

中华人民共和国国家标准

农业部 781 号公告—11—2006

牛奶中青霉素类药物残留的检测方法 ——高效液相色谱法

High Performance Liquid Chromatographic Method
for Determination of Penicillins Residues in Milk

2006-12-16 发布

2006-12-16 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。

牛奶中青霉素类药物残留的检测方法

——高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中青霉素类抗生素残留量检测的制样和高效液相色谱的测定方法。

本标准适用于牛奶中氨苄西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V、乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯青霉素单个或多个残留的检测。

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 1.1—2000 标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则(ISO/IEC Directives, Part 3, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

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

取适量新鲜或冷冻空白供试牛奶样品。

3.2 样品的保存

-20℃贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

牛奶样品用四丁基溴化铵溶液提取，经过 C_{18} 固相萃取柱净化，用合适的溶剂选择洗脱，经过衍生化，供高效液相色谱定量（紫外检测器）测定。外标法定量。

4.2 试剂和材料

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

- 4.2.1 青霉素 V 钾，含量不少于 98%
- 4.2.2 青霉素 G 钠，含量不少于 98%
- 4.2.3 乙氧萘青霉素钠盐，含量不少于 98%
- 4.2.4 苯唑西林钠，含量不少于 93.6%
- 4.2.5 双氯西林钠，含量不少于 98%
- 4.2.6 氨苄西林钠，含量不少于 97%
- 4.2.7 阿莫西林，含量不少于 98%
- 4.2.8 甲醇：色谱纯
- 4.2.9 乙腈：色谱纯
- 4.2.10 二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

4.2.11 正己烷

4.2.12 无水磷酸氢二钠

4.2.13 氢氧化钠

4.2.14 硫酸氢化四丁基铵

4.2.15 四丁基溴化铵

4.2.16 五水硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

4.2.17 1,2,4-三氮唑

4.2.18 氯化钠

4.2.19 氯化汞(Ⅱ)

4.2.20 净化柱 C_{18} SPE

4.2.21 流动相

A 相:称取无水磷酸氢二钠 5.0 g, 二水磷酸二氢钠 10.0 g, 五水硫代硫酸钠 4.0 g, 硫酸氢化四丁基铵 6.5 g, 用适量的水溶解, 定容至 1 000 mL。

B 相:乙腈。

4.2.22 磷酸缓冲液

称取无水磷酸氢二钠 15.0 g, 用适量的水溶解, 定容至 1 000 mL, 4℃ 保存。

4.2.23 溴化四丁基铵乙腈溶液

称取溴化四丁基铵 3.2 g 溶解于乙腈中, 定容至 1 000 mL, 4℃ 保存。

4.2.24 氯化钠溶液

称取氯化钠 20 g 溶解于适量水中, 定容至 1 000 mL, 室温保存。

4.2.25 标准稀释液

量取流动相 A 50 mL, 用 2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 8.0, 然后与乙腈等体积混合, 现配现用。

4.2.26 苯甲酸酐溶液

称取苯甲酸酐 2.262 g, 用适量乙腈溶解, 定容至 50 mL, 4℃ 保存。

4.2.27 氯化汞(Ⅱ)溶液

称取氯化汞(Ⅱ) 0.271 5 g, 用适量水溶解, 定容至 10 mL, 现配现用。

4.2.28 衍生化试剂

称取 1,2,4-三氮唑 13.78 g, 用水 60 mL 溶解, 加入氯化汞溶液 10 mL, 用 5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.0, 用水定容至 100 mL, 4℃ 避光保存。

4.2.29 标准贮备液

准确称量氯苄西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V、乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林标准品 10 mg, 用水溶解并定容至 10 mL, 为 1 mg/mL 标准贮备液。-20℃ 避光保存, 有效期 1 个月。

4.2.30 标准工作液的配制

取氯苄西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V 贮备工作液各 1 mL 和乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林贮备工作液各 3 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用标准稀释液稀释, 定容至 100 mL, 即为氯苄西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液; 取标准工作液倍比稀释, 使氯苄西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、80 $\mu\text{g/L}$ 、160 $\mu\text{g/L}$ 、320 $\mu\text{g/L}$; 乙氧萘青霉素、苯唑青霉素、双氯西林浓度为 30 $\mu\text{g/L}$ 、60 $\mu\text{g/L}$ 、120 $\mu\text{g/L}$ 、240 $\mu\text{g/L}$ 、480 $\mu\text{g/L}$ 、960 $\mu\text{g/L}$, 现配现用。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)

4.3.2 分析天平

感量 0.000 01 g。

4.3.3 分析天平

感量 0.001 g。

4.3.4 离心机(5 000 r/min)

4.3.5 冷冻高速离心机(10 000 r/min)

4.3.6 恒温水浴锅

4.3.7 旋涡混合器

4.3.8 固相萃取装置

4.3.9 超声波清洗机

4.3.10 组织匀浆机

4.3.11 氮气吹干装置

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取供试样品,作为供试试料。

——取空白样品,作为空白试料。

——取空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

量取试料 5.0 mL 置于离心管中,加溴化四丁基铵乙醇溶液 10 mL 轻摇混匀,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再按上述操作重复 2 次。合并 3 次上清液,加正己烷 10 mL。振荡混匀,静置 10 min,除去正己烷层,在 45℃~50℃ 水浴旋转蒸发至 3 mL~4 mL,供 SPE 净化。

4.4.3 净化

C₁₈固相萃取柱依次用甲醇、水、氯化钠溶液和磷酸缓冲液各 3 mL 活化,将提取液过 C₁₈柱,用水 1 mL 淋洗,真空抽干。用乙腈 3.0 mL 洗脱,真空抽干,收集洗脱液。在样液过柱和洗脱过程中流速控制在 1 mL/min 左右。

4.4.4 衍生化反应

洗脱液在 45℃~50℃ 下氮气吹干,加标准稀释液 0.50 mL 旋涡振荡溶解,转入 1.5 mL 聚丙烯离心管中,加无水苯甲酸酐溶液 25 μL,旋涡混匀,50℃ 水浴反应 5 min,冰浴、快速冷却,加衍生化试剂 (4.2.28) 250 μL,旋涡混匀,65℃ 水浴反应 10 min,快速冰浴冷却,在 4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液供高效液相色谱分析。

4.4.5 标准曲线的制备

准确量取混合标准工作液(4.2.24) 0.5 mL,其中氟苯西林、阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V 浓度为 10 μg/L、20 μg/L、40 μg/L、80 μg/L、160 μg/L、320 μg/L 以及乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林浓度为 30 μg/L、60 μg/L、120 μg/L、240 μg/L、480 μg/L、960 μg/L,经过衍生化反应(见 4.4.4),得到系列浓度的衍生化产物,供高效液相色谱分析。将测得的峰面积与相对应浓度绘制标准曲线,拟合,求回归方程和相关系数。

4.4.6 测定

4.4.6.1 色谱条件

色谱柱:C₈柱,150 mm×3.9 mm(i.d.),粒径 5 μm,或相当者。

流动相:见 4.2.15,用前过滤膜。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A相:B相(V/V)	流速(mL/min)
0~3	70:30	1
3~8	65:35	1
8~30	60:40	1

紫外检测器波长:325 nm。

进样量:100 μ L。

4.4.6.2 色谱测定

在仪器最佳工作条件下,对青霉素类抗生素药物的混合标准溶液(4.2.24)分别进样,以峰面积为纵坐标,混合标准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线,用单点校正方法对样品进行定量,各种青霉素类抗生素药物的标准溶液最低定量限色谱图参见图 A.1,其中阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V、氨苄西林、乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林分别的保留时间见表 2。

表 2 7 种青霉素平均保留时间

青霉素	平均保留时间 min	
	标准溶液(n=25)	牛奶样品(n=25)
阿莫西林	5.0 $\pm$ 0.09	4.9 $\pm$ 0.13
青霉素 G	6.9 $\pm$ 0.12	6.8 $\pm$ 0.18
青霉素 V	8.4 $\pm$ 0.22	8.4 $\pm$ 0.23
氨苄西林	11.1 $\pm$ 0.31	11 $\pm$ 0.36
苯唑西林	13.2 $\pm$ 0.11	12.2 $\pm$ 0.44
乙氧萘霉素	16.5 $\pm$ 0.55	16.4 $\pm$ 0.56
双氯西林	26.6 $\pm$ 0.91	26.4 $\pm$ 0.99

4.4.7 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

试样中青霉素类药物的残留量(μ g/L):按式(1)计算

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W} \quad \text{..... (1)}$$

式中:

X——试样中青霉素类抗生素残留,单位为微克每升(μ g/L);

A——试样溶液中青霉素类药物衍生物的峰面积;

A_s——标准工作液中青霉素类药物衍生物的峰面积;

C_s——标准工作液中青霉素类药物的浓度,单位为微克每升(μ g/L);

V——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);

W——牛奶样品体积,单位为毫升(mL)。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在牛奶中的定量限为:阿莫西林、青霉素 G、氨苄西林、青霉素 V 为 4 μ g/L,苯唑西林、乙氧萘青霉素、双氯西林为 30 μ g/L。

5.2 准确度

本方法在牛奶中添加浓度 $2\ \mu\text{g/L}$ ~ $8\ \mu\text{g/L}$ 的回收率为 60%~120%，添加浓度 $15\ \mu\text{g/L}$ ~ $60\ \mu\text{g/L}$ 的回收率为 70%~110%。

5.3 精密度

本方法在牛奶中批间的相对标准偏差小于 20%。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

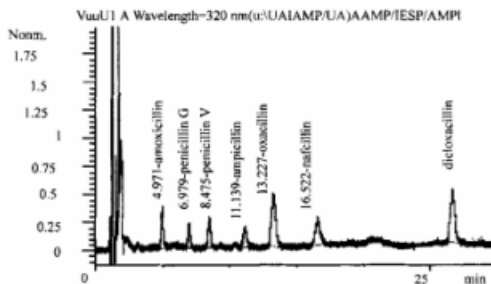


图 A.1 7 种青霉素类药物标准溶液衍生化物的液相色谱图

(阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V、氨苄西林浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林为 75 $\mu\text{g/L}$)

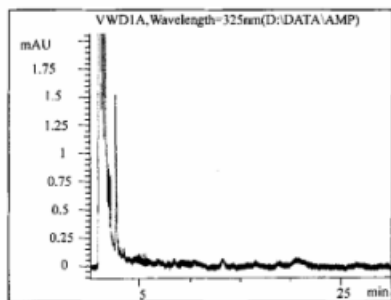


图 A.2 牛奶样品空白色谱图

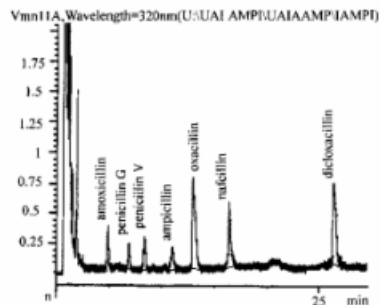


图 A.3 牛奶添加青霉素类药物衍生化物的液相色谱图

(阿莫西林、青霉素 G、青霉素 V、氨苄西林浓度为 2 $\mu\text{g/L}$, 乙氧萘青霉素、苯唑西林、双氯西林为 15 $\mu\text{g/L}$)