

中华人民共和国国家标准

农业部 1163 号公告—2—2009

动物性食品中林可霉素和大观霉素 残留检测 气相色谱法

Gas chromatographic method for determination of Lincomycin
and Spectinomycin residues in animal products

2009-02-06 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 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。

本标准起草单位：华中农业大学。

本标准主要起草人：袁宗辉、于刚、陶燕飞、陈冬梅、王玉莲、黄玲利、彭大鹏、戴梦红、刘振利。

动物性食品中林可霉素和大观霉素 残留检测 气相色谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中林可霉素和大观霉素残留检测的制样和气相色谱测定方法。

本标准适用于猪肾脏、猪肌肉、牛肾脏、牛肌肉、鸡胸肌、鸡肾脏、鸡蛋、牛奶中林可霉素和大观霉素单个或多个残留量的定量测定。

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。

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

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

试料用磷酸缓冲液提取,利用离子对原理反相 SPE 柱净化,BSTFA 衍生后用 GC-NPD 测定。

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 规定的一级水。

4.2.1 盐酸林可霉素标准品($C_{18}H_{34}N_2O_6 \cdot SHCl$),含量 $\geq 99\%$ 。

4.2.2 硫酸大观霉素标准品($C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot H_2SO_4$),含量 $\geq 98\%$ 。

4.2.3 N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA,N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)。

4.2.4 Waters oasis HLB SPE 柱(60 mg/3 mL)或相当者。

4.2.5 甲醇。

4.2.6 乙腈:色谱纯。

4.2.7 正己烷:色谱纯。

4.2.8 磷酸二氢钾:优级纯。

4.2.9 磷酸:优级纯。

4.2.10 氢氧化钾:优级纯。

4.2.11 三氯乙酸:优级纯。

4.2.12 十二烷基磺酸钠:色谱纯。

- 4.2.13 乙酸:优级纯。
- 4.2.14 40%氢氧化钾溶液:称取氢氧化钾 40 g,加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.2.15 10%氢氧化钾溶液:称取氢氧化钾 10 g,加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.2.16 1 mol/L 的盐酸:量取浓盐酸 9 mL,加水稀释至 100 mL。
- 4.2.17 提取液:称取磷酸二氢钾 1.36 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL,磷酸调节 pH 至 4.0,加入三氯乙酸 30 g。
- 4.2.18 十二烷基磺酸钠溶液:称取十二烷基磺酸钠 2.78 g,加水溶解并稀释至 50 mL。
- 4.2.19 十二烷基磺酸钠缓冲液:称取十二烷基磺酸钠 2.78 g,用水溶解,加入乙酸 1 mL,并稀释至 500 mL。
- 4.2.20 标准贮备液:称取林可霉素对照品约 10 mg(以纯品计算)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解、定容,制成 1.0 mg/mL 的标准贮备液。

称取大观霉素对照品约 10 mg(以纯品计算)于 10 mL 容量瓶中,用超纯水溶解、定容,制成 1.0 mg/mL 的标准贮备液。配制完毕后移至 10 mL 聚四氟乙烯管中储存。

以上 2℃~8℃避光保存,有效期 6 个月。

- 4.2.21 标准工作液:准确量取林可霉素和大观霉素标准贮备液适量,用甲醇稀释成适宜浓度的标准工作液,2℃~8℃避光保存,有效期 1 周。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 气相色谱仪:配氮磷检测器。
- 4.3.2 分析天平:感量 0.000 01 g,感量 0.01 g。
- 4.3.3 离心机。
- 4.3.4 电热恒温水浴锅。
- 4.3.5 旋涡混合器。
- 4.3.6 组织匀浆机。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

- 取混合均匀后的供试样品,作为供试试料;
- 取混合均匀后的空白样品,作为空白试料。

4.4.2 提取

称取试料(2±0.05)g 于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加提取液 15 mL。漩涡混匀,摇床振荡 30 min,5 000 r/min 离心 10 min。取上清液,残渣用提取液 10 mL 重复提取一次。合并上清液,5 000 r/min 离心 15 min。水层(用 40%、10%氢氧化钾和 1 mol/L 盐酸)调节 pH 到 5.8±0.2。加十二烷基磺酸钠溶液 2 mL,漩涡混匀后静置 15 min,备用。

牛奶样品的提取:量取试料(2±0.05)mL 置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加提取液 10 mL。漩涡混匀,摇床振荡 30 min,5 000 r/min 离心 10 min。取上清液,残渣用提取液 10 mL 重复提取一次。合并上清液,加正己烷 5 mL,5 000 r/min 离心 15 min,弃有机层。提取液调节 pH 至 5.8±0.2。加十二烷基磺酸钠溶液 2 mL,漩涡混匀后静置 15 min,备用。

4.4.3 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水、十二烷基磺酸钠缓冲液各 3 mL 预洗,取备用液过柱,用水 3 mL 淋洗 2 次,甲醇 4 mL 洗脱,收集洗脱液,水浴 40℃ 下氮气吹干至约 100 μL 左右时取出,室温下吹干。加 500 μL 硅烷化试剂(BSTFA)和 100 μL 乙腈,涡旋混合 1 min,密封,75℃ 恒温箱中,衍生反应 1 h;于室温

下氮气吹干;加 1.0 mL 正己烷,涡旋混合 2 min,为试样溶液,供 GC-NPD 分析。

4.4.4 标准曲线的制备

分别精密量取适量标准贮备液,制成混合标准溶液,再用甲醇稀释成其中林可霉素浓度为 20 000 μg/L、10 000 μg/L、5 000 μg/L、1 000 μg/L、500 μg/L、100 μg/L、50 μg/L,大观霉素为 20 000 μg/L、10 000 μg/L、5 000 μg/L、1 000 μg/L、500 μg/L、100 μg/L、50 μg/L 的工作液。按照衍生化反应步骤得到系列衍生化产物,供气相色谱分析,将测得的峰面积与相对应浓度绘制标准曲线。

4.4.5 测定

4.4.5.1 气相色谱条件

- a) 色谱柱:HP-5,30.0 m×320 μm×0.25 μm。
- b) 进样口温度:280℃。
- c) 进样方式:不分流。
- d) 进样体积:1 μL。
- e) 模式:恒流。
- f) 载气:氮气(99.999%)。
- g) 柱流速:1 mL/min。
- h) 柱温升温程序见表 1:

表 1 柱温升温程序

起始温度 ℃	终止温度 ℃	升温速率 ℃/min	保持时间 min	总时间 min
150	150	—	2.0	2.0
150	300	20	10	19.5

- i) 检测器温度:325℃。
- j) 辅助气:氢气 3 mL/min,空气 60 mL/min。
- k) 尾吹气:氮气 12 mL/min。

4.4.5.2 气相色谱测定

取适量试样溶液和相应的标准溶液,做单点或多点校准,按外标法,以峰面积积分值定量,标准工作液及试样液中林可霉素和大观霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液和试样的液相色谱图参见附录 A。

4.4.6 空白实验

除不加试样外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算与表述

试料中林可霉素和(或)大观霉素的残留量(μg/L 或 μg/kg)按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试料中林可霉素和(或)大观霉素残留量,单位为微克每千克或微克每升(μg/kg 或 μg/L);
- A——试样溶液中林可霉素和(或)大观霉素的峰面积;
- A_s——标准工作液中林可霉素和(或)大观霉素的峰面积;
- C_s——标准工作液中林可霉素和(或)大观霉素的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V——溶解残余物所得试样溶液体积,单位为毫升(mL);
- W——样品质量,单位为克或毫升(g 或 mL)。

注:计算结果需将空白值扣除。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

在猪、牛、鸡的肌肉和肾脏中林可霉素的定量限为 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$,在鸡蛋、牛奶中林可霉素的定量限为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$;在猪、牛、鸡的肌肉和肾脏、鸡蛋、牛奶中大观霉素的定量限为 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在样品中添加药物浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率为 $70\% \sim 110\%$,添加药物浓度 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率为 $80\% \sim 110\%$ 。

5.3 精密度

本方法在组织中添加药物浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的变异系数 $CV \leq 21\%$,添加 $100 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1\ 000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的变异系数 $CV \leq 17\%$; $1\ 000 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 3\ 000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的变异系数 $CV \leq 11\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液和试样的液相色谱图

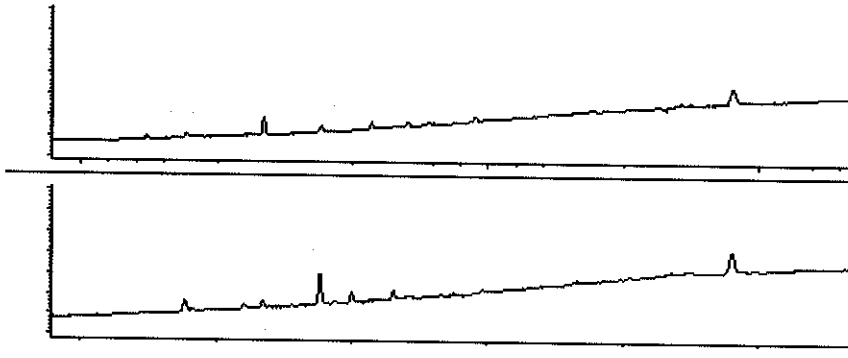


图 A.1 林可霉素和大观霉素浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液色谱图

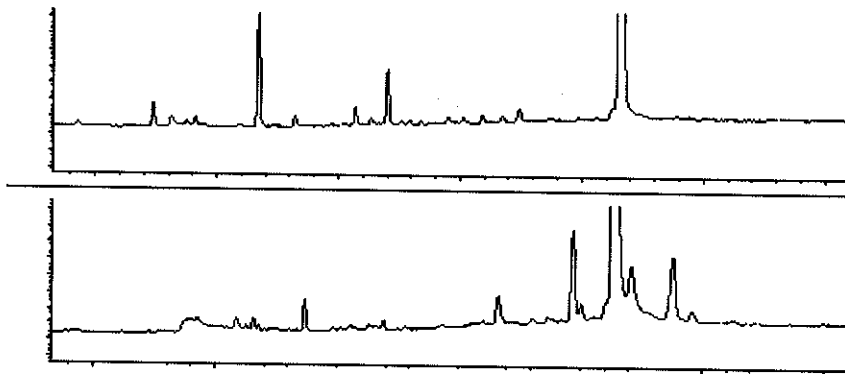


图 A.2 猪空白肾脏和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g/kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g/kg}$)图谱

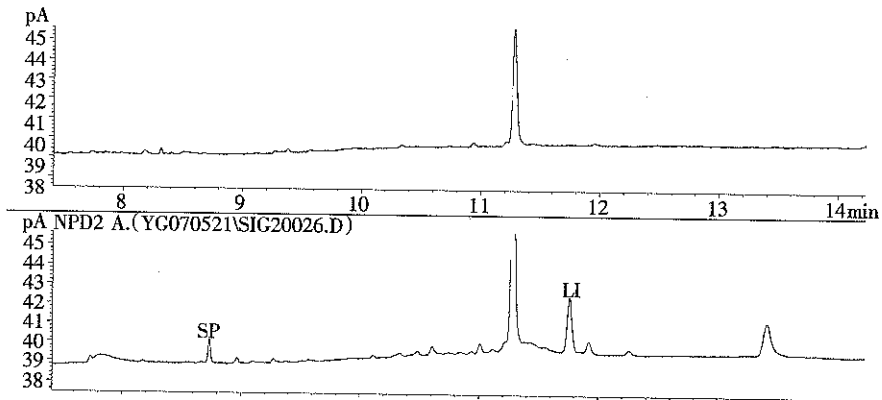


图 A.3 空白牛奶和牛奶添加药物(林可霉素 25 $\mu\text{g/L}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g/L}$)图谱

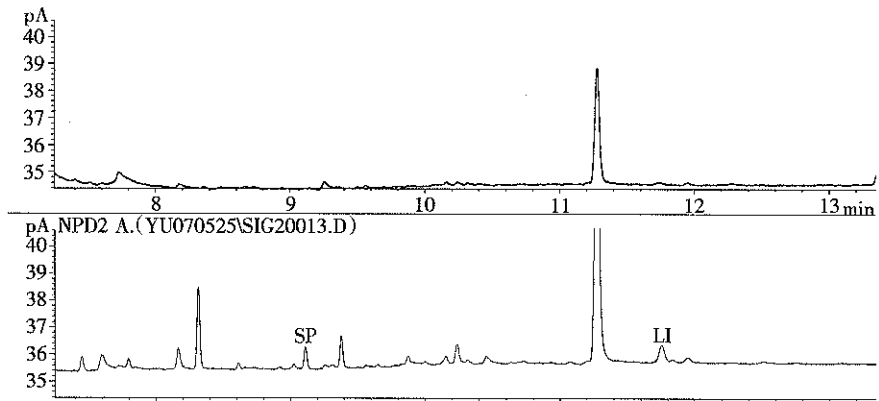


图 A. 4 空白鸡蛋和鸡蛋添加药物(林可霉素 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

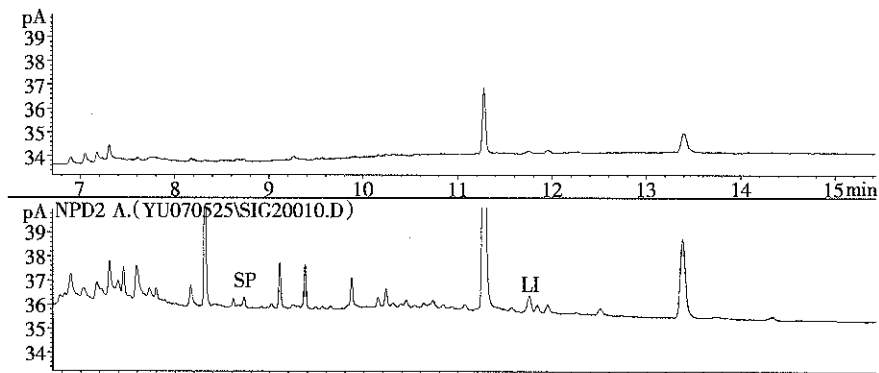


图 A. 5 空白猪肌肉和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

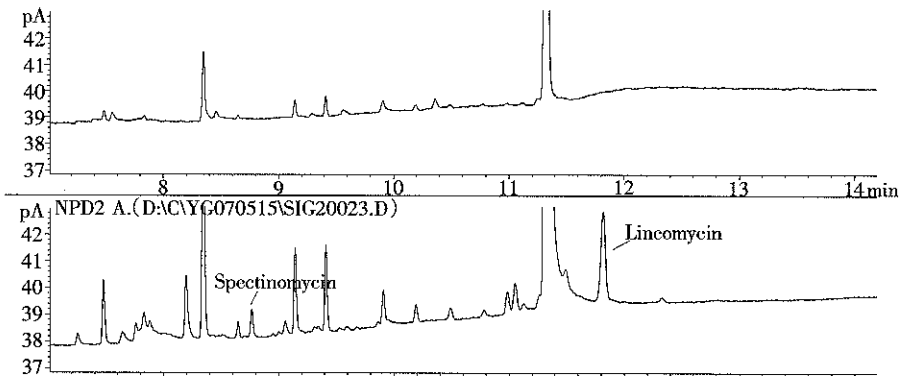


图 A. 6 空白猪肾脏和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

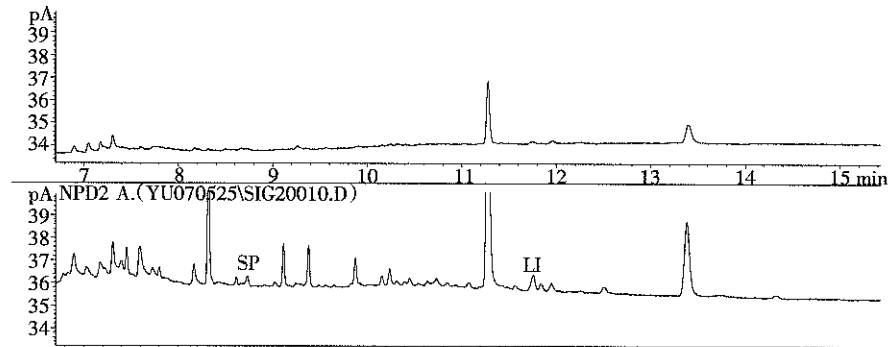


图 A. 7 空白牛肌肉和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

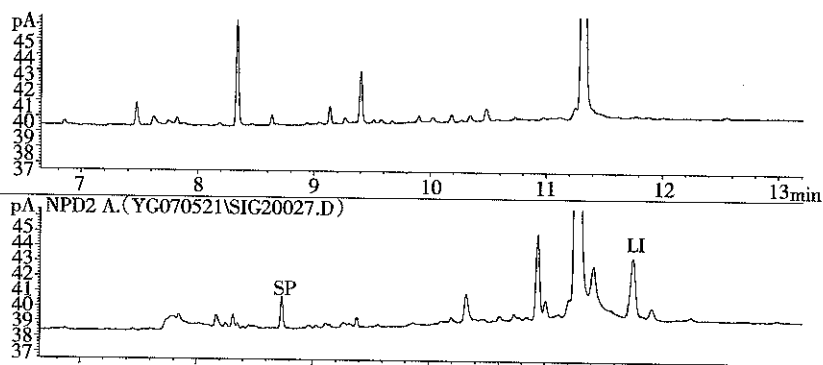


图 A. 8 空白牛肾脏和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

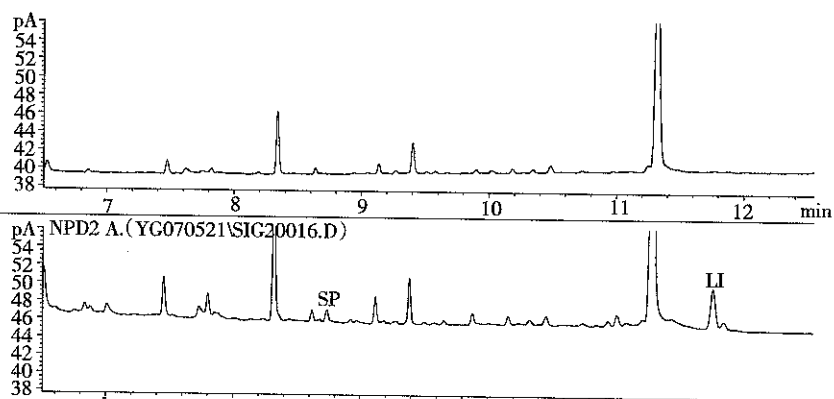


图 A. 9 空白鸡肌肉和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

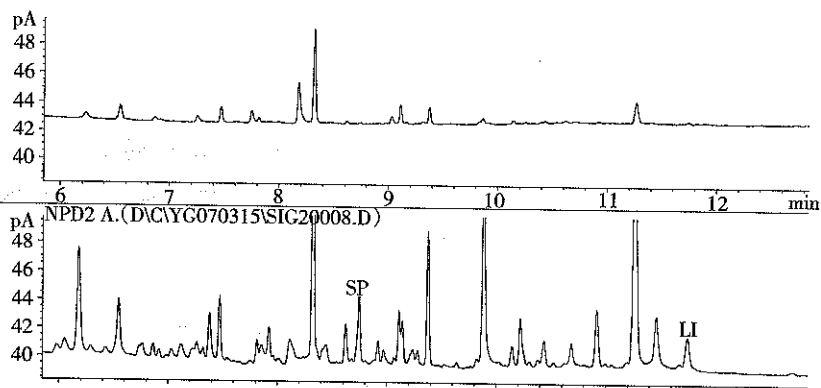


图 A. 10 空白鸡肾脏和添加药物(林可霉素 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图