

中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—3—2014

饲料中匹莫林的测定 高效液相色谱法

Determination of pemoline 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:河南省兽药监察所。

本标准主要起草人:班付国、张发旺、吴宁鹏、彭丽、李慧素、杜红鸽、谭旭信、刘占通、方忠意。

饲料中匹莫林的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中匹莫林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、添加剂预混合饲料和精料补充料中匹莫林的测定。

本方法检测限为 1.0 mg/kg, 定量限为 2.0 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

用乙醇提取样品中的匹莫林, 浓缩至干后用甲醇水溶解, HLB 固相萃取柱及中性氧化铝柱净化, 高效液相色谱法测定, 内标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外, 本法所用试剂均为分析纯; 水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 匹莫林对照品: 纯度 $\geq 98\%$ 。

4.2 5-甲基-5-苯海因(内标): 纯度 $\geq 99\%$ 。

4.3 乙腈: 色谱纯。

4.4 甲醇: 色谱纯。

4.5 乙醇。

4.6 10%乙腈溶液: 取乙腈(4.3)10 mL, 加水 90 mL, 混匀。

4.7 90%甲醇溶液: 取甲醇(4.4)90 mL, 加水 10 mL, 混匀。

4.8 50%甲醇溶液: 取甲醇(4.4)50 mL, 加水 50 mL, 混匀。

4.9 HLB 固相萃取柱: 规格为 500 mg/6mL, 或相当者。

4.10 中性氧化铝柱: 规格为 500 mg/3 mL。

4.11 标准储备液(1 mg/mL): 精密称取匹莫林对照品(4.1)适量, 置于容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液。于 -18°C 下保存, 有效期为 6 个月。

4.12 标准中间液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确吸取标准储备液(4.11)2 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀。于 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期为 1 个月。

4.13 内标储备液(1 mg/mL): 精密称取 5-甲基-5-苯海因(4.2)适量, 置于容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液。

4.14 内标中间液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确吸取内标储备液(4.13)2 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液

稀释至刻度。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。
- 5.2 分析天平:感量 0.01 mg。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 离心机。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 水平振荡器。
- 5.7 超声水浴。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 氮吹仪。

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 GB/T 20195 规定的方法制备样品,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 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入内标储备溶液(4.13)100 μ L。准确加入乙醇(4.5)25.0 mL,涡旋混合后振荡 10 min,超声提取 10 min,8000 r/min 离心 5 min,移取上清液至另一离心管中。残渣加入乙醇 25.0 mL 重复提取一次,合并上清液。准确移取上清液 10.0 mL 于 15 mL 离心管中,于 50 $^{\circ}$ C 下氮气吹干。残余物用甲醇 0.5 mL 涡旋溶解,再加入水 4.5 mL,超声 5 min,涡旋混匀,备用。

7.2 净化

HLB 固相萃取柱(4.9)依次用甲醇和水各 5 mL 活化,移取备用液(7.1)过柱。依次用水和 10%乙腈溶液(4.6)各 5 mL 淋洗,抽干。将预先用甲醇 3 mL 活化好的中性氧化铝柱(4.10)串接在 HLB 固相萃取柱下方。用 90%甲醇溶液(4.7)5 mL 洗脱,收集洗脱液,于 50 $^{\circ}$ C 下氮气吹干。准确加入 50%甲醇水溶液(4.8)1.0 mL,超声 2 min,混匀后过 0.22 μ m 微孔滤膜,供 HPLC 测定。

7.3 标准曲线的制备

准确量取匹莫林标准中间液及内标中间液适量,用 50%甲醇水溶液稀释,制得浓度为 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL 和 100 μ g/mL 的系列标准工作溶液(内标均为 20 μ g/mL),由低浓度到高浓度进高效液相色谱仪测定。以色谱峰面积比为纵坐标、浓度为横坐标,绘制标准曲线。匹莫林标准溶液色谱图参见附录 A。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μ m;或相当者。

流动相:水+乙腈=85+15。

检测波长:216 nm。

柱温:30 $^{\circ}$ C。

流速:1.0 mL/min。

进样量:20 μ L。

7.4.2 定量测定

取试样溶液和标准工作液上机分析,得到色谱峰面积响应值,做单点或多点校准,用内标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液浓度超过线性范围时,用 50% 甲醇稀释后重新测定。

8 结果计算

试样中匹莫林含量 X_i 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X_i = \frac{C_s \times C_i \times A \times A_s \times V \times V_2}{C_s \times A_s \times A_i \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_s ——匹莫林标准工作溶液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

C_s ——匹莫林标准工作溶液中内标的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

C_i ——试样溶液中内标的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A ——试样溶液中匹莫林的峰面积;

A_s ——匹莫林标准工作溶液的峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的峰面积;

A_s ——匹莫林标准工作溶液中内标物的峰面积;

m ——样品的质量,单位为克(g);

V ——溶解残余物所得溶液体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——过固相萃取柱的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液总体积,单位为毫升(mL)。

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的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)
匹莫林标准溶液色谱图

匹莫林标准溶液色谱图见图 A.1。

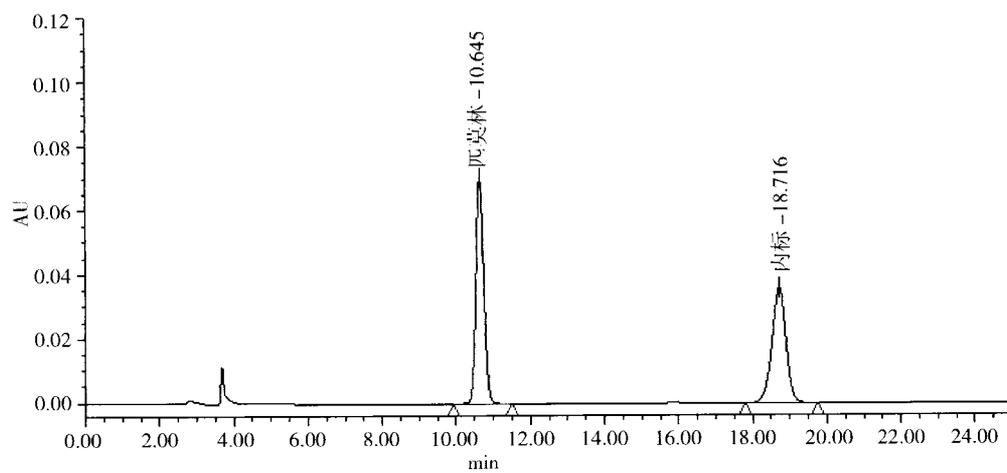


图 A.1 匹莫林标准溶液色谱图(5 µg/mL)