

中华人民共和国国家标准

农业部 1068 号公告—2—2008

饲料中 5 种糖皮质激素的测定 高效液相色谱法

Determination of 5 kinds of glucocorticoids in feeds
High-performance liquid chromatography

2008-07-25 发布

2008-07-25 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所〔国家饲料质量监督检验中心（北京）〕、河南省饲料产品监督检验站、农业部饲料质量监督检验中心（济南）。

本标准主要起草人：李兰、索德成、班付国、谭旭信、杜红鸽、贾振民、吴宁鹏、刘素梅、任爱丽、李俊玲。

饲料中 5 种糖皮质激素的测定 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配合饲料中的 5 种糖皮质激素。

本标准适用于配合饲料中泼尼松、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松的测定。

方法最低检出限：泼尼松龙、甲基泼尼松龙为 0.5 mg/kg；醋酸可的松、倍氯米松、氟氢可的松为 1.0 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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中糖皮质激素经甲醇振荡提取，再经活性炭吸附柱、氨基柱串联净化后注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离，用紫外检测器测定。

4 试剂和溶液

除非另有规定，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级用水。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 甲醇：分析纯。

4.4 二氯甲烷：分析纯。

4.5 流动相：溶剂 A—水；溶剂 B—乙腈。

4.6 淋洗液：15% 甲醇水。

4.7 洗脱液：二氯甲烷/甲醇（7+3）。

4.8 糖皮质激素标准品：泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松的纯度均应大于 95%。

4.9 糖皮质激素标准溶液

4.9.1 糖皮质激素标准贮备液：分别准确称取已知纯度的泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松标准品各 50 mg，精确至 0.000 1 g，分别置于 50 mL 棕色容量瓶中，加甲醇（4.2）超声使之完全溶解，并定容至刻度，摇匀，该溶液中泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松浓度均为 1 mg/mL，于 -20℃ 保存可使用 3 个月。

4.9.2 糖皮质激素标准混合中间液：分别准确移取泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟

氢可的松标准贮备液(4.9.1)各 5 mL,置于 50 mL 棕色容量瓶中,甲醇(4.2)定容至刻度。该溶液中泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$,于 -20°C 保存可使用 1 个月。

4.9.3 糖皮质激素标准混合工作液:准确移取糖皮质激素标准中间液(4.9.2)1.0 mL、2.5 mL、5.0 mL、10.0 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,此时溶液中各种糖皮质激素的浓度分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 。于 -20°C 保存,可使用 2 周。

5 仪器和设备

5.1 实验室常用仪器和设备。

5.2 电子天平:感量 0.000 1 g 和 0.001 g。

5.3 涡轮混合器。

5.4 振荡器。

5.5 离心机:12 000 r/min~15 000 r/min(离心力为 17 212 g~26 895 g)。

5.6 旋转蒸发器。

5.7 SPE 活性炭吸附柱:500 mg/6 mL。

5.8 SPE 氨基柱:500 mg/6 mL。

5.9 氮吹仪。

5.10 针头过滤器:备孔径为 0.45 μm 有机微孔滤膜。

5.11 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采样。按 GB/T 20195 制备样品。

7 分析步骤

7.1 试液的制备

7.1.1 提取

称取配合饲料 5 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 15 mL 的甲醇(4.3),于涡轮混合器(5.3)涡旋混合 30s,于振荡器(5.4)振荡提取 20 min。于离心机(5.5)上以 17 212 g 的离心力离心,上清液转移至 50 mL 旋转蒸发瓶中。重复上述步骤提取、离心、转移一次,合并两次上清液备用。

7.1.2 浓缩

于旋转蒸发器(5.6)上 $40^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 将(7.1.1)中的液体全部蒸干(避免爆沸)。加入 4 mL 甲醇(4.3),于超声波超声 30 s 溶解残渣,再加入 16 mL 水,混合超声 30 s,充分混合,转移至另一支 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,以 26 895 g 的离心力离心 5 min,上清液备用。

7.1.3 净化

用 6 mL 二氯甲烷(4.4)、6 mL 甲醇(4.3)、6 mL 水活化活性炭吸附柱(5.7)。准确加入(7.1.2)中的试液 10 mL,加入 3 mL 淋洗液(4.6)淋洗小柱,抽干小柱约 30 min。用 6 mL 二氯甲烷/甲醇(7+3)活化氨基柱(5.8),将氨基柱串联在活性炭吸附柱下方。加入 6 mL 洗脱液(4.7)洗脱串接小柱并收集洗脱液,氮吹仪(5.9) 50°C 氮气吹干,加入 0.5 mL 甲醇(4.3)溶解,过滤膜(5.10)上液相色谱仪(5.11)测定。

注:对高含量的样品,应调整过柱体积,保证活性炭吸附柱上组分的量小于 35 μg 。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱条件

色谱柱:具有 C₁₈ 填料的柱子(粒度为 5 μm),柱长 250 mm,内径 4.6 mm。

流动相:以 1.0 mL/min 流速梯度洗脱。梯度条件见表 1。

进样量:20 μL。

柱温:30℃。

检测器:紫外检测器,检测波长 254 nm。

表 1 洗脱梯度表

时间, min	溶剂 A, %	溶剂 B, %
8.00	70	30
16.00	50	50
22.00	70	30
25.00	10	90
28.00	70	30

7.2.2 定量测定

7.2.2.1 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糖皮质激素标准混合工作液(4.9.3)及试液(7.1.3),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量。

7.2.2.2 结果计算

试样中每种糖皮质激素的含量 w_i ,以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$w_i = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_i ——试样溶液峰面积值;

V ——样品的总稀释体积,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_{st} ——标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

P_{st} ——标准溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g);

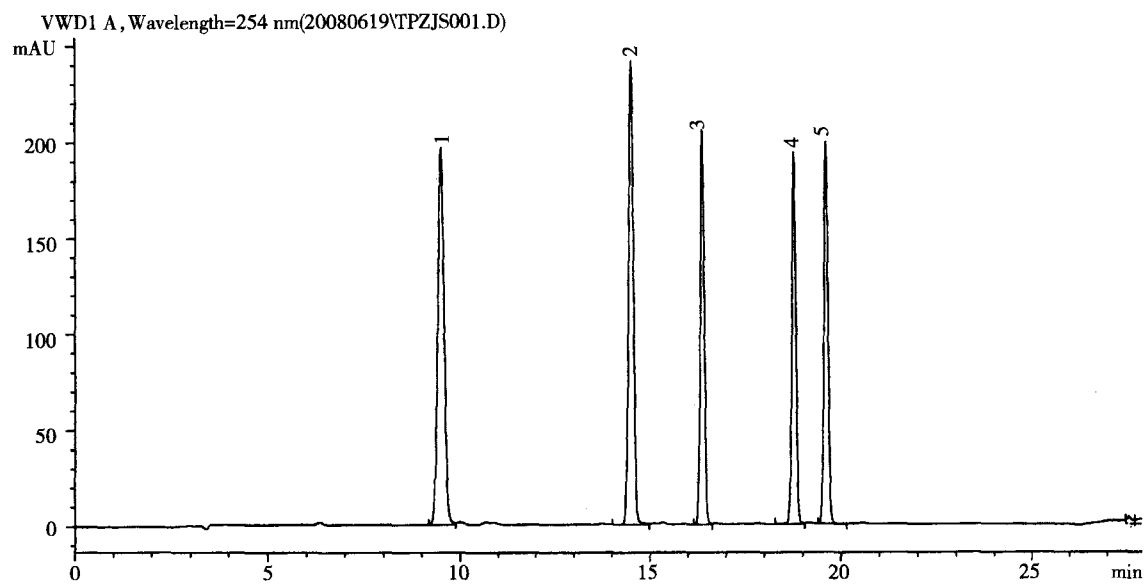
V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL)。

7.2.3 平行测定结果用算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

8 重复性

同一分析者对同一试样同时 2 次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附录 A
(资料性附录)
5 种糖皮质激素出峰顺序



- 1——泼尼松龙；
- 2——醋酸可的松；
- 3——甲基泼尼松龙；
- 4——倍氯米松；
- 5——氟氢可的松。

