出口肉及肉制品中新霉素残留量检验方法琥 相 色 谱 法

Method for the determination of neomycin residues in meats and meat products for export

SN 0646—1997

前言

本标准是根据GB/T1 1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》及SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求而编写的。其中测定方法是参考国内外有关文献，经研究、改进和验证后而制定的；本标准同时制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉及肉制品中新霉素残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

本标准的附录A是提示的附录。

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。

本标准由中华人民共和国宁波进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：李佐卿、康德韬、吕建成、刘晓剑。

本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

本标准规定了出口肉及肉制品中新霉素残留量检验的抽样、制样和琥珀色谱测定方法。

本标准适用于出口猪肉中新霉素残留量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

以不超过2500件为一检验批。

同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

2.2 抽样数量

批量，件	最低抽样数，件
1～25	1
26～100	5
101～250	10
251～500	15
501～1000	17
1001～2500	20

2.3 抽样方法

按2.2规定的抽样数，随机抽取，逐件开启。每件至少取一袋作为原始样品，原始样品总量不得少于2kg，放入清洁容器内，加封后，标明标记，及时送交实验室。

如每件中无小包装或有小包装但每袋重量超过2kg者，则可用锋利刀(经灭菌)在抽出的包件中，每件割取不少于100 g，混合后置于清洁容器内，作为混合原始样。混合原始样的量最不少于2kg，加封后，标明标记，及时送交实验室。

2.4 试样制备

将所取样品全部放入高速捣碎机中捣碎均匀，混匀后用四分法缩分出不少于1kg，均分成两份，作为试样，装入清洁容器内，加封后标明标记。

2.5 试样保存

将试样于－18℃以下冷冻保存。

注：在抽样及制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

3 测定方法

3.1 方法提要

用磷酸盐缓冲液—乙腈提取试样中的新霉素，提取液经加热、冷却和过滤以除去蛋白质和脂肪。在阳离子交换柱上与邻苯二甲酸进行衍生化，用四磷酸钾缓冲液—甲醇洗脱，洗脱液用带有荧光检测器的高效液相色谱仪测定，外标法定量。

3.2试剂和材料

除特殊规定外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

3.2.1 乙腈。

3.2.2 甲醇：紫外光谱纯。

3.2.3 三乙胺。

3.2.4 磷酸(85%)。

3.2.5 氯化钠。

3.2.6 磷酸盐缓冲液：将33.46g磷酸氢二钾和1.046g磷酸二氢钾溶解在水中，并定容至1 L。

3.2.7 混合提取液：磷酸盐缓冲液—乙腈(1+1)。

3.2.8 磷酸钾缓冲液：将2.5g磷酸溶于60 mL水中，用50%(m/V)氢氧化钾溶液调pH至10.5，用水定容至100mL。

3.2.9 邻苯二甲醛试剂：将100mg邻苯二甲醛溶于1mL甲醇中，加入200μL 2—巯基乙醇和10mL磷酸钾缓冲液，用锋色瓶(有盖)贮存于冰箱中，一周内有效。

3.2.10 碱性缓冲液：将76g四磷酸钾溶于400 mL水中，用50%(m/V)氢氧化钾溶液调pH至11.0，用水定容至500mL。

3.2.11 洗脱剂：碱性缓冲液—甲醇(1+4)。

3.2.12 阳离子交换树脂：D152。

3.2.13 硫酸新霉素标准品：生化试剂，已知纯度，700IU/mg以上(硫酸新霉素1mg=1000IU)。

3.2.14 硫酸新霉素标准溶液：称取适量的硫酸新霉素标准品(精确至0.1mg)，用水配成浓度为0.100 mg/mL的标准储备溶液，根据需要再用水配成适当浓度的标准工作溶液。

3.2.15 新霉素衍生物标准溶液：将适量的标准工作溶液注入到阳离子交换柱(3.3.6)中，按3.4.2步骤进行衍生化反应，制成新霉素衍生物标准溶液。

3.3仪器和设备

3.3.1 液相色谱仪：配有荧光检测器。

3.3.2高速捣碎机。

3.3.3 振荡器。

3.3.4 离心机。

3.3.5 过滤漏斗：滤孔为80～120μm，40～60μm。

3.3.6 阳离子交换柱：120 mm×5mm(内径)玻璃柱，用碱性缓冲液(3.2.10)将阳离子交换树脂制成悬浮液，平衡2h，装入玻璃柱中，高度约为6cm，用5mL洗脱剂淋洗，流速为0.6mL/min，然后用水洗至流出液呈中性，备用。

3.4 测定步骤

3.4.1 提取

称取试样约10 g(准确至0.1g)于一100mL锥形瓶中，加入60mL混合提取液(3.2.7)和2g氯化钠，振荡30 min，经滤孔为80～120 μm的过滤漏斗抽滤，残渣用5×10 mL混合提取液洗涤。合并滤液和洗涤于一250mL烧杯中。在沸水中加热30min，取下，于3000 r/min离心20 min，置4℃冰箱中冷却20 min，然后经滤孔为40～60 μm的过滤漏斗抽滤，收集滤液。

3.4.2 衍生化

将滤液注入阳离子交换柱(3.3.6)中，用10 mL水洗柱，弃去流出液。将1mL邻苯二甲醛试剂注入柱中，反应5min。然后加2mL洗脱剂洗脱柱上衍生物，弃去前面1mL洗脱液，收集后面1mL洗脱液，立即放置在－18℃冰箱中，15min后进行液相色谱测定。

3.4.3 测定

3.4.3.1 色谱条件

a) 色谱柱：ODS Hypersil，3μm，60mm×4.6mm(内径)，或相当者；

b) 柱温：35℃；

c) 流动相：77.5%甲醇水溶液中含0.09mol/L三乙胺和0.45mol/L磷酸；

d)流速：1.0mL/min；

e) 激发波长：345nm；发射波长：445nm；

f) 进样量：10μL。

3.4.3.2 色谱测定

根据样液中新霉素含量情况，选定峰面积相近的新霉素衍生物标准溶液。标准溶和样液中新霉素衍生物响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准溶和样液等体积参插进样测定。在上述色谱条件下，新霉素衍生物的保留时间约为6min。标准品衍生物液相色谱图见附录A中图A1。

3.4.4 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

3.4.5 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)进行计算：

$$X = \frac{A \cdot c \cdot V \times 0.855}{A_1 \cdot m} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(1)$$

式中：X—试样中新霉素含量，mg/kg；

A—样液中新霉素衍生物的峰面积，mm^2；

A_1—新霉素衍生物标准溶液中新霉素衍生物峰面积，mm^2；

c—新霉素衍生物标准溶液中相当的硫酸新霉素浓度，μg/mL；

V—最终样液的体积，mL，

m—最终样液相当的试样量，g；

0.855—由硫酸新霉素换算成新霉素的换算系数。

注：计算结果需扣除空白值。

4 测定低限和回收率

4.1 测定低限

本方法的测定低限为0.05mg/kg。

4.2 回收率

猪肉中新霉素添加浓度及其回收率实验数据：

在0.05mg/kg时，回收率为90.4%；

在0.10 mg/kg时，回收率为91.6%；

在0.50mg/kg时，回收率为96.3%。

附 录 A
(提示的附录)
标准品色谱图

图 A1 新霉素标准品衍生物的液相色谱图