

YU/35. < . 717

12/2



中华人民共和国农业部公告

第 236 号

根据《兽药管理条例》规定,我部组织制定了 12 种动物性食品中兽药残留检测方法,现予发布,请各地遵照执行。

附件:动物性食品中兽药残留检测方法



附件:

动物性食品中兽药残留检测方法

二 0 0 三 年

动物性食品中兽药残留检测方法目录

- 1、动物性食品中卡巴氧标示残留物检测方法-----高效液相色谱法
- 2、动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测方法-----高效液相色谱法
- 3、动物性食品中磺胺二甲嘧啶残留检测方法-----高效液相色谱法
- 4、动物性食品中拉沙洛西钠残留检测方法-----高效液相色谱法
- 5、动物性食品中恩诺沙星和环丙沙星残留检测方法-----高效液相色谱法
- 6、动物性食品中噁喹酸和氟甲喹残留检测方法（鸡）-----高效液相色谱法
- 7、动物性食品中噁喹酸和氟甲喹残留检测方法（鱼）-----高效液相色谱法
- 8、动物性食品中苯唑西林残留检测方法-----微生物法
- 9、动物性食品中青霉素类抗生素残留检测方法（鸡）-----微生物法
- 10、动物性食品中苯唑西林残留检测方法（牛奶）-----纸色谱筛选法
（微生物法）
- 11、动物性食品中氯霉素残留检测方法（牛奶）-----高效液相色谱法
- 12、动物性食品中青霉素类抗生素残留检测方法（牛奶）---微生物法

动物性食品中卡巴氧标示残留物检测方法-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中卡巴氧的标示残留物喹啉-2-羧酸(QCA)残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于猪的肌肉、肝脏和肾脏组织中卡巴氧标示残留物残留量检测。

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 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或冷冻空白或供试组织,绞碎使均匀。

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

试样中残留的卡巴氧标示残留物喹啉-2-羧酸(QCA)经氢氧化钠水解,盐酸酸化,乙酸乙酯提取,过柱,洗脱液用三氯甲烷提取;浓缩,甲醇溶解,用高效液相色谱-紫外检测法测定,外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂,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 喹啉-2-羧酸(QCA)对照品 含喹啉-2-羧酸(QCA)($C_9H_6NO_2$)不得少于 99.0%

4.2.2 三氯甲烷 优级纯

4.2.3 甲醇 色谱纯

4.2.4 乙酸乙酯 优级纯

4.2.5 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

4.2.6 氢氧化钠

4.2.7 盐酸

4.2.8 冰乙酸

4.2.9 强酸阳离子大孔树脂 AGMP-50,100-200 目, 美国 Bio-Rad 公司

4.2.10 盐酸溶液 1mol/L

取盐酸83.3mL用水稀释至1000mL。

4.2.11 氢氧化钠溶液 3mol/L

取澄清的氢氧化钠饱和溶液 168mL, 用水稀释至 1000mL。

4.2.12 氢氧化钠溶液 5mol/L

取澄清的氢氧化钠饱和溶液 280mL, 用水稀释至 1000mL。

4.2.13 柠檬酸溶液 1mol/L

取柠檬酸 210g, 用水溶解并稀释至 1000mL。

4.2.14 0.5mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH6.0)

取 1mol/L 柠檬酸溶液 100mL, 用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0, 用水定容至 200mL。

4.2.15 喹啉-2-羧酸标准储备液

准确称取喹啉-2-羧酸对照品 15mg, 用甲醇溶解, 并稀释成浓度为 $150 \mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, 置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。有效期 2 周。

4.2.16 喹啉-2-羧酸标准标准工作液

准确量取适量的标准储备液, 用甲醇稀释成适宜浓度的标准工作液。

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 0.00001g

4.3.3 天平 感量 0.01g

4.3.4 离心机

4.3.5 旋转蒸发器

4.3.6 电热恒温水浴

4.3.7 具活塞玻璃层析柱 $250\text{mm} \times 10.5\text{mm}$ (i.d.) G_2 砂芯滤板

4.3.8 旋涡混合器

4.3.9 离子交换柱

(制备: 称取 7g AGMP-50 树脂, 用适量甲醇润湿一并装入层析柱内, 填充树脂至高度 $10.5\text{cm} \sim 11.0\text{cm}$, 保持液面高于树脂。)

4.3.10 具塞玻璃离心管 50mL

4.3.11 分液漏斗 125mL

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎并均匀后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎并均匀后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎并均匀后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 $(5 \pm 0.05)\text{g}$ 试料, 置于 50mL 离心管中, 加 3mol/L 氢氧化钠溶液 10mL, 旋涡混匀, 置 $95^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 水解 35min。冷却至室温, 加盐酸 4mL、乙酸乙酯 15mL, 盖塞, 手摇振荡 20s, 4000r/min 离心 5min, 取上层溶液转入分液漏斗; 用乙酸乙酯重复提取两次, 合并上层溶液于同一分液漏斗中。加柠檬酸缓冲液 5mL, 振摇 30s, 静置分层, 收集下层溶液至 25mL 带盖玻璃试管中; 用柠檬酸缓冲液重复提取一次, 合并下层溶液, 加盐酸 2mL, 备用。

4.4.3 净化

将离子交换柱依次用甲醇、水、1mol/L 盐酸溶液各 50mL 洗柱, 洗脱时流速控制在 $1.0\text{mL/min} \sim 1.2\text{mL/min}$ 。取备用液过柱, 用 1mol/L 盐酸溶液 50mL 洗柱, 弃流出液, 再用 75mL 甲醇-水 (10+90) 洗脱,

收集洗脱液于另一分液漏斗中。加盐酸1mL, 用三氯甲烷75mL分三次提取, 合并提取液于茄形瓶中, 40℃~50℃ 旋转蒸发至干, 用甲醇2.5mL溶解残余物, 转入带盖试管中, 4000r/min离心5min, 取上清液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量喹啉-2-羧酸标准工作液, 用甲醇稀释成浓度分别为 0.03、0.06、0.12、0.24、0.48、0.96 μg/mL 的喹啉-2-羧酸标准溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈ 150mm×4.6mm (i.d.), 粒径 5μm, 或相当者。

流动相: 甲醇-水 (40+60), 配制后每 1000mL 中加入 8mL 冰乙酸, 混匀, 脱气。

流速: 1.0mL/min。

检测波长: 320nm。

进样量: 20 μL。

4.4.5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中喹啉-2-羧酸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, 喹啉-2-羧酸的保留时间在11min左右, 标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录A中图A.1。

4.5 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.6 结果计算和表述

按下式计算试料中喹啉-2-羧酸残留量 (μg/kg):

$$X = \frac{A C_s V}{A_s M}$$

式中:

X —— 试料中喹啉-2-羧酸的残留 (ng/g);

A —— 试样溶液中喹啉-2-羧酸的峰面积;

C_s —— 标准工作液中喹啉-2-羧酸的浓度(ng/mL);

V —— 浓缩至干后, 溶解残余物所用甲醇的总体积(mL)。

A_s —— 标准工作液中喹啉-2-羧酸的峰面积;

M —— 组织样品的质量(g)。

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

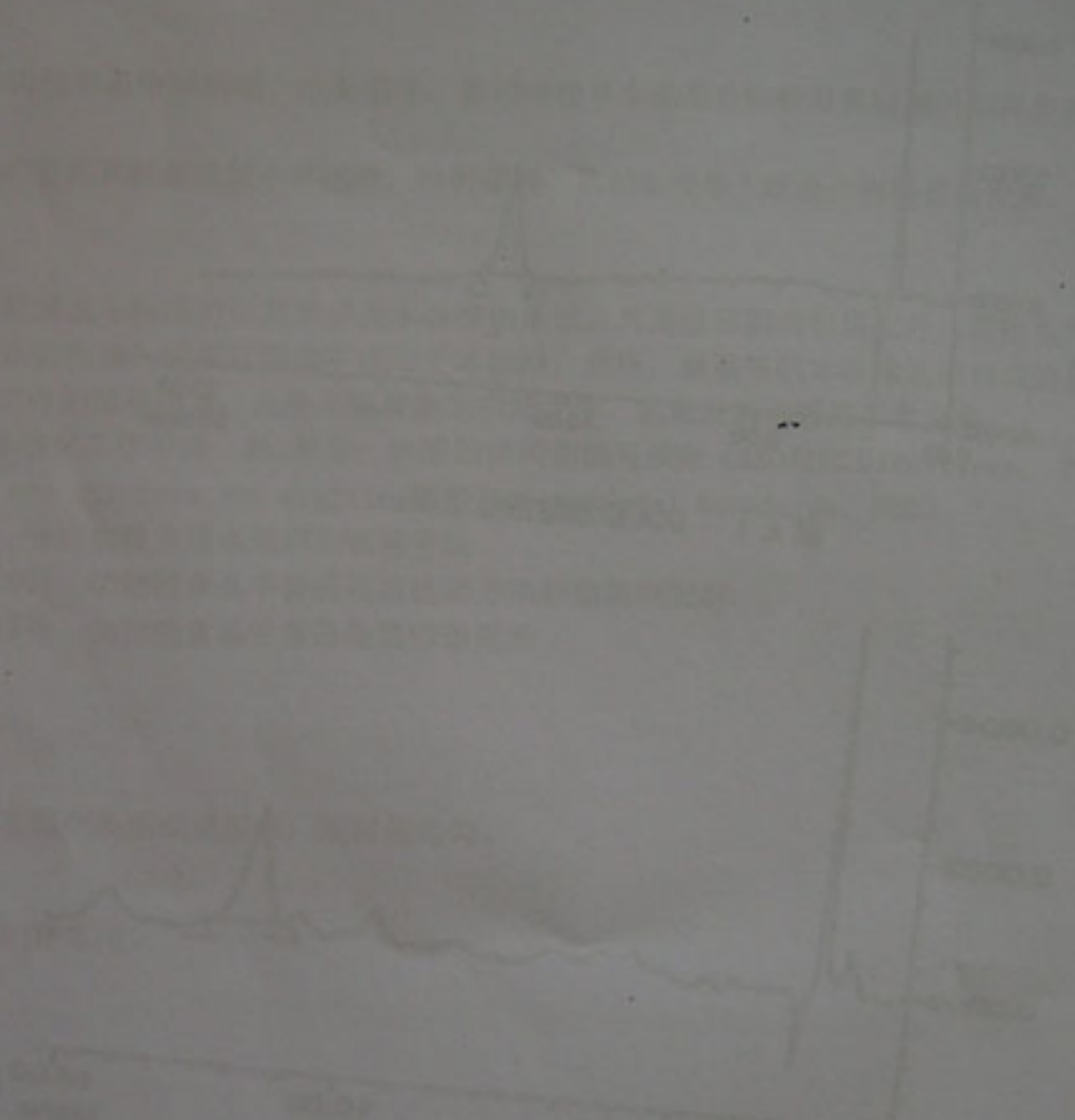
本方法在猪的肌肉、肝脏和肾脏组织中的检测限为 15 μg/kg。

5.2 准确度

本方法在 15 μg/kg 添加浓度的回收率为 70%~110%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 15\%$ ，批间变异系数 $CV \leq 20\%$ 。



附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

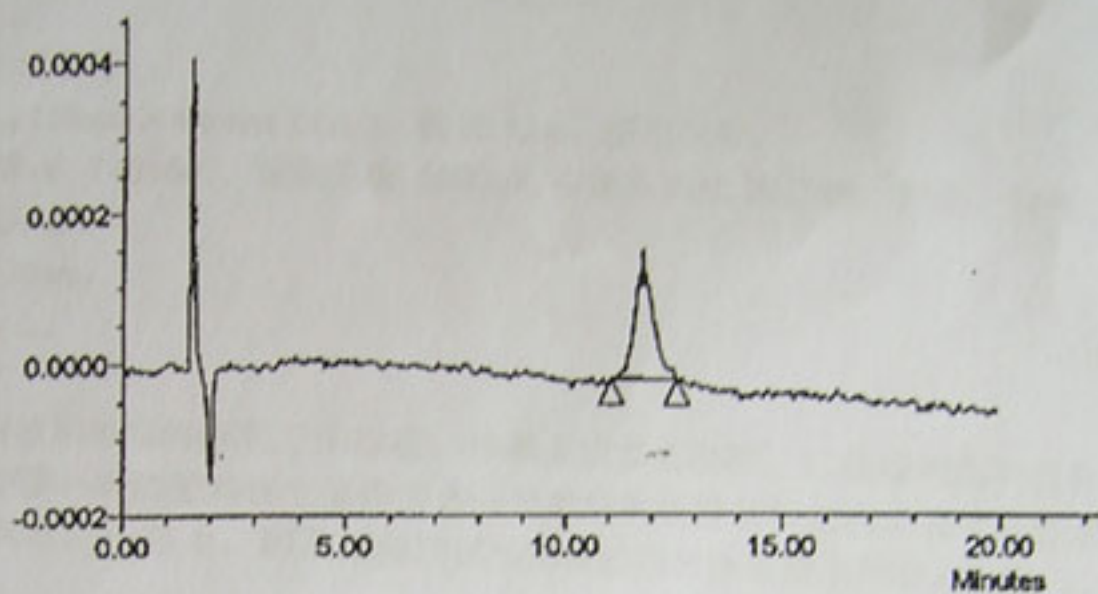


图 A. 1 QCA 标准溶液色谱图.

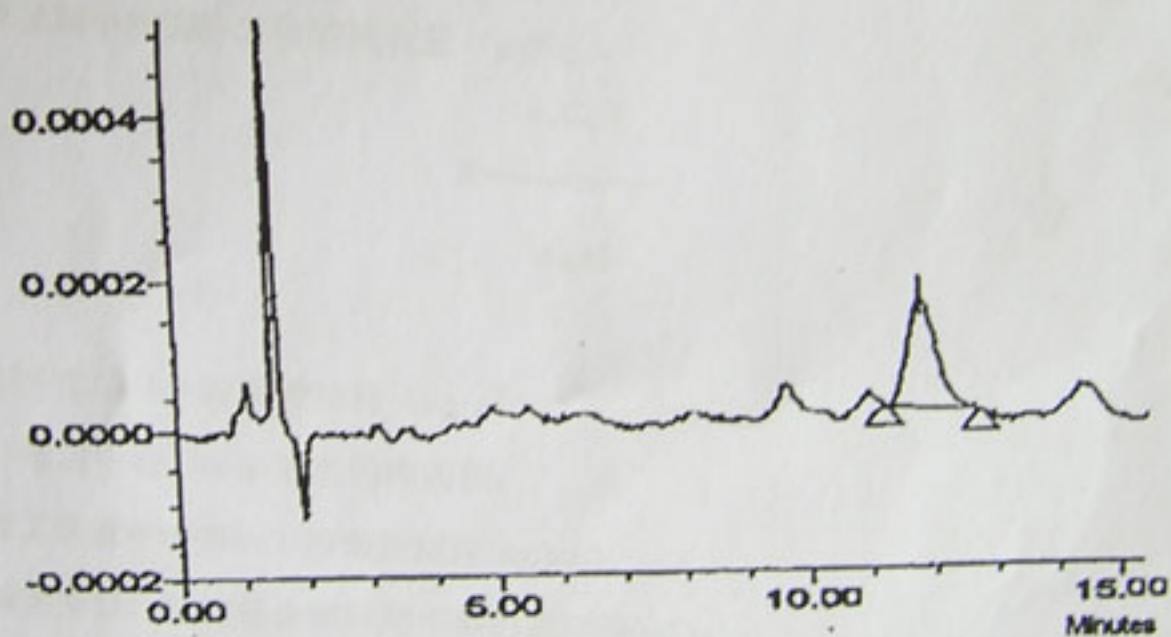


图 A. 2 组织中 QCA 色谱图

动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中甲硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑单个或混合物残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉和肝脏组织中甲硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑单个或混合物残留量检测。

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 1:1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

制样

样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎使均匀。

样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

测定方法

方法提要或原理

试样中残留的甲硝唑、地美硝唑和/或洛硝哒唑经乙酸乙酯提取，固相萃取净化，用高效液相色谱-外标法测定，外标法定量。

试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合 GB/T6682 规定的二级水。

1.1 硝基咪唑类药物对照品 含甲硝唑 ($C_6H_9N_3O_3$)、地美硝唑 ($C_5H_7N_3O_3$)、洛硝哒唑 ($C_6H_8N_4O_4$) 不得少于 99.0%。

1.2 甲醇 色谱纯

1.3 乙腈 色谱纯

1.4 正己烷

1.5 乙酸乙酯

2.6 盐酸 优级纯

2.7 氢氧化钠 优级纯

2.8 无水醋酸钠

4.2.9 冰醋酸

4.2.10 固相萃取柱 Waters OasisTMHLB500mg/6cc

4.2.11 醋酸盐缓冲液

取无水醋酸钠 0.82g 溶解于 800mL 水中, 用冰醋酸调节 pH 至 4.3, 定容至 1000mL。

4.2.12 硝基咪唑类药物标准储备液

准确称取甲硝唑、地美硝唑、洛硝唑各 50mg, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1mg/mL 的储备液, (-20±2)℃ 冰箱中保存, 有效期 3 个月。

4.2.13 硝基咪唑类药物标准工作液

准确量取适量的标准储备液, 用流动相稀释成适宜浓度的标准工作液。

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 旋涡混合器

4.3.3 离心机

4.3.4 分析天平 感量 0.0001g

4.3.5 天平 感量 0.01g

4.3.6 旋转蒸发器

4.3.7 振荡器

4.3.8 组织匀浆机

4.3.9 精密 pH 试纸

4.3.10 聚丙烯离心管

4.3.11 鸡心瓶

4.3.12 分液漏斗 50mL

4.3.13 滤膜 0.45 μm

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 (10±0.1) g 试料置 30mL 匀浆杯中, 加乙酸乙酯 20mL, 10000r/min 匀浆 1min。浆液转入离心管中, 中速振荡 30min, 3000r/min 离心 5min, 取上清液至鸡心瓶中。用乙酸乙酯 20mL 重复提取一次, 合并上清液, 50℃ 减压旋转蒸发至干。依次加入 1mol/L 盐酸 2mL、乙酸乙酯 1.5mL 溶解残余物, 转入加有正己烷 20mL 的分液漏斗中, 用 1mol/L 盐酸 2mL 和乙酸乙酯 1.5mL 洗涤鸡心瓶, 一并转入分液漏斗中, 振摇 1min, 静置 30min, 收集下层溶液。再用 1mol/L 盐酸 4mL、乙酸乙酯 3mL 洗涤鸡心瓶, 并转至同一分液漏斗中, 重复萃取一次, 收集下层溶液, 合并, 用 1mol/L 盐酸或 5mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 4.8~5.2, 备用。

4.4.3 净化

将固相萃取柱依次用甲醇 10 mL、水 10mL 预洗, 挤干。取备用液过柱, 自然流出, 挤干。用水 3mL 洗柱, 挤干, 用甲醇 3mL 洗脱, 收集洗脱液至试管中, 氮气吹干, 加流动相 1.0 mL 溶解残余物, 过 0.45μm 微孔滤膜, 收集滤液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量硝基咪唑类药物标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为 0.02 μg/mL~0.75 μg/mL 的硝基咪唑类药物的标准溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.5 测定

色谱条件:

色谱柱: C_{18} 250mm×4.6mm (i.d.), 粒径 5 μ m, 或相当者。

流动相: 醋酸缓冲液-乙腈 (85+15)。

流速: 1mL/min。

检测波长: 320nm。

进样量: 50 μ L。

5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中硝基咪唑类药物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, 甲硝唑、洛硝唑、地美硝唑的保留时间分别在 6.18min、6.75min 和 11.12min 左右, 标准溶液和试样溶液液相色谱图见附录 A 中图 A.1、图 A.2。

5.3 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

5.4 结果计算和表述

按下式计算试料中硝基咪唑类药物的残留量 (μ g/kg):

$$X = \frac{C_s A V}{A_s M}$$

式中:

X——试料中硝基咪唑类药物的残留量 (ng/g);

C_s ——标准工作液中对应的硝基咪唑类药物的浓度 (ng/mL);

A——试样溶液中硝基咪唑类药物的峰面积;

V——浓缩至干后, 溶解残余物所用流动相的总体积 (mL);

A_s ——标准工作液中硝基咪唑类药物的峰面积;

M——组织样品的质量 (g)。

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡肌肉和肝脏组织中的检测限为 1 μ g/kg。

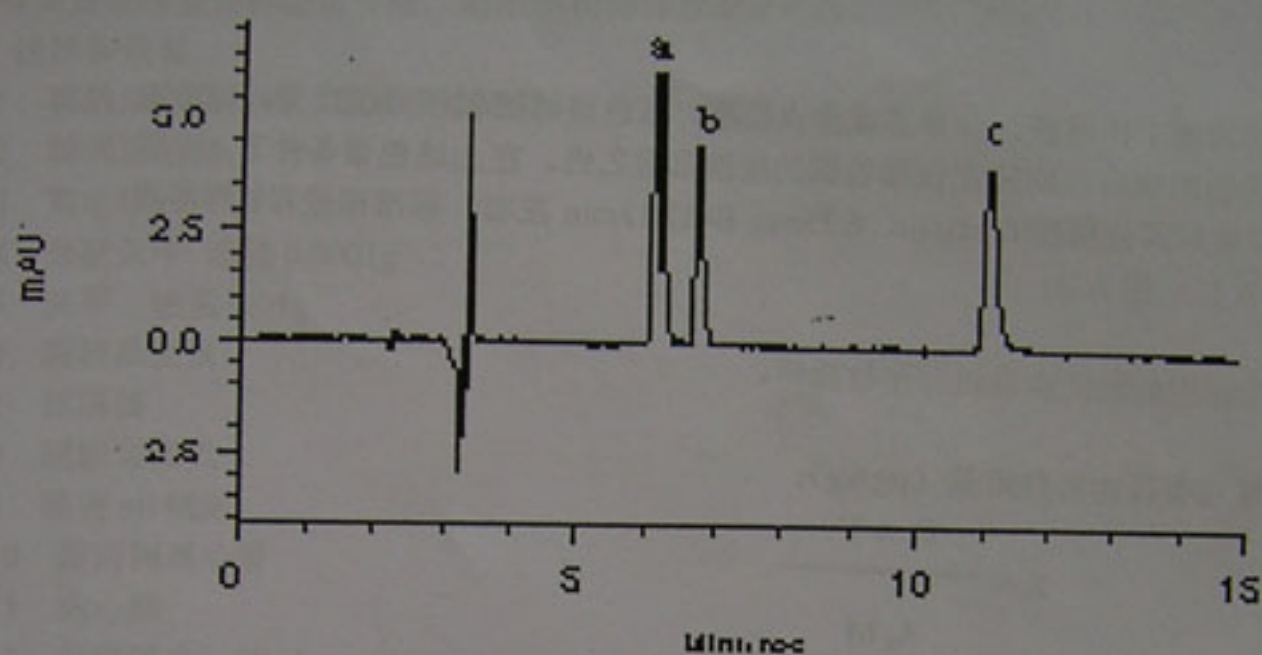
5.2 准确度

本方法在 6 μ g/kg~50 μ g/kg 添加浓度的回收率为 60%~120%

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 CV $\leq$ 15%, 批间变异系数 CV $\leq$ 20%。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图



色谱峰:

- a——甲硝唑;
- b——洛硝哒唑;
- c——地美硝唑。

图 A.1 甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑标准溶液色谱图

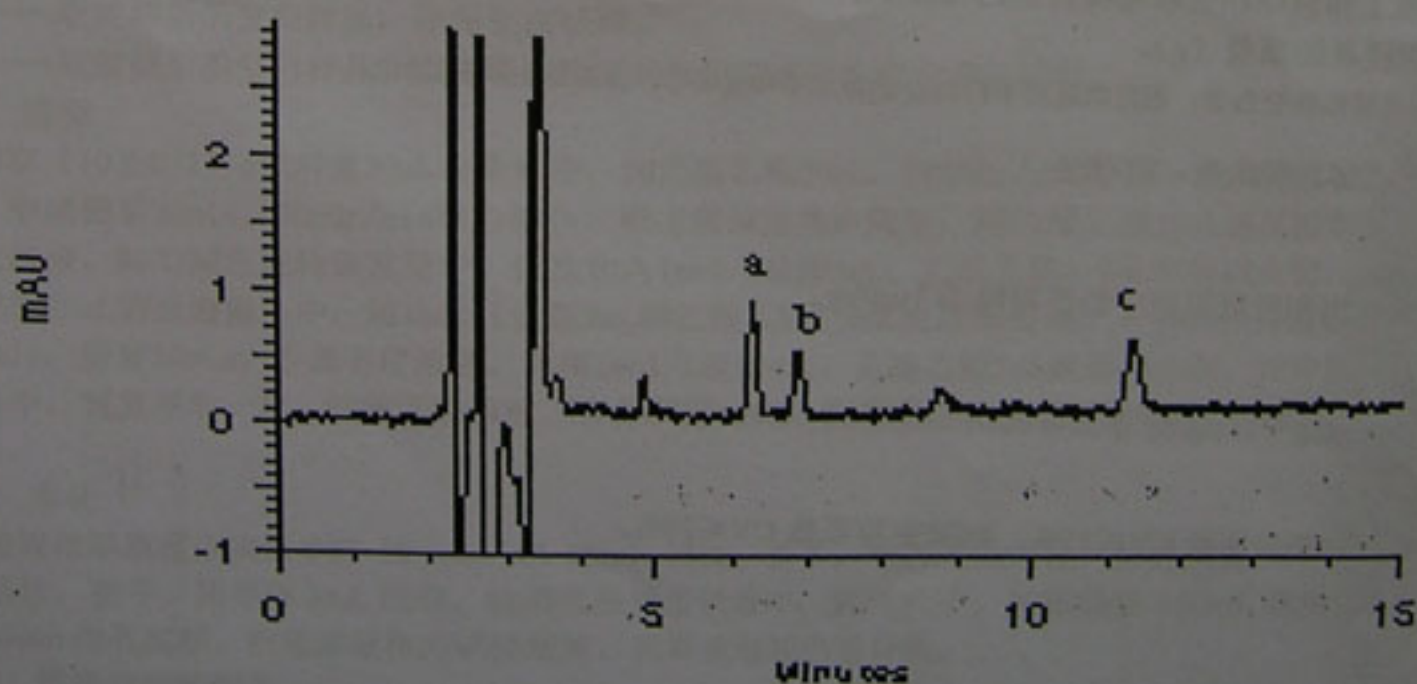


图 A.2 肌肉组织中甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑色谱图

动物性食品中磺胺二甲嘧啶残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中磺胺二甲嘧啶残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本标准适用于鸡蛋中磺胺二甲嘧啶残留量检测。

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 1, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ）

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

制样

1.1 样品的制备

取适量新鲜的空白或供试鸡蛋内容物，匀浆使均匀。

1.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

测定方法

1.1 方法提要或原理

试样中残留的磺胺二甲嘧啶，经 C_{18} 吸附后，用二氯甲烷洗脱，洗脱液经旋转蒸发至干，残渣用流动相溶解，用高效液相色谱-紫外检测法测定，外标法定量。

1.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合 GB/T6682 规定的二级水。

1.2.1 磺胺二甲嘧啶对照品 含磺胺二甲嘧啶 ($C_{12}H_{14}N_4O_2S$) 不得少于 98.0%

1.2.2 乙腈 色谱纯

1.2.3 甲醇

1.2.4 正己烷

1.2.5 二氯甲烷

1.2.6 磷酸

1.2.7 乙二醇

1.2.8 无水硫酸钠

1.2.9 C_{18} 填料 30 μm ~40 μm

使用前依次用两倍体积的正己烷、二氯甲烷和甲醇洗涤，真空干燥后备用。

1.2.10 磺胺二甲嘧啶标准储备液

准确称取磺胺二甲嘧啶对照品 20mg, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 $200\mu\text{g/mL}$ 的储备液, $\pm 2^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 有效期 3 个月。临用前, 用流动相稀释成适宜浓度的标准工作溶液。

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 0.00001g

4.3.3 天平 感量 0.01g

4.3.4 组织匀浆机

4.3.5 旋转蒸发器

4.3.6 玻璃研钵

4.3.7 具活塞玻璃层析柱 $100\text{mm}\times 15\text{mm}$ (i.d.), G_2 砂芯滤板

4.3.8 微孔滤膜 $0.45\mu\text{m}$

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取匀浆后的供试样品, 作为供试试料。

——取匀浆后的空白样品, 作为空白试料。

——取匀浆后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取与净化

称取 $(1\pm 0.01)\text{g}$ 试料置于玻璃研钵中, 加 C_{18} 填料 2g , 充分研磨, 使混合均匀。转入装有无水硫酸钠约 0.5g 的层析柱。用正己烷 8mL 洗涤, 挤干; 用二氯甲烷 12mL 洗脱, 收集洗脱液于鸡心瓶中 40°C 旋转蒸发至干, 用流动相 1.0mL 溶解残余物, 过 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 收集滤液, 作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.3 标准曲线的制备

准确量取适量磺胺二甲嘧啶标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为: 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 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: C_{18} $200\text{mm}\times 4.6\text{mm}$ (i.d.), 粒径 $5\mu\text{m}$, 或相当者。

流动相: 0.017mol/L 磷酸-乙腈 (80+20)。

流速: 1.0mL/min 。

检测波长: 270nm 。

进样量: $50\mu\text{L}$ 。

4.4.4.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中磺胺二甲嘧啶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, 磺胺二甲嘧啶的保留时间在 7min 左右, 标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录 A 中图 A.1、图 A.2。

4.4.5 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

下式计算试料中磺胺二甲嘧啶的残留量 ($\mu\text{g/kg}$):

$$X = \frac{A C_s V}{A_s M}$$

式中:

X —— 试料中磺胺二甲嘧啶的残留量 (ng/g);

A —— 试样溶液中磺胺二甲嘧啶的峰面积;

C_s —— 标准工作液中的磺胺二甲嘧啶的浓度 (ng/mL);

V —— 浓缩至干后, 溶解残余物所用流动相的总体积 (mL);

A_s —— 标准工作液中的磺胺二甲嘧啶的峰面积;

M —— 组织样品的质量 (g);

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后2位。

5 检测方法的灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡蛋中的检测限为 $20\mu\text{g/kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 $20\mu\text{g/kg} \sim 100\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为 $60\% \sim 100\%$ 。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 15\%$, 批间变异系数 $CV \leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

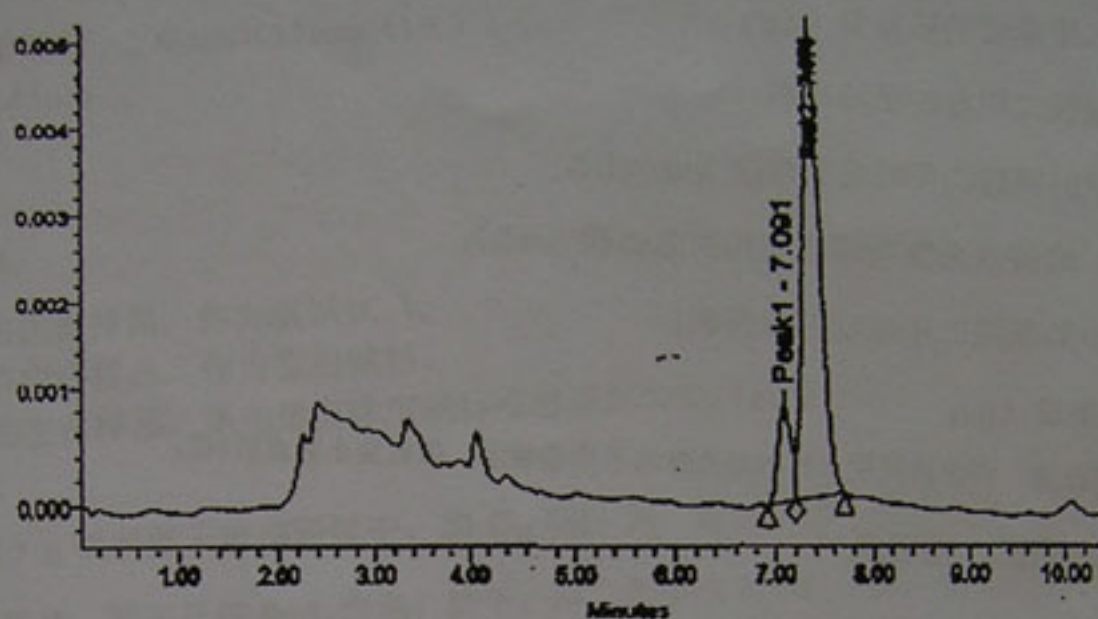


图 A. 1 磺胺二甲嘧啶标准溶液色谱图

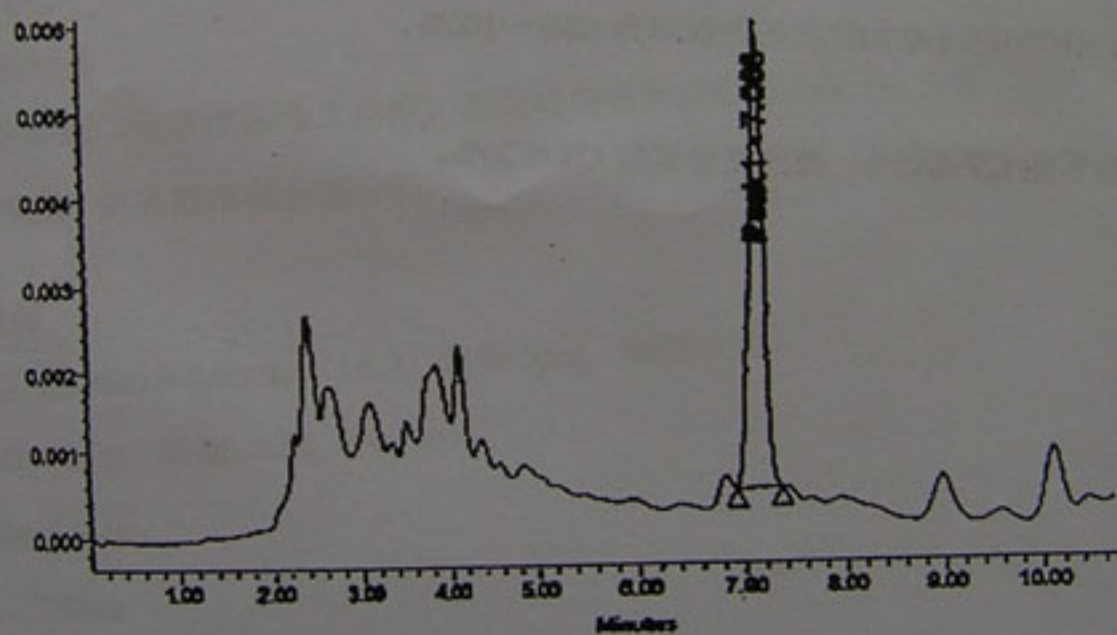


图 A. 2 鸡蛋中磺胺二甲嘧啶色谱图

动物性食品中拉沙洛西钠的残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中拉沙洛西钠残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本标准适用于鸡肌肉和肝脏组织中拉沙洛西钠残留量检测。

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/T1.1-20001 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 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎使均匀。

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

试样中残留的拉沙洛西钠经甲醇提取，硅胶柱净化后，用高效液相色谱-荧光检测法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合 GB/T6682 规定的二级水。

4.2.1 拉沙洛西钠对照品 含拉沙洛西钠 ($C_{34}H_{33}O_8Na$) 不得少于 98.0%

4.2.2 磷酸二氢钠 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

4.2.3 磷酸氢二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)

4.2.4 甲醇 色谱纯

4.2.5 乙腈 色谱纯

4.2.6 二氯甲烷

4.2.7 四氯化碳

4.2.8 无水硫酸钠

4.2.9 层析用硅胶 100~200 目

4.2.10 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7)

称取磷酸二氢钠 1.3g 和磷酸氢二钠 4.4g，用水溶解，并稀释至 1000mL，摇匀即得。

4.2.11 拉沙洛西钠标准储备液

准确称取拉沙洛西钠对照品 100mg, 用甲醇溶解, 并稀释成浓度为 1mg/mL 的储备液, 置 (± 2) °C 冰箱中保存, 有效期 3 个月。临用前用甲醇稀释成适宜浓度的标准工作液。

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 涡动混合器

4.3.3 离心机

4.3.4 分析天平 感量 0.0001g

4.3.5 天平 感量 0.01g

4.3.6 旋转蒸发器

4.3.7 振荡器

4.3.8 组织匀浆机

4.3.9 分液漏斗 250mL

4.3.10 聚丙烯离心管 50mL

4.3.11 微孔滤膜 0.45 μ m

4.3.12 具活塞玻璃层析柱 100mm $\times$ 15mm (i.d.) G₂砂芯滤板

4.3.13 硅胶柱

(制备: 取适量硅胶于 105°C 下烘烤 3 小时, 然后称取 40g 置于具塞三角瓶中, 加水 2mL, 振荡使充分混匀, 密闭, 放入干燥器中, 备用。玻璃层析柱内依次装入无水硫酸钠 0.25g, 硅胶 0.5g, 无水硫酸钠 0.25g, 小圆片滤纸。轻轻敲匀, 临用前现制。)

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 (5 ± 0.05) g 试料置 30mL 匀浆杯中, 加甲醇 20mL, 10000r/min 匀浆 1min。转入 50mL 离心管中, 涡动混合 2min, 3000r/min 离心 10min。上清液入分液漏斗中, 再向离心管中加入甲醇 20mL 涡动混合 2min, 重复提取 1 次, 合并上清液。向分液漏斗中依次加入水 40mL 和四氯化碳 30mL, 振荡, 静置 10min, 将下层溶液分离至鸡心瓶中, 再用四氯化碳 30mL 重复萃取 1 次, 合并下层提取液 50°C 减压浓缩至 5mL, 备用。

4.4.3 净化

先用四氯化碳 5mL 预洗硅胶柱, 取上述备用液过柱, 用二氯甲烷 5mL 洗柱, 挤干。用甲醇 10mL 洗脱, 收集洗脱液于鸡心瓶中, 40°C 旋转蒸发至干, 用流动相 5.0mL 溶解溶解残余物, 过 0.45 μ m 孔滤膜, 收集滤液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量拉沙洛西钠标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为: 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 μ g/L 的标准溶液, 供高效液相色谱分析。

测定

1.1 色谱条件:

1.1.1 色谱柱: C_{18} 250mm $\times$ 4.6mm (i.d.), 粒径 5 μ m, 或相当者。

1.1.2 流动相: 磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈 (25+40+35)。

1.1.3 流速: 1mL/min。

1.1.4 激发波长: 310nm。

1.1.5 发射波长: 420nm。

1.1.6 进样量: 20 μ L。

4.5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中拉沙洛西钠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, 拉沙洛西钠的保留时间在6min左右, 标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录A中图A.1、图A.2。

4.4.6 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

按下式计算试料中拉沙洛西钠的残留量 (μ g/kg):

$$X = \frac{A C_s V}{A_s M}$$

式中:

X —— 试料中拉沙洛西钠的残留量 (ng/g);

A —— 试样溶液中拉沙洛西钠的峰面积;

C_s —— 标准工作液中拉沙洛西钠的浓度 (ng/mL);

V —— 浓缩至干后, 溶解残余物所用流动相的总体积 (mL);

A_s —— 标准工作液中拉沙洛西钠的峰面积;

M —— 组织样品的质量 (g)。

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡肌肉和肝脏组织中的检测限为 20 μ g/kg。

5.2 准确度

本方法在 50 μ g/kg~500 μ g/kg 添加浓度的回收率为 70%~110%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 10\%$, 批间变异系数 $CV \leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

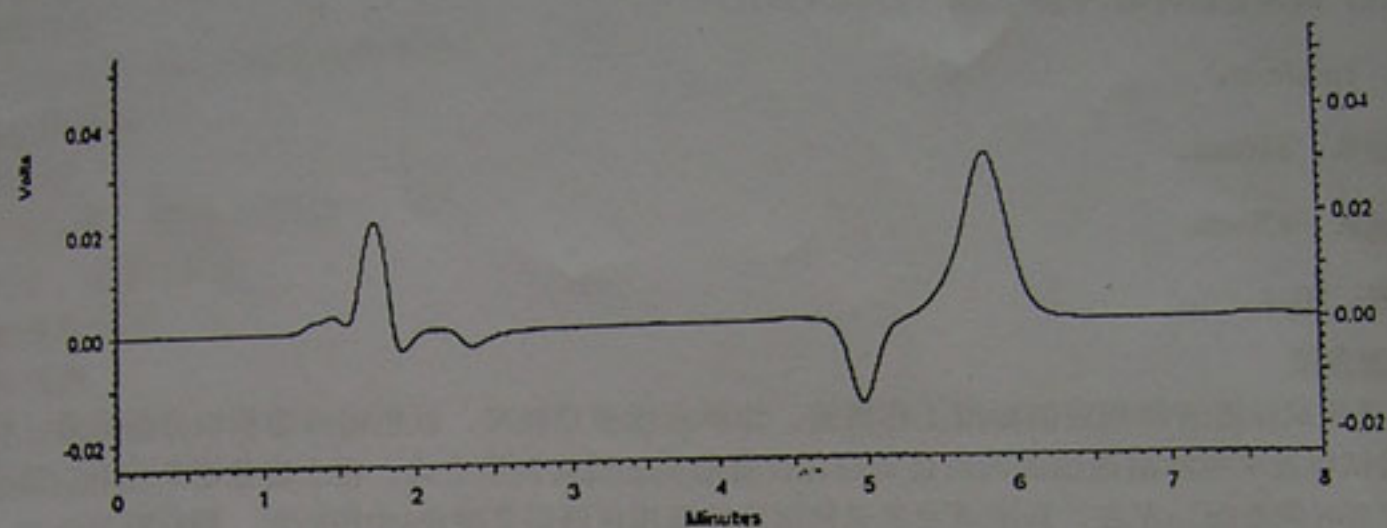


图 A.1 拉沙洛西钠标准溶液色谱图

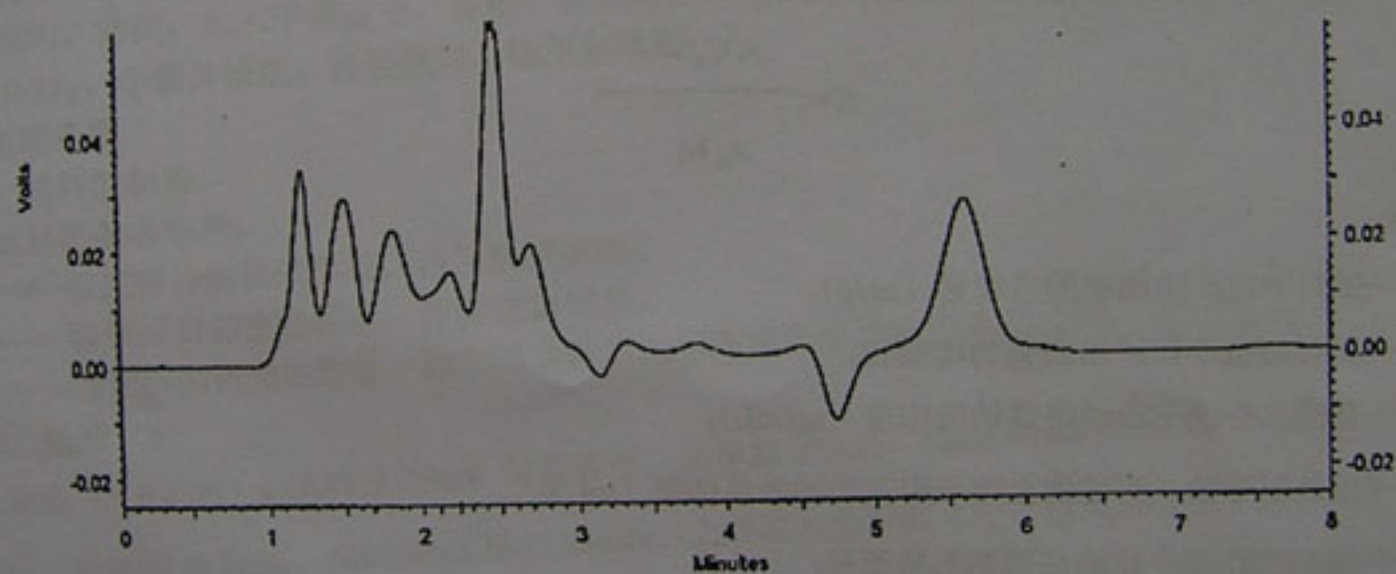


图 A.2 组织中拉沙洛西钠色谱图

动物性食品中恩诺沙星和环丙沙星残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中恩诺沙星、环丙沙星残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。本标准适用于鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中恩诺沙星、环丙沙星的残留量检测。

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/T1.1-20001 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 1, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发 [1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎并使均匀。

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

试样中残留的恩诺沙星、环丙沙星用不同pH值的磷酸缓冲液提取，C₁₈柱净化，流动相洗脱，以磷酸-乙腈作为流动相，用高效液相色谱-荧光检测法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合GB/T6682规定的二级水。

4.2.1 恩诺沙星 含恩诺沙星 (C₁₉H₂₂FN₃O₃) 不得少于 99.0%

4.2.2 环丙沙星 含环丙沙星 (C₁₇H₁₈FN₃O₃) 不得少于 99.0%

4.2.3 磷酸

4.2.4 氢氧化钠

4.2.5 乙腈 色谱纯

4.2.6 三乙胺

4.2.7 磷酸二氢钾

4.2.8 氢氧化钠溶液 5.0mol/L

取氢氧化钠饱和液 14mL，加水稀释至 100mL。

4.2.9 氢氧化钠溶液 0.03mol/L

取 5.0mol/L 氢氧化钠液 0.6mL，加水稀释至 100mL。

4.2.10 磷酸/三乙胺溶液 0.05mol/L

取 85%磷酸 3.4mL，用水稀释至 1000 mL。搅拌下滴加三乙胺，调 pH 至 2.4。

4.2.11 磷酸盐缓冲液 (用于肌肉、脂肪组织)

取磷酸二氢钾 6.8g, 加水使溶解并稀释至 500mL, 用 5.0mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0。

4.2.12 磷酸盐缓冲液 (用于肝脏、肾脏组织)

取磷酸二氢钾 6.8g, 加水溶解并稀释至 500mL, pH 为 4.0~5.0。

4.2.13 恩诺沙星、环丙沙星标准储备液

准确称取恩诺沙星、环丙沙星对照品各 50mg, 用 0.03mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释成 1mg/mL 的储备液, 置 2℃~8℃ 冰箱中保存, 有效期 1 个月。

4.2.14 恩诺沙星、环丙沙星标准工作液

准确量取适量恩诺沙星、环丙沙星标准储备液, 用乙腈稀释成适宜浓度的喹啉酸和氟甲喹标准溶液。
1mg → 100μL
1μL → 10μL

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 分析天平 感量 0.0001g

4.3.3 天平 感量 0.01g

4.3.4 振荡器

4.3.5 组织匀浆机

4.3.6 离心机

4.3.7 聚丙烯离心管 25 mL、50mL

4.3.8 固相萃取柱 C_{18} 100mg/mL, 含碳量 $\geq 16\%$

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 (2 ± 0.05) g 试料, 置 30mL 匀浆杯中, 加磷酸盐缓冲液 10.0mL, 10000r/min 匀浆 1min。匀浆液转入 50mL 聚丙烯离心管中, 振荡混合 5min, 4000r/min 离心 10min, 上清液转入另一 25mL 离心管中。磷酸盐缓冲液 10.0mL 洗刀头及匀浆杯, 转入 50mL 离心管洗残渣, 搅匀, 振荡, 离心。合并上清液于 2 离心管中, 备用。
此步可不用。

4.4.3 净化

C_{18} 固相萃取柱依次用 2mL 甲醇、2mL 润洗, 润洗完毕后, 准确量取适量备用液过柱, 用 2mL 水挤干。加 2.0mL 流动相洗脱, 挤干。收集洗脱液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。
水 瓦利 1mL 100mg/mL 2mL 12/10/2001 07280600

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量恩诺沙星、环丙沙星标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 μ g/mL 的恩诺沙星、环丙沙星标准溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.5 测定

4.4.5.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 250mm $\times$ 4.6mm (i. d.), 粒径 5 μ m, 或相当者。

保护柱: 10GC₄ ODS₂ C_{18}

流动相: 0.05mol/L 磷酸溶液/三乙胺—乙腈 (82+18), 用前过 0.45 μ m 滤膜。

流速: 0.8mL/min。

检测波长: 激发波长 280nm; 发射波长 450nm。

进样量: 20 μ L。

4.4.5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液，作单点或多点校准，以色谱峰面积积分值定量。标准工
及试样溶液中恩诺沙星、环丙沙星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，
沙星、环丙沙星的保留时间分别在11min和8min左右，标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录A
图A.1、图A.2。

4.6 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

5 结果计算和表述

按下式计算试料中恩诺沙星或环丙沙星的残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$):

$$X = \frac{AC_s V_1 V_3}{A_s V_2 M}$$

式中:

X —— 试料中恩诺沙星或环丙沙星的残留量(ng/g);

A —— 试样溶液中恩诺沙星或环丙沙星的峰面积;

C_s —— 标准工作液中恩诺沙星或环丙沙星的浓度(ng/mL);

V_1 —— 提取用磷酸盐缓冲液总体积(mL);

V_3 —— 试样溶液体积(mL);

A_s —— 标准工作液中恩诺沙星或环丙沙星的峰面积;

V_2 —— 过 C_{18} 固相萃取柱所用备用液体积(mL);

M —— 组织样品的质量(g)。

注: 计算结果需扣除空白试料值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中的检测限为: 恩诺沙星 $20\mu\text{g}/\text{kg}$; 环丙沙星 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 $20\mu\text{g}/\text{kg} \sim 600\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为70%~100%。

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 恩诺沙星和环丙沙星在鸡组织中的液相色谱图

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

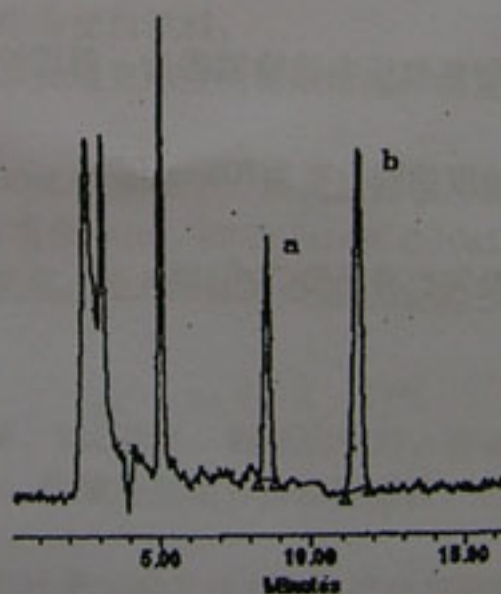


色谱峰:

a——环丙沙星;

b——恩诺沙星。

图 A.1 环丙沙星、恩诺沙星标准溶液色谱图



色谱峰:

a——环丙沙星;

b——恩诺沙星。

图 A.2 鸡肌肉组织中环丙沙星、恩诺沙星色谱图

动物性食品中噁喹酸和氟甲喹残留检测方法-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中噁喹酸和氟甲喹残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本标准适用于鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中噁喹酸和氟甲喹残留量的检测。

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/T1.1-20001 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 1, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ）

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎并使均匀。

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

试样中残留的噁喹酸和氟甲喹用不同pH值的磷酸缓冲液提取， C_{18} 柱净化，流动相洗脱。以磷酸-乙腈-四氢呋喃作为流动相，用高效液相色谱-荧光检测法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合GB/T6682规定的二级水。

4.2.1 噁喹酸对照品 含噁喹酸($C_{13}H_{11}NO_5$)不得少于99.0%

4.2.2 氟甲喹对照品 含氟甲喹($C_{14}H_{12}FNO_3$)不得少于99.0%

4.2.3 磷酸

4.2.4 氢氧化钠

4.2.5 乙腈 色谱纯

4.2.6 四氢呋喃

4.2.7 磷酸二氢钾

4.2.8 氢氧化钠溶液 5.0mol/L

取氢氧化钠饱和液14mL，加水稀释至100mL。

4.2.9 氢氧化钠溶液 0.03mol/L

取 5.0mol/L 氢氧化钠液 0.6mL, 加水稀释至 100mL。

4.2.10 磷酸溶液 0.02mol/L

取 85%磷酸 1.36mL, 用水稀释至 1000mL。

4.2.11 磷酸盐缓冲液 (用于肌肉、脂肪组织)

取磷酸二氢钾 6.8g, 加水使溶解并稀释至 500mL, 用 5.0mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0。

4.2.12 磷酸盐缓冲液 (用于肝脏、肾脏组织)

取磷酸二氢钾 6.8g, 加水溶解并稀释至 500mL, pH 为 4.0~5.0。

4.2.13 噁唑酸和氟甲唑标准储备液

准确称取噁唑酸和氟甲唑对照品各 50mg, 用 0.03mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释成浓度为 1mg/mL 的储备液, 置 2℃~8℃ 冰箱中保存, 有效期 1 个月。

4.2.14 噁唑酸和氟甲唑标准工作液

准确量取适量噁唑酸和氟甲唑标准储备液, 用乙腈稀释成适宜浓度的噁唑酸和氟甲唑标准工作液。

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 分析天平 感量 0.0001g

4.3.3 天平 感量 0.01g

4.3.4 振荡器

4.3.5 组织匀浆机

4.3.6 离心机

4.3.7 聚丙烯离心管 25 mL、50mL

4.3.8 固相萃取柱 C_{18} 100mg/mL, 含碳量 $\geq 16\%$

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 (2 ± 0.05) g 试料, 置 30mL 匀浆杯中, 加磷酸盐缓冲液 10.0mL, 10000r/min 匀浆 1min。液转入 50mL 聚丙烯离心管中, 振荡混合 5min, 4000r/min 离心 10min, 上清液转入另一 25mL 离心管中。磷酸盐缓冲液 10.0mL 洗刀头及匀浆杯, 转入 50mL 离心管洗残渣, 搅匀, 振荡, 离心。合并上清液于离心管中, 备用。

4.4.3 净化

C_{18} 固相萃取柱依次用 2mL 甲醇、2mL 润洗, 润洗完毕后, 准确量取 10.0mL 备用液过柱, 用 2mL 水挤干。加 2.0mL 流动相洗脱, 挤干。收集洗脱液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量噁唑酸和氟甲唑标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为 0.01, 0.025, 0.1, 0.3, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的噁唑酸和氟甲唑标准溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.5 测定

4.4.5.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 150mm $\times$ 4.6mm (i. d.), 粒径 5 μm , 或相当者。

保护柱: 10GC₄ ODS₂ C_{18}

流动相: 0.02mol/L 磷酸溶液-乙腈-四氢呋喃 (69+16+15), 用前过 0.45 μm 滤膜。

流速: 0.8mL/min。

检测波长：激发波长325nm；发射波长369nm。

进样量：20μL。

4.5.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液，作单点或多点校准，以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样溶液中噁唑酸和氟甲喹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，噁唑酸和氟甲喹的保留时间分别在5min和11min左右，标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录A中图A.1、图A.2。

4.4.6 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

按下式计算试料中噁唑酸或氟甲喹的残留量(μg/kg)：

$$X = \frac{A C_s V_1 V_3}{A_s V_2 M}$$

式中：

X —— 试料中噁唑酸或氟甲喹的残留量(ng/g)；

A —— 试样溶液中噁唑酸或氟甲喹的峰面积；

C_s —— 标准工作液中噁唑酸或氟甲喹的浓度(ng/mL)；

V₁ —— 提取用磷酸盐缓冲液总体积(mL)；

V₃ —— 试样溶液体积(mL)；

A_s —— 标准工作液中噁唑酸或氟甲喹的峰面积；

V₂ —— 过C₁₈固相萃取柱所用备用液体积(mL)；

M —— 组织样品的质量(g)。

注：算结果需扣除空白试料值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中的检测限为：噁唑酸 20μg/kg；氟甲喹 20μg/kg。

5.2 准确度

本方法在 20μg/kg~300μg/kg 添加浓度的回收率为 65%~100%。

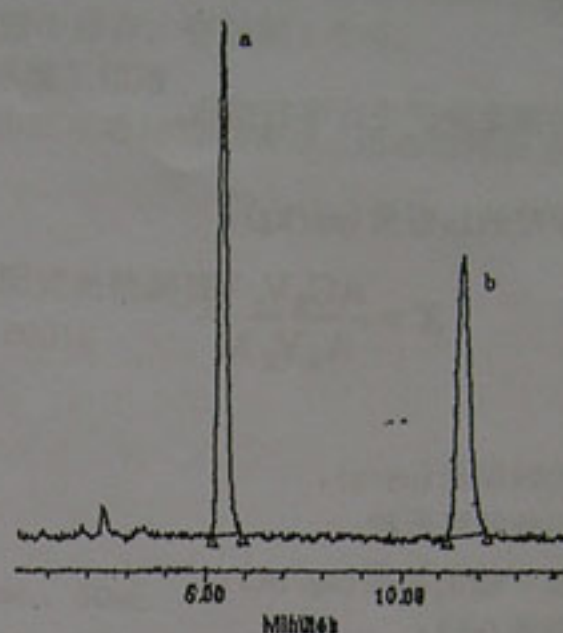
5.3 精密度

本方法的批内变异系数 CV≤10%，批间变异系数 CV≤15%。

附录A 噁唑酸和氟甲喹的液相色谱图

图A.1

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

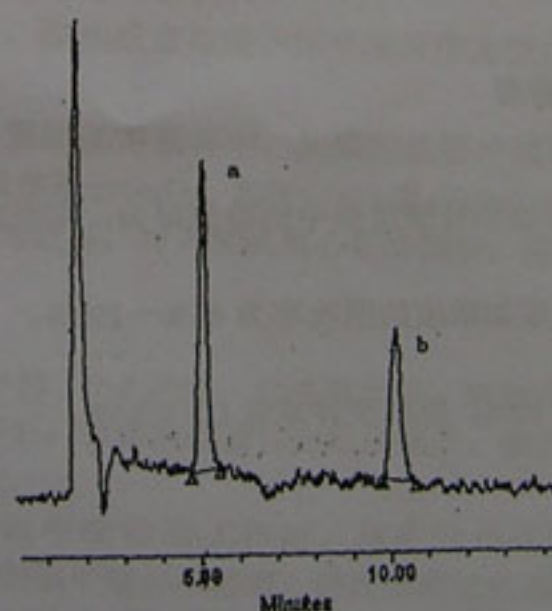


色谱峰:

a—— 嘧啶酸;

b—— 氟甲嘧。

图 A.1 嘧啶酸及氟甲嘧标准溶液色谱图



色谱峰:

a—— 嘧啶酸;

b—— 氟甲嘧。

图 A.2 肌肉组织中嘧啶酸及氟甲嘧色谱图

动物性食品中噁唑酸和氟甲噻残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中噁唑酸和氟甲噻残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。本标准适用于带皮鱼肌肉中噁唑酸和氟甲噻残留量的检测。

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/T1.1-20001 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 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎并使均匀。

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

试样中残留的噁唑酸和氟甲噻用干燥的乙酸乙酯液提取，50℃~55℃旋转蒸发至干，用0.02mol/L磷酸溶液溶解。以磷酸-乙腈-四氢呋喃作为流动相，用高效液相色谱-荧光检测法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合GB/T6682规定的二级水。

4.2.1 噁唑酸对照品 含噁唑酸($C_{13}H_{11}NO_5$)不得少于99.0%

4.2.2 氟甲噻对照品 含氟甲噻($C_{14}H_{12}FNO_3$)不得少于99.0%

4.2.3 磷酸

4.2.4 氢氧化钠

4.2.5 乙腈 色谱纯

4.2.6 四氢呋喃

4.2.7 乙酸乙酯

4.2.8 无水硫酸钠

4.2.9 正己烷

4.2.10 氢氧化钠溶液 5.0mol/L

取氢氧化钠饱和液 14mL，加水稀释至 100mL。

4.2.11 氢氧化钠溶液 0.03mol/L

取 5.0mol/L 氢氧化钠液 0.6mL, 加水稀释至 100mL。

4.2.12 磷酸溶液 0.02mol/L

取 85%磷酸 1.36mL, 用水稀释至 1000mL。

4.2.13 干燥的乙酸乙酯液

取 25g 无水硫酸钠于 500 mL 乙酸乙酯中, 摇匀、放置液体清晰即可。

4.2.14 噁唑酸和氟甲唑标准储备液

准确称取噁唑酸和氟甲唑对照品各 50mg, 用 0.03mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释成浓度为 1mg 的储备液, 置 2℃~8℃冰箱中保存, 有效期 1 个月。

4.2.15 噁唑酸和氟甲唑标准工作液

准确量取适量噁唑酸和氟甲唑标准储备液, 用乙腈稀释成适宜浓度的噁唑酸和氟甲唑标准工作液。

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 分析天平 感量 0.0001g

4.3.3 天平 感量 0.01g

4.3.4 振荡器

4.3.5 组织匀浆机

4.3.6 旋转蒸发仪

4.3.7 离心机

4.3.8 玻璃离心管 10mL、50mL

4.3.9 茄形瓶 50mL

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品, 作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品, 作为空白试料。

——取绞碎后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 (2±0.05) g 试料, 置于 30mL 匀浆杯中, 加干燥的乙酸乙酯液 12mL, 无水硫酸钠 2g, 10000r/min 匀浆 1min。匀浆液转入 50mL 离心管中, 振荡混合 5min, 3000r/min 离心 10min, 上清液转入茄形瓶中, 残渣转入原匀浆杯, 加干燥的乙酸乙酯液 10mL, 重复提取一遍。上清液合并于茄形瓶中, 50℃~55℃ 旋转蒸发至干, 用适量 0.02mol/L 磷酸溶液、2mL 正己烷溶解残余物, 转入 10mL 离心管中, 3000r/min 离心 10min, 取下层清液, 作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.3 标准曲线的制备

准确量取适量噁唑酸和氟甲唑标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 μg/mL 的噁唑酸和氟甲唑标准溶液, 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 150mm×4.6mm (i. d.), 粒径 5 μm, 或相当者。

保护柱: 10GC₄ ODS₂ C₁₈

流动相: 0.02mol/L 磷酸溶液-乙腈-四氢呋喃 (69+16+15), 用前过 0.45 μm 滤膜。

流速: 0.8mL/min。

检测波长: 激发波长 325nm; 发射波长 369nm。

进样量: 20 μL。

4.2 测定法

取适量试样溶液和相应的标准工作溶液，作单点或多点校准，以色谱峰面积积分值定量。标准工作及试样溶液中噁嗪酸和氟甲嗪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，噁嗪酸和氟甲嗪的保留时间分别在5min和11min左右，标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录A中图、图A.2。

5 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

5. 结果计算和表述

按下式计算试料中噁嗪酸或氟甲嗪的残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$)：

$$X = \frac{AC_s V}{A_s M}$$

式中：

X —— 试料中噁嗪酸或氟甲嗪的残留量(ng/g)；

A —— 试样溶液中噁嗪酸或氟甲嗪的峰面积；

C_s —— 标准工作液中噁嗪酸或氟甲嗪的浓度(ng/mL)；

V —— 浓缩至干后，溶解残余物所用0.02mol/L磷酸溶液的总体积(mL)；

A_s —— 标准工作液中噁嗪酸或氟甲嗪的峰面积；

M —— 组织样品的质量(g)。

注：计算结果需扣除空白试料值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留至小数点后2位。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在带皮鱼肌肉组织中的检测限为：噁嗪酸 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ ；氟甲嗪 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

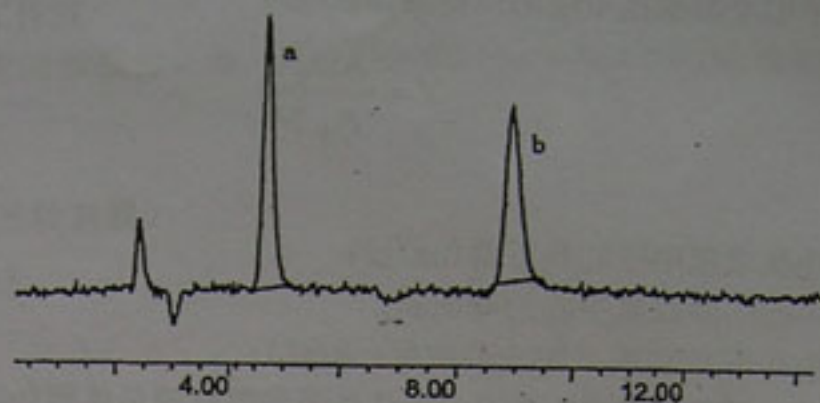
5.2 准确度

本方法在 $20\mu\text{g}/\text{kg} \sim 300\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为80%~100%。

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

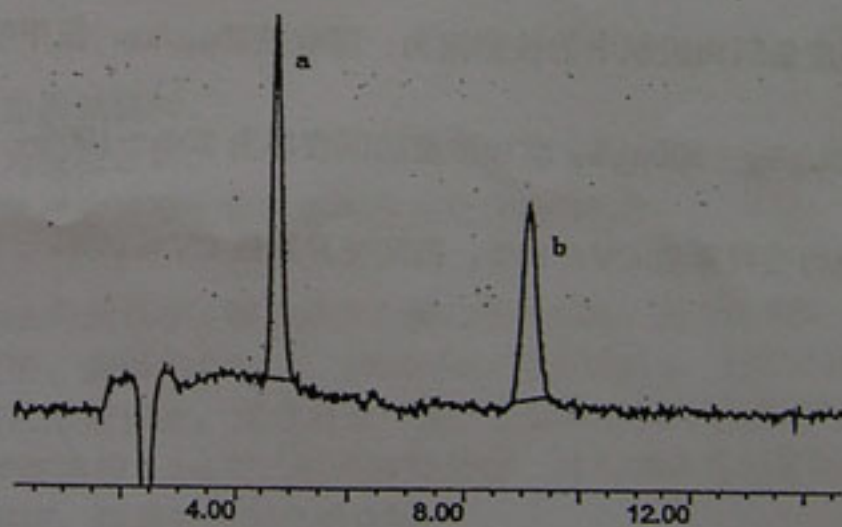


色谱峰:

a—— 尿酸;

b—— 氟甲喹。

图 A.1 尿酸及氟甲喹标准溶液色谱图



色谱峰:

a—— 尿酸;

b—— 氟甲喹。

图 A.2 鱼肌肉组织中尿酸及氟甲喹色谱图

动物性食品中苯唑西林残留检测方法-微生物法

1 部分：纸色谱筛选法

范围

本标准规定了动物性食品中苯唑西林残留量检测的制样和纸色谱筛选方法。

本标准适用于鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织中苯唑西林残留的筛选。

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决定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 1, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

中华人民共和国兽药典 二〇〇〇年版

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

1.3 制样

1.3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎使均匀。

1.3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

1.4 测定方法

1.4.1 方法提要或原理

试料中残留的苯唑西林经水提取，用硫酸溶液和钨酸钠溶液除去蛋白。溶液通过净化富集柱富集，洗脱液经纸层析分离，用以嗜热脂肪芽孢杆菌为测试菌的微生物法显影，与对照品的位置比较。

1.4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇二年版规定的纯化水。

1.4.2.1 苯唑西林钠标准品

1.4.2.2 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) ATCC 10149

斜面培养基（见附录 A.1）每月传代一次，置 2℃~8℃ 冰箱中保存。

1.4.2.3 青霉素酶 不得少于 200 万单位/mL

1.4.2.4 乙腈

1.4.2.5 25%氯化钠溶液

取氯化钠 25g，加水至 100mL，溶解，混匀。

1.4.2.6 2%氯化钠溶液

取氯化钠 2g，加水至 100mL，溶解，混匀。

1.4.2.7 0.9%灭菌氯化钠溶液

取氯化钠 0.9g，加水至 100mL，溶解，混匀，115℃ 灭菌 30min。

1.4.2.8 硫酸溶液

取硫酸 1mL, 缓缓加入到 100mL 水中, 混匀。

1.4.2.9 钨酸钠溶液

取钨酸钠 5g, 加水 100mL, 溶解, 混匀。

1.4.2.10 乙腈溶液

取乙腈 80mL, 加水至 100mL, 混匀。

1.4.2.11 丙酮溶液

取丙酮 50mL, 加水至 100mL, 混匀。

1.4.2.12 标准溶液的制备

取苯唑西林标准品适量, 精密称定, 用丙酮溶液溶解并稀释成浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, 再用丙酮溶液稀释成 $1 \mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

1.4.2.13 展开剂

(制备: 正戊醇-丙酮-水 (4+1+3), 充分混合, 静置, 取完全澄清的上层溶液, 备用)

1.4.2.14 菌悬液的制备

将测试菌种接种至培养与保存培养基 (见附录 A.1) 斜面上, 置 $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 培养 24h, 用 0.9% 氯化钠溶液 7mL 洗下菌苔, 置 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 可使用 1 个月。

1.4.3 仪器与设备

1.4.3.1 显影槽 内部尺寸为 $250\text{mm} \times 250\text{mm} \times 30\text{mm}$ 的玻璃槽并配有玻璃盖

1.4.3.2 显影平板

(制备: 取显影培养基 (见附录 A.2) 适量, 加热融化后, 置水浴中冷却至 $54^\circ\text{C} \sim 56^\circ\text{C}$, 加入悬液适量 (以能得清晰抑菌斑为准), 摇匀, 取 60mL 加入经消毒、干燥的显影槽内, 使其均匀摊置水平台上凝固。)

1.4.3.3 振荡器

1.4.3.4 离心机

1.4.3.5 恒温培养箱

1.4.3.6 C_{18} 净化富集柱 250mg

1.4.3.7 旋转蒸发器

1.4.3.8 电热恒温水浴

1.4.3.9 分析天平 感量 0.0001g

1.4.3.10 天平 感量 0.01g

1.4.3.11 层析滤纸

长 200mm, 适当宽度的滤纸。于 180°C 干热灭菌 1h, 放冷至室温, 当天使用。

1.4.4 测定步骤

1.4.4.1 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, 按 $300 \mu\text{g/kg}$ 的量加入苯唑西林标准品, 作为空白添加试料。

——取供试样品, 加水 20mL, 再加入适量的青霉素酶 (能够全部水解样品中不耐青霉素酶的内酰胺类抗生素), 摇匀, 于 37°C 水浴中放置 1h, 作为判定试验试料。

1.4.4.2 提取

称取 $(5 \pm 0.01)\text{g}$ 试料, 置 250mL 离心管中, 加水 30mL, 加入硫酸溶液 5mL, 钨酸钠溶液 5mL, 5min, 3500r/min 离心 5min, 取上清液用滤纸过滤, 备用。

1.4.4.3 净化

C₁₈富集柱依次用乙腈10mL, 水10mL, 25%氯化钠5mL减压抽洗。取备用液减压过柱, 依次用2%氯溶液10mL、水10mL洗涤, 抽干。用乙腈溶液5mL减压洗脱, 收集洗脱液于25mL蒸发瓶中, 在65℃旋发至干。残渣加入丙酮溶液1.5mL, 振摇使全部溶解作为试样溶液, 当天使用。

4.4 测定

在距层析滤纸下端2cm处依次点入标准溶液10 μ L、试样溶液10 μ L、判定试验试剂溶液10 μ L、标准溶液5 μ L、试样溶液5 μ L、判定试验试剂溶液5 μ L, 每个样点间隔2cm以上。待样点溶剂挥干后, 放入用展开剂饱和2h以上的层析缸中, 上行法展开10cm, 取出, 在紫外灯照射下晾干。

将层析后的滤纸正面向下平铺于显影平板上, 盖好盖子, 放置30min, 小心取下滤纸, 将显影槽倒置于64℃培养1.5h~2.5h, 注意观察, 直至培养基的蓝色变成黄色, 与样点位置对应处显现的蓝色抑菌斑最清晰。

4.5 结果判定和表述

4.5.1 对试验过程的验证

对照组只有符合下述要求才能进行下一步的结果判定, 否则需要检查各试验环节, 重新操作。

——空白试剂在与标准品斑点对应处不得产生抑菌斑。

——空白添加试剂在与标准品斑点对应处应出现抑菌斑。10 μ L空白添加试剂所致抑菌斑的大小应与标准品所致抑菌斑相近, 不得等于或小于5 μ L标准品抑菌斑; 5 μ L空白添加试剂须产生明显可见的抑菌斑, 且大小应与5 μ L标准品所致抑菌斑相近, 不得等于或超过10 μ L标准品所致抑菌斑。

4.5.2 结果判定

试样溶液及判定试验试剂在与标准品溶液所显斑点对应处均无抑菌斑, 判定供试试料中没有残留的苯唑西林;

试样溶液在与标准品溶液对应处有抑菌斑, 而判定试验试剂在此处没有抑菌斑, 判定供试试料中残留青霉素类抗生素;

10 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均等于或小于5 μ L标准品溶液所致抑菌斑, 且5 μ L试样溶液及判定试验试剂均无抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量等于或小于150 μ g/kg;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均小于对应的10 μ L、5 μ L标准品溶液所致抑菌斑, 且10 μ L试样溶液及判定试验试剂的抑菌斑均大于5 μ L标准品溶液所致的抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量在150 μ g/kg~300 μ g/kg之间;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑与对应的10 μ L、5 μ L标准品溶液所致抑菌斑相近, 判定供试试料中苯唑西林残留量大约为300 μ g/kg;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均大于对应的10 μ L、5 μ L标准品溶液所致抑菌斑, 但5 μ L试样溶液及判定试验试剂的抑菌斑均小于10 μ L标准品溶液所致的抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量在300 μ g/kg~600 μ g/kg之间;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均大于10 μ L标准品溶液所致抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量大于600 μ g/kg。

1.5 判定方法的灵敏度

本方法在鸡的肌肉、肝脏和肾脏中的检出限为150 μ g/kg。

2 第2部分: 微生物测定法

2.1 范围

本标准规定了动物源食品中苯唑西林残留量检测的制样和微生物检测方法。

本标准适用于使用过苯唑西林、且经纸色谱筛选判定含有苯唑西林的鸡的肌肉、肝脏、肾脏组织中苯唑西林的检测。

2.2 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)

中华人民共和国兽药典 二〇〇〇年版

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

2.3 制样

2.3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎使均匀。

2.3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

2.4 测定方法

2.4.1 方法提要或原理

试料中残留的苯唑西林经含5%氯化钠的磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 提取，82℃加热后，上清液按抗生素微生物检定法，标准曲线法，以藤黄微球菌 (28004) 为检定菌，用8mL单层平板测定。

2.4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇二年版规定的纯化水。

2.4.2.1 苯唑西林钠标准品

2.4.2.2 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) CMCC 28004

2.4.2.3 磷酸氢二钾

2.4.2.4 磷酸二氢钾

2.4.2.5 氯化钠

2.4.2.6 葡萄糖

2.4.2.7 胰 生化试剂

2.4.2.8 胰蛋白胨 生化试剂

2.4.2.9 酵母浸膏 生化试剂

2.4.2.10 牛肉浸膏 生化试剂

2.4.2.11 琼脂 生化试剂

2.4.2.12 菌悬液的制备

取藤黄微球菌的营养琼脂斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基 (见附录A.3) 的培养瓶中，在26℃~27℃培养24h，用0.9%灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，置2℃~8℃保存，可使用2周。

2.4.2.13 磷酸缓冲液 (pH6.0, 含5%氯化钠)

取磷酸氢二钾10g、磷酸二氢钾2g、氯化钠50g，加水使成1000mL，滤过，分装，115℃灭菌30min。

2.4.2.14 苯唑西林标准储备液

取苯唑西林标准品适量，精密称定，用缓冲液制成1000μg/mL浓度的储备液。2℃~8℃冰箱保存，有效期1周。

2.4.2.15 苯唑西林标准工作溶液

临用前，准确量取适量的苯唑西林标准储备液，按1:1.5的剂间比，用缓冲液逐步稀释成0.026、0.040、0.060、0.135、0.200μg/mL浓度的溶液。以0.040μg/mL为参考浓度标准工作溶液。

2.4.3 仪器与设备

1.1 分析天平 感量 0.0001g

1.2 天平 感量 0.01g

1.3 平底双碟

直径约 90mm, 高 16mm~17mm, 符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇〇年版一部要求

1.4 不锈钢小管

高 (10±0.1) mm, 外径 (8±0.1) mm, 内径 (6±0.1) mm, 符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇〇年版一部要求。

1.3.5 游标卡尺 (精度 0.02mm) 或抑菌圈测量仪

1.3.6 均质器

1.3.7 离心机

1.3.8 恒温培养箱

1.3.9 高压灭菌锅

1.3.10 微型混合器

1.3.11 电热恒温水浴

1.4 测定步骤

1.4.1 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, 按 193、300、600 μg/mL 三个剂量点加入标准溶液适量, 作为空白添加试料。

2.4.4.2 双碟的制备

取平板培养基 (见附录A.4), 加热融化, 置水浴中冷却至 (50±1) °C, 加入适量菌悬液 (以参考标准工作溶液所致抑菌圈直径在 12.5mm~14.5mm 为宜), 摇匀, 每个双碟加入 8mL, 均匀摊布, 放置水平台上冷却, 待培养基凝固后, 将双碟倒置于 2°C~8°C 冷藏 1h 以上。临用前取出, 在每个双碟内半径为 28mm 圆周上等距离放置 6 个不锈钢小管。

2.4.4.3 标准曲线的制备

取当天制备好的双碟, 平均分为 6 组, 按苯唑西林标准工作溶液每一浓度为 1 组, 每一双碟内的 6 个不锈钢小管中, 间位的 3 个滴加参考浓度标准工作溶液, 另外 3 个滴加该组标准工作溶液, 每组滴加至少 3 个双碟。于 36°C~37°C 培养 16h~18h, 测量各组参考标准工作溶液和该组工作溶液抑菌圈数值分别计算平均值, 再计算所有双碟参考标准工作溶液抑菌圈的总平均值, 作为修正值。各浓度组的抑菌圈数值按 (1) 式修正:

$$A' = B - B' + A \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A' ——该浓度组标准工作溶液被修正后的抑菌圈数值;

B ——修正值;

B' ——该浓度组中参考浓度标准工作溶液所致抑菌圈数值平均值;

A ——该浓度标准工作溶液抑菌圈的平均值。

以各组溶液浓度的对数与该组被修正后的抑菌圈数值做标准曲线, 求出回归方程, 相关系数 r 应不小于 0.99。

2.4.4.4 提取

取 (3±0.05) g 试料, 置 50mL 离心管中, 加入磷酸缓冲液使总体积为 11.0mL (试样以每 1g 为 1mL 计), 于微型混合器上旋涡提取, 肌肉 1min, 肝脏、肾脏 30s, 于 (82±1) °C 水浴中加热 5min, 冷却至室温, 7000r/min 离心 15min, 取上清液作为试样溶液, 供微生物法测定。

2.4.4.5 测定

取与标准曲线同时制备的双碟至少3个, 按标准曲线的制备方法分别滴加试样溶液和参考浓度标准工作溶液, 与标准曲线同时操作和培养。

2.4.5 结果计算和表述

用由回归方程求出的参考浓度标准工作溶液对应的抑菌圈数值, 求出试样中苯唑西林的浓度, 按(2)式计算试料中苯唑西林的残留量。

按(2)式计算试料中苯唑西林的残留量($\mu\text{g/kg}$):

$$X = \frac{C V}{M} \times 1000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X——试料中苯唑西林的残留量($\mu\text{g/kg}$);

C——试样溶液中苯唑西林的浓度($\mu\text{g/mL}$);

V——提取液总体积(mL);

M——组织样品的质量(g)。

2.5 检测方法的灵敏度、准确度、精密度

2.5.1 灵敏度

本方法在鸡的肌肉、肝脏和肾脏中的检测限为 $193\mu\text{g/kg}$ 。

2.5.2 准确度

本方法在鸡的肌肉、肝脏组织中的回收率为60%~110%, 肾脏组织中的回收率为40%~100%。

2.5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 20\%$, 批间变异系数 $CV \leq 30\%$ 。

附 录 A
(规范性附录)
培养基的配制

1 嗜热脂肪芽孢杆菌培养与保存培养基

胰酶水解酪蛋白胨	15.0g
番木瓜蛋白酶消化大豆	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

除琼脂外，混合上述成分，调节pH值使比最终pH值略高0.2~0.4，加入琼脂加热溶化后滤过，调节pH值使灭菌后为7.3±0.2，分装，115℃灭菌30min。制备斜面时，趁热斜放使凝固成斜面。

A.2 显影培养基

牛肉浸膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
胰酶水解蛋白胨	1.7g
大豆蛋白胨	0.3g
葡萄糖	5.25g
氯化钠	0.5g
磷酸氢二钾	0.25g
吐温-80	1.0g
溴甲酚紫	0.06g
琼脂	13g~15g
水	1000mL

除葡萄糖、琼脂、溴甲酚紫外，混合上述成分，调节pH值使比最终pH值略高0.2~0.4，加入琼脂加热溶化后，加入剩余成分，调节pH值使灭菌后为7.6~8.0，115℃灭菌30min。

A.3 营养琼脂培养基

胨	5g
酵母浸膏	2g
牛肉浸膏	1g
氯化钠	5g
琼脂	15g
水	1000mL

除琼脂外，混合上述成分，调节pH值使比最终pH值略高0.2~0.4，加入琼脂加热溶化后滤过，调节pH值使灭菌后为7.4±0.1，分装，115℃灭菌30min。制备斜面时，趁热斜放使凝固成斜面。

A.4 平板培养基

蛋白胨	6g
胰酶水解蛋白胨	4g
酵母浸膏	3.0g

牛肉浸膏	1.5g
葡萄糖	1g
琼脂	15g
水	1000mL

除琼脂和葡萄糖外，混合上述成分，调节pH值使比最终的pH值略高0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后，加葡萄糖溶解后摇匀，调节pH值使灭菌后为6.5~6.6，115℃灭菌30min。

动物性食品中青霉素类抗生素残留检测方法-微生物法

范围

本标准规定了动物性食品中青霉素类抗生素残留的微生物学检测方法。

本标准适用于鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织中青霉素类抗生素的残留检测。

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/T1.1-20001 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)

中华人民共和国兽药典 二〇〇〇年版

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编写规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎使均匀。

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

试料中残留的青霉素类抗生素经磷酸盐缓冲液(pH6.0)提取，取上清液按照微生物琼脂扩散法，以藤黄微球菌为测试菌测定，用标准曲线法进行定量，以青霉素酶法进行判定。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇二版规定的纯化水。

4.2.1 青霉素标准品

4.2.2 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) CMCC 28004

4.2.3 青霉素酶 不得少于200万单位/mL

4.2.4 磷酸氢二钾

4.2.5 磷酸二氢钾

4.2.6 胨 生化试剂

4.2.7 胰蛋白胨 生化试剂

4.2.8 酵母浸出膏 生化试剂

4.2.9 牛肉浸出膏 生化试剂

4.2.10 葡萄糖

4.2.11 琼脂 生化试剂

4.2.12 0.9%氯化钠溶液

称取9.0g氯化钠,溶解于1000mL水中,121℃高压灭菌15min。

4.2.13 灭菌磷酸盐缓冲液 (pH6.0)

取8g无水磷酸二氢钾和2g磷酸氢二钾,用1000mL水溶解,121℃高压灭菌15min。

4.2.14 菌悬液的制备

取藤黄微球菌(28004)的营养斜面培养物(每个月传代一次),将菌种接种至营养琼脂斜面培养基(见附录A.1)上,置26℃~27℃培养24h,用0.9%灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下,置2℃~8℃冰箱中保存,可使用2周。

4.2.15 青霉素标准储备液

准确称取青霉素标准品适量,用磷酸盐缓冲液(pH6.0)溶解并稀释成浓度为1000 μg/mL的储备液,(-20±2)℃冰箱保存,有效期1周。

4.2.16 青霉素标准工作液

准确量取适量的标准储备液,以1:1.5的剂间比,用磷酸盐缓冲液(pH6.0)逐步稀释成适宜浓度的标准工作液。

4.3 仪器与设备

4.3.1 平底双碟 直径约90mm,高16mm~17mm

4.3.2 不锈钢片 六孔,重量(25±1.0)g(见附录B)

或不锈钢小管 高(10±0.1)mm,内径(6±0.1)mm

4.3.3 游标卡尺(精度0.02mm)或抑菌圈测定仪

4.3.4 匀浆机

4.3.5 离心机

4.3.6 恒温培养箱

4.3.7 高压灭菌锅

4.3.8 微量移液器 200 μL

4.3.9 振荡器

4.3.10 电热恒温水浴锅

4.3.11 分析天平 感量0.00001g

4.3.12 天平 感量0.01g

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,按25、50、100 μg/kg三个剂量点加入标准溶液适量,作为空白添加试料。

4.4.2 双碟的制备

吸取已融化的下层培养基(见附录A.2)10mL,注入双碟并使其均匀摊布,凝固后作为底层。将上层培养基(见附录A.3)融化,置水浴中冷却至(50±1)℃,加入菌悬液(以参考浓度标准工作溶液所致抑菌圈直径在17.5mm~19.5mm为宜),摇匀。吸取4.0mL,使其均匀摊布在底层培养基上,待凝固后,备用。

4.4.3 标准曲线的制备

取浓度分别为8.89、13.33、20.00、30.00、45.00、67.50ng/mL的标准工作液,以25.00ng/mL的标准工作液为参考浓度标准工作液,每个标准工作液取至少3个双碟,在每个双碟中放置不锈钢片(或在半径为2.8cm圆周上等间距放置6个不锈钢小管),间位的3个加样孔中滴加200 μL参考浓度标准工作液,另外3个加样孔中滴加200 μL其他浓度的一种标准工作液。于33℃~35℃培养18h~24h,测量各组中

和该组溶液抑菌圈数值分别计算平均值,再计算所有双碟参考标准工作溶液抑菌圈的总平均值,正值。各浓度组的抑菌圈数值按(1)式修正:

$$A' = B - B' + A \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A'——该浓度组标准工作溶液被修正后的抑菌圈数值;

B——修正值;

B'——该浓度组中参考浓度标准工作溶液所致抑菌圈数值平均值;

A——该浓度标准工作溶液抑菌圈的平均值。

以各组溶液浓度的对数与该组被修正后的抑菌圈数值做标准曲线,求出回归方程。相关系数 r 应不小于0.99。

4.4.4 提取

取试料(5±0.05)g,加磷酸盐缓冲液(pH6.0)7.0mL,8000r/min匀浆30s,振摇15min,在(84±2)℃水浴中加热10min,7000r/min离心15min,取上清液作为试样溶液,供微生物法测定。

4.4.5 测定法

取与标准曲线同时制备的至少3个双碟,与标准曲线的制备方法相同,分别滴加样品上清液和参考浓度标准工作液,与标准曲线同时操作。

4.5 结果计算和表述

样品溶液抑菌圈平均直径与标准曲线参考浓度工作液抑菌圈平均直径校正后,用回归方程求出每克试样中青霉素类抗生素的残留量。

按(2)式计算试料中青霉素类抗生素的残留量(μg/kg):

$$X = \frac{C \cdot V}{M} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——试样中青霉素类抗生素的残留量(ng/g);

C——试样中青霉素类抗生素的浓度(ng/mL);

V——试样总体积(mL);

M——组织样品的质量(g)。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在鸡的肌肉、肝脏、肾脏组织中的检测限为10μg/kg。

5.2 准确度

鸡肌肉组织中回收率为60%~110%,鸡肝脏组织中回收率为60%~100%,鸡肾脏中回收率为40%~110%。

5.3 精密度

批内变异系数 $CV \leq 20\%$,批间变异系数 $CV \leq 30\%$ 。

附录 A
(规范性附录)
培养基的配制

A.1 营养琼脂斜面培养基

胨	10g
琼脂	15g~20g
氯化钠	5g
牛肉浸膏	1000mL

除琼脂外,混合上述成分,调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4,加入琼脂,加热融化后滤过,调节 pH 值使灭菌后为 7.2~7.4,分装,灭菌,趁热斜放使凝固成斜面。

A.2 下层培养基

胨	6g
酵母浸膏	3g
牛肉浸膏	1.5g
葡萄糖	1g
琼脂	15g
水	1000mL

除琼脂和葡萄糖外,混合上述成分,调节 pH 值使比最终的 pH 值高 0.2~0.4,加入琼脂,加热融化后滤过,加葡萄糖溶解后,摇匀,调节 pH 值使灭菌后为 6.5~6.6,在 115℃灭菌 30min。

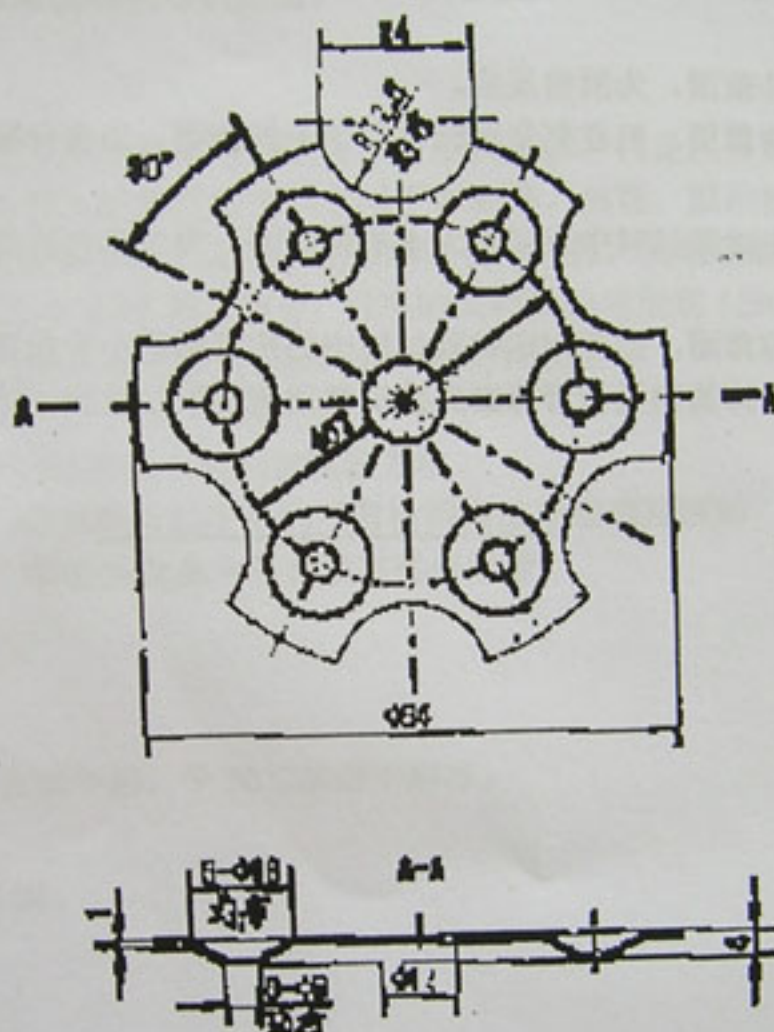
A.3 上层培养基

胨	6g
胰蛋白胨	4g
酵母浸膏	3g
牛肉浸膏	1.5g
葡萄糖	1g
琼脂	15g
水	1000mL

除琼脂和葡萄糖外,混合上述成分,调节 pH 值使比最终的 pH 值高 0.2~0.4,加入琼脂,加热融化后滤过,加葡萄糖溶解后,摇匀,调节 pH 值使灭菌后为 6.5~6.6,在 115℃灭菌 30min。

附录 B
(规范性附录)
不锈钢片的规格

单位: mm



附 录 C
(规范性附录)
判定实验

C.1 青霉素酶的判定试验

每 10mL 组织样品提取液加 1.0mL 青霉素酶, 在 37℃ 培养 30min, 作为判定试验试料。

结果判断:

1. 在供试试料中无抑菌圈, 为阴性反应。
 2. 在供试试料中有抑菌圈, 但在判定试验试料中无抑菌圈, 为含青霉素类抗生素残留的阳性反应。
 3. 在供试试料和判定试验试料中有同等大小的抑菌圈, 为含其它抑菌物、不含青霉素类抗生素残留的阳性反应。
 4. 在供试试料中有抑菌圈, 但在判定试验试料中的抑菌圈远小于加青霉素酶的组织样品提取液中的抑菌圈, 为即含其它抑菌物又含青霉素类抗生素残留的阳性反应。
-

动物性食品中苯唑西林残留检测方法-纸色谱筛选法

范围

本标准规定了动物性食品中苯唑西林残留量检测的制样和纸色谱筛选方法。

本标准适用于牛奶中苯唑西林残留的筛选。

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/T1.1-20001 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）

中华人民共和国兽药典 二〇〇〇年版

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编写规则

农牧发[1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量冷冻的空白或供试牛奶，于30℃水浴中解冻。

3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料中残留的苯唑西林用乙二胺四乙酸二钠的饱和溶液提取，过C₁₈柱净化，洗脱液经纸层析分离，用以嗜热脂肪芽孢杆菌为测试菌的微生物法显影，与对照品的位置比较。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇二年版规定的纯化水。

4.2.1 苯唑西林钠标准品

4.2.2 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) ATCC 10149

斜面培养基（见附录A.1）每月传代一次，置2℃~8℃冰箱中保存。

4.2.3 青霉素酶 不得少于200万单位/mL

4.2.4 乙腈

4.2.5 25%氯化钠溶液

取氯化钠25g，加水至100mL，溶解，混匀。

4.2.6 2%氯化钠溶液

取氯化钠2g，加水至100mL，溶解，混匀。

4.2.7 0.9%灭菌氯化钠溶液

取氯化钠 0.9g, 加水至 100mL, 溶解, 混匀, 115℃灭菌 30min。

4.2.8 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 饱和溶液

在室温条件下, 量取水 100mL, 加乙二胺四乙酸二钠适量, 使其饱和, 放置过夜, 过滤, 取滤液备用。

4.2.9 乙腈溶液

取乙腈 80mL, 加水至 100mL, 混匀。

4.2.10 丙酮溶液

取丙酮 50mL, 加水至 100mL, 混匀。

4.2.11 标准溶液的制备

取苯唑西林标准品适量, 精密称定, 用丙酮溶液溶解并稀释成浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。再用丙酮溶液稀释成 $1 \mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

4.2.12 展开剂

(制备: 正戊醇-丙酮-水 (4+1+3), 充分混合, 静置, 取澄清的上层溶液, 备用。)

4.2.13 菌悬液的制备

将测试菌种接种至培养与保存培养基 (见附录 A.1) 上, 置 $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 培养 24h, 用 0.9% 灭菌氯化钠溶液 7mL 洗下菌苔, 置 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 可使用 1 个月。

4.3 仪器与设备

4.3.1 显影槽 内部尺寸为 $250\text{mm} \times 250\text{mm} \times 30\text{mm}$ 的玻璃槽并配有玻璃盖

4.3.2 显影平板

(制备: 取显影培养基 (见附录 A.2) 适量, 加热融化后, 置水浴中冷却至 $54^\circ\text{C} \sim 56^\circ\text{C}$, 加入菌悬液适量 (以能得清晰抑菌斑为准), 摇匀, 取 60mL 加入经消毒、干燥的显影槽内, 使其均匀摊布, 置水平台上凝固。)

4.3.3 振荡器

4.3.4 离心机

4.3.5 恒温培养箱

4.3.6 C_{18} 净化富集柱 250mg

4.3.7 旋转蒸发器

4.3.8 电热恒温水浴

4.3.9 分析天平 感量 0.0001g

4.3.10 层析滤纸

长 200mm, 宽度适当的滤纸。180℃干热灭菌 1h, 冷却至室温, 当天使用。

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, 按 $30 \mu\text{g/mL}$ 浓度加入苯唑西林标准品, 作为空白添加试料。

——取供试样品 25mL, 加水 20mL, 再加入适量的青霉素酶 (能够全部水解样品中不耐青霉素酶的 β -内酰胺类抗生素), 摇匀, 于 37°C 水浴中放置 1h, 作为判定试验试料。

4.4.2 提取

量取 25mL 试料, 置 250mL 离心管中, 加水 20mL, EDTA-2Na 饱和溶液 5mL, 振摇 5min, 3500r/min 离心 5min, 取上清液用滤纸过滤, 备用。

4.4.3 净化

将C₁₈富集柱依次用乙腈10mL, 水10mL, 25%氯化钠5mL减压抽洗。取备用液减压过柱, 依次用2%氯溶液10mL、水10mL洗涤, 抽干。用乙腈溶液5mL减压洗脱, 收集洗脱液于25mL蒸发瓶中, 65℃旋转至干, 残渣加入丙酮溶液0.75mL, 振摇使全部溶解作为试样溶液, 当天使用。

4.4 测定

在距层析滤纸下端2cm处, 依次点入标准溶液10 μ L、试样溶液10 μ L、判定试验试剂溶液10 μ L、标准溶液5 μ L、试样溶液5 μ L、判定试验试剂溶液5 μ L, 每个样点间隔2cm以上。待样点溶剂挥干后, 放入用展开剂饱和2h以上的层析缸中, 上行法展开10cm, 取出, 在紫外灯照射下晾干。

将层析后的滤纸正面向下平铺于显影平板上, 盖好盖子, 放置30min, 小心取下滤纸, 将显影槽倒置于64℃培养1.5h~2.5h, 注意观察, 直至培养基的蓝色变成黄色, 与样点位置对应处显现的蓝色抑菌斑最清晰。

4.5 结果判定和表述

4.5.1 对试验过程的验证

对照组只有符合下述要求才能进行下一步的结果判定, 否则需要检查各试验环节, 重新操作。

——空白试剂在与标准品斑点对应处不得产生抑菌斑。

——空白添加试剂在与标准品斑点对应处应出现抑菌斑。10 μ L 空白添加试剂所致抑菌斑的大小应与标准品所致抑菌斑相近, 不得等于或小于 5 μ L 标准品抑菌斑; 5 μ L 空白添加试剂须产生明显可见的抑菌斑, 且大小应与 5 μ L 标准品所致抑菌斑相近, 不得等于或超过 10 μ L 标准品所致抑菌斑。

4.5.2 结果判定

试样溶液及判定试验试剂在与标准品溶液所显斑点对应处均无抑菌斑, 判定供试试料中没有残留的苯唑西林;

试样溶液在与标准溶液对应处有抑菌斑, 而判定试验试剂在此处没有抑菌斑, 判定供试试料中残留青霉素类抗生素;

10 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均等于或小于5 μ L标准溶液所致抑菌斑, 且5 μ L试样溶液及判定试验试剂均无抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量等于或小于15 μ g/L;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均小于对应的10 μ L、5 μ L标准溶液所致抑菌斑, 且10 μ L试样溶液及判定试验试剂的抑菌斑均大于5 μ L标准溶液所致的抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量在15 μ g/L~30 μ g/L之间;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑与对应的10 μ L、5 μ L标准溶液所致抑菌斑相近, 判定供试试料中苯唑西林残留量约为30 μ g/L;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均大于对应的10 μ L、5 μ L标准溶液所致抑菌斑, 但5 μ L试样溶液及判定试验试剂的抑菌斑均小于10 μ L标准溶液所致的抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量在30 μ g/L~60 μ g/L之间;

10 μ L、5 μ L试样溶液及判定试验试剂产生的抑菌斑均大于10 μ L标准溶液所致抑菌斑, 判定供试试料中苯唑西林残留量大于60 μ g/L。

5. 判定方法的灵敏度

本方法在牛奶中的检出限为 15 μ g/L。

附 录 A
(规范性附录)
培养基的配制

A.1 嗜热脂肪芽孢杆菌培养与保存培养基

胰酶水解酪蛋白胨	15.0g
番木瓜蛋白酶消化大豆	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

除琼脂外,混合上述成分,调节pH值使比最终pH值略高0.2~0.4,加入琼脂加热溶化后滤过,调节pH值使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ,分装,115℃灭菌30min。制备斜面时,趁热斜放使凝固成斜面。

A.2 显影培养基

牛肉浸膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
胰酶水解蛋白胨	1.7g
大豆蛋白胨	0.3g
葡萄糖	5.25g
氯化钠	0.5g
磷酸氢二钾	0.25g
吐温-80	1.0g
溴甲酚紫	0.06g
琼脂	13g~15g
水	1000ml

除葡萄糖、琼脂、溴甲酚紫外,混合上述成分,调节pH值使比最终pH值略高0.2~0.4,加入琼脂加热溶化后,加入剩余成分,调节pH值使灭菌后为7.6~8.0,115℃灭菌30min。

动物性食品中氯霉素残留检测方法-高效液相色谱法

范围

本标准规定了动物性食品中氯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氯霉素的残留量检测。

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 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编制规则

农牧发[1999] 17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量冷冻的空白或供试牛奶，于 30℃ 水浴中解冻。

3.2 样品的保存

-20℃ 以下冰箱贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试样中残留的氯霉素用乙酸乙酯提取，旋转蒸发至干，残渣用正己烷-氯仿溶解，并加少量水，混匀，离心，取上清液，以磷酸氢二铵-乙腈作为流动相，用高效液相色谱-紫外检测法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合 GB/T6682 规定的二级水。

4.2.1 氯霉素对照品 含氯霉素 ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) 不得少于 99.0%

4.2.2 乙酸乙酯 重蒸

4.2.3 甲醇 色谱纯

4.2.4 三氯甲烷

4.2.5 正己烷

4.2.6 乙腈 色谱纯

4.2.7 氯霉素标准储备液

准确称取氯霉素对照品 100mg，加甲醇溶解并稀释成浓度为 500 μ g/mL 的储备液，置 2℃~8℃ 冰箱中保存，有效期 3 个月。临用前，取此储备液用水稀释成浓度分别为 10、25、50、100、125、250、1250、2500ng/mL 的标准工作液。

4.2.8 盐酸溶液 5mol/L

取盐酸 450mL, 加水稀释至 1000mL, 摇匀即得。

4.2.9 磷酸氢二铵溶液 0.005mol/L

取磷酸氢二铵 0.66g, 加水使溶解并稀释至 1000mL, 摇匀即得。

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 冷冻离心机

4.3.3 旋转蒸发器

4.3.4 分析天平 感量 0.0001g

4.3.5 天平 感量 0.01g

4.3.6 振荡器

4.3.7 微孔滤膜 0.45 μ m

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括

——取新鲜或 30℃ 水浴中解冻后的供试样品, 作为供试试料。

——取新鲜或 30℃ 水浴中解冻后的空白样品, 作为空白试料。

——取新鲜或 30℃ 水浴中解冻后的空白样品, 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 5.0mL 试料于 50mL 离心管中, 加 5mol/L 的盐酸溶液 50 μ L, 旋涡混合 10s, 加入乙酸乙酯 25mL, 振荡提取 10min, 5000r/min 离心 5min, 取上层有机相 20.0mL 于 50mL 鸡心瓶中。35℃ 水浴中旋转蒸发至近干, 用正己烷-氯仿 (1+1) 1.6mL 溶解残渣, 旋涡混合 15s, 再加水 0.8mL, 旋涡混合 1min, 将鸡心瓶中的内容物转入尖底玻璃离心管中, 6000r/min 离心 10min, 取上清液作为试样溶液, 供高效液相色谱分析。

4.4.3 测定

4.4.3.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 150mm $\times$ 3.9mm (i.d.), 粒径 5 μ m, 或相当者。

流动相: 0.005mol/L 磷酸氢二铵-乙腈 (82+18)。

流速: 1mL/min。

检测波长: 278nm。

进样量: 100 μ L。

4.4.3.2 测定法

取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中氯霉素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, 氯霉素的保留时间在 11min 左右, 标准溶液和试样溶液的液相色谱图见附录 A 中图 A.1、图 A.2。

4.4.4 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

按下式计算试料中氯霉素的残留量 (μ g/L):

$$X = \frac{A_{Cs} \times 25 \times 0.8}{A_s \times 20 \times 5} = \frac{A_{Cs}}{A_s \times 5}$$

式中:

X —— 试样中氯霉素的残留量 (ng/mL);

A —— 试样溶液中氯霉素色谱峰的峰面积;

C_s —— 标准工作液中氯霉素的浓度 (ng/mL);

A_s —— 标准工作液中氯霉素的峰面积。

注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留至小数点后 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: 2μg/L。

5.2 准确度

本方法在 2μg/L~50μg/L 添加浓度的回收率为 80%~120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 CV≤15%, 批间变异系数 CV≤20%。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

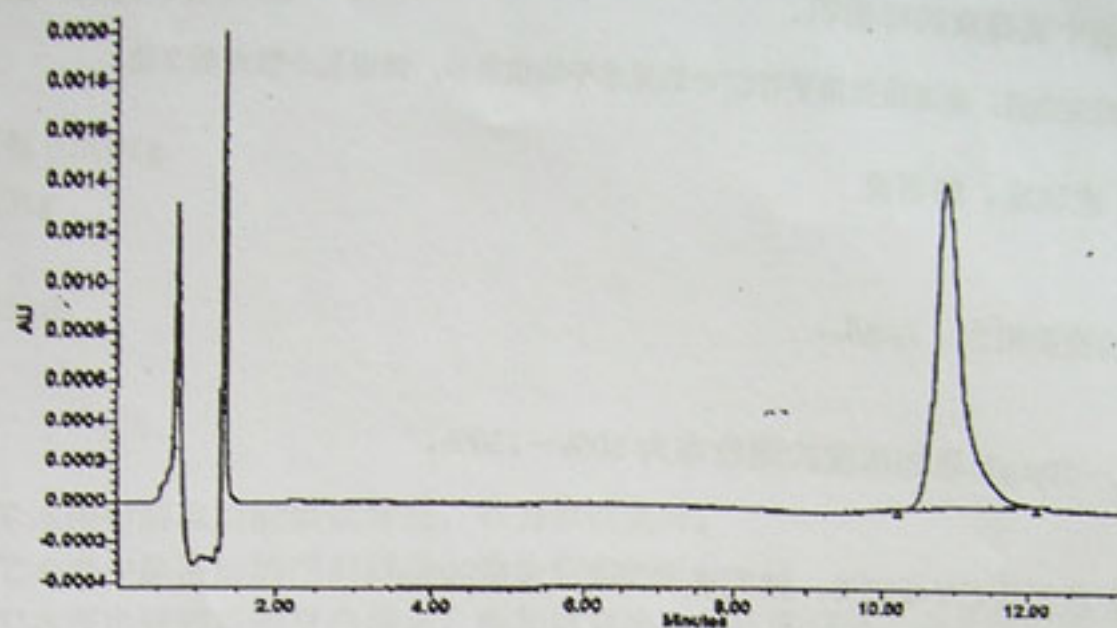


图 A.1 氯霉素标准溶液色谱图

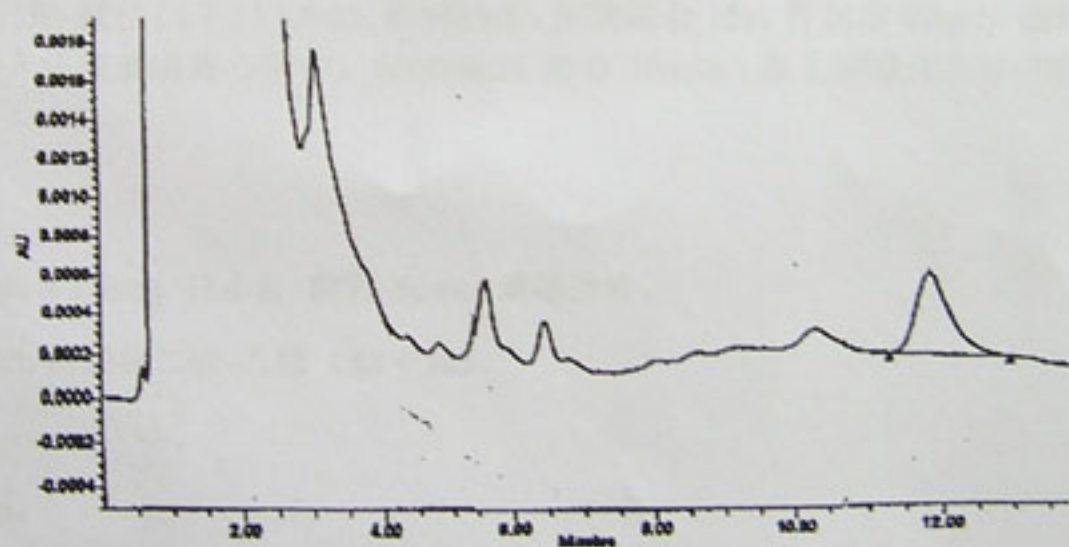


图 A.2 牛奶中氯霉素色谱图

动物性食品中青霉素类抗生素残留检测方法-微生物法

范围

本标准规定了动物性食品中青霉素类抗生素残留的微生物学检测方法。
本标准适用于牛奶中青霉素类抗生素的残留筛选检测。

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/T1.1-20001 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）

中华人民共和国兽药典 二〇〇〇年版

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规则和试验方法

NY/T ××××-2001 动物源食品中兽药残留检测方法标准编写规则

农牧发[1999]17号 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量冷冻的空白或供试牛奶，于30℃水浴中解冻。

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

试料中残留的青霉素类抗生素，以嗜热脂肪芽孢杆菌为检定菌，采用微生物学圆纸片筛选法定性测定。当检定菌生长时，由于产酸而使培养基的颜色由紫色变为黄色。细菌被抑制的区域，无酸产生，培养基仍为紫色。本试验用青霉素酶区分耐青霉素酶的抗生素和不耐青霉素酶的青霉素类抗生素。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，水为符合《中华人民共和国兽药典》二〇〇二年版规定的纯化水。

4.2.1 青霉素标准品

4.2.2 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stercorophilus*) ATCC 10149

斜面培养基（见附录 A.1）每月传代一次，置2℃~8℃冰箱中保存。

4.2.3 青霉素酶 不得少于200万单位/mL

4.2.4 磷酸氢二钾

4.2.5 磷酸二氢钾

4.2.6 脲 生化试剂

4.2.7 大豆蛋白脲 生化试剂

4.2.8 胰蛋白脲 生化试剂

4.2.9 牛肉浸出膏 生化试剂

- 4.2.10 葡萄糖
- 4.2.11 氯化钠
- 4.2.12 吐温 80
- 4.2.13 溴甲酚紫
- 4.2.14 琼脂 生化试剂
- 4.2.15 菌悬液的制备

将菌种接种至斜面培养基（见附录A.1）上，置 $(55\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养24h后，接种到繁殖培养基（见附录A.2）150mL中，于 $(55\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养72h，当有80%芽孢形成时，停止培养。取培养液，5000r/min离心15min，弃上清液；将沉淀物悬浮于灭菌生理盐水中，振荡，离心，弃上清液，重复洗涤3次。将洗涤过的芽孢悬浮于灭菌生理盐水20mL中，置 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，可使用6个月。

将菌种接种至斜面培养基（见附录A.1）上，置 $(55\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养7天后，镜检，应有芽孢85%以上。用灭菌生理盐水7mL将芽孢洗下，在 $(65\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 加热30min，备用。置 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，可使用3个月。

4.2.16 青霉素标准储备液

取青霉素标准品适量，精密称定，用磷酸盐缓冲液（pH8.0）制成1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。置 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，有效期3天。

4.2.17 磷酸盐缓冲液（pH8.0）

取磷酸二氢钾 2g 与磷酸氢二钾 8g，加水使溶解成 1000mL，滤过，分装， 115°C 灭菌 30min。

4.3 仪器与设备

- 4.3.1 圆滤纸片 直径 13mm
- 4.3.2 平底双碟 直径约 90mm，高 16mm~17mm
- 4.3.3 游标卡尺（精度 0.02mm）或抑菌圈测定仪
- 4.3.4 恒温培养箱
- 4.3.5 微量移液器
- 4.3.6 显微镜
- 4.3.7 镊子
- 4.3.8 电热恒温水浴锅
- 4.3.9 分析天平 感量 0.00001g
- 4.3.10 天平 感量 0.01g

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，将青霉素标准储备液稀释成 10ng/mL 的溶液，作为空白添加试料。
- 取供试样品适量，按每 1mL 计加青霉素酶 0.10mL，在 $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 30min，作为判定试验试料。

4.4.2 样品处理

取试料适量， $(82\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 水浴加热2min，冷却后，作为试样溶液，供微生物法测定。

4.4.3 双碟的制备

将检定培养基（见附录A.3）融化，置水浴中冷却至 $55^{\circ}\text{C}\sim 64^{\circ}\text{C}$ ，加入菌悬液（每100mL培养基加0.6mL~0.8mL），摇匀，吸取6.0mL置平皿中，使其均匀摊布，待凝固15min后，备用。

4.4.4 测定

每个双碟中放置5个圆滤纸片，每个滤纸片间距10mm以上，用镊子轻压纸片，使纸片与培养基接触，用微量移液器分别在5个滤纸片上加空白添加试料、空白试料、磷酸盐缓冲液(pH8.0)、判定试验试料、供试试料各90 μ L。每个试料至少重复2个双碟，置(55 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C培养箱中培养5h~6h。

5 结果判定

供试试料中无抑菌圈，为阴性反应。

供试试料中有大于空白添加试料的抑菌圈，但在判定试验试料中无抑菌圈，为含不耐青霉素酶的青霉素类抗生素残留的阳性反应。

判定试验试料和供试试料中有同等大小抑菌圈，为含其它抑菌物、不含不耐青霉素酶的青霉素类抗生素残留的阳性反应。

供试试料中有抑菌圈，但判定试验试料中的抑菌圈远小于供试试料中的抑菌圈，为既含其它抑菌物又含不耐青霉素酶的青霉素类抗生素残留的阳性反应。

5 检测方法灵敏度

本方法在牛奶中的检测限为4 μ g/kg。

附录 A
(规范性附录)
培养基的配制

A.1 斜面琼脂培养基

胨	5g
酵母浸膏	2g
牛肉浸膏	1g
氯化钠	5g
琼脂	15g
水	1000mL

除琼脂外，混合上述成分，调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后滤过，调节 pH 值使灭菌后为 7.4 ± 0.1 ，分装， 115°C 灭菌 30min，趁热斜放使凝固成斜面。

A.2 繁殖培养基

酵母浸膏	1g
胰蛋白胨	2g
葡萄糖	0.05g
水	100mL

混合上述成分，调节 pH 值使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，分装， 115°C 灭菌 30min。

A.3 检定培养基

牛肉浸膏	3g
蛋白胨	5g
胰蛋白胨	1.7g
大豆蛋白胨	0.3g
葡萄糖	5.25g
氯化钠	0.5g
磷酸氢二钾	0.25g
吐温 80	1g
溴甲酚紫	0.06g
琼脂	15g
水	1000mL

混合上述成分，调节 pH 值使灭菌后为 7.8 ± 0.2 ，分装， 115°C 灭菌 15min。