



中华人民共和国国家标准

GB 31658.1—2021

食品安全国家标准 动物性食品中头孢噻呋残留量的测定 高效液相色谱法

National food safety standard—
Determination of ceftiofur residues in animal tissues
by high performance liquid chromatography method

2021-09-16 发布

2022-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布
国家市场监督管理总局

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中头孢噻呋残留量的测定 高效液相色谱法

方法一 动物性可食组织中头孢噻呋残留量测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物性可食组织中头孢噻呋残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本文件适用于猪、牛肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中头孢噻呋残留量的测定。

2 规范性应用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的头孢噻呋，经二硫赤藓醇(DTE)作用，使头孢噻呋及去味喃甲酰头孢噻呋(DFC)有关代谢物从蛋白或含硫化合物中分离，与碘乙酰胺反应，生成稳定的乙酰胺衍生物(DCA)，经提取、纯化、净化，高效液相色谱测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH_3OH)。
- 5.1.3 二硫赤藓醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTE)。
- 5.1.4 碘乙酰胺($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$)。
- 5.1.5 无水氯化钙(CaCl_2)。
- 5.1.6 冰醋酸(CH_3COOH)。
- 5.1.7 磷酸(H_3PO_4):85%。
- 5.1.8 氯化钾(KCl)。
- 5.1.9 氢氧化钾(NaOH)。
- 5.1.10 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 5.1.11 四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.12 氯化钠(NaCl)。
- 5.1.13 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.1.14 三氟乙酸(CF_3COOH , TFA)。

5.2 标准品

盐酸头孢噻呋(Ceftiofur Hydrochloride, $C_{19}H_{16}N_5O_7S_3 \cdot HCl$), 以 $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$ 计, 含量 $\geq 87.5\%$, 或相当者。

5.3 溶液配制

- 5.3.1 硼酸缓冲液(0.05 mol/L): 取四硼酸钠 19 g, 氯化钾 3.7 g, 加水使溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.3.2 磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L): 取磷酸二氢钾 3.4 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL, 用 45% 氢氧化钾溶液调 pH 至 7.0。
- 5.3.3 提取液(0.4% DTE): 取 DTE 1 g, 加硼酸缓冲液适量使溶解并稀释至 250 mL, 现用现配。
- 5.3.4 碘乙酰胺溶液(14%): 取碘乙酰胺 7 g 溶于 50 mL 磷酸盐缓冲液中, 现用现配。
- 5.3.5 氢氧化钠溶液(0.01 mol/L): 取氢氧化钠 0.4 g, 加水使溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.3.6 氯化钠溶液(0.1 mol/L): 取氯化钠 5.9 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.3.7 氯化钙溶液(0.1 mol/L): 取无水氯化钙 11.1 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.3.8 磷酸溶液(25%): 取磷酸 25 mL, 加水溶解并稀释至 100 mL。
- 5.3.9 醋酸溶液(5%): 取冰醋酸 5 mL, 加水溶解并稀释至 100 mL。
- 5.3.10 C_{18} 洗脱液: 乙腈-水(15 : 85)
- 5.3.11 SAX 预洗液: 甲醇-氯化钠溶液(25 : 75)。
- 5.3.12 SAX 洗脱液: 乙腈-醋酸溶液(5 : 95)。
- 5.3.13 SCX 预洗液: 甲醇-氯化钙溶液(25 : 75)。
- 5.3.14 SCX 洗脱液: 乙腈-氯化钠溶液(5 : 95)。
- 5.3.15 流动相:
 - A(0.1% TFA 水溶液): 取 1 mL 三氟乙酸, 加水至 1 000 mL。
 - B(0.1% TFA 乙腈溶液): 取 1 mL 三氟乙酸, 加乙腈至 1 000 mL。

5.4 标准溶液制备

- 5.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 取盐酸头孢噻呋标准品约 11 mg, 精密称定, 加甲醇使溶解并稀释定容至 100 mL 容量瓶, 摇匀, 即得。-18 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 6 个月。
- 5.4.2 标准工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 精密量取标准储备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶, 加磷酸盐缓冲液至刻度, 摇匀, 即得。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 1 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 C_{18} 固相萃取柱: 1 g/6 mL, 或相当者。
- 5.5.2 SAX 固相萃取柱: 500 mg/10 mL, 或相当者。
- 5.5.3 SCX 固相萃取柱: 100 mg/10 mL, 或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器。
- 6.2 分析天平: 感量 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.3 恒温水浴振荡器。
- 6.4 匀浆机。
- 6.5 涡旋混合器。
- 6.6 冷冻离心机
- 6.7 固相萃取装置。
- 6.8 pH 计。
- 6.9 离心管: 50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

- 取均质后的供试样品,作为供试试料;
- 取均质后的空白样品,作为空白试料;
- 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g(准确至±0.02 g),加提取液 30.0 mL,中速振荡 5 min,4 000 r/min 离心 5 min。取 15.0 mL 于另一 50 mL 离心管,20 r/min~30 r/min 转速,50℃ 恒温水浴振荡 15 min,备用。

8.2 衍生

在上述备用液加碘乙酰胺溶液 3 mL,混匀,室温下放置 30 min,4℃、10 000 r/min 离心 20 min。取上清液,备用。

8.3 净化

8.3.1 取 C₁₈ 固相萃取柱,依次用甲醇 1 mL、磷酸盐缓冲液 5 mL 预洗柱。取 8.2 中衍生后备用液过柱。依次用磷酸缓冲液 5 mL、氢氧化钠溶液 3 mL 洗柱,挤干。加入 C₁₈ 洗脱液 3 mL,洗脱,收集洗脱液。加水 15 mL 稀释至总体积为 18 mL,混匀,备用。

8.3.2 取 SAX 固相萃取柱,依次用甲醇、SAX 预洗液和水各 2 mL 预洗柱。取 8.3.1 备用液过柱,加水 1 mL 洗柱,挤干。加 SAX 洗脱液 3 mL,洗脱,收集洗脱液。加水 10 mL 使总体积为 13 mL,混匀,备用。

注:脂肪组织稀释提取液经 SAX 固相萃取柱净化后,用 1 mL 水洗,挤干。加 SAX 固相萃取柱洗脱液 2.0 mL,收集洗脱液,混匀,供高效液相色谱进行分析。

8.3.3 取 SCX 固相萃取柱,依次用甲醇 1 mL、SCX 预洗液 2 mL 和水 2 mL 预洗柱。取 8.3.2 备用液,过柱,用水 1 mL 淋洗,挤干或真空抽干。加 SCX 洗脱液 2.0 mL,洗脱,挤干,收集洗脱液,供高效液相色谱测定。

8.4 标准曲线的制备

精密量取标准储备液适量,用磷酸盐缓冲液稀释制成浓度为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、2.0 μg/mL、10.0 μg/mL 和 20.0 μg/mL 的溶液,分别精密量取 0.5 mL,按衍生及净化步骤同法处理制成头孢噻唑浓度为 25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、2 500 ng/mL 和 5 000 ng/mL 的标准溶液,供高效液相色谱测定。以峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

注:用于脂肪组织检测的标准曲线的制备,经过 SAX 固相萃取柱净化后,加入水 1 mL 洗柱,挤干。加 SAX 洗脱液 2.0 mL,收集洗脱液,混匀,供高效液相色谱测定。

8.5 测定

8.5.1 色谱条件

- 色谱柱:C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),或相当者;
- 检测波长:266 nm;
- 柱温:30℃;
- 进样量:40 μL;
- 流速:1.0 mL/min;
- 流动相:A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液,B 为 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液;

g) 流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0~10	100	0
10~35	100→75	0→25
35~40	50	50
40~45	100	0

0 min~10 min, 流动相 A 比例保持 100%; 10 min~35 min, 流动相 A 比例由 100% 线性变化至 75%; 35 min~40 min, 流动相 A 比例保持 50%; 40 min~45 min, 流动相 A 比例保持 100%。

8.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液, 作单点或多点校正, 以色谱峰面积定量, 按外标法计算。标准溶液及试样溶液中 DCA 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, 标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 A。

8.6 空白试验

取空白试料, 除不加标准溶液外, 采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中头孢噻吩的残留量按公式(1)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \times 2 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试料中头孢噻吩残留量的数值, 单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- A —— 试料溶液中头孢噻吩的峰面积;
- A_s —— 对照溶液中头孢噻吩的峰面积;
- C_s —— 对照溶液中头孢噻吩浓度的数值, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— SCX(脂肪为 SAX)洗脱液体积的数值, 单位为毫升(mL)。
- m —— 供试试料质量的数值, 单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛、猪肌肉、脂肪、肾脏和猪肝中的定量限为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, 牛肝脏中的定量限为 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $6\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 80%~110%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

方法二 牛奶中头孢噻呋残留量测定 高效液相色谱法

11 范围

本文件规定了牛奶中头孢噻呋残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本文件适用于牛奶中头孢噻呋残留量的测定。

12 规范性应用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

13 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

14 原理

试料中残留的头孢噻呋,经二硫赤藓醇(DTE)作用,使头孢噻呋及去吠喃甲酰头孢噻呋(DFC)有关代谢物从蛋白或含硫化合物中分离,与碘乙酰胺反应,生成稳定的乙酰胺衍生物(DCA),再经强阳离子交换柱净化,高效液相色谱测定,外标法定量。

15 试剂和材料

以下所用试剂,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。

15.1 试剂

- 15.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 15.1.2 甲醇(CH_3OH)。
- 15.1.3 冰醋酸(CH_3COOH)。
- 15.1.4 醋酸铵($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)。
- 15.1.5 二硫赤藓醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$,DTE)。
- 15.1.6 碘乙酰胺($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$)。
- 15.1.7 氢氧化钠(NaOH)。
- 15.1.8 三氟乙酸(CF_3COOH ,TFA)。

15.2 标准品

盐酸头孢噻呋(Ceftiofur Hydrochloride, $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3 \cdot \text{HCl}$),以 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3$ 计,含量 $\geq 87.5\%$ 。

15.3 溶液配制

- 15.3.1 醋酸铵溶液 I (1.0 mol/L):取醋酸铵 77.1 g,加水使溶解并稀释至 1 000 mL。
- 15.3.2 醋酸铵溶液 II (0.1 mol/L):取醋酸铵 7.71 g,加水使溶解并稀释至 1 000 mL。
- 15.3.3 氢氧化钠溶液 I (1 mol/L):取氢氧化钠 4 g,加水使溶解并稀释至 100 mL。
- 15.3.4 氢氧化钠溶液 II (0.01 mol/L):取氢氧化钠 0.4 g,加水适量使溶解并稀释至 1 000 mL。
- 15.3.5 醋酸溶液:取冰醋酸 20 mL,加水至 1 000 mL。

15.3.6 提取液(2.0% DTE):取二硫赤藓醇 5 g,加醋酸铵溶液Ⅱ溶解并稀释至 250 mL,用氢氧化钠溶液Ⅰ调节 pH 至 9.0,现用现配。

15.3.7 碘乙酰胺溶液(4.0%):取碘乙酰胺 4 g,用醋酸铵缓冲液Ⅱ溶解并稀释至 100 mL,现用现配。

15.3.8 C_{18} 洗脱液:乙腈-醋酸溶液(20:80)。

15.3.9 SCX 洗脱液:甲醇-醋酸铵溶液Ⅰ(15:85)。

15.3.10 流动相:A 为 0.1%TFA 水溶液(取三氟乙酸 1 mL,加水至 1 000 mL)。B 为 0.1%TFA 乙腈溶液(取三氟乙酸 1 mL,加乙腈至 1 000 mL)。

15.4 标准溶液制备

15.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):取盐酸头孢噻吩标准品约 11 mg,精密称定,于 100 mL 量瓶中,加醋酸铵溶液Ⅱ使溶解并稀释至刻度,即得。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 6 个月。

15.4.2 标准工作液(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精密量取标准储备液 0.5 mL,于 10 mL 量瓶中,用醋酸铵溶液Ⅱ稀释至刻度,即得。 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

15.5 材料

15.5.1 C_{18} 固相萃取柱:1 g/6 mL,或相当者。

15.5.2 SCX 固相萃取柱:100 mg/10 mL,或相当者。

16 仪器和设备

16.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

16.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

16.3 恒温水浴振荡器。

16.4 匀浆机(10 000 r/min)。

16.5 涡旋混合器。

16.6 冷冻离心机。

16.7 pH 计。

16.8 离心管:50 mL。

17 试样的制备与保存

17.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶,并使均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

17.2 试料的保存

$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

18 测定步骤

18.1 提取

取试样 5.0 mL,加提取液 5.0 mL,充分混合,于 20 r/min~30 r/min、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴振摇 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心 20 min,取上清液(尽量完全转移上清液,如上清液中有漂浮的固状凝结物,将其除去),备用。

取 C_{18} 固相萃取柱,依次用甲醇 5 mL、醋酸铵溶液Ⅱ(2次,每次 5 mL)预洗,保持湿润。备用液过柱,并保持溶液缓慢流出。用醋酸铵溶液Ⅱ洗柱 2次,每次 5 mL,排干洗液,备用。

18.2 衍生

取碘乙酰胺溶液 5 mL 于上述 C₁₈ 柱,使溶液约在 30 min 流完,保证衍生化反应充分进行。用醋酸铵溶液 II 冲洗 2 次,每次 5 mL,再用醋酸溶液 5 mL 洗涤,保持柱子湿润。

18.3 净化

SCX 柱依次用甲醇、乙腈-2%醋酸溶液(20:80)各 2 mL 预洗。将 C₁₈ 柱直接放在相应的 SCX 柱上,用 C₁₈ 洗脱液 3 mL 洗脱 2 次,使溶液以适当速度缓慢流过 SCX 固相萃取柱。依次用甲醇 1 mL、醋酸溶液 2 mL 淋洗 SCX 柱,挤干柱子和连接口的溶液。用 SCX 洗脱液 2.0 mL,洗脱,收集洗脱液,混匀,供高效液相色谱测定。

18.4 标准曲线的制备

精密量取头孢噻吩标准工作液适量,用醋酸铵溶液 II 稀释成浓度为 0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.3 μg/mL 和 0.6 μg/mL 的溶液,分别精密量取 5.0 mL,按衍生及净化步骤同法处理制成浓度为 50 ng/mL、125 ng/mL、250 ng/mL、750 ng/mL 和 1 500 ng/mL 的 DCA 衍生物标准溶液,供高效液相色谱测定。

18.5 测定

18.5.1 色谱条件

- 色谱柱:C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),或相当者;
- 检测波长:266 nm;
- 柱温:30 ℃;
- 进样量:40 μL;
- 流速:1.0 mL/min;
- 流动相:A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液,B 为 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液;
- 流动相梯度洗脱条件见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0~8	90	10
8~21	90→60	10→40
21~23	40	60
23~25	90	10

0 min~8 min,流动相 A 比例保持 90%;8 min~21 min,流动相 A 比例由 90%线性变化至 60%;21 min~23 min,流动相 A 比例保持 40%;23 min~25 min,流动相 A 比例保持 90%。

18.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校正,以色谱峰面积定量,按外标法计算。标准溶液及试样溶液中头孢噻吩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,标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 B。

18.6 空白试验

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

19 结果计算和表述

试样中头孢噻吩的残留量按公式(2)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V_1}{A_s \times V} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中头孢噻吩残留量的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

- A —— 试样溶液中头孢噻吩色谱峰的峰面积；
- A_s —— 标准溶液中头孢噻吩色谱峰的峰面积；
- V_1 —— SCX 洗脱液体积的数值,单位为毫升(mL)；
- V —— 试样中取样量的数值,单位为毫升(mL)。

20 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

20.1 灵敏度

本方法在牛奶中的定量限为 50 ng/mL。

20.2 准确度

本方法在 50 ng/mL~200 ng/mL 添加浓度的回收率为 80%~110%。

20.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。



附录 A
(资料性)
色谱图

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照溶液色谱图见图 A.1。

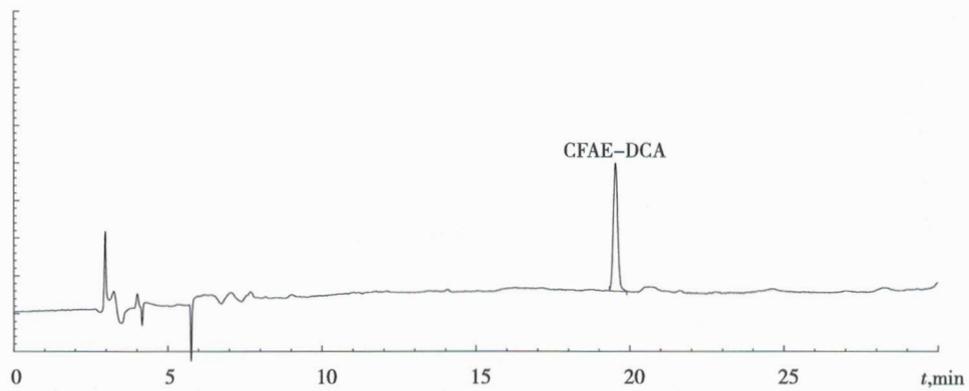


图 A.1 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋对照溶液色谱图

附录 B
(资料性)
色谱图

0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋标准溶液色谱图见图 B.1。

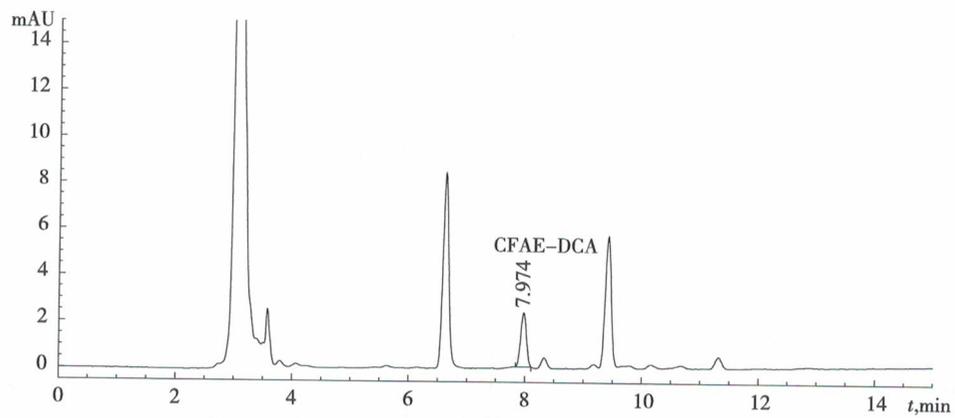


图 B.1 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻呋标准溶液色谱图

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准
动物性食品中头孢噻唑残留量的测定
高效液相色谱法
GB 31658.1—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字
2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷
书号: 16109·8752
定价: 32.00 元



GB 31658.1—2021

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261