

ICS 65.120

B 54

备案号:

DB33

浙 江 省 地 方 标 准

DB33/T 745—2009

饲料中甲基睾酮的测定 高效液相色谱法

Determination of Methyltestosterone in Feeds
High Performance Liquid chromatography

2009-04-07 发布

2009-05-07 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准附录A为资料性附录。

本标准由浙江省海洋与渔业局提出并归口。

本标准起草单位：浙江省水产质量检测中心。

本标准主要起草人：王扬、叶磊海、宋琍琍、张海琪、郑重莺、马文俊、何丰。

1 范围

本标准规定了饲料中甲基睾酮的液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料中甲基睾酮的测定。

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

用甲醇水溶液提取饲料中甲基睾酮，石油醚脱脂，固相萃取柱净化，高效液相色谱法检测，外标法定量。

4 试剂与材料

本标准所用试剂，除特别注明外，均为分析纯试剂。实验用水应符合GB/T 6682中二级水标准。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 石油醚。

4.3 磷酸。

4.4 95%甲醇溶液：准确量取 95mL 甲醇（4.1）和 5mL 水，将水加入甲醇搅拌均匀。

4.5 磷酸水溶液：准确量取 1mL 磷酸和 600mL 水，将磷酸加入水搅拌均匀。

4.6 甲基睾酮（ $C_{20}H_{30}O_2$ ）：已知质量分数 $\geq 99.0\%$ 。

4.7 标准储备液：精确称取甲基睾酮 0.010 0g，用甲醇溶解配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液。-4℃保存。有效期 6 个月。

4.8 标准工作液：临用时，分别用流动相稀释成各质量浓度的标准溶液。

4.9 中性氧化铝固相萃取柱：3mL，500mg。

4.10 滤膜：四氟乙烯膜，孔径 0.45 μ m。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱仪：配紫外检测器。

5.2 电子分析天平：感量 0.01g 和 0.000 1g。

5.3 标准筛：孔径 1 mm。

5.4 恒温振荡器。

5.5 离心机：5000 r/min。

5.6 氮气吹干仪。

5.7 固相萃取装置。

5.8 旋涡混匀器。

5.9 聚丙烯离心管：50mL。

5.10 玻璃离心管：10mL。

6 色谱条件

6.1 色谱柱：C18，5μm，250mm×4.6mm（i.d.）。

6.2 柱温：30℃。

6.3 流动相：Φ 甲醇+磷酸水溶液（4.5）=72+28。

6.4 流速：0.8mL/min。

6.5 进样量：20 μ L。

6.6 检测器波长：254nm。

7 分析步骤

7.1 试样制备

按GB/T14699.1的规定选取有代表性的样品200g~500g，用四分法缩至100g，粉碎使之全部通过1mm孔筛，充分混匀，贮于磨口瓶中于干燥避光处保存。

7.2 提取

称取约5.00g试样（精确到0.01 g），于50mL聚丙烯离心管中，加入20mL甲醇水溶液（4.4）和5mL的石油醚（4.2），加塞剧烈振荡1min后置恒温振荡器（5.4）上，30℃振荡提取15min，5000r/min离心10分钟，弃去上层石油醚层，准确吸取甲醇水溶液层2mL于10mL具塞玻璃离心管中，再加0.3mL水。

7.3 净化

加3mL的石油醚至上述离心管中，加塞剧烈旋涡振荡1min，静置分层，弃去上层石油醚层，下层加入3mL石油醚按上述方法再洗涤一次。下层甲醇液经中性氧化铝柱（预先1mL甲醇活化平衡好），流入10mL玻璃离心管中，再用2mL甲醇冲洗柱子，冲洗液并入离心管中，40℃下氮气吹干，用1.0mL流动相定容，经膜（4.10）过滤，上机分析。若溶液中甲基睾酮含量超出线性范围可以用流动相稀释后测定。

7.4 工作曲线

按设定的色谱条件（6），待仪器稳定后，分别注入20μL浓度为0.05~5.0 μ g/mL标准工作液于高效液相色谱仪中，按设定的色谱条件进行检测分析，以峰面积为纵坐标，以标准样品中甲基睾酮含量为横坐标，绘制工作曲线。

7.5 色谱测定

取试样滤液20μL进样，记录峰面积，响应值均应在上述标准曲线的线性范围之内。分别从工作曲线查得样品提取液中甲基睾酮含量。根据标准品的保留时间定性，外标法定量。

注：甲基睾酮的标准品（0.1 μ g/mL）和仔猪前期配合饲料加标4mg/kg的色谱图参见附录A。

8 结果计算与表述

试样中甲基睾酮的含量按下式计算：

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

式中：

X——试样中甲基睾酮的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C——试样溶液中甲基睾酮的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

f——稀释倍数；

m——试样质量，单位为克（g）。

结果表述：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留至小数点后两位。

9 方法定量限和回收率、精密度

9.1 方法定量限

本方法的定量限为2mg/kg。

9.2 回收率

在本实验方法和条件下，测定其加标回收率在70%~120%。

9.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 A
(资料性附录)
甲基睾丸酮的色谱分析图

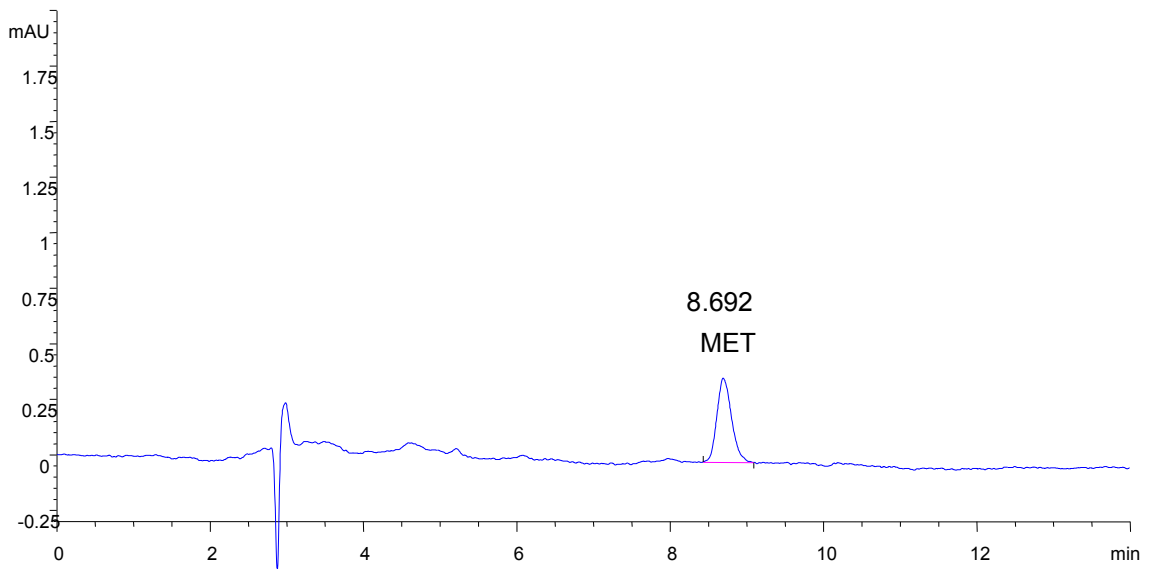


图 A.1 甲基睾丸酮的标准品色谱图 (0.1 µg/mL)

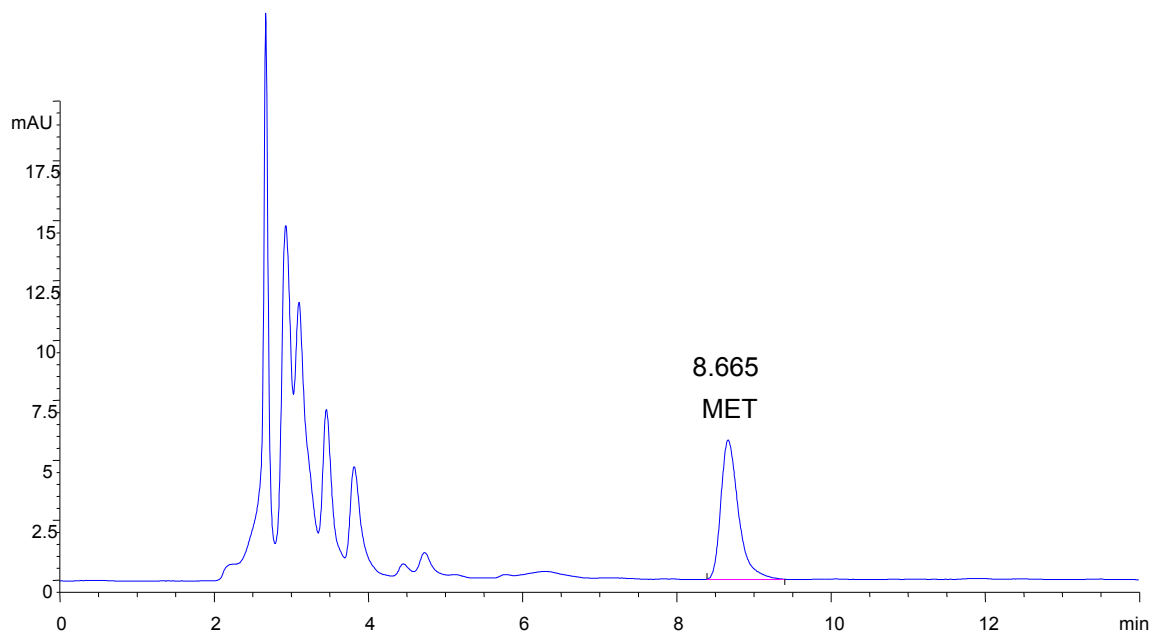


图 A.2 仔猪前期配合饲料加标 4mg/kg 的色谱图