ICS

备案号：

DB34

安　徽　省　地　方　标　准

DB 34/T xxx-2019

饲料中恩拉霉素的测定
高效液相色谱法

Determination of Chlorogenic acid in feed
High performance liquid chromatography method

（征求意见稿）

2019-XX-XX 发布　　2019-XX-XX 实施

安徽省质量技术监督局 发布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。
本标准由安徽省兽药饲料监察所提出。
本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。
本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所、宣州区畜牧兽医管理局等。
本标准起草人：蔡一杰等。

饲料中恩拉霉素含量测定
高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中恩拉霉素含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中恩拉霉素含量测定。

本标准定量限为 1.0 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）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 14699.1 饲料采样

3 原理

试样中的恩拉霉素经流动相溶液超声提取，过滤后经色谱柱分离，用高效液相紫外检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 除特殊说明外，本方法所用试剂均为分析纯，用水符合 GB/T 6682 中一级用水的规定。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 磷酸二氢钠。

4.4 丙酮。

4.5 盐酸。

4.6 流动相：0.05mol/L 磷酸二氢钠+乙腈，按体积比 70:30（v/v）。

4.7 稀释液：丙酮-2mol/L 盐酸-水（20:1:21）

4.8 恩拉霉素标准品：纯度≥98.0%。

4.9 恩拉霉素标准溶液的制备

4.9.1 恩拉霉素标准溶液贮备液：精确称取 20mg 恩拉霉素标准品(精确至 0.01mg)于 100 mL 容量瓶中，用稀释液（4.7）溶解，冷却，此溶液浓度为 200 μg/mL。此溶液现配现用。

4.9.2 恩拉霉素标准工作溶液：分别吸取贮备液（4.9.1）1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL 于 200 mL 容量瓶中，用稀释液（4.7）定容，标准工作溶液系列浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。

5.2 分析天平：感量 0.1 mg、0.01 mg。

5.3 离心机：≥3000 r/min。

5.4 超声波仪。

5.5 分析筛：孔径 0.42 mm。

5.6 粉碎机。

5.7 微孔滤膜：孔径 0.45 μm 尼龙滤膜。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 规定采样，选取饲料样品 500 g 以上，四分法缩减至 100 g，磨碎，全部通过分析筛(5.5)，充分混匀，装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 称取试样适量（配合饲料 5.0 g、浓缩饲料 3.0 g、预混合饲料 1.0 g），精确至 0.001g，置于 100 mL 容量瓶中，用稀释液（4.7）准确定容，置于超声波仪（5.4）超声提取 30 min。

7.1.2 将试样提取液（7.1.1）转移至离心管，3000 r/min，离心 10 min，取离心上清液用 0.45 μm 尼龙滤膜过滤，滤液作为试样溶液上机测定。

7.2 测定

7.2.1 高效液相色谱条件

色谱柱：C_{18}型柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或相当性能 C_{18}柱；

检测波长：267nm；

流动相：0.05mol/L 磷酸二氢钠+乙腈，按体积比 70:30（v/v）；

流速：1.0 mL/min；

柱温：25℃；

进样体积：10 μL。

7.2.2 上机测定

恩拉霉素标准工作溶液和试液（上机液）分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积进行计算。

7.3 结果的计算与表述

7.3.1 计算公式

结果按式(1)计算：

$$X=\frac{C\times V}{m}\times f \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X---试样中恩拉霉素含量，单位为毫克/每千克（mg/kg）；

C---试液色谱峰对应的恩拉霉素浓度，单位为微克/每毫升（μg/mL）；

m---试样质量，单位为克（g）；

V---定容体积，单位为毫升（mL）

f---稀释倍数。

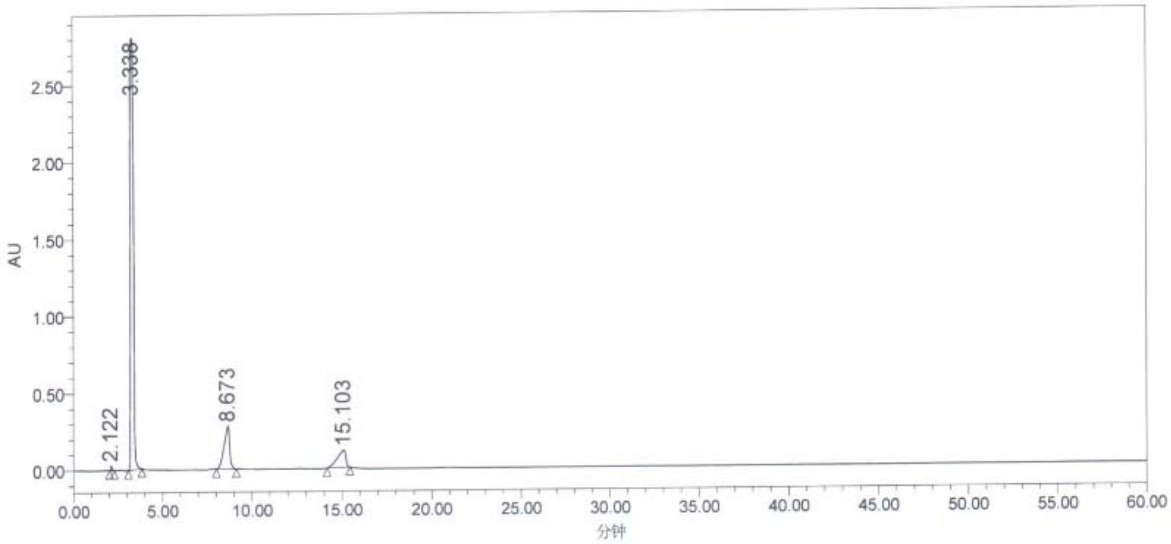
7.3.2 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示，计算结果保留 3 位有效数字。

8 精密度

同一分析者对同一试样同时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）
恩拉霉素标准图谱



图A.恩拉霉素标准溶液色谱图