

中华人民共和国国家标准

农业部 2224 号公告—1—2015

饲料中赛地卡霉素的测定 高效液相色谱法

Determination of sedecamycin 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:中国农业科学院农业质量与标准检测技术研究所。

本标准主要起草人:陈刚、朱丹、王凯强、郑晓春、米晓霞、李思聪。

饲料中赛地卡霉素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中赛地卡霉素含量测定的高效液相色谱方法。

本标准适用于配合饲料、添加剂预混合饲料、浓缩饲料及精料补充料中赛地卡霉素的测定。

本方法的检出限为 0.3 mg/kg, 定量限为 1 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

样品用乙腈提取, 硅胶固相萃取柱净化, 高效液相色谱仪配紫外检测器测定, 外标法进行定量。

4 试剂和材料

除另有说明外, 本法所用试剂均为分析纯, 水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 乙腈: 色谱纯。

4.2 赛地卡霉素对照品: 纯度 $\geq 99\%$ 。

4.3 赛地卡霉素标准储备液(1 mg/mL): 称取赛地卡霉素标准品 10 mg(精确到 0.01 mg), 用乙腈(4.1)溶解并定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液。-20℃避光保存, 有效期为 3 个月。

4.4 赛地卡霉素标准工作液: 吸取赛地卡霉素标准储备液适量, 用乙腈(4.1)稀释, 配制成赛地卡霉素浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 2℃~8℃避光保存。现配现用。

4.5 硅胶固相萃取柱(SI): 3 mL, 500 mg 或性能相当者。

4.6 0.22 μm 微孔滤膜(有机相)。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪: 配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2 分析天平: 感量 0.01 mg。

5.3 天平: 感量 0.01 g。

5.4 旋涡混合器。

5.5 振荡器。

5.6 高速冷冻离心机: 转速不低于 12 000 r/min, 可控温范围 4℃。

5.7 氮吹仪。

5.8 固相萃取装置。

5.9 粉碎机。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的样品,四分法缩减取样。按 GB/T 20195 制备试样,粉碎过 0.30 mm 孔径筛,充分混匀。装入密闭容器中,置于-20℃冰柜中避光保存。

6.2 试样保存

制备好的试样装入密闭容器中,置于-20℃冰柜中避光保存。

7 测定步骤

7.1 试样的提取

称取试样 5 g (精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入乙腈(4.1)10.0 mL,充分振荡 15 min,于 12 000 r/min、4℃条件下离心 15 min,转移上清液至 25 mL 容量瓶中。用乙腈(4.1)10 mL 重复提取一次,合并上清液,用乙腈(4.1)定容至刻度,混匀备用。

7.2 净化

硅胶柱(4.5)用乙腈(4.1)3 mL 活化,取上述备用液 5.0 mL 上柱,浓缩饲料和添加剂预混合饲料取上述备用液 0.5 mL 过柱。收集流出液,用乙腈(4.1)2 mL 淋洗,收集洗脱液于离心管中,于 40℃下氮气吹干,残余物用 1.0 mL 乙腈涡旋溶解,经 0.22 μm 滤膜(4.6)过滤后供高效液相色谱(5.1)分析。

7.3 标准曲线的制备

准确吸取赛地卡霉素标准工作液(4.4)适量,用乙腈稀释,配制成赛地卡霉素浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的系列标准溶液。以色谱峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或其相当的色谱柱。

流动相:A:乙腈,B:水。

流速:1.0 mL/min。

检测波长:254 nm。

柱温:30℃。

进样量:20 μL。

流动相梯度及洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A(乙腈),%	B(水),%
0	40	60
12	40	60
13	95	5
17	95	5
17.5	40	60
23.5	40	60

7.4.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液,外标法定量。试样溶液及标准溶液中赛地卡霉素的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。赛地卡霉素标准品色谱图参见图 A.1。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

单点校准试样溶液中赛地卡霉素的浓度 C_i 按式(1)计算:

$$C_i = \frac{A_i C_s}{A_s} \dots\dots\dots (1)$$

或标准曲线校准,由式(2)求得 a 和 b :

$$A_s = aC_s + b \dots\dots\dots (2)$$

则试样溶液中赛地卡霉素的浓度 C_i 按式(3)计算:

$$C_i = \frac{A_i - b}{a} \dots\dots\dots (3)$$

试样中赛地卡霉素含量 X 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(4)计算。

$$X = \frac{C_i V_1 V_2}{m V_3} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

C_i ——试样溶液中赛地卡霉素的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_i ——试样溶液中赛地卡霉素的峰面积;

C_s ——标准溶液(7.3)中赛地卡霉素浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_s ——标准溶液(7.3)中赛地卡霉素的峰面积;

V_1 ——上机前最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——总提取定容液体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——加入 SPE 净化柱的提取液体积,单位为毫升(mL);

m ——称取的试样质量,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,结果保留三位有效数字。

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数平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)
赛地卡霉素色谱图

赛地卡霉素标准溶液色谱图见图 A. 1。

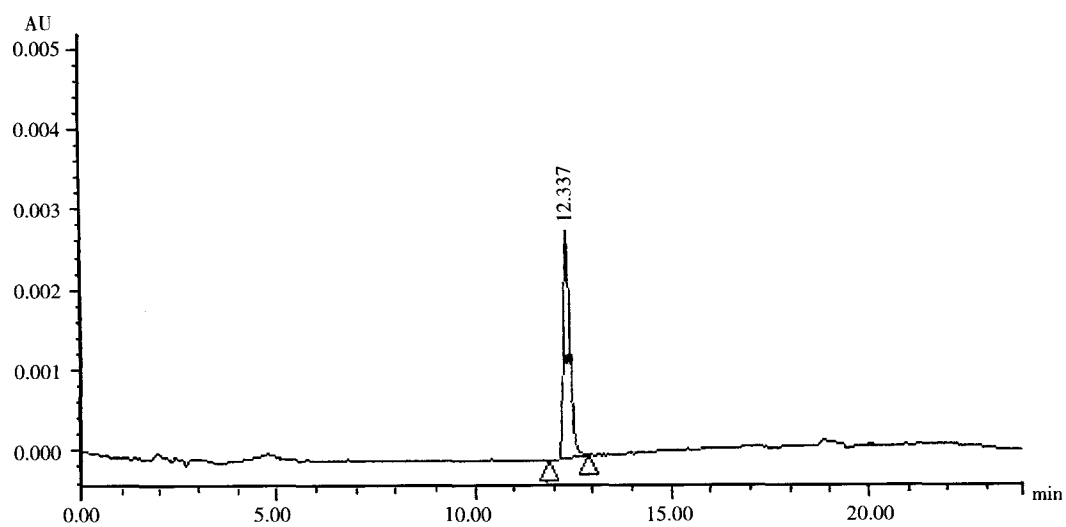


图 A. 1 赛地卡霉素标准溶液色谱图(1 $\mu\text{g/mL}$)