

ICS 65.120
B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1457—2007

饲料中氟哌酸的测定 ——高效液相色谱法

**Determination of norfloxacin in feeds
——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。

本标准负责起草单位：中国农业科学院饲料研究所。

本标准起草人：满晨、干小英、刘庆生、邱华勇。

饲料中氟哌酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中氟哌酸的测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中氟哌酸含量的测定。方法检出限 0.005 g/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

在酸性条件下,饲料中的氟哌酸用乙酸和甲醇的混合溶液液液萃取,经固相萃取柱净化,HPLC 仪测定。

4 试剂和材料

以下所用试剂,除特别注明外,均为分析纯试剂。水为符合 GB/T 6682 的二级水。

- 4.1 氟哌酸标准品:1-乙基-6-氟-1,4-二氢-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸(含量 \geq 99%)。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 50%甲醇溶液:取 50 mL 甲醇(4.2)用水稀释至 100 mL。
- 4.5 35%甲醇溶液:取 35 mL 甲醇(4.2)用水稀释至 100 mL。
- 4.6 4%乙酸溶液:取 4 mL 乙酸用水稀释至 100 mL。
- 4.7 提取液:取 50 mL 50%甲醇溶液(4.4)与 50 mL 4%乙酸溶液(4.6)混合。
- 4.8 碳酸钠溶液:100 g/L。
- 4.9 盐酸溶液: $C(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。
- 4.10 氢氧化钠溶液:20 g/L。
- 4.11 20%氨水:取 8 mL 氨水用水稀释至 100 mL。
- 4.12 磷酸二氢钾溶液: $C(\text{KH}_2\text{PO}_4)=100 \text{ mmol/L}$,称取 13.6 g 磷酸二氢钾,用水溶解并稀释至 1 000 mL,用磷酸调至 pH3~4,过 0.45 μm 滤膜。
- 4.13 MAX 洗脱液:35%甲醇溶液(4.5)用 4%乙酸溶液(4.6)调至 pH3~4。
- 4.14 MCX 洗脱液(10%氢氧化铵甲醇溶液):取 40 mL 氨水用甲醇(4.2)稀释至 100 mL。
- 4.15 HPLC 流动相:取 850 mL 磷酸二氢钾溶液(4.12)与 150 mL 乙腈(4.3),混合均匀。

4.16 氟哌酸标准贮备液:

称取 0.025 0 g 氟哌酸标准品,用甲醇(4.2)溶解并定容至 100 mL,该溶液的浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期一个月)。

4.17 氟哌酸标准工作液:

准确移取标准贮备液(4.16)2.0 mL,用甲醇(4.2)稀释并定容至 25 mL,该溶液的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d)。

4.18 氟哌酸标准系列溶液:

移取氟哌酸标准工作液(4.17)0.2 mL,0.5 mL,1.0 mL,4.0 mL,8.0 mL,10.0 mL 分别用甲醇(4.2)稀释并定容至 10 mL。其相应浓度分别为:0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,8.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,16.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。现配现用。

5 仪器设备

常用的实验室仪器设备:

- 5.1 分析天平:感量 0.1 mg。
- 5.2 离心机:离心力 4 000 \times g。
- 5.3 恒温水浴和氮吹仪。
- 5.4 旋涡混合器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 带盖塑料离心管:50 mL。
- 5.7 广泛 pH 试纸。
- 5.8 高效液相色谱仪。
- 5.9 阴离子交换固相萃取柱,3 mL/60 mg,30 μm 。
- 5.10 阳离子交换固相萃取柱,3 mL/60 mg,30 μm 。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 采集实验室样品约 500 g,粉碎,使之全部过 0.28 mm 筛,充分混匀,贮于磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取适量试样(配合饲料 2 g \sim 5 g、浓缩饲料 1 g \sim 2 g、添加剂预混合饲料 1 g \sim 2 g),精确至 0.001 g。置离心管中,加入提取液(4.7)10 mL,轻摇约 10 s,加盖密封,旋涡混匀约 10 s,放气,旋涡混匀 30 s 两次,4 000 r/min 离心 10 min,上清液置于 100 mL 容量瓶中。再分别用 10 mL 提取液(4.7)重复提取两次,合并上清液,用碳酸钠溶液(4.8)调至 pH6 \sim 7。用甲醇(4.2)稀释并定容,摇匀,并通过中速定性滤纸,待用。

配合饲料用移液管量取滤液 4.0 mL 于 60°C 水浴中用氮气吹至约 1 mL(浓缩饲料、添加剂预混合饲料用移液管量取滤液 2.0 mL 于 60°C 水浴中用氮气吹至约 0.5 mL),加 2 mL 盐酸溶液(4.9)溶解,置超声波中超声 30 s,并旋涡混合约 10 s,备用。

7.2 净化

备用液(7.1)注入已用 1 mL 甲醇(4.2)、1 mL 氢氧化钠溶液(4.10)和 1 mL 水活化过的 MAX 小柱,流速不超过 1 mL/min,先用 0.5 mL 2% 氨水(4.11)淋洗,再用 0.5 mL 甲醇(4.2)淋洗,然后用 MAX

洗脱液(4.13)6 mL 洗脱,挤干;收集洗脱液,注入已用 3 mL 甲醇处理过的 MCX 小柱,流速不超过 1 mL/min,用 6 mL 甲醇(4.2)淋洗,MCX 洗脱液(4.14)1.5 mL 洗脱,挤干,收集洗脱液,用 MAX 洗脱液(4.13)中和至 pH6~7,用甲醇(4.2)稀释并定容至 10 mL,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,备用。

7.3 测定

7.3.1 HPLC 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 型柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm 或性能类似的分析柱。

柱温: 30℃。

流动相: 取 850 mL 磷酸二氢钾溶液(4.12)与 150 mL 乙腈(4.3),混合均匀,流速: 1.0 mL/min。

检测器: 紫外检测器或二极管阵列检测器。

检测波长: 278 nm。

进样量: 20 μL。

7.3.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,向液相色谱柱中注入欲测定的氟哌酸标准系列溶液(4.18)和试样溶液(7.2),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量。

8 测定结果的计算

8.1 试样中氟哌酸的含量(W_i),以质量分数毫克每克(mg/g)表示,按式(1)计算:

$$W_i = \frac{P_i \times V \times C_i \times V_s}{P_s \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_i ——试样溶液峰面积值;

V ——试样的总稀释体积,单位为毫升(mL);

C_i ——标准溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V_s ——标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

P_s ——标准溶液峰面积值;

m ——试样质量,单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL)。

8.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

同一分析者对同一试样于同一实验室的同一台仪器同时两次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。