

中华人民共和国国家标准

农业部 1862 号公告—4—2012

饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of five polyether antibiotics in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2012-12-03 发布

2012-12-03 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 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:中国农业大学。

本标准主要起草人:沈建忠、张素霞、程林丽、曹兴元、王战辉、温凯、汪洋、吴聪明。

饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中聚醚类药物的液相色谱—串联质谱分析方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中甲基盐霉素、盐霉素、莫能菌素、拉沙洛西钠和马杜霉素含量的测定。

本标准 5 种聚醚类药物的定量限均为 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

3 方法原理

饲料中的聚醚类药物经乙腈提取,硅胶固相萃取柱净化,用液相色谱—串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用试剂,除特殊注明外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 标准品纯度:甲基盐霉素(Narasin, NAR) $\geq 97\%$, 盐霉素(Salinomycin, SAL) $\geq 98\%$, 莫能菌素(Monensin, MON) $\geq 90\%$, 拉沙洛西钠(Lasalocid, LAS) $\geq 90\%$, 马杜霉素(Maduramicin, MAD) $\geq 98.1\%$ 。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 甲酸:色谱纯。

4.5 正己烷。

4.6 乙醚。

4.7 二氯甲烷。

4.8 硅胶固相萃取柱, $500 \text{ mg}/3 \text{ mL}$ 。

4.9 乙醚—正己烷(50+50):乙醚、正己烷按体积比 1:1 混匀。

4.10 二氯甲烷—甲醇(90+10):二氯甲烷、甲醇按体积比 9:1 混匀。

4.11 单个聚醚类标准液($1000 \mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确称取适量的盐霉素、甲基盐霉素、莫能菌素、拉沙洛西钠、马杜霉素于 5 个容量瓶中,用甲醇溶解配成 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的单个聚醚类药物标准溶液。 -20°C 保存,有效期 12 个月。

4.12 5 种聚醚类混合标准液($100 \mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确量取适量 5 种 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 单个聚醚类标准溶液于同一容量瓶中,用甲醇稀释成 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准液。 -20°C 保存,有效期 6 个月。

4.13 5 种聚醚类混合标准液(10 $\mu\text{g/mL}$):分别准确量取适量 100 $\mu\text{g/mL}$ 聚醚类混合标准溶液于容量瓶中,用甲醇稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准液。 -20°C 保存,有效期 6 个月。

4.14 5 种聚醚类药物混合标准工作液:量取适量 10 $\mu\text{g/mL}$ 聚醚类药物混合标准液,用乙腈(含 0.1% 甲酸)依次稀释成浓度为 0.2 ng/mL 、2 ng/mL 、5 ng/mL 、20 ng/mL 、50 ng/mL 、100 ng/mL 、500 ng/mL 的标准工作液。现配现用。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱—串联质谱仪:配有电喷雾电离源。

5.2 组织匀浆机。

5.3 涡动仪。

5.4 旋转蒸发仪。

5.5 离心机。

5.6 天平:感量 0.01 g。

5.7 分析天平:感量 0.000 01 g。

5.8 振荡器。

5.9 固相萃取装置。

5.10 氮吹仪。

5.11 0.2 μm 有机滤膜。

6 试样制备

取 500 g 样品,四分法缩减取约 50 g。经粉碎,全部过 40 目孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试样 2 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加 20 mL 乙腈,振荡提取 30 min,6 000 r/min 离心 5 min,取上清液至鸡心瓶。残渣用 20 mL 乙腈重复提取一次,合并两次上清液。50 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸至干,用 3 mL 正己烷溶解残渣,转移至 10 mL 离心管。再用 2 mL 正己烷洗涤鸡心瓶,合并两次溶解液,3 500 r/min 离心 5 min,上清液备用。

7.2 净化

取硅胶固相萃取柱,加 5 mL 正己烷预洗,将备用液过柱,加乙醚—正己烷(50/50)8 mL 洗涤,抽干,加二氯甲烷—甲醇(90/10)6 mL 洗脱,收集洗脱液,50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,乙腈(含 0.1% 甲酸)1.0 mL 溶解残渣,过 0.2 μm 滤膜后 LC-MS/MS 分析。

注:固相萃取上述样液、洗涤液和洗脱液流速均不超过 1 mL/min。

7.3 测定方法

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,150 mm $\times$ 2.1 mm(i. d.),粒径 5 μm ;或相当者。

柱温:室温。

流动相:乙腈(含 0.1% 甲酸)—0.1% 甲酸(97+3)。

流速:0.2 mL/min。

进样体积:10 μL 。

7.3.2 质谱条件

电离源:电喷雾离子源(ESI)。

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应监测(MRM)。

电喷雾毛细管电压:2.8 kV。

取样锥孔电压:1.0 V。

透镜电压:0.5 V。

离子源温度:80℃。

去溶剂温度:300℃。

倍增器电压:650 V。

二级碰撞气:氦气。

其他质谱条件见表 1。

表 1 聚醚类药物测定的质谱条件

分析物	保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
LAS	5.27	613.4	377.3*	50	35
			359.4	50	35
SAL	5.33	773.3	431.2*	45	50
			265.1	45	55
MON	5.97	693.4	461.3*	50	48
			479.4	50	48
NAR	6.20	787.3	431.2*	50	50
			531.2	50	45
MAD	6.71	939.8	877.5*	50	50
			719.0	50	55
* 定量离子。					

7.3.3 定性测定

根据试样溶液中药物的含量,选择峰面积相近的标准工作液和样品溶液等体积参插进样。通过色谱保留时间与质谱选择离子共同定性。样品中待测药物与标准物质的保留时间相对偏差不大于 1%,而且其选择离子的相对丰度的差异不大于 10%。

7.3.4 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应参插标准工作液,以便准确定量。相关谱图参见图 A.1。

8 结果计算和表示

8.1 结果计算

试样中 5 种聚醚类的残留量 X ,以质量分数微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \times n \quad \text{..... (1)}$$

式中:

C ——试样液中对应的 5 种聚醚类的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——溶解残留物所用溶剂的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 15%。

附录 A
(资料性附录)

聚醚类药物基质匹配标准溶液质量色谱图

聚醚类药物基质匹配标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)的色谱图见图 A. 1。

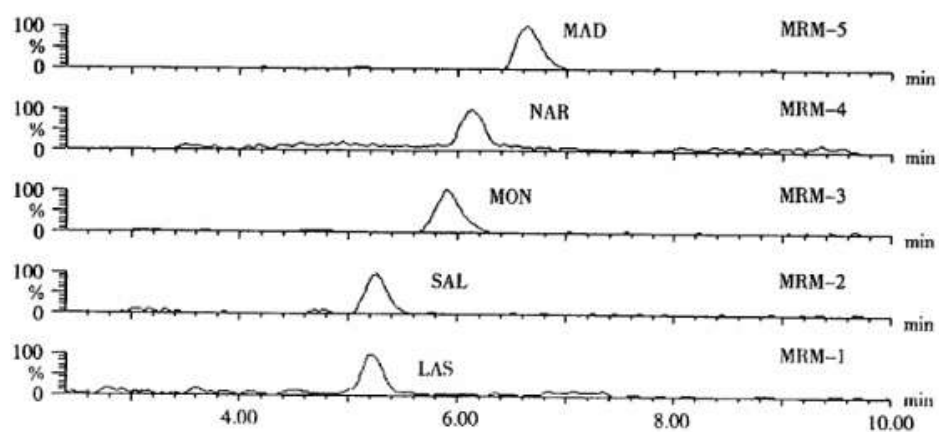


图 A. 1 基质匹配标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)的色谱图