

中华人民共和国国家标准

农业部 2483 号公告—2—2016

饲料中苯巴比妥钠的测定 高效液相色谱法

Determination of phenobarbital sodium in feeds—
High performance liquid chromatography

2016-12-23 发布

2017-04-01 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:农业部饲料质量监督检验测试中心(济南)。

本标准主要起草人:李俊玲、张芸、赵学峰、李宏、孙延军、李斌。

饲料中苯巴比妥钠的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中苯巴比妥钠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、精料补充料和添加剂预混合饲料中苯巴比妥钠的测定。

本标准的检出限为 0.5 mg/kg,定量限为 1 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

农业部 2483 号公告—4—2016 饲料中苯巴比妥钠的测定 液相色谱—串联质谱法

3 原理

试样中苯巴比妥钠在酸性条件下转化为苯巴比妥,经提取、净化和浓缩后,高效液相色谱仪测定,外标法定量。根据测得的苯巴比妥含量计算苯巴比妥钠含量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯和符合 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 正己烷。

4.4 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.5\text{ mol/L}$ 。吸取 42 mL 盐酸,用水稀释并定容至 1 000 mL。

4.5 乙酸铅溶液:22 g/L。称取 22 g 乙酸铅,用约 300 mL 水溶解并定容至 1 000 mL。

4.6 2%甲醇水溶液:取 2 mL 甲醇,用水定容至 100 mL。

4.7 20%甲醇水溶液:取 20 mL 甲醇,用水定容至 100 mL。

4.8 甲醇盐酸溶液:甲醇+0.5 mol/L 盐酸溶液=20+80。

4.9 氨化甲醇:取 5 mL 氨水,加甲醇定容至 100 mL。

4.10 苯巴比妥标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.11 苯巴比妥标准储备溶液:称取苯巴比妥标准品 100 mg(精确至 0.01 mg),用甲醇溶解,定容至 100 mL,配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

4.12 苯巴比妥标准中间溶液:准确移取苯巴比妥标准储备溶液 10 mL,用甲醇定容至 100 mL,配成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的苯巴比妥标准中间溶液。 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

4.13 苯巴比妥标准工作溶液:分别准确移取苯巴比妥标准中间溶液适量,用 20%甲醇水溶液(4.7)稀释定容,配制成浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、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 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。现用现配。

4.14 固相萃取柱:亲水亲脂平衡固相萃取柱,60 mg/3 mL;或其他性能类似的固相萃取柱。

4.15 微孔滤膜:0.22 μm ,有机膜。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器。

5.2 分析天平:感量为 0.001 g。

5.3 分析天平:感量为 0.01 mg。

5.4 氮吹仪。

5.5 旋涡混合器。

5.6 固相萃取仪。

5.7 高速离心机:转速不低于 10 000 r/min。

6 采样和试样制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 的规定,制备通过 0.45 mm 实验筛的试样,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试料 2 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 正己烷涡旋 2 min 后,10 000 r/min 离心 5 min,弃去上层正己烷,残液经氮吹 5 min 使其挥发完全。准确加入 1 mL 乙酸铅溶液(4.5)和 19 mL 甲醇盐酸溶液(4.8),旋涡 2 min,10 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

7.2 净化

固相萃取柱分别用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化。准确移取提取液(7.1)5 mL 过柱,再分别用 5 mL 水、5 mL 2%甲醇水溶液(4.6)淋洗,用 5 mL 氯化甲醇(4.9)洗脱,收集洗脱液,40℃氮吹至干,准确移取 1 mL 20%甲醇水溶液(4.7)溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜后待测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_8 柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ;或其他效果等同的色谱柱。

柱温:30℃。

检测器:紫外检测器。

检测波长:215 nm。

流动相:梯度洗脱,见表 1。

流速:1.0 mL/min。

进样量:20 μL 。

表 1 梯度洗脱表

时间,min	A(水),%	B(甲醇),%
0	59	41
4.0	59	41
7.0	70	30

表 1 (续)

时间, min	A(水), %	B(甲醇), %
20	70	30
20.1	59	41
23	59	41

7.3.2 定性测定

在仪器最佳工作条件下,样品中待测物的保留时间与苯巴比妥标准工作溶液中对应的保留时间相对偏差在±2.5%之内,则可判定为样品中存在对应的待测物。如需进一步确认,可采用农业部 2483 号公告—4—2016 规定的方法检测。

7.3.3 定量测定

在仪器最佳工作条件下,分别上机测定标准工作溶液(4.13,从低浓度到高浓度)和试样溶液中苯巴比妥的峰面积。以标准工作溶液中苯巴比妥的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线多点校准或以标准工作溶液单点进行定量。试样溶液中苯巴比妥的峰面积应在标准工作曲线测定的线性范围内,超出线性范围的则用 20%的甲醇水溶液(4.7)适当稀释后再进样分析。苯巴比妥标准工作溶液色谱图参见附录 A。

8 结果计算

试样中苯巴比妥钠的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X = \frac{C \times V \times V_1}{V_2 \times m} \times n \times 1.095 \quad (1)$$

式中:

C —— 试样中苯巴比妥色谱峰面积对应的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V —— 加入提取液的总体积,单位为毫升(mL);

V_1 —— 氮吹至干后溶解残渣用 20%甲醇水溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 —— 吸取 7.1 项下试液的体积,单位为毫升(mL);

m —— 试样的质量,单位为克(g);

n —— 上机测定的试样溶液超出线性范围后,进一步稀释的倍数;

1.095 —— 苯巴比妥与苯巴比妥钠的换算系数。1.000 g 苯巴比妥相当于 1.095 g 的苯巴比妥钠。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%。

附 录 A
(资料性附录)
苯巴比妥标准工作溶液色谱图

苯巴比妥标准工作溶液色谱图见图 A. 1。

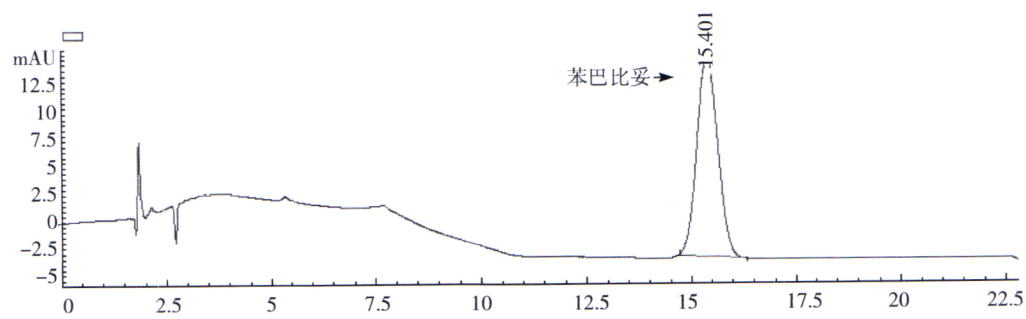


图 A. 1 苯巴比妥标准工作溶液(20 μg/mL) 色谱图