

中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—5—2014

饲料中卡巴氧、乙酰甲喹、喹烯酮和喹乙醇的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of carbadox, mequindox, quincetone and olaquindox in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2014-04-01 发布

2014-07-01 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—2009 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:中国农业大学动物医学院、中国饲料工业协会、新希望六和股份有限公司。

本标准主要起草人:沈建忠、程林丽、王黎文、郭吉原、张素霞、江海洋、丁双阳、吴聪明。

饲料中卡巴氧、乙酰甲喹、喹烯酮和喹乙醇的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中卡巴氧、乙酰甲喹、喹烯酮和喹乙醇含量测定的液相色谱—串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中卡巴氧、乙酰甲喹、喹烯酮和喹乙醇含量的测定。

本方法检测的 4 种药物在配合饲料和浓缩饲料中检测限均为 0.06 mg/kg,定量限均为 0.20 mg/kg;精料补充料和添加剂预混合饲料中检测限均为 0.15 mg/kg,定量限均为 0.40 mg/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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

采用乙腈和甲酸溶液提取试料中的卡巴氧、乙酰甲喹、喹烯酮和喹乙醇,经 HLB 固相萃取柱净化后液相色谱—串联质谱法测定,基质匹配标准曲线校正,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

- 4.1 卡巴氧(Carbdox):纯度 $\geq 97.0\%$ 。
- 4.2 乙酰甲喹(Mequindox):纯度 $\geq 97.0\%$ 。
- 4.3 喹烯酮(Quincetone):纯度 $\geq 97.0\%$ 。
- 4.4 喹乙醇(Olaquindox):纯度 $\geq 97.0\%$ 。
- 4.5 乙腈:色谱纯。
- 4.6 甲醇:色谱纯。
- 4.7 甲酸:色谱纯。
- 4.8 盐酸。
- 4.9 二甲亚砜。
- 4.10 磷酸二氢钾。
- 4.11 HLB 固相萃取柱:规格为 200 mg/6mL 或相当者。
- 4.12 0.1%甲酸溶液:量取 1.0 mL 甲酸于 1 000 mL 水中,混匀。
- 4.13 0.1%甲酸—乙腈溶液(4+6):量取 400 mL 和 600 mL 乙腈,混匀。
- 4.14 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液:称取磷酸二氢钾 13.6 g,用水 1 000 mL 溶解。

- 4.15 0.02 mol/L 盐酸溶液:准确量取盐酸 1.8 mL,加水稀释至 1 000 mL,混匀。
- 4.16 5%甲醇:分别量取 5 mL 甲醇和 95 mL 水,混匀。
- 4.17 20%乙腈溶液:量取 200 mL 乙腈和 800 mL 水,混匀。
- 4.18 混合标准储备液 I (1 mg/mL):分别准确称取唑乙醇、卡巴氧、乙酰甲喹和喹烯酮对照品各 10 mg 于 10 mL 棕色量瓶中,用 2 mL 二甲亚砜溶解,并用甲醇定容。—20℃密封避光保存,有效期 3 个月。
- 4.19 混合标准储备液 II (100 μg/mL):量取 1 mg/mL 混合标准储备液 1 mL,用乙腈稀释定容到 10 mL。—20℃密封避光保存,有效期 3 个月。
- 4.20 混合标准储备液 III (500 ng/mL):准确量取 100 μg/mL 混合标准储备液 500 μL,用乙腈稀释定容至 100 mL。—20℃密封避光保存,有效期 3 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱—串联质谱仪:配电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 离心机:可达 10 000 r/min。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 固相萃取装置。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 水浴超声波清洗仪。
- 5.9 0.22 μm 有机相滤膜。

6 采样和试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中备用。

7 测定步骤

警告:整个样品处理过程均需注意避光。

7.1 样品提取

准确称取配合饲料、精料补充料和浓缩饲料 2 g(精确至 0.01 g),或预混合饲料 1 g(精确至 0.01 g),以及相同质量的基质匹配空白试料分别于 50 mL 聚丙烯离心管中。加入 0.1%甲酸—乙腈溶液(4.13)10 mL,涡动 1 min,40℃超声波清洗仪中超声 10 min。9 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。残渣用 0.1%甲酸—乙腈溶液(4.13)10 mL 重复提取一次,合并两次提取液,混匀,为总提取液。准确量取 5.0 mL 总提取液(为分取液)于 10 mL 试管中,60℃下氮气吹至约 2 mL,加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液(4.14)4 mL,充分溶解残余物,为备用液。

7.2 样品净化

取 HLB 固相萃取柱,依次用 3 mL 甲醇(4.6)和 3 mL 水活化。取备用液过柱,依次用 0.02 mol/L 盐酸(4.15)3 mL 和 5%甲醇(4.16)3 mL 淋洗,挤干。用 5 mL 甲醇(4.6)洗脱,收集洗脱液,60℃下氮气吹干,加入 20%乙腈溶液(4.17)1 mL 充分溶解,为净化液。过 0.22 μm 滤膜后供上机检测。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

称取 6 个空白饲料,按 7.1~7.2 步骤进行样品前处理后制得多个 1 mL 空白基质样品溶液,混合均

匀。准确移取合适浓度的喹乙醇、卡巴氧、乙酰甲喹和喹烯酮混合标准储备液适量,氮气吹干,用 1 mL 空白基质样品溶液溶解,配制成浓度为 25 ng/ mL、50 ng/ mL、100 ng/ mL、200 ng/ mL、500 ng/ mL、1 000 ng/ mL 的基质匹配标准溶液,过 0.22 μ m 滤膜后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒度 1.7 μ m;或相当者。
流动相:A 为含 0.1%甲酸的乙腈溶液,B 为 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1。
流速:0.2 mL/ min。
进样量:10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

序号	时间,min	A, %	B, %
1	0	88	12
2	1.0	88	12
3	2.0	50	50
4	3.5	12	88
5	4.5	88	12
6	5.0	88	12

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。
扫描方式:正离子扫描。
检测方式:多反应监测 MRM。
电离电压:2.8 kV。
源温:80℃。
雾化温度:350℃。
锥孔气流速:27 L/h。
雾化气流速:600 L/h。
定性离子对、定量离子对和对应的仪器条件参考值见表 2。

表 2 定性、定量离子和锥孔电压、碰撞能量

药物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
卡巴氧	263>229	263>231	30	15
	263>231		30	15
乙酰甲喹	219>160	219>185	18	15
	219>185		18	15
喹烯酮	307>273	307>273	15	25
	307>197		15	25
喹乙醇	264>143	264>143	25	30
	264>212		25	30

7.4.3 定性测定

目标药物选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的

待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分率

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质匹配标准溶液进样,以峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标绘制工作曲线,用单点或多点校正对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,基质匹配标准溶液特征离子色谱图参见图 A.1。

8 结果计算

试样中目标药物含量 X_i 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X_i = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- A —— 试样溶液中对应目标药物的峰面积;
- A_s —— 基质匹配标准溶液中对应目标药物的峰面积;
- C_s —— 基质匹配标准溶液中对应目标药物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V —— 净化液体积,单位为毫升(mL);
- m —— 样品的质量,单位为克(g);
- V_1 —— 分取液体积,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 总提取液体积,单位为毫升(mL)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

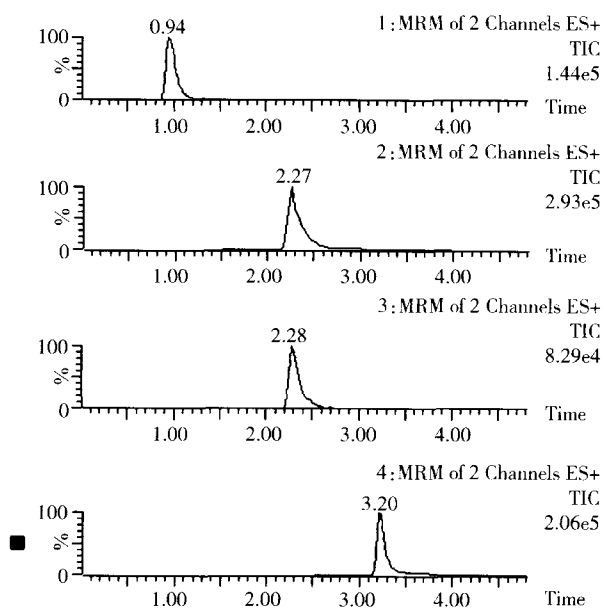
9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与这两个测定值算术平均值的绝对差值不大于该平均值的 20%。

附 录 A
(资料性附录)

基质匹配标准溶液特征离子色谱图

卡巴氧、乙酰甲喹、啉烯酮和啉乙醇基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 A. 1。



说明:

1——卡巴氧;

3——啉烯酮;

2——乙酰甲喹;

4——啉乙醇。

图 A. 1 卡巴氧、乙酰甲喹、啉烯酮和啉乙醇基质匹配标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)特征离子色谱图