

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3139—2017

饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法

Determination of levamisole in feeds—
High performance liquid chromatography

2017-12-22 发布

2018-06-01 实施

中华人民共和国农业部 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(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量监督检验测试中心(广州)。

本标准主要起草人:林海丹、吴荔琴、廖雁平、江庆娣、陈运勤、伍宏凯、邓国东。

饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中左旋咪唑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、精料补充料及添加剂预混合饲料中左旋咪唑的测定。

本标准中左旋咪唑在配合饲料中的检出限为 0.2 mg/kg, 定量限为 0.5 mg/kg; 在浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料中的检出限为 0.4 mg/kg, 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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料中左旋咪唑在碱性环境下, 用乙酸乙酯提取, 取部分提取液氮气吹干, 流动相定容, 正己烷净化, 高效液相色谱仪测定, 外标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明, 所用试剂均为分析纯, 实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 盐酸左旋咪唑对照品: 纯度 $\geq 98.5\%$ 。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 甲醇: 色谱纯。

4.4 乙酸乙酯。

4.5 正己烷。

4.6 5 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取氢氧化钠 40 g, 用水溶解并稀释至 200 mL, 混匀即得。

4.7 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液: 称取无水磷酸二氢钠 2.40 g, 用水溶解并稀释至 1 000 mL, 混匀即得。

4.8 流动相: 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液+乙腈=75+25(V+V)。

4.9 左旋咪唑标准储备溶液: 准确称取盐酸左旋咪唑对照品(4.1)11.78 mg(相当于左旋咪唑 10 mg, 精确至 0.01 mg), 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇(4.3)溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 标准储备溶液。该储备溶液于 2℃~8℃保存, 保存期 6 个月。

4.10 左旋咪唑标准工作溶液: 准确量取左旋咪唑标准储备溶液(4.9)1 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇(4.3)溶解并定容至刻度, 配制成 0.1 mg/mL 标准工作溶液。该工作溶液于 2℃~8℃保存, 保存期 3 个月。

4.11 pH 试纸: 范围 9~14。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪: 配二极管阵列检测器。

- 5.2 分析天平:感量 0.001 g;感量 0.01 mg。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 氮吹仪。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 振荡器。
- 5.7 涡旋混合器。
- 5.8 高速离心机:转速为 12 000 r/min 及以上。
- 5.9 微孔滤膜:0.45 μm ,有机相。

6 采样和试样的制备

按照 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的样品,四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 的规定制备试样,粉碎后过 0.45 mm 孔径筛,充分混匀,装入密闭容器中备用。

7 分析步骤

7.1 样品提取

称取配合饲料 2 g(浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料 1 g,精确到 0.001 g)样品于 50 mL 离心管中,加水 10 mL,用 5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.6)调 pH 至 12~13。涡旋混匀 1 min,超声 20 min,准确加入乙酸乙酯(4.4)20.0 mL,振荡 30 min,以 6 500 r/min 离心 5 min。准确移取上清液 5.0 mL 于试管中,置于 50℃氮气吹干。准确加入流动相(4.8)2.00 mL 超声溶解,加入正己烷(4.5)2 mL,涡旋 1 min,静置分层。取下层液,高速离心 12 000 r/min 离心 10 min,过滤膜(5.9)作为试样溶液,上机测定。

7.2 标准曲线制备

准确量取左旋咪唑标准工作溶液(4.10)适量,用流动相(4.8)逐级稀释配制成浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,供高效液相色谱分析。以色谱峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程。

8 测定

8.1 液相色谱参考条件

色谱柱:SCX 柱(强阳离子交换柱),柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ;或性能相当者;

流动相:0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液+乙腈=75+25(V+V);

流速:1.0 mL/min;

检测波长:215 nm;

进样量:20 μL ;

柱温:30℃。

8.2 定性测定

在仪器最佳工作条件下,试样中待测物的保留时间与左旋咪唑标准溶液中对应的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且二者光谱图一致,则可判定试样中存在对应的待测物。光谱图参见附录 A 中的图 A.1。

8.3 定量测定

按照上述液相色谱条件测定试样溶液和标准溶液,以色谱峰面积进行单点或多点校正定量,试样溶液中待测物的响应值应在仪器测定的线性范围内。标准溶液的高效液相色谱图参见图 A.2。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

9.1.1 单点校准

试样中左旋咪唑的含量 X ，以质量分数表示，单位为毫克每千克(mg/kg)，按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X —— 试样中左旋咪唑的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；
- C_s —— 标准溶液中左旋咪唑的浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；
- A —— 试样溶液中左旋咪唑的峰面积；
- A_s —— 标准溶液中左旋咪唑的峰面积；
- V —— 净化后定容的体积，单位为毫升(mL)；
- m —— 试样的质量，单位为克(g)；
- f —— 稀释倍数。

9.1.2 多点校准

试样中左旋咪唑的含量 X ，以质量分数表示，单位为毫克每千克(mg/kg)，按式(2)计算。

$$X = \frac{C_x \times V}{m} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- C_x —— 由标准曲线得出的试样溶液中左旋咪唑的浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

9.2 结果表示

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

10 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

左旋咪唑标准溶液光谱图和色谱图

A.1 左旋咪唑标准溶液光谱图

见图 A.1。

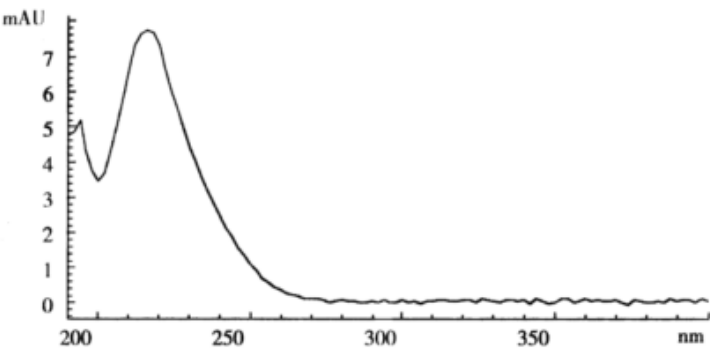


图 A.1 左旋咪唑标准溶液光谱图

A.2 左旋咪唑标准溶液色谱图

见图 A.2。

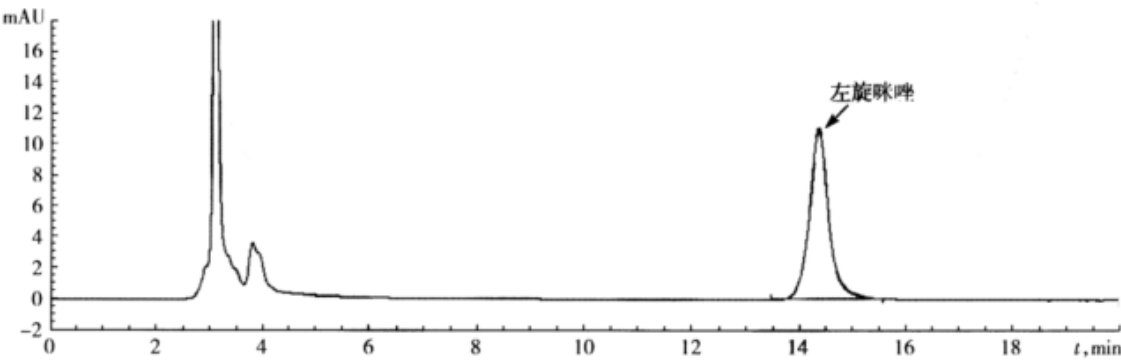


图 A.2 左旋咪唑标准溶液(2.0 µg/mL)色谱图