

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 316 号 — 6 — 2020

饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法

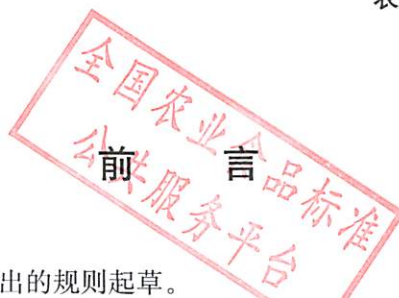
Determination of ethopabate in feeds —
High performance liquid chromatography

2020-07-17 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布



本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人：宋荣、索德成、李丽蓓、范理、杨文军、符金华。

饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中乙氧酰胺苯甲酯的高效液相色谱测定方法。

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乙氧酰胺苯甲酯的测定。

本标准的检出限为 0.2 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样润湿后用乙腈提取, 经 QuEChERS 和中性氧化铝固相萃取柱净化, 用高效液相色谱分离, 荧光检测, 外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

- 4.1 水: GB/T 6682, 一级。
- 4.2 甲醇: 色谱纯。
- 4.3 正己烷: 色谱纯。
- 4.4 丙酮: 色谱纯。
- 4.5 乙腈。
- 4.6 乙腈: 色谱纯。
- 4.7 QuEChERS 盐析剂: 按 4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠比例配制, 并混合均匀。
- 4.8 QuEChERS 净化剂: 按 0.5 g 无水硫酸镁、0.8 g 乙二胺-N-丙基吸附剂(PSA, 粒径 40 μm)、0.6 g 十八烷基键合硅胶吸附剂(C_{18} , 粒径 40 μm)比例配制, 并混合均匀。
- 4.9 试样溶解液: 正己烷(4.3)+丙酮(4.4)=95+5, 将 950 mL 正己烷加入 50 mL 丙酮中。
- 4.10 乙腈水溶液: 乙腈(4.6)+水=3+7, 将 300 mL 乙腈加入 700 mL 水中。
- 4.11 乙氧酰胺苯甲酯(Ethopabate, CAS 号: 59-06-3): 纯度 $\geq 99.5\%$ 。
- 4.12 乙氧酰胺苯甲酯标准储备溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 称取 10 mg 乙氧酰胺苯甲酯(精确至 0.000 01 g)于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇(4.2)溶解定容。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 有效期为 2 个月。
- 4.13 乙氧酰胺苯甲酯标准系列工作溶液: 分别准确量取 0.05 mL、0.25 mL、0.50 mL、2.50 mL、5.00 mL、10.0 mL 乙氧酰胺苯甲酯标准储备溶液(4.12)于 50 mL 棕色容量瓶, 用甲醇(4.2)稀释定容, 配成标准系列工作溶液, 浓度分别为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。临用现配。
- 4.14 固相萃取柱: 中性氧化铝, 1 000 mg/ 6 mL, 或性能相当者。
- 4.15 微孔滤膜: 0.45 μm , 有机系。

5 仪器设备

- 5.1 高效液相色谱仪:配有荧光检测器。
- 5.2 分析天平:感量 0.000 1 g 和 0.000 01 g。
- 5.3 超声波清洗器。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 离心机:转速不低于 10 000 r/min。
- 5.6 固相萃取装置。
- 5.7 氮吹仪:带加热装置,温度可控制在 $(50\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。

6 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取配合饲料、浓缩饲料或精料补充料 2 g~3 g,添加剂预混合饲料 0.5 g~1 g,精确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,加等量水润湿样品(配合饲料、浓缩饲料或精料补充料加 2 mL~3 mL 水,添加剂预混合饲料加 0.5 mL~1 mL 水),准确加入 20 mL 乙腈(4.5),涡旋 1 min 后,超声提取 30 min,期间用手振摇数次。超声后,离心管中加入 QuEChERS 盐析剂(4.7),涡旋 1 min,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,备用。

7.2 净化

移取 8 mL 上清液(7.1),加入 QuEChERS 净化剂(4.8),涡旋 1 min,于 4 000 r/min 离心 10 min。准确移取 5 mL 上清液于 10 mL 离心管中,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至近干,用 5 mL 试样溶解液(4.9)溶解,涡旋混匀,该溶液为净化上柱液。

固相萃取柱(4.14),用 10 mL 正己烷(4.3)预淋洗,全部净化上柱液过柱,用 5 mL 正己烷(4.3)淋洗,抽干,用 6 mL 甲醇(4.2)洗脱。收集洗脱液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至近干。准确加入 1 mL 甲醇(4.2)溶解,涡旋混匀,0.45 μm 微孔滤膜(4.15)过滤备用。

7.3 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ,或性能相当者。

柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

检测波长:荧光检测器,激发波长 306 nm,发射波长 350 nm。

流动相:乙腈水溶液(4.10)(用前超声脱气)。

流速:1.0 mL/min。

进样量:10 μL 。

7.4 测定

7.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列工作溶液(4.13)和试样溶液(7.2)上机测定。乙氧酰胺苯甲酯标准溶液液相色谱图参见附录 A。

7.4.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中乙氧酰胺苯甲酯保留时间应与标准系列工作溶液(浓度相当)中乙氧酰胺苯甲酯的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

7.4.3 定量

以乙氧酰胺苯甲酯的浓度为横坐标、以色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于

0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,应将试样溶液用甲醇稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

8 试验数据处理

试样中乙氧酰胺苯甲酯的含量以质量分数 w 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按式(1)计算,单点校准按式(2)计算。

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2}{V_1 \times m} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中乙氧酰胺苯甲酯浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——净化过柱时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——上机测定的试样溶液超出规定范围后进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2}{A_s \times V_1 \times m} \times n \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

A ——试样溶液中乙氧酰胺苯甲酯的色谱峰面积;

A_s ——标准溶液中乙氧酰胺苯甲酯的色谱峰面积;

ρ_s ——标准溶液中乙氧酰胺苯甲酯的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性附录)

乙氧酰胺苯甲酯标准溶液液相色谱图

乙氧酰胺苯甲酯标准溶液液相色谱图见图 A.1。

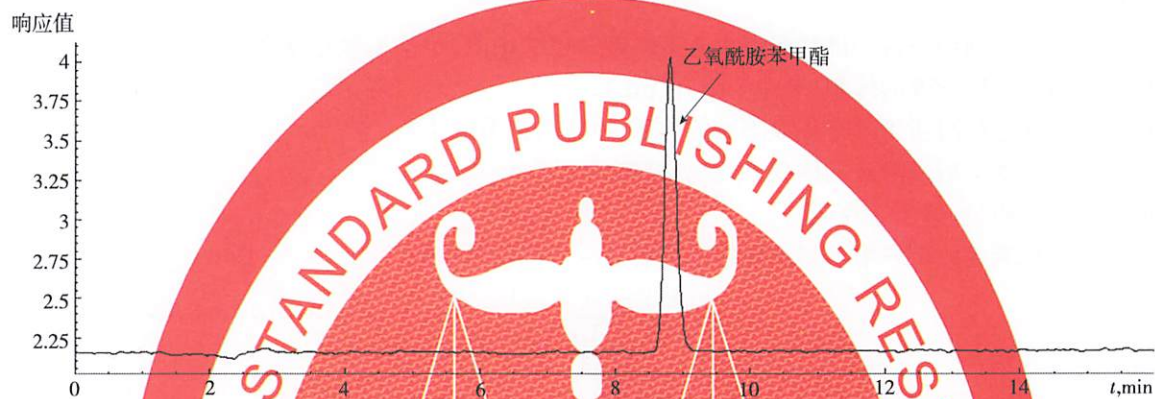


图 A.1 乙氧酰胺苯甲酯标准溶液(1 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定
高效液相色谱法
农业农村部公告第316号—6—2020

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷
书号: 16109·8155
定价: 18.00 元



农业农村部公告第316号—6—2020

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261