

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3140—2017

饲料中苯乙醇胺A的测定 高效液相色谱法

Determination of phenylethanolamine A 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(成都)。

本标准主要起草人:张静、赵立军、程传民、陈红、高庆军、王宇萍、李云。

饲料中苯乙醇胺 A 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中苯乙醇胺 A 的高效液相色谱测定法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中苯乙醇胺 A 的测定。

本标准方法的检出限为 1.0 mg/kg, 定量限为 2.0 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

农业部 1486 号公告—1—2010 饲料中苯乙醇胺 A 的测定 高效液相色谱—串联质谱法

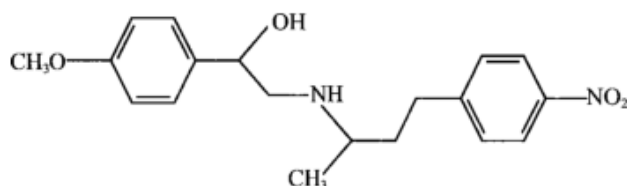
3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

苯乙醇胺 A phenylethanolamine A

化学名称为 2-[4-(4-硝基苯基)丁基-2-基氨基]-1-(4-甲氧基苯基)乙醇, 俗称克伦巴胺。分子量为 344.17, 分子式 $C_{19}H_{24}N_2O_4$, 英文名称 2-[4-(nitrophenyl)butan-2-ylamino]-1-(4-methoxyphenyl) ethanol。化学结构式如下:



4 原理

试样中的苯乙醇胺 A 经甲酸甲醇溶液提取、固相萃取柱净化后, 用高效液相色谱仪进行测定, 外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明, 所有试剂均为分析纯, 实验室用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

5.1 乙腈: 色谱纯。

5.2 甲醇。

5.3 甲酸: 优级纯。

5.4 苯乙醇胺 A 对照品: 纯度 $\geq 95\%$ 。

5.5 0.1% 甲酸溶液: 取甲酸 1.0 mL 加水定容至 1 000 mL, 摇匀即得。

- 5.6 甲酸甲醇溶液:取甲酸 0.1 mL,加入甲醇定容至 100 mL,摇匀即得。
- 5.7 稀释液:取 0.1%甲酸溶液(5.6)80 mL,加乙腈至 100 mL,摇匀即得。
- 5.8 氨化甲醇溶液:取氨水 5 mL,加入甲醇至 100 mL,摇匀即得。
- 5.9 标准储备溶液:100 $\mu\text{g/mL}$,准确称取苯乙醇胺 A 50 mg(精确到 0.1 mg),用甲醇配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液,−18℃避光保存备用,有效期为 6 个月。
- 5.10 标准工作溶液:用稀释液(5.7)稀释标准储备溶液(5.9),配制成浓度范围为 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液,4℃避光保存,有效期 1 个月。
- 5.11 混合型阳离子固相萃取柱:3 mL,60 mg;或相当的分析柱。
- 5.12 微孔滤膜:0.45 μm ,有机相。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 6.2 天平:感量 1 mg。
- 6.3 分析天平:感量 0.1 mg。
- 6.4 离心机:转速为 5 000 r/min 及以上。
- 6.5 超声水浴。
- 6.6 涡旋混合器。
- 6.7 固相萃取装置。
- 6.8 氮吹装置。

7 试样制备

按照 GB/T 14699.1 的规定,抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 的规定制备样品,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光常温保存,备用。

8 测定步骤

8.1 提取

称取饲料试样 2 g(精确到 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,准确加入甲酸甲醇溶液(5.6)20.0 mL,涡旋混合 30 s,超声提取 20 min,期间摇动 2 次;取出后,于离心机上 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

8.2 净化

固相萃取柱(5.11)分别用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化,准确移取上清液(8.1)5.0 mL 过柱,分别用水 3 mL、甲醇 3 mL 淋洗,近干后用氨化甲醇溶液(5.8)3 mL 洗脱。收集洗脱液,在氮吹装置上 50℃下用氮气吹干。准确加入稀释液(5.7)1.0 mL 溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,供高效液相色谱仪测定。

8.3 测定

8.3.1 高效液相色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm ;或性能相当的分析柱;

柱温:30℃;

流动相 A 为 0.1%甲酸溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱,梯度见表 1;

流速:1.0 mL/min;

进样量:20 μL ;

检测波长:276 nm。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间,min	流动相 A,%	流动相 B,%
0.00	80	20
10.00	60	40
10.10	80	20
18.00	80	20

8.3.2 定性测定

在仪器最佳工作条件下,样品中待测物的保留时间与苯乙醇胺 A 标准工作溶液中对应的保留时间相对偏差在±2.5%之内,则可判定样品中存在对应的待测物。如需进一步确认,可按农业部 1486 号公告—1—2010 的规定检测。

8.3.3 定量测定

按照上述液相色谱条件测定样品溶液和标准工作溶液,以色谱峰面积进行单点或多点校正定量,样品溶液中待测物的响应值应在仪器测定的线性范围内。苯乙醇胺 A 标准工作溶液色谱图参见附录 A。

9 结果计算

试样中苯乙醇胺 A 的含量 X,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),单点校正按式(1)计算。

$$X = \frac{P_i \times C_s \times V \times n}{P_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——试样中苯乙醇胺 A 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- P_i ——试样溶液峰面积值;
- C_s ——标准工作溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- P_s ——标准工作溶液峰面积值;
- m ——称取试样的质量,单位为克(g);
- V ——上机前定容体积,单位为毫升(mL);
- n ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

多点校正按式(2)计算。

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

式中:

- C_x ——标准曲线上查得的试样中苯乙醇胺 A 的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL)。

测定结果用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)

苯乙醇胺 A 标准工作溶液的高效液相色谱图

苯乙醇胺 A 标准工作溶液色谱图见图 A. 1。

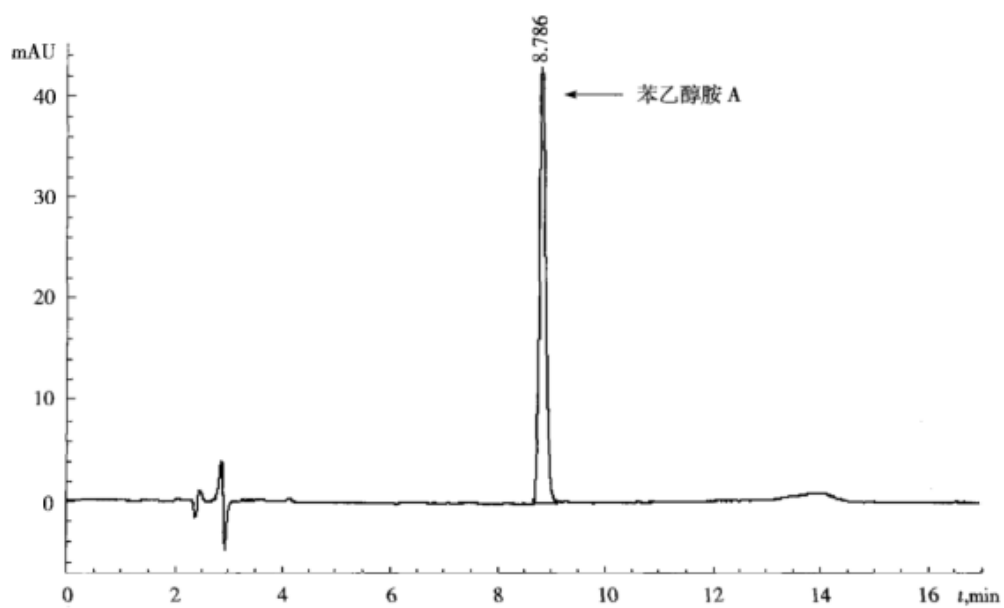


图 A. 1 苯乙醇胺 A 标准工作溶液(10 µg/mL)的高效液相色谱图