

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T××××—××××

代替NY/T 3139-2017

## 饲料中左旋咪唑的测定

Determination of levamisole in feeds

(公开征求意见稿)

(本稿完成日期: 2024-09-20)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 3139-2017《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》，与 NY/T 3139-2017 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了适用范围（见第 1 章，2017 年版的 1）；
- 增加了液相色谱-串联质谱测定方法（见第 4 章）；
- 更改了高效液相色谱法的原理（见 5.1，2017 年版的 3）；
- 更改了高效液相色谱法的提取和净化方法（见 5.5.1，5.5.2，2017 年版的 7.1）；
- 更改了高效液相色谱参考条件（见 5.5.3.1，2017 年版的 8.1）；
- 更改了高效液相色谱法的试验数据处理（见 5.6，2017 年版的 9）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司、深圳市绿诗源生物技术有限公司。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2017 年首次发布为 NY/T 3139-2017；
- 本次为第一次修订。

# 饲料中左旋咪唑的测定

## 1 范围

本文件描述了饲料中左旋咪唑的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中左旋咪唑的测定。

本文件液相色谱-串联质谱法的检出限均为0.02 mg/kg，定量限均为0.05 mg/kg；高效液相色谱法中配合饲料的检出限为0.2 mg/kg，定量限为0.5 mg/kg，浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂的检出限为0.4 mg/kg，定量限为1 mg/kg。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20195 动物饲料 试样的制备

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 液相色谱-串联质谱法（仲裁法）

### 4.1 原理

试样中的左旋咪唑在碱性条件下用乙酸乙酯提取，经正己烷脱脂净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

### 4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.4 甲酸铵：色谱纯。

4.2.5 乙腈：色谱纯。

4.2.6 甲酸：色谱纯。

4.2.7 乙酸乙酯。

4.2.8 正己烷。

4.2.9 氨水。

4.2.10 复溶液：准确移取10 mL乙腈（4.2.5），加入0.1 mL甲酸（4.2.6），用水稀释、定容至100 mL，混匀。

4.2.11 0.05mol/L 甲酸铵溶液：准确称取 3.15g 甲酸铵（4.2.4）于 1L 容量瓶中，用水溶解并定容，混匀。

4.2.12 标准储备溶液（1000 µg/mL）：准确称取盐酸左旋咪唑（CAS: 16595-80-5，纯度≥98%）标准品适量（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（4.2.2）溶解并定容，混匀。于-18 ℃以下保存，有效期为 6 个月。如所用标准品为相应的盐，应折算成有效成份。或购买有证标准溶液。

4.2.13 标准中间溶液（10 µg/mL）：准确移取0.1mL标准储备溶液（4.2.12）于10 mL容量瓶中，用甲醇（4.2.2）稀释并定容，混匀。于-18 ℃以下保存，有效期为3个月。

4.2.14 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液(4.2.13)，用甲醇（4.2.2）稀释、定容、混匀，配制成质量浓度分别为: 0.01 µg /mL、0.05 µg /mL、0.1 µg /mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg /mL的标准系列溶液。临用现配。

4.2.15 微孔滤膜：0.22 µm，有机系。

### 4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱：配有电喷雾离子源。

4.3.2 分析天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。

4.3.3 涡旋混合器。

4.3.4 超声波清洗机。

4.3.5 振荡器。

4.3.6 离心机：转速不低于 10000 r/min。

4.3.7 可控温度氮吹仪：45±2℃。

### 4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中保存，备用。选取与待测样品类型相同，均匀一致，且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品，作为空白样品。

### 4.5 试验步骤

#### 4.5.1 试样制备

平行做 2 份试验。配合饲料称取 2 g（浓缩饲料、精料补充饲料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂 1 g），精确至 0.01g，于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 水、0.5 mL 氨水（4.2.9）和 10 mL 乙酸乙酯（4.2.7），涡旋混匀 1 min，振荡提取 20 min。于 8000 r/min 离心 5 min。取上清液于另一支离心管中，残渣用 10 mL 乙酸乙酯（4.2.7）重复提取 1 次，合并上清液，混匀。准确移取 2 mL 上清液于 10 mL 离心管中，于 45℃水浴氮气吹至近干，准确加入 5 mL 复溶液（4.2.10）溶解，加入 3mL 正己烷（4.2.8），超声 1 min，于 10000 r/min 离心 5min，吸取下层溶液，过微孔滤膜（4.2.15），待测。

#### 4.5.2 基质匹配标准系列溶液的制备

称取空白试样，按照 4.5.1 处理得到空白基质溶液。取适量的标准系列溶液（4.2.14），用氮气吹至近干，用 1 mL 空白基质溶液溶解，混匀，配制成质量浓度分别为 1 ng /mL、5 ng /mL、10ng /mL、50ng /mL、100ng /mL、200ng /mL、500ng /mL，基质匹配标准系列溶液。

#### 4.5.3 测定

##### 4.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.7 µm，或性能相当者；

b) 柱温：40 ℃；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 进样量：5 µL；

e) 流动相：A 相为 0.05mol/L 甲酸铵溶液（4.2.11）；B 相为乙腈（4.2.5）。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A 相, %	B 相, %
0.0	90	10
1.5	90	10
2.5	20	80
4.0	20	80
4.1	90	10
7.0	90	10

#### 4.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI<sup>+</sup>）；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 毛细管电压：4.5 kV；
- d) 离子源温度：400 °C；
- e) 脱溶剂温度：526 °C；
- f) 干燥气流量：氮气 600 L/Hr；
- g) 左旋咪唑的定性、定量离子对及其他参考质谱条件等见表 2。

表 2 左旋咪唑的定性、定量离子对及其他参考质谱条件

待测物名称	监测离子对, m/z	Q <sub>1</sub> 电压, V	碰撞能量, eV	Q <sub>3</sub> 电压, V
左旋咪唑	205.2>178.1 <sup>a</sup>	-20	21	-20
	205.2>123.1	-23	28	-23
<sup>a</sup> 为定量离子。				

#### 4.5.3.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液（4.5.2）和试样溶液（4.5.1）上机测定。左旋咪唑标准溶液定量离子色谱图见附录 A。

#### 4.5.3.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中左旋咪唑的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中左旋咪唑定性离子的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在左旋咪唑。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
最大允许偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

#### 4.5.3.5 定量

以基质匹配标准系列溶液的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于0.99。试样溶液与标准溶液中左旋咪唑的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线

性范围，应减少称样量或减少分取体积后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中左旋咪唑的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

#### 4.6 试验数据处理

试样中左旋咪唑的含量  $w$  以质量分数计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示。多点校准按公式 (1) 计算，单点校准按公式 (2) 计算：

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho$ —从标准曲线查得的试样溶液中左旋咪唑的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

$V_1$ —试样提取溶液的总体积，单位为毫升 (mL)；

$V_3$ —试样定容的体积，单位为毫升 (mL)；

$m$ —试样的质量，单位为克 (g)；

$V_2$ —用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)。

$$w = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A$ —试样溶液中左旋咪唑的峰面积；

$V_1$ —试样提取溶液的总体积，单位为毫升 (mL)；

$V_3$ —试样定容的体积，单位为毫升 (mL)；

$\rho$ —标准溶液中左旋咪唑的浓度，单位为微克每升 ( $\mu\text{g/L}$ )；

$A_s$ —标准溶液中左旋咪唑的峰面积；

$V_2$ —用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)；

$m$ —试样的质量，单位为克 (g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

#### 4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

### 5 高效液相色谱法

#### 5.1 原理

试样中的左旋咪唑在碱性条件下用乙酸乙酯提取，经混合型阳离子交换固相萃取柱净化后，用高效液相色谱仪检测，外标法定量。

#### 5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 甲醇：色谱纯。

5.2.3 甲酸铵：色谱纯。

5.2.4 甲酸：色谱纯。

5.2.5 乙酸乙酯。

5.2.6 正己烷。

- 5.2.7 氨水。
- 5.2.8 0.1 mol/L 盐酸溶液：准确量取 8.33 mL 盐酸，用水稀释定容至 1000 mL，混匀。。
- 5.2.9 5%氨水甲醇溶液：移取 5 mL 氨水（5.2.7），用甲醇（5.2.2）稀释、定容至 100 mL，混匀。
- 5.2.10 复溶液：准确量取 20mL 甲醇（5.2.2）和 0.1mL 甲酸（5.2.4），用水稀释、定容至 100 mL，混匀。
- 5.2.11 0.05 mol/L 甲酸铵溶液（含 0.1%甲酸）：准确称取 3.15 g 甲酸铵（5.2.3）于 1 L 容量瓶中，加入 1 mL 甲酸（5.2.4），用水溶解并定容，混匀。
- 5.2.12 标准储备溶液（1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：准确称取盐酸左旋咪唑（CAS: 16595-80-5，纯度 $\geq 98\%$ ）标准品适量（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2）溶解并定容，混匀。于-18  $^{\circ}\text{C}$  以下保存，有效期为 6 个月。如所用标准品为相应的盐，应折算成有效成份。或购买有证标准溶液。
- 5.2.13 标准中间溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：准确移取 1 mL 标准储备溶液（5.2.12）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2）稀释、定容。于-18  $^{\circ}\text{C}$  以下保存，有效期为 3 个月。
- 5.2.14 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液(4.2.13)，用复溶液（5.2.10）稀释、定容，配成质量浓度分别为：0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准系列溶液，临用现配。
- 5.2.15 混合型阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL，或性能相当者。
- 5.2.16 微孔滤膜：0.45  $\mu\text{m}$ ，有机系。

### 5.3 仪器设备

- 5.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器/二极管阵列检测器。
- 5.3.2 分析天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。
- 5.3.3 涡旋混合器。
- 5.3.4 可控温度氮吹仪：45 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3.5 振荡器。
- 5.3.6 超声清洗机。
- 5.3.7 离心机：转速不低于 10000 r/min。
- 5.3.8 固相萃取装置。

### 5.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，至少约 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中保存，备用。

### 5.5 试验步骤

#### 5.5.1 提取

平行做 2 份试验。配合饲料称取 2 g（浓缩饲料、精料补充饲料和添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂各 1 g），精确至 0.01 g，于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 水、0.5 mL 氨水（5.2.7）和 10 mL 乙酸乙酯（5.2.5），涡旋混匀 1 min，振荡提取 20 min。于 8000 r/min 离心 5 min。取上清液于 50 mL 离心管中，残渣用 10 mL 乙酸乙酯（5.2.5）重复提取 1 次，合并上清液，混匀。准确移取 10 mL 上清液于 50 mL 离心管中，于 45 $^{\circ}\text{C}$  水浴氮气吹至近干。准确加入 10 mL 盐酸溶液（5.2.8），涡旋溶解，再加入 5 mL 正己烷，摇动数次脱脂，10000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，得到试样溶液，待净化。

#### 5.5.2 净化

固相萃取小柱（5.2.15）依次用 3 mL 甲醇（5.2.2）和 3 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液（5.2.8）活化，准确移取 5 mL 试样溶液（5.5.1）过柱，分别用 3 mL 水和 3 mL 甲醇（5.2.2）淋洗。抽干。用 3 mL 氨水甲醇溶液（5.2.9）洗脱（流速约 1 滴/3s），收集洗脱液于 45 $^{\circ}\text{C}$  水浴氮气吹至近干，准确加入 1 mL 复溶

液（5.2.10），超声 1 min，涡旋混匀 30 s，过微孔滤膜（5.2.16），待测。

### 5.5.3 测定

#### 5.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5.0 μm；或性能相当者；
- b) 流动相：0.05 mol/L 甲酸铵溶液（含 0.1% 甲酸）（5.2.11）+ 甲醇（5.2.2）= 82+18（V/V）；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：35 ℃；
- e) 进样量：20 μL；
- f) 检测波长：215 nm。

#### 5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.2.14）和试样溶液（5.5.2）上机测定。左旋咪唑标准溶液的液相色谱图见附录 B。

#### 5.5.3.3 定性

在相同实验条件下，试样溶液中待测物保留时间应与质量浓度相近的标准系列溶液中左旋咪唑的保留时间一致，其相对偏差在 ±2.5% 之内。

#### 5.5.3.4 定量

以标准系列溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中左旋咪唑的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样溶液用复溶液（5.2.10）稀释（稀释倍数 *n*）至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中左旋咪唑的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

## 5.6 试验数据处理

试样中左旋咪唑的含量 *w* 以质量分数计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（3）计算，单点校准按公式（4）计算：

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$\rho$ ——从标准曲线查得的试样溶液中左旋咪唑的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$V_1$ ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

$V_3$ ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）；

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times \rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$A$ ——试样溶液中左旋咪唑的峰面积；

$\rho$ ——标准溶液中左旋咪唑的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$V_1$ ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

$V_3$ ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；



$A_s$ ——标准溶液中左旋咪唑的峰面积；

$V_2$ ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）；

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

### 5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 15%。

附录 A  
(资料性)  
左旋咪唑标准溶液的定量离子色谱图

左旋咪唑标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。

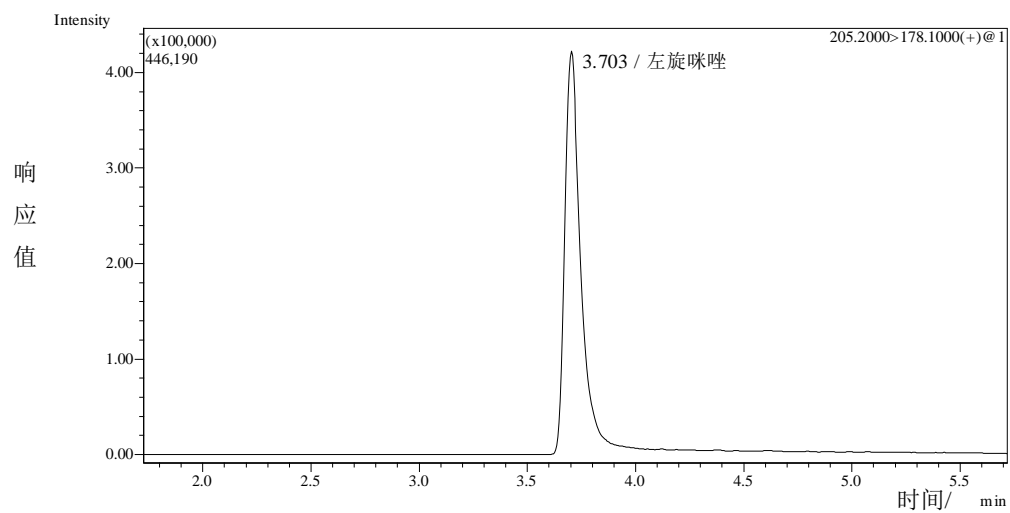


图 A.1 左旋咪唑标准溶液 (10 ng/mL) 的定量离子色谱图

附录 B  
(资料性)  
左旋咪唑标准溶液的液相色谱图

左旋咪唑标准溶液的液相色谱图见图 B.1。

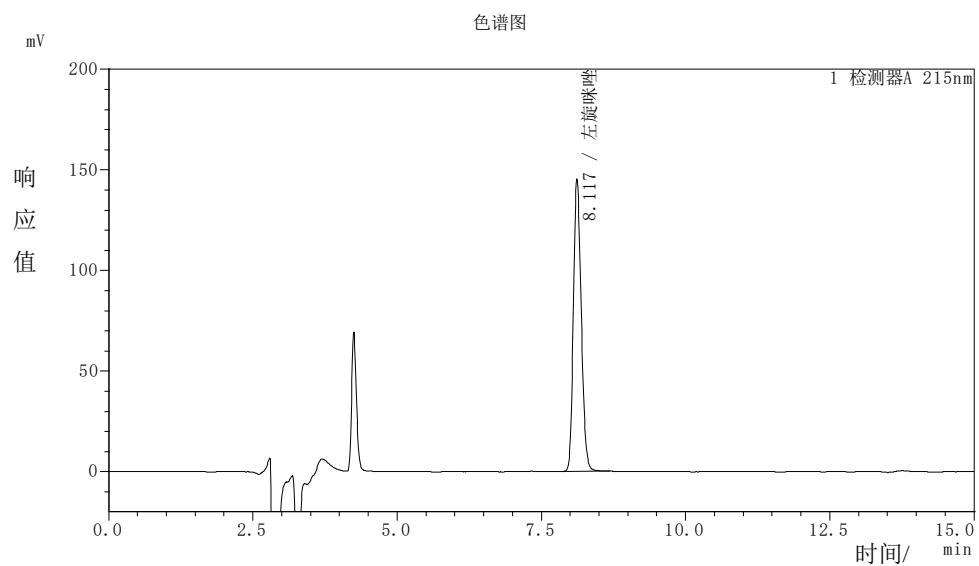


图 B.1 左旋咪唑标准溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的液相色谱图