

ICS 65.120
B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 23385—2009

饲料中氨苄青霉素的测定 高效液相色谱法

Determination of ampicillin in feed—
High performance liquid chromatography

2009-03-26 发布

2009-07-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:黑龙江省兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:金慧然、叶建敏、范锡龙、郭文欣、陶娅、江森、李春辉。



饲料中氨苄青霉素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱(HPLC)法测定饲料中氨苄青霉素的含量。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中氨苄青霉素含量的测定。

本标准检出限为 1.0 mg/kg,定量限为 5.0 mg/kg。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998,IDT)

3 原理

用磷酸盐缓冲液提取试样中的氨苄青霉素,高效液相色谱仪反相色谱系统分离,紫外检测器或二极管矩阵检测器在波长 220 nm 处进行定性、定量测定。

4 试剂和溶液

除非另有规定,在分析中仅使用确认为分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 磷酸二氢钾溶液, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0.02\text{ mol/L}$:准确称取 2.72 g 磷酸二氢钾于 1 000 mL 容量瓶中,加水溶解稀释至刻度。

4.3 提取液:磷酸二氢钾溶液(4.2)+乙腈(4.1)=19+1。

4.4 HPLC 流动相:取 920 mL 磷酸二氢钾溶液(4.2)和 80 mL 乙腈(4.1),混合均匀,通过 0.45 μm 的溶剂微孔过滤膜过滤,使用前用超声波脱气。

4.5 氨苄青霉素标准贮备液:准确称取氨苄青霉素标准品(含量不少于 86.5%)50 mg(精确至 0.000 01 g),于 50 mL 容量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀。其溶液浓度为 1.0 mg/mL,贮于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~6 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期 2 d。

4.6 氨苄青霉素标准工作液:准确移取氨苄青霉素标准贮备液(4.5)适量,用水稀释成浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$,现用现配。

5 仪器和设备

5.1 分析天平:感量为 0.000 01 g 和 0.000 1 g 各 1 台。

5.2 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管矩阵检测器。

5.3 超声波清洗机。

5.4 振荡器。

- 5.5 离心机。
- 5.6 涡旋混合器。
- 5.7 微孔滤膜:0.45 μm。

6 试样制备

- 6.1 按 GB/T 14699.1 采样。
- 6.2 选取有代表性样品至少 500 g,按 GB/T 20195 进行样品制备,粉碎,全部通过孔径为 0.45 mm 的孔筛,充分混匀,装入密闭容器中,避光保存,备用。

7 分析步骤

7.1 试样溶液的制备

称取饲料样品 5 g,精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 三角瓶中,准确加入 25 mL 提取液(4.3),于振荡器上振荡提取 5 min,把溶液转入离心管中以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜,供高效液相色谱仪测定。

7.2 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱(柱长为 250 mm,内径为 4.6 mm,粒度为 5 μm)或类似分析柱。

柱温:室温。

检测器:紫外检测器或二极管矩阵检测器,检测波长 220 nm。

流动相:磷酸二氢钾溶液(4.2)+乙腈(4.1)=92+8。

流速:1.0 mL/min。

进样量:20 μL。

7.3 HPLC 测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器参数。向高效液相色谱仪中注入氨苄青霉素标准工作液(4.6)及试液(7.1),得到色谱峰面积响应值,用标准系列进行单点或多点校准。

8 结果的计算与表达

饲料中氨苄青霉素的含量 X 以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

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

式中:

A——试样提取液测得的色谱峰面积;

A_s——氨苄青霉素标准工作液测得的色谱峰面积;

c_s——标准工作液中氨苄青霉素含量,单位为微克每毫升(μg/mL);

V——加到试样中的提取液体积,单位为毫升(mL);

m——试样质量,单位为克(g)。

平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附录 A
(资料性附录)
氟苄青霉素标准样品色谱图

图 A.1 给出了氟苄青霉素高效液相色谱图。

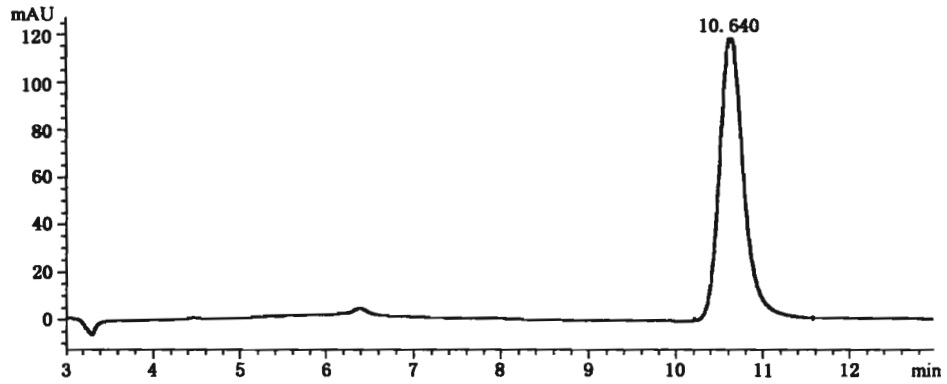


图 A.1 氟苄青霉素高效液相色谱条件下标准样品色谱图