

中华人民共和国国家标准

农业部 1629 号公告 — 2 — 2011

饲料中利血平的测定 高效液相色谱法

Determination of reserpine in feeds
High-performance liquid chromatography

2011-08-17 发布

2011-08-17 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)。

本标准主要起草人:李云、赵立军、柏凡、王艳、林顺全。

饲料中利血平的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中利血平含量的高效液相色谱法检测方法。
本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中的利血平测定。
本标准的检测限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 14699.1 饲料采样
GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料中的利血平经提取液提取、离心后, 取部分上清液过 PCX 固相萃取柱净化, 用高效液相色谱仪—荧光检测器检测。外标法计算其含量。

4 试剂和材料

除非另有说明, 在分析中仅使用分析纯的试剂。

- 4.1 色谱分析用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。
- 4.2 甲醇: 色谱纯。
- 4.3 乙酸。
- 4.4 乙腈: 色谱纯。
- 4.5 氨水: 浓度为 25%~28%。
- 4.6 乙酸乙酯。
- 4.7 乙酸铵: 色谱纯。
- 4.8 乙酸铵缓冲液(5 mmol/L): 称取 0.38 g 乙酸铵(4.7), 溶解于 1 000 mL 水中, 加入 1.0 mL 乙酸, 并用适量乙酸调 pH 至 4.2。
- 4.9 利血平标准溶液储备液: 准确称取适量利血平标准品(纯度 $\geq 95\%$), 用乙腈(4.4)溶解、定容至 100 mL, 此储备液浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 密封贮于 -20°C 冰箱内, 有效期为 1 个月。
- 4.10 标准工作溶液: 分别准确移取利血平标准溶液储备液, 用乙腈(4.4)配制成标准工作溶液: 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。现配现用。
- 4.11 氨化乙腈溶液: 氨水(4.5)+乙腈(4.4)=10+90(V+V)。
- 4.12 提取液: 乙酸(4.3)+乙酸乙酯(4.6)=5+95(V+V)。
- 4.13 PCX 阳离子固相萃取柱(60 mg/3 mL)或性能相当者。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室用样品粉碎机。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg。
- 5.3 离心机:转速为 5 000 r/min 以上。
- 5.4 超纯水器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 涡旋混合器。
- 5.7 振荡器。
- 5.8 密封盖塑料离心管:50 mL。
- 5.9 固相萃取装置。
- 5.10 高效液相色谱仪:配备荧光检测器。
- 5.11 氮吹仪。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定采集试样后,按 GB/T 20195 的规定选取具有代表性的实验室样品 1 kg,四分法缩减分取 200 g,粉碎过 1 mm 孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 准确称取配合饲料样品 4 g(精确到 0.01 g),置于离心管(5.8)中,向试料中加入提取液(4.12) 20.0 mL,涡旋振荡 2 min。然后,将离心管(5.8)置于振荡器(5.7)上振荡 10 min,离心机(5.3)上以 5 000 r/min 离心 5 min,上清液待用。

7.1.2 准确称取添加剂预混合饲料或浓缩饲料样品 1 g~2 g(精确到 0.01 g),置于离心管(5.8)中,向试料中加入提取液(4.12) 40.0 mL,涡旋振荡 2 min。然后,将离心管(5.8)置于振荡器(5.7)上振荡 10 min,离心机(5.3)上以 5 000 r/min 离心 5 min,上清液待用。

7.2 SPE 柱净化

依次用 3 mL 甲醇(4.2)、3 mL 水活化 PCX 小柱(4.13),精确吸取提取液 2.0 mL 过此小柱(流速<1.0 mL/min)。再依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇(4.2)淋洗,抽近干后用氯化乙腈(4.11) 5 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管内,在 50℃水浴中氮气吹干,残余物用 1.00 mL 乙腈(4.4)定容,涡旋混合 1 min,过 0.45 μm 滤膜作为试样制备液,供高效液相色谱测定。

7.3 高效液相色谱条件

检测波长:激发波长为 280 nm,发射波长为 360 nm。

色谱柱:C₁₈柱,5 μm,250 mm×4.6 mm;或性能类似的色谱柱。

流动相:乙酸铵缓冲液+乙腈=60+40(V+V)。

流速:1.0 mL/min。

柱温:25℃。

进样量:20 μL。

7.4 高效液相色谱测定

取适量试样制备液(7.2)和相应浓度的标准工作溶液(4.10),作单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。10.0 μg/mL 利血平标准液相色谱图参见附录 A。当分析物浓度不在线性范围内时,应将分

析物稀释或者浓缩后再进行检测。

8 计算结果

8.1 饲料中利血平的含量 X , 以毫克每千克(mg/kg)表示, 单点校正按式(1)计算:

$$X = \frac{P_i \times C_s \times V_s \times n}{P_s \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_i ——试样溶液峰面积值;

C_s ——标准溶液浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_s ——标准溶液进样体积, 单位为微升(μL);

P_s ——标准溶液峰面积值;

m ——称取饲料的质量, 单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积, 单位为微升(μL);

n ——稀释倍数。

多点校正按式(2)计算:

$$X = \frac{C_x \times n}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_x ——标准曲线上查得的试样中利血平的浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m ——称取饲料的质量, 单位为克(g);

n ——稀释倍数。

8.2 按平行测定的算术平均值报告结果, 计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

在同一实验室, 由同一操作人员完成的两个平行测定结果, 相对偏差不大于 10%。

9.2 再现性

在不同的实验室, 由不同的操作人员用不同的仪器设备完成的测定结果, 相对偏差不大于 20%。

附 录 A
(资料性附录)

10.0 $\mu\text{g/mL}$ 利血平标准液相色谱图

