

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2896—2022

代替 NY/T 2896—2016

饲料中斑螫黄的测定 高效液相色谱法

Determination of canthaxanthin in feeds—
High performance liquid chromatography

2022-07-11 发布

2022-10-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 2896—2016《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》，与 NY/T 2896—2016 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了原理(见第 4 章,2016 年版的第 3 章)；
- b) 更改了试样溶液制备,配合饲料和浓缩饲料增加了 HLB 固相萃取柱净化处理(见 8.1,2016 年版的 7.1)；
- c) 增加了定性(见 8.3.2)；
- d) 更改了试验数据处理(见第 9 章,2016 年版的第 8 章)；
- e) 更改了精密度(见第 10 章,2016 年版的第 9 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：浙江大学、帝斯曼(中国)有限公司。

本文件主要起草人：王凤芹、汪以真、路则庆、刘波静、冯杰、余东游、张进、虞哲高、肖平、曹进平、董信阳、陆梅、赵贵。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2016 年首次发布为 NY/T 2896—2016；

——本次为第一次修订。

饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了饲料中斑蝥黄的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中斑蝥黄的测定。

本文件的检出限为 0.16 mg/kg, 定量限为 0.40 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中斑蝥黄经水分散、乙醇和二氯甲烷提取、净化,反相高效液相色谱测定,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 二氯甲烷。

5.3 无水乙醇。

5.4 乙腈:色谱纯。

5.5 乙腈水溶液:取 50 mL 乙腈(5.4),用水(5.1)定容至 100 mL,混匀。

5.6 斑蝥黄标准储备溶液:称取斑蝥黄标准品(CAS号:514-78-3,纯度 $\geq 95\%$)适量(约 12.5 mg,精确至 0.01 mg),用二氯甲烷(5.2)溶解,转移至 50 mL 棕色容量瓶中定容,摇匀。-18℃以下玻璃容器中避光储存,有效期不超过 1 个月。

注:斑蝥黄标准品在保存过程中,易发生氧化,应该严格按照说明书给定条件保存。

5.7 斑蝥黄标准系列工作溶液:取适量斑蝥黄标准储备溶液(5.6)用乙腈(5.4)稀释,分别配制成浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作溶液。现用现配。

5.8 亲水亲脂平衡(HLB)固相萃取柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.9 微孔滤膜:0.45 μm ,有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外可见光检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

- 6.4 超声波清洗仪。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 氮吹仪。

7 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,避光密闭保存。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

8.1.1 配合饲料和浓缩饲料

8.1.1.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 5 g,精确至 0.1 mg,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 15 mL 60 °C 左右的水,于 60 °C 水浴超声 5 min。加入 50 mL 无水乙醇(5.3)和 30 mL 二氯甲烷(5.2),摇匀,常温水浴超声 20 min。冷却至室温后,用二氯甲烷(5.2)定容(V),摇匀。取部分提取液置离心管中,于 8 000 r/min 离心 5 min,准确吸取上清液 5 mL(V₁)到 10 mL 离心管中,于 50 °C 水浴氮气吹干,用 3 mL 乙腈(5.4)复溶,再加入 3 mL 水,涡旋混匀,备用。

8.1.1.2 净化

HLB 小柱(5.8)先用 3 mL 乙腈(5.4)和 3 mL 水活化,备用液(8.1.1.1)过柱,先用 1 mL 乙腈(5.4)洗涤离心管,再加入 1 mL 水洗涤,洗涤液过柱。用 5 mL 乙腈水溶液(5.5)淋洗 HLB 小柱,抽干。用 3 mL 乙腈(5.4)洗脱,收集洗脱液于 50 °C 水浴氮气吹干,准确加入 0.5 mL(V₂)乙腈(5.4)复溶,过微孔滤膜(5.9),备用。

8.1.2 添加剂预混合饲料

8.1.2.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2.5 g,精确至 0.1 mg,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 15 mL 60 °C 左右的水,于 60 °C 水浴超声 5 min。加入 50 mL 无水乙醇(5.3)和 30 mL 二氯甲烷(5.2),摇匀,常温水浴超声 20 min。冷却至室温后,用二氯甲烷(5.2)定容(V),摇匀。备用。

8.1.2.2 稀释

取部分提取液(8.1.2.1)至离心管中,于 8 000 r/min 离心 5 min,准确吸取上清液 5 mL(V₁),用乙腈(5.4)稀释到线性范围内进行测定。

8.2 液相色谱参考条件

色谱柱:C₁₈,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者;

柱温:30 °C;

检测波长:474 nm;

流动相:乙腈+水=95+5;

流速:1.2 mL/min;

进样量:20 μL。

8.3 测定

8.3.1 标准系列工作溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下,依次测定试剂空白、斑蝥黄标准系列工作溶液(5.7)和试样溶液(8.1.1.2 或/和 8.1.2.2)。斑蝥黄标准溶液色谱图见附录 A。

8.3.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中斑蝥黄保留时间应与标准系列中浓度相当的标准溶液的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.3 定量

以斑蝥黄标准品浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中色谱峰面积应在标准系列工作溶液测定的线性范围内。如超出线性范围,应将试样溶液用乙腈进一步稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中斑蝥黄的浓度与标准系列工作溶液的浓度相差不超过 30%。

注:色谱峰面积指反式斑蝥黄峰面积与 1.3 倍的顺式斑蝥黄峰面积之和,1.3 为顺式斑蝥黄对反式斑蝥黄的校正因子。

9 试验数据处理

试样中斑蝥黄的含量(顺反式斑蝥黄总量)以质量分数表示,多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算。

$$\omega = \frac{\rho_1 \times V \times V_2 \times n}{V_1 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω —— 试样中斑蝥黄含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ_1 —— 由标准工作曲线得到的试样溶液中斑蝥黄的浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V —— 提取液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 净化后最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 用于净化的提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- n —— 稀释倍数;
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

$$\omega = \frac{A_1 \times \rho_2 \times V \times V_2 \times n}{A_2 \times V_1 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_1 —— 试样中斑蝥黄色谱峰面积;
- ρ_2 —— 标准溶液中斑蝥黄浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- A_2 —— 标准溶液中斑蝥黄色谱峰面积。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性)
斑蝥黄标准溶液色谱图

斑蝥黄标准溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)色谱图见图 A.1。

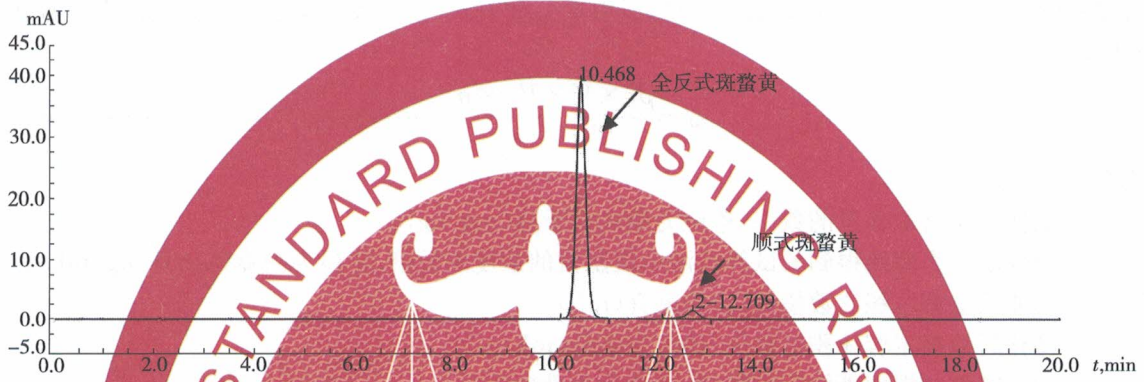


图 A.1 斑蝥黄标准溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)色谱图

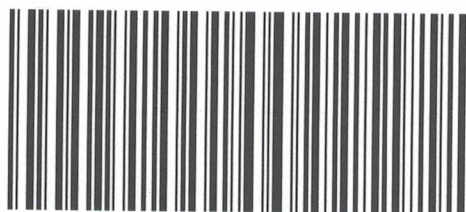
中华人民共和国
农业行业标准
饲料中斑螫黄的测定 高效液相色谱法
NY/T 2896—2022

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2022年8月第1版 2022年8月北京第1次印刷
书号: 16109·9090
定价: 24.00 元



NY/T 2896—2022

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261