



中华人民共和国国家标准

GB/T 8381.3—2005

饲料中林可霉素的测定

Determination of lincomycin in feed

2005-09-05 发布

2006-02-01 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

本标准参考了美国公职分析化学家协会(AOAC)《公定分析方法》978.31“饲料中的林可霉素 微生物学方法”和国内外有关林可霉素生产、检验等资料,根据我国饲料工业的实际情况制定。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由辽宁省兽药饲料监察所负责起草,吉林省兽药监察所和国家饲料监督检验测试中心(北京)参加起草。

本标准主要起草人:陈莹莹、曹东、董永亮、刘雪红、苗畅海、肖勇、战石、李广生、刘同民、杨曙明。

饲料中林可霉素的测定

1 范围

本标准规定了饲料中林可霉素的测定方法。

本标准适用于浓缩饲料、配合饲料中林可霉素的鉴别和含量测定。

采用本方法鉴别林可霉素的最小含量为 10 mg/kg。

采用本方法测定林可霉素定量的检测限为每千克饲料中含 10 000 林可霉素效价单位。

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 14699.1 饲料 采样

中华人民共和国兽药典(2000年版一部)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

林可霉素效价单位

用微生物法测定的林可霉素的生物活性单位,用 u 表示。林可霉素中所含的抗菌活性部分的质量与生物活性单位的关系为 1 mg 相当于 1 000 林可霉素效价单位。

4 原理

在酸性条件下,用二氯甲烷除去饲料中能够溶入其中的杂质,调节液性呈碱性,用二氯甲烷提取溶液中的林可霉素,经浓缩、溶剂转换,制成试样溶液。试样溶液在硅胶 G 薄层板上用两种展开剂展开,与标准品比较 R_f 值,确认试样中是否含有林可霉素;用微生物标准曲线法测定含量。

5 试剂和溶液

除非另有说明,在本分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水。

5.1 林可霉素标准品:符合《中华人民共和国兽药典》2000年版一部的要求。

5.2 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CMCC 28001。

5.3 甲醇。

5.4 正己烷。

5.5 二氯甲烷。

5.6 硅胶 G,薄层层析用。

5.7 碘。

5.8 盐酸溶液:取盐酸 9 mL,加水至 1 000 mL,混匀。

5.9 盐酸-甲醇,1+1。

5.10 氨溶液:取浓氨溶液 50 mL,加水至 100 mL,混匀。

5.11 氨溶液:取浓氨溶液 5 mL,加水至 100 mL,混匀。

- 5.12 展开剂 1,丁酮-丙酮-水,9.3+2.6+1。
- 5.13 展开剂 2,三氯甲烷-甲醇-浓氨溶液,1+1+1,混合,振荡,静置至上下两层均澄清,分取下层混合液备用。
- 5.14 林可霉素标准溶液:取林可霉素标准品 50 mg,加甲醇 2 mL 使溶解,用二氯甲烷稀释至浓度为 1 mg/mL。当天配制。供鉴别用。
- 5.15 林可霉素标准储备液:称取 50 mg 林可霉素标准品,精确至 0.1 mg,用水溶解并稀释成约含 1 000 u/mL 的溶液。在 2℃~10℃ 可保存 7 天。供含量测定用。

6 仪器及设备

- 6.1 分析天平,感量 0.000 1 g。
- 6.2 天平,感量 0.01 g。
- 6.3 振荡器。
- 6.4 离心机。
- 6.5 旋转蒸发器。
- 6.6 超声波发生器。
- 6.7 旋涡式微型混合器。
- 6.8 电热恒温水浴锅。
- 6.9 注射器,全玻璃,5 mL,配有 8° 针头。
- 6.10 浓缩瓶,容量 10 mL,具塞,底部具 0.2 mL 刻度尾管。
- 6.11 玻璃板,规格 20 cm×10 cm。
- 6.12 展开槽,立式,双槽,规格 10 cm×5 cm×20 cm。
- 6.13 平底双碟,直径约 90 mm,高 16 mm~17 mm;符合《中华人民共和国兽药典》2000 年版一部的

8.1.3 洗涤

合并两次酸溶液(8.1.2),加入3 mL正己烷(5.4),于微型混合器(6.7)上混合30 s,弃去上层正己烷,用7 mL二氯甲烷(5.5)分三次洗涤酸提取液(3.2、2 mL),每次混合30 s,用注射器(6.9)吸去下层二氯甲烷。如果出现乳化现象,可于3 000 r/min离心5 min破除乳化,使溶液分层。

8.2 试样溶液的制备

用氨溶液(5.11)调节酸提取液(8.1.3)至pH10,用7 mL二氯甲烷分三次(3、2 mL)提取溶液中的林可霉素,每次混合1 min,吸出下层二氯甲烷提取液,合并到浓缩瓶(6.10)中,在30℃水浴中蒸干。放冷至室温后加入0.2 mL二氯甲烷溶解残渣,留做薄层层析用。当天使用。

8.3 测定

8.3.1 薄层板的制备

取8 g硅胶G(5.6),加水约24 mL,研磨2 min至呈粘稠状,铺成三块薄层板(6.11),置室温干燥后,于105℃活化1 h,贮于干燥器中备用。一周内使用。

8.3.2 点样

取两块薄层板(8.3.1),在距下端2 cm处作为基线点样。每块板各点三个样点:50 μL林可霉素标准溶液(5.14)、25 μL试样溶液(8.2)和25 μL林可霉素标准溶液、50 μL试样溶液,各点间距离应不小于1 cm。

8.3.3 展开

在两个展开槽内分别倒入10 mL展开剂1(5.12)和10 mL展开剂2(5.13),将点好样的两块薄层板分别置装有展开剂的展开槽中(不浸入展开剂中),预饱和2 h,再浸入展开剂中展开15 cm,取出,通风挥干。

8.3.4 显影

将展开后的薄层板放置在充满碘(5.7)蒸气的密闭容器内,注意观察,薄层板上的林可霉素标准溶液斑点逐渐显现直至清晰可见,取出薄层板立即观察。

8.4 观察与判定

比较薄层板上各斑点的位置以及颜色,判定方法如下:

- 在两块薄层板上,试样溶液在与标准溶液斑点对应处均无斑点出现,且混合加样点的斑点颜色比标准溶液斑点浅,判定试样中林可霉素阴性;
- 两块薄层板中,其中一块板上的试样溶液在与标准溶液斑点对应处无斑点出现,而另一块板出现斑点,判定试样中林可霉素阴性;
- 在两块薄层板上,如果试样溶液在与标准溶液斑点对应处均出现斑点,混合加样点只显现一个主斑点(与标准品溶液中最大的、颜色最重的斑点对应处)且所显现的斑点与标准溶液斑点的位置及颜色相同,可能判定林可霉素阳性,继续以下含量测定。

9 含量测定

9.1 菌悬液的制备

取藤黄微球菌(5.2)的营养琼脂斜面培养物,接种于盛有营养琼脂培养基(第A.4章)的培养瓶中,在26℃~27℃培养24 h,或采用适当方法制备的菌斜面。用0.9%灭菌氯化钠溶液(第A.1章)将菌苔洗下,置4℃冰箱保存(不宜超过两周)。

9.2 双碟的制备

取平板培养基(第A.5章)加热融化,冷却至50℃±1℃,加入适量菌悬液(9.1)(以参考浓度标准工作溶液所至抑菌圈直径在18.5 mm±2 mm为宜),必要时,每100 mL培养基中可加入50%葡萄糖溶液(第A.3章)2 mL,摇匀。每1个双碟(6.13)加入10 mL,均匀摊布,放置水平台上冷却,待培养基凝固后,将双碟倒置于4℃冷藏1 h以上。临用前取出,在每1个双碟内半径为2.8 cm圆周上等距离放置

6 个不锈钢小管(6.14)。

9.3 标准曲线的制备

9.3.1 标准工作溶液

量取林可霉素标准储备液(5.15),用磷酸盐缓冲液(pH7.8)稀释使成 0.15 u/mL、0.30 u/mL、0.60 u/mL、1.20 u/mL、2.40 u/mL 浓度的标准工作溶液。以 0.60 u/mL 为参考浓度标准工作溶液。

9.3.2 培养

取当天制备好的双碟(9.2)平均分为 5 组,标准工作溶液(9.3.1)每一浓度为 1 组。每一个双碟的 6 个不锈钢小管中,间位的 3 个滴加参考浓度标准工作溶液,另外 3 个滴加该组标准工作溶液,每组滴加至少 3 个双碟,于 36℃~37℃ 培养 16 h~18 h。

9.3.3 标准曲线

测量各组参考浓度标准工作溶液和该组标准工作溶液抑菌圈数值,分别计算平均值,再计算所有双碟参考浓度标准工作溶液抑菌圈的总均值,作为修正值。各浓度组的抑菌圈数值按式(1)修正:

$$A_s = B_s - B + A \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A_s ——该浓度标准工作溶液被修正后的抑菌圈数值;

B_s ——修正值;

B ——该浓度组中参考浓度标准工作溶液所至抑菌圈读数平均值;

A ——该浓度标准工作溶液抑菌圈读数平均值。

以各组溶液浓度的对数与该组溶液被修正后的抑菌圈数值作线性回归,求出回归方程。相关系数 r 应不小于 0.99。

9.4 试样溶液的制备

9.4.1 提取

称取 15 g 试样(7),精确至 10 mg,置 150 mL 锥形瓶中,准确加入 0.1 mol/L 盐酸-甲醇(5.9) 50 mL,振摇 30 min,转移至 100 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 5 min。

9.4.2 净化

准确量取离心管中的上清液(9.4.1)5 mL 到 125 mL 分液漏斗中,加入 0.5 mL 正己烷,5 mL 二氯甲烷,旋摇 30 s,弃去下层二氯甲烷,反复操作两次。

用氨溶液(5.10)调节分液漏斗中溶液的 pH 值至约 10(必要时可向溶液中加入一滴酚酞指示剂,帮助确认),加入 10 mL 二氯甲烷,旋摇提取 1 min,仔细分出下层二氯甲烷,反复操作三次。

9.4.3 试样溶液

合并二氯甲烷提取液于旋转蒸发器中,低于 30℃ 减压蒸干,量取磷酸盐缓冲液适量到蒸发瓶中,超声不少于 2 min,使残渣中的林可霉素完全溶出,准确定容(使溶液中林可霉素的浓度在 0.15 u/mL~2.40 u/mL 之间)制成试样溶液。于当天使用。

9.5 测定

取与标准曲线同时制备的至少 3 个双碟,按标准曲线的制备方法(9.3)分别滴加试样溶液(9.4.3)和参考浓度标准工作溶液,与标准曲线同时操作和培养。

10 判定与结果计算

10.1 判定

——试样溶液不产生抑菌圈,判定林可霉素阴性;

——试样溶液产生抑菌圈,判定林可霉素阳性并计算含量。

10.2 结果计算

用回归方程求出标准工作溶液参考浓度对应的抑菌圈数值作为修正值,按式(1)校正试样溶液抑菌

圈读数的平均值,再用回归方程求出试样溶液中林可霉素的实测浓度(c)。

试样中林可霉素的含量按式(2)计算:

$$W = \frac{c \times n}{m} \times 1000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

W ——试样中林可霉素的含量,单位为林可霉素效价单位每千克(μ/kg);

c ——试样溶液中林可霉素的实测浓度,单位为林可霉素效价单位每毫升(μ/mL);

n ——试样的稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留至整数位。

11 重复性

同一操作者对同一试样同时两次平行测定所得结果的相对偏差不大于20%。

附录 A
(规范性附录)
溶液及培养基的配置

A.1 0.9%灭菌氯化钠溶液

取氯化钠 9 g,加水使成 1 000 mL,滤过,分装,115℃灭菌 30 min。

A.2 磷酸盐缓冲液(pH7.8)

取磷酸氢二钾 5.59 g 与磷酸二氢钾 0.41 g,加水使成 1 000 mL,滤过,分装,115℃灭菌 30 min。

A.3 50%葡萄糖溶液

取葡萄糖 50 g,加水使成 100 mL,滤过,分装,100℃灭菌 20 min。

A.4 营养琼脂培养基

胨	10 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
肉浸液	1 000 mL

除琼脂外,混合上述成分,调节 pH 使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4,加入琼脂,加热溶化后滤过,调节 pH 值使灭菌后为 7.2~7.4,分装,115℃灭菌 30 min,趁热斜放使凝固成斜面。

A.5 平板培养基

胨	6 g
牛肉浸出粉	1.5 g
酵母浸出粉	6 g
葡萄糖	1 g
琼脂	15 g~20 g
水	1 000 mL

除琼脂和葡萄糖外,混合上述成分,调节 pH 使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4,加入琼脂,加热溶化后滤过,加葡萄糖溶解后,摇匀,调节 pH 值使灭菌后为 7.8~8.0,分装,115℃灭菌 30 min。

培养基可以采用相嗣成分的抗生素微生物检定培养基 II 《《中华人民共和国兽药典》2000 年版一部》)的干燥培养基代替,临时时,照使用说明配制和灭菌。