

中华人民共和国国家标准

农业部 2349 号公告—6—2015

饲料中硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉 类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of nitroimidazoles, nitrofurans and quinazolines in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2015-12-29 发布

2016-04-01 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:河南省兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:班付国、张发旺、吴宁鹏、孟蕾、周红霞、李慧素、彭丽、宋善道、李华岑。

饲料中硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中异丙硝唑、甲硝唑、替硝唑、塞克硝唑、卡硝唑、奥硝唑、地美硝唑、罗硝唑 8 种硝基咪唑类药物,呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林 4 种硝基呋喃类药物和卡巴氧、喹乙醇、乙酰甲喹、喹烯酮 4 种喹噁啉类药物含量测定的液相色谱—串联质谱方法。

本标准适用于畜禽配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉类药物的测定。

本标准的检出限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.10 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

用甲醇:乙腈:水(3:3:4,V+V+V)溶液提取试样中的待测药物,提取液吹干后用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液溶解,HLB 固相萃取柱净化,液相色谱—串联质谱法进行测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,本法所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 异丙硝唑、甲硝唑、替硝唑、塞克硝唑、卡硝唑、奥硝唑、地美硝唑、罗硝唑、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林、卡巴氧、喹乙醇、乙酰甲喹和喹烯酮对照品,纯度均 $\geq 98\%$ 。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH=3.0):称取磷酸二氢钠 7.8 g,用水溶解并稀释至 500 mL,混匀,用磷酸调节 pH 至 3.0。

4.5 提取液:取甲醇 300 mL,乙腈 300 mL,加水 400 mL,混匀。

4.6 10%甲醇溶液:取甲醇 10 mL,加水 90 mL,混匀。

4.7 60%乙腈溶液:取乙腈 60 mL,加水 40 mL,混匀。

4.8 标准储备液(1.0 mg/mL):分别精密称取异丙硝唑、甲硝唑、替硝唑、塞克硝唑、卡硝唑、奥硝唑、地美硝唑、罗硝唑、呋喃妥因、呋喃西林、喹乙醇、乙酰甲喹、喹烯酮、呋喃唑酮、呋喃它酮、卡巴氧对照品(4.1)适量,置于 10 mL 容量瓶中,用少量二甲基亚砜溶解,乙腈稀释并定容,分别配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液。—20℃下避光保存,有效期为 4 个月。

4.9 混合标准中间工作液(10 μ g/mL):分别准确移取标准储备液(4.8)各 1.00 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用

乙腈稀释至刻度,混匀。配制成 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。2℃~8℃下避光保存,有效期为1周。

4.10 混合标准工作液:准确吸取标准中间工作液(4.9)适量,用甲醇稀释成浓度为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 的系列标准工作液,现配现用。

4.11 HLB 固相萃取柱或相当者。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱—串联质谱仪(带电喷雾离子源)。

5.2 分析天平:感量 0.01 mg。

5.3 天平:感量 0.01 g。

5.4 离心机。

5.5 旋涡振荡器。

5.6 超声波清洗器。

5.7 固相萃取装置。

5.8 氮吹仪。

6 采样和试样制备

6.1 采样

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。

6.2 试样制备

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 分析步骤

7.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入提取液(4.5)20.0 mL,涡旋混合后,水浴超声提取 10 min,振荡 15 min。8 000 r/min 离心 5 min,取 1.00 mL 上清液于 40℃下氮气吹至近干,残余物用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(4.4)5.0 mL 溶解,超声 10 min,备用。

7.2 净化

HLB 固相萃取柱(4.11)依次用甲醇和水各 3 mL 活化,将备用液全部过柱。依次用水、10%甲醇溶液各 3 mL 淋洗,抽干。乙酸乙酯 3 mL 洗脱,收集洗脱液,40℃下氮气吹干。准确加入 60%乙腈溶液(4.7)1.00 mL 溶解残余物,涡动混匀,超声 10 min,过 0.22 μm 微孔滤膜,供液相色谱—串联质谱仪测定。

注:操作过程中注意避光,试样上机前酌情稀释,避免造成仪器污染。

7.3 标准曲线的制备

取浓度为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 的混合标准工作液(4.10),0.22 μm 微孔滤膜过滤后分别在正离子模式下和负离子模式下供液相色谱—串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,混合标准工作液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 100 mm,柱内径 1.0 mm,粒度 1.7 μm 或相当的分析柱。

柱温:40℃。

流动相:A 相为水;B 相为甲醇,梯度洗脱,梯度见表 1。

流速:0.1 mL/min。

进样量:2 μL 。

表 1 梯度洗脱条件

时间,min	A 相,%	B 相,%
0.0	95	5
4.0	5	95
5.0	5	95
5.1	95	5
7.0	95	5

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描模式:正离子扫描/负离子扫描。

检测方式:多反应监测(MRM)。

电离电压:2.8 kV。

源温:150℃。

雾化温度:500℃。

锥孔气流速:50 L/h。

雾化气流速:1 000 L/h。

定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 2。

表 2 硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉类药物定性定量离子对的扫描方式、锥孔电压和碰撞能量

药物名称	扫描方式	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
地美硝唑	ESI+	142.1>95.8	142.1>95.8	16	14
		142.1>81.1			18
异丙硝唑	ESI+	169.9>124.1	169.9>124.1	16	18
		169.9>109.1			22
甲硝唑	ESI+	172.1>82.0	172.1>82.0	2	20
		172.1>111.1			20
塞克硝唑	ESI+	186.1>128.1	186.1>128.1	16	12
		186.1>82.1			22
罗硝唑	ESI+	201.1>140.0	201.1>140.0	2	10
		201.1>110.1			16
奥硝唑	ESI+	220.1>128.0	220.1>128.0	2	26
		220.1>82.1			14
卡硝唑	ESI+	245.1>118.1	245.1>118.1	12	12
		245.1>75.0			32
替硝唑	ESI+	248.1>121.1	248.1>121.1	34	14
		248.1>128.1			20
呋喃它酮	ESI+	325.2>100.1	325.2>100.1	4	22
		325.2>252.1			14
呋喃唑酮	ESI+	226.1>122.1	226.1>122.1	16	22
		226.1>139.0			14
卡巴氧	ESI+	263.1>90.0	263.1>230.9	2	28
		263.1>230.9			12
喹乙醇	ESI+	264.2>143.2	264.2>143.2	36	34
		264.2>212.1			24
乙酰甲喹	ESI+	219.1>143.1	219.1>143.1	34	20
		219.1>102.1			36
喹烯酮	ESI+	307.2>102.9	307.2>131.1	40	40
		307.2>131.1			26

表 2 (续)

药物名称	扫描方式	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
呋喃妥因	ESI—	237.0>151.9	237.0>151.9	36	12
		237.0>193.9			10
呋喃西林	ESI—	197.0>149.9	197.0>149.9	8	8
		197.0>123.9			10

7.4.3 定性测定

待测药物选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同实验条件下,试样中待测物质的保留时间与混合标准工作液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且试样中各组分两个子离子的相对丰度与浓度接近的混合标准工作液中对应的两个子离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样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

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

取试样溶液和混合标准工作液上机分析,得到色谱峰面积响应值,作单点或多点校准,用外标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱和质谱条件下,混合标准工作液特征离子色谱图参见附录 A。

8 结果计算

试样中待测药物含量以质量分数 X 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

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

式中:

X ——试样中待测药物含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——试样溶液中待测药物的峰面积;

A_s ——混合标准工作液中待测药物的峰面积;

C_s ——混合标准工作液中待测药物浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g);

V_1 ——过固相萃取柱的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液总体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 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)
混合标准工作液特征离子色谱图

硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉类药物混合标准工作液的特征离子色谱图见图 A.1。

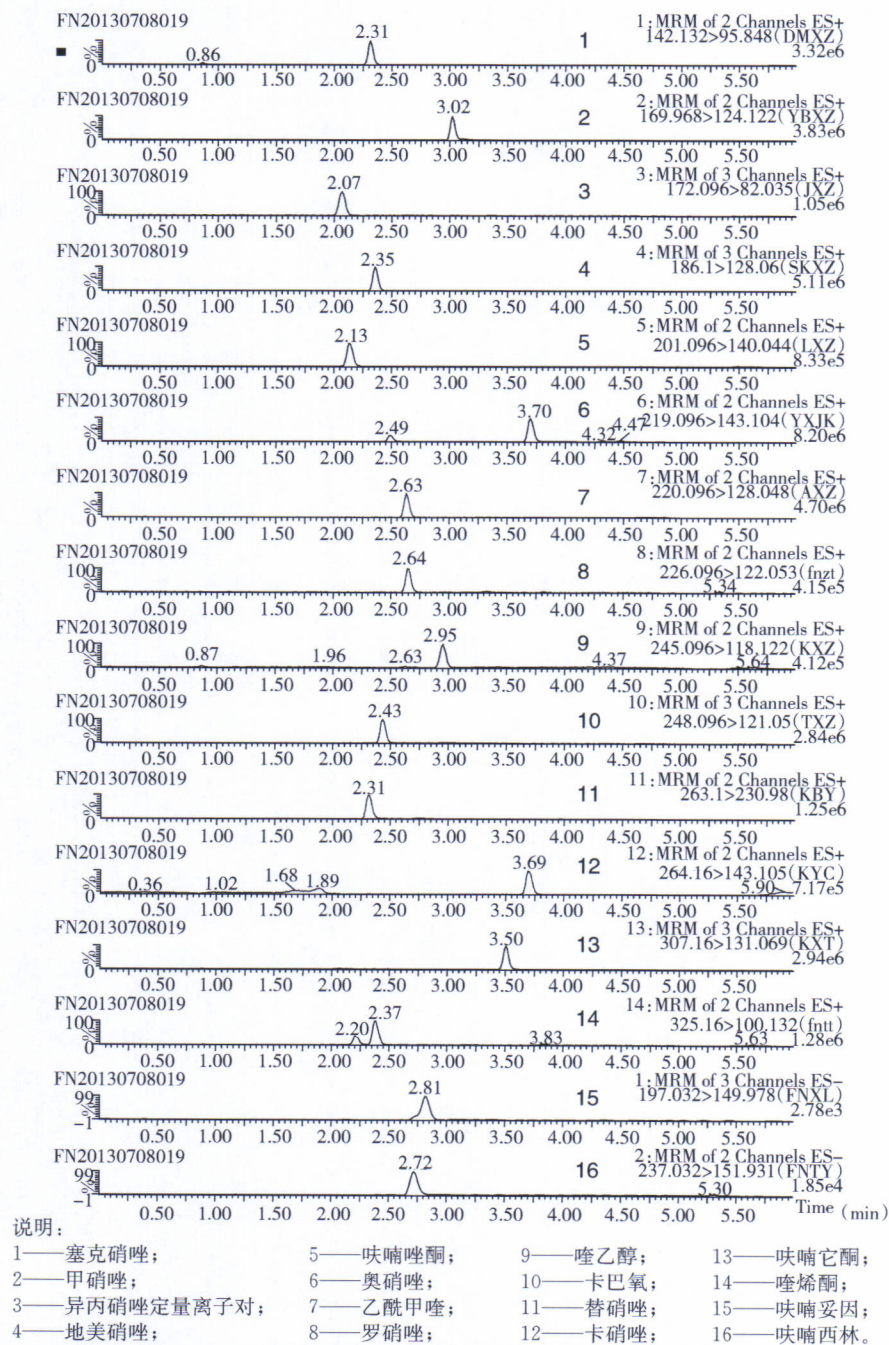


图 A.1 硝基咪唑类、硝基呋喃类和喹噁啉类药物混合标准工作液(1 ng/mL)特征离子色谱图