



中华人民共和国国家标准

GB/T 22146—2008

饲料中洛克沙肿的测定 高效液相色谱法

Determination of roxarsone in animal feeds—
High performance liquid chromatography

2008-06-27 发布

2008-10-01 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。

本标准负责起草单位：中国农业大学、农业部饲料效价与安全监督检验测试中心（北京）。

本标准主要起草人：张丽英、王金荣、杨文军、王宗义。

饲料中洛克沙肿的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱法测定饲料中洛克沙肿的含量。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中洛克沙肿的测定。

本标准定量限为 5 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(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 原理

用磷酸氢二钾溶液作为提取液,用复合阴离子交换柱萃取柱净化后,经反相 C_{18} 柱分离,采用紫外检测器检测,根据洛克沙肿的色谱峰保留时间进行定性,以外标法进行定量分析。

4 试剂和溶液

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯。水为符合 GB/T 6682 二级用水规定。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 磷酸氢二钾溶液(20 g/L):称取 20 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)用水溶解,并定容至 1 000 mL。

4.3 硫酸铜溶液(100 g/L):称取 10 g 硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)用水溶解,并定容至 100 mL。

4.4 固相萃取小柱淋洗液与洗脱液

4.4.1 淋洗液 1:6.80 g/L 乙酸钠-甲醇溶液。称取 6.80 g 乙酸钠($Na_2C_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$)于烧杯中,加入 800 mL 水溶解,用 10% 乙酸调 pH 至 7,加入 53 mL 甲醇,定容至 1 000 mL,4℃ 贮存。

4.4.2 淋洗液 2:无水甲醇。

4.4.3 洗脱液:5% 甲酸甲醇溶液,吸取 5 mL 甲酸,用无水甲醇定容至 100 mL。

4.5 流动相

4.5.1 A 液:含 0.1% 甲酸的 6.98 g/L 磷酸二氢钾溶液,称取 6.98 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)于烧杯中,用水溶解,加入 1 mL 甲酸溶液,并定容至 1 000 mL。

4.5.2 B 液:无水甲醇。

4.6 洛克沙肿标准溶液

4.6.1 标准贮备液:准确称取洛克沙肿标准品(含量 $\geq 99\%$)500 mg,置于 1 000 mL 棕色容量瓶中,用磷酸氢二钾溶液(4.2)超声溶解,配制成 500 μ g/mL 标准贮备液,贮于 4℃ 冰箱中。

4.6.2 标准工作液:吸取标准贮备液(4.6.1)0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别至 50 mL 棕色容量瓶中,并用磷酸氢二钾溶液(4.2)稀释至刻度,摇匀。其浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μ g/mL 的标准工作液。

5 仪器、设备

- 5.1 分析天平：感量为 0.000 1 g。
- 5.2 离心机：转速能达 3 000 r/min~4 000 r/min。
- 5.3 固相萃取(SPE)装置。
- 5.4 恒温水浴和氮吹仪。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 复合阴离子固相萃取小柱。
- 5.7 高效液相仪(配有紫外检测器)。
- 5.8 超声波仪。

6 试样制备

按照 GB/T 14699.1 规定方法采样,采取样品量至少 500 g,以四分法缩减至 200 g,粉碎过孔径 0.45 mm 目筛,充分混匀,装瓶,备用。

7 分析步骤

7.1 试样溶液的准备

7.1.1 提取

准确称取适量试样(配合饲料 5 g,浓缩饲料 2 g,添加剂预混合饲料 1 g,准确至 0.000 1 g)于 50 mL 离心管中,加磷酸氢二钾溶液(4.2)40 mL,盖好管盖,充分振摇后,在 60 ℃ 超声水浴上提取 30 min,然后于离心机以 4 000 r/min 离心 10 min。上清液倒入 100 mL 棕色容量瓶中,残渣再分别用上述提取剂 30 mL、20 mL 重复提取 2 次,每次 15 min,离心后合并上清液于 100 mL 棕色容量瓶中,然后加硫酸铜溶液(4.3)2 mL,并用磷酸氢二钾溶液(4.2)稀释至刻度,摇匀,过滤,滤液待用。

浓缩饲料和添加剂预混合饲料的滤液需分别做 2 倍和 5 倍稀释。

7.1.2 净化

将固相萃取柱(5.6)固定于 SPE 系统(5.3)上,依次用 1.0 mL 甲醇和 1.0 mL 水活化、平衡 SPE 小柱(5.6)。吸取 7.1.1 得到的样品提取滤液 1 mL 加到 SPE 小柱上,控制过柱流速不超过 1.0 mL/min,然后依次用乙酸钠-甲醇溶液(4.4.1)和无水甲醇溶液(4.4.2)各淋洗一次,最后用 1.0 mL 洗脱液(4.4.3)洗脱,洗脱速度不超过 1.0 mL/min。洗脱液于 65 ℃ 水浴中以氮气吹干,准确加入 1.0 mL 磷酸氢二钾溶液(4.2)充分溶解混匀,并转移到样品瓶中,盖好,待用。

7.2 色谱条件

- 7.2.1 色谱柱:具有 C₁₈ 填料的柱子(粒径为 3 μm),内径 3.9 mm,柱长 150 mm。
- 7.2.2 流动相:A 液(4.5.1)+B 液(4.5.2)=95+5(体积比),以 1.0 mL/min 流速洗脱。
- 7.2.3 进样体积:20 μL。
- 7.2.4 检测器:紫外检测器(或二极管矩阵检测器),检测波长 266 nm。

7.3 定量方法

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数。向色谱柱中注入洛克沙肿标准工作液(4.6.2)及试样溶液(7.1.2),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量。

8 结果计算与表述

- 8.1 试样中洛克沙肿含量(w)以质量分数计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按照式(1)计算。

$$w = \frac{\rho}{m} \times K \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——根据标准曲线计算的上机试样溶液中洛克沙肿含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m ——试样质量,单位为克(g);

K ——稀释倍数。

8.2 测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 重复性

同一实验室同一操作人员使用同一台仪器完成的两个平行测定的相对偏差不大于 10%。
