

中华人民共和国国家标准

农业部 1486 号公告 — 9 — 2010

饲料中氯烯雌醚的测定 高效液相色谱法

Determination of chlorotrianisene in feeds—
High-performance liquid chromatography

2010-11-16 发布

2010-11-16 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:柏凡、赵立军、高庆军、赵彩会、张自强、廖峰、冯娅。

饲料中氯烯雌醚的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了测定饲料中氯烯雌醚含量的高效液相色谱法(HPLC)。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料。

本标准的检测限为 0.1 mg/kg,定量限为 0.3 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

用乙腈从饲料中提取氯烯雌醚,离心后取上清液经过 C_{18} 固相萃取小柱净化,用高效液相色谱仪—紫外检测器在 307 nm 处测定。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 乙腈:色谱纯。

4.4 25%氨水。

4.5 流动相:甲醇+水=82+18。

4.6 氯烯雌醚储备液:准确称取适量氯烯雌醚标准品(纯度 $\geq 95\%$),用甲醇(4.2)溶解、定容至 100 mL。此贮备液浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,密封贮于 4℃冰箱内,有效期为一个月。

4.7 氯烯雌醚中间液:准确移取适量氯烯雌醚储备液(4.6)配制,保存于 4℃冰箱内,有效期为一周。

4.8 标准工作溶液:分别准确移取氯烯雌醚储备液和中间液,用甲醇(4.2)配制成标准工作溶液:0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。现配现用。

4.9 淋洗液的配制:25%氨水(4.4)+水(一级)=5+95。

4.10 C_{18} 固相萃取小柱:200 mg/3 mL。

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:配备紫外检测器。
- 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 左右,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

准确称取配合饲料 5 g、浓缩饲料或添加剂预混合饲料称取 2 g(精确到 0.01 g),置于离心管(5.8)中,加入提取液乙腈(4.3)10.0 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 20 min,然后在离心机(5.3)上以 5 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液于另一具塞试管中,待净化。

7.2 SPE 柱净化

每一试样各准备一只 C₁₈ 小柱(4.10),依次用 3 mL 甲醇(4.2)、3 mL 蒸馏水、3 mL 甲醇(4.2)活化。将提取液(7.1)3.0 mL 与等体积的蒸馏水混合均匀后,吸取 5.0 mL 过此小柱(流速<1.0 mL/min)。用 6 mL 淋洗液(4.9)淋洗,最后用 3 mL 甲醇(4.2)洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管内,洗脱液于 50℃ 下用氮气吹干,残余物用 1.0 mL 甲醇(4.2)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 HPLC 测定参数的设定

检测器:紫外检测器,检测波长:307 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:甲醇+水=82+18;

流速:1.0 mL/min;

柱温:30℃;

进样量:20 μL。

7.4 HPLC 测定

取适量试样制备液(7.2)和相应浓度的标准工作溶液(4.8),作单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。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 定性

8.1 总则

如果从峰形、测定数值对氯烯雌醚的峰产生怀疑,则必须用二极管阵列检测器(8.2)来定性。

8.2 二极管阵列检测器

8.2.1 条件

色谱测定条件同 7.3 的规定,只是将紫外检测器换为二极管阵列检测器,具体参数如下:

参 数	设 定
测定波长	307 nm
频带宽度	4 nm[即波长(307±2) nm]
参比波长	450 nm
参比频带宽度	100 nm
光谱范围	200 nm~400 nm
光谱值	基线、峰最大值、上升拐点斜率和下降拐点斜率

8.2.2 步骤

HPLC 系统稳定后,依次注入适量浓度的氯烯雌醚标准工作溶液(4.8)、有疑问的试样制备液(7.2)和又一适量浓度的氯烯雌醚标准工作溶液(4.8)。记录、存储各个色谱峰的基线、最大值以及峰两侧的拐点数据。

8.2.3 评价

将试样色谱峰不同光谱值归一化并绘制成图,记录峰值和峰前后的拐点值。分别将试样峰光谱和氯烯雌醚标准系列溶液的光谱归一化,并绘图,在峰顶处标示。

8.2.4 定性标准

样品峰只有满足下列条件才能证实是氯烯雌醚:

- 样品峰的保留时间应与标准峰的保留时间相同(差异≤±5%)。
- 样品峰的纯度评定是基于所记录的峰顶、上升拐点斜率和下降拐点斜率不同光谱的符合程度。所有光谱图每个波长的相对吸收值应该相等(差异≤±15%)。
- 样品峰和标准峰的最大吸收波长应该相同,即其差异不大于检测系统分辨率决定的范围(一般是 2 nm~4 nm),两个光谱图任意观察点的偏差均不能超过该特定波长下标准测定物吸收值的 15%。

9 计算结果

9.1 饲料中氯烯雌醚的含量 X,以质量分数(mg/kg)表示,按下列式(1)计算:

$$X = \frac{P_i \times C_s \times V_s \times V}{P_s \times m \times V_i \times 2.5} \dots\dots\dots (1)$$

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);
 V ——提取液体积,单位为毫升(mL);
 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)。

9.2 按平行测定的算数平均值报告结果,计算结果保留三位有效数字。

10 精密度

10.1 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%;以两次平行测定结果的平均值为测定结果。

10.2 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)
氯烯雌醚标准色谱图和光谱图

A. 1 氯烯雌醚标准色谱图见图 A. 1。

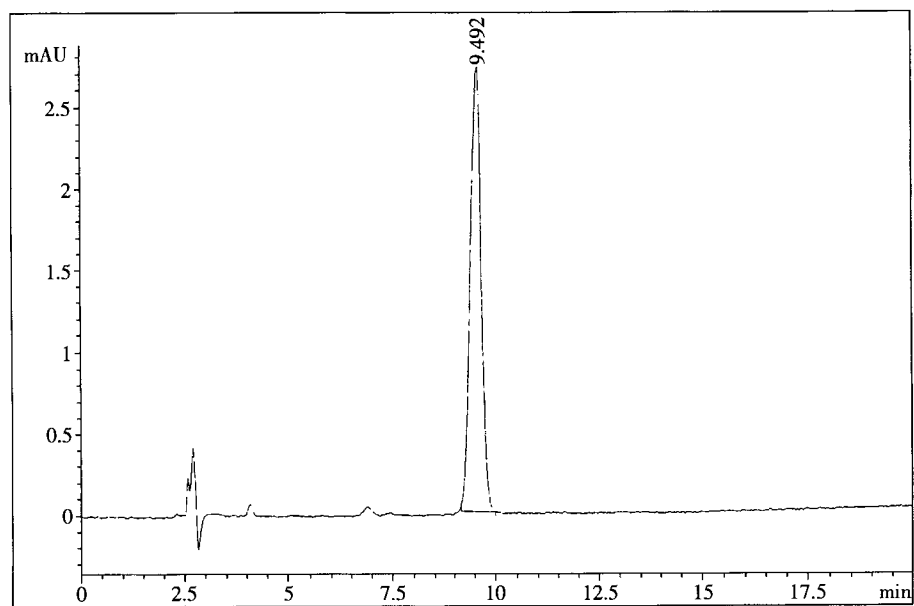


图 A. 1 氯烯雌醚标准色谱图

A. 2 氯烯雌醚标准光谱图见图 A. 2。

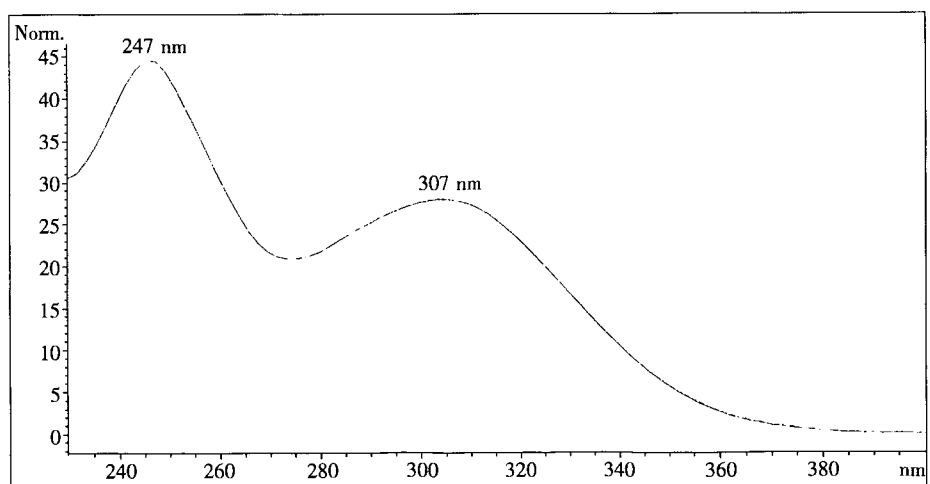


图 A. 2 氯烯雌醚标准光谱图