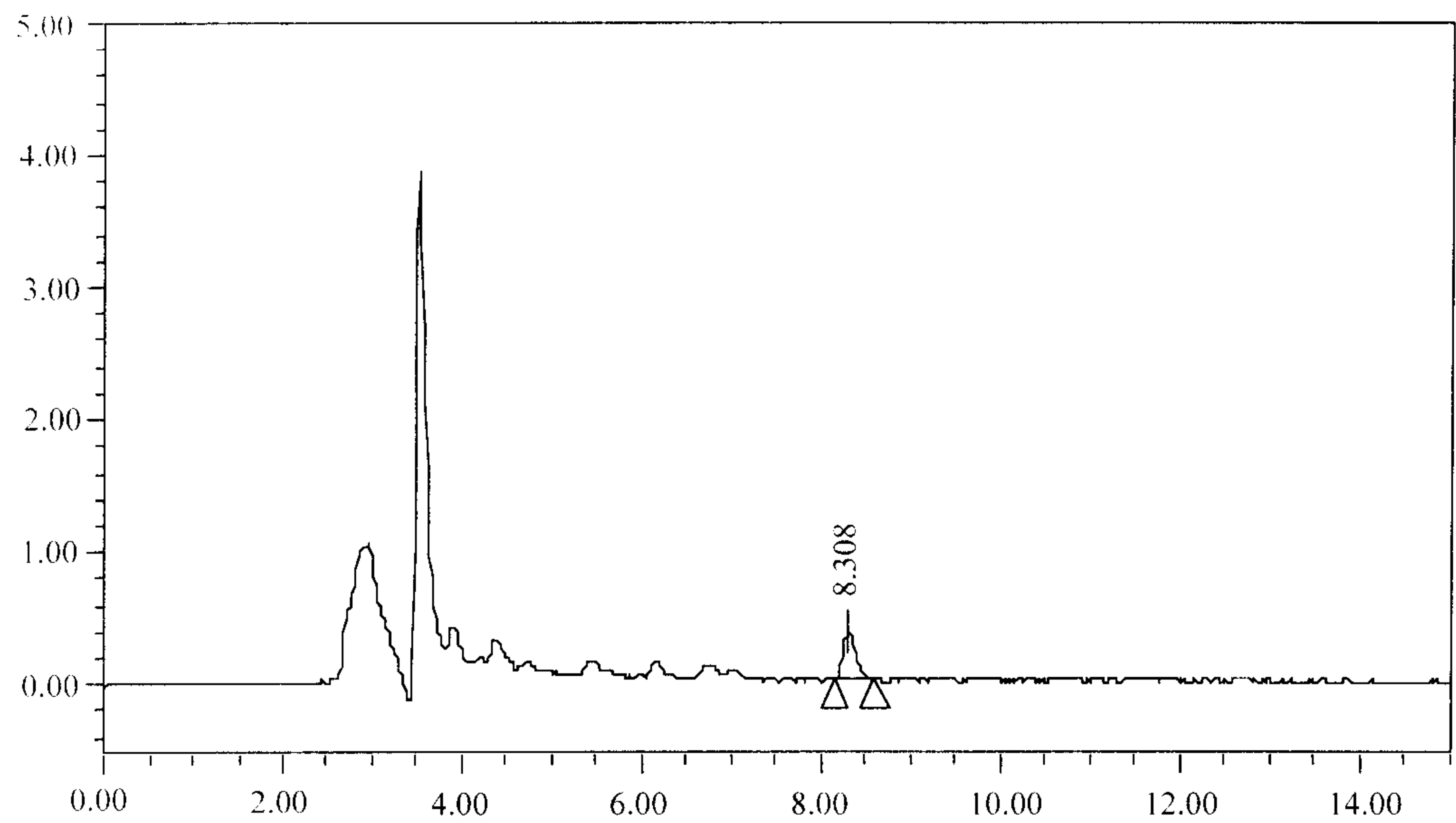


图 A.1 氨基糖苷类标准溶液(1 µg/L)的色谱图(保留时间:8.308 min)

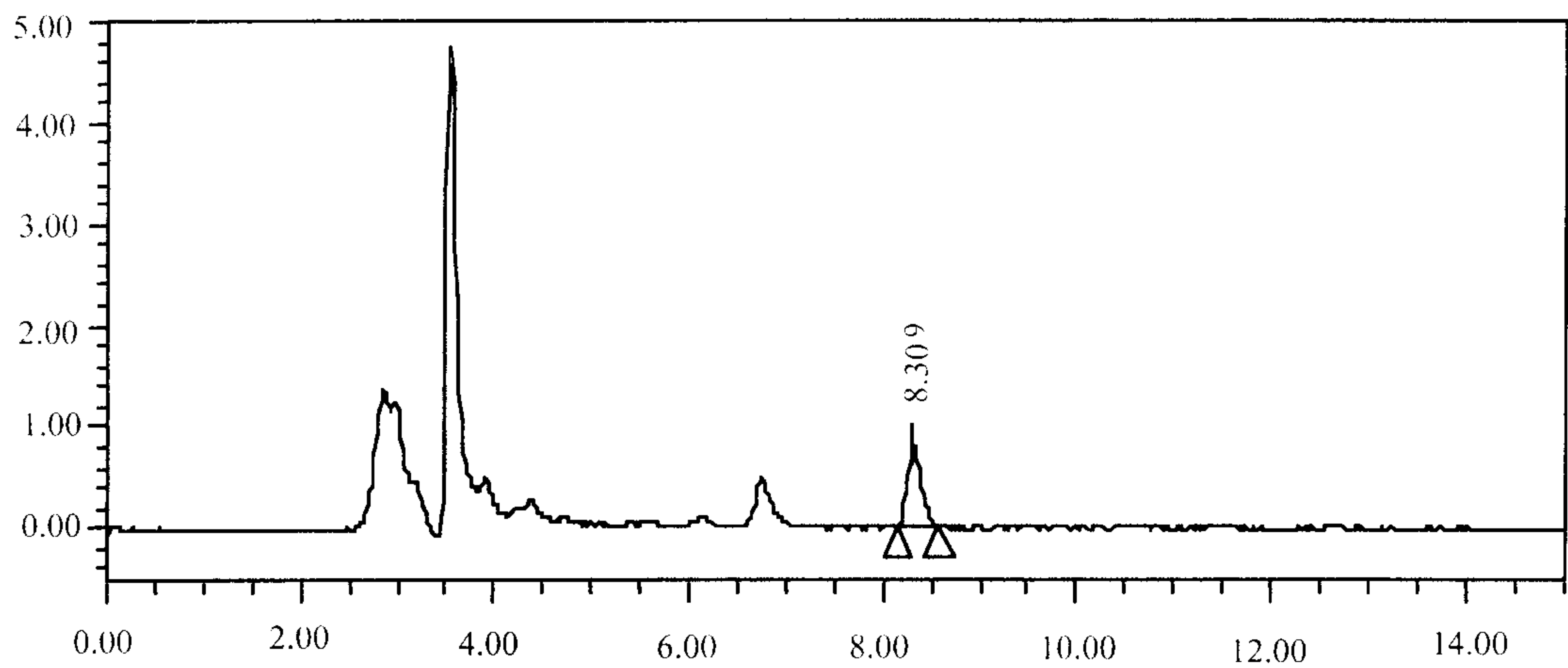


图 A.2 氨基糖苷类标准溶液(2 µg/L)的色谱图

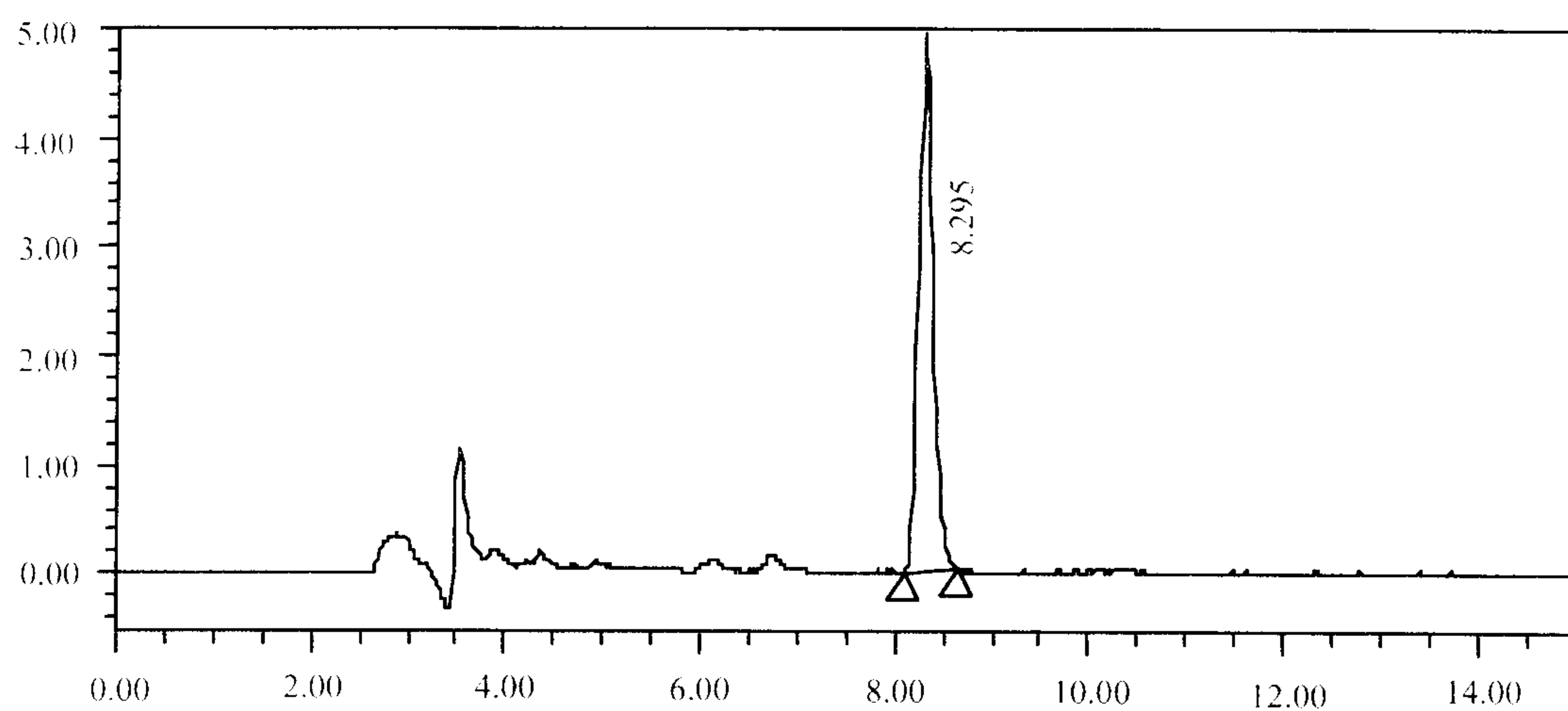


图 A.3 氨苄青霉素标准溶液(10 µg/L)的色谱图

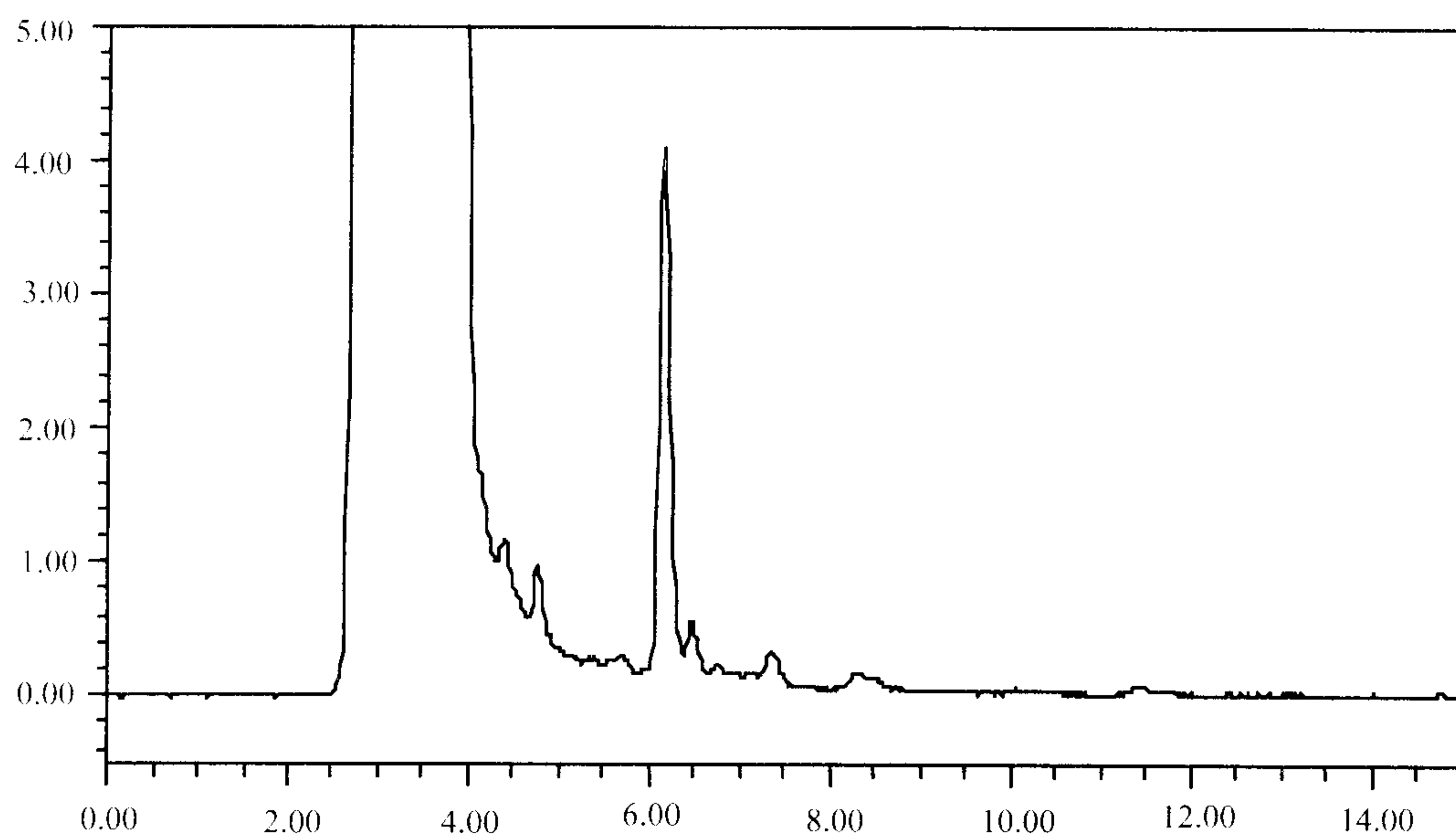


图 A.4 空白牛奶试样的色谱图

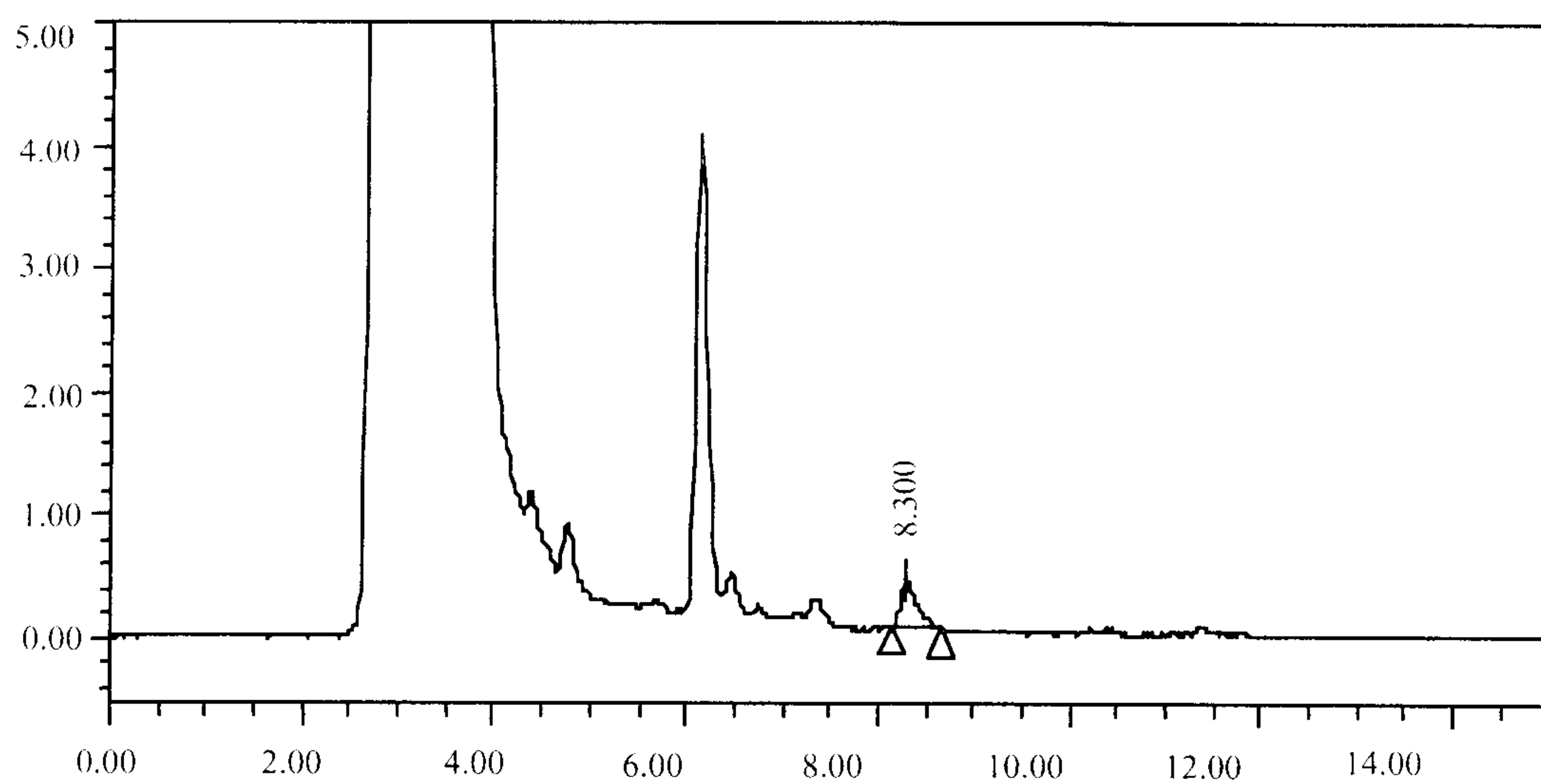


图 A.5 空白牛奶添加试样(1 µg/L)的色谱图

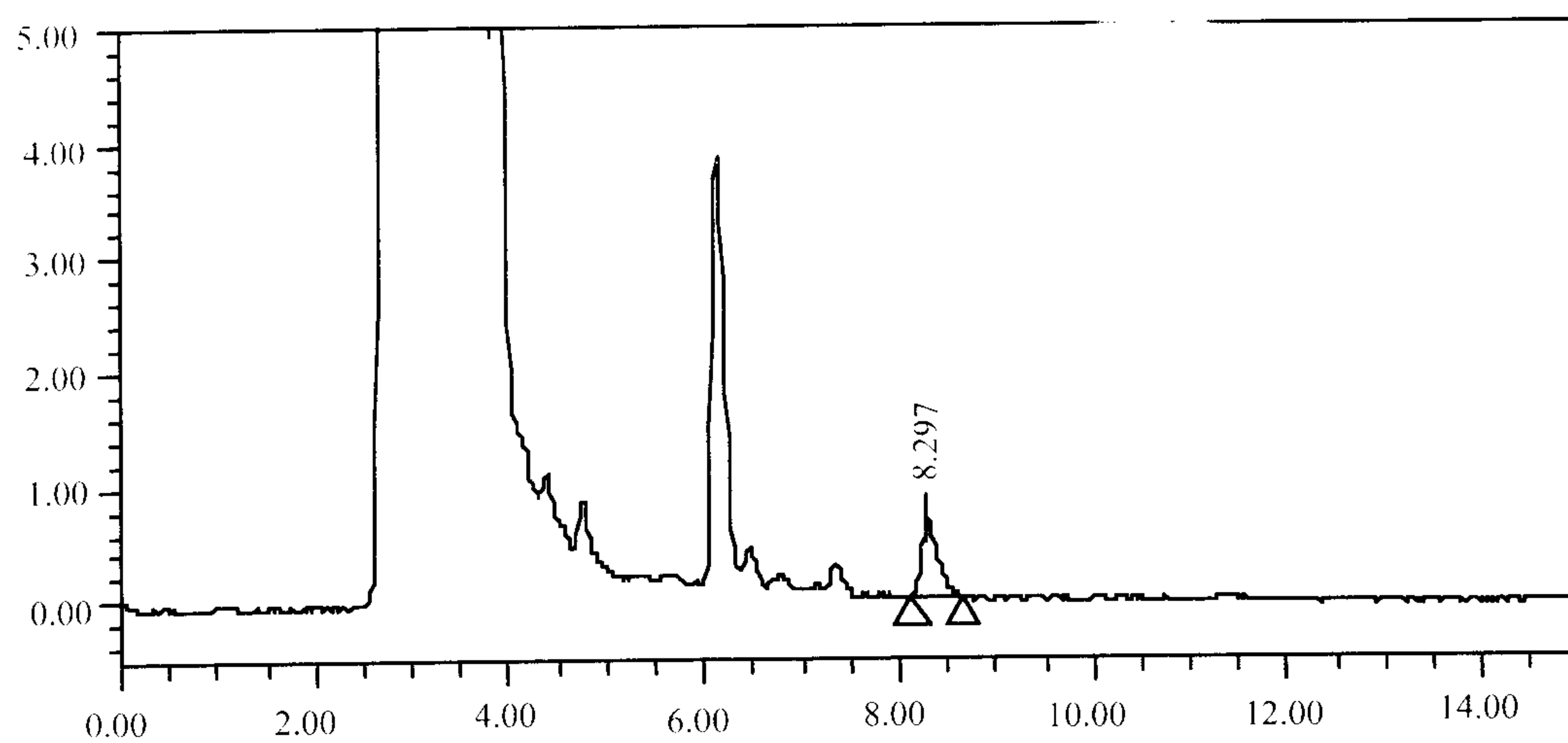


图 A.6 空白牛奶添加试样(2 µg/L)的色谱图

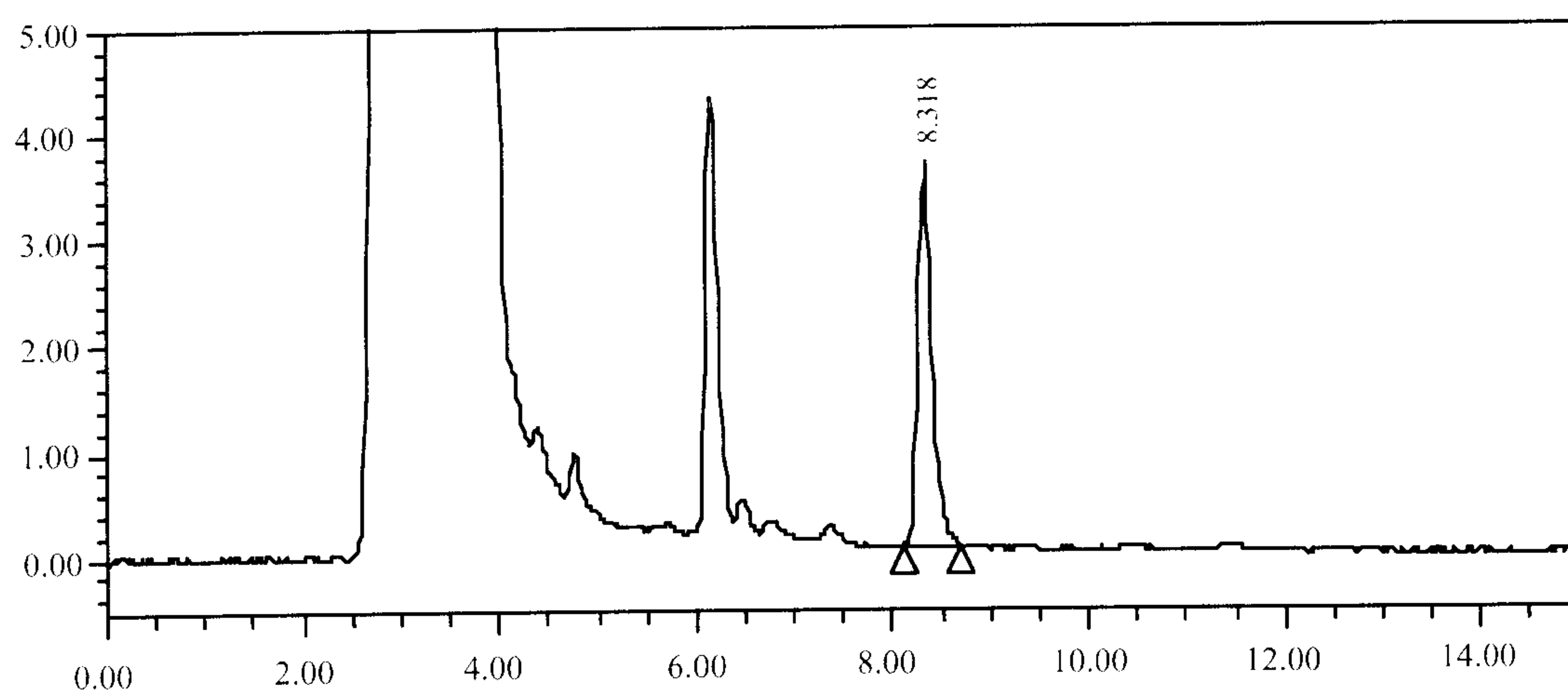


图 A.7 空白牛奶添加试样(10 µg/L)的色谱图

附 录 B
(规范性附录)
添加回收试验

精密量取 4.9 mL 离心后的空白牛奶,置于 10 mL 塑料离心管中,加入 0.1 mL 氨苄青霉素标准品溶液,使成最终浓度为 2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL 的添加试样,旋涡混匀 30 s 后,静置 10 min。按测定步骤(4.4.2~4.4.4)相同的操作进行测定。
