

采用固相萃取技术结合高效液相色谱- 荧光检测法测定饲料中的乙氧酰胺苯 甲酯

作者

宋荣
中国农业科学院农业质量标准与
检测技术研究所

吴翠玲, 安娟, 薛彬
安捷伦科技(中国)有限公司

前言

乙氧酰胺苯甲酯, 又名衣索巴, 俗名球虫酯, 是尼卡巴嗪和氨丙啉等抗球虫药的增效剂。该药品抗球虫作用及机理与磺胺药和抗菌增效剂相同, 本身具有抗原虫活性, 它通过干扰四氢叶酸的合成阻止裂殖体的正常发育, 从而产生抗球虫作用。

2020 年农业农村部公告第 316 号-6-2020 饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法正式颁布。本文所述方法以此标准为基础, 重点优化了前处理流程。本方法采用 Agilent Bond Elut AL-N 柱对样品进行萃取和净化, 并利用安捷伦专利的 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱对目标物进行快速分析, 荧光检测器进行检测, 方法检测限为 0.0048 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 0.016 $\mu\text{g/g}$ 。

该方法简化了公告标准中的前处理方法, 在一定程度上节约了分析成本, 提高了分析效率。对于基质更为复杂的饲料样品, 仍需参考农业农村部公告第 316 号-6-2020 所规定检测方法。

乙氧酰胺苯甲酯的分析

样品前处理及分析条件

取饲料样品 5 (± 0.05) g, 于 50 mL 离心管中。根据生产实际需要, 按照表 1 所示添加水平, 向饲料样品中添加乙氧酰胺苯甲酯标准品, 制备得到加标样品, 用于考察方法的稳定性和准确度。

表 1. 各种饲料的乙氧酰胺苯甲酯添加水平

饲料	添加水平
鸡预混饲料	200 mg/kg 和 500 mg/kg
蛋鸡预混饲料	20 mg/kg
鸡配合饲料	0.3 mg/kg
肉鸡配合料	8.0 mg/kg
蛋鸡浓缩料	10.0 mg/kg

加标后, 将饲料混合均匀, 静置过夜。加入 20 mL 乙腈萃取, 涡旋混合 1 min, 超声 10 min, 5000 r/min 离心后取 10 mL 上清液在 30–40 °C 下氮吹近干; 复溶于 5 mL 正己烷:丙酮 (v/v, 9:1) 中; 涡旋混合 1 min, 超声 10 min, 5000 r/min 离心 10 min, 上清液经过 Bond Elut Al-N SPE 柱进行净化处理 (SPE 流程见图 1); 接收洗脱液, 氮吹近干后, 用 1 mL 甲醇重新定容, 供 LC-FLR 检测, 分析条件如表 2 所示。每个加标样品分别做三个平行样品进行测定。



图 1. 饲料中乙氧酰胺苯甲酯固相萃取净化操作流程

乙氧酰胺苯甲酯标准品, 用甲醇逐级稀释配制成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/g}$ 的标准溶液。从低浓度到高浓度样品进行分析, 所得数据制作为标准曲线。

表 2. 仪器条件

液相色谱仪:	Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统		
液相色谱柱:	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 100 \times 4.6 mm, 2.7 μm (部件号 685975-902)		
流动相:	运行时间 (min)	流动相 (%)	乙腈 (%)
	0	70	30
	3.5	70	30
	4.0	95	5
	6.0	95	5
	6.5	70	30
	8.0	70	30
流速:	1 mL/min		
进样量:	10 μL		
柱温:	30 °C		
时间:	8 min		
发射波长:	350 nm		
激发波长:	306 nm		

样品前处理过程的优化

方法比对了两种不同 SPE 操作流程处理后的样品的分析结果, 两种 SPE 操作流程为: 1, 红色, 目标分析物经乙腈提取后, 直接浓缩至 2 mL, 再过 Bond Elut Al-N 柱, 正己烷淋洗, 甲醇洗脱; 2, 蓝色, 乙腈提取后浓缩, 转换溶剂为正己烷:丙酮后, 过 Bond Elut Al-N 柱, 正己烷淋洗, 甲醇洗脱。

两种不同 SPE 操作流程所得最终样品分别用 LC-FLR 和 LC-UV 检测, 虽然两种方式均可以得到较好回收率的实验结果, 但是用后一种方法 (2, 蓝色) 可以保证对饲料基质更加干净的萃取, 去除了保留性较强的基质干扰组分, 从而在一定程度上减少了基质对仪器和色谱柱的污染。如图 2 和图 3 所示, 红色线的基质干扰明显较大。

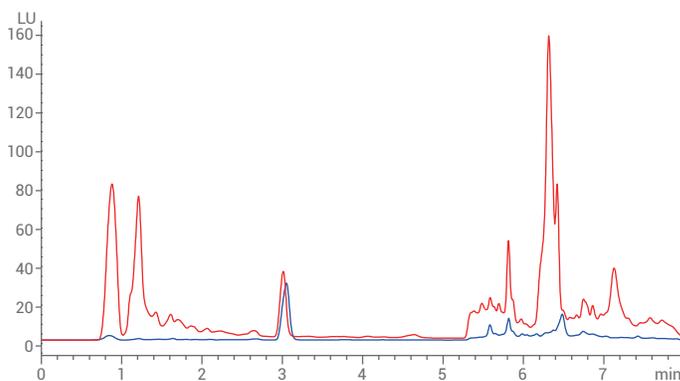


图 2. 鸡预混饲料, 加标浓度 0.3 $\mu\text{g/g}$, HPLC-FLR 检测结果

红色: 乙腈提取浓缩后直接过 Bond Elut AL-N SPE 柱

蓝色: 乙腈提取后浓缩转换成正己烷:丙酮溶剂过 Bond Elut AL-N SPE 柱

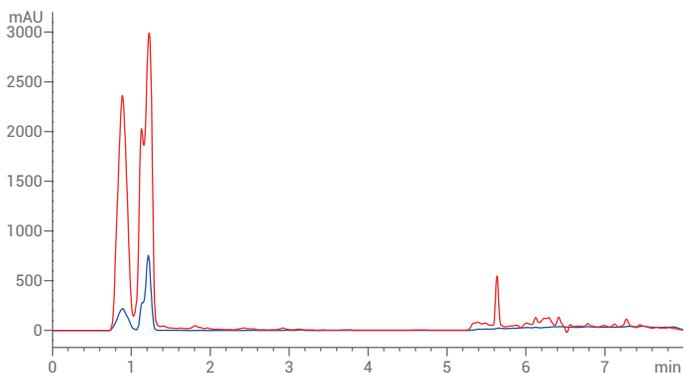


图3. 鸡预混饲料，加标浓度 0.3 $\mu\text{g/g}$ ，HPLC-UV 检测结果
 红色：乙腈提取浓缩后直接过 Bond Elut AL-N SPE 柱
 蓝色：乙腈提取后浓缩转换成正己烷丙酮溶剂过 Bond Elut AL-N SPE 柱

色谱分析条件的优化

色谱分析采用安捷伦专利的 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，在普通液相色谱仪上可以实现快速分析。8 min 内即可完成整个方法的运行。由图 4 可以看出，连续进样 6 针，色谱图基本完全重合，表明方法具有完美的重复性。在 0.1–20.0 $\mu\text{g/g}$ 范围内，仪器具有良好的线性，线性相关系数 R^2 为 0.9989，见图 4。

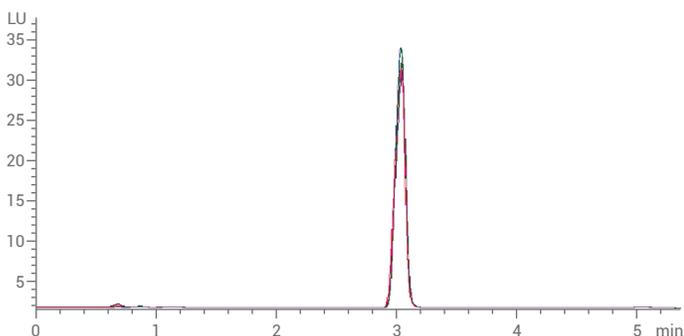


图4. 1.5 $\mu\text{g/g}$ 标准品 6 针重复测试

回收率结果

根据实际生产需要，在不同品种的饲料基质中加入合适水平的乙氧酰胺苯甲酯，均可以获得很好的回收率结果，见表 3。平均回收率均在 98.0%–111.3% 之间，RSD 均小于 5% ($n = 6$)，说明该方法具有很好的准确度和精密度。

表 3. 饲料中乙氧酰胺苯甲酯加标回收率

加标浓度	平均回收率 (%)	RSD (%)
鸡预混饲料 200.0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	111.3	2.01
鸡预混饲料 500.0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	98.0	2.18
蛋鸡浓缩饲料 20.0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	111.02	0.68
鸡配合饲料 0.3 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	106.6	4.64
肉鸡配合饲料 8.0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	102.2	1.38
蛋鸡浓缩饲料 10.0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 6$)	105.4	2.22

结论

本方法基于 Agilent Bond Elut AL-N SPE 柱，结合 Poroshell 120 SB-C18 快速色谱柱，在普通液相色谱仪上实现了对饲料中乙氧酰胺苯甲酯的含量分析。方法准确度和精密度均可达到标准要求，同时简化了前处理方法，大大提高了分析效率。该方法适用于实际生产中饲料中乙氧酰胺苯甲酯含量的测定。

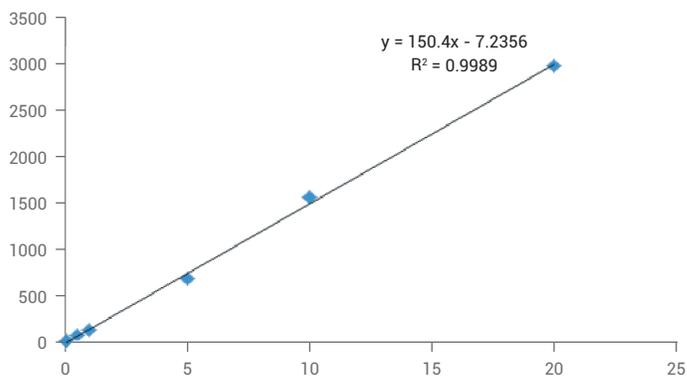


图5. 标准曲线，线性范围 0.1–20.0 $\mu\text{g/g}$

消耗品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Luer 活塞	12131005
Agilent Vac Elut 20 固相萃取装置	12234103
Agilent Bond Elut AL-N 固相萃取小柱 1 g, 6 mL, 30/包	12256086
Agilent Poroshell 120 SB-C18 100 \times 4.6 mm, 2.7 μm	685975-902

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020
2020年11月18日, 中国出版
5994-2885ZHCN

