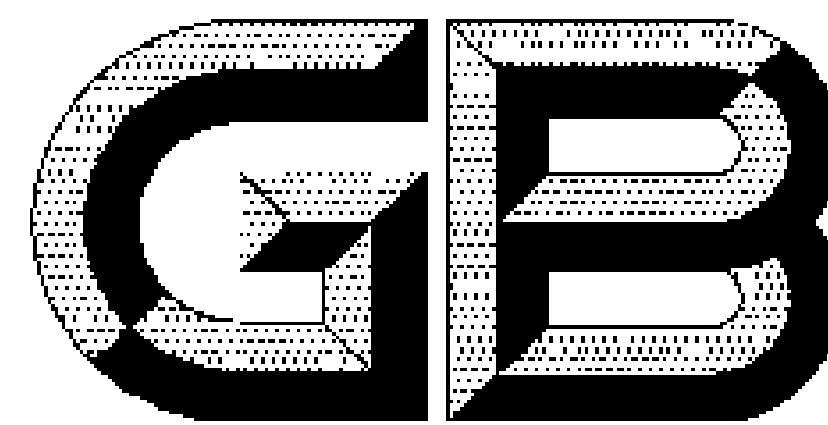




中华人民共和国国家标准

GB/T 20363—2006

饲料中苯巴比妥的测定

Determination of phenobarbital in feed

2006-06-09 发布

2006-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准系参阅国内外最新文献,经大量实验研究后结合我国现有技术装备水平,提出用高效液相色谱(HPLC)法定量,用气相色谱-质谱(GC-MS)法仲裁。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:国家饲料质量监督检验中心(武汉)。

本标准主要起草人:屈利文、钱昉、杨林、叶德连、钱沁。

SAC

饲料中苯巴比妥的测定

1 范围

本标准规定了以高效液相色谱(HPLC)仪和气相色谱-质谱(GC-MS)仪测定饲料中苯巴比妥的方法,规定 GC-MS 法为仲裁法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中苯巴比妥的测定。HPLC 法的最低检出量为 5.0 ng(取样 5 g 时,最低检测限为 0.10 mg/kg),GC-MS 法最低检出量为 0.25 ng(取样 5 g 时,最低检测限为 0.02 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(neq ISO 3696)

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 方法 1:HPLC 法

3.1 原理

用三氯甲烷将饲料中的苯巴比妥溶出,经净化、萃取、浓缩后,用甲醇溶解,在 HPLC 仪上分离测定。

3.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

3.2.1 水,GB/T 6682 中二级。

3.2.2 三氯甲烷。

3.2.3 甲醇。

3.2.4 氢氧化钠溶液[$c(\text{NaOH})$ 约 0.45 mol/L]:18 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 水中。

3.2.5 磷酸:85%。

3.2.6 HPLC 流动相: $V(\text{水})(3.2.1)+V(\text{乙腈})(\text{用前过 } 0.45 \mu\text{m 滤膜})=65+35$,用前超声脱气。

3.2.7 苯巴比妥标准溶液

3.2.7.1 储备液:准确称取 100.00 mg 苯巴比妥标准品(含 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$ 不少于 98.5%)于 50 mL 容量瓶中,用甲醇(3.2.3)溶解,并定容至刻度,该溶液为每毫升含苯巴比妥 2 000 μg 。储于冰箱中,有效期半年。

3.2.7.2 工作液:用微量移液器移取储备液(3.2.7.1)500 μL ,用甲醇(3.2.3)定容于 50 mL 容量瓶,该溶液为每毫升含苯巴比妥 20.00 μg ,储存于冰箱中备用。

3.2.7.3 标准系列:用移液器移取工作液(3.2.7.2)1.0、2.0、5.0、10.00、15.00 mL 于 50 mL 容量瓶,以甲醇(3.2.3)稀释定容,该标准溶液系列中苯巴比妥的相应浓度为 0.40、0.80、2.00、4.00、6.00 $\mu\text{g/mL}$,储存于冰箱中备用。

3.3 仪器与设备

3.3.1 实验室常用仪器设备。

3.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g。

3.3.3 实验用振荡器。

3.3.4 具塞三角瓶:100 mL。

3.3.5 分液漏斗:150 mL。

3.3.6 旋转蒸发器:带 100 mL、200 mL 梨形瓶。

3.3.7 高效液相色谱仪:具有 C₁₈柱或类似的分析柱和紫外(UV)检测器或二极管阵列检测器。

3.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 方法采样,选取饲料样品至少 500 g,四分法缩减至少 100 g,磨碎,通过 0.42 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,保存备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 提取

称取适量试样(配合饲料 5 g,预混料和浓缩料 2 g),精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 具塞三角烧瓶中,加入 25 mL 三氯甲烷(3.2.2)充分振摇,于振荡器上提取 30 min,过滤,滤渣返回瓶内,再用 25 mL 三氯甲烷重复上述操作两次,合并滤液用三氯甲烷定容到 100 mL。

3.5.2 净化及浓缩

移取 50 mL 三氯甲烷提取液(3.5.1)置于 200 mL 梨形烧瓶中,在旋转蒸发器(3.3.6)上于 50℃蒸干溶剂,残渣加 10 mL 氢氧化钠溶液(3.2.4),充分振荡后,用磷酸(3.2.5)酸化调 pH2~3 后,转入分液漏斗中,每次用 10 mL 三氯甲烷反提取共三次,弃去水相,将三次三氯甲烷提取液转入 150 mL 梨形烧瓶中,于旋转蒸发器上,蒸干溶剂。

3.5.3 测定

3.5.3.1 溶解

于净化、蒸干溶剂的残渣试样中准确加入 1.00 mL~2.00 mL(V)甲醇(3.2.3),充分振摇、超声,使残渣溶解,过 0.45 μm 的滤膜,清液上机测定,用苯巴比妥标准系列(3.2.7.3)进行单点或多点校准。

3.5.3.2 HPLC 测定参数设定

色谱柱:C₁₈柱,长 250 mm,内径 3.9 mm,粒度 4 μm,或类似的分析柱;

柱温:室温;

流动相:V(乙腈)+V(水)=35+65(见 3.2.6);

流速:1.0 mL/min;

检测器:UV 检测器或二极管阵列检测器;

检测波长:210 nm;

进样量:20 μL~50 μL。

3.5.3.3 定性、定量方法

定性方法:除用保留时间定性外,还可使用二极管阵列检测器测定苯巴比妥紫外光区的特征光谱。试样的特征光谱应与标准品的特征光谱一致(在相同的保留时间处)。

定量方法:积分记录峰面积,用单点或多点校准法定量。

3.6 分析结果的表述

3.6.1 试样中苯巴比妥的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{m_1}{m_2} \times \frac{100}{50} \times V \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——试样中苯巴比妥的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

m₁——HPLC 色谱峰的面积对应的苯巴比妥的质量,单位为微克(μg);

m₂——所称取的试样质量(3.5.1),单位为克(g);

V——溶解残渣的总体积,单位为毫升(mL)。

3.6.2 每个试样取两份试料进行平行测定,以其算术平均值为测定结果,保留三位有效数字。

3.7 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大于这两个测定值的算术平均值的 20%,以大于这两个测定值的算术平均值的 20%情况不超过 5%为前提。

4 方法 2:GC-MS 法(仲裁法)

4.1 原理

用三氯甲烷将饲料中的苯巴比妥溶出,经净化、萃取、浓缩后,在 GC-MS 联用仪上分离、测定。

4.2 试剂和材料

4.2.1 提取净化用试剂

同 HPLC 法中 3.2.1~3.2.5。

4.2.2 苯巴比妥标准溶液

4.2.2.1 储备液:2 000 $\mu\text{g/mL}$,同 HPLC 法中 3.2.7.1。

4.2.2.2 工作液:20.00 $\mu\text{g/mL}$,同 HPLC 法中 3.2.7.2。

4.2.2.3 标准系列:用微量移液器分别移取工作液(4.2.2.2)125、250、500、1 000、2 500 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.2.3)稀释定容,该标准系列中苯巴比妥的相应浓度分别为:0.25、0.50、1.00、2.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$,贮于冰箱中备用。

4.3 仪器、设备

4.3.1 样品前处理设备同 HPLC 法 3.3.1~3.3.6。

4.3.2 GC-MS 联用仪:装有弱极性或非极性的交联毛细管柱的气相色谱仪和具电子轰击离子源及检测器。

4.4 试样制备

同 3.4。

4.5 分析步骤

4.5.1 提取

同 3.5.1。

4.5.2 净化及浓缩

同 3.5.2。

4.5.3 测定

4.5.3.1 溶解

同 3.5.3.1。

4.5.3.2 GC-MS 测定参数设定

色谱柱:弹性石英键合相毛细管色谱柱 SE-54,长 30 m,直径 0.25 mm,壁厚 0.25 μm ;

载气:氦气(99.999%);

柱头压:100 kPa;

进样口温度:260℃;

进样量:1 μL 不分流;

柱温程序:120℃保持 1 min,以 20℃/min 的速度升至 260℃,于 260℃保持 15 min;

EI 源电子轰击能:70 eV;

离子源温度:200℃;

接口温度:250℃;

质量扫描范围:60 AMU~250 AMU;

溶剂延迟:2 min;

特征质谱峰： m/z 为 89、117、204、232。

4.5.3.3 定性定量方法

定性方法：试样与标准品质谱特征峰对照可信度大于 90%。

定量方法：单点或多点色谱峰面积校准法定量。

4.6 分析结果的表述

4.6.1 苯巴比妥的含量按式(2)计算：

$$X = \frac{m_1}{m_2} \times \frac{100}{50} \times V \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X——试样中苯巴比妥的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

m_3 ——GC-MS 色谱峰的面积对应的苯巴比妥的质量，单位为微克(μg)；

m_4 ——所称取的试样质量(4.5.1)，单位为克(g)；

V——溶解残渣的总体积，单位为毫升(mL)。

4.6.2 每个试样取两份试料进行平行测定，以其算术平均值为测定结果，保留三位有效数字。

4.7 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大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于这两个测定值的算术平均值的 20%情况不超过 5%为前提。

