



中华人民共和国国家标准

GB/T 22261—2008

饲料中维吉尼亚霉素的测定 高效液相色谱法

Determination of virginiamycin in feeds—
High performance liquid chromatography

2008-08-01 发布

2008-11-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：农业部饲料质量监督检验测试中心（南京）。

本标准主要起草人：冯三令、耿士伟、储瑞武、冯群科、贾书静。

饲料中维吉尼亚霉素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中维吉尼亚霉素含量的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中维吉尼亚霉素含量的测定,检出限为 0.5 mg/kg,定量限为 2 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 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料中的维吉尼亚霉素用乙酸乙酯提取出来,提取液经硅胶柱和亲水亲脂平衡型固相萃取柱净化,在高效液相色谱仪(HPLC)反相柱上分离,用紫外检测器(或二极管阵列检测器)在 210 nm 波长处检测,根据维吉尼亚霉素 M_1 和 S_1 峰面积加和值用外标法计算饲料中维吉尼亚霉素的含量。

4 试剂和溶液

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水,色谱用水符合 GB/T 6682 中一级用水规定。

4.1 乙酸乙酯。

4.2 无水硫酸钠。

4.3 正己烷。

4.4 无水乙酸乙酯-正己烷:将乙酸乙酯和正己烷按体积 1+1 混合,通过无水硫酸钠脱水。

4.5 乙腈。

4.6 甲醇。

4.7 乙酸铵缓冲溶液(pH4.0):0.05 mmol/L。称取 3.85 g 无水乙酸铵,溶解于 1 000 mL 水中,用冰乙酸调节 pH 至 4.0。

4.8 甲醇-乙酸铵缓冲溶液:将甲醇和乙酸铵缓冲溶液(4.7)按 1:3 比例混合,摇匀。

4.9 40%甲醇-水溶液:将甲醇和水按 4+6 比例混合,摇匀。

4.10 乙腈:色谱纯,用于配制流动相。

4.11 磷酸。

4.12 流动相:乙腈+水+磷酸=400+600+1,混匀,用前脱气。

4.13 维吉尼亚霉素标准溶液

4.13.1 维吉尼亚霉素标准品:维吉尼亚霉素 M_1 和 S_1 总和不少于 95.0%。

4.13.2 维吉尼亚霉素标准贮备液:准确称取维吉尼亚霉素标准品(4.13.1)100 mg,置于 100 mL 棕色

量瓶中,用乙腈(4.5)溶解定容,摇匀,该溶液中维吉尼亚霉素浓度为1 mg/mL。贮存于4℃冰箱中,有效期三个月。

4.13.3 维吉尼亚霉素标准系列工作液:准确吸取维吉尼亚霉素标准贮备液(4.13.2)置于棕色量瓶中,用流动相(4.12)配制成浓度分别为2、5、10、25、50、100 µg/mL的标准系列工作溶液。贮存于4℃冰箱中,有效期一周。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2 分析天平:感量0.1 mg。

5.3 涡旋混合器。

5.4 超声波水浴仪。

5.5 离心机:4 000 r/min。

5.6 氮吹仪:可控温50℃。

5.7 固相萃取柱

5.7.1 硅胶柱:690 mg/3 mL。

5.7.2 亲水亲脂平衡型固相萃取柱:60 mg/3 mL。

5.8 固相萃取装置。

5.9 pH计。

5.10 0.45 µm微孔滤膜。

6 试样制备

6.1 按GB/T 14699.1采样。

6.2 选取有代表性饲料样品至少500 g,按GB/T 20195制备样品。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样适量(配合饲料、浓缩饲料2 g~5 g,预混料1 g~2 g),精确至1 mg,置于50 mL离心管中,加2 mL水,使试样充分湿润并混匀,加入20 mL乙酸乙酯(4.1),加盖,置涡旋混合器上混匀后,置超声波水浴中超声提取30 min。于离心机上以4 000 r/min离心10 min。

准确吸取10 mL上层乙酸乙酯清液于另一离心管中,加入5 g无水硫酸钠(4.2)和10 mL正己烷(4.3),置涡旋混合器上充分混匀后,于离心机上以4 000 r/min离心10 min,上清液备用。

7.2 净化

用2.5 mL无水乙酸乙酯-正己烷(4.4)预淋洗活化硅胶柱(5.7.1),将上清液(7.1)小心转移入硅胶柱内(保持过柱流速不超过2 mL/min,且不得抽干),用5 mL无水乙酸乙酯-正己烷(4.4)洗涤离心管中无水硫酸钠,洗涤液一并转移入硅胶柱内,抽干,用2 mL乙腈(4.5)淋洗硅胶柱,抽干。

用1 mL甲醇(4.6)和1 mL乙酸铵缓冲溶液(4.7)预淋洗活化亲水亲脂平衡型固相萃取柱(5.7.2),将抽干的硅胶柱安装在亲水亲脂平衡型固相萃取柱(5.7.2)的上面,用5 mL甲醇-乙酸铵缓冲溶液(4.8)淋洗硅胶柱,淋洗液正好通过亲水亲脂平衡型固相萃取柱(5.7.2),保持过柱流速不超过2 mL/min。淋洗完毕后,弃去硅胶柱,用5 mL 40%甲醇-水溶液(4.9)淋洗亲水亲脂平衡型固相萃取柱(5.7.2),弃去淋洗液。最后用5 mL甲醇(4.6)进行洗脱,收集洗脱液,于50℃氮吹仪上蒸发至干,用0.5 mL~5 mL的流动相(4.12)溶解残渣,过0.45 µm微孔滤膜,供上机测定。

7.3 色谱条件

7.3.1 色谱柱: C₁₈柱,长150 mm,内径4.6 mm,粒径5 µm,或相当者。

- 7.3.2 柱温:室温。
- 7.3.3 流动相:同 4.12。
- 7.3.4 流速:1.0 mL/min。
- 7.3.5 检测器:紫外检测器(或二极管阵列检测器),检测波长 210 nm。
- 7.3.6 进样体积:20 μL。

7.4 定量测定

按上述色谱条件,分别将维吉尼亚霉素标准系列工作液(4.13.3)及试样溶液(7.2)上机测定,根据维吉尼亚霉素 M₁ 和 S₁ 峰面积加和值,用外标法定量。

7.5 结果计算

试样中维吉尼亚霉素的含量(X)以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{c_x \times V_1 \times V_3 \times \rho}{m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中维吉尼亚霉素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c_x——试样溶液中 M₁ 和 S₁ 色谱峰面积加和值对应的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V₁——加入试样中的乙酸乙酯总体积,单位为毫升(mL);
- V₃——最终溶解残渣用流动相的体积,单位为毫升(mL);
- ρ——维吉尼亚霉素标准品含量,%;
- m——试样质量,单位为克(g);
- V₂——移取的乙酸乙酯体积,单位为毫升(mL)。

结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性试验条件下两次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附录 A
(资料性附录)
维吉尼亚霉素标准溶液图谱

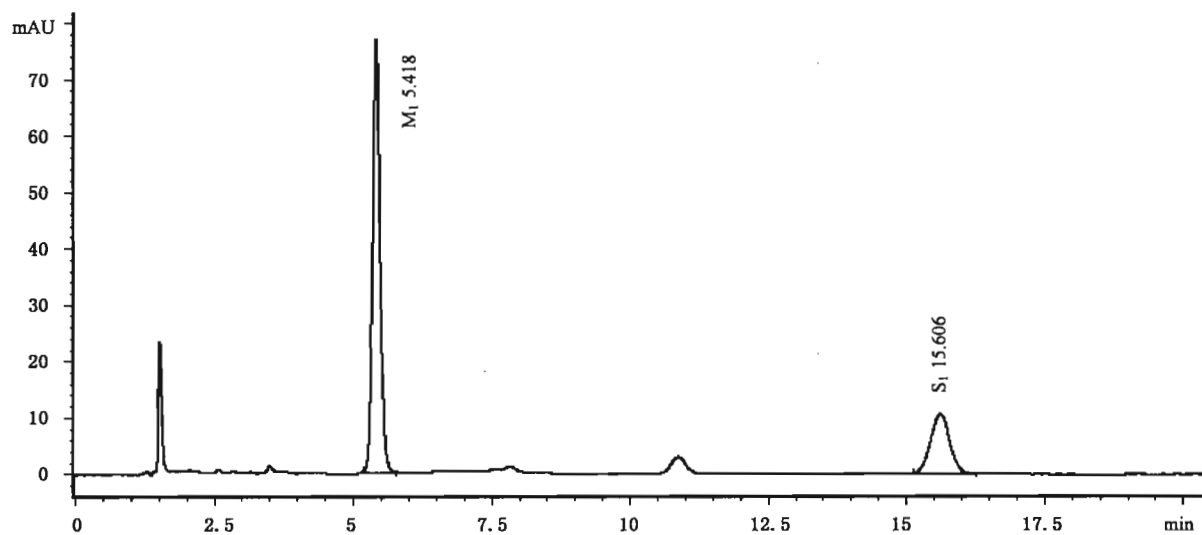


图 A.1 维吉尼亚霉素标准溶液图谱(10 µg/mL)



GB/T 22261-2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 • 1-33926

定价: 10.00 元