

中华人民共和国国家标准

农业部 2224 号公告—4—2015

饲料中苯丙酸诺龙的测定 高效液相色谱法

Determination of nandrolone phenpropionate in feeds—
High performance liquid chromatography

2015-01-30 发布

2015-04-01 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:广东省农业科学院农产品公共监测中心。

本标准主要起草人:何绮霞、续倩、殷秋妙、梁琳、张展、林雪贤、季天荣。

饲料中苯丙酸诺龙的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中苯丙酸诺龙含量测定的高效液相色谱方法。

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苯丙酸诺龙的测定。

本标准检出限为 0.1 mg/kg, 定量限为 0.5 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

3 原理

饲料中的苯丙酸诺龙经叔丁基甲醚超声提取, 提取液经旋转蒸干, 残渣用甲醇溶解, 离心, 取上清液, 过孔径为 0.45 μm 微孔有机滤膜, 用高效液相色谱—紫外检测器测定, 外标法定量。

4 试剂

除非另有说明, 本方法所用试剂均为析纯的试剂, 实验用水符合 GB/T 6682 中一级水规定。

4.1 乙腈: 色谱纯。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 叔丁基甲醚: 分析纯。

4.4 苯丙酸诺龙标准品: 纯度不得低于 98%。

4.5 苯丙酸诺龙标准贮备液: 准确称取苯丙酸诺龙标准品 50 mg(精确至 0.000 1 g), 用甲醇溶解, 转移并定容至 50 mL。该溶液中苯丙酸诺龙浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$, -20°C 条件下储藏, 保存期 6 个月。

4.6 苯丙酸诺龙标准工作液: 准确量取苯丙酸诺龙标准贮备液(4.5), 置于容量瓶中, 用甲醇稀释、定容至浓度分别为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 4°C 条件下储藏, 保存期 1 个月。

5 仪器和设备

除常用实验室仪器设备外, 还需要以下设备:

5.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器。

5.2 电子天平: 感量为 0.000 1 g。

5.3 电子天平: 感量为 0.001 g。

5.4 超声水浴锅。

5.5 离心机: 转速 10 000 r/min。

5.6 涡旋混合器。

5.7 旋转蒸发仪。

5.8 微孔有机滤膜:孔径 0.45 μm 。

6 试样制备

按照 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样,按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 测定步骤

7.1 提取

称取一定量的试样(配合饲料、浓缩饲料和精料补充料 5 g,预混合饲料 2 g,精确至 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,加入叔丁基甲醚 20 mL,加塞,涡旋震荡 1 min;再超声提取 20 min,其间充分摇动 2 次。取出,离心(3 500 r/min)10 min。收集上清液于 100 mL 梨形瓶中。残渣再加入叔丁基甲醚 10 mL,重复提取 1 次。合并 2 次提取液,于 45℃ 旋转蒸干,准确加入甲醇 3.00 mL,超声溶解。于 -20℃ 冰箱中放置 60 min,离心(10 000 r/min)5 min,上清液过 0.45 μm 微孔有机滤膜,上机测定。

7.2 测定

7.2.1 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:35℃。

流速:1.0 mL/min。

检测波长:241 nm。

进样量:20 μL 。

流动相:A:乙腈,B:水,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A(乙腈),%	B(水),%
0	75	25
5	80	20
10	85	15
20	85	15

7.2.2 测定

取适量试样制备液和苯丙酸诺龙标准工作液,做单点或多点校准,以保留时间定性,色谱峰面积定量,外标法计算结果。苯丙酸诺龙标准溶液色谱图参见图 A.1。阳性样品需进一步确证。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

8.1.1 单点校准

试样中苯丙酸诺龙的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

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

式中:

A —— 试样溶液峰面积;

A_s —— 标准溶液中苯丙酸诺龙的峰面积;

C_s —— 标准溶液中苯丙酸诺龙的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V —— 溶解残渣用甲醇的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

8.1.2 多点校准

试样中苯丙酸诺龙的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算。

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C ——由标准曲线得出的试样溶液中苯丙酸诺龙的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——溶解残渣用甲醇的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附 录 A
(资料性附录)
苯丙酸诺龙标准溶液色谱图

苯丙酸诺龙标准溶液色谱图见图 A. 1。

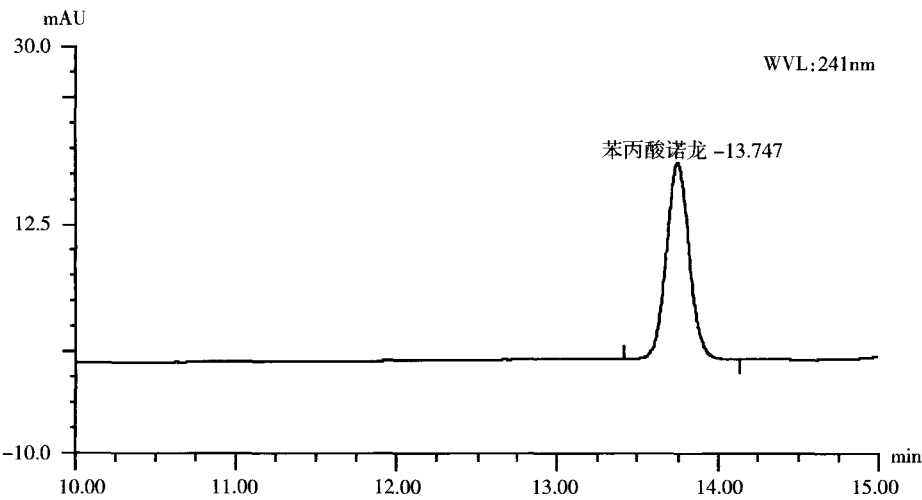


图 A. 1 苯丙酸诺龙标准溶液色谱图 (5 mg/L)