

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY361-2022

饲料中环丙氨嗪的测定 高效液相色谱法

Determination of cyromazine in feeds—High performance liquid chromatographic method

2022-12-28 发布

2022-12-28 实施

湖南省农业农村厅 发布

目 次

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 原理	2
5 试剂和材料	2
6 仪器和设备	3
7 试样制备与保存	3
8 试验步骤	3
9 结果计算	4
10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度	5
附录 A	6

前 言

本文件按照《湖南省农业技术规程制修订与发布管理规范》相关规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出，省农业农村标准化技术委员会技术归口。

本文件起草单位：湖南省兽药饲料监察所，农业农村部畜禽产品质量安全监督检验测试中心（长沙），湖南省水产科学研究所，湖南省农产品质量检验检测中心，永州市零陵区畜牧水产事务中心，娄底市畜禽水产品质量安全检测中心，长沙市农产品质量监测中心，邵阳县畜牧水产事务中心。

本文件主要起草人：谭美英，隆雪明，周灿，易建希，周卫国，彭椒华，徐丽君，范叶，杨彦宁，周玉洁，张港，欧海军，关静渊，陈福华，江燕，邓均红，冯晚霞，余桐，贺磊，张永勇。

饲料中环丙氨嗪的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了饲料中环丙氨嗪的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料及添加剂预混合饲料中环丙氨嗪的测定。

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 原理

试样中环丙氨嗪经三氯乙酸/乙腈溶液提取，混合型阳离子固相萃取柱净化，高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 甲酸。

5.5 三氯乙酸。

5.6 磷酸氢二钾。

5.7 磷酸二氢钾。

5.8 1%三氯乙酸溶液：取三氯乙酸 1g，加水定容至 100 mL。

5.9 2%甲酸水溶液：取甲酸 2 mL，加水定容至 100 mL。

5.10 5%氨化甲醇溶液：取氨水 5 mL，加甲醇定容至 100 mL。

5.11 提取液：取 1%三氯乙酸溶液 20 mL，加乙腈 80 mL，混匀。

5.12 磷酸盐缓冲液：准确称取磷酸氢二钾 3.73g，磷酸二氢钾 6.48g，用 930mL 水溶解，混匀。

5.13 标准物质：环丙氨嗪，纯度 $\geq 95.0\%$ 。

5.14 标准储备液的配制：精确称取环丙氨嗪标准品 10 mg（精确到 0.000 01 g），加适量甲醇（5.2）超声溶解并用甲醇（5.2）定容于 10 mL 容量瓶中。配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。-18℃以下保存，有效期 1 年。

5.15 标准工作溶液的配制：准确移取适量标准储备液，用提取液稀释配成 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

5.16 混合型阳离子交换固相萃取柱：60mg/3mL,或相当者。

5.17 微孔滤膜：0.45 μm ，有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外可见光检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量 0.000 01g 和 0.001 g。

6.3 离心机：转速不低于 4000 r/min。

6.4 旋涡混匀器。

6.5 振荡器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

6.8 分子筛：孔径 0.42mm 。

7 试样制备与保存

按GB/T 20195制备样品，至少200g，粉碎过0.42mm孔径的分子筛，充分混匀，避光密闭保存。

8 试验步骤

8.1 提取

称取适量样品2 g（精确到0.001g），置于50 mL离心管中，加入10 mL提取液（5.11），涡旋混匀后振荡5 min，5000 r/min离心5 min，移取上清液至另一50 mL离心管中，残渣重复提取一次，合并上清液，混匀，备用。

8.2 净化

混合型阳离子交换固相萃取柱依次用3mL甲醇、3mL水活化，取5 mL备用液（8.1）过柱，用3 mL2%甲酸水溶液（5.9）、3 mL甲醇（5.2）淋洗，挤干，用3 mL 5%氨化甲醇（5.10）洗

脱，收集洗脱液，于50℃氮吹至干，准确移取1.00 mL流动相（8.3）溶解，混匀后过微孔滤膜，供高效液相色谱分析。

8.3 液相色谱参考条件

使用液相色谱法的方法时，应：

- 1) 色谱柱：C18 柱 (250×4.6 mm, 5μm)，或者相当；
- 2) 流动相：磷酸盐缓冲液+甲醇+乙腈=93+5+2；
- 3) 流速：1.0 mL/min；
- 4) 进样量：20 μL；
- 5) 检测波长：214 nm 。

8.4 测定

8.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液（5.15）和试样溶液（8.2）上机测定。环丙氨嗪标准溶液液相色谱图参见附录A。

8.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中环丙氨嗪保留时间与标准系列工作溶液（浓度相当）中环丙氨嗪保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.4.3 定量

以环丙氨嗪的浓度为横坐标、以色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.999。试样溶液中环丙氨嗪的浓度应在标准系列工作溶液的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用流动相进一步稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 结果计算

试样中环丙氨嗪药物的含量以质量分数 ω 计，单位以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式(1)计算；单点校准按公式(2)计算：

$$\omega = \frac{\rho_1 \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ρ_1 ——从标准曲线查的试样溶液环丙氨嗪的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化时所用试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——饲料质量，单位为克（g）；

n ——稀释倍数；

1000——换算系数。

$$\omega = \frac{\rho_2 \times A_i \times V \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots(2)$$

ρ_2 ——标准溶液中环丙氨嗪的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A_i ——试样溶液中环丙氨嗪的色谱峰面积；

V ——提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——标准溶液中环丙氨嗪的色谱峰面积；

V_1 ——净化时所用试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——饲料质量，单位为克（g）；

n ——稀释倍数；

1000——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为0.2mg/kg，定量限为0.5mg/kg。

10.2 准确度

本方法在0.5mg/kg~50mg/kg添加浓度水平上的添加回收率为70%~100%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

环丙氨嗪标准溶液液相色谱图

环丙氨嗪标准溶液液相色谱图见图A.1。

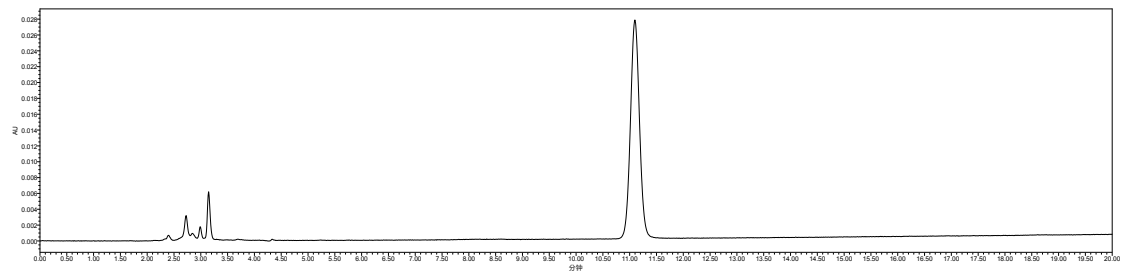


图 A.1 环丙氨嗪标准溶液(1.0 μ g/mL)液相色谱图