

中华人民共和国国家标准

农业部 958 号公告—1—2007

牛奶中替米考星残留量的测定 高效液相色谱法

Determination of tilmicosin residues in milk—
High performance liquid chromatography

2007-12-29 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

目 次

前言

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 制样	1
3.1 样品的制备	1
3.2 样品的保存	1
4 测定方法	1
4.1 方法提要或原理	1
4.2 试剂和材料	1
4.3 仪器和设备	2
4.4 测定步骤	2
4.5 结果计算和表述	3
5 检测方法灵敏度、准确度和精密度	3
5.1 灵敏度	3
5.2 准确度	3
5.3 精密度	3
附录 A (资料性附录)高效液相色谱图	4

前 言

本标准附录 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。

本标准主要起草单位：河南省兽药监察所。

本标准起草人：班付国、吴宁鹏、周红霞、张发旺、贾振民、宋志超、郭芙蓉、刘素梅、陈蔷、杜红鸽。

牛奶中替米考星残留量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了牛奶中替米考星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替米考星残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件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 分析实验室用水规格和试验方法

农业部农牧发[2003]1号 兽药残留试验技术规范(试行)

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试牛奶样品,摇匀。

3.2 样品的保存

—20℃以下贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

用乙腈提取牛奶中的替米考星,经 C_{18} 固相萃取柱净化,溶剂洗脱,氮气吹干,溶解残余物,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

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯;水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 替米考星对照品,纯度 $\geq 90.3\%$ 。

4.2.2 乙腈:色谱纯。

4.2.3 甲醇:色谱纯。

4.2.4 四氢呋喃:色谱纯。

4.2.5 磷酸。

4.2.6 二丁胺。

4.2.7 乙酸铵。

4.2.8 1 mol/L 磷酸二丁胺缓冲液(DBAP):量取水 700 mL,加入二丁胺 168 mL,然后缓慢加入磷酸约 70 mL,搅拌使二丁胺溶解,冷却至室温。调 pH 至 2.5~2.6(以每次 1 mL~2 mL 的量加入磷酸约 18 mL)。加水稀释至 1 000 mL,过滤,备用。

4.2.9 洗脱液:称取乙酸铵 7.71 g 溶解于甲醇 200 mL 中,加入乙腈 790 mL,冷却至室温,用乙腈稀释至 1 000 mL。

4.2.10 替米考星标准贮备液:将替米考星对照品在 60℃减压干燥 3 h,精密称取 25 mg(按标示量计),置 25 mL 棕色量瓶中,用乙腈溶解、定容,制成 1 mg/mL 的标准贮备液,4℃以下避光保存。有效期 3 个月。

4.2.11 替米考星标准工作液:准确量取标准贮备液适量,用流动相稀释成适宜浓度的标准工作液。临用前配制。

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 聚丙烯离心管:50 mL。

4.3.4 Waters C₁₈固相萃取柱:500 mg/6 mL(或相当者)。

4.3.5 漩涡混合仪。

4.3.6 离心机。

4.3.7 固相萃取装置。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取摇匀后的供试样品,作为供试试料。

——取摇匀后的空白样品,作为空白试料。

——取摇匀后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

量取试料 5 mL 于离心管中,加入乙腈 15 mL,涡旋混合 30 s,超声 1 min,以 6 000 r/min 离心 5 min,将上清液转入 150 mL 锥形瓶中,加水 50 mL 稀释,备用。

4.4.3 净化

C₁₈固相萃取柱依次用甲醇 10 mL、水 10 mL 活化,将提取液过柱,依次用水 10 mL、乙腈 10 mL 洗涤,抽干 5 min,用洗脱液 5 mL 洗脱,30℃水浴下氮气吹干。用流动相 1.0 mL 溶解残留物,0.22 μm 微孔滤膜过滤后,供高效液相色谱分析。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取标准工作液适量于棕色量瓶中,用流动相稀释为 50、100、250、500、1 000 μg/L 浓度的标准工作液,供高效液相色谱仪分析,以测得替米考星的顺式与反式异构体峰面积之和为纵坐标,相应的替米考星浓度为横坐标绘制标准曲线,计算曲线的回归方程及相关系数。

4.4.5 测定

4.4.5.1 色谱条件

色谱柱:XBridgeC₁₈柱,粒度 5 μm,4.6 mm×150 mm(或相当者)。

流动相:取 110 mL 乙腈、55 mL 四氢呋喃和 25 mL 1 mol/L DBAP,加入 700 mL 水中,用水稀释至 1 000 mL,滤过,脱气,即得。

柱温:30℃。

流速:1.0 mL/min。

检测波长:280 nm。

进样量:50 μL。

4.4.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按外标法,以峰面积定量,即得。替米考星标准溶液色谱图和试样溶液色谱图分别见附录 A 中图 A.1 和图 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

按式(1)计算试料中替米考星的残留量($\mu\text{g/L}$)

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

式中: X ——试料中相应替米考星的残留量, $\mu\text{g/L}$;

A_i ——试样溶液中替米考星顺式与反式峰面积之和;

C_s ——标准工作液中替米考星的浓度, $\mu\text{g/L}$;

A_s ——标准工作液中替米考星顺式与反式峰面积之和;

m ——试样的量,mL;

V ——溶解残余物体积,mL。

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,保留三位有效数字。

5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

5.1 灵敏度

本方法牛奶中的检测限为 $5 \mu\text{g/L}$,定量限为 $25 \mu\text{g/L}$ 。

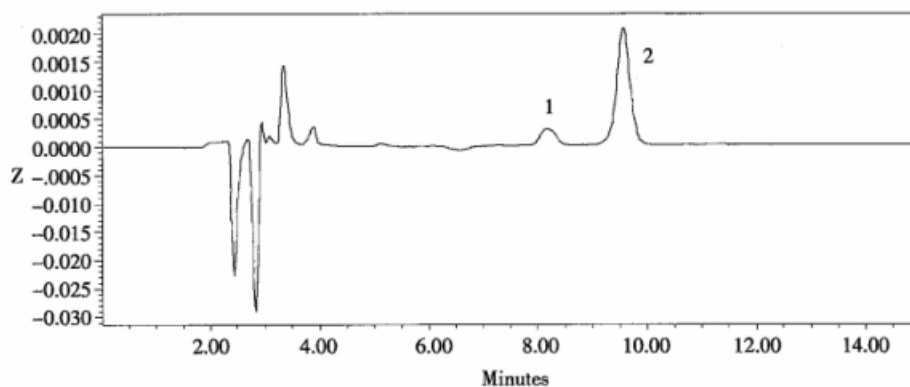
5.2 准确度

本方法在 $25 \mu\text{g/L} \sim 100 \mu\text{g/L}$ 添加浓度的回收率为 $70\% \sim 110\%$ 。

5.3 精密度

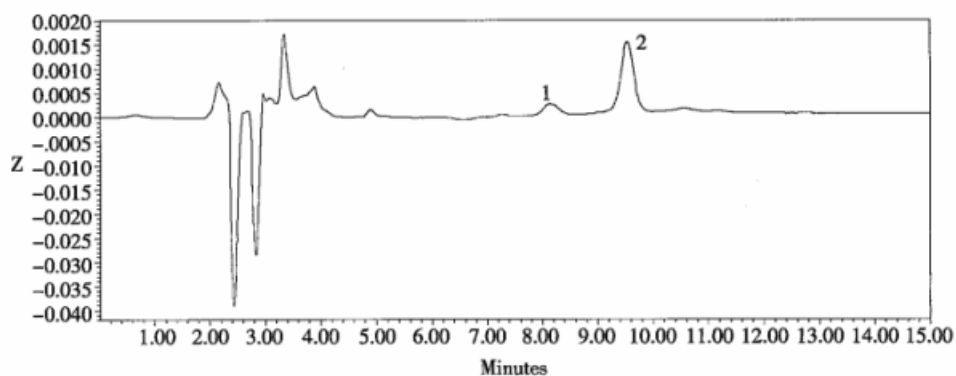
本方法的批内相对标准偏差 $\leq 10\%$,批间相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图



1. 替米考星反式异构体色谱峰
2. 替米考星顺式异构体色谱峰

图 A. 1 替米考星标准溶液色谱图



1. 替米考星反式异构体色谱峰
2. 替米考星顺式异构体色谱峰

图 A. 2 空白牛奶添加标准溶液色谱图