

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1756—2012
代替 NY/T 1756—2009

饲料中孔雀石绿的测定

Determination of malachite green in feeds

2012-12-24 发布

2013-03-01 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 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 1756—2009《饲料中孔雀石绿的测定》。

本标准与 NY/T 1756—2009 的主要差异如下：

——在适用范围中增加了“植物性饲料原料”和“精料补充料”；

——液相色谱—串联质谱部分增加了进样前离心步骤；

——标准对 6.2.12 溶液浓度做了详细说明。

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：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)〕、浙江省饲料监察所。

本标准主要起草人：李兰、索德成、贾铮、应永飞、杨曙明、朱聪英、赵根龙、魏书林、肖志明、杜洪鸽、孙志文、符金华。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——NY/T 1756—2009。

饲料中孔雀石绿的测定

1 范围

本标准规定了用液相色谱仪和液相色谱—串联质谱仪测定饲料中的孔雀石绿及其同系物无色孔雀石绿含量的方法。

本标准分为高效液相色谱法和高效液相色谱—串联质谱法,高效液相色谱—串联质谱法为确证法。

本标准高效液相色谱法适用于鱼粉、配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、精料补充料中孔雀石绿和无色孔雀石绿含量的测定;高效液相色谱—串联质谱法适用于鱼粉、植物性饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、精料补充料中孔雀石绿和无色孔雀石绿含量的测定。

液相色谱法测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的定量限均为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$;液相色谱—串联质谱法测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的定量限均为 $1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 采样

按 GB/T 14699.1 的规定执行。

4 试样的制备

选取有代表性饲料样品,按 GB/T 20195 制备样品,过 $0.425\ \text{mm}$ (40 目)孔筛。

5 液相色谱法

5.1 原理

以乙腈—乙酸钠缓冲溶液提取样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿,提取液经过二氯甲烷液液萃取,再经固相萃取柱净化,用接有二氧化铅柱的氨基柱进行高效液相色谱分离,紫外可见光检测器检测,外标法定量。

5.2 试剂

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。

5.2.1 乙腈:色谱纯。

5.2.2 二氯甲烷。

5.2.3 盐酸羟胺溶液:称取 $12.5\ \text{g}$ 盐酸羟胺溶于 $50\ \text{mL}$ 水中。

5.2.4 盐酸羟胺甲醇溶液:取 $1\ \text{mL}$ 盐酸羟胺溶液(5.2.3)加甲醇定容至 $100\ \text{mL}$ 。

5.2.5 乙酸钠缓冲溶液:称取 $4.95\ \text{g}$ 无水乙酸钠和 $0.95\ \text{g}$ 对甲苯磺酸于 $900\ \text{mL}$ 水中,用冰乙酸调节 $\text{pH}4.5$,用水定容至 $1\ 000\ \text{mL}$ 。

5.2.6 $1.0\ \text{mol/L}$ 对甲苯磺酸溶液:称取 $17.2\ \text{g}$ 对甲苯磺酸,加水溶解并定容至 $100\ \text{mL}$ 。

- 5.2.7 中性氧化铝,粒度为 0.071 nm~0.150 1 nm,层析用。
- 5.2.8 乙腈—乙酸钠缓冲溶液:乙腈+乙酸钠缓冲溶液(5.2.5)=60+40。
- 5.2.9 氯化钠溶液:称取 25 g 氯化钠,加水溶解并定容至 500 mL。
- 5.2.10 孔雀石绿标准贮备溶液:精确称取孔雀石绿标准品(纯度 $\geq 95\%$)0.100 0 g,用乙腈(5.2.1)溶解并定容至 100 mL。该溶液中孔雀石绿的浓度为 1 mg/mL,于 -18°C 保存可使用 3 个月。
- 5.2.11 无色孔雀石绿标准贮备溶液:精确称取无色孔雀石绿(纯度 $\geq 95\%$)0.100 0 g,用乙腈(5.2.1)溶解并定容至 100 mL。该溶液中无色孔雀石绿浓度为 1 mg/mL,于 -18°C 保存可使用 3 个月。
- 5.2.12 孔雀石绿和无色孔雀石绿混合中间液:精确移取孔雀石绿标准贮备溶液(5.2.10)和无色孔雀石绿标准贮备溶液(5.2.11)各 5 mL,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈定容至刻度。该溶液中孔雀石绿和无色孔雀石绿均为 10 $\mu\text{g/mL}$,于 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存可使用 1 个月。
- 5.2.13 孔雀石绿和无色孔雀石绿标准工作液:精确移取孔雀石绿和无色孔雀石绿混合中间液(5.2.12)各 1 mL,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈—乙酸钠缓冲溶液(5.2.8)定容至刻度。该溶液中孔雀石绿和无色孔雀石绿均为 100 ng/mL,现用现配。

5.3 仪器与设备

- 5.3.1 高效液相色谱仪:配紫外可见光检测器。
- 5.3.2 电子天平:感量 0.000 1 g、感量 0.001 g。
- 5.3.3 离心机。
- 5.3.4 振荡器。
- 5.3.5 旋转蒸发器,可控温 $25^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3.6 中性氧化铝柱:1 g/6 mL。
- 5.3.7 丙基磺酸阳离子树脂 PRS (propylsulfonic acid)柱:500 mg/3 mL。

5.4 分析步骤

5.4.1 提取

称取试样约 5 g(精确到 0.001 g),置于 100 mL 离心管中,依次加入 1.5 mL 盐酸羟胺溶液(5.2.3)、2 mL 对甲苯磺酸溶液(5.2.6)、5 mL 乙酸钠缓冲溶液(5.2.5)和 20 mL 乙腈,加入约 2 g 中性氧化铝(5.2.7),振荡 2 min,超声 30 min,4 000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至 250 mL 分液漏斗中,向离心管中再次加入 20 mL 乙腈,振摇 2 min,4 000 r/min 离心 5 min,合并上清液至分液漏斗中。

5.4.2 液液萃取

加入 50 mL 氯化钠溶液(5.2.9)、50 mL 二氯甲烷(5.2.2),旋摇,静置分层。用蒸发瓶收集下层液体后,在分液漏斗再次加入 20 mL 二氯甲烷,旋摇,静置分层,收集下层液体于同一蒸发瓶。将收集液在 35°C 下减压旋转蒸发(注意:开始时温度不要直接升到 35°C ,以免冲料损失)至近干,加入 5 mL 乙腈溶解残渣,备用。

5.4.3 固相萃取净化

将中性氧化铝柱(5.3.6)串接在 PRS 柱(5.3.7)上方,使用前用 5 mL 乙腈预洗两柱。将 5.4.2 的样液缓慢转移到中性氧化铝柱内,在抽真空情况下过柱(保持流速 1 mL/min)。再用 5 mL 乙腈洗涤蒸发瓶 2 次,洗涤液均转移至柱内,最后用 5 mL 乙腈洗涤小柱。

弃去中性氧化铝柱,用乙腈—乙酸钠缓冲溶液(5.2.8)2 mL、盐酸羟胺甲醇溶液(5.2.4)1 mL 洗脱,收集洗脱液,过 0.45 μm 微孔滤膜上机测定。

5.4.4 测定

5.4.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:氰基柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm;柱后串接氧化铝柱,柱长 35 mm,内径 4.6 mm。

流动相:乙腈+乙酸钠缓冲溶液=60+40。

流速:1.0 mL/min。

柱温:室温。

进样量:50 μ L。

检测波长:600 nm。

5.4.4.2 定量测定

调整仪器工作参数,使其处于良好状态。向液相色谱仪中注入孔雀石绿和无色孔雀石绿标准工作液(5.2.13)及试样溶液(5.4.3),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量。

5.4.4.3 结果计算

试样中孔雀石绿或无色孔雀石绿的含量 X_i ,以质量分数表示,单位为微克每千克(μ g/kg),按式(1)计算。

$$X_i = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_s}{P_s \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

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);

V_s ——标准工作溶液的进样体积,单位为毫升(mL);

V_i ——样品溶液的进样体积,单位为毫升(mL);

C_i ——标准工作溶液浓度,单位为纳克每毫升(μ g/mL);

P_s ——标准工作溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g)。

5.4.4.4 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

5.5 重复性

重复性条件下,平行测定结果的相对偏差不大于15%。

6 液相色谱—串联质谱法

6.1 原理

以乙腈提取样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿,提取液经过固相萃取柱净化后,进行液相色谱—串联质谱仪测定,以内标法定量。

6.2 试剂

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。

6.2.1 乙腈:色谱纯。

6.2.2 甲醇:色谱纯。

6.2.3 中性氧化铝:粒度为 0.075 mm~0.150 mm,层析用。

6.2.4 甲酸:优级纯。

6.2.5 甲酸溶液:0.1%,取甲酸(6.2.4)1.0 mL加水定容至 1 000 mL。

6.2.6 淋洗液:取甲酸溶液(6.2.5)20 mL,加乙腈定容至 100 mL。

6.2.7 洗脱液:取氨水 5 mL加甲醇至 100 mL,摇匀。

6.2.8 标准贮备溶液:准确称取孔雀石绿标准品(纯度 $\geq$ 95%)、无色孔雀石绿标准品(纯度 $\geq$ 95%)、氘代孔雀石绿标准品(纯度 $\geq$ 95%)、氘代无色孔雀石绿标准品(纯度 $\geq$ 95%),用乙腈分别配制成 100 μ g/mL 的标准贮备液, -18℃避光保存备用,可使用 3 个月。

6.2.9 混合标准贮备溶液:分别吸取孔雀石绿和无色孔雀石绿的标准贮备溶液(6.2.8),用乙腈稀释成 $1\mu\text{g/mL}$, -18°C 避光保存,可使用1个月。

6.2.10 混合内标贮备溶液:分别吸取氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准贮备溶液(6.2.8),用乙腈稀释成 $1\mu\text{g/mL}$, -18°C 避光保存,可使用1个月。

6.2.11 混合内标工作溶液:用乙腈稀释内标贮备溶液(6.2.10),配制成含氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿各 100 ng/mL 的混合内标工作溶液, -18°C 避光保存,可使用1个月。

6.2.12 混合标准工作溶液:根据需要,临用时用流动相稀释混合标准贮备溶液(6.2.9)和混合内标贮备溶液(6.2.10),配制成适当浓度的混合标准工作溶液,每毫升混合标准工作溶液含有氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿的量应与样品含量相同。

6.3 仪器与设备

6.3.1 高效液相色谱—串联质谱仪:配电喷雾(ESI)离子源。

6.3.2 电子天平:感量 0.0001 g 、感量 0.001 g 。

6.3.3 离心机。

6.3.4 振荡器。

6.3.5 旋转蒸发器,可控温 $35^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。

6.3.6 固相萃取装置。

6.3.7 中性氧化铝柱: $1\text{ g}/6\text{ mL}$ 。

6.3.8 丙基磺酸阳离子树脂 PRS (propylsulfonic acid)柱: $500\text{ mg}/3\text{ mL}$ 。

6.4 分析步骤

6.4.1 试样提取

称取试样约 5 g (精确到 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,依次加入 $200\mu\text{L}$ 混合内标工作液(6.2.11)、约 2 g 中性氧化铝(6.2.3)、 20 mL 乙腈,涡旋混匀,超声 30 min ;于 8000 r/min 离心 10 min ,倾出上清液至旋转蒸发瓶中,另取 20 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液;在 35°C 下减压蒸至近干,用 5 mL 乙腈溶解残渣,备用。

6.4.2 试样净化

将中性氧化铝柱(6.3.7)串接在PRS柱(6.3.8)上方,用 5 mL 乙腈活化。取试液(6.4.1)过柱,另取 5 mL 乙腈清洗旋转蒸发瓶,溶液过柱,重复以上操作一次,取 5 mL 乙腈淋洗柱子。移去中性氧化铝柱,用 5 mL 淋洗液(6.2.6)淋洗阳离子交换柱,弃去流出液,抽干;用 5 mL 洗脱液(6.2.7)洗脱。收集洗脱液,用氮气在 50°C 吹至近干,用流动相(6.4.3)溶解残渣,并定容到适当的体积、离心,取上层清液过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤后上机测定。

6.4.3 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱;柱长 150 mm ,内径 2.1 mm ,填料粒度 $3.5\mu\text{m}$;或性能相当的色谱柱。

流动相: 0.1% 甲酸溶液(6.2.5)+乙腈(6.2.1)=22+78。

流速: 0.25 mL/min 。

柱温: 50°C 。

进样量: $20\mu\text{L}$ 。

6.4.4 质谱参考条件

离子源:电喷雾 ESI 离子源。

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应监测。

监测离子对及电压参考见表1。

表 1 孔雀石绿和无色孔雀石绿的离子对

名称	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	CE eV
孔雀石绿	329/313	329/208	34;38
无色孔雀石绿	331/239	331/316	21;32
氘代孔雀石绿	334/318	334/318	34
氘代无色孔雀石绿	337/240	337/240	21

6.4.5 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子、2 个子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准工作液中相对保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的对照品工作液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。如有可能,可利用基质添加实验确证结果。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

6.4.6 定量测定

在仪器正常工作条件下,对混合标准工作溶液进样,以标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标,被测组分浓度为横坐标,用内标法对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。以氘代孔雀石绿为内标物计算孔雀石绿含量,以氘代无色孔雀石绿为内标物计算无色孔雀石绿含量。上述色谱和质谱条件下,孔雀石绿、无色孔雀石绿以及内标物氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准物质的多反应监测色谱图参见附录 A。

6.5 结果计算

试样中孔雀石绿或无色孔雀石绿的含量 X_i ,以质量分数表示,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$),按式(2)计算:

$$X_i = \frac{C \times C_i \times P \times P_{si} \times V}{C_{si} \times P_i \times P_s \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C ——孔雀石绿或无色孔雀石绿标准工作溶液的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{si} ——标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_i ——样液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

P ——样液中孔雀石绿或无色孔雀石绿的峰面积;

P_s ——孔雀石绿或无色孔雀石绿标准工作溶液的峰面积;

P_{si} ——标准工作溶液中内标物的峰面积;

P_i ——样液中内标物的峰面积;

V ——样品总稀释体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

6.6 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。

6.7 重复性

重复性条件下,平行测定结果的相对偏差不大于 20%。

附 录 A
(资料性附录)
标准溶液色谱图和标准物质 MRM 图

A. 1 孔雀石绿和无色孔雀石绿标准溶液色谱图见图 A. 1。

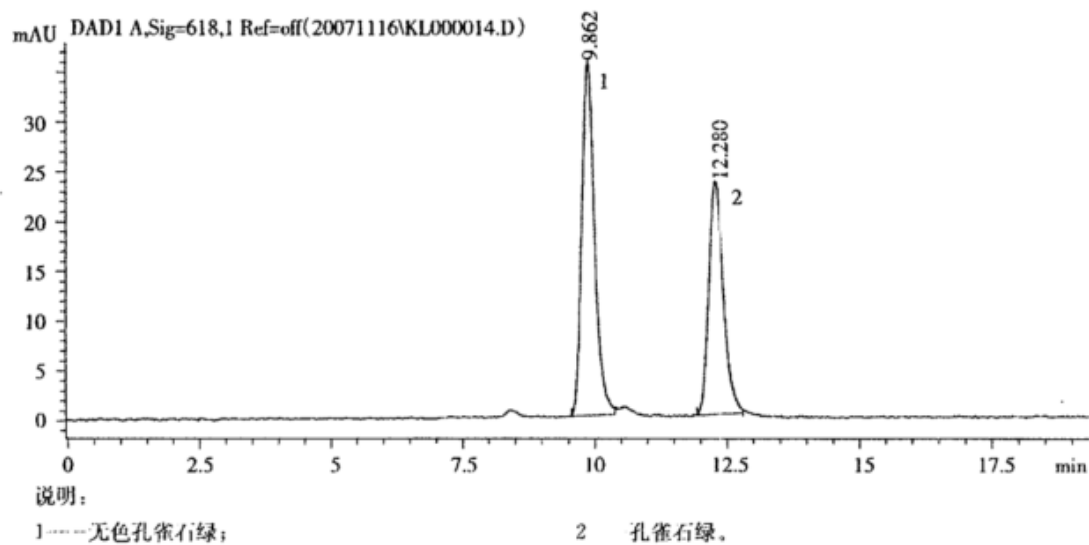


图 A. 1 液相色谱法孔雀石绿和无色孔雀石绿标准溶液色谱图

A. 2 孔雀石绿、无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准物质的 MRM 色谱图见图 A. 2。

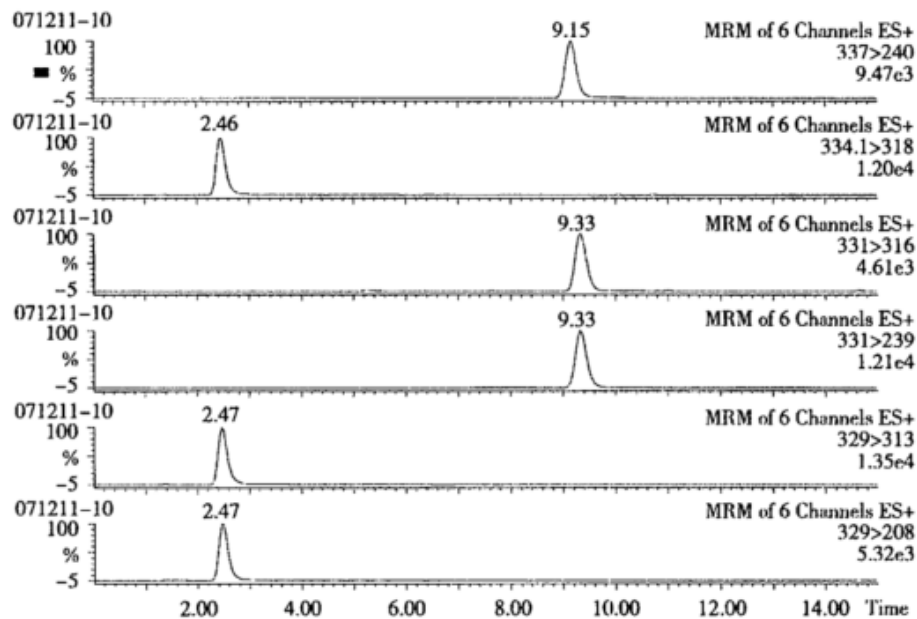


图 A. 2 氘代无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿、无色孔雀石绿、孔雀石绿标准物质的 MRM 图
(浓度:5.0 ng/mL)