

ICS 65.120
B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 934—2005

饲料中地西泮的测定 高效液相色谱法

Determination of diazepam in feeds
High-performance liquid chromatography

2005-09-21 发布

2005-12-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准在参照国内外有关饲料中地西洋的测定方法的基础上,提出用高效液相色谱法(HPLC法)测定饲料中的地西洋。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

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)、国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准主要起草人:汤文利、李俊玲、李有志、徐强、李蔚、门晓冬、苏晓鸥。

饲料中地西洋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测定饲料中地西洋的方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料。最低检测浓度为 1 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,用正己烷与二氯甲烷的混合溶液,将饲料中的地西洋经液液萃取提取出来,再经固相提取、净化,直接在 HPLC 上分离、测定。

4 试剂和材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水符合 GB/T 6682 中一级水和三级水的规定。一般化学分析试验用三级水,高效液相色谱分析和硅酸镁固相萃取小柱的淋洗用一级水。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 碳酸钠溶液: $\rho(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 100 \text{ g/L}$ 。

4.4 提取液:正己烷 + 二氯甲烷 = 7 + 3。

4.5 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,用一级水(4.1)溶解、定容至 1 000 mL,过 0.45 μm 的微孔滤膜。

4.6 HPLC 流动相:乙腈(色谱纯) + 乙酸铵溶液(4.5) = 45 + 55,用前超声脱气 5 min。

4.7 地西洋标准贮备液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确称取 10.1 mg 地西洋标准品($\geq 99.0\%$),用甲醇溶解、定容至 100 mL。

4.8 地西洋标准系列溶液:准确移取地西洋标准贮备液(4.7),用甲醇配制成标准系列溶液 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.9 硅酸镁固相萃取小柱:200 mg/3 mL。液体的过柱速度为成滴滴下。

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:4 000 r/min。

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 高效液相色谱仪:具有 C₁₈柱、紫外检测器和二极管阵列检测器。

6 采样

- 6.1 采样步骤:按 GB/T 14699.1 的规定进行。
- 6.2 试样的制备: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

称取试料约 2 g(精确至 0.1 mg)于离心管(5.7)中,加入三级水(4.1)20 mL,用碳酸钠溶液(4.3)调 pH 至 8~9。

准确加入提取液(4.4)15.00 mL;加入提取液后,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;4 000 r/min(5.3)离心 5 min;吸取上清液于具塞试管中。再准确加入提取液 15.00 mL,重复上述操作,合并两次上清液,旋涡混匀。

7.2 净化

准确移取配合饲料试液(7.1)15.00 mL、浓缩饲料试液(7.1)6.00 mL、添加剂预混合饲料试液(7.1)3.00 mL,注入已用甲醇 2 mL(4.2)和提取液 3 mL 处理过的硅酸镁固相萃取小柱(4.9),用一级水 3 mL 淋洗,再准确移取甲醇 2.00 mL 洗脱,收集洗脱液。调整洗脱液的用量,使洗脱液中地西洋的浓度在 1.00 μg/mL~50.0 μg/mL 之间。旋涡混匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,上 HPLC 测定。

7.3 HPLC 测定参数的设定

色谱柱:C₁₈柱,柱长 250 mm,内径 4.0 mm,粒度 5 μm 或性能类似的分析柱。

柱温:室温。

流动相:乙腈+乙酸铵溶液=45+55(4.6)。

流速:1.00 mL/min。

检测器:紫外检测器和二极管阵列检测器。

检测波长:254 nm。

进样量:20 μL。

7.4 定性定量方法

7.4.1 定性方法

除用保留时间定性外,还必须用二极管阵列检测器测定地西洋紫外光区的特征光谱,即在 201 nm、229 nm、254 nm、317 nm 处有四个依次变低的吸收峰。

7.4.2 定量方法

用紫外检测器或二极管阵列检测器测定标准系列溶液(4.8)和试料溶液(7.2)中地西洋峰面积的响应值,用多点校准法定量。

8 结果计算

饲料中地西洋的含量 X,以毫克每千克(mg/kg)表示,按公式(1)计算:

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

式中:

A —— 试料溶液中地西洋峰面积的响应值对应的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V_1 —— 加入提取液的总体积,单位为毫升(mL);

V_2 —— 甲醇洗脱液的总体积,单位为毫升(mL);

m —— 试料的质量,单位为克(g);

V_3 —— 移取试液上硅酸镁固相萃取小柱的体积, mL 。

每个试样取两份试料进行平行测定,以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果,结果保留三位有效数字。

9 重复性

在同一实验室,由同一操作人员完成的两个平行测定结果,相对偏差不大于 10%。