

中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—2—2014

饲料中醋酸氯地孕酮的测定 高效液相色谱法

Determination of chlormadinone acetate in feeds—
High performance liquid chromatography

2014-04-01 发布

2014-07-01 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—2009 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:北京市兽药监察所、北京市饲料监察所。

本标准主要起草人:怀文辉、孙志文、左文霞、冯秀燕、赵莹、李月、邓程君、贾涛、卢光菊、李志宏、魏秀莲。

饲料中醋酸氯地孕酮的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中醋酸氯地孕酮含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、精料补充料中醋酸氯地孕酮含量的测定。

本方法检测限为 0.1 mg/kg,定量限为 0.2 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

试样中醋酸氯地孕酮用乙腈提取, C₁₈ 固相萃取柱净化, 乙腈洗脱, 吹干后以流动相溶解, 高效液相色谱法测定, 外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用的试剂, 除特别注明者外均为分析纯试剂; 水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 40% 甲醇水溶液: 取甲醇 40 mL, 加水稀释至 100 mL。

4.4 醋酸氯地孕酮对照品: 纯度大于 98.5%。

4.5 醋酸氯地孕酮标准储备液: 准确称取醋酸氯地孕酮对照品适量, 用甲醇溶解并定容, 配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃ 保存, 有效期为 3 个月。

4.6 醋酸氯地孕酮标准工作液: 准确量取适量标准储备液(4.5), 用流动相定容至适当的容量瓶中, 配制成浓度为 0.2 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的标准工作液。现用现配。

4.7 HLB 固相萃取柱(亲水亲脂平衡固相萃取柱): 200 mg/6 mL 或相当者。

4.8 微孔滤膜: 0.45 μm。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器或二极管阵列检测器)。

5.2 涡旋振荡器。

5.3 离心机。

5.4 氮吹仪。

5.5 分析天平:感量 0.1 mg。

5.6 天平:感量 0.01 g。

5.7 固相萃取装置。

6 采样和试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样,按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样 2 g(精确到 0.01 g),至 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈,涡旋震荡 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液。残留物用 10 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液,50℃下氮气吹干至约 2 mL,涡旋震荡 30 s,加入 4 mL 水,混匀,作为备用液。

7.2 净化

HLB 固相萃取柱依次用甲醇、水各 5 mL 活化,取全部备用液过柱,依次用水、40%甲醇水溶液(4.3)各 5 mL 淋洗,抽干,用 10 mL 乙腈洗脱。洗脱液在 50℃下氮气吹干后,准确加入 2 mL 流动相,涡旋溶解,过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 250 mm,柱内径 4.6 mm,粒度 5 μm;或相当者。

流动相:乙腈+水=53+47。

流速:1.0 mL/min。

进样量:20 μL。

柱温:30℃。

检测波长:285 nm。

检测器:紫外检测器或二极管阵列检测器。

7.3.2 标准曲线的制备

在上述色谱条件下,取醋酸氯地孕酮系列标准工作液(4.6)供高效液相色谱仪测定,以色谱峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,制备标准曲线。

7.3.3 测定

分别注入醋酸氯地孕酮标准工作液(4.6)和试样溶液进行测定。用液相色谱保留时间定性,选取标准工作溶液中合适的点做单点校准,以色谱峰的峰面积进行定量计算。标准色谱图参见附录 A。

8 计算与表示

8.1 结果计算

试样中醋酸氯地孕酮含量 X 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中醋酸氯地孕酮的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——试样溶液中醋酸氯地孕酮的峰面积;

A_s ——标准工作液中醋酸氯地孕酮的峰面积;

C_s ——标准工作液中醋酸氯地孕酮浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于平均值的 15%。

附 录 A
(资料性附录)
醋酸氯地孕酮标准品色谱图

醋酸氯地孕酮标准品色谱图见图 A. 1。

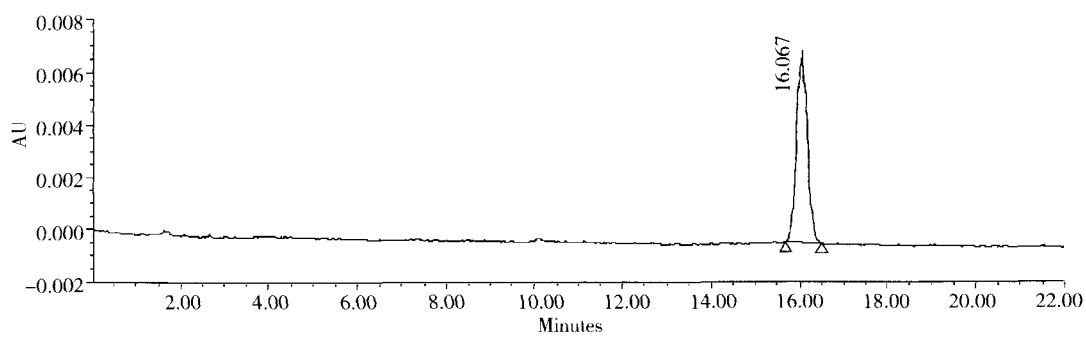


图 A. 1 醋酸氯地孕酮标准品(0.5 $\mu\text{g/mL}$)色谱图