

中华人民共和国国家标准

农业部 1862 号公告—6—2012

饲料中噁嗉酸的测定 高效液相色谱法

Determination of oxolinic acid in feeds—
High performance liquid chromatography

2012-12-03 发布

2012-12-03 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由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:中国农业大学。

本标准主要起草人:沈建忠、张素霞、程林丽、江海洋、吴聪明、王战辉、曹兴元。

饲料中噁嗉酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中噁嗉酸的高效液相色谱分析方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中噁嗉酸含量的测定。

本标准噁嗉酸的定量限为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

3 方法原理

饲料中的噁嗉酸经乙酸乙酯提取,正己烷脱脂后,用液相色谱—荧光检测法测定,外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用试剂,除特殊注明外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 标准品:噁嗉酸(Oxolinic Acid, OA) $\geq 99.7\%$ 。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 氢氧化钠。
- 4.5 无水硫酸钠。
- 4.6 乙酸乙酯。
- 4.7 正己烷。
- 4.8 磷酸。
- 4.9 噁嗉酸标准液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取适量的噁嗉酸,用 0.03 mol/L NaOH 溶解配成 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。4℃保存,有效期 12 个月。
- 4.10 噁嗉酸标准液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确量取适量的 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 噁嗉酸标准液,用甲醇稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。4℃保存,有效期 6 个月。
- 4.11 噁嗉酸标准液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确量取适量的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 噁嗉酸标准液,用甲醇稀释成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液。4℃保存,有效期 6 个月。
- 4.12 噁嗉酸标准工作液:量取适量 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 噁嗉酸标准液,用 0.02 mol/L 磷酸依次稀释成浓度为 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL、500 ng/mL 的标准工作液。现配现用。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱:配荧光检测器。
- 5.2 水平摇床。
- 5.3 涡动仪。

- 5.4 旋转蒸发仪。
- 5.5 离心机。
- 5.6 天平:感量 0.01 g。
- 5.7 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.8 移液器:10 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L。
- 5.9 一次性注射器:1 mL。
- 5.10 0.45 μ m 有机滤膜。

6 试样制备

取 500 g 样品,四分法缩减取约 50 g。经粉碎,全部过 40 目孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 样品前处理

称取配合饲料 2 g(或浓缩饲料、预混合饲料 1 g,精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加无水硫酸钠 2 g,加乙酸乙酯 10 mL,300 r/min 振荡 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液至鸡心瓶。残渣用 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次,合并两次上清液。50℃旋蒸至干,加入 0.02 mol/L 磷酸溶液 0.8 mL、1.6 mL 正己烷溶解,转入 10 mL 离心管中,于 3 000 r/min 离心 10 min,取下层清液,定容至 1.0 mL,过 0.45 μ m 有机滤膜后供高效液相色谱分析。

7.2 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,250 mm $\times$ 4.6 mm(i. d.),粒径 5 μ m;或相当者。

柱温:室温。

流动相:0.02 mol/L 磷酸溶液—乙腈—四氢呋喃(69+16+15)。

流速:0.8 mL/min。

进样体积:20 μ L。

激发波长:325 nm。

发射波长:369 nm。

7.3 测定方法

分别取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,作单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内,试样液进样测定过程中应参插标准工作液,以便准确定量。试样液浓度不在线性范围内时将样品稀释后进样。标准品液相色谱图参见图 A.1。

8 结果计算和表示

8.1 结果计算

试样中噻嗪酸含量 X ,以质量分数微克每千克(μ g/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C ——试样液中对应的噻嗪酸的浓度,单位为微克每升(μ g/L);

V ——溶解残留物所用溶剂的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数,试样液浓度不在线性范围内时进样前稀释的倍数。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 15%。

附 录 A
(资料性附录)
噁嗪酸标准溶液质量色谱图

噁嗪酸标准溶液色谱图见图 A. 1。

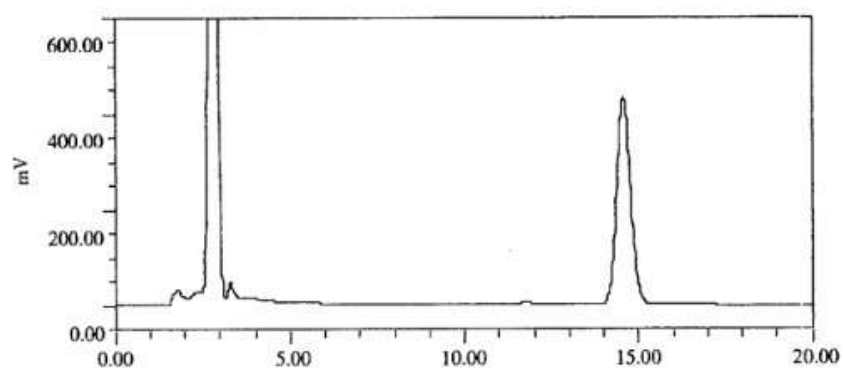


图 A. 1 噁嗪酸标准溶液色谱图