

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告—1—2008

牛奶中氨基苷类多残留检测 ——柱后衍生高效液相色谱法

High Performance Liquid Chromatographic Method by post
column derivised for Determination of aminoglycosides
residues in milk

2008-04-29 发布

2008-04-29 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。

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：华中农业大学。

本标准主要起草人：袁宗辉、肖爱国、陶燕飞、王玉莲、陈冬梅、黄玲利、彭大鹏、戴梦红、刘振利。

本标准系国内首次发布的农业标准。

牛奶中氨基苷类多残留检测 ——柱后衍生高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中氨基苷类抗生素残留检测的制样和柱后衍生高效液相色谱测定方法。
本标准适用于牛奶中卡那霉素、安普霉素、新霉素、庆大霉素单个或多个残留量检测。

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)或修定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 分析实验室用水规则和试验方法。

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶,使混合均匀。

3.2 样品的保存

冷藏贮存备用,有效期 1 个月。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料用磷酸缓冲液和 10%三氯乙酸溶液提取, C_{18} SPE 柱净化,甲醇洗脱,氮气吹干,用水定容。高效液相色谱柱后衍生,荧光检测,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 规定的一级水。

4.2.1 庆大霉素硫酸盐标准品

($C_{19}H_{39}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$),含量不得少于 99.0%。

4.2.2 安普霉素硫酸盐标准品

($C_{21}H_{41}N_5O_{11} \cdot H_2SO_4$),含量不得少于 98.0%。

4.2.3 卡那霉素硫酸盐标准品

($C_{18}H_{35}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$),含量不得少于 98.0%。

4.2.4 新霉素硫酸盐标准品

($C_{23}H_{45}N_6O_{13} \cdot H_2SO_4$),含量不得少于 99.0%。

4.2.5 甲醇 色谱纯。

4.2.6 正己烷

4.2.7 磷酸二氢钾 优级纯。

4.2.8 硼酸 优级纯。

4.2.9 硼酸钠 优级纯。

- 4.2.10 氢氧化钠 优级纯。
- 4.2.11 氢氧化钾 优级纯。
- 4.2.12 氯化钾 优级纯。
- 4.2.13 氯化钠 优级纯。
- 4.2.14 三氯乙酸 优级纯。
- 4.2.15 邻苯二甲醛 色谱纯。
- 4.2.16 磷酸氢二钠 优级纯。
- 4.2.17 正己烷磺酸钠 色谱纯。
- 4.2.18 2-巯基乙醇 优级纯。
- 4.2.19 磷酸二氢钠 优级纯。
- 4.2.20 乙酸 优级纯。
- 4.2.21 流动相 A

称取无水磷酸二氢钾 13.00 g,硼酸 6.00 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL。

流动相 B

称取氢氧化钾 5.60 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL。

流动相 C

称取氯化钾 75.00 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.2.22 磷酸缓冲液

称取氯化钠 8.50 g,磷酸氢二钠 3.58 g,磷酸二氢钠 3.12 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.2.23 100%三氯乙酸溶液(W/V)

称取三氯乙酸 100 g,加水溶解并稀释至 100 mL。

4.2.24 10%三氯乙酸溶液(W/V)

称取三氯乙酸 10.00 g,加水溶解并稀释至 100 mL。

4.2.25 正己烷磺酸钠溶液

称取正己烷磺酸钠 0.94 g,加水溶解并稀释至 250 mL。

4.2.26 正己烷磺酸钠缓冲液

称取正己烷磺酸钠 0.94 g,加水溶解,加乙酸 0.5 mL,用水稀释至 250 mL。

4.2.27 衍生化试剂

称取硼酸钠 4.00 g,氢氧化钠 1.00 g,加水 800 mL 溶解;称取邻苯二甲醛 100 mg,用甲醇 10 mL 溶解,将邻苯二甲醛甲醇溶液加入硼酸钠缓冲溶液中,用水稀释至 1 000 mL,加 2-巯基乙醇 2 mL,混匀,现配现用。

4.2.28 标准贮备液

分别准确称取安普霉素、新霉素、卡那霉素和庆大霉素标准品适量,用水分别溶解并稀释制得含安普霉素、新霉素、卡那霉素和庆大霉素分别为 1 mg/mL 的标准贮备液,4℃避光保存,有效期六个月。

4.2.29 标准工作液

准确量取安普霉素、卡那霉素、庆大霉素和新霉素标准贮备液适量,用磷酸缓冲液溶解并定容,制得卡那霉素、庆大霉素、新霉素和安普霉素浓度为 100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L、2 000 μg/L、5 000 μg/L、10 000 μg/L 的混合标准工作液,4℃避光保存,有效期一周。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器和柱后衍生系统。

4.3.2 分析天平 感量 0.000 01 g,感量 0.000 1 g,感量 0.001 g。

4.3.3 离心机 (5 000 r/min)

4.3.4 冷冻高速离心机 (10 000 r/min)

4.3.5 电热恒温水浴锅

4.3.6 旋涡混合器

4.3.7 组织匀浆机

4.3.8 C₁₈SPE 柱 (100 mg/3mL)

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取混合均匀后的供试样品,作为供试试料。

——取混合均匀后的空白样品,作为空白试料。

——取混合均匀后样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

量取牛奶试料(5±0.05) mL 置聚丙烯离心管中,加磷酸缓冲液 5 mL,混匀,静置 30 min,加 10% 三氯乙酸溶液 5 mL,混匀,静置 10 min,4 200 r/min 离心 10 min,取上清液至聚丙烯离心管中,加正己烷 5 mL,混匀,静置 10 min,弃正己烷层,加正己烷磺酸钠溶液 2 mL,混匀,备用。

4.4.3 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水、正己烷磺酸钠缓冲液各 3 mL 预洗,取备用液过柱,依次用水、正己烷磺酸钠缓冲液各 1 mL 淋洗,甲醇 2 mL 洗脱,收集洗脱液,40℃ 水浴氮气吹干,用水 1.0 mL 溶解,并转入 1.5 mL 聚丙烯离心管,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

取标准工作液,高效液相色谱检测,将测得的峰面积与相对应浓度绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

a) 色谱柱:阳离子交换柱(Cation-exchange) 4 mm×150 mm 离子交换柱。

b) 梯度洗脱程序:

Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	65	35	0
15	65	35	0
15.1	48	48	4
20	48	48	4

c) 流速:1 mL/min

d) 检测波长: E_x:235 nm, E_m:465 nm

e) 进样量:50 μL

f) 柱温:30℃

g) 反应器温度:45℃

h) 衍生液流速:0.3 mL/min

4.4.5.2 液相色谱测定

取适量试样溶液和相应的标准溶液,做单点或多点校准,按外标法,以峰面积积分值定量,标准工作液及试样液中氨基苷类的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,标准溶液和试样

的液相色谱图见附录 A。

4.4.6 空白实验

除不加试样外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算与表述

试料中氨基苷类的残留量($\mu\text{g/L}$):按式(1)计算

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

式中:

X ——试料中氨基苷类残留量($\mu\text{g/L}$);

A ——试样溶液中氨基苷类的峰面积;

A_s ——标准工作液中氨基苷类的峰面积;

C_s ——标准工作液中氨基苷类的浓度($\mu\text{g/L}$);

V ——溶解残余物所得试样溶液体积(mL);

M ——样品体积(mL)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用两次平行测定的算术平均值表示,保留至小数点后两位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在牛奶中卡那霉素、安普霉素和庆大霉素检测限为 $10 \mu\text{g/L}$,定量限为 $20 \mu\text{g/L}$,新霉素的检测限为 $25 \mu\text{g/L}$,定量限为 $100 \mu\text{g/L}$ 。

5.2 准确度

本方法在牛奶中卡那霉素、庆大霉素和安普霉素添加浓度为 $20 \mu\text{g/L} \sim 100 \mu\text{g/L}$ 的回收率为 $70.0\% \sim 110.0\%$;新霉素添加浓度为 $100 \mu\text{g/L} \sim 1000 \mu\text{g/L}$ 的回收率为 $80.0\% \sim 110.0\%$ 。

5.3 精密度

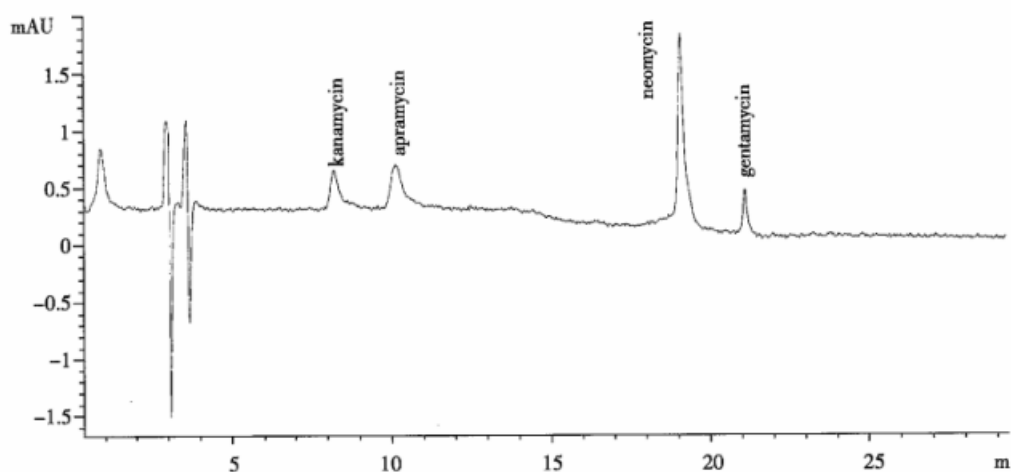
本方法的批内变异系数 $CV < 15\%$,批间变异系数 $CV < 26\%$ 。

附 录 A

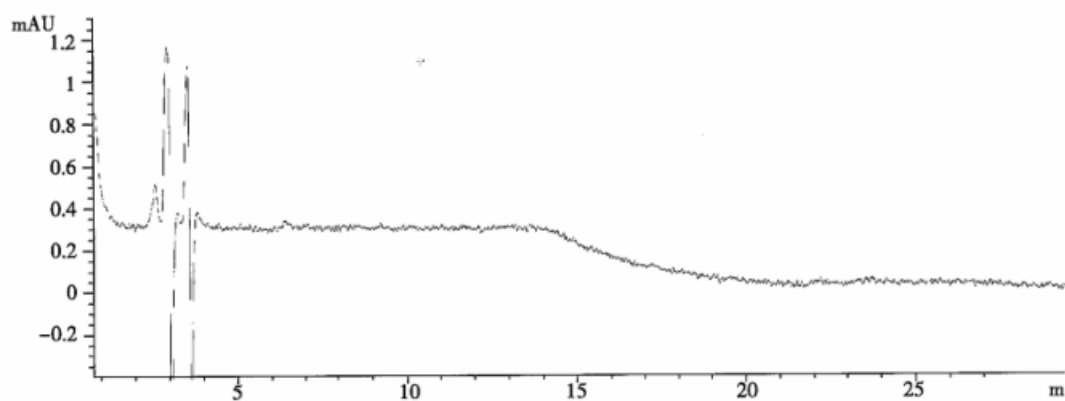
(资料性附录)

氨基苷类药物的高效液相色谱图

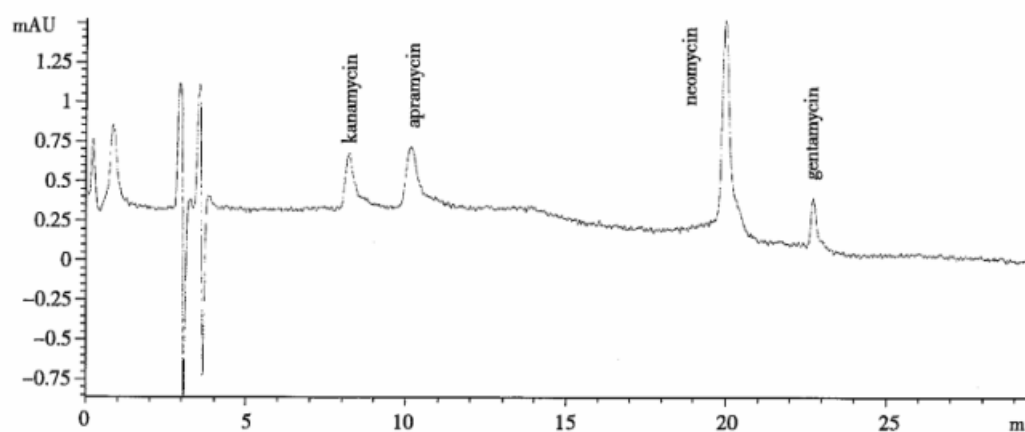
(A: kanamycin; B: apramycin; C: neomycin; D: gentamycin)



氨基苷类药物(卡那霉素、安普霉素、庆大霉素浓度为 100 $\mu\text{g/L}$,
新霉素浓度为 500 $\mu\text{g/L}$)的标准溶液衍生物色谱图



牛奶样品空白色谱图



牛奶添加氨基苷类药物(卡那霉素、安普霉素、庆大霉素浓度为 20 $\mu\text{g/L}$,
新霉素浓度为 100 $\mu\text{g/L}$)衍生物色谱图