



中华人民共和国国家标准

GB/T 30945—2014

饲料中泰乐菌素的测定 高效液相色谱法

Determination of tylosin in feeds—
High performance liquid chromatography

2014-07-08 发布

2015-01-08 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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:农业部饲料质量监督检验测试中心(西安)。

本标准主要起草人:张眉、贾青、李会玲、冯西辉、王均良、郭洁、李胜。

饲料中泰乐菌素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了以高效液相色谱(HPLC)仪测定饲料中泰乐菌素的方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中泰乐菌素的测定,本方法定量限为1 mg/kg。

本标准不适用于添加尿素的饲料。

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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的泰乐菌素经二氯甲烷提取后,过滤,滤液经 HLB 小柱净化、浓缩,注入高效液相色谱仪进行分离,用紫外检测器检测,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯试剂,用水符合 GB/T 6682 中一级用水的规定。

4.1 甲醇。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 二氯甲烷。

4.5 正己烷。

4.6 氨水。

4.7 乙腈溶液(50%):取乙腈(4.2)100 mL 与 100 mL 水混合。

4.8 盐酸溶液(1 mol/L):取 9 mL 盐酸于 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容。

4.9 泰乐菌素标准品:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.10 0.005 mol/L 磷酸二氢铵缓冲液:准确称取 0.575 1 g 磷酸二氢铵于 1 000 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,过 0.45 μm 滤膜。

4.11 淋洗液:含 2% 氨水 5% 甲醇的水溶液,吸取 2 mL 氨水(4.6)、5 mL 甲醇(4.1),用水稀释至 100 mL。

4.12 乙酸钠缓冲液(pH=5.5,0.15 mol/L):称取 12.30 g 无水乙酸钠于 1 000 mL 量瓶中,加 900 mL

水,使溶解,用 1 mol/L 的盐酸溶液(4.8)调节 pH 至 5.5,用水定容。

4.13 HLB 固相萃取小柱¹⁾(200 mg,3 mL)。

4.14 泰乐菌素标准储备液:精密称定泰乐菌素标准品 100 mg(精确到 0.01 mg),于 100 mL 容量瓶中,加入 50%乙腈(4.7)溶液使溶解,并定容,该溶液浓度为 1mg/mL,置 4℃冰箱中保存,该溶液有效期为 3 个月。

4.15 泰乐菌素标准系列:分别吸取一定量的标准储备液(4.14),置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(4.2)稀释、定容,配制成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 μg/mL 的标准工作液。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。

5.2 振荡器。

5.3 天平:精度为 0.01 g 和 0.000 01 g。

5.4 固相萃取装置。

5.5 超纯水处理器。

5.6 氮吹仪。

5.7 真空泵。

5.8 高速离心机。

5.9 旋转蒸发仪。

5.10 真空抽滤装置。

5.11 0.45 μm 微孔滤膜。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,按 GB/T 20195 进行样品制备。粉碎过 0.45 mm 孔筛,混合均匀,装入密闭容器,低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 样品处理

7.1.1 提取

准确称取 2 g~3 g 饲料样品(精确至 0.01 g),置于 100 mL 具塞三角瓶中,加入 25 mL 二氯甲烷(4.4)于振荡器上振荡提取 20 min,用快速滤纸过滤,收集全部滤液于梨形瓶中,在 45℃下于旋转蒸发仪上蒸干溶剂,加 0.5 mL 甲醇(4.1)溶解残渣,再加入 pH=5.5 的乙酸钠缓冲溶液(4.12)4.5 mL,轻轻摇匀,将此溶液转入 20 mL 离心管中,用少量乙酸钠缓冲溶液(4.12)冲洗梨形瓶,洗液合并入离心管中。在离心管中加入 5 mL 正己烷(4.5),轻轻摇动离心管,防止乳化,于 4 000 r/min 离心 5 min,使分层,弃去正己烷层,下层水相层备用。

7.1.2 净化

HLB 小柱固定在固相萃取装置上,依次用 5 mL 甲醇(4.3)和 5 mL 超纯水活化柱子,将全部水相

1) Oasis®HLB 固相萃取小柱是由 Waters Corporation(34 Maple street Milford MA, USA)提供的产品的商品名称,给出这一信息是为了给本标准使用者提供方便,而不是标准主管部门对这一产品的认可。

层加入小柱,让溶液自然流下,分别用 5 mL 水和 5 mL 淋洗液(4.11)淋洗,待淋洗液全部流出,抽干 HLB 小柱中的液体,用 5 mL 甲醇(4.3)洗脱,收集洗脱液于试管中,在氮气流下吹干,用 1 mL 乙腈(4.2)溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

7.2 测定

7.2.1 色谱条件

色谱条件如下:

- a) 流动相:乙腈:甲醇:0.005 mol/L 磷酸二氢铵(4.10)=50:35:15。
- b) 流速:0.6 mL/min。
- c) 柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。
- d) 检测器:紫外检测器。
- e) 检测波长:290 nm。
- f) 色谱柱:symmetry shield RP18²⁾,柱长 250 mm,内径 3.9 mm,或性能类似的色谱柱。
- g) 进样体积:20 μL 。

7.2.2 定量测定

分别取样品试液(7.1.2)和相应浓度的泰乐菌素标准工作液(4.15)按 7.2.1 的条件进行分析,以外标法做单点或多点校正,以保留时间定性,峰面积定量,泰乐菌素标准溶液的色谱图参见附录 A。

8 结果计算及表示

8.1 结果计算

试样中泰乐菌素的含量(X)以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{P \times c_s \times V \times 1\,000}{P_s \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- P —— 试样溶液中泰乐菌素的峰面积;
 c_s —— 标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
 V —— 试样定容体积,单位为毫升(mL);
 P_s —— 标准溶液中泰乐菌素的峰面积;
 m —— 试样质量,单位为克(g)。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 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%。

2) symmetry shield RP18 色谱柱是由 Waters Corporation(34 Maple street Milford MA, USA)提供的产品的商品名称,给出这一信息是为了给本标准使用者提供方便,而不是标准主管部门对这一产品的认可。

附录 A
(资料性附录)

泰乐菌素标准溶液的液相色谱图

泰乐菌素标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

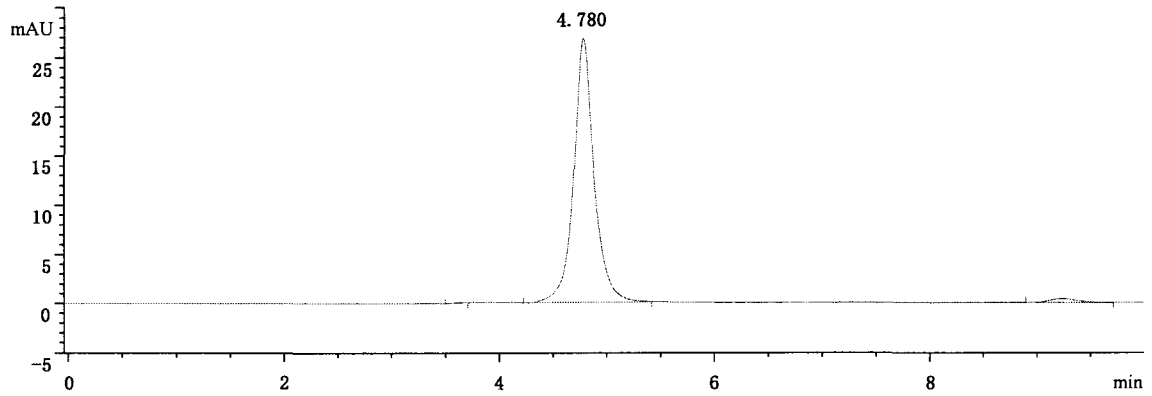


图 A.1 泰乐菌素标准溶液的液相色谱图
