

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告 — 10 — 2008

动物性食品中替米考星残留检测 高效液相色谱法

**Determination of tilmicosin residue in animal derived food
High performance liquid chromatographic method**

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施



中华人民共和国农业部 发布

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和归口。

本标准起草单位：中国农业大学动物医学院。

本标准主要起草人：沈建忠、张素霞、丁双阳、李建成、王战辉、江海洋、李晓薇。

本标准系首次发布的国家标准。

动物性食品中替米考星残留检测 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中替米考星残留量测定的制样和高效液相色谱方法。
本标准适用于猪肝脏、猪肌肉、鸡肝脏和鸡肌肉中替米考星残留的检测。

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/T 6682 分析实验室用水规则和试验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或解冻的空白或供试组织，剪碎，置于组织匀浆机中高速匀浆。

3.2 样品的保存

-20℃冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法原理或提要

用乙腈和磷酸二氢钾缓冲液提取试样中的替米考星，加水稀释后，用 C₁₈ 固相萃取柱净化，反相高效液相色谱-紫外检测，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别说明外均为分析纯试剂，水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 替米考星对照品(Timicosin)

纯度≥98%。

4.2.2 乙腈

4.2.3 四氢呋喃

4.2.4 磷酸二氢钾

4.2.5 甲醇

4.2.6 二丁胺

4.2.7 磷酸

4.2.8 乙酸铵

4.2.9 C₁₈ 固相萃取柱

500 mg/6cc。

4.2.10 微孔滤膜

4.2.11 10%磷酸溶液

取 100 mL 磷酸缓慢加入 900 mL 水中,边加边搅拌,用水稀释至 1 000 mL。

4.2.12 二丁胺磷酸缓冲液(1 mol/L)

取 10%磷酸溶液 700 mL,缓缓加入 168 mL 二丁胺,边加边搅拌。冷却至室温,用 85%磷酸调 pH 至 2.5,加水稀释至 1 000 mL。注意溶液变成棕色时不能使用。

4.2.13 流动相(乙腈—四氢呋喃—1 mol/L 二丁胺磷酸缓冲液,130+55+25,v/v/v)

分别量取 130 mL 乙腈、55 mL 四氢呋喃、25 mL 二丁胺磷酸缓冲液,依次加入 700 mL 水中,用水稀释至 1 000 mL,0.2 μm 滤膜过滤。配制前各组分要真空脱气,配制后不能再脱气。使用时密封,以防止流动相中的有机溶剂挥发。

4.2.14 洗脱液(0.1 mol/L 乙酸铵甲醇—乙腈,20+80,v/v)

称取 7.71 g 乙酸铵溶解于 200 mL 甲醇中,加 790 mL 乙腈混匀,冷却至室温,用乙腈稀释至 1 000 mL。

4.2.15 磷酸二氢钾缓冲液

称取 13.61 g 磷酸二氢钾溶解于 800 mL 水中,用磷酸调 pH 至 2.5,再用水稀释至 1 000 mL。

4.2.16 替米考星标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

称取替米考星对照品约 20 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容。4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,有效期 3 个月。

4.2.17 替米考星标准储备液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

取 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 替米考星标准储备液 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释并定容。4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,有效期 3 个月。

4.2.18 标准工作溶液

取适量 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 替米考星标准储备液于容量瓶中,用流动相稀释并定容,制成浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作溶液,现配现用。

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 组织匀浆机

4.3.3 天平

感量 0.01 g。

4.3.4 分析天平

感量 0.000 01 g。

4.3.5 离心机

4.3.6 振荡器

4.3.7 旋涡混合器

4.3.8 氮吹仪

4.3.9 固相萃取装置

4.4 试料的制备

试料的制备包括:

——取制备后的供试样品,作为供试试料。

——取制备后的空白样品,作为空白试料。

——取制备后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试剂。

4.5 测定步骤

4.5.1 提取

称取 $5.0\text{ g}\pm 0.05\text{ g}$ 试样于 50 mL 离心管中,加 8 mL 乙腈,涡动混匀,中速振荡 20 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液于 100 mL 离心管中,组织残渣中依次加 5 mL 磷酸二氢钾缓冲液和 8 mL 乙腈,搅动残渣,涡动混匀,中速振荡 20 min,3 500 r/min 离心 10 min,合并两次上清液,加 40 mL 水,3 500 r/min 离心 10 min,上清液转至另一离心管中,再加 10 mL 水混匀,为样品提取液。

4.5.2 净化

将 C_{18} 固相萃取柱置于固相萃取装置上,依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 水平衡,将样品提取液过柱,自然流干,再依次用 10 mL 水和 10 mL 乙腈洗涤,抽真空干燥 3 min,用 2.5 mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液,30°C 水浴中氮气吹干。加 1.0 mL 流动相溶解,涡动 30 s,放置 15 min,经微孔滤膜过滤,供高效液相色谱分析。

固相萃取洗涤液和洗脱液流速均不超过 1 mL/min。

4.5.3 测定

4.5.3.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 $5\ \mu\text{m}$,或相当者。

柱温:30°C。

流动相:乙腈—四氢呋喃—1 mol/L 二丁胺磷酸缓冲液(130+55+25, v/v/v)。

流动相流速:1.0 mL/min。

检测波长:290 nm。

进样体积:100 μL 。

4.5.3.2 液相色谱测定

分别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替米考星的响应值均应在仪器检测的线性范围之内,试样液测定过程中应参插注入标准工作液,以便准确定量。标准品及试样液相色谱图见图 A. 1、图 A. 2 和图 A. 3。

4.6 结果计算和表述

动物组织中替米考星的含量 X ,以质量分数微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C ——试样液中对应的替米考星的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——溶解残留物所用流动相的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在猪肝、鸡肝中的检测限为 $25\ \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。在猪肉、鸡肉中检测限为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 $0.05\ \mu\text{g}/\text{g}\sim 5\ \mu\text{g}/\text{g}$ 添加浓度水平上猪肝、鸡肝空白添加回收率为 60%~120%。

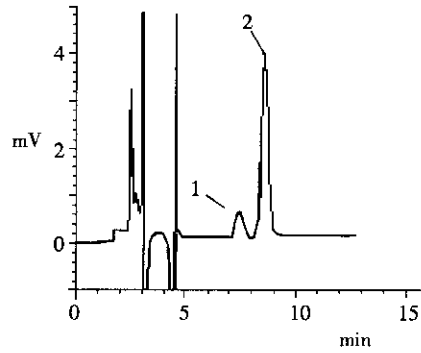
农业部 1025 号公告—10—2008

本方法在 $0.02 \mu\text{g}/\text{g} \sim 2 \mu\text{g}/\text{g}$ 添加浓度水平上猪肉、鸡肉空白添加回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

5.3 精密度

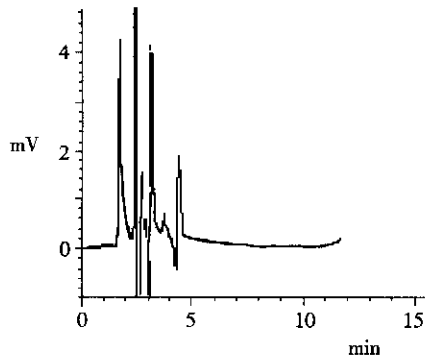
本方法的批内变异系数 $\leq 15.0\%$ ，批间变异系数 $\leq 25.0\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
色谱图



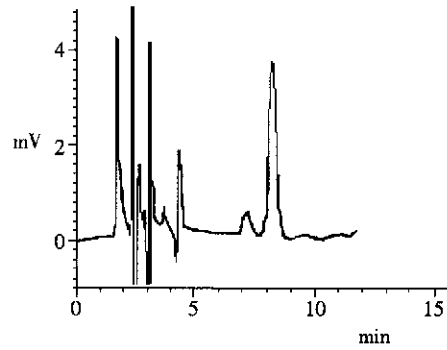
- 1. 替米考星反式异构体色谱峰
- 2. 替米考星顺式异构体色谱峰

图 A.1 1 µg/mL 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 空白肝脏样品色谱图



- 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.3 添加肝脏样品色谱图(0.2 µg/g)