

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1463—2007

饲料中安眠酮的测定 高效液相色谱法

Determination of methaqualone in feeds
by high-performance liquid chromatography

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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：农业部饲料质量监督检验测试中心（济南）、农业部饲料质量监督检验测试中心（西安）。

本标准主要起草人：汤文利、任爱丽、梁萌、徐强、陈淑沂、忽桂香。

饲料中安眠酮的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪(HPLC)测定饲料中安眠酮的检测方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料的检测。方法的定量限为 1.5 mg/kg,检测限为 0.5 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 14699.1 饲料采样

3 原理

在碱性条件下,用三氯甲烷和异丙醇的混合溶液将饲料中的安眠酮提取出来,将提取液蒸至近干,用甲醇溶解残渣,在 HPLC 上分离、测定。

4 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。水符合 GB/T 6682 中一级水和三级水的规定。一般化学分析用三级水,高效液相色谱分析用一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 碳酸钠饱和溶液。

4.4 氯化钠。

4.5 提取液:异丙醇+三氯甲烷=1+3。

4.6 乙酸铵溶液: $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4)=25\text{ mmol/L}$,准确称取 1.927 g 乙酸铵于 1 000 mL 容量瓶中,用一级水溶解、定容,用 $\Phi 0.45\ \mu\text{m}$ 的水相微孔滤膜过滤。

4.7 HPLC 流动相:乙腈(4.1)+乙酸铵溶液(4.6)=30+70,用前超声脱气 5 min。

4.8 安眠酮标准贮备溶液($100\ \mu\text{g/mL}$):准确称取 10.1 mg 安眠酮标准品($\geq 99.0\%$)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)溶解、定容。置于 4℃ 冰箱中保存,有效期 1 个月。

4.9 安眠酮标准工作溶液:分别准确移取安眠酮标准贮备溶液(4.8)1.00 mL、3.00 mL、5.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释、定容,配制标准工作溶液,质量浓度分别为 1.00 mg/L、3.00 mg/L、5.00 mg/L、10.00 mg/L、20.00 mg/L、30.00 mg/L、50.00 mg/L。现用现配。

5 仪器

5.1 实验室用样品粉碎机。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg。

- 5.3 离心机:4 360×g。
- 5.4 超纯水器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 旋涡混合器。
- 5.7 带盖塑料离心管:100 mL。
- 5.8 旋转蒸发器。
- 5.9 高效液相色谱仪,由下述部件组成:
 - 5.9.1 泵,无脉冲,能将流速保持在 0.1 mL/min~2.0 mL/min。
 - 5.9.2 进样系统,进样环体积 20 μL~50 μL。
 - 5.9.3 紫外检测器,适合在波长 226 nm 测定。如可能可使用二极管阵列检测器,其还能用于安眠酮的确证。
 - 5.9.4 工作站。
 - 5.9.5 保护柱:柱长 12.5 mm,内径 4.6 mm,填有粒度为 5 μm 的 C₁₈键合硅胶或质量相当的其他保护柱。
 - 5.9.6 分析柱:柱长 250 mm,内径 4.6 mm,填有粒度为 5 μm 的 C₁₈键合硅胶柱或性能相当的其他分析柱。

分析柱的性能应确保以下条件:

安眠酮的容量因子 $K' \geq 1$ 。

注:容量因子按式(1)计算:

$$K' = \frac{t_R}{t} - 1 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

K' ——容量因子;

t_R ——安眠酮的保留时间,单位为分钟(min);

t ——不保留成分的保留时间,单位为分钟(min)。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定进行采样。选取具有代表性的实验室样品 1 000 g,用四分法缩减分取 200 g 左右,粉碎过 0.45 mm 孔径的筛,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取约 2 g 试料,精确到 0.1 mg,放入离心管(5.7)中,加入氯化钠(4.4)2 g,加入 15 mL 三级水,用碳酸钠饱和溶液(4.3)调 pH 至 10~11。加入 20 mL 提取液(4.5),轻摇数秒;加盖密封,旋涡(5.6)混匀数秒,放气;旋涡混匀 30 s 两次;离心机(5.3)离心 5 min;吸取下层溶液于具塞试管中。再加入提取液 20 mL,重复上述操作,合并两次提取液,旋涡混匀。全部转移到 100 mL 鸡心瓶中,在 50℃下用旋转蒸发器(5.8)蒸发至近干,用 5.00 mL 甲醇溶解残渣,旋涡混匀,使溶液中安眠酮的质量浓度在 1.00 mg/L~50.00 mg/L 之间。否则,需要重新调整溶液的稀释倍数。用 Φ 0.45 μm 的有机微孔滤膜过滤,在高效液相色谱仪(5.9)上进行分离、测定。

7.2 HPLC 分析

7.2.1 色谱条件

流动相流速:1.00 mL/min;

进样量:20 μL ;

检测波长:226 nm。

7.2.2 分析程序

7.2.2.1 向 HPLC 分析仪中连续注入安眠酮工作液(4.9),直至得到基线平稳,峰形对称而且峰高或峰面积能够重现的安眠酮峰,即三个连续测定的峰高或峰面积中最大与最小值之间的差异小于其平均值的5%。

安眠酮峰应是对称的($f_s < 2$)。

注: f_s 为安眠酮峰高10%处,尾半部峰宽与前半部峰宽之商。

两个安眠酮工作液所得色谱峰峰高与浓度之间应有正比例关系。如果偏差大于5%,则需制备新的工作液。

7.2.2.2 依次注入安眠酮工作液(4.9)、五个试样溶液(7.1)和安眠酮工作液(4.9),观察工作液的峰高或峰面积差异不得超过均值的5%。可依此顺序不断加入待测样品。

8 确证

8.1 总则

如果从峰形、测定数值对安眠酮的峰产生了怀疑,或所测定安眠酮含量低于1.5 mg/kg,则应用重叠色谱分析(8.2)或二极管阵列检测器(8.3)来确证。

8.2 重叠色谱法

于样品提取液中加入适量的安眠酮工作液(4.9),加入的量应与提取液中安眠酮的量相当。

依次注入样品提取液、安眠酮工作液和添加了安眠酮的样品提取液。如果添加提取液样品峰的半峰宽变化不大于10%,且峰高或峰面积发生了成比例的变化,则可确证原安眠酮峰就是安眠酮的。

8.3 二极管阵列检测器

8.3.1 条件

测定条件同7.2.1的规定,只是将紫外检测器换为二极管阵列检测器,具体参数如下:

参 数	设 定
测定波长	226 nm
频带宽度	4 nm(即波长 226 nm \pm 2 nm)
参比波长	360 nm
参比频带宽度	100 nm
光谱范围	190 nm~400 nm
光谱值	基线、峰最大值、上升斜率和下降斜率拐点

8.3.2 步骤

HPLC 系统稳定后,依次注入10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的安眠酮工作液(4.9)、有疑问的样品提取液和又一10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的安眠酮工作液(4.9)。记录、存储各个色谱峰的基线、最大值以及峰两侧的拐点数据。

8.3.3 评价

将样品峰不同光谱值(样品—基线)归一化并绘制成图,记录峰值和峰前后的拐点值。分别将样品峰光谱和安眠酮工作液的光谱归一化,并绘图。在峰顶处标示。

8.3.4 确证标准

样品峰只有满足下述条件,才能证实是安眠酮:

- 样品峰的保留时间应与标准峰的保留时间相同(差异 $\leq \pm 5\%$),如有怀疑,需做标准物添加(即将标准物加到样品中)实验。
- 样品峰的纯度评定是基于所记录的峰顶、上升斜率拐点和下降斜率拐点不同光谱的符合程度。

所有光谱图每个波长的相对吸收值应该相等(差异 $\leq 15\%$)。

- c) 波长大于 220 nm、样品光谱图与标准光谱图在相对吸收至少等于 10% 的部分无明显区别,样品峰和标准峰的最大吸收波长相同,即其差异不大于检测系统分辨率决定的范围(一般是 2 nm~4 nm),两个光谱图任一观察点的偏差均不能超过该特定波长下标准测定物吸收值的 15%。

9 结果计算

通过比较试样溶液色谱峰的峰高或峰面积和在样品前后注入的安眠酮工作液的峰高或峰面积的平均值定量。

饲料中安眠酮的含量 X ,以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(2)计算:

$$X = \frac{P_1 \times \rho \times V}{P_2 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- P_1 ——安眠酮试样溶液峰面积的响应值;
- P_2 ——安眠酮标准工作溶液峰面积的响应值;
- ρ ——安眠酮标准工作溶液的浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V ——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试料的质量,单位为克(g)。

每个试样取两份试料进行平行测定,以其算术平均值为测定结果,结果保留三位有效数字。

10 重复性

在同一实验室,由同一操作人员,用同一台仪器完成的两个平行测定结果,相对相差小于 8%。