

中华人民共和国国家标准

农业部 2224 号公告—2—2015

饲料中炔雌醇的测定 高效液相色谱法

Determination of ethinylestradiol 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:殷秋妙、何绮霞、梁琳、张展、续倩、季天荣、王英、林雪贤。

饲料中炔雌醇的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中炔雌醇含量测定的高效液相色谱法。

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炔雌醇的测定。

本方法检出限为 0.05 mg/kg, 定量限为 0.12 mg/kg(添加剂预混合饲料为 0.20 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

饲料中炔雌醇经磷酸乙腈混合液提取, 提取液经液液萃取净化, C_{18} 小柱净化, 洗脱液浓缩至干, 甲醇水溶液溶解、过滤膜, 用高效液相色谱—荧光测定, 外标法定量。

4 试剂和材料

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

4.1 乙腈。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 磷酸。

4.4 正己烷。

4.5 炔雌醇标准品: 纯度 $\geq 98\%$ 。

4.6 50%磷酸: 磷酸(4.3)与等体积水混合。

4.7 0.025%磷酸: 准确吸取 50%磷酸(4.6)0.5 mL, 加水稀释定容至 1 L。

4.8 混合提取液: 0.025%磷酸(4.7)与乙腈(4.1)等体积混合。

4.9 正己烷乙腈饱和液: 取正己烷(4.4)适量, 加入其体积 20%的乙腈(4.1), 涡旋后静置直到溶液分层, 上层溶液为正己烷的乙腈饱和液。

4.10 40%甲醇溶液: 甲醇+水=40+60。

4.11 80%甲醇溶液: 甲醇+水=80+20。

4.12 炔雌醇标准溶液。

4.12.1 炔雌醇标准贮备液(100 mg/L): 称取适量炔雌醇标准品(4.5), 精确至 0.1 mg, 用甲醇(4.2)溶解并配制成 100 mg/L 标准贮备液。该贮备液于 -18°C 保存, 保存期 6 个月。

4.12.2 标准中间液(10.0 mg/L): 准确量取标准贮备液(4.12.1)2.50 mL, 用 80%甲醇水溶液(4.11)溶液稀释并定容至 25.00 mL, 浓度为 10.0 mg/L。该溶液于 4°C 保存, 保存期 1 个月。

4.12.3 标准工作液: 准确吸取标准中间液(4.12.2)0.125 mL、0.250 mL、0.500 mL、1.25 mL、2.50

农业部 2224 号公告—2—2015

mL、5.00 mL,用甲醇水溶液(4.11)稀释定容至 25.00 mL,即配制成浓度为 0.050 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.100 $\mu\text{g/mL}$ 、0.200 $\mu\text{g/mL}$ 、0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。即配即用。

4.13 固相萃取柱(SPE): C_{18} (500 mg/6 mL,70 $\text{\AA}$)或相当者。

4.14 微孔有机滤膜:孔径 0.45 μm 。

5 仪器

除实验室常用仪器设备外,还需要以下设备:

5.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

5.2 旋转蒸发仪或氮吹仪。

5.3 超声波清洗器。

5.4 振荡器。

5.5 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

5.6 固相萃取装置。

6 采样和试样制备

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,装入密闭容器中,备用。

7 分析步骤

7.1 试液的制备

7.1.1 提取

称取适量饲料样品于 50 mL 离心管中(配合饲料试样 5 g,精确至 0.01 g;浓缩饲料和精料补充料 3 g,添加剂预混料称取 1 g,精确至 0.001 g),准确加入磷酸乙腈混合液(4.8)30.00 mL,振荡 5 min,超声提取 20 min,3 500 r/min(离心力 2 200 g)离心 10 min,静置,上清液备用。

7.1.2 净化

7.1.2.1 萃取

准确吸取上清提取液 10.00 mL,加入正己烷乙腈饱和液(4.9)8 mL,涡旋混合 30 s,静置至分层,弃去上层液后,下层液加水 10 mL,混匀,备用。

7.1.2.2 净化

预处理:SPE 柱用 6 mL 甲醇(4.2)、6 mL 40%甲醇溶液(4.10)活化。

净化:萃取液(7.1.2.1)全部通过 SPE 柱,用 40%甲醇溶液(4.10)淋洗 2 次,每次 5 mL,将 SPE 小柱抽干或挤干后,用甲醇(4.2)6 mL 洗脱,收集洗脱液置鸡心瓶中。

7.1.3 浓缩

将洗脱液于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴减压蒸干或氮吹仪吹干,加 80%甲醇溶液(4.11)1.00 mL 复溶,超声辅助溶解,滤膜过滤,供高效液相色谱仪测定。

7.2 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 $^{\circ}\text{C}$ 。

流速:0.9 mL/min。

波长:激发波长 283 nm,发射波长 315 nm。

进样量:20 μL 。

流动相: A: 甲醇, B: 0.025% 磷酸。流动相梯度洗脱程序参见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A(甲醇), %	B(0.025%磷酸), %
0	60	40
6	70	30
11.5	70	30
12	95	5
16	95	5
17	70	30
23	60	40
25	60	40

7.3 测定

取试样溶液和炔雌醇标准工作溶液上机测定, 以保留时间定性, 色谱峰面积定量, 作单点或多点校准, 外标法计算结果。炔雌醇标准溶液色谱图参见附录 A 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

试样中炔雌醇的含量 w , 以质量分数表示, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按(1)式计算。

$$w = \frac{C_{st} \times V_0 \times A \times V_2}{m \times A_{st} \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- w —— 试样中炔雌醇含量, 单位为毫克每千克(mg/kg);
- C_{st} —— 炔雌醇标准溶液的浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- m —— 试样的质量, 单位为克(g);
- A —— 试样溶液峰面积值;
- A_{st} —— 炔雌醇标准溶液峰面积;
- V_0 —— 试样提取液总体积, 单位为毫升(mL);
- V_1 —— 提取液分取体积, 单位为毫升(mL);
- V_2 —— V_1 净化后终复溶体积, 单位为毫升(mL)。

8.1.2 多点校准

试样中炔雌醇的含量 w , 以质量分数表示, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按(2)式计算。

$$w = \frac{C \times V_0 \times V_2}{m \times V_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- w —— 试样中炔雌醇含量, 单位为毫克每千克(mg/kg);
- C —— 由标准曲线得出的试样溶液中炔雌醇的浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- m —— 试样的质量, 单位为克(g);
- V_0 —— 试样提取液总体积, 单位为毫升(mL);
- V_1 —— 提取液分取体积, 单位为毫升(mL);
- V_2 —— V_1 净化后终复溶体积, 单位为毫升(mL)。

8.2 结果表示

测定结果以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 20%。

附 录 A
(资料性附录)
炔雌醇标准溶液色谱图

炔雌醇标准溶液色谱图见图 A. 1。

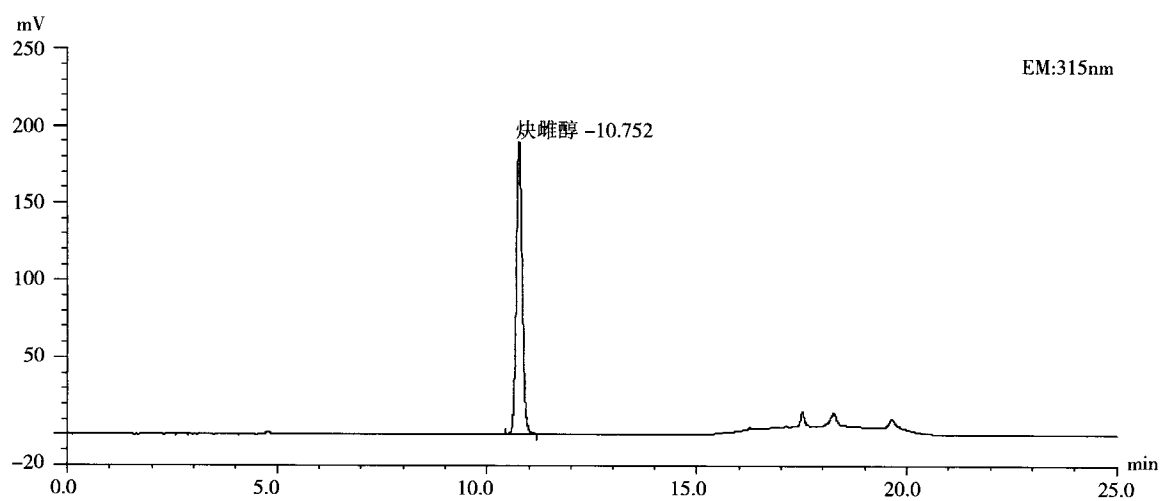


图 A. 1 炔雌醇标准溶液色谱图(2mg/L)