



中华人民共和国国家标准

GB/T 20750—2006

牛肌肉中氟胺烟酸残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

Determination of flunixin meglumine residue
in bovine muscle tissue—
LC-UV method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、李军、宋文斌、董振霖、李一尘、薛大方、于一茫。

本标准系首次发布的国家标准。

牛肌肉中氟胺烟酸残留量的测定

液相色谱-紫外检测法

1 范围

本标准规定了牛肌肉中氟胺烟酸残留量的液相色谱-紫外检测法。

本标准适用于牛肌肉中氟胺烟酸残留量的测定。

本标准的方法检出限为:0.005 mg/kg。

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。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测定方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测定方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

样品中氟胺烟酸采用 β -葡萄糖苷酸酶降解,然后用乙腈提取、浓缩,磷酸盐缓冲溶液溶解,SPE-C18净化 and 富集,利用适当的洗脱溶剂对固相萃取柱上富集的组分进行选择性的淋洗,通过高效液相色谱的紫外检测器进行分析测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所有试剂均为分析纯。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲酸。

4.2 冰乙酸。

4.3 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase)15 000 U/mL:例如: β -葡萄糖苷酸酶(600 000 U/g),准确称取0.050 0 g β -葡萄糖苷酸酶于5 mL 玻璃试管中,加2 mL 的磷酸盐(PBS)缓冲溶液溶解,用0.45 μ m 尼龙滤膜过滤。使用前现配制。

4.4 葡萄糖。

4.5 浓盐酸。

4.6 流动相 A:乙酸铵 0.05 mol/L,pH5.0;准确称取 3.90 g 乙酸铵于 1 000 mL 的烧杯中,加 900 mL 水溶解并用甲酸调整至 pH5.0,转移至 1 000 mL 容量瓶中,使用前过 0.45 μ m 滤膜。

4.7 流动相 B:甲醇,色谱纯。

4.8 流动相 C:乙腈,色谱纯。

4.9 混合流动相:将 40 mL 流动相 B,30 mL 流动相 C 以及 30 mL 流动相 A 相混合。

4.10 磷酸盐(PBS)缓冲溶液:称取 0.8 g 氯化钠,0.02 g 氯化钾,0.02 g 磷酸二氢钾,0.115 g 磷酸氢二钠和 0.02 g 葡萄糖于 250 mL 烧杯中加约 90 mL 的水溶解,用 0.1 mol/L 磷酸调整 pH6.0,转移至

100 mL 容量瓶中并稀释至刻度。

4.11 85%磷酸。

4.12 乙酸钾溶液:0.04 mol/L。称取 1.95 g 乙酸钾于 500 mL 容量瓶中,加约 450 mL 水溶解并稀释至刻度。

4.13 氯化钾。

4.14 磷酸二氢钾。

4.15 磷酸二氢钾缓冲溶液:0.25 mol/L,pH7.0。称取 17.01 g 磷酸二氢钾溶于 400 mL 水中,定容到 500 mL,然后用 0.25 mol/L 磷酸氢二钠调节 pH 至 7.0(约 500 mL),定容到 1 L。

4.16 氯化钠。

4.17 无水磷酸氢二钠。

4.18 磷酸氢二钠溶液:0.25 mol/L。称 17.75 g 磷酸氢二钠溶于 400 mL 水中,定容到 500 mL。

4.19 乙酸正己烷溶液:乙酸+正己烷(10+90)。

4.20 正己烷:色谱纯。

4.21 标准物质:氟胺烟酸,纯度>99%。

4.22 标准储备液:50 $\mu\text{g/mL}$ 。称取适量的氟胺烟酸标准物质,用甲醇配成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 $2^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

注:称取标准物的质量是按纯度修正过的质量。

4.23 标准工作溶液:2 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取适量的氟胺烟酸的标准储备液(4.22),用甲醇配制成 2 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液, $2^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 1 个月。

4.24 标准基质溶液:根据氟胺烟酸的灵敏度和仪器线性范围,用空白样品提取液配制成不同浓度($\mu\text{g/mL}$)标准基质溶液。

5 仪器

5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器。

5.2 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。

5.3 离心机:最大转速为 10 000 r/min。

5.4 离心管:50 mL 聚丙烯离心管。

5.5 均质机。

5.6 振荡器。

5.7 微量移液器:10 $\mu\text{L}\sim 100 \mu\text{L}$ 和 1 000 $\mu\text{L}\sim 5 000 \mu\text{L}$ 。

5.8 氮气浓缩仪。

5.9 酸度计:测量精度为 ± 0.02 。

5.10 样品过滤器:PTFE,0.45 μm 。

5.11 固相萃取柱:Bond Elut Certify II,3 mL,200 mg 或相当者。

5.12 真空固相萃取装置。

5.13 旋转蒸发仪。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

去掉牛肌肉中的骨头和皮,将其搅拌均匀。分出 0.5 kg 作为试样,将制备好的试样密封,并贴上标签。

6.2 试样的保存

将试样置于 -18°C 条件下贮存。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2.0 g 试样,于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入乙酸钾溶液(4.12)5 mL,高速旋涡混合 10 s。混合后向样品中加入 30 μ L 乙酸,调节样品 pH 至 4.5,旋涡混合。再加入 70 μ L 新配制的 β -葡萄糖苷酸酶溶液(4.3)混合,于振荡器 37℃ 条件下低速振荡 16 h。分别向样品中加入 5 mL 乙腈,旋涡混合 5 s,离心 10 min(3 200 r/min)。转移上清液至 50 mL 离心管中。在原液中加入 5 mL 乙腈和 1 mL 乙酸钾溶液(4.12)旋涡混合,离心,将上清液转移至 50 mL 离心管中,合并上清液,待净化。

7.2 净化

在混合的上清液中加入 5 mL 正己烷和 50 μ L 浓盐酸,旋涡混合 15 s,离心 5 min(3 200 r/min)。弃去正己烷层,重复上述步骤一次。55℃ 条件下氮吹使其体积小于 5 mL。加入磷酸二氢钾缓冲溶液(4.15)7 mL,旋涡混合,超声 20 s,5℃ 条件下离心 15 min(3 200 r/min)。采用固相萃取柱(5.11),用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化柱,将样品过柱,弃去过柱液,然后用 3 mL 水和 6 mL 甲醇洗柱,弃去过柱液。加大真空度抽滤 10 min。用 2 mL 正己烷淋洗柱子两次并弃去淋洗液。用 2 mL 乙酸正己烷溶液(4.19)洗提柱子两次,用 15 mL 离心管收集洗脱液。在 55℃ 条件下将洗脱液氮吹至干。随后,在每个样品中加入混合流动相(4.9)1 mL,旋涡混合 5 s,超声 5 s。样液用 0.45 μ m 的滤膜过滤到进样瓶中,待测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱测定条件

- a) 色谱柱:Inertsil, ODS-3, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 或相当者;
- b) 流速:0.4 mL/min;
- c) 检测波长:285 nm;
- d) 柱温:35℃;
- e) 进样量:20 μ L;
- f) 运行时间:20 min;
- g) 延迟时间:10 min。

7.3.2 液相色谱测定

用氟胺烟酸的标准基质溶液(4.24)分别进样,以峰面积和工作标准溶液浓度绘制标准工作曲线,样品溶液中氟胺烟酸的响应值应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,氟胺烟酸保留时间约为 13.0 min,标准物质色谱图参见图 A.1。氟胺烟酸的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B.1。

7.4 平行试验

按照上述步骤,对同一试样进行平行试验。

7.5 回收率试验

空白样品中添加标准溶液按 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

按式(1)计算试样中氟胺烟酸的残留量:

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

式中:

X——试样中被测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c——从标准曲线上得到被测组分溶液的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,牛肌肉中氟胺烟酸含量范围及重复性限方程为:0.01 mg/kg~0.20 mg/kg 和 $\lg r = 0.836 \lg m - 0.8509$ 。

如果差值超过重复性 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在线性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,牛肌肉中氟胺烟酸含量范围及再现性方程为:0.01 mg/kg~0.20 mg/kg 和 $R = 0.1987m + 0.0046$ 。

附 录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

氟胺烟酸色谱图,见图 A.1。

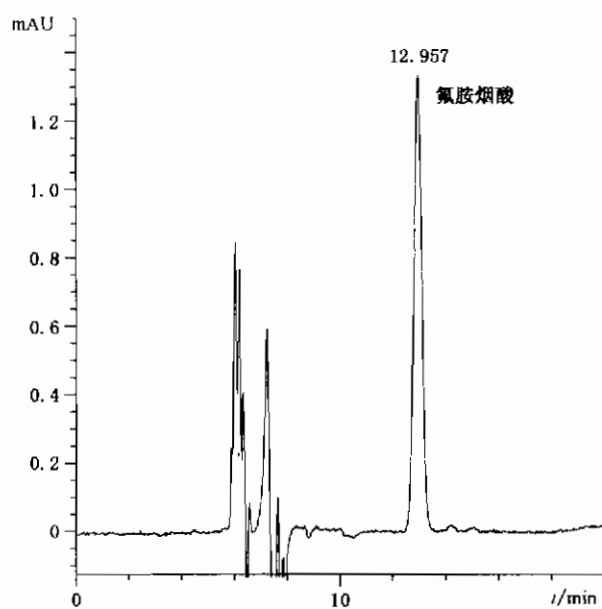


图 A.1 氟胺烟酸色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

氟胺烟酸添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 氟胺烟酸添加浓度及其平均回收率的试验数据

兽药名称	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/(%)
氟胺烟酸	0.010	81.4
	0.025	85.3
	0.100	82.5
	0.200	91.0

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
牛肌肉中氟胺烟酸残留量的测定
液相色谱-紫外检测法
GB/T 20750—2006

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字
2007年3月第一版 2007年3月第一次印刷

*

书号:155066·1-28966 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 20750-2006