

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 316 号—3—2020

饲料中泰妙菌素的测定 高效液相色谱法

Determination of tiamulin in feeds—
High performance liquid chromatography

2020-07-17 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布



前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位：江西省兽药饲料监察所、播恩生物技术股份有限公司、赣州朱师傅预混饲料事业有限公司、江西省动物卫生监督所。

本标准主要起草人：杨琳芬、符金华、吴科盛、徐国茂、夏骏、李勇、韩晓瑛、冯长贵、胡翊炜。

饲料中泰妙菌素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中泰妙菌素含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中泰妙菌素的测定。

本标准配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中泰妙菌素的检出限为 0.4 mg/kg,定量限为 1.0 mg/kg; 添加剂预混合饲料中泰妙菌素的检出限为 0.8 mg/kg,定量限为 2.0 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验室用水规则和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

用乙腈提取试样中泰妙菌素,经混合型强阳离子交换固相萃取柱净化,高效液相色谱分离,紫外检测器测定,外标法定量。

4 试剂或材料

除另有规定外,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 正丙醇。

4.5 正己烷。

4.6 磷酸盐缓冲溶液 I (pH 5.5):准确称量 1.420 g 无水磷酸氢二钠,加约 800 mL 水溶解后,用磷酸调至 pH 5.5,用水定容至 1 000 mL。

4.7 磷酸盐-乙腈溶液:准确量取 700 mL 磷酸盐缓冲溶液 I (4.6),加入 300 mL 乙腈混匀。

4.8 磷酸盐缓冲溶液 II (pH 8.0):准确称量 1.420 g 无水磷酸氢二钠,加约 800 mL 水溶解后,用磷酸调至 pH 8.0,用水定容至 1 000 mL。

4.9 氨化乙腈溶液:准确量取 3 mL 氨水,用乙腈稀释并定容至 100 mL。

4.10 泰妙菌素标准储备溶液(1 mg/mL):称取泰妙菌素标准品(分子式: $C_{28}H_{47}NO_4S$,CAS 号:55297-95-5,纯度 $\geq 99.8\%$)10 mg(精确至 0.01 mg),用乙腈溶解并定容至 10 mL。 -20°C 以下保存,有效期 3 个月。

4.11 泰妙菌素标准中间溶液(200 $\mu\text{g/mL}$):准确量取适量泰妙菌素标准储备溶液(4.10),用流动相稀释至 200 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

4.12 泰妙菌素标准系列工作溶液:准确量取适量泰妙菌素标准中间溶液(4.11),用流动相分别配制成 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作溶液。临用现配。

4.13 混合型强阳离子交换固相萃取(MCX)柱:60 mg/3 mL,或与之性能相当者。

4.14 微孔滤膜:孔径 0.45 μm ,有机相。

5 仪器设备

- 5.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管矩阵检测器。
- 5.2 天平:感量 0.1 mg 和感量 0.01 mg。
- 5.3 振荡器:最大转速不低于 200 r/min。
- 5.4 高速冷冻离心机:可控温至 4℃,转速不低于 10 000 r/min。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 旋转蒸发器。
- 5.7 氮吹仪。

6 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎至全部通过 0.42 mm 孔径的筛,混匀,装入密闭容器中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g(添加剂预混合饲料称取 1 g)(精确至 0.1 mg),置于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 乙腈,涡旋混匀后,振荡提取 10 min,4℃下 10 000 r/min 离心 5 min 后,转移上清液至另一离心管中,残渣加入 10.0 mL 乙腈,重复提取一次,合并提取液,混匀后备用。

7.2 净化

移取 15.0 mL 提取液至鸡心瓶中,加入 5 mL 正丙醇,于 40℃下旋转浓缩至干,加入 10 mL 磷酸盐-乙腈溶液(4.7)溶解,加入 10 mL 正己烷,涡旋萃取后,转移到 50 mL 离心管中,于 4℃下 10 000 r/min 离心 5 min,取下层溶液备用。MCX 固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 磷酸盐缓冲溶液 I(4.6)活化,加载备用液,过柱后,再依次用 3 mL 磷酸盐缓冲溶液 I(4.6)和 3 mL 乙腈淋洗,抽干后用 3 mL 氨化乙腈溶液(4.9)洗脱,洗脱液收集于试管中于 40℃下氮吹至干,加入 1.0 mL 流动相溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜后,上机测定。

7.3 液相色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者。

流动相:磷酸盐缓冲溶液 II + 乙腈=4+6。

流速:1.0 mL/min。

检测器:紫外检测器或二极管矩阵检测器。

检测波长:210 nm。

柱温:30℃。

进样量:50 μL。

7.4 测定

7.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列工作溶液(4.12)和试样溶液(7.2)上机测定。泰妙菌素标准溶液的液相色谱图参见附录 A。

7.4.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中泰妙菌素保留时间应与标准系列工作溶液中泰妙菌素的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

7.4.3 定量

以泰妙菌素的浓度为横坐标、以色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试

样溶液中待测物的响应值应在标准系列工作溶液测定的线性范围内。如超出线性范围,应将试样溶液用流动相进一步稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

8 试验数据处理

试样中泰妙菌素的含量以质量分数 w 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。单点校准按式(1)计算;多点校准按式(2)计算。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——试样中泰妙菌素的峰面积;

A_s ——标准溶液中泰妙菌素的峰面积;

ρ_s ——标准溶液中泰妙菌素的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_1 ——提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——净化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——净化后最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中泰妙菌素的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下,2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性附录)
泰妙菌素标准溶液色谱图

泰妙菌素标准溶液(20 $\mu\text{g/mL}$)色谱图见图 A.1。

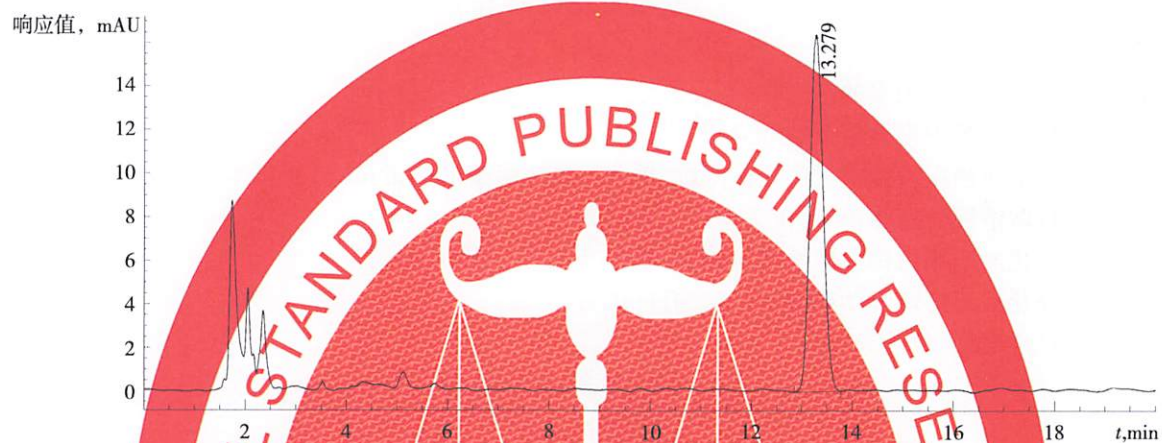


图 A.1 泰妙菌素标准溶液(20 $\mu\text{g/mL}$)色谱图

中华人民共和国
国家标准
饲料中泰妙菌素的测定
高效液相色谱法

农业农村部公告第316号—3—2020

* * *

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 0.75 字数 15 千字

2020年10月第1版 2020年10月北京第1次印刷

书号: 16109·8152

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第316号—3—2020