

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中左旋咪唑的测定》

编制说明

(公开征求意见稿)

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

2024年9月

目 录

一、工作简况.....	1
1 标准修订背景.....	1
2 任务来源.....	3
3 主要工作过程.....	3
3.1 成立标准编制小组.....	3
3.2 项目方案的制定.....	4
3.3 开展方法学研究.....	5
3.4 征求意见和方法验证.....	5
3.5 预审会情况.....	5
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	6
1 标准编制原则.....	6
2 修订内容的说明.....	6
5.5.3.4 定量.....	10
5.6 试验数据处理.....	10
3 主要技术内容确定的依据.....	13
3.1 液相色谱-串联质谱法.....	13
3.1.1 仪器检测条件的确定	13
3.1.1.1 质谱参考条件的确定.....	13
3.1.1.2 流动相选择及梯度的确定.....	14
3.1.1.3 液相色谱柱的确定.....	15
3.1.2 样品前处理方法确定	15
3.1.2.1 提取条件的确定.....	15
3.1.2.2 提取方式确定.....	19
3.1.2.3 提取溶剂体积的选择优化.....	20
3.1.2.4 提取时间确定.....	21
3.1.2.5 净化方式的选择.....	22
3.1.3 标液有效期确定	23
3.1.4 分析步骤的确定	24
3.1.5 基质效应	24
3.1.6 技术指标	25
3.1.6.1 线性范围.....	25
3.1.6.2 检出限与定量限.....	29
3.1.6.3 方法准确度与精密度实验.....	30
3.2 高效液相色谱法.....	39
3.2.1 液相条件选择	39
3.2.1.1 波长选择.....	39
3.2.1.2 色谱柱选择.....	39
3.2.1.3 液相色谱条件的优化.....	40
3.1.2.5 净化柱的选择.....	43
3.1.2.6 洗脱体积确定.....	44
3.2.2 干扰实验	45
3.2.3 分析步骤的确定	48

3.2.3.1 提取.....	48
3.2.3.2 净化.....	48
3.2.4 标准技术指标的验证	48
3.2.4.1 线性试验.....	48
3.2.4.2 检测限和定量限的确定.....	49
3.2.4.3 方法的回收率和精密度.....	50
3.3 混合型饲料添加剂.....	57
3.4 样品实测.....	64
4 新旧标准对比.....	64
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果.....	65
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况.....	66
五、采用情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....	66
六、与有关法律、法规的关系.....	66
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....	66
八、涉及专利的有关说明.....	66
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议.....	67
十、其他应予说明的事项.....	67

《饲料中左旋咪唑的测定》编制说明

（定向征求意见稿）

一、工作简况

1 标准修订背景

左旋咪唑（Levamisole, LMS）属咪唑并噻唑类抗蠕虫药，化学名为S-(-)-2,3,5,6-四氢-6-苯基咪唑噻唑，分子量为204.29，临床常用其盐酸盐或磷酸盐，结构式见图1。为白色或类白色的针状结晶或结晶性粉末，无臭。在水中极易溶解，在乙醇中易溶，在三氯甲烷中微溶，在丙酮中极微溶解。在碱性条件下以分子状态存在，具有非极性，可以溶于乙酸乙酯等溶剂中。左旋咪唑具有广谱、高效、低毒的特点，对鞭虫、类原线虫、蛲虫有良效，对丝虫亦有一定作用，WHO推荐治疗蛔虫病和钩虫病。在兽医临床，左旋咪唑对畜禽的主要胃肠道线虫、肺线虫效果极佳，对猪肾虫、毛首线虫的幼虫有良效，对苯并咪唑类药物耐药的捻转血矛线虫和蛇形毛圆线虫亦有高效，是广泛应用的驱虫药。左旋咪唑还具有明显的免疫调节功能，动物实验证明：左旋咪唑能增加体内巨噬细胞的数量及活性，当机体的T-淋巴细胞和巨噬细胞的功能降低时，作用更为明显，能使机体的细胞免疫反应和抗病能力增强。

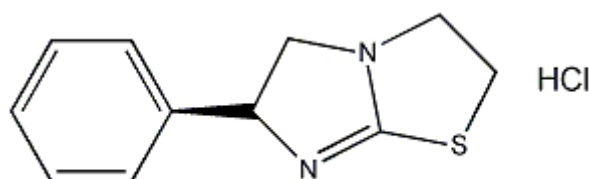


图1 盐酸左旋咪唑化学结构式

左旋咪唑在FAO/WHO食品添加剂联合专家委员会（JECFA）第36次会议上首次被评价，该药具有潜在的基因毒性，人淋巴细胞染色体畸变和姐妹染色体互换试验均为阳性。人用药后在消化系统、神经系统、心血管系统、血液及造血系统、泌尿系统和皮肤均有不同程度的毒副反应。严重的可造成肝功能损害，GPT升高，称之为肝炎样反应。大剂量服用左旋咪唑可引起急性肾功能衰竭，另有“脑炎综合征”的病理报告，多发生在肿瘤患者。还有报道左旋咪唑作为免疫调节剂治疗类风湿关节炎、癌症和乙型肝炎时，在大剂量和长期用药的情况下会引起急性粒细胞缺乏症。

左旋咪唑在农业养殖中广泛使用，可以提高畜禽的生产性能和免疫力。2020年农业农村部发布《中华人民共和国农业农村部公告 第246号》除了规定的数种药物外，禁止其他促生长作用药物添加到饲料中。左旋咪唑也在禁止添加之列。目前左旋咪唑使用往往添加到饲料中，供动物食用，对牛、羊、猪、禽使用范围较大，马和骆驼较敏感。其用量根据《中华人民共和国兽药典兽药使用指南》左旋咪唑内服一次量，每1 kg体重，牛、羊、猪7.5 mg，禽25 mg，根据驱虫饲喂时畜禽的体重、日采食量，确定配合饲料的添加剂量。如60日龄仔猪体重约20kg，日采食量约1kg，左旋咪唑的添加量约为150 mg/kg；30日龄肉鸡体重约1kg，日采食量约0.15kg，左旋咪唑的添加量约为166 mg/kg，综合取整数150 mg/kg。长期、超量用药或不执行休药期规定时，或盲目用药、重复用药、配伍不当时，均可产生残留，直接危害

人类健康。饲料作为动物的食品，是整个食物链的第一个关键环节，其本身质量的好坏关系到畜禽产品及水产品质量安全。左旋咪唑不能作为饲料药物添加使用，为避免左旋咪唑残留对人体的危害和对出口贸易的影响，保障广大人民群众身体健康，必须从饲料源头上严格控制该药物的使用。

目前现行有效的行业标准为NY/T 3139-2017 《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》，其在饲料中左旋咪唑安全使用起到了重要作用，该标准前处理在部分饲料中在定量限附近有干扰，无法准确定量，且提取过程稍显繁琐。目前随着液质联用仪器的普及，质谱检测方法以其高灵敏度和准确定性能力迅速普及，本次修订主要是液相方法和新增液相色谱-串联质谱法。

2 任务来源

本标准的制定任务来源于农质标函〔2020〕128号文件“关于下达2020年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知”，任务名称：《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》(NY/T 3139-2017)农业行业标准制修订，项目编号为HYB-20275。在参考国内外左旋咪唑含量测定有关资料以及NY/T 3139-2017《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》基础上起草本标准。

3 主要工作过程

3.1 成立标准编制小组

2020年8月，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和深圳市绿诗源生物技术有限公司接到修订项目任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，组建了标准编制小组，制定工作计划，落实人员与分工，详见表 1。

表 1 标准主要起草人员和任务分工

人员	工作单位	承担任务
王威利	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	项目主持人，负责项目的全面工作
万凯	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	统筹协调
丁晨红	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
王旭	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	统筹协调
季天荣	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
蒋永青	深圳市绿诗源生物技术有限公司	方法研究
林奕云	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
林雪贤	广东农科监测科技有限公司	标准研究方案设计、方法研究、标准文本和编制说明编写和完善
刘香香	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
陈惠婷	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	标准文本编写
刘振妮	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法精密度考察
崔泽锋	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法精密度考察

3.2 项目方案的制定

2020 年 8 月-2021 年 6 月，标准编制工作小组广泛收集了国内外有关标准和规程，查阅了左旋咪唑使用方法、理化性质及检测等有关文献资料。掌握了当前左旋咪唑在不同基质中的检测现状，指定了标

准检测方法试验草案，拟订了工作计划和工作进度。

3.3 开展方法学研究

2021年7月-2023年6月，按照拟定的试验草案进行饲料中左旋咪唑的液相色谱法的前处理方法和仪器方法的研究，并确定了最终的前处理条件和液相色谱条件。并进行了线性、检测限和定量限、添加回收率、同类药物干扰等相关试验以确定方法的操作性和科学性。

2023年7-12月，标准编制工作小组在方法实验过程中认真学习了GB/T 1.1-2020标准化工作导则关于“标准的结构和编写”。完成了该方法标准的征求意见稿和编制说明。

3.4 征求意见和方法验证

2024年6月-2024年7月，对标准及编制说明的征求意见稿进行了征求意见，发函专家30个，回函专家26个，未回函单位4个；提出意见单位25个，无意见单位0个。共提出意见230条；采纳225条，部分采纳或不采纳5条。对意见进行了整理，并根据专家意见修改了标准和编制说明，形成了标准及编制说明的预审稿。

3.5 预审会情况

2024年9月12日，广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所组织专家对广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所等单位修订的农业行业标准《饲料中左旋咪唑的测定》（预审稿）进行了认真审查。专家组由8位专家组成。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：1. 进一步考察本方法对植物提取物、微生物制剂等混合型饲料添加剂适用

性，并根据考察结果分析是否增加混合型饲料添加剂适用范围；2. 进一步核查高效液相色谱法精密度；3. 按照 GB/T 1.1—2020 和 GB/T 20001.4—2015 的要求规范标准文本及编制说明。与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。起草组根据专家提出意见对编制说明和文本进行修改，形成公开征求意见稿。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

1 标准编制原则

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照 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》和 GB/T 20001.4-2001《标准编写规则第4部分：试验方法标准》的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2 修订内容的说明

本次修订除按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 对标准进行编辑性修改外，主要针对 NY/T 3139-2017 存在的问题，结合饲料行业实际样品检测情况进行。主要修订包括文件名称由《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》改为《饲料中左旋咪唑的测定》；更改了高效液相色谱法的提取和净化方法；更改了高效液相色谱法的实验数据处理；增加了液相色谱-串联质谱测定方法；详见表 2。

表 2 标准主要技术内容修订说明

No.	章节编号	原标准	修订后	修订原因
1	首页	标准名称《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》	《饲料中左旋咪唑的测定》	由于增加了液相色谱-串联质谱法，包含两种方法。
2	前言	“本标准.....”	“本文件按照 GB/T1.1-2020....——NY/T 3139-2017。”	按照 GB/T1.1-2020 要求重新整理。
3	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。	标准范围增加了液相色谱-串联质谱法，并重新进行描述。
4	1 范围	本标准中左旋咪唑在配合饲料中的检出限为 0.2mg/kg，定量限为 0.5mg/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 0.4mg/kg，定量限为 1.0mg/kg。	本文件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；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。	
5	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。	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	按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。增加试样制备的标准。

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
		GB/T 6682-1992 分析实验室用水规格和实验方法 GB/T 14699.1 饲料 采用	GB/T 20195 动物饲料 试样的制备	
6	3 术语和定义	无	新增章节。本文件没有需要界定的术语和定义。	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》的规定补充。
7	4 液相色谱-串联质谱法	无	4 液相色谱-串联质谱法	增加饲料中左旋咪唑的液相色谱-串联质谱法。
8	5.1 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。	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。	根据新方法重新进行了规范性描述。
9	5.4 样品	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。	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。	按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。

No.	章节编号	原标准	修订后	修订原因
10	5.5.1 提取 5.5.2 净化	<p>7.1提取 称取配合饲料2g（浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料1g，精确到0.01g）样品于50mL离心管中，加水10mL，用5mol/L氢氧化钠调pH至12-13.涡旋混匀1min，超声20min，准确加入乙酸乙酯20mL，振荡30min，以6500r/min离心5min。准确移取上清液5.0mL于试管中，至于50℃氮气吹干，准确加入流动相2.00mL，超声溶解，加入正己烷2mL，涡旋1min，静置分层。取下层液，高速离心12000r/min离心10min，过膜作为试样溶液，上机测定。</p>	<p>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，合并提取液，混匀。准确移取10 mL样品液于50 mL离心管中，于45℃下氮气吹至近干。准确加入10 mL 盐酸溶液(5.2.8)，涡旋溶解，再加入5mL正己烷，摇动数次脱脂，10000 r/min离心5 min，弃去上层正己烷，得到试样待测液，待净化。</p> <p>5.5.2 净化 依次用3 mL甲醇(5.2.2)和3 mL 0.1 mol/L盐酸溶液(5.2.8)活化固相萃取小柱(5.2.15)，准确移取5mL待净化液(5.5.1)过柱。抽干。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℃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。</p>	根据新方法，重新确定了试样提取、净化过程。
11	5.5.3.1 高效液相色谱参考条件	<p>7.4.1 高效液相色谱条件 色谱柱:SCX 柱（强阳离子交换柱）,柱长 250mm，内径 4.6mm，粒径 5 μm 或性能相当者； 流动相:0.02mol/L 磷酸二氢钠溶液+乙腈=75+25（V+V）； 流速:1.0 mL/min。 检测波长:215nm。 进样量:20uL。</p>	<p>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：C18 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:0.05mol/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；</p>	由于使用常规 C18 柱，重新优化了流动相组成和比例，使目标物与杂质能够很好的分离。

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
		柱温:30℃。	d)柱温: 35 ℃; e)进样量: 20 μL; f)检测波长: 215nm。	
12	5.5.3.4 定量	<p>8.3 定量测定</p> <p>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。</p>	<p>5.5.3.4 定量</p> <p>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待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应将试样净化液用甲醇溶液(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,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。</p>	根据新的定量规范,进行描述。
13	5.6 试验数据处理	<p>9.1 结果计算</p> <p>9.1.1 单点校准</p> <p>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:</p> $X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times f \dots$ <p>式中:</p> <p>X—试样中左旋咪唑的含量,单位为毫克每千克(mg/kg):</p>	<p>5.6 试验数据处理</p> <p>试样中待测物的含量 w 以质量分数计,单位为毫克每公斤(mg/kg)。多点校准按公式(3)计算,单点校准按公式(4)计算:</p> $w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (3)$ <p>式中:</p>	重新对计算公式进行表述

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
		<p>C_s—标准溶液中左旋咪唑的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);</p> <p>A—试样溶液中左旋咪唑的峰面积;</p> <p>A_s—标准溶液中左旋咪唑的峰面积;</p> <p>V—净化后定容的体积,单位为毫升(mL);</p> <p>m—试样质量,单位为克(g);</p> <p>f—稀释倍数。</p> <p>9.1.2 多点校准</p> <p>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:</p> $X = \frac{C_s \times V}{m} \times f \dots\dots\dots (2)$ <p>式中:</p> <p>C_s—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($\mu\text{g/mL}$);</p>	<p>ρ——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($\mu\text{g/mL}$);</p> <p>V_1——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);</p> <p>V_3——试样定容的体积,单位为毫升(mL);</p> <p>V_2——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);</p> <p>m——试样的质量,单位为克(g);</p> <p>n——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。</p> $w = \frac{A \times \rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$ <p>式中:</p> <p>A——试样溶液中左旋咪唑的峰面积;</p> <p>ρ——标准溶液中左旋咪唑的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);</p> <p>V_1——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);</p> <p>V_3——试样定容的体积,单位为毫升(mL);</p> <p>A_s——标准溶液中左旋咪唑的峰面积;</p> <p>V_2——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);</p> <p>m——试样的质量,单位为克(g);</p> <p>n——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。</p> <p>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。</p>	

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
14	5.7 精密度	<p>10 重复性</p> <p>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%。</p>	<p>5.7 精密度</p> <p>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 10%。</p>	<p>根据实验数据和最新要求，将精密度修改为 10%。</p>

3 主要技术内容确定的依据

3.1 液相色谱-串联质谱法

3.1.1 仪器检测条件的确定

3.1.1.1 质谱参考条件的确定

采用 LC-MS/MS 对左旋咪唑标准溶液进行母离子扫描, 根据分子量和文献, 确定母离子大小, 然后对分子离子进行 MRM 优化, 确定定量离子和定性离子, 以及电压等参数。在对其他质谱参数进行优化后, 左旋咪唑标准品的 MRM 总离子流色谱图见图 2。与强制性国家标准 GB 31658.21-2022 《食品安全国家标准 动物性食品中左旋咪唑残留量的测定液相色谱-串联质谱法》一致。

表 3 选择离子参数设定表

被测物名称	监测离子对 (m/z)	Q1 电压 (V)	碰撞能量 (eV)	Q3 电压 (V)
左旋咪唑	205.10>178.05 ^a	-20	21	-20
	205.10>123.05	-23	28	-23
^a 为定量离子。				

电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式 (ESI+)。

检测方式: 多反应监测 (MRM)。

毛细管电压: 4.5 kV。

离子源温度: 400 °C。

脱溶剂温度: 526 °C。

干燥气流量: 氮气 600 L/Hr。

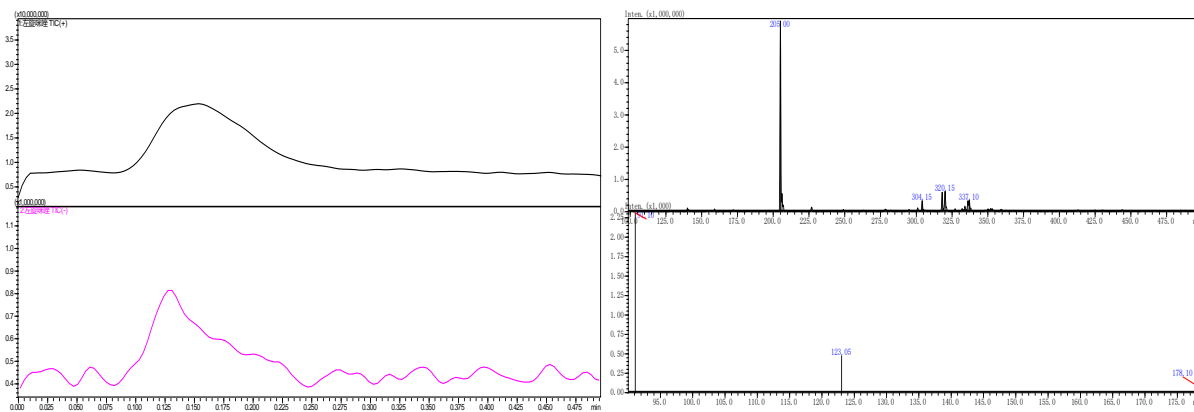


图2 左旋咪唑母离子扫描及MRM质谱图

3.1.1.2 流动相选择及梯度的确定

左旋咪唑的液相色谱-串联质谱检测采用正离子检测模式，本实验对比了水+甲醇体系、甲酸水+甲醇体系、乙酸铵/甲酸溶液+甲醇体系、乙酸铵+甲醇体系、甲酸水+乙腈体系、乙酸铵/甲酸溶液+乙腈体系、乙酸铵+乙腈体系、甲酸铵+乙腈体系等作为流动相对左旋咪唑分析的影响。甲醇作为有机相流动相体系左旋咪唑均出现峰拖尾现象，乙腈体系峰型相对较好，其中甲酸铵+乙腈体系具有良好的分离效果和峰型，且保留时间比较合适，因此最终选择 5mmol/L 甲酸铵和乙腈作为本标准流动相。不同流动相色谱图分离效果及响应值见图 3。流动相梯度具体如表 4：

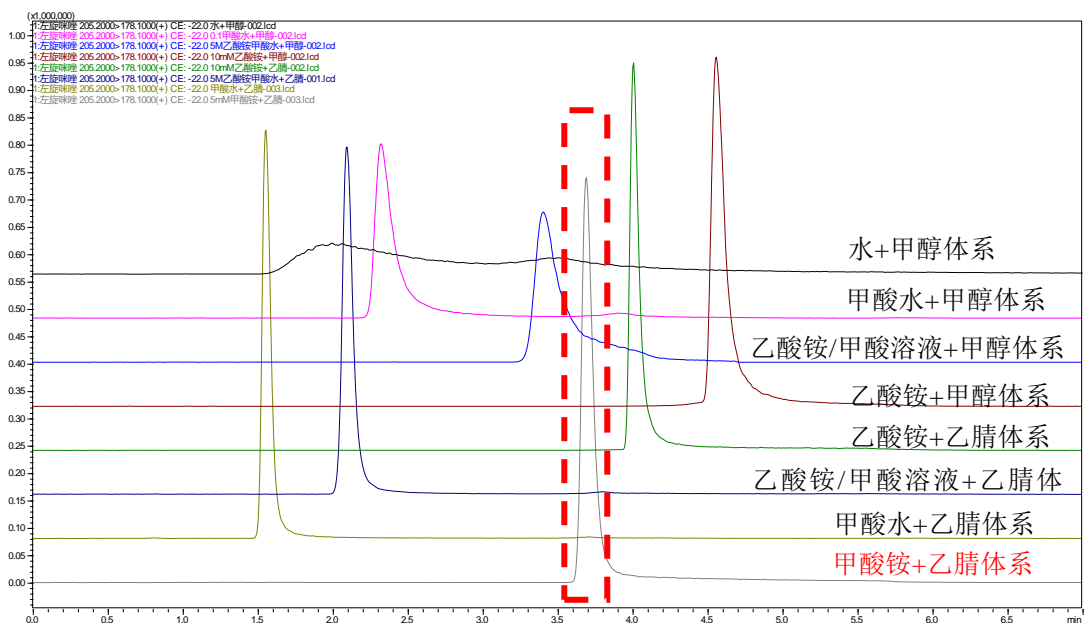


图 3 不同流动相色谱图分离效果及响应值

表 4 流动相梯度

时间 (min)	5mmol/L 甲酸铵溶液 (%)	乙腈 (%)
0.0	90	10
1.5	90	10
2.5	20	80
4.0	20	80
4.1	90	10
7.0	90	10

3.1.1.3 液相色谱柱的确定

实验对比不同厂家色谱柱的分离效果，对比峰型和响应值。结果表明，不同厂家 C18 柱，除了保留时间稍微有些差异，其峰型和峰面积没有明显差异，无须规定具体厂家信息，可采用性能相当者。

3.1.2 样品前处理方法确定

3.1.2.1 提取条件的确定

我们发现的，旧标准用 5mol/L 氢氧化钠调 pH 12~13 后加乙酸乙酯作为提取剂提取某些饲料时，可导致乳化层过厚，提取液不易转移，损失较多，导致回收率不稳定，且调整 pH 步骤繁琐。因此重新

考察选择其他提取剂的可能性。对于左旋咪唑的提取，NY/T 3139-2017；GB/T 22994-2008；GB 31658.21-2022 中采用的是在碱性溶液中将左旋咪唑盐酸盐转化为左旋咪唑，以乙酸乙酯进行提取；GB 29681-2013 中采用磷酸缓冲液加乙酸乙酯提取；也有采用 1%冰乙酸-乙腈进行提取的。本研究以配合饲料、浓缩料、精补料、添加剂预混料等饲料为基质，分别加入 10 mg/kg 水平的左旋咪唑，对比了直接采用甲醇、乙腈、乙酸乙酯、1%乙酸乙腈、5mol/L 氢氧化钠调 pH12~13 后加乙酸乙酯、磷酸盐缓冲溶液加乙酸乙酯、氨水溶液+乙酸乙酯等 7 种溶液作为提取剂的效果，每种提取剂平行实验 3 次。结果见图 4-7，甲醇、氨水溶液+乙酸乙酯作为提取剂时不同饲料提取效果均比较好，但甲醇溶解性较强，可以提取很多杂质，不利于后续净化，最终选择氨水溶液+乙酸乙酯作为提取剂，对 4 种饲料中左旋咪唑均有很好的提取效率。

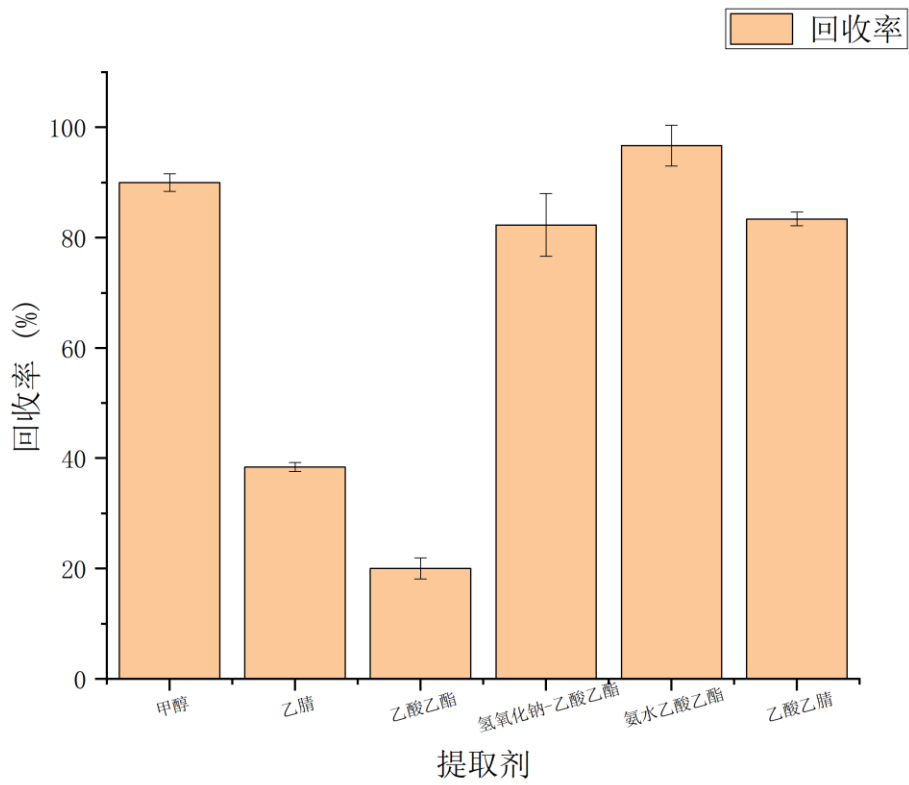


图 4 不同提取剂对配合饲料中左旋咪唑的提取效率

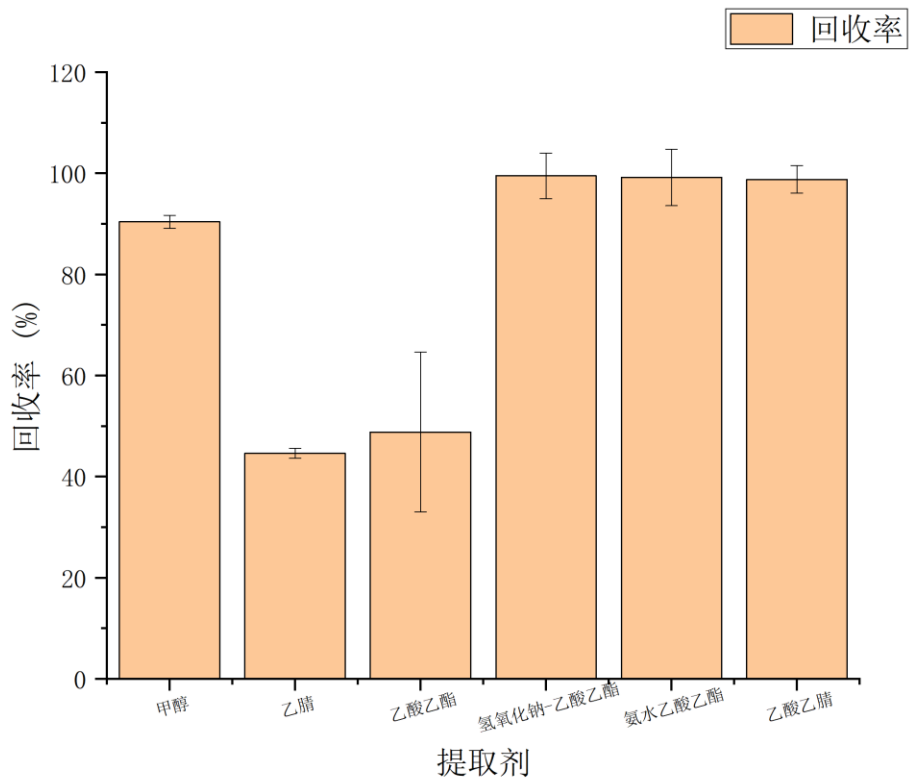


图 5 不同提取剂对浓缩饲料中左旋咪唑的提取效率

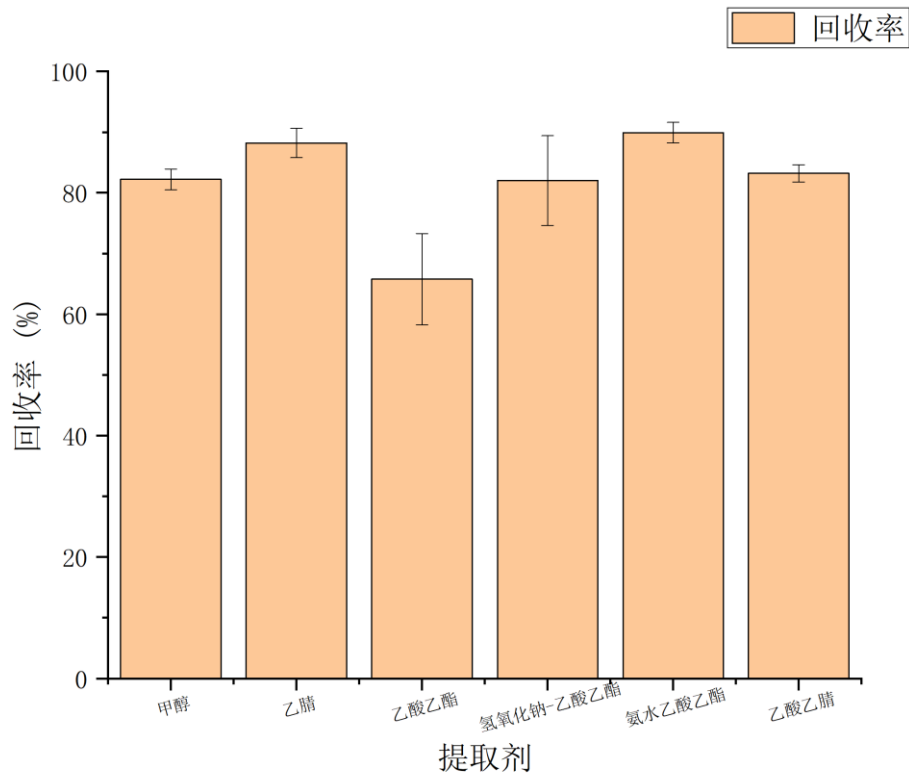


图 6 不同提取剂对添加剂预混合饲料中左旋咪唑的提取效率

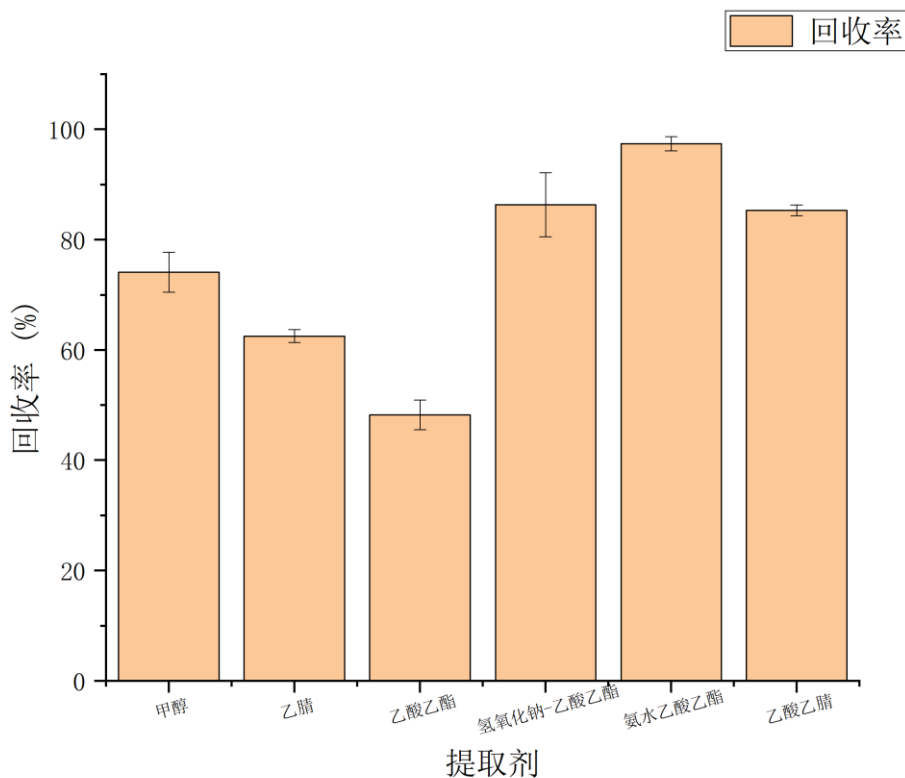


图 7 不同提取剂对精料补充料左旋咪唑的提取效率

3.1.2.2 提取方式确定

为了验证不同提取方式对测定结果的影响，实验考察了先超声 20min 再加乙酸乙酯振荡 30min 和加入乙酸乙酯后直接振荡提取 30min 提取的回收率情况，结果见表 5 和图 8。结果表明，两者结果无明显区别。从整个实验的易操作程度考虑，采取振荡的提取方式。

表 5 不同提取方式回收率试验结果 (n=3)

待测组分	饲料类型	平均回收率 (%)	
		先超声 20min 再振荡 30min (旧标准)	振荡提取 30min
左旋咪唑	配合饲料	94.8±2.3	95.3±3.1
	预混合饲料	81.6±0.7	80.8±2.1

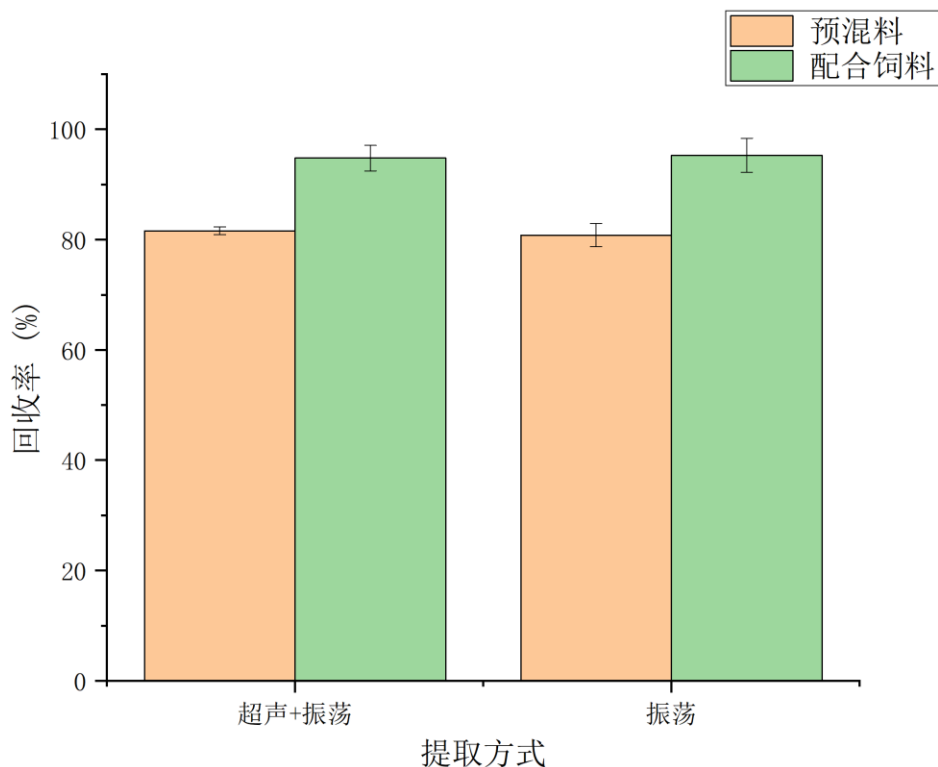


图 8 不同提取方式回收率

3.1.2.3 提取溶剂体积的选择优化

为了考察提取剂体积的选择，充分提取样品中的左旋咪唑，取浓缩饲料和添加剂预混合饲料作为对象，空白饲料样品添加 50mg/kg 左旋咪唑，第一份直接用 40mL 提取一次，取 5mL 氮气吹干，复溶脱脂后，过膜后上机测定；第二份，先用 20mL 提取，离心后，残渣再用 20mL 提取液提取，合并提取液后，取 5mL 氮气吹干，复溶脱脂后，过膜后上机测定；第三份用 20mL 提取一次，取 5mL 氮气吹干，复溶脱脂后，过膜后上机测定；第四份，先用 10mL 提取，离心后，残渣再用 10mL 提取液提取，合并提取液后，取 5mL 氮气吹干，复溶脱脂后，过膜后上机测定。分别进行三个平行样品的测定，比较提取的平均回收率。结果显示，对于浓缩饲料提取次数和体积对回收

率影响不大，对于添加剂预混合饲料，提取两次提取效果更好，增大提取体积效果不显著，因此最终确定，10mL 提取剂提取两次。

表 6 不同提取体积下左旋咪唑回收率

待测组分	饲料类型	平均回收率 (%)			
		40mL 提取1次	20 mL+20 mL 提取2次	20 mL 提取 1次	10 mL+10 mL 提取2次
左旋咪唑	浓缩饲料	87.8±2.4	90.4±0.6	88±0.6	91.5±3.3
	预混合饲料	72.2±3.5	84.3±2.8	77.4±2.4	87.4±5.2

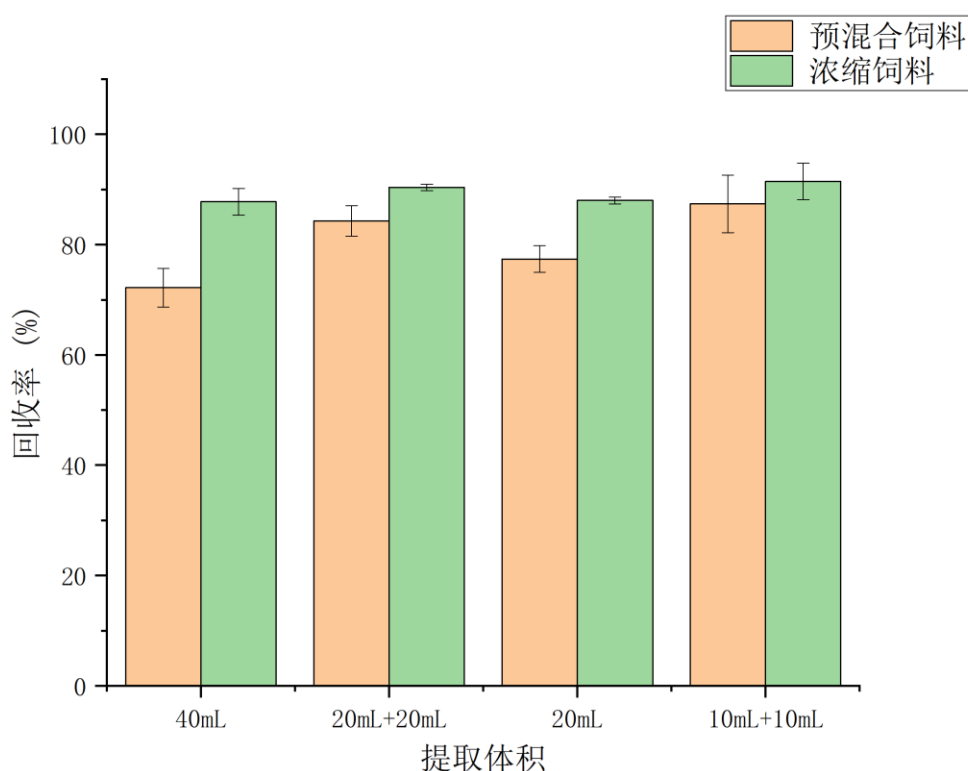


图 9 不同提取体积对左旋咪唑回收率的影响

3.1.2.4 提取时间确定

为了进一步考察提取时间对测定结果的影响，加入 10 mL 乙酸乙酯提取液，分别考察了水平振荡提取时间分别为 5 min、10 min、20min 和 30min 时样品回收率。结果见图 10。试验结果表明，随着提取时

间增加，回收率无明显增加，但是偏差比较小。为保证不同类型样品的提取效率，且综合考虑时间成本，最终将样品提取时间定为 20 min。

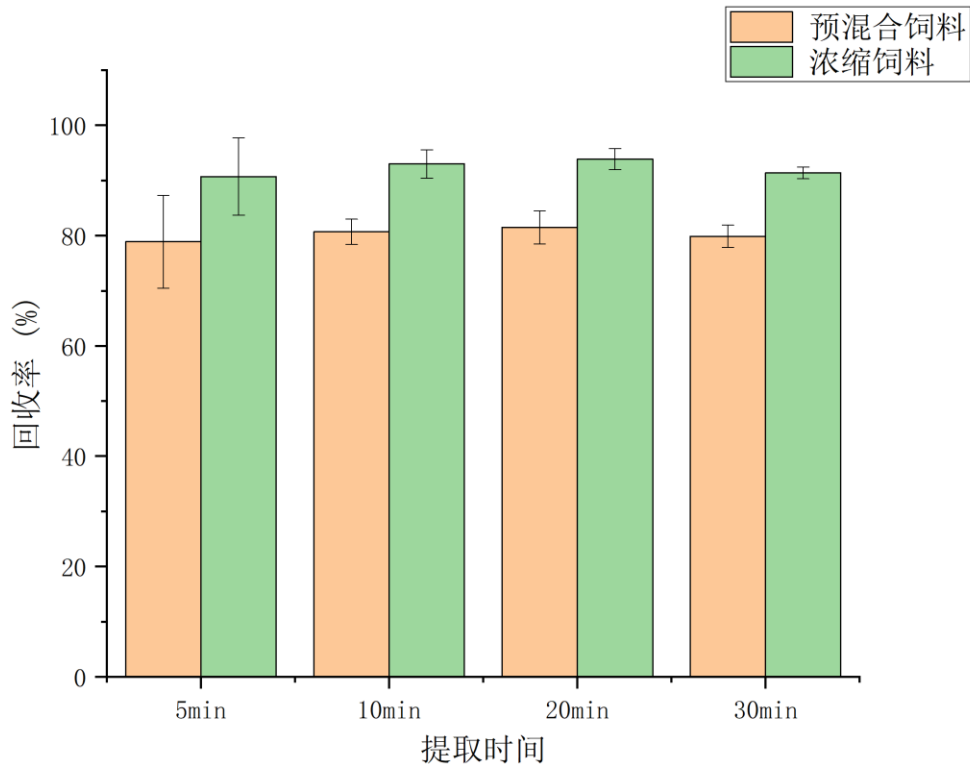
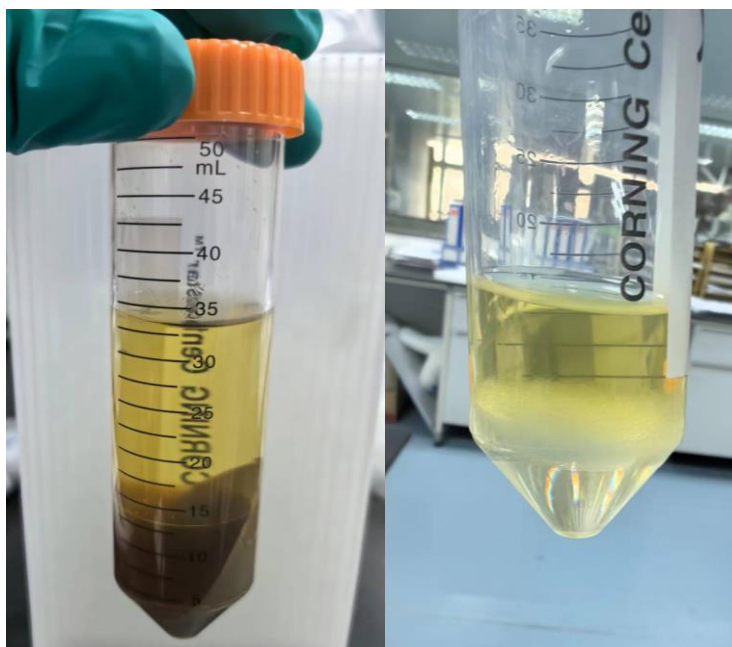


图 10 不同提取时间对左旋咪唑回收率的影响

3.1.2.5 净化方式的选择

样品提取过程中，乙酸乙酯将左旋咪唑从饲料中完全提取出来，无机盐由于无法溶解于乙酸乙酯非极性较强溶剂中，从而保留在下层水溶液中。此步骤可以除去饲料中无机盐等极性杂质，因此，与提取液中杂质主要是样品中的脂肪类物质等非极性杂质。液液萃取是最常见的除杂方式，同时萃取回收率较高且成本低廉，因此，本标准考虑采用正己烷脱脂进行净化，大大减少过柱造成的繁琐步骤，同时可以大大节约成本。将提取液氮气吹干后，加入复溶液，同时加入正己烷

进行脱脂，考察样品绝对回收率，正己烷脱脂脱脂后，目标物回收率均能达到 80% 以上，并且可以除去非极性杂质。因此，正己烷脱脂作为本方法净化方式。



3.1.3 标液有效期确定

根据现行国家标准和行业标准规定有效期分析，储备液在 6 个月内稳定，工作液在 3 个月内稳定。本标准借鉴现行国家标准。规定储备液保存期 6 个月，工作液保存期 3 个月。

表 7 现行标准左旋咪唑标准溶液有效期

标准编号	标准名称	目标物	标液有效期
NY/T 3139-2017	饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法	左旋咪唑	储备液 6 个月 工作液 3 个月
GB 29681-2013	食品安全国家标准 牛奶中左旋咪唑残留量的测定 高效液相色谱法	左旋咪唑	储备液 3 个月 工作液 3 个月
GB 31658.21-2022	食品安全国家标准 动物性食品中左旋咪唑残留量的测定液相色谱-串联质谱法	左旋咪唑	储备液 6 个月 工作液 3 个月
GB/T 22994-2008	牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量的测定 液相色谱-串联质谱法	左旋咪唑	储备液 6 个月

3.1.4 分析步骤的确定

平行做两份试验。称取配合饲料 2 g（浓缩饲料、精料补充饲料和添加剂预混合饲料各 1 g），精确至 0.01 g，于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 超纯水，再加入 0.5 mL 氨水，再加入 10 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 1 min，水平振荡提取 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 乙酸乙酯重复提取一次，合并两次提取液，混匀。准确移取 2 mL 提取液于 10 mL 离心管中，于 45°C 下氮气吹近干，准确加入 5 mL 20% 甲醇溶液，加入 3 mL 正己烷脱脂，取下次溶液于 10000 r/min 离心 5 min，过 0.22 μm 微孔滤膜，得到试样溶液，用液相色谱-串联质谱仪测定。

3.1.5 基质效应

基质效应 MEs 是在利用 ESI 离子源分析复杂样品时相当重要的影响因素。共流出或共提取的其他杂质在 ESI 离子源竞相离子化，从而导致目标检测物离子化效果的抑制或者增强，从而表现出基质抑制或者基质增强的现象。MEs 是根据纯标准溶液与基质标准溶液的响应强度进行评估，考察某水平下，溶剂标准溶液的响应强度 S_{solvent} 和同条件下基质标准溶液的响应强度 S_{matrix} 的关系，具体公式如下： $ME\% = (S_{\text{matrix}} - S_{\text{blank}}) / S_{\text{solvent}}$ ，其中， S_{blank} 为空白基质提取液的响应强度。MEs 值介于 0.85 和 1.15 之间认为无明显的基质效应，大于 1.15 表明是基质增强，小于 0.85 表明是基质抑制。本实验通过测定 10 μg/L 标准品溶液和 3 种饲料 10 μg/L 基质匹配标准溶液比较有无基质效应。结果表明：5 种饲料的基质匹配标准溶液中，左旋咪

唑基质效应抑制显著。同时根据标准曲线斜率来计算基质效应大小，发现与面积比值具有相似的基质效应结果，为了结果准确性选用基质匹配标准曲线校准，结果如表 8。

表 8 基质效应

基质种类	基质效应 (MEs)	
	峰面积	斜率
溶剂	1.000	1.000
配合饲料	0.873	0.931
浓缩饲料	0.899	0.894
添加剂预混合饲料	0.815	0.835
精料补充料	0.851	0.842
水产配合饲料	0.840	0.851

3.1.6 技术指标

3.1.6.1 线性范围

精确量取适量的左旋咪唑标准工作液与基质空白溶液，配制成浓度分别为 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准溶液。用液相色谱-串联质谱测定。在上述确定参数条件下，从低浓度到高浓度进样，按其所得峰面积的平均值与对应的溶液浓度做基质标准曲线，得出回归方程和相应系数。结果如见表 9 和图 13-18。

表 9 左旋咪唑在溶剂和饲料中的基质匹配标准曲线

基质	标液浓度 (µg/L)									回归方程	相关系数 r^2
	1	2	5	10	20	50	100	200	500		
溶剂	226965	407856	1044988	1978393	3993445	9966786	19665191	39735862	93898557	$Y = (191342)X + (60230.5)$	0.9948
配合饲料	196464	424027	953091	1770025	3661744	8948671	18031690	36837552	85917761	$Y = (178228)X + (41732.9)$	0.9960
浓缩饲料	242078	447859	962956	1870777	3636840	9007093	17959151	36098961	83248144	$Y = (171096)X + (115187)$	0.9970
精料补充料	208749	370264	903141	1654111	3388442	8296804	17246882	34110274	78828561	$Y = (159761)X + (88104.9)$	0.9981
添加剂预混合饲料	238572	392148	862764	1678090	3355260	8189194	16631291	33618143	78099745	$Y = (161202)X + (75190.5)$	0.9920
水产配合饲料	193297	362096	881809	1646317	3324783	8176225	16182130	33178610	74823279	$Y = (162851)X + (32690.4)$	0.9914

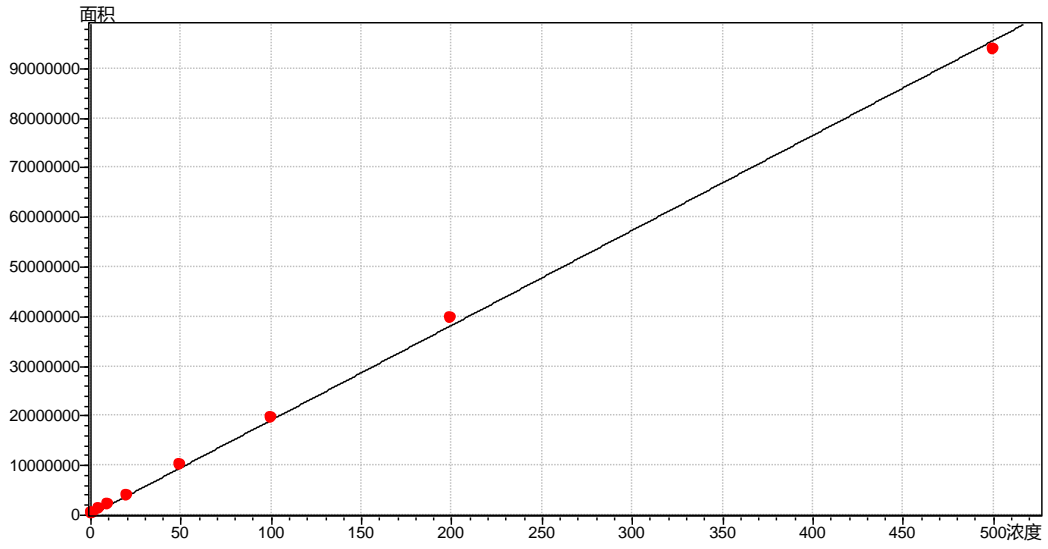


图 13 左旋咪唑溶剂标准曲线图

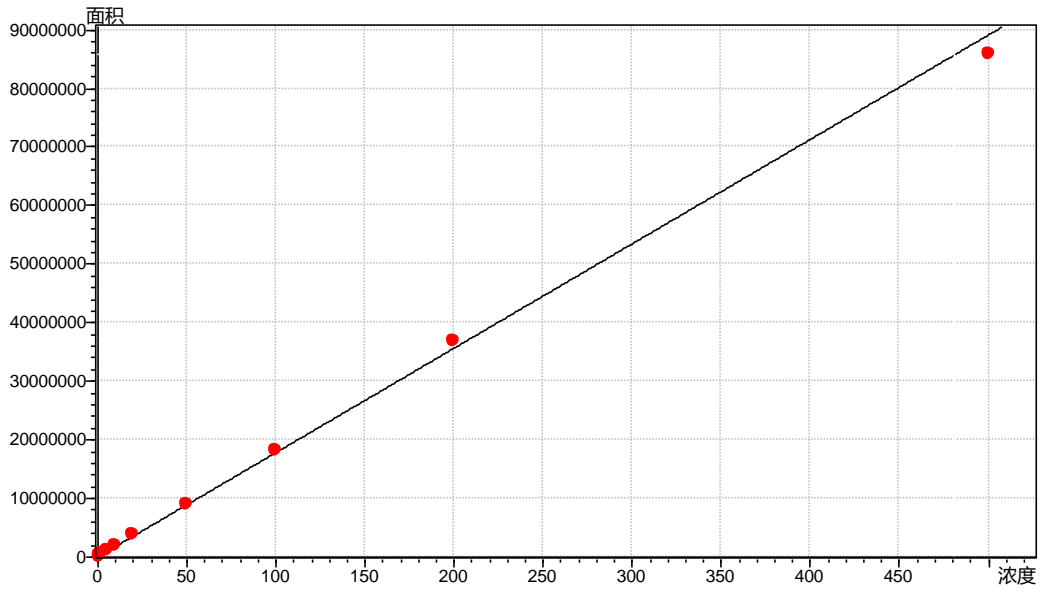


图 14 左旋咪唑配合饲料基质匹配标准曲线图

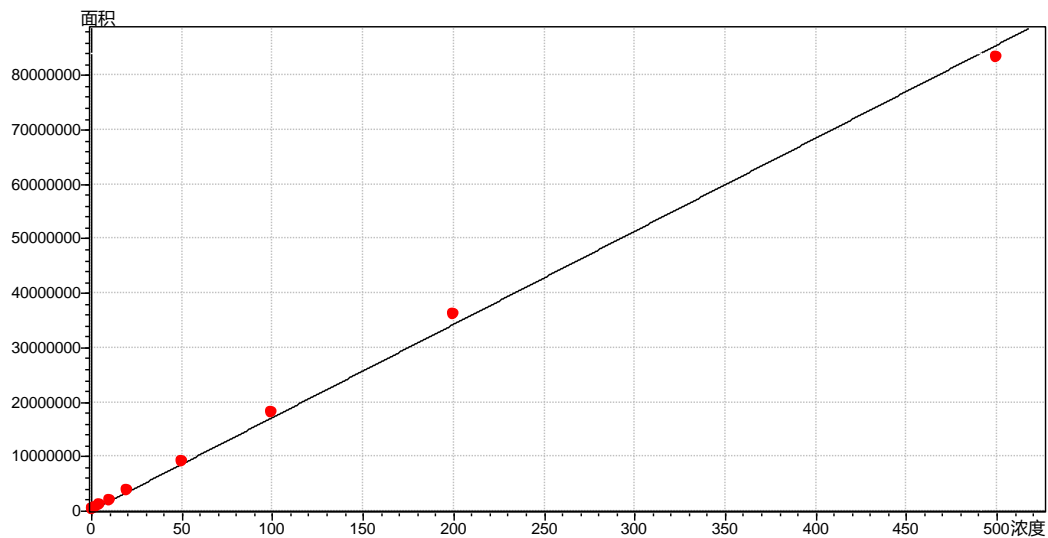


图 15 左旋咪唑浓缩饲料基质匹配标准曲线图

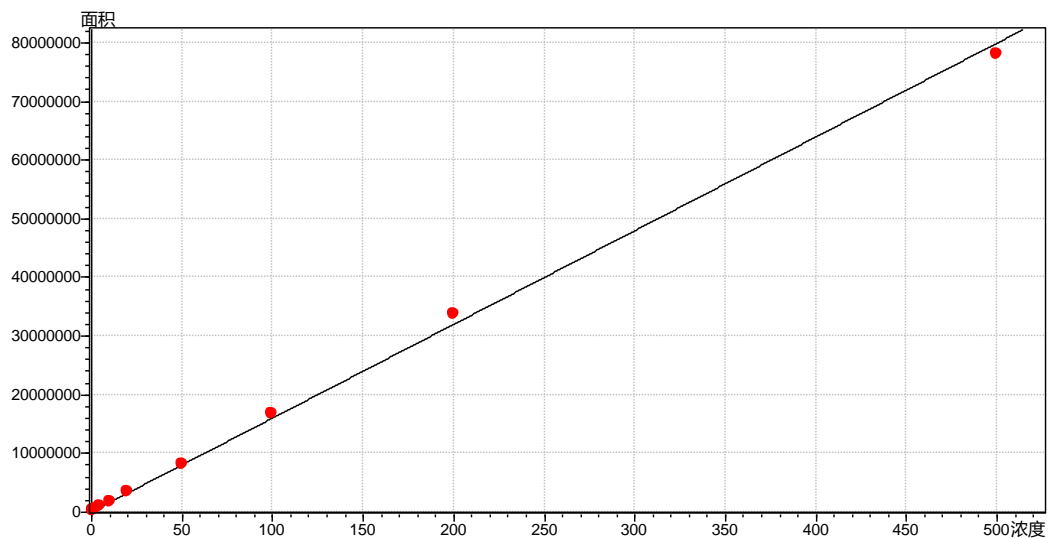


图 16 左旋咪唑添加剂预混合饲料基质匹配标准曲线图

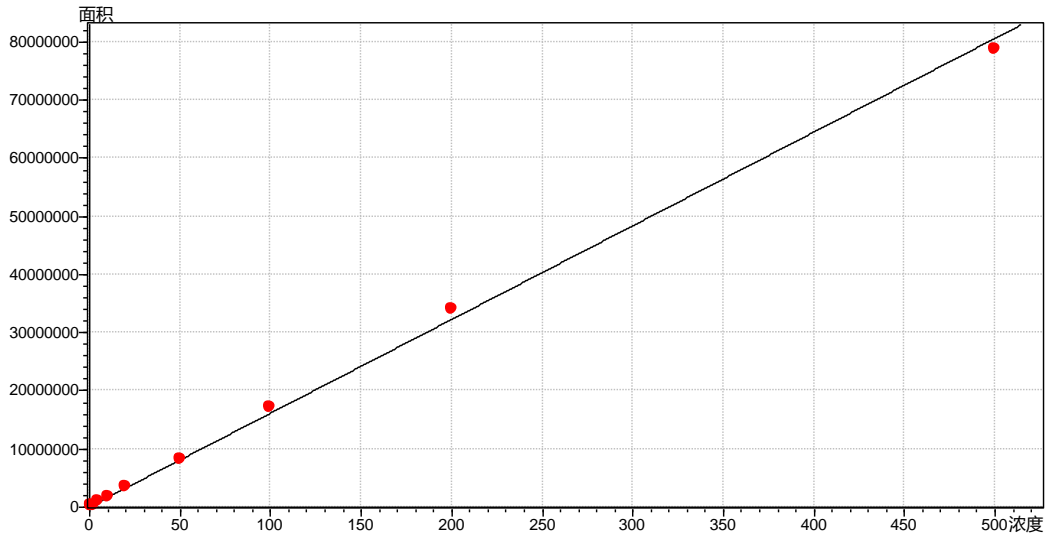


图 17 左旋咪唑精料补充料基质匹配标准曲线图

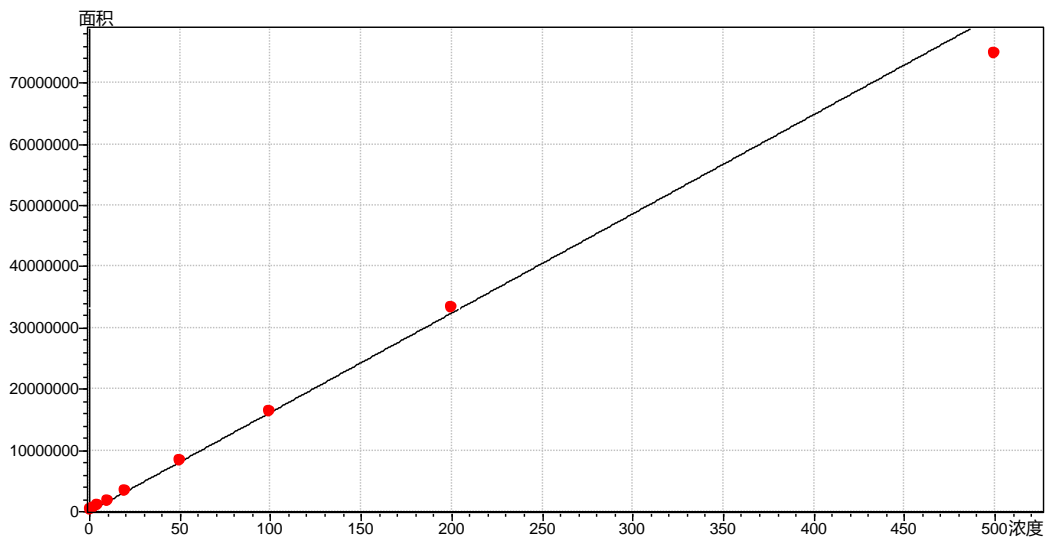


图 18 左旋咪唑水产配合饲料基质匹配标准曲线图

3.1.6.2 检出限与定量限

空白试料按相同的步骤处理后，在相应的保留时间，空白试料对所测分析物无干扰。检测限（LOD）与定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于 2 g 配合饲料空白样品（其他饲料 1g），经提取净化后测定，根据所测药物的 $S/N \geq 3$ 为方法检测限， $S/N \geq 10$ 为方法定量限的原则，测得左旋咪唑在配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料中的

检测限为 0.02 mg/kg，定量限为 0.05 mg/kg。

3.1.6.3 方法准确度与精密度实验

分别取配合饲料 2.0 g（其他饲料 1g），分别添加适量左旋咪唑标准溶液使配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料添加浓度为 0.05 mg/kg、0.5mg/kg、1 mg/kg、10mg/kg、250 mg/kg 和 1000 mg/kg，经提取净化后进行液相色谱-串联质谱法测定，每个梯度平行测定六次，以考察方法的准确度和精密度。结果见表 10~表 14。左旋咪唑标准溶液、饲料空白及添加图谱见图 19-34。

表 10 鸡配合饲料回收率及精密度结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
								平均回收率 (%)	相对平均偏差	平均回收率 (%)	相对平均偏差
0.05	1	0.0459	0.0464	0.0478	0.0468	0.0497	0.0508	95.8	3.3	94.9	2.6
	2	0.0474	0.0451	0.0477	0.0464	0.0458	0.0480	93.5	2.1		
	3	0.0468	0.0494	0.0469	0.0463	0.0487	0.0485	95.5	2.3		
0.5	1	0.451	0.455	0.465	0.477	0.451	0.481	92.7	2.4	95.6	2.6
	2	0.479	0.489	0.503	0.466	0.489	0.452	95.9	2.9		
	3	0.465	0.481	0.499	0.489	0.503	0.509	98.2	2.6		
1	1	0.941	0.945	0.945	0.918	0.917	1.01	94.6	2.3	94.4	2.2
	2	0.947	0.941	0.908	0.935	1.02	0.918	94.5	2.7		
	3	0.952	0.947	0.919	0.926	0.936	0.965	94.1	1.5		
10	1	10.1	9.67	9.53	9.55	9.81	10.3	98.3	2.5	99.7	2.1
	2	9.97	9.93	9.89	9.98	10.1	10.4	100.5	1.4		
	3	10.3	10.0	9.74	9.66	10.4	10.1	100.3	2.3		
250	1	231	250	237	245	272	269	100.3	5.3	101.0	5.3
	2	272	234	266	224	242	264	100.1	6.8		
	3	242	257	260	242	270	269	102.7	3.8		
1000	1	915	852	984	1017	893	954	93.6	5.3	97.0	6.2
	2	870	1036	1028	1003	885	1071	98.2	7.1		
	3	1049	937	1097	930	1017	928	99.3	6.2		

表 11 鸡浓缩饲料添加回收率及精密度结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	回收率 (%)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率(%)	相对 平均 偏差
0.05	1	0.0488	0.0481	0.0534	0.0482	0.0460	0.0458	96.8	3.7	96.4	3.1
	2	0.0467	0.0473	0.0488	0.0497	0.0470	0.0497	96.4	2.5		
	3	0.0464	0.0457	0.0509	0.0480	0.0495	0.0475	96.0	3.1		
0.5	1	0.474	0.485	0.472	0.483	0.480	0.506	96.7	1.7	96.8	2.0
	2	0.487	0.481	0.509	0.487	0.498	0.502	98.8	1.8		
	3	0.464	0.483	0.469	0.501	0.467	0.463	94.9	2.5		
1	1	0.924	0.925	0.888	0.937	0.970	0.911	92.6	2.0	94.3	2.7
	2	0.946	0.950	0.979	0.937	0.979	1.00	96.5	2.2		
	3	0.935	0.984	1.00	0.902	0.904	0.904	93.8	3.8		
10	1	8.71	8.72	8.92	8.75	10.2	10.3	92.7	7.1	97.7	3.1
	2	9.50	9.80	10.07	9.56	9.95	9.87	97.9	1.8		
	3	10.2	10.33	10.3	10.1	10.4	10.2	102.6	0.9		
250	1	238	259	272	255	266	238	101.9	4.4	100.5	5.4
	2	250	224	246	261	266	275	101.5	5.4		
	3	238	226	225	268	245	271	98.2	6.5		
1000	1	949	1100	1015	875	914	877	95.5	7.2	97.9	6.0
	2	989	1043	1014	863	997	1016	98.7	4.2		
	3	854	1023	995	1072	1089	930	99.4	6.8		

表 12 鸡预混合饲料准确度及精密度结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	回收率 (%)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率(%)	相对 平均 偏差
0.05	1	0.0380	0.0410	0.0429	0.0428	0.0432	0.0433	83.7	3.8	85.5	3.9
	2	0.0449	0.0402	0.0409	0.0458	0.0407	0.0432	85.2	4.7		
	3	0.0416	0.0452	0.0419	0.0449	0.0435	0.0454	87.5	3.2		
0.5	1	0.409	0.424	0.412	0.414	0.400	0.437	83.2	2.3	86.1	3.2
	2	0.425	0.459	0.416	0.408	0.456	0.450	87.1	4.4		
	3	0.425	0.453	0.453	0.440	0.416	0.449	87.9	2.9		
1	1	0.815	0.836	0.827	0.791	0.841	0.836	82.4	1.7	86.2	2.4
	2	0.876	0.892	0.882	0.914	0.872	0.815	87.5	2.4		
	3	0.886	0.903	0.882	0.950	0.849	0.855	88.8	2.9		
10	1	8.21	8.34	9.29	8.14	8.04	8.67	84.5	4.2	88.4	4.5
	2	9.12	9.48	8.35	9.54	9.66	9.16	92.2	3.7		
	3	9.69	8.34	9.52	8.35	8.88	8.35	88.6	5.7		
250	1	239	254	263	257	234	263	100.7	4.0	101.7	4.0

	2	269	261	265	241	271	271	105.2	3.0		
	3	264	261	229	238	239	256	99.1	5.0		
1000	1	883	948	818	894	835	843	87.0	4.4	88.4	4.9
	2	952	836	865	989	846	939	90.5	6.1		
	3	963	814	876	899	856	858	87.8	4.1		

表 13 水产配合饲料准确度及精密度结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	回收率 (%)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率 (%)	相对 平均 偏差
0.05	1	0.0443	0.0423	0.0470	0.0483	0.0409	0.0428	88.5	5.1	85.9	3.7
	2	0.0431	0.0439	0.0433	0.0403	0.0408	0.0406	84.0	3.4		
	3	0.0418	0.0433	0.0434	0.0441	0.0413	0.0412	85.0	2.5		
0.5	1	0.445	0.461	0.465	0.466	0.407	0.454	89.9	3.5	86.8	2.9
	2	0.422	0.420	0.458	0.423	0.424	0.404	85.0	2.6		
	3	0.448	0.438	0.409	0.422	0.420	0.424	85.4	2.5		
1	1	0.939	0.954	0.952	1.06	0.898	0.894	95.0	4.1	91.9	3.4
	2	0.916	0.876	0.924	0.889	0.939	0.874	90.3	2.6		
	3	0.866	0.946	0.910	0.866	0.948	0.889	90.4	3.4		
10	1	8.08	7.90	8.13	8.03	9.38	9.11	84.4	6.4	91.7	3.9
	2	9.96	9.52	9.75	9.26	9.48	9.21	95.3	2.3		
	3	9.13	9.24	9.30	9.52	9.97	10.1	95.4	3.4		
250	1	229	229	258	242	225	265	96.5	5.7	96.3	4.6
	2	230	261	238	256	267	242	99.6	5.0		
	3	239	227	223	245	224	235	92.9	3.2		
1000	1	929	946	940	856	939	851	91.0	4.2	89.1	4.6
	2	850	810	939	872	882	948	88.4	4.5		
	3	906	840	914	951	817	842	87.8	5.2		

表 14 精料补充料准确度及精密度结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	回收率 (%)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率 (%)	相对 平均 偏差
0.05	1	0.0461	0.0461	0.0527	0.0517	0.0464	0.0467	96.6	5.4	92.3	3.1
	2	0.0445	0.0462	0.0458	0.0478	0.0456	0.0471	92.3	1.9		
	3	0.0444	0.0434	0.0431	0.0431	0.0458	0.0442	88.0	1.8		
0.5	1	0.455	0.471	0.482	0.462	0.470	0.428	92.3	2.9	89.8	4.2

	2	0.475	0.439	0.446	0.423	0.407	0.423	87.1	4.1		
	3	0.472	0.473	0.432	0.483	0.422	0.422	90.1	5.6		
1	1	0.941	0.956	0.991	0.905	0.938	0.947	94.6	1.9	91.2	2.4
	2	0.930	0.862	0.928	0.915	0.940	0.890	91.1	2.5		
	3	0.909	0.916	0.869	0.853	0.864	0.853	87.7	2.7		
10	1	8.63	8.75	9.06	9.57	9.94	9.90	93.1	5.3	95.1	4.2
	2	9.29	10.0	10.2	9.67	10.4	10.1	99.4	3.1		
	3	9.46	8.45	9.11	9.87	9.65	9.07	92.7	4.2		
250	1	247	259	223	275	253	259	101.1	4.7	101.6	3.7
	2	237	245	244	229	255	261	98.1	3.5		
	3	271	274	264	271	262	243	105.7	3.0		
1000	1	906	930	912	941	905	920	91.9	1.2	91.8	2.2
	2	953	935	905	880	940	904	92.0	2.5		
	3	949	962	882	886	917	897	91.6	3.0		

由上表可以看出，不同的饲料样品，添加回收率均在 80% 以上，批内变异系数均在 10% 范围内，批间变异系数在 15% 内，方法满足饲料中左旋咪唑的测定的方法学要求。

通过样品的添加回收试验，证明本方法可适用于包括配合饲料、浓缩饲料、预混饲料及精料补充料等饲料样品中左旋咪唑的检测。

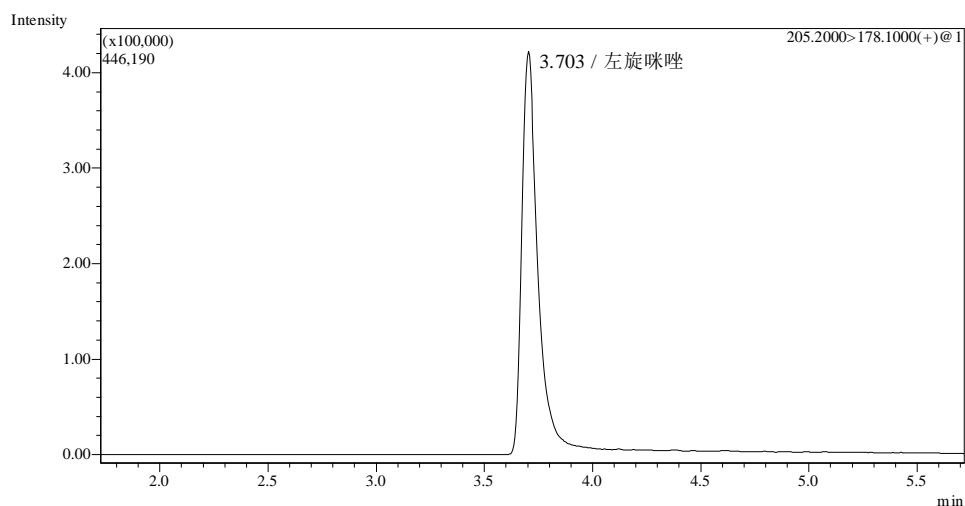


图 19 左旋咪唑标准溶液 (10 µg/L) 质量色谱图

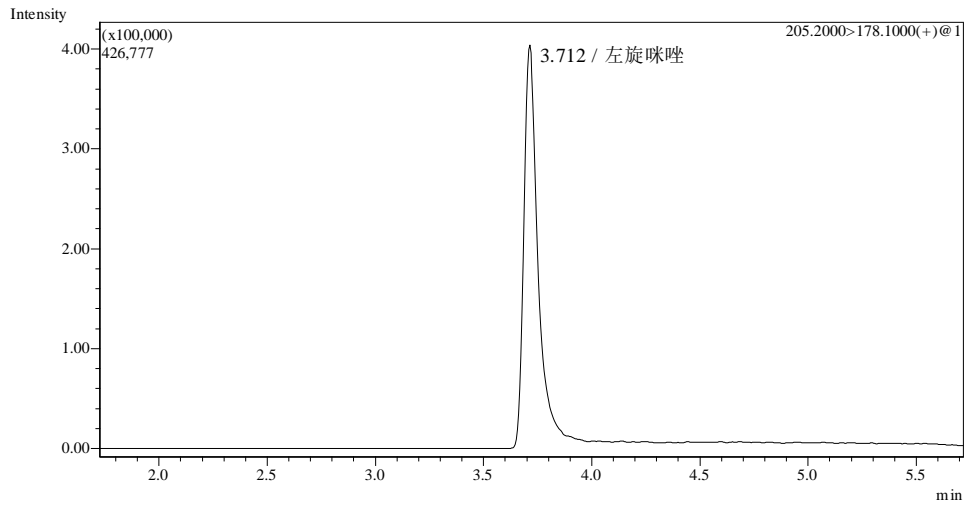


图 20 配合饲料基质匹配标准溶液质量色谱图 (10 μ g/L)

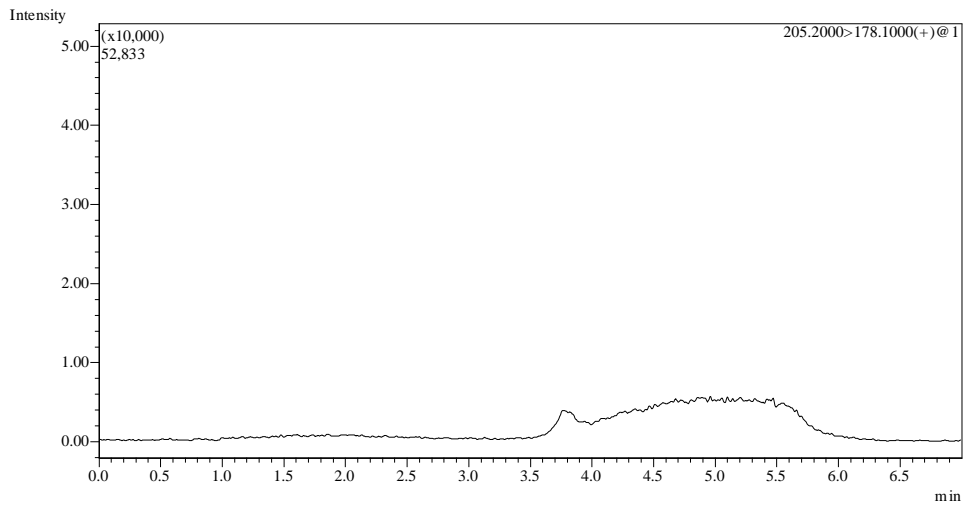


图 21 猪配合饲料空白样品质量色谱图

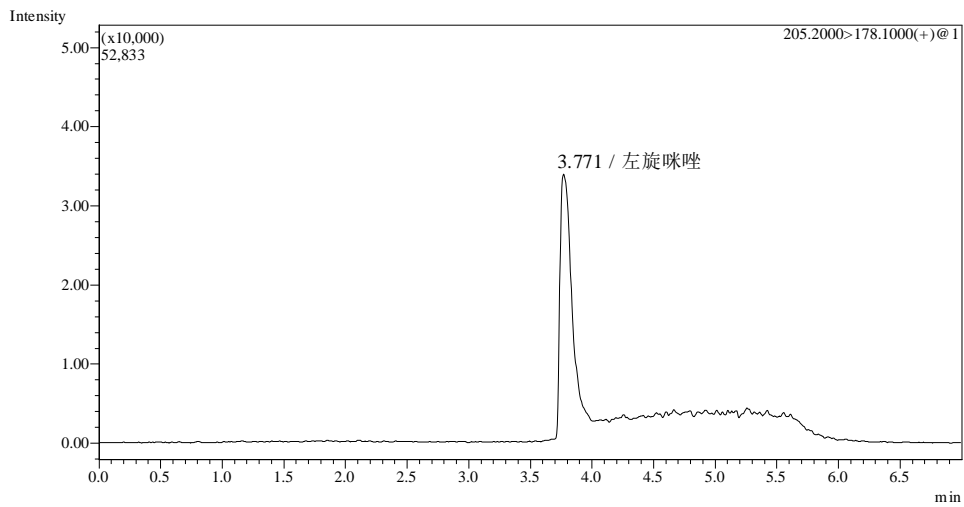


图 22 猪配合饲料添加样品 (0.05mg/kg) 质量色谱图

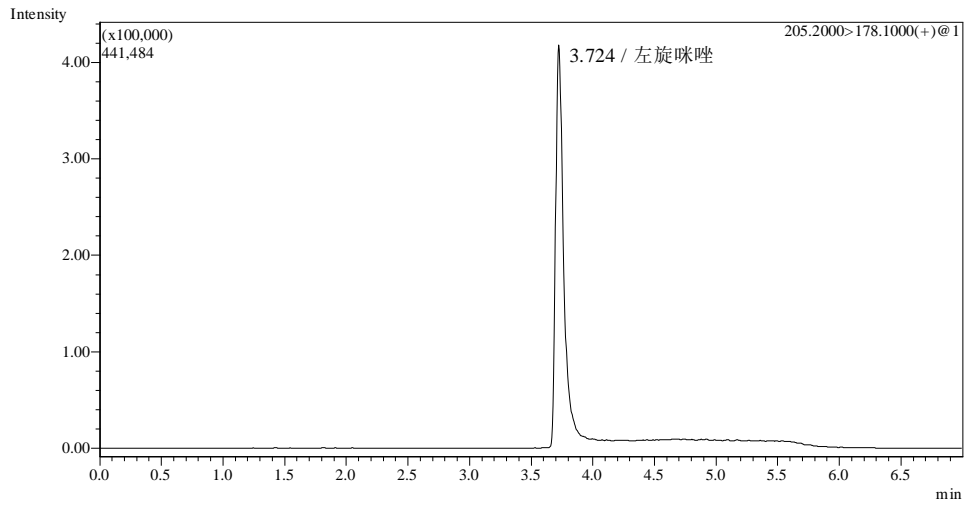


图 23 浓缩饲料基质匹配标准溶液质量色谱图 (10 μ g/L)

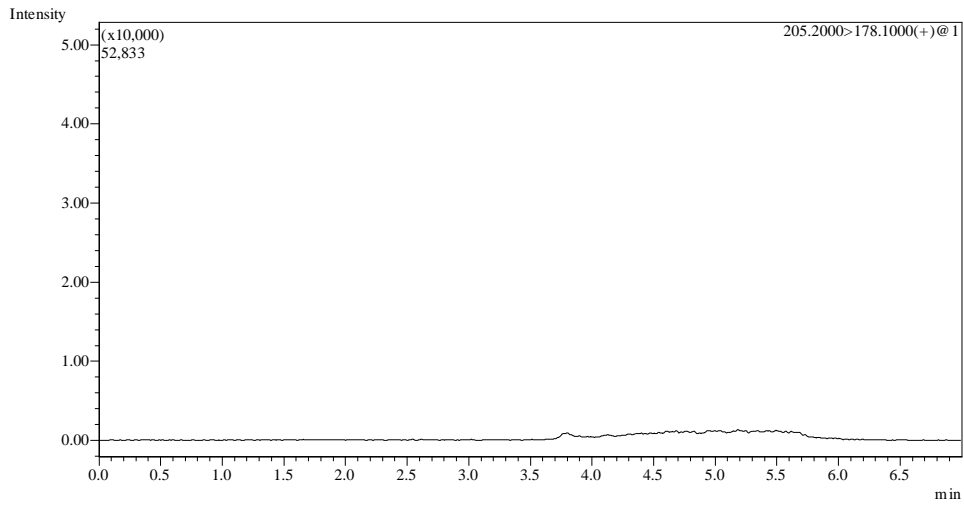


图 24 浓缩饲料空白样品质量色谱图

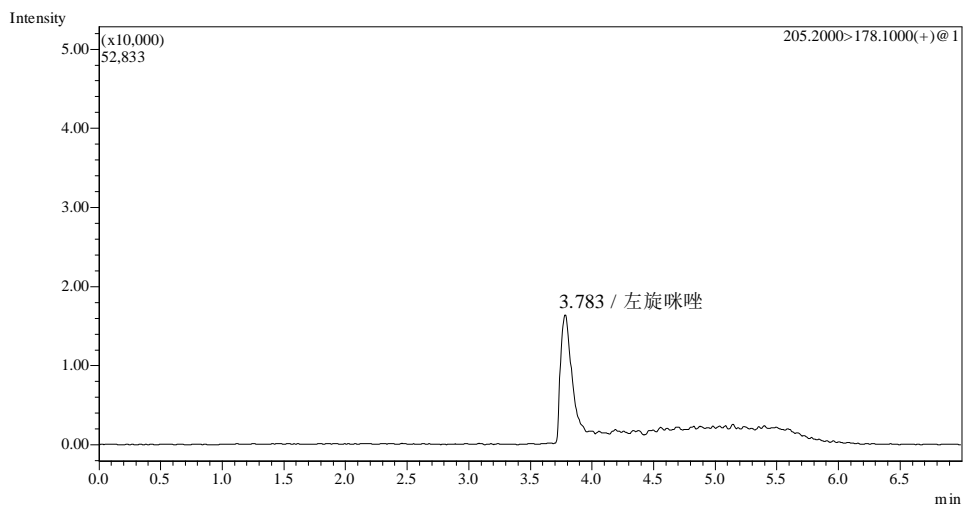


图 25 浓缩饲料添加样品 (0.05mg/kg) 质量色谱图

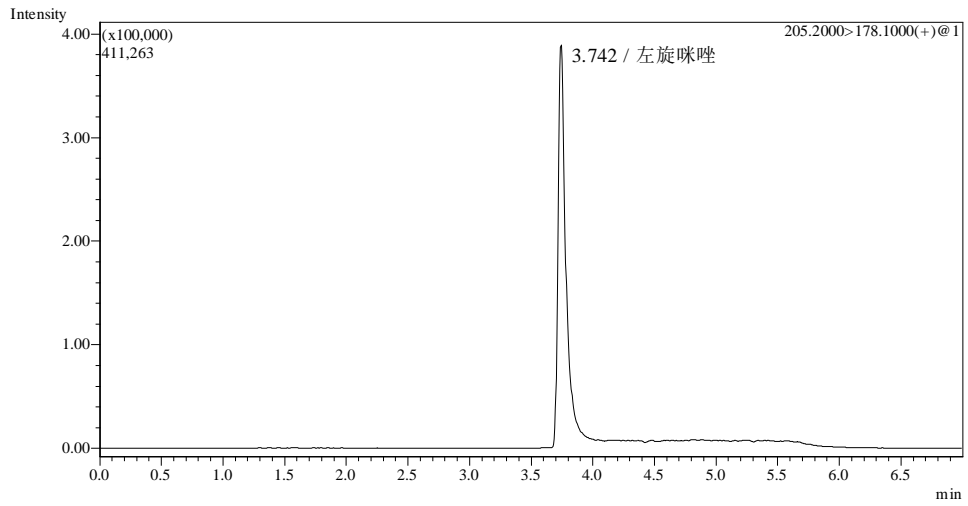


图 26 添加剂预混合饲料基质匹配标准溶液质量色谱图 (10µg/L)

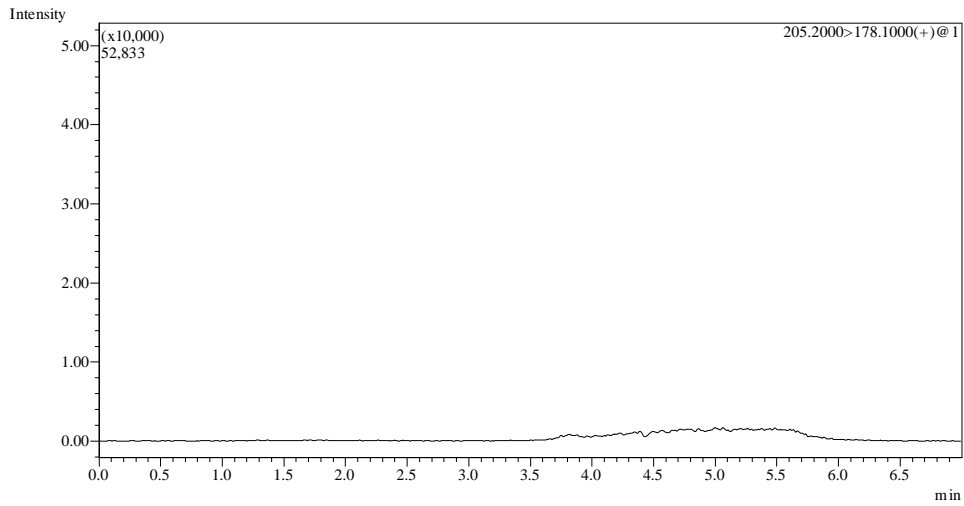


图 27 添加剂预混合饲料空白样品质量色谱图

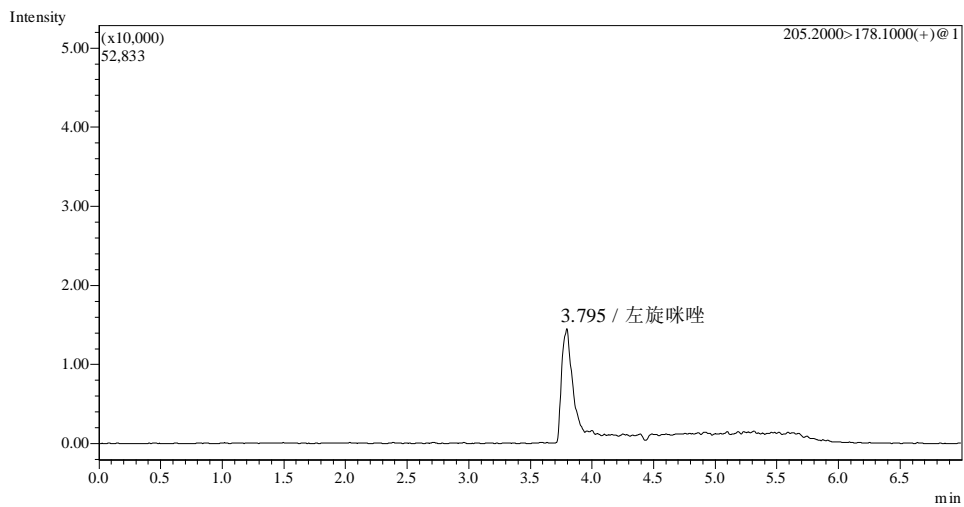


图 28 添加剂预混合饲料添加样品 (0.05mg/kg) 质量色谱图

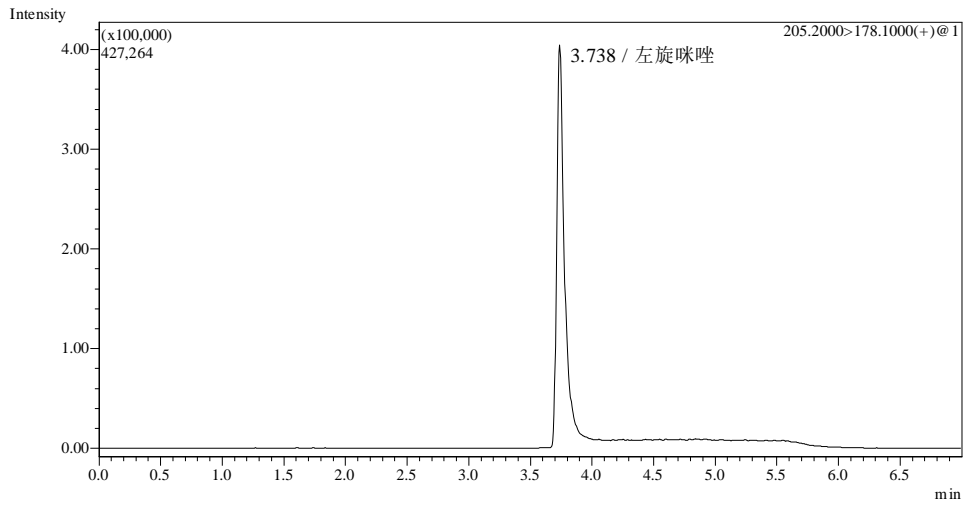


图 29 精料补充料基质匹配标准溶液质量色谱图 (10µg/L)

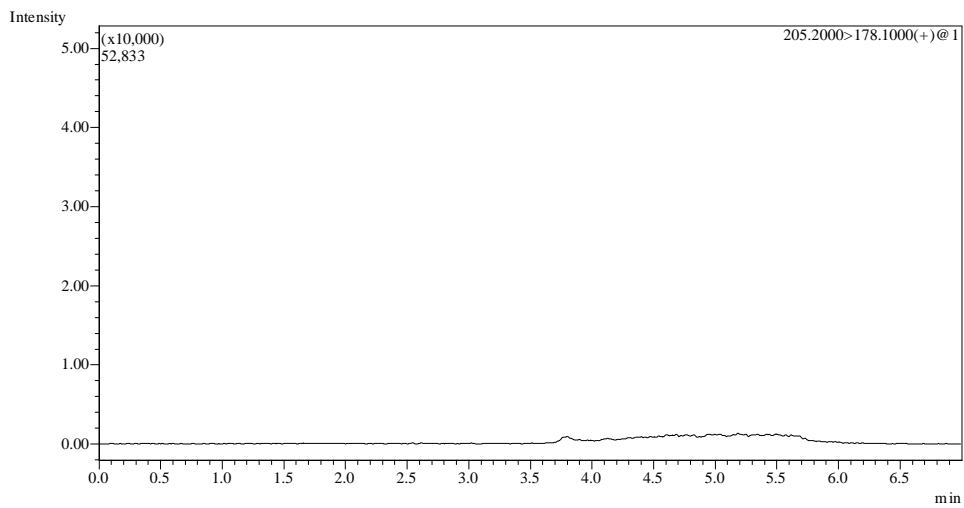


图 30 精料补充料空白样品质量色谱图

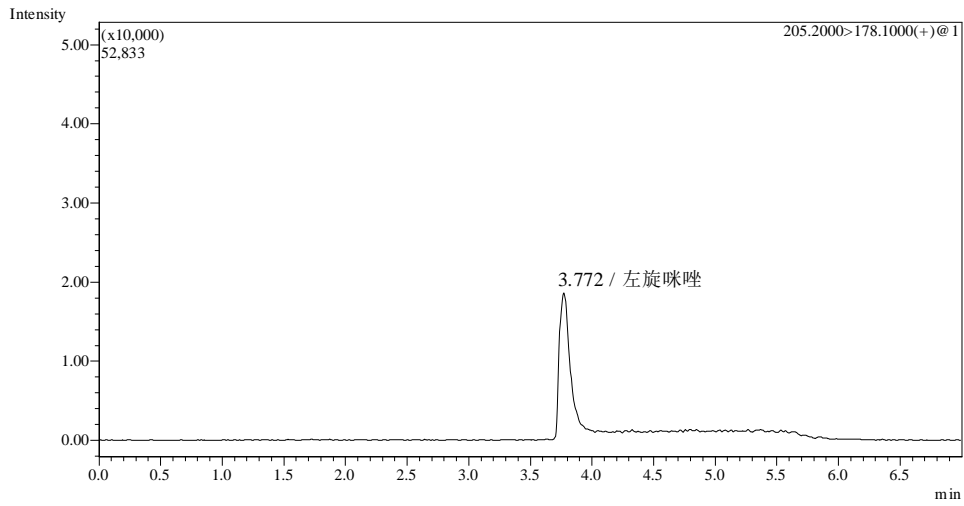


图 31 精料补充料添加样品 (0.05mg/kg) 质量色谱图

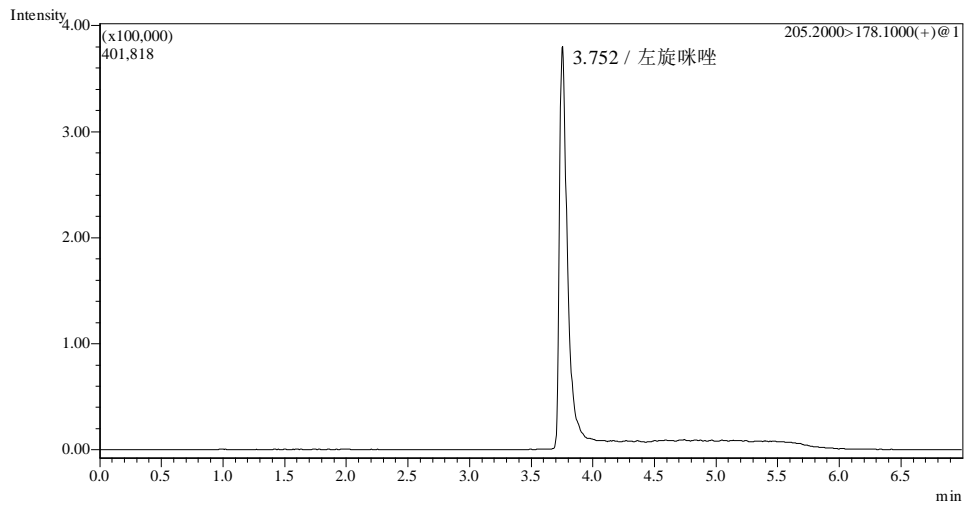


图 32 水产配合饲料基质匹配标准溶液质量色谱图 (10µg/L)

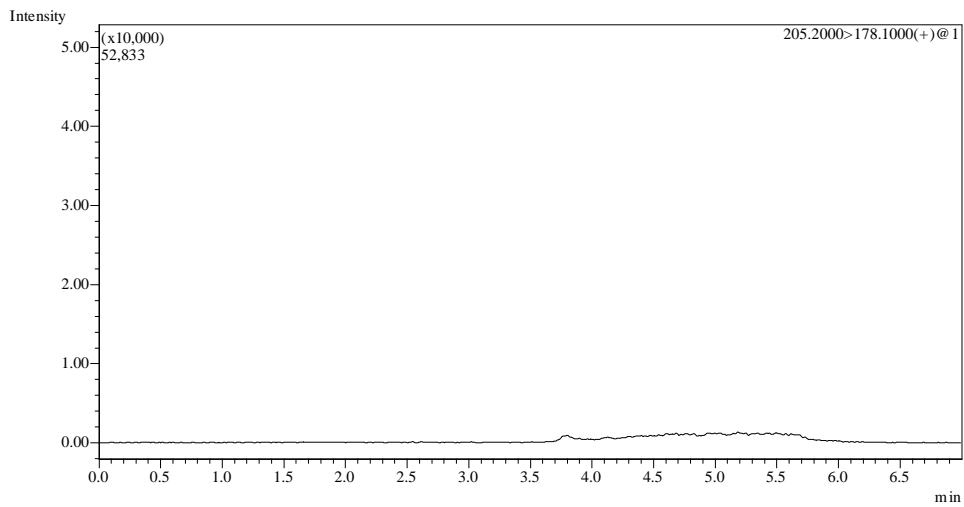


图 33 水产配合饲料空白样品质量色谱图

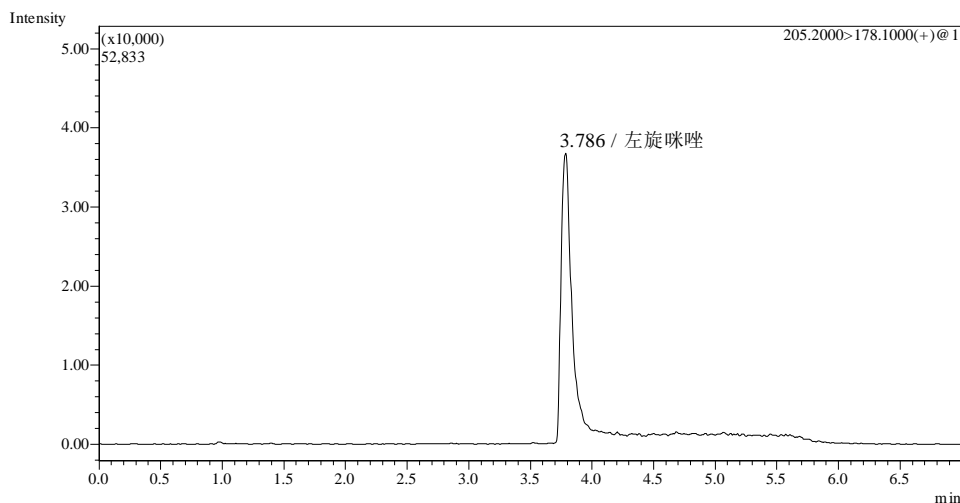


图 34 水产配合饲料添加样品 (0.05mg/kg) 质量色谱图

3.2 高效液相色谱法

3.2.1 液相条件选择

3.2.1.1 波长选择

采用二极管阵列检测器在 190 nm~400 nm 波长扫描得到左旋咪唑色谱峰的光谱图，波长扫描图见图 39。结果表明，左旋咪唑在波长 215 nm 有最大吸收，且无明显杂质干扰。因此，选择 215nm 作为其检测波长。与旧标准保持一致。

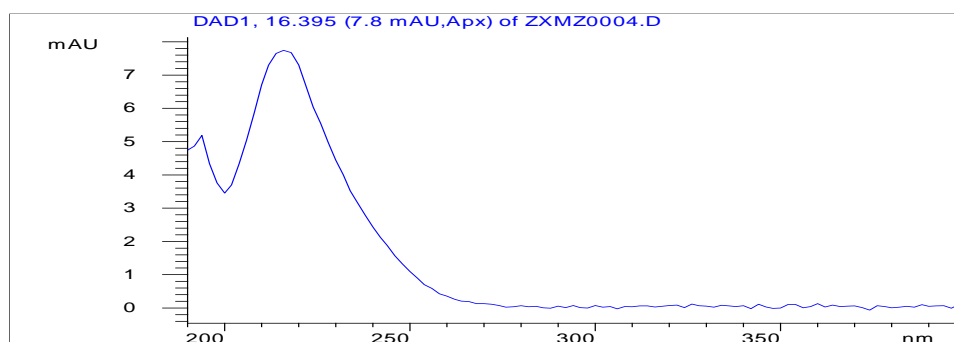


图 39 左旋咪唑波长扫描图

3.2.1.2 色谱柱选择

测定左旋咪唑可使用 C_{18} 、SCX 色谱柱进行分离，旧标准使用 SCX 进行分离，由于 C_{18} 色谱柱更常用，试验对比了采用不同厂家 C_{18}

柱均可，除了保留时间有差异外，均表现出了良好的峰型，故本方法采用 C₁₈（250mm×4.6mm, 粒径 5 μ m）色谱柱作为分析柱。

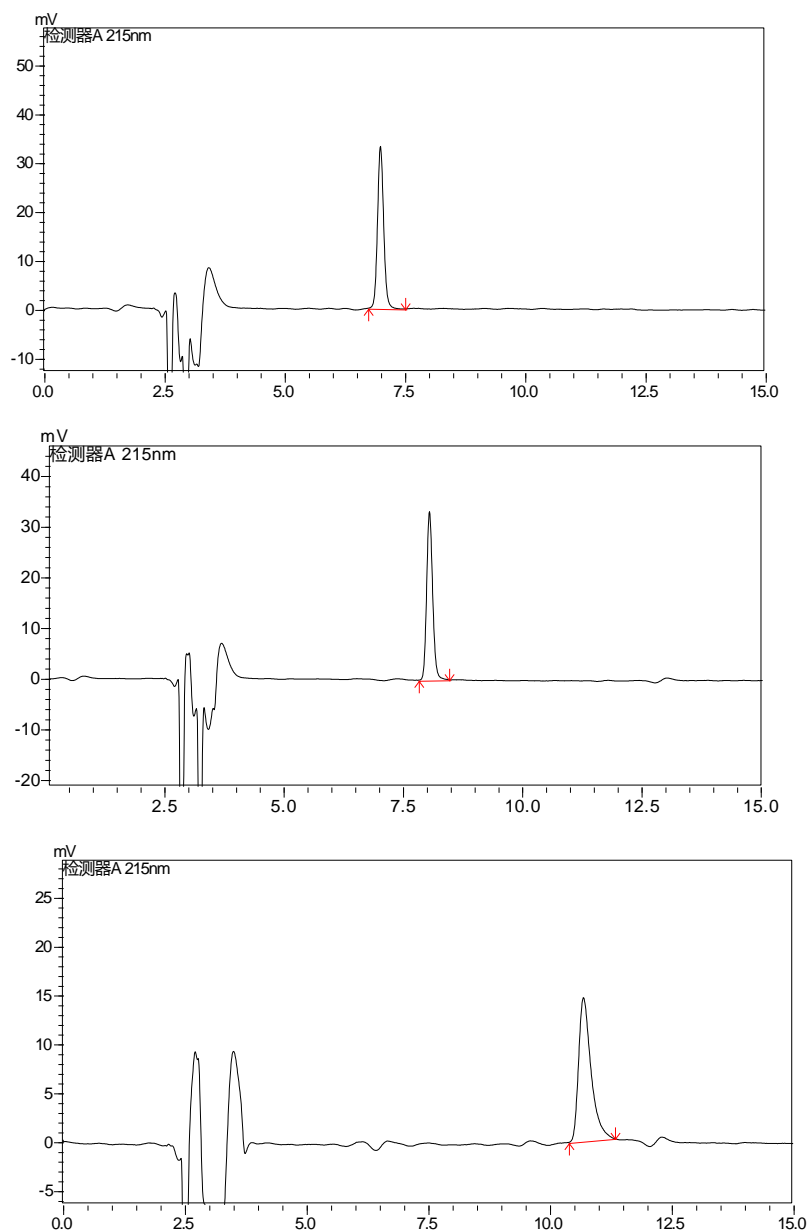
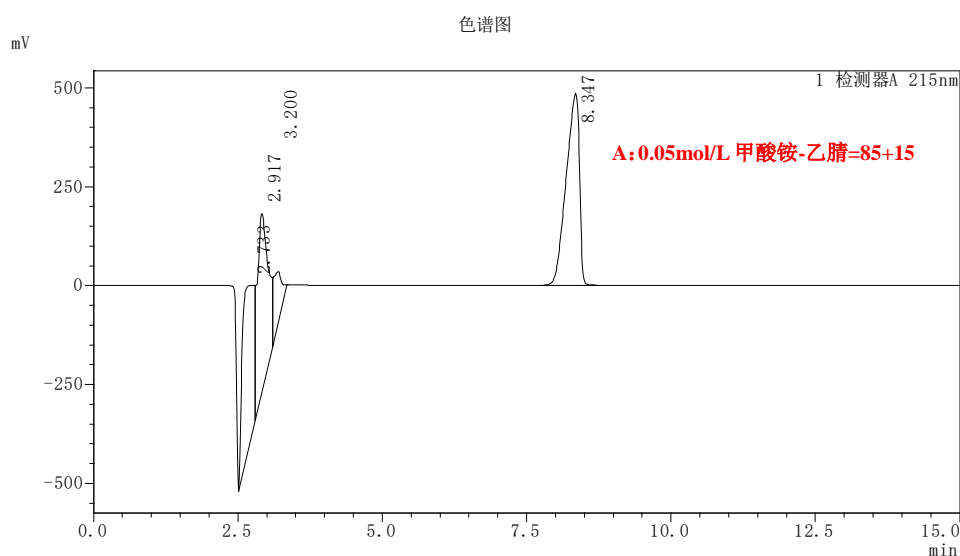


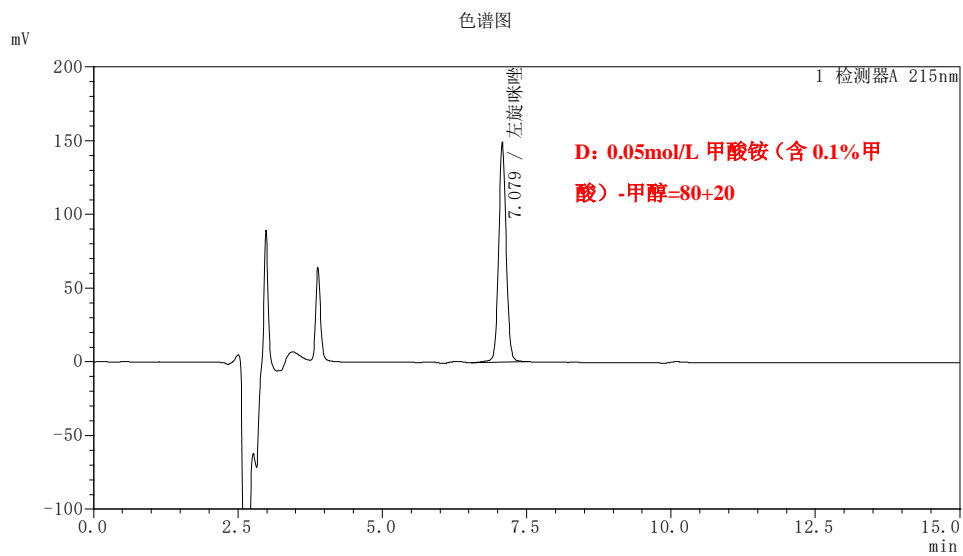
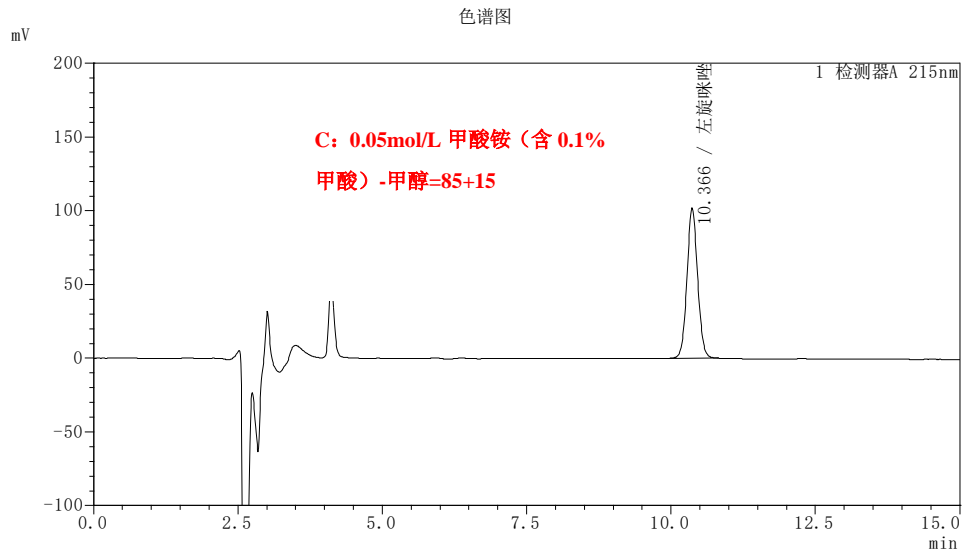
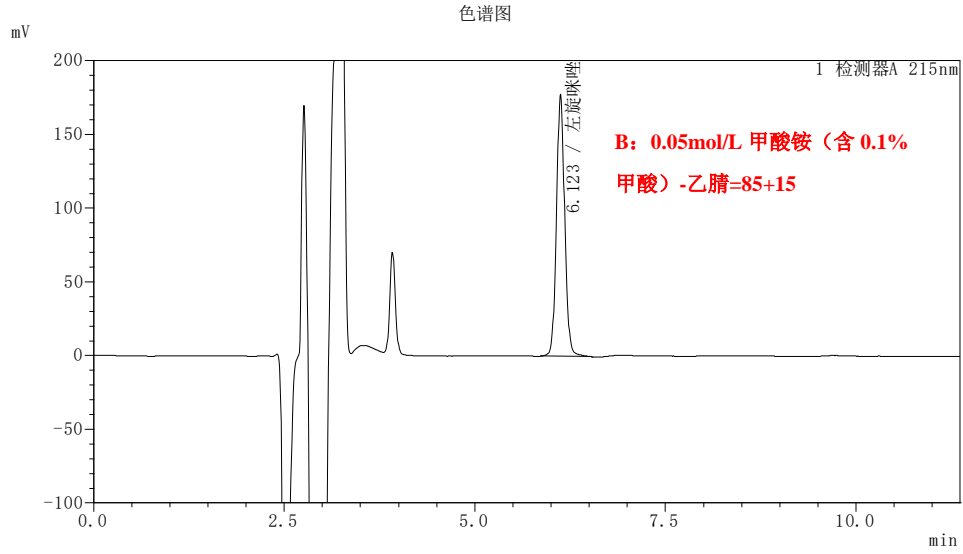
图 40 不同色谱柱左旋咪唑液相液相色谱图

3.2.1.3 液相色谱条件的优化

本实验比较了甲酸水-乙腈、甲酸水-甲醇、0.05mol/L 甲酸铵-乙腈、0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1% 甲酸水）-乙腈、0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1% 甲酸水）-甲醇、0.05mol/L 乙酸铵-乙腈等不同流动相条件下左

旋咪唑的分离峰型情况，对比峰型，杂质分离度以及响应值。
0.05mol/L 甲酸铵-乙腈体系在部分色谱柱上显示较好的峰型和分离度，在另外一部分色谱柱上出现比较严重的峰前延现象。水相使用 0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1% 甲酸水）时不同色谱柱均表现出良好的峰型和分离度，随后对比甲醇和乙腈作为有机相时，对目标物分析的影响，结果显示，两者均具有良好的峰型和杂质分离度，相比较，同等有机相下乙腈出峰时间较快，且乙腈毒性强于甲醇，最终选择 0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1% 甲酸水）+ 甲醇=80+20 作为流动性体系，基线平稳，左旋咪唑峰对称性、出峰时间以及响应值均较好。不同流动相体系色谱图见图 41。





A——0.05mol/L 甲酸铵-乙腈=85+15

B——0.05mol/L 甲酸铵 (含 0.1% 甲酸) -乙腈=85+15

C——0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1%甲酸）-甲醇=85+15

D——0.05mol/L 甲酸铵（含 0.1%甲酸）-甲醇=80+20

图 41 左旋咪唑液相色谱图

3.1.2.5 净化柱的选择

饲料属于复杂基质样品。由于饲料样品中含有大量的蛋白质、脂肪等杂质，加之无机盐、色素的影响，这些杂质不仅会对实验的回收率有影响，还会降低色谱柱和仪器的使用寿命，旧标准在定量限时，杂质干扰较大，可能存在假阳性情况。因此需对样品提取液进行进一步净化处理。实验考察了 **MCX**、**HLB**、**C18** 以及 **WCX** 等净化小柱的对配合饲料、浓缩饲料、精补料以及添加剂预混合饲料的净化效果。结果显示，左旋咪唑在这几种净化柱上均具有较好的保留效果，回收率满足要求。**HLB**、**C18** 是根据极性进行富集分析，结合作用较弱，对左旋咪唑除杂效果较弱。左旋咪唑具有较强极性，且在酸性环境中可以带正电，可以通过离子交换进行净化，且结合作用较强，可以用纯有机相进行淋洗除杂，净化效果更好。**MCX** 小柱和 **WCX** 小柱均表现出良好的净化效果和回收率，由于 **MCX** 小柱更为常用，因此选择 **MCX** 小柱进行净化。

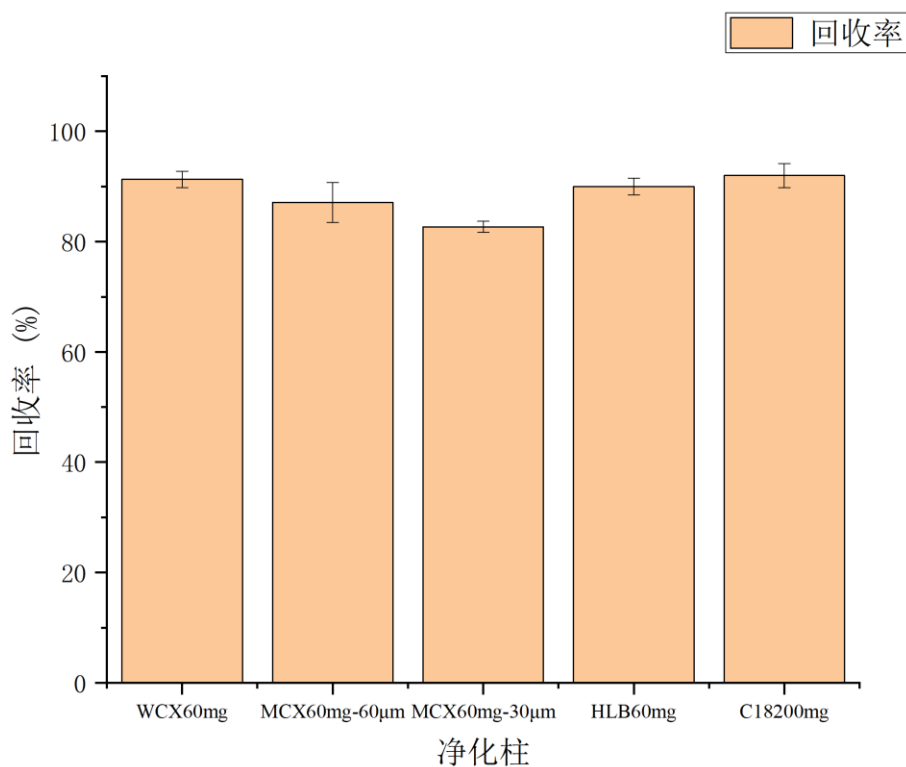


图 11 不同净化柱回收率对比

3.1.2.6 洗脱体积确定

为了优化净化柱的洗脱体积，考察了净化柱洗脱曲线，净化柱依次预淋洗、上样后，分别用不同体积 5%氨水甲醇溶液淋洗，收集淋洗液，50℃氮气吹干后，复溶过膜上机测定。洗脱曲线见图 12。综合考察，选择 MCX 小柱净化，洗脱液体积为 3mL。

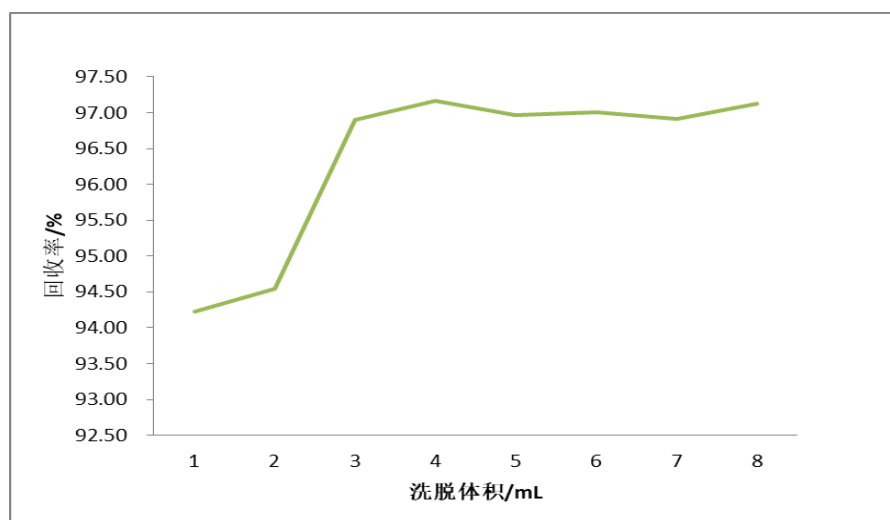


图 12 洗脱曲线

3.2.2 干扰实验

以常使用的抗生素和抗虫药物等为检测的干扰物质,应用该方法色谱条件对上述 30 种药物和左旋咪唑的混合标准溶液进行测定,包括 17 种磺胺类、4 种四环素(四环素、金霉素、土霉素、多西环素)、新霉素、壮观霉素、卡那霉素、6 种镇定剂(安眠酮、地西洋、盐酸氯丙嗪、盐酸异丙嗪、盐酸硫利达嗪、奋乃静)。结果表明,30 种干扰物质均能对左旋咪唑无干扰,表明该检测方法专属性较好,见图 42~44。

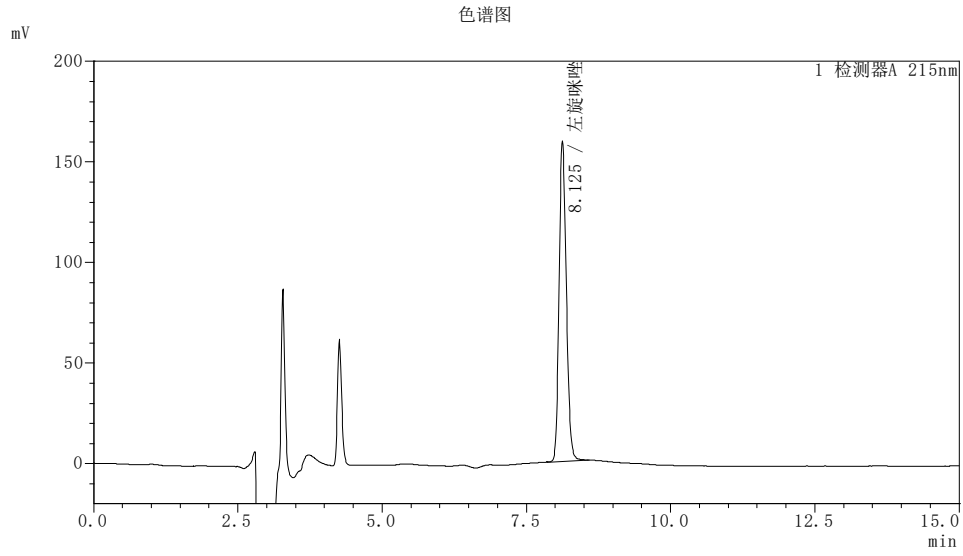


图 42 左旋咪唑标准色谱图(10.0 mg/kg)

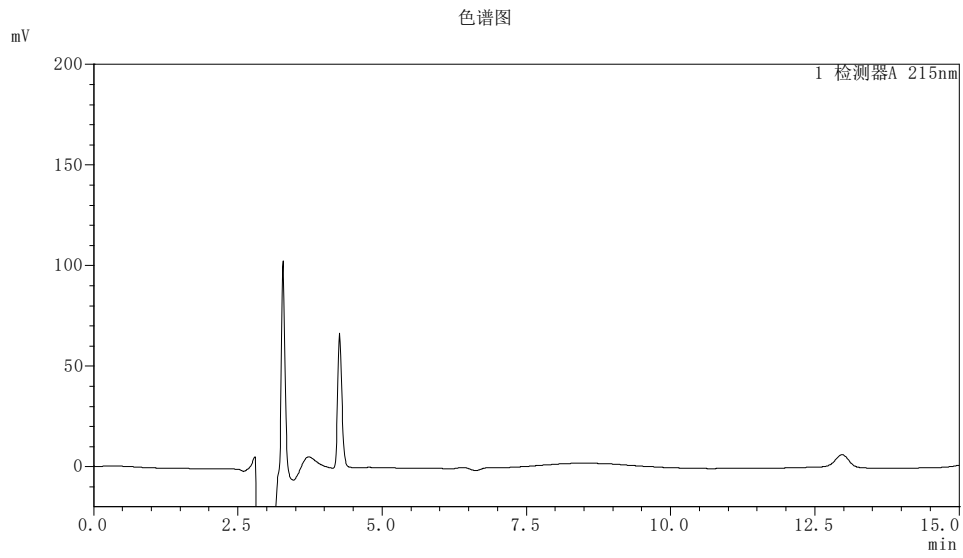


图 43 干扰物试样液相色谱图

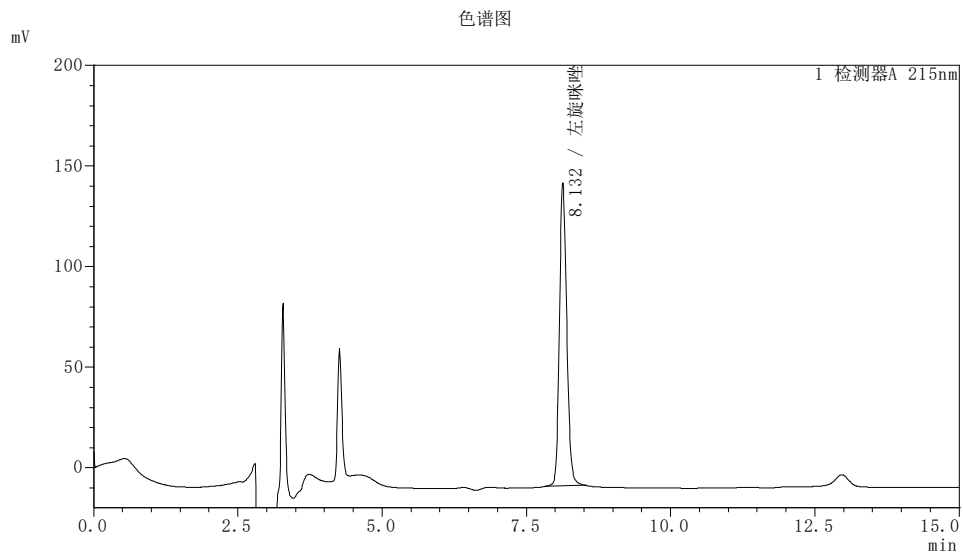


图 44 干扰物和左旋咪唑液相色谱图

根据定向征求意见，专家提出增加氯硝柳胺、四氢嘧啶类和苯并咪唑类等杀虫药（如阿苯达唑）的液相干扰实验。试验结果表明，集中干扰物对左旋咪唑分析并未有干扰，表明该检测方法专属性较好，见图 45~47。

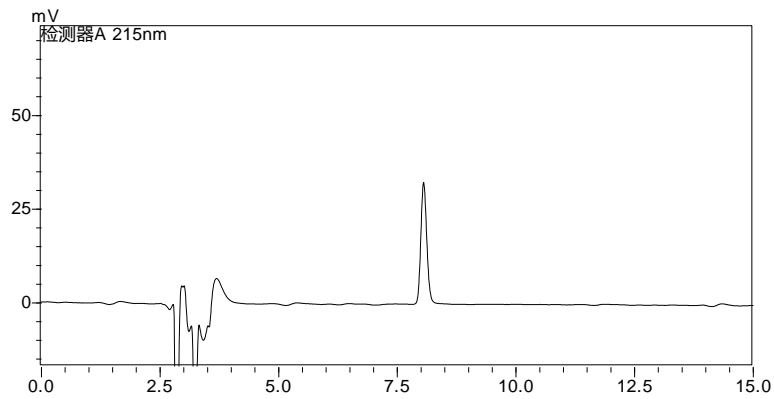


图 45 左旋咪唑标准色谱图(10.0 mg/kg)

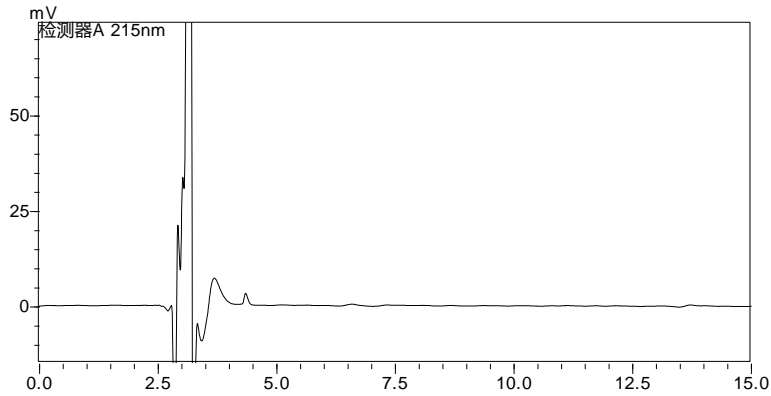


图 46 干扰物（氯硝柳胺、四氢嘧啶和阿苯达唑）试样液相色谱图

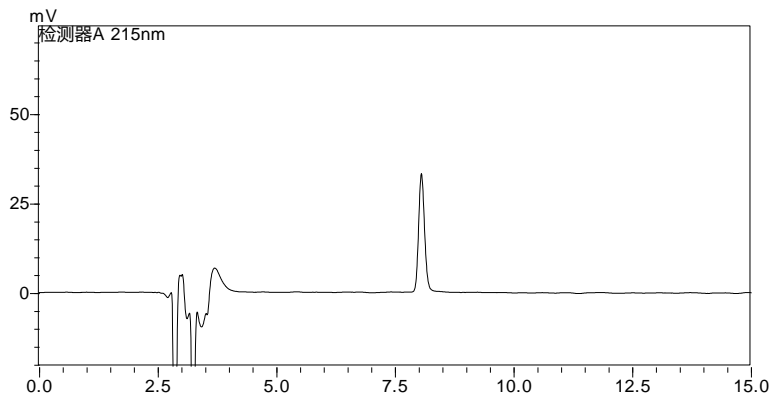


图 47 干扰物（氯硝柳胺、四氢嘧啶和阿苯达唑）和左旋咪唑液相色谱图

3.2.3 分析步骤的确定

3.2.3.1 提取

平行做两份试验。称取配合饲料 2 g（浓缩饲料、精料补充饲料和添加剂预混合饲料各 1 g），精确至 0.01 g，于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 超纯水，再加入 0.5mL 氨水，再加入 10mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 1 min，水平振荡提取 20min。于 8000 r/min 离心 5 min。取上清液于 50mL 离心管中，残渣用 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次，合并两次提取液，混匀。准确移取 10 mL 提取液于 50 mL 离心管中，于 45℃ 下氮气吹干，加入 10 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液，在加入 5mL 正己烷脱脂，去上清，得到试样待测液，待净化。

3.2.3.2 净化

MCX 固相萃取小柱依次用 3mL 甲醇、3mL 0.1 mol/L 盐酸溶液活化，取上述得到的试样待测液 5mL 过柱，依次用 3mL 水和 3mL 甲醇淋洗。用 3 mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，于 45℃ 水浴中氮气吹干，用 1 mL 20% 甲醇溶液复溶，涡旋混匀后过 0.45 μm 微孔滤膜，得到试样溶液，用高效液相色谱仪测定。

3.2.4 标准技术指标的验证

3.2.4.1 线性试验

准确移取左旋咪唑标准工作液适量，用流动相逐级稀释配制成浓度为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 的系列标准溶液上机测定。以左旋咪唑药物峰为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。得到的回归方程为 $Y = 136930X - 859.583$,

$r=0.9999$ 。结果显示，左旋咪唑在 $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系。左旋咪唑标准曲线见表 16 和图 48。

表 16 左旋咪唑液标准响应值及回归方程

浓度 mg/L	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0	50.0	回归方程	相关系数 r^2
峰面积	12905	26444	66393	135150	274091	688958	1377863	2767798	6796318	$Y = 136930X - 859.583$	0.9999

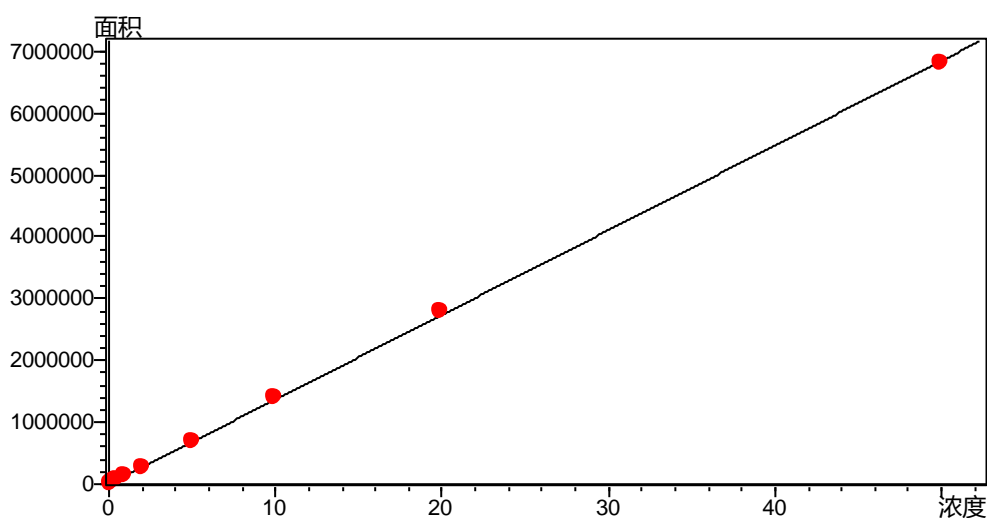


图 48 左旋咪唑标准曲线

3.2.4.2 检测限和定量限的确定

空白试料按相同的步骤处理后，在相应的保留时间，空白试料对所测分析物无干扰。检测限（LOD）与定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于 2 g 空白配合饲料样品（浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料各 1g），经提取净化后测定，根据所测药物的 $S/N \geq 3$ 为方法检测限， $S/N \geq 10$ 为方法定量限的原则，测得左旋咪唑在配合饲料中的检测限为 0.2 mg/kg ，定量限为 0.5 mg/kg 。在浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中的检测限为 0.4 mg/kg ，定量限为 1 mg/kg 。

3.2.4.3 方法的回收率和精密度

按照定量限及该药物在临床使用的有效剂量，确定配合饲料的添加浓度分别为 0.5 mg/kg（定量限）、1 mg/kg、10 mg/kg 和 250 mg/kg。因此其他饲料添加浓度分别为 1 mg/kg（定量限）、10 mg/kg、250 mg/kg。按照确定的前处理方法和仪器条件，进行处理和分析。每个添加浓度设 6 个平行，进行 3 次重复。回收率试验中，当样品上机液的浓度超过线性范围时，需稀释后重新测定，直至上机液浓度在线性范围内。配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料以及精料补充料的添加回收结果见表 17-21。

表 17 配合饲料中左旋咪唑添加回收率测定结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率(%)	相对 平均 偏差
0.5	1	0.440	0.456	0.439	0.431	0.429	0.429	87.5	1.8	86.5	3.8
	2	0.460	0.435	0.409	0.408	0.459	0.441	87.1	4.1		
	3	0.417	0.404	0.455	0.402	0.466	0.406	85.0	5.6		
1	1	0.752	0.836	0.832	0.813	0.754	0.812	80.0	3.9	79.5	2.9
	2	0.800	0.818	0.758	0.768	0.785	0.835	79.4	3.0		
	3	0.781	0.787	0.779	0.822	0.808	0.776	79.2	1.9		
10	1	8.10	8.57	8.64	8.76	8.47	8.79	85.6	2.1	84.6	2.4
	2	8.28	8.50	8.67	8.48	8.58	8.07	84.3	2.0		
	3	8.68	8.03	8.42	8.16	8.80	8.20	83.8	3.0		
250	1	223	221	207	208	218	210	85.8	2.9	87.2	2.5
	2	231	237	239	212	235	238	92.8	3.0		
	3	207	200	214	206	212	208	83.1	1.7		
1000	1	881	959	905	880	911	949	91.4	2.9	94.7	4.7
	2	1073	965	903	1086	1074	902	100.1	7.7		
	3	923	1003	883	900	910	942	92.7	3.3		

表 18 浓缩饲料中左旋咪唑添加回收率测定结果

加标浓度	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
------	----	-------------	--	--	--	--	--	------	--	------	--

(mg/kg)								平均回收率 (%)	相对平均偏差	平均回收率 (%)	相对平均偏差
1	1	0.783	0.758	0.772	0.828	0.797	0.789	78.8	2.1	78.6	1.4
	2	0.773	0.798	0.807	0.790	0.791	0.812	79.5	1.3		
	3	0.783	0.782	0.776	0.774	0.769	0.758	77.4	0.9		
10	1	7.68	7.6	8.24	8.28	7.52	7.88	78.7	3.4	82.3	5.0
	2	8.50	7.56	9.00	8.78	7.62	8.88	83.9	6.4		
	3	8.57	9.16	8.90	8.19	8.23	7.56	84.4	5.2		
250	1	220	212	220	221	211	205	85.9	2.6	85.9	2.2
	2	213	210	224	214	225	210	86.4	2.6		
	3	214	210	223	214	210	211	85.5	1.6		
1000	1	895	996	939	983	896	998	95.1	4.3	96.7	4.5
	2	1046	1094	1013	1023	1095	929	103.3	4.4		
	3	920	982	877	899	980	842	91.7	4.8		

表 19 添加剂预混合饲料中左旋咪唑添加回收率测定结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
								平均回收率 (%)	相对平均偏差	平均回收率 (%)	相对平均偏差
1	1	0.736	0.724	0.728	0.820	0.761	0.825	76.6	4.9	78.3	3.5
	2	0.790	0.802	0.812	0.794	0.779	0.846	80.4	2.1		
	3	0.775	0.740	0.771	0.750	0.826	0.817	78.0	3.6		
10	1	8.50	8.84	8.63	8.83	8.98	8.99	88.0	1.7	88.1	1.9
	2	8.55	9.06	8.85	8.63	8.60	9.07	87.9	2.3		
	3	9.00	8.62	8.82	9.08	8.85	8.67	88.4	1.5		
250	1	225	225	220	234	231	219	90.3	2.0	89.8	2.3
	2	227	228	216	214	233	228	89.7	2.8		
	3	214	227	226	223	230	219	89.3	2.0		
1000	1	988	1003	874	1000	1046	939	97.5	4.7	93.7	4.6
	2	985	905	978	932	965	897	94.4	3.4		
	3	837	862	912	990	830	929	89.3	5.6		

表 20 精料补充料中左旋咪唑添加回收率测定结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
								平均回收率	相对平均偏差	平均回收率 (%)	相对平均

								(%)			偏差
1	1	0.850	0.828	0.868	0.984	0.912	0.919	89.4	5.0	91.4	4.7
	2	0.851	0.982	0.974	0.958	0.856	0.962	93.1	5.5		
	3	0.954	0.971	0.927	0.872	0.901	0.888	91.9	3.5		
10	1	8.49	8.95	8.52	8.68	9.12	8.94	87.8	2.5	88.3	2.1
	2	8.73	8.75	8.99	8.68	9.09	9.03	88.8	1.8		
	3	8.91	8.63	9.16	8.70	8.57	8.93	88.2	2.1		
250	1	213	222	218	224	212	230	87.9	2.5	87.8	2.9
	2	206	218	231	225	208	215	86.9	3.5		
	3	207	218	220	231	224	227	88.5	2.8		
1000	1	943	907	899	987	911	924	92.9	2.6	93.0	4.1
	2	870	942	965	887	878	894	90.6	3.5		
	3	1090	927	918	900	897	996	95.5	6.2		

表 21 水产配合饲料中左旋咪唑添加回收率测定结果

加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
								平均回 收率 (%)	相对平 均偏差	平均回 收率(%)	相对 平均 偏差
0.5	1	0.411	0.408	0.41	0.402	0.486	0.407	84.1	5.2	91.2	5.4
	2	0.496	0.439	0.491	0.518	0.471	0.439	95.1	5.5		
	3	0.436	0.469	0.51	0.511	0.443	0.46	94.3	5.5		
1	1	0.842	0.784	0.912	0.772	0.785	0.763	81.0	5.5	82.7	4.9
	2	0.761	0.862	0.841	0.781	0.843	0.892	83.0	4.7		
	3	0.891	0.892	0.839	0.821	0.759	0.854	84.3	4.3		
10	1	7.66	7.93	7.374	7.924	7.50	7.78	76.9	2.4	77.3	2.2
	2	7.78	7.83	8.18	7.66	7.69	8.18	78.9	2.5		
	3	7.61	7.58	7.51	7.48	7.40	8.01	76.0	1.9		
250	1	186	188	197	198	191	201	77.4	2.7	78.0	2.8
	2	200	189	189	200	190	198	77.7	2.6		
	3	193	189	210	193	204	196	79.0	3.2		
1000	1	918	994	874	999	938	960	94.7	3.9	93.7	4.5
	2	832	987	842	856	913	856	88.1	5.2		
	3	993	949	1045	1007	1025	886	98.4	4.5		

从以上结果可以看出不同饲料、不同添加浓度其平均回收率均在 75% 以上，批内和批间的相对标准偏差均低于 15%。说明本方法能满

足饲料中左旋咪唑测定的要求。左旋咪唑标准溶液和不同添加浓度的
色谱图见图 49-图 61。

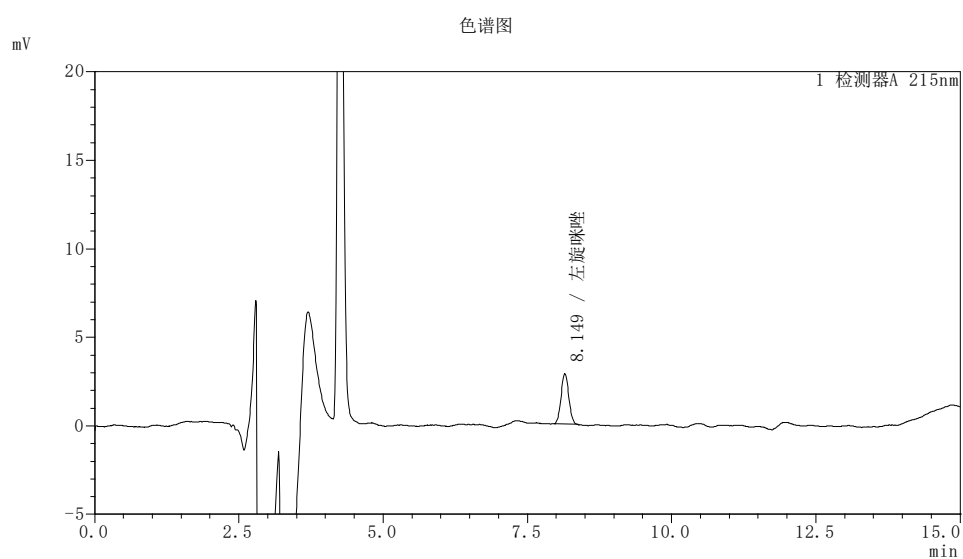


图 49 左旋咪唑标准溶液色谱图 (0.2 µg/mL)

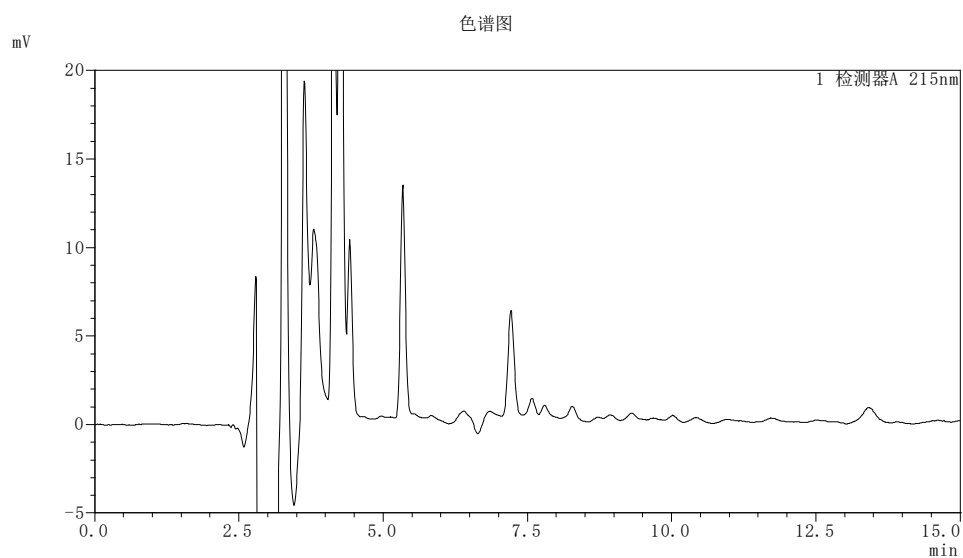


图 50 配合饲料空白试样色谱图

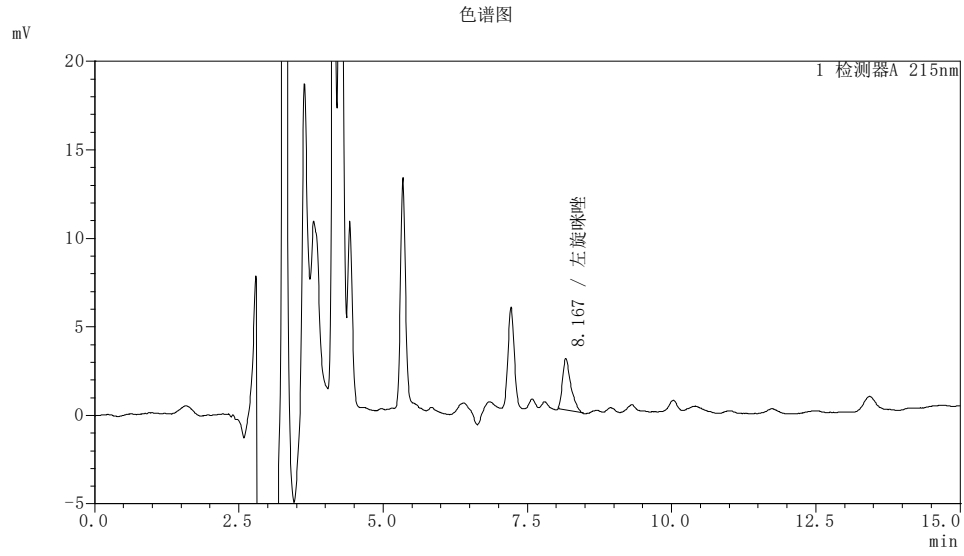


图 51 配合饲料空白添加左旋咪唑色谱图 (0.5 mg/kg)

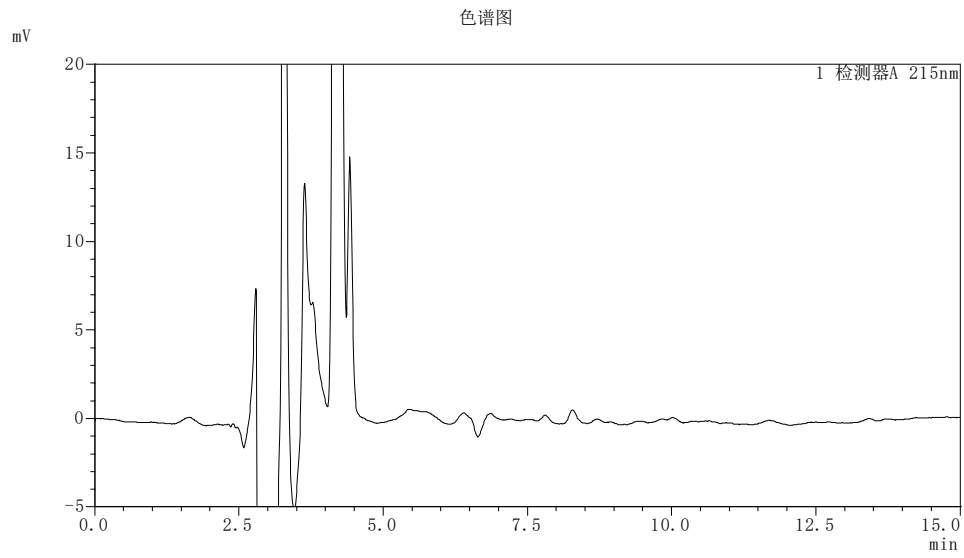


图 52 浓缩饲料空白试样色谱图

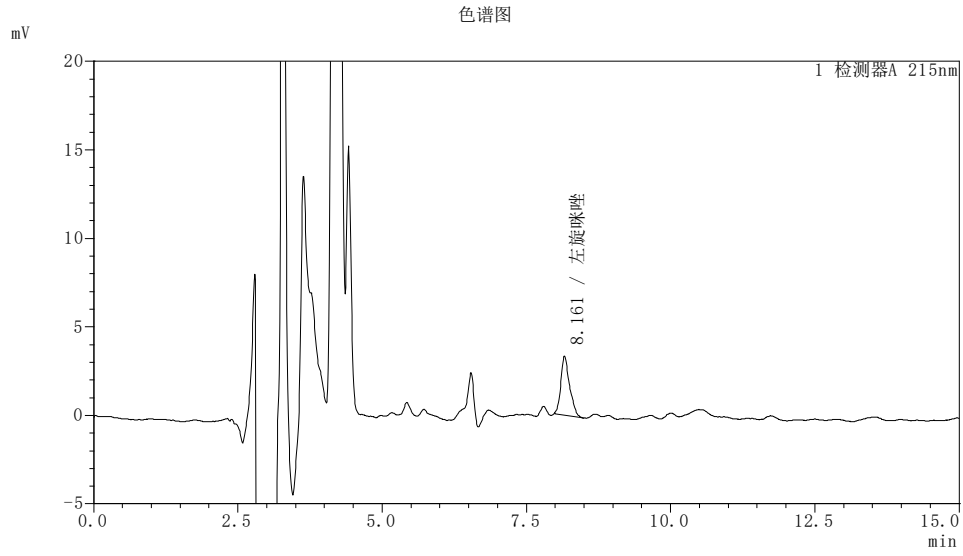


图 53 浓缩饲料空白添加左旋咪唑色谱图 (1.0 mg/kg)

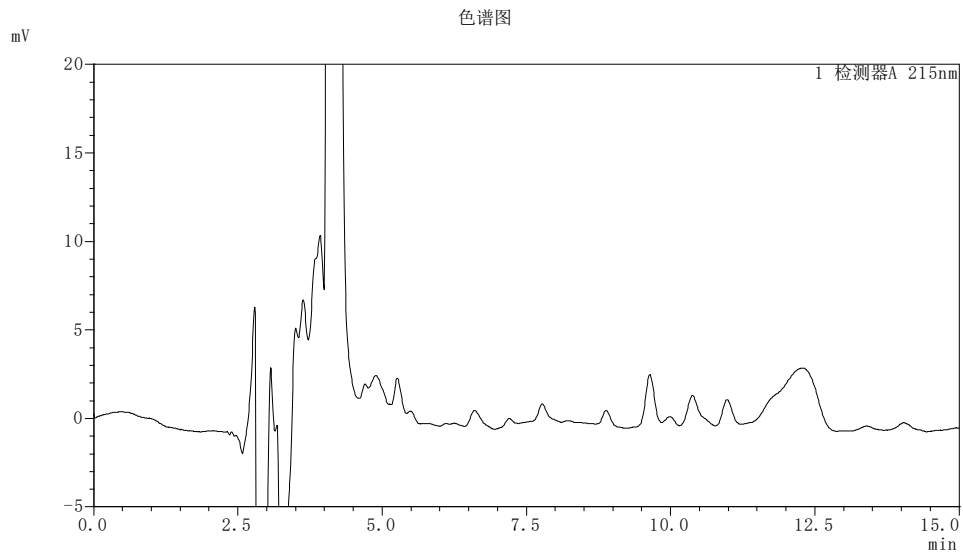


图 54 添加剂预混合饲料空白试样色谱图

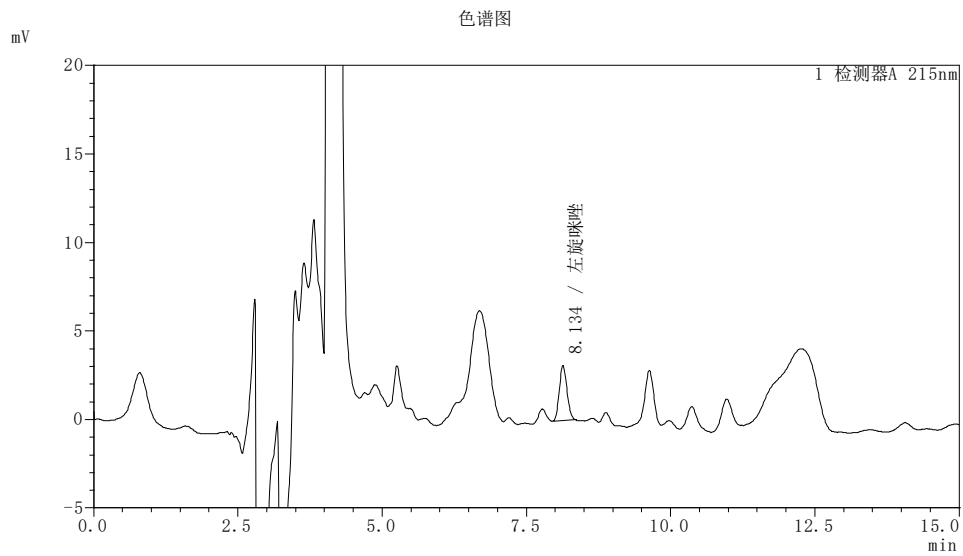


图 55 添加剂预混合饲料空白添加左旋咪唑色谱图 (1.0 mg/kg)

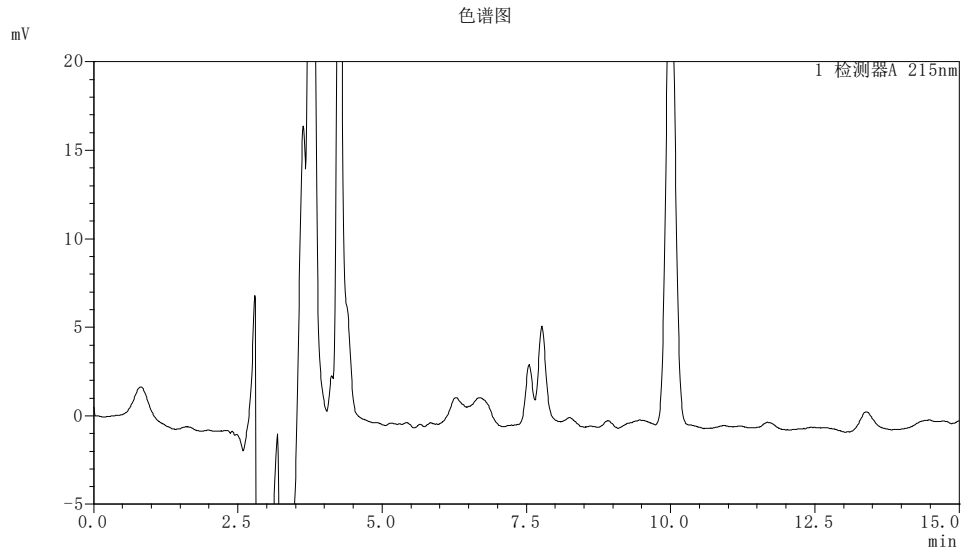


图 56 精料补充料空白色谱图

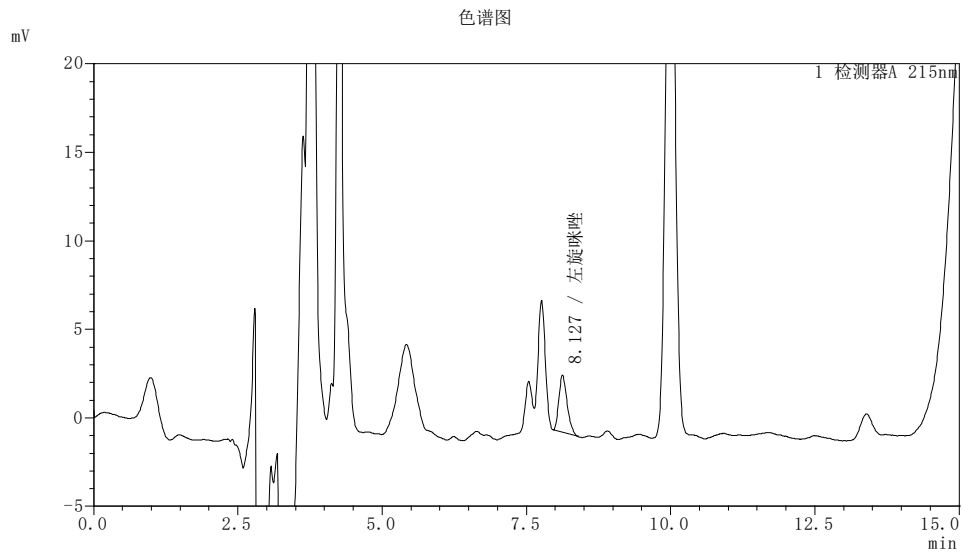


图 57 精料补充料空白添加左旋咪唑色谱图 (1.0 mg/kg)

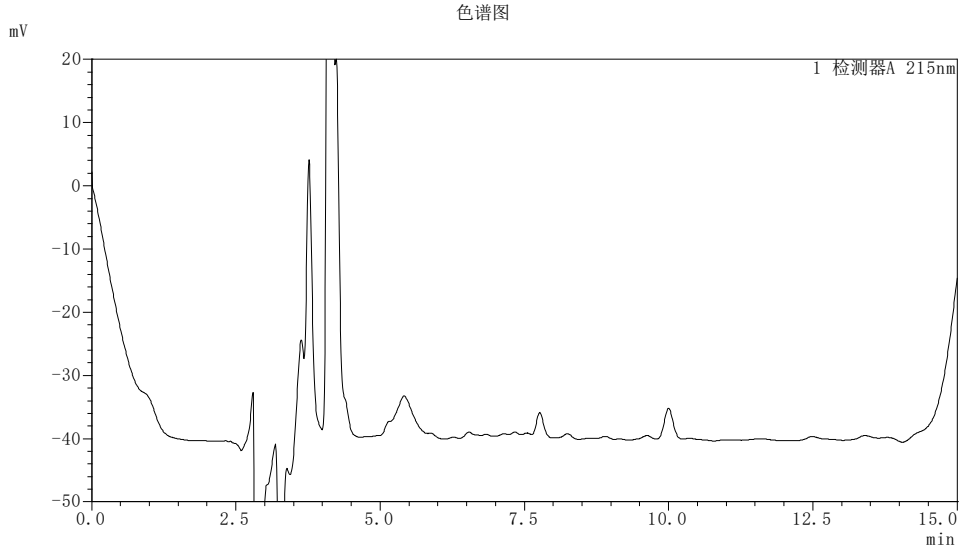


图 58 水产配合饲料空白色谱图

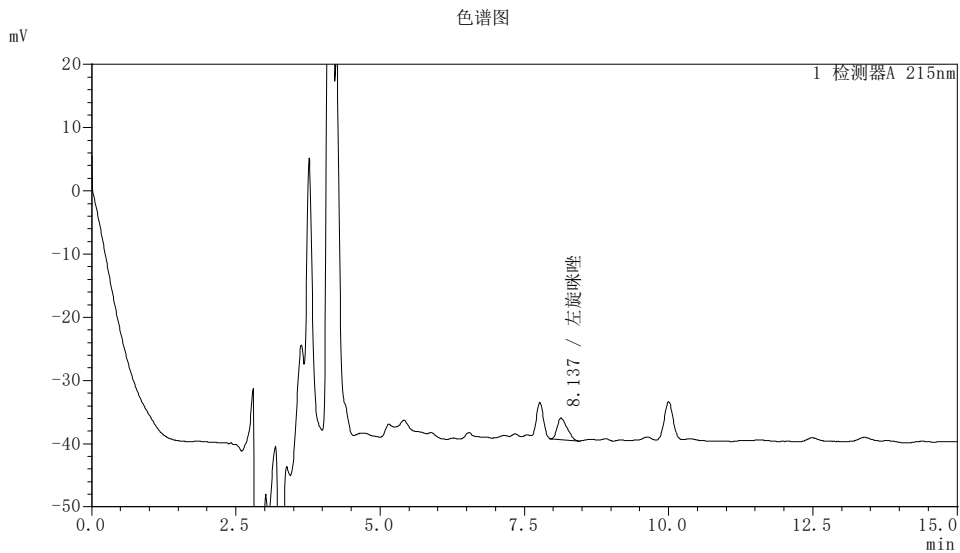


图 59 水产配合饲料空白添加左旋咪唑色谱图 (0.5mg/kg)

3.3 混合型饲料添加剂

根据预审会专家提出的意见，范围中建议考察本方法对植物提取物、微生物制剂等混合型饲料添加剂适用性。标准起草组选取混合型饲料添加剂 黄芪粗提物（超微三黄粉）、混合型饲料添加剂 姜黄素（五黄散）、混合型饲料添加剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）和混合型饲料添加剂菌肽菌素 4 种混合型饲料添加剂，根据前处理条件，液相色谱串联质谱法在 0.05 mg/kg、1 mg/kg、10 mg/kg 和

100 mg/kg 四个添加水平，高效液相色谱法在 1 mg/kg、10 mg/kg 和 100 mg/kg 三个添加水平考察方法准确度和精密度。结果显示，左旋咪唑回收率均在 80% 以上，两种方法对四种混合型饲料添加剂均具有很好的适用性。图谱见 60-77。

表 22 液相色谱-串联质谱法对 4 种混合型饲料添加剂回收率

	加标浓度 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						平均回收 率/%	平均相对 偏差%
混合型饲料添加 剂 黄芪粗提物 (超微三黄粉)	0.05	0.0489	0.0529	0.0459	0.0518	0.0460	0.0484	97.9	4.6
	1	0.800	0.797	0.871	0.801	0.821	0.842	82.2	2.8
	10	8.311	8.560	8.209	8.211	8.308	8.283	83.1	1.0
	100	102	104	97.5	96.4	96.9	104	100.1	3.2
混合型饲料添加 剂 姜黄素(五黄 散)	0.05	0.041	0.0459	0.0451	0.0467	0.0454	0.0488	91.0	3.6
	1	0.858	0.832	0.88	0.852	0.831	0.854	85.1	1.5
	10	9.015	9.435	9.275	9.284	9.125	9.263	92.3	1.2
	100	100	91.4	92.7	91.7	100	99.4	95.9	4.1
混合型饲料添加 剂微生物(枯草 芽孢杆菌+粪肠+ 酿酒酵母)	0.05	0.0559	0.0505	0.0472	0.0466	0.0454	0.0474	97.7	6.0
	1	0.828	0.836	0.832	0.863	0.832	0.778	82.8	2.0
	10	8.725	8.697	8.717	8.841	8.811	8.523	87.2	0.8
	100	101	100	99.1	91.5	90.1	105	97.8	4.8
混合型饲料添加 剂菌肽菌素	0.05	0.0475	0.0525	0.0408	0.0427	0.0484	0.0431	91.7	7.9
	1	0.787	0.753	0.851	0.843	0.804	0.797	80.6	3.4
	10	8.403	8.720	7.575	7.842	8.348	7.624	80.9	5.0
	100	93.4	94.4	95.8	91.6	96.4	101	95.4	2.4

表 23 高效液相色谱法对 4 种混合型饲料添加剂回收率

	加标浓度 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						平均回收 率/%	平均相对 偏差/%
混合型饲料添加 剂 黄芪粗提物 (超微三黄粉)	1	0.860	0.935	0.918	0.878	0.921	0.904	90.3	2.5
	10	9.30	8.04	8.40	9.09	9.18	8.52	87.6	5.0
	100	90.0	88.0	90.9	94.1	89.5	88.4	90.1	1.8
混合型饲料添加 剂 姜黄素(五黄 散)	1	0.938	0.880	0.945	0.873	0.851	0.937	90.4	4.0
	10	8.81	8.09	8.95	8.36	8.51	8.05	84.6	3.5
	100	89.0	90.6	92.2	94.2	90.7	88.1	90.8	1.8
混合型饲料添加	1	0.937	0.901	0.862	0.858	0.937	0.911	90.1	3.0

剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）	10	9.49	8.60	8.93	8.79	8.93	8.29	88.4	3.1
	100	92.7	90.3	93.4	90.0	93.3	89.6	91.6	1.7
混合型饲料添加剂菌肽菌素	1	0.913	0.917	0.913	0.932	0.858	0.943	91.3	2.0
	10	9.42	8.99	9.40	8.08	9.12	8.38	89.0	5.0
	100	89.0	91.4	90.3	90.5	87.8	89.9	89.8	1.0

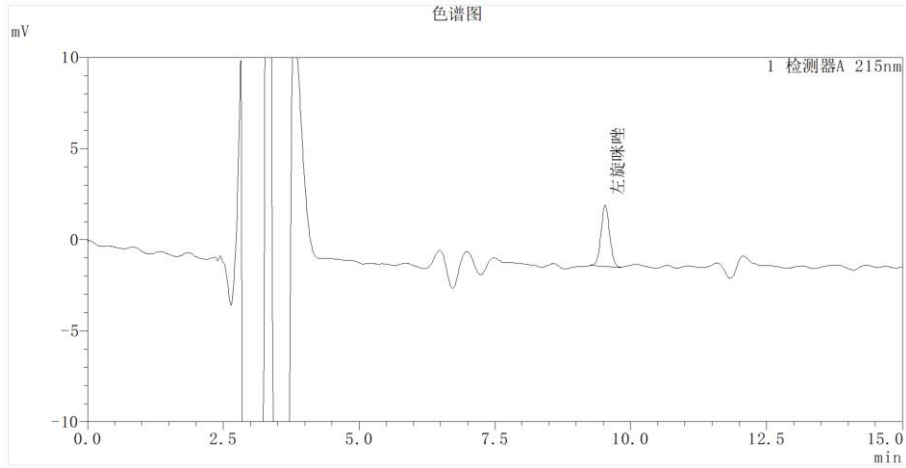


图 60 左旋咪唑标准溶液色谱图 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)

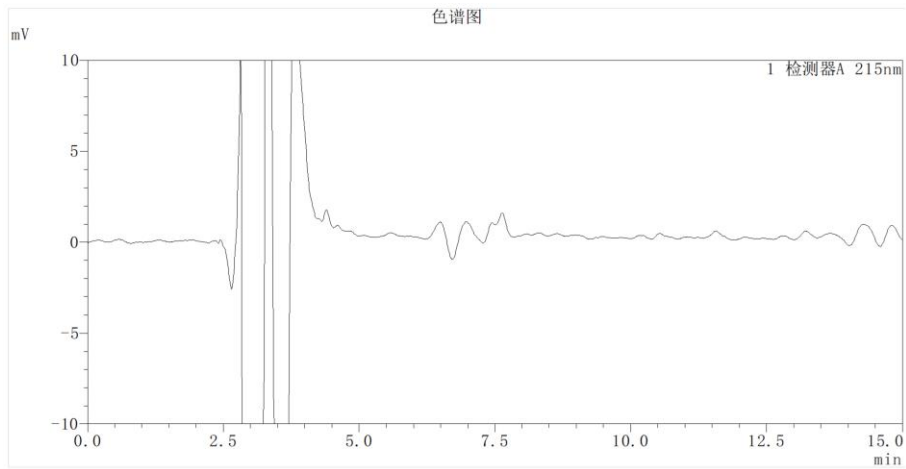


图 61 混合型饲料添加剂 黄芪粗提物（超微三黄粉）空白色谱图

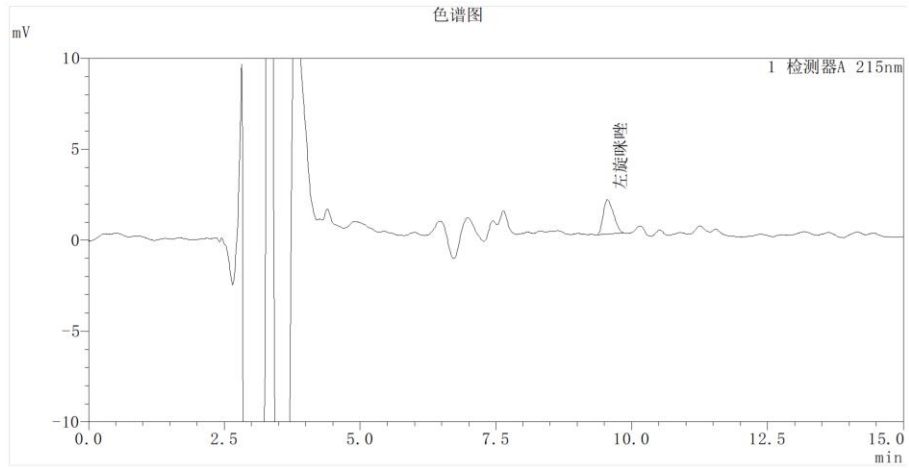


图 62 混合型饲料添加剂 黄芪粗提取物（超微三黄粉）空白添加左旋咪唑色谱图
(0.5mg/kg)

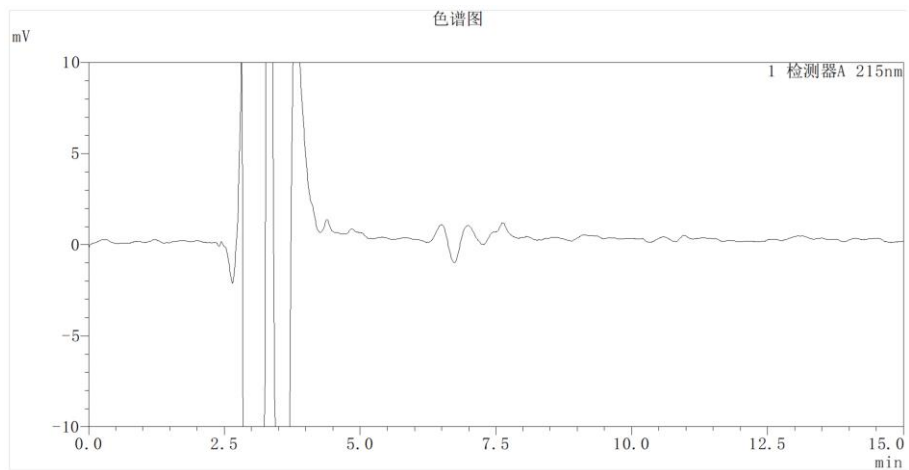


图 63 混合型饲料添加剂 姜黄素（五黄散）空白色谱图

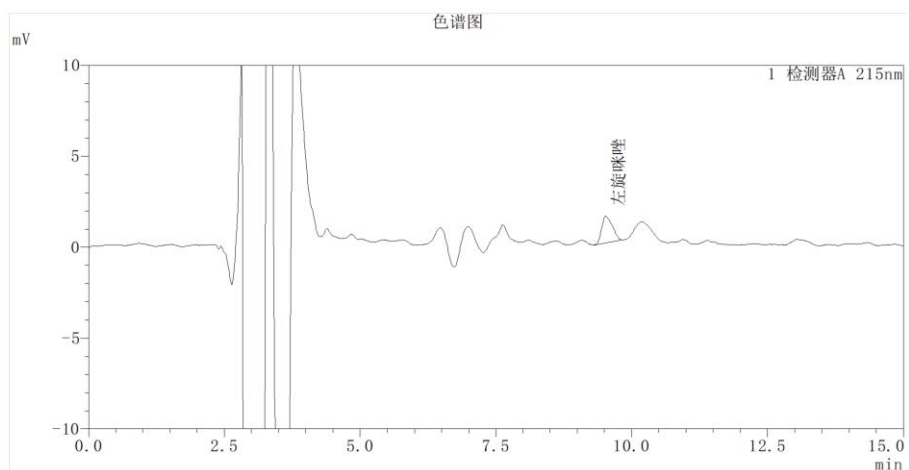


图 64 混合型饲料添加剂 姜黄素（五黄散）空白添加左旋咪唑色谱图 (0.5mg/kg)

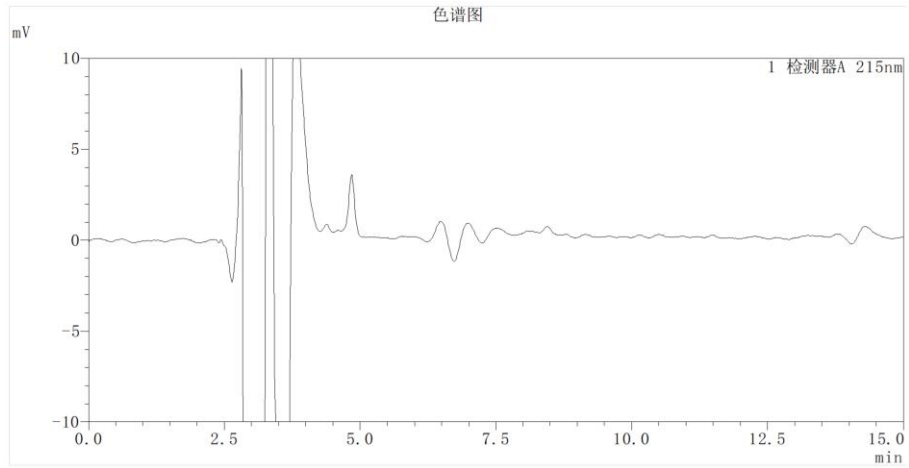


图 65 混合型饲料添加剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）空白色谱图

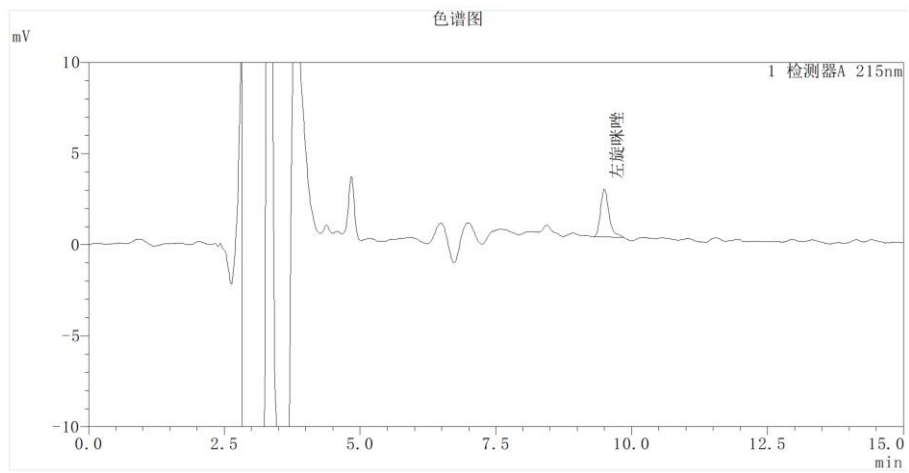


图 66 混合型饲料添加剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）空白添加左旋咪唑色
谱图（0.5mg/kg）

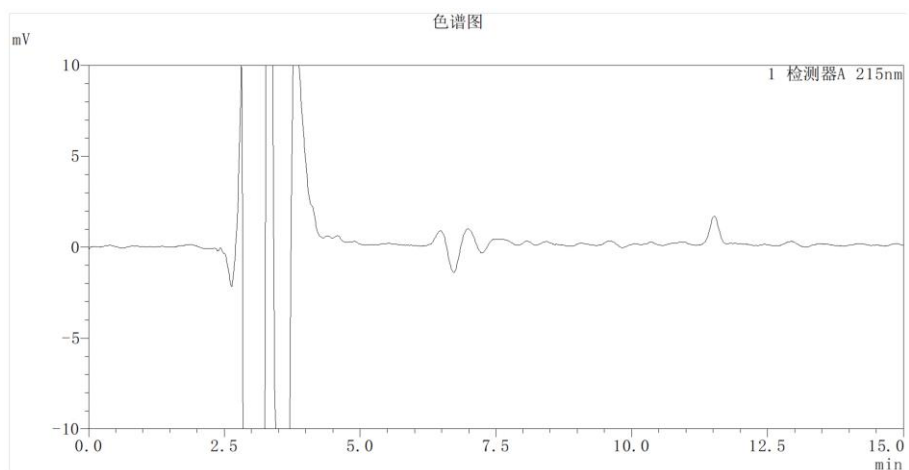


图 67 混合型饲料添加剂菌肽菌素空白色谱图

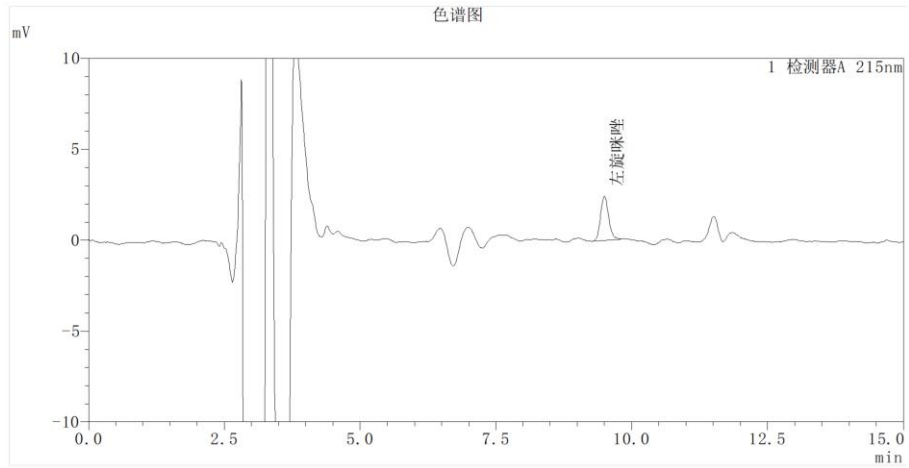


图 68 混合型饲料添加剂菌肽菌素空白添加左旋咪唑色谱图 (0.5mg/kg)

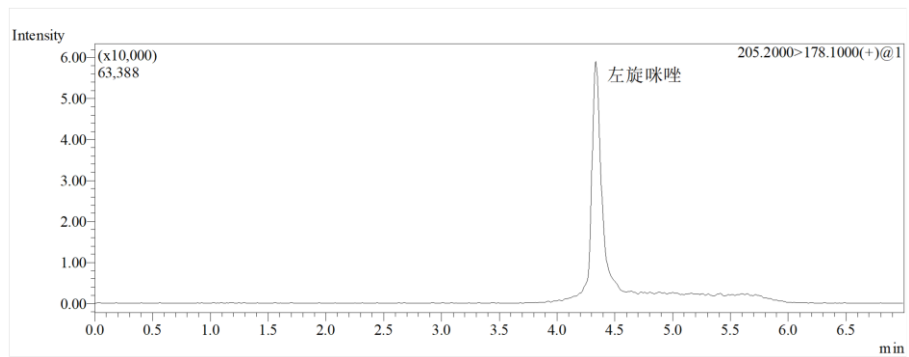


图 69 左旋咪唑标准溶液色谱图 (1 ng/mL)

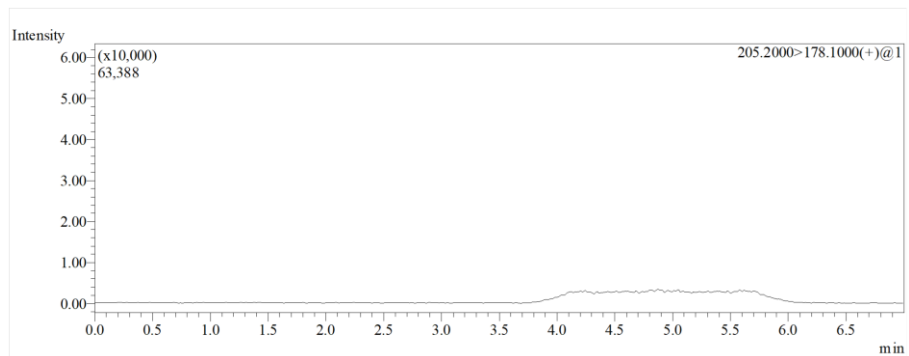


图 70 混合型饲料添加剂 黄芪粗提物 (超微三黄粉) 空白色谱图

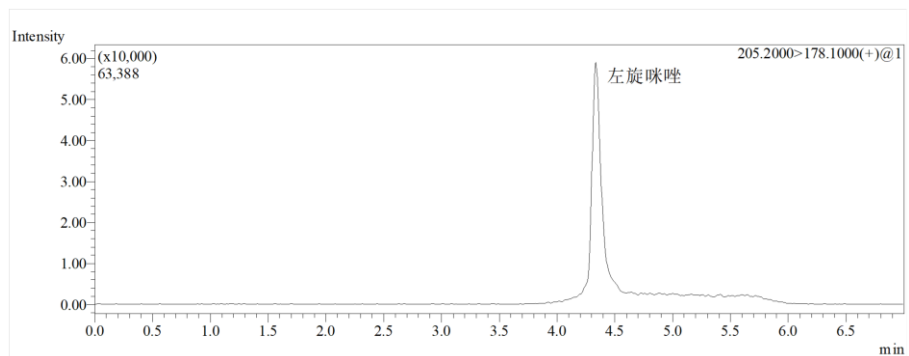


图 71 混合型饲料添加剂 黄芪粗提物 (超微三黄粉) 空白添加左旋咪唑色谱图

(0.05mg/kg)

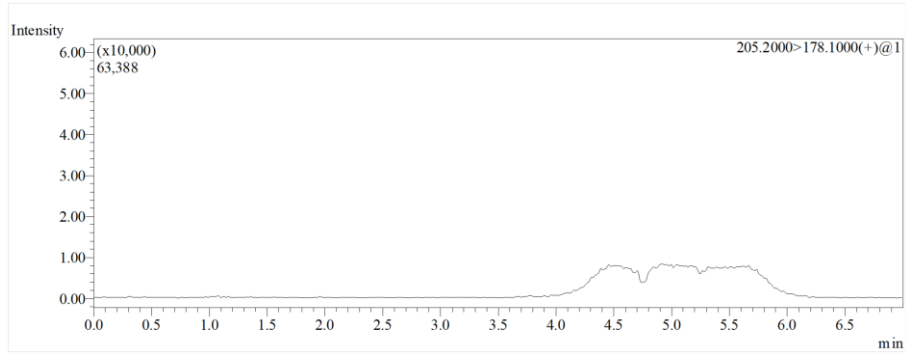


图 72 混合型饲料添加剂 姜黄素（五黄散）空白色谱图

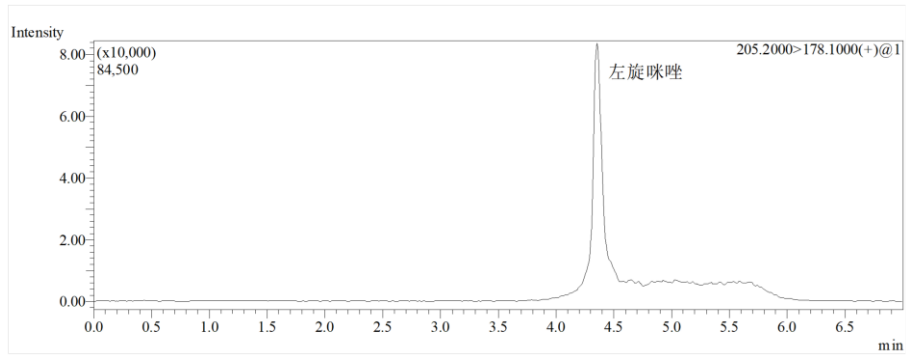


图 73 混合型饲料添加剂 姜黄素（五黄散）空白添加左旋咪唑色谱图（0.05mg/kg）

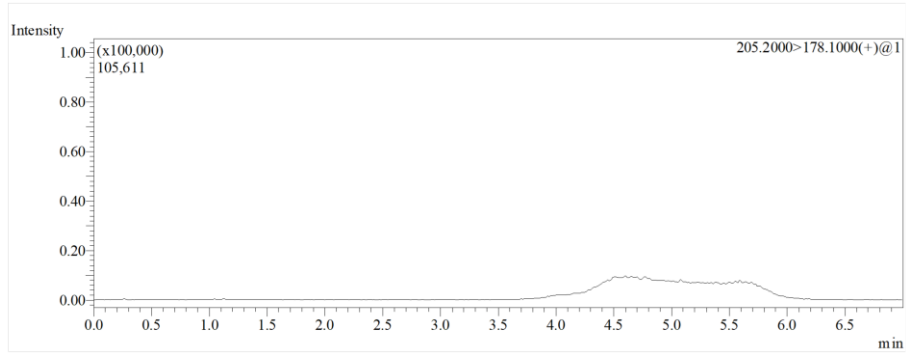


图 74 混合型饲料添加剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）空白色谱图

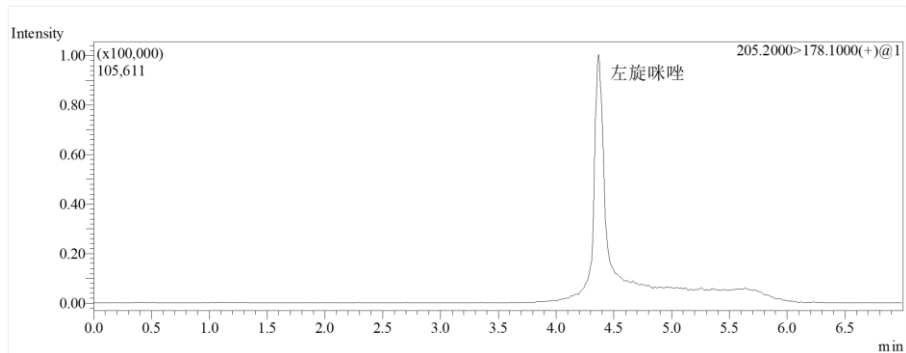


图 75 混合型饲料添加剂微生物（枯草芽孢杆菌+粪肠+酿酒酵母）空白添加左旋咪唑色
谱图（0.05mg/kg）

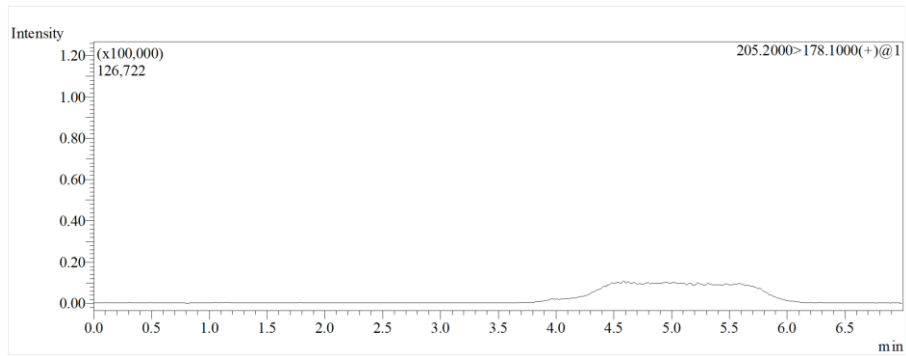


图 76 混合型饲料添加剂菌肽菌素空白色谱图

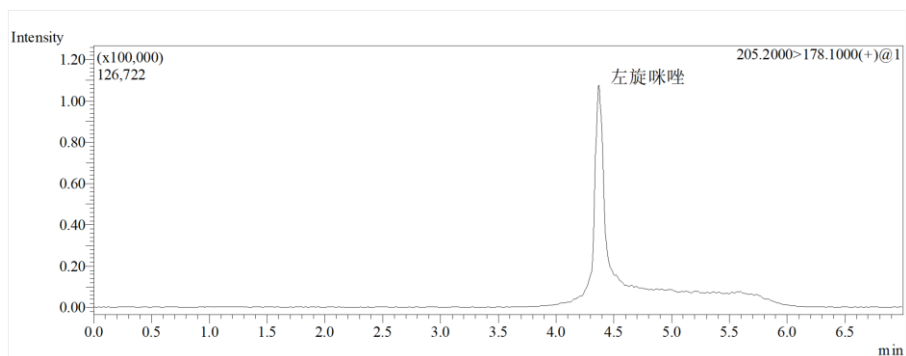


图 77 混合型饲料添加剂菌肽菌素空白添加左旋咪唑色谱图 (0.05mg/kg)

3.4 样品实测

在市场上收集 53 个饲料样品，包括配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料，使用建立的方法进行测定。结果显示，所有饲料中均没有测出左旋咪唑。

4 新旧标准对比

标准起草组对新标准和 2017 年标准进行对比分析。首先 2017 年标准高效液相色谱法稀释倍数过多，液相色谱法在定量限浓度进行检测时对仪器设备灵敏度要求高，新标准减少了稀释倍数，较容易满足定量限添加浓度的分析要求；此外新标准增加了净化步骤，减少饲料杂质干扰，也对色谱柱和仪器设备更友好。新标准还增加了液相色谱串联质谱方法作为第一法，其定量限远低于 2017 年旧标准，结果可正确性及准确度均有明显提升。

表 24 新旧标准前处理过程对比

标准号	/	HPLC				液质			
		配合饲料	浓缩饲料	精料补充料	添加剂预混合饲料	配合饲料	浓缩饲料	精料补充料	添加剂预混合饲料
NY/T 3139—2017	稀释倍数	20	40	40	40	-	-		-
	定量限 mg/kg	0.5	1	1	1	-	-		-
	上机浓度 $\mu\text{g/L}$	125	125	125	125	-	-		-
NY/T 3139—202 X	稀释倍数	10	20	20	20	50	50	50	50
	定量限 mg/kg	0.5	1	1	1	0.05	0.05	0.05	0.05
	上机浓度 $\mu\text{g/L}$	250	250	250	250	40	20	20	20

表 25 新旧标准添加回收率对比

标准号	药物	HPLC 添加回收率				液质添加回收率			
		配合饲料 0.5mg/kg	浓缩饲料 1mg/kg	精料补充料 1mg/kg	添加剂预混合饲料 1mg/kg	配合饲料 0.05mg/kg	浓缩饲料 0.05mg/kg	精料补充料 0.05mg/kg	添加剂预混合饲料 0.05mg/kg
NY/T 3139—2017	左旋咪唑	78.9%	80.3%	75.6%	76.8%	-	-	-	-
NY/T 3139—202X	左旋咪唑	86.4%	92.4%	88.7%	82.4%	95.7	89.7%	96.7%	90.4%

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

本标准在制定过程中，起草组委托广州汇标检测技术中心、中国热带农业科学院农产品加工研究所、广东省农产品质量安全中心进行方法验证，验证结果良好，满足对应饲料样品的检验检测需要，能够

有效检测饲料中左旋咪唑的合理添加，为养殖业健康发展提供保障，为饲料中药物使用监管提供技术支撑。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无

五、采用情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

未采用任何国际标准和国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准修订过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献资料，向国家和省部级饲料检测试验室、主要大中型饲料企业试验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、高校、检测机构、企业等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件未涉及专利。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。建议本标准自发布 6 个月后实施。该标准发布、实施后，建议废除 NY/T 3139-2017《饲料中左旋咪唑的测定 高效液相色谱法》。

十、其他应予说明的事项

无。