

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1258—2007

饲料中苏丹红染料的测定 高效液相色谱法

Determination of sudandyes in feed
High-performance liquid chromatography

2007-01-19 发布

2007-01-19 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准主要起草人：李兰、杨曙明、索德成、闫惠文、刘庆生。

饲料中苏丹红染料的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪测定饲料中的苏丹红染料,方法定量限为 0.05 mg/kg。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料及添加剂预混合饲料中苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

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

3 原理

试样中苏丹红染料经乙腈振荡提取后,氮气吹干浓缩,注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离,用紫外检测器和二极管矩阵检测器进行定性、定量测定。

4 试剂和溶液

除非另有规定,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级用水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 乙腈:分析纯。

4.3 流动相:溶剂 A—乙腈;溶剂 B—水。

4.4 苏丹红染料标准品:苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ的纯度均应大于 95%。

4.5 苏丹红染料标准溶液

4.5.1 苏丹红染料标准贮备液:分别准确称取已知纯度的苏丹红标准品苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ各 10 mg,精确至 0.000 1 g,分别置于 100 mL 棕色容量瓶中,加乙腈(4.1)超声使之完全溶解,并定容至刻度,摇匀。该溶液中苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$,于 4℃ 保存可使用 3 个月。

4.5.2 苏丹红染料标准中间液:分别准确移取苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ标准贮备液(4.5.1)各 5 mL,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.1)定容至刻度。该溶液中苏丹红染料浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,于 4℃ 保存可使用 1 个月。

4.5.3 苏丹红染料标准工作液:准确移取苏丹红染料标准中间液(4.5.2)0.5 mL、1.0 mL、2.5 mL、5.0 mL、10.0 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.1)定容至刻度。此时,溶液中苏丹红染料的浓度分别为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$,于 4℃ 保存可使用一周。

5 仪器和设备

除实验室常用仪器和设备外,还包括:

5.1 电子天平:精度为万分之一和千分之一各 1 台。

- 5.2 振荡器。
- 5.3 高效液相色谱仪:紫外检测器(多波长)和二极管矩阵检测器。
- 5.4 针头过滤器:备孔径为 0.45 μm 有机微孔滤膜。
- 5.5 离心机:5 000 r/min。
- 5.6 氮吹仪:50℃。
- 5.7 涡轮混合器:2 500 r/min。

6 试样的选取和制备

6.1 按 GB/T 14699.1 采样。

6.2 选取有代表性饲料样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,粉碎,全部通过孔径为 0.42 mm 的试验筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存,备用。

7 分析步骤

7.1 试液的制备

7.1.1 提取

称取配合饲料 10 g;浓缩饲料、添加剂预混合饲料样品 5 g(精确至 0.001 g),置于 150 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 的乙腈(4.2),于振荡器(5.2)振荡提取 30 min,离心,上清液备用。

7.1.2 准确吸取试液(7.1.1)中配合饲料提取液 10 mL,氮气吹干,加入 2 mL 乙腈(4.1)涡轮混合器(5.7)混合 30 s,过孔径为 0.45 μm 的有机滤膜,滤液上机测定。

7.1.3 浓缩饲料、添加剂预混合饲料提取液直接上液相色谱仪测定。

7.2 色谱条件

7.2.1 色谱柱

具有 C_{18} 填料的柱子(粒度为 5 μm):柱长 250 mm,内径 4.6 mm。

7.2.2 流动相(4.3)

以 1.0 mL/min 流速梯度洗脱。梯度条件见表 1。

表 1 洗脱梯度表

时间(min)	溶剂(A %)	溶剂(B %)
0.00	95	5
8.00	100	0
8.50	100	0
28.0	100	0
29.0	95	5
35.0	95	5

7.2.3 进样量

50 μL 。

7.2.4 检测器

紫外检测器和二极管矩阵检测器,检测波长苏丹红 I 为 478 nm;苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 均为 520 nm。

7.3 测定

7.3.1 定性测定

二极管矩阵检测器定性。样品峰只有满足下述条件,才能证实是苏丹红染料:

- a) 样品峰的保留时间与标准峰的保留时间相同(差异 $\leq \pm 5\%$)。如有怀疑,需做标准物添加(即将标准物加到样品中)实验。
- b) 波长大于 220 nm、样品的光谱图应与标准品光谱图无明显差别,样品峰与标准峰的最大吸收波长相同,即其差异不大于检测系统分辨率决定的范围(一般是 2 nm~4 nm)。

7.3.2 定量测定

7.3.2.1 按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数。向液相色谱柱中注入待测定苏丹红染料标准液(4.5.3)及试液(7.1),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量。

7.3.2.2 结果计算

试样中每种苏丹红染料的含量按式(1)分别计算:

$$W_i = \frac{P_i \times V \times C_i \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

W_i ——试样中每种苏丹红的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

P_i ——试样溶液峰面积值;

V ——样品的总稀释体积,单位为毫升(mL);

C_i ——标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_{st} ——标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

P_{st} ——标准溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL)。

平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

8 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附录 A
(资料性附录)
苏丹红标准色谱图

