

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1372—2007

饲料中三聚氰胺的测定

Determination of Melamine in Feeds

2007-06-14 发布

2007-06-14 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准参考美国食品药品监督管理局(FDA)实验室方法和国内相关实验室的方法,提出了饲料中三聚氰胺的测定方法。

本标准的附录 A 为资料性附录。

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)。

本标准起草人:赵根龙、王培龙、宋荣、索德成、马东霞、张苏、李丽蓓、杨曙明、苏晓鸥。

饲料中三聚氰胺的测定

1 范围

本标准规定了测定饲料中三聚氰胺的含量的高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱质谱联用法(GC-MS),其中 GC-MS 法为确证法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、植物性蛋白饲料、宠物饲料(干粮、罐头)中三聚氰胺的测定。

本标准中 HPLC 法最低定量限为 2.0 mg/kg, GC-MS 法最低定量限为 0.05 mg/kg。

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 20195 动物饲料 试样的制备

3 HPLC 法

3.1 原理

试样中的三聚氰胺用三氯乙酸溶液提取,提取液离心后经混合型阳离子交换固相萃取柱净化,洗脱物吹干后用甲醇溶液溶解,用高效液相色谱仪进行测定。

3.2 试剂与材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 的三级水,色谱用水符合 GB/T 6682 一级水的规定。

3.2.1 甲醇:色谱纯。

3.2.2 乙腈:色谱纯。

3.2.3 氨水:浓度 25%~28%。

3.2.4 混合型阳离子交换固相萃取柱:60 mg, 3 mL。

3.2.5 三氯乙酸溶液 10 g/L:称取 10 g 三氯乙酸加水至 1 000 mL。

3.2.6 氨水甲醇溶液:量取 5 mL 氨水,溶解于 100 mL 甲醇中。

3.2.7 乙酸铅溶液 22 g/L:取 22 g 乙酸铅用约 300 mL 水溶解后定容至 1 L。

3.2.8 滤膜:0.45 μ m,有机相。

3.2.9 甲醇溶液:200 mL 甲醇(3.2.1)加入 800 mL 一级水,混匀。

3.2.10 流动相:称取 2.02 g 庚烷磺酸钠和 2.10 g 柠檬酸于 1 L 容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度。取该溶液 900 mL 加入 100 mL 乙腈(3.2.2)。

3.2.11 三聚氰胺标准品(纯度>99%)。

3.2.12 三聚氰胺标准溶液

3.2.12.1 标准储备液:称取 100 mg(精确到 0.1 mg)的三聚氰胺标准品,用甲醇溶液(3.2.9)溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,该溶液浓度为 1 mg/mL,于 4℃ 冰箱内贮存,有效期 3 个月。

3.2.12.2 标准中间液:吸取标准储备液 5.00 mL,于 50 mL 容量瓶内,用甲醇溶液(3.2.9)定容至 50 mL,该溶液三聚氰胺浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,于 4℃ 冰箱内贮存,有效期 1 个月。

3.2.12.3 标准工作液:用移液管分别移取标准中间液 1 mL、5 mL、10 mL、25 mL、50 mL 于 5 个 100 mL 容量瓶内,用甲醇溶液(3.2.9)定容,该溶液三聚氰胺浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 。于 4℃ 冰箱内贮存,有效期 1 周。

3.3 仪器与设备

3.3.1 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器或紫外检测器。

3.3.2 离心机:10 000 r/min。

3.3.3 涡旋混合器。

3.3.4 超声波清洗器。

3.3.5 氮吹仪,可控温至 60℃。

3.3.6 固相萃取装置。

3.3.7 高速匀质器。

3.3.8 索式提取器。

3.3.9 震荡摇床。

3.4 试样制备

按照 GB/T 20195 的规定制备试样。

3.5 测定步骤

3.5.1 提取

3.5.1.1 配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、植物性蛋白饲料和宠物饲料(干粮)中三聚氰胺的提取。称取 5 g 试样(精确至 0.01 g),准确加入 50 mL 三氯乙酸溶液(3.2.5),加入 2 mL 乙酸铅溶液(3.2.7)。摇匀,超声提取 20 min。静止 2 min,取上层提取液约 30 mL 转入离心管,在 10 000 r/min 离心机上离心 5 min。

3.5.1.2 宠物饲料(罐头)中三聚氰胺的提取。称取 5 g 试样(精确至 0.01 g),加入 50 mL 乙醚,摇床上 120 r/min 振荡 1 h,弃去乙醚,再加入 50 mL 乙醚,摇床上 120 r/min 振荡 1 h,弃去乙醚,其余步骤同 3.5.1.1。

3.5.2 净化

分别用 3 mL 甲醇,3 mL 水活化混合型阳离子交换固相萃取柱,准确移取 10 mL 离心液分次上柱,控制过柱速度在 1 mL/min 以内。再用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤混合型阳离子交换固相萃取柱,抽干后用氨水甲醇溶液(3.2.6)3 mL 洗脱。洗脱液 50℃ 氮气吹干,准确加入甲醇溶液(3.2.9),涡旋振荡 1 min,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

3.5.3 液相色谱条件

色谱柱: C_8 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm ;或性能相当的色谱柱。

柱温:室温。

流动相流速:1.0 mL/min。

检测波长:240 nm。

3.5.4 测定

按照保留时间进行定性,试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 2%,单点或多点校正外标法定量。待测样液中三聚氰胺的响应值应在工作曲线范围内。

3.6 结果计算和表述

3.6.1 试样中三聚氰胺的含量 X ,以质量分数毫克每千克(mg/kg)表示,单点校正按式(1)计算:

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

式中:

- V ——净化后加入的甲醇溶液体积,单位为毫升(mL);
 A_s ——三聚氰胺标准溶液对应的色谱峰面积响应值;
 A ——试样溶液对应的色谱峰面积响应值;
 C_s ——三聚氰胺标准溶液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
 m ——试样质量,单位为克(g);
 n ——稀释倍数。

多点校正按式(2)计算:

$$X = \frac{C_x \times V}{m} \times n \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- V ——净化后加入的甲醇溶液体积,单位为毫升(mL);
 C_x ——标准曲线上查得的试样中三聚氰胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
 m ——试样质量,单位为克(g);
 n ——稀释倍数。

3.6.2 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

3.7 重复性

在同一实验室由同一操作人员使用同一仪器完成的两个平行测定的相对偏差不大于 10%。

4 GC-MS 法

4.1 方法原理

试样中的三聚氰胺用三氯乙酸溶液提取,经混合型阳离子交换固相萃取柱净化,用 N,O-双三甲基-硅基三氟乙酰胺(BSTFA)衍生化,以气相色谱质谱联用仪进行定性和定量。

4.2 试剂和材料

4.2.1 衍生化试剂:BSTFA + 1% 三甲基氯硅烷(TMCS)。

4.2.2 吡啶:优级纯。

4.2.3 其他试剂和材料同 3.2.1~3.2.8、3.2.11、3.2.12。

4.2.4 标准工作液:用移液管分别吸取标准工作液(3.2.12.3)中浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液 0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL、10 mL 于 5 个 100 mL 容量瓶内,用甲醇定容,该溶液三聚氰胺浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 仪器和设备

4.3.1 气相色谱质谱联用仪。

4.3.2 其他同 3.3.2~3.3.9。

4.4 分析步骤

4.4.1 前处理同 3.5.1~3.5.2,但需根据洗脱液中三聚氰胺的浓度用甲醇进行适当稀释。

4.4.2 衍生化

取 4.4.1 的稀释液适量用氮气吹干,加入 200 μL 的吡啶和 200 μL 的衍生化试剂(4.2.1),混匀,70℃ 反应 30 min。同时,用三聚氰胺标准系列(4.2.4)或相应浓度单点标准做同步衍生。

4.4.3 测定

4.4.3.1 GC-MS 条件

色谱柱:柱长 30 m,内径 0.25 mm,甲基苯基聚硅氧烷涂层,膜厚 0.25 μm 。

载气:氦气,流速为 1.3 mL/min。

进样量:1 μL 。

进样口温度:250℃

升温程序:起始温度 75℃,持续 1.0 min,以 30℃/min 升温至 300℃,保持 2.0 min。

传输线温度:280℃。

运行时间:10.5 min。

扫描范围:60 m/z~400 m/z。

扫描模式:选择离子扫描。监测离子 99 m/z、171 m/z、327 m/z、342 m/z。

离子源温度:230℃。

EI 源轰击能:70 eV。

4.4.3.2 测定

定性方法:试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%,特征离子丰度与标准品相差不大于 20%。

定量方法:以 342、327、171 和 99 峰面积之和进行单点或多点校正定量。

4.5 结果计算和表述

4.5.1 试样中三聚氰胺的含量 X ,以质量分数毫克每千克(mg/kg)表示,单点校正按式(3)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times n \quad \text{..... (3)}$$

式中:

A ——试样溶液对应的色谱峰面积响应值;

A_s ——三聚氰胺标准溶液对应的色谱峰面积响应值;

C_s ——标准工作液中三聚氰胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——用于衍生的试样溶液(4.4.2)体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数。

多点校准时,可用公式(4):

$$X = \frac{C_x \times V}{m} \times n \quad \text{..... (4)}$$

式中:

V ——用于衍生的试样溶液(4.4.2)体积,单位为毫升(mL);

C_x ——由标准曲线而得的样液中三聚氰胺的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m ——试样量,单位为克(g);

n ——稀释倍数。

4.5.2 平行测定结果用算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

4.6 重复性

在同一实验室由同一操作人员使用同一仪器完成的两个平行测定的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)
三聚氰胺标准图谱

A.1 三聚氰胺标准色谱图见图 A.1。

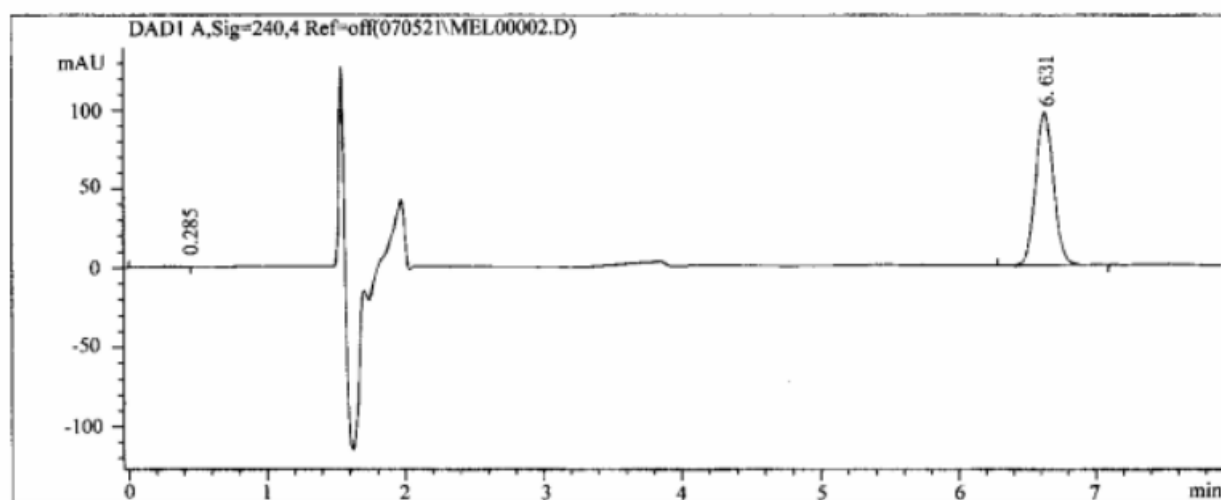


图 A.1 三聚氰胺标准色谱图

A.2 三聚氰胺标准紫外光谱图见图 A.2。

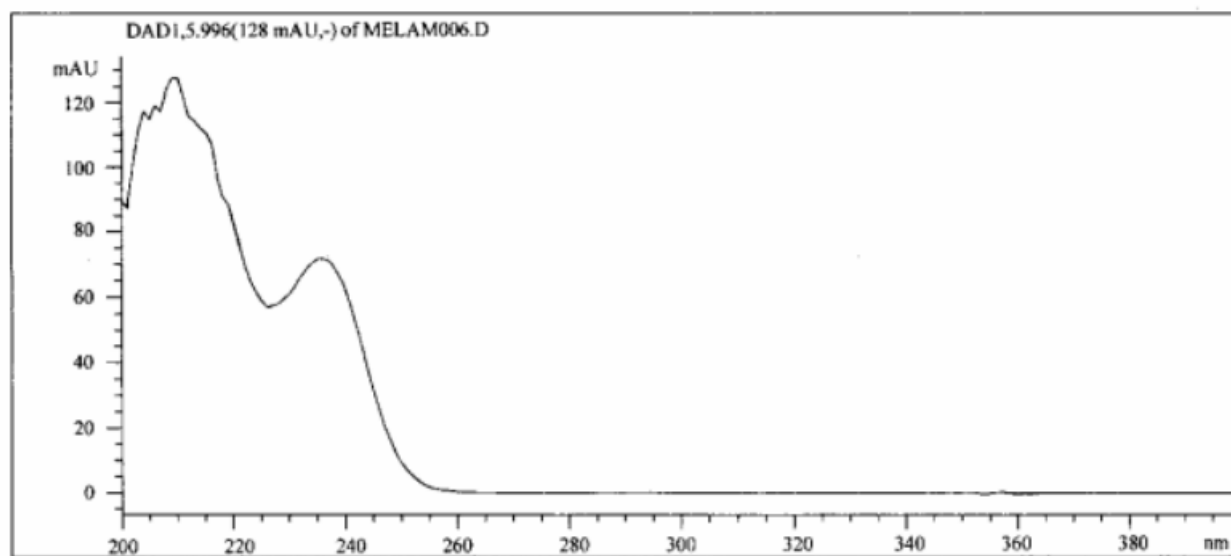


图 A.2 三聚氰胺紫外光谱图

A.3 三聚氰胺标准品衍生物选择离子色谱图见图 A.3。

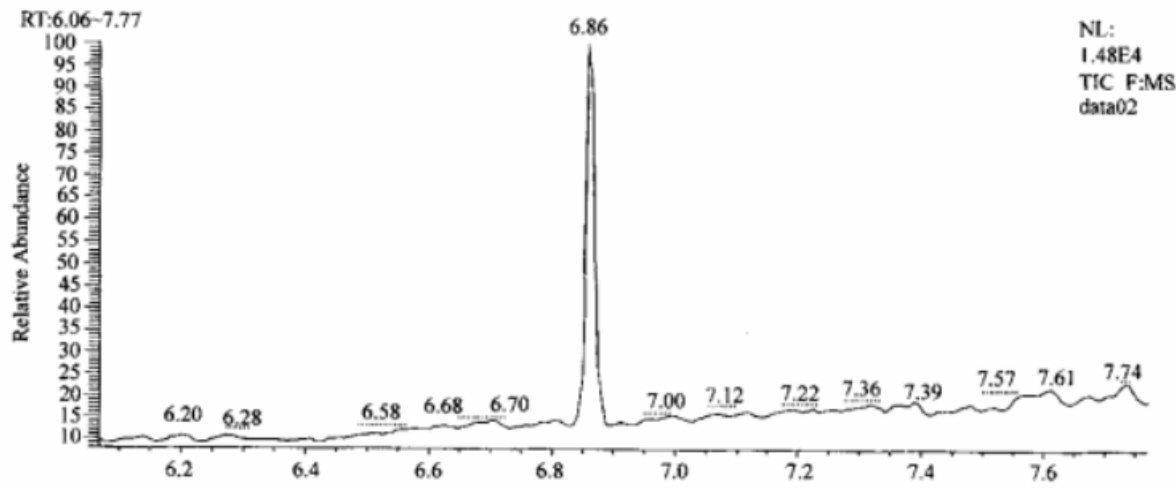


图 A.3 三聚氰胺标准品衍生物选择离子色谱图

A.4 三聚氰胺衍生物选择离子质谱图见图 A.4。

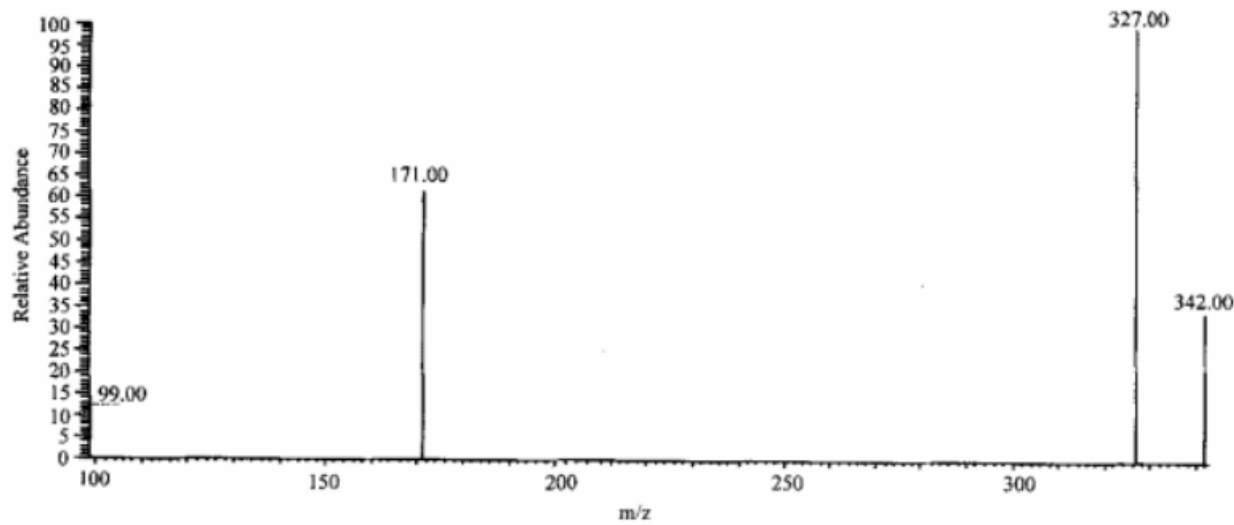


图 A.4 三聚氰胺衍生物选择离子质谱图