

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 197 号—2—2019

饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of valnemulin hydrochloride and tiamulin in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019-08-01 发布

2020-01-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:浙江大学饲料科学研究所。

本标准主要起草人:王凤芹、汪以真、路则庆、余东游、王新霞、单体中、冯杰、刘波静、杜华华。



饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素测定的液相色谱-串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的测定。

本标准盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的检出限均为 0.1 mg/kg,定量限均为 0.5 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样用甲醇提取,经混合型阳离子固相小柱净化,甲酸乙腈水溶液溶解、过膜后,供液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂或材料

除特殊说明外,本法所用试剂均为分析纯。

4.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2 甲醇。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 乙腈:色谱纯。

4.5 甲酸:色谱纯。

4.6 2%甲酸溶液:取甲酸 2 mL,加水定容至 100 mL。

4.7 0.1%甲酸溶液:取 1 mL 甲酸,加水定容至 1 000 mL。

4.8 5%甲酸溶液:取甲酸 5 mL,加水定容至 100 mL。

4.9 5%氨水-甲醇溶液:取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。

4.10 0.1%甲酸-乙腈水溶液:取 1 mL 甲酸,加入 200 mL 乙腈,用水定容至 1 000 mL。

4.11 盐酸沃尼妙林(CAS 号:133868-46-9):纯度大于等于 99%。

4.12 泰妙菌素(CAS 号:55297-95-5):纯度大于等于 98%。

4.13 标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):依次称取盐酸沃尼妙林(4.11)和泰妙菌素(4.12)各 0.05 g(精确到 0.000 1 g),分别用乙腈(4.4)溶解并定容至 50 mL 棕色容量瓶中,混匀。—20℃ 以下保存,有效期为 3 个月。

4.14 混合标准溶液(250 $\mu\text{g/mL}$):准确移取 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准储备溶液各 25 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释并定容至刻度,混匀。此溶液临用现配。

4.15 标准系列工作溶液:准确移取适量的混合标准溶液(4.14),用 0.1%甲酸-乙腈水溶液(4.10)配制浓度分别为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。此溶液临用现配。

4.16 混合型阳离子交换固相萃取柱(MCX):150 mg/6 mL 或相当者。

4.17 微孔滤膜:0.22 μm ,水系。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪;配电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg。

5.3 离心机:转速不低于 5 000 r/min。

5.4 氮吹仪。

6 样品

按 GB/T 20195 的规定制备样品,至少约 200 g,粉碎过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。配合饲料、浓缩饲料、精料补充料称取 5 g 试样,添加剂预混合饲料称取 2 g 试样,精确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 甲醇(4.2),超声提取 30 min,于 5 000 r/min 离心 10 min。收集上清液于 100 mL 棕色容量瓶中,并向残渣中加入 20 mL 甲醇(4.2),重复提取 2 次。合并上清液于容量瓶中,并用甲醇(4.2)定容至刻度,摇匀,备用。

7.2 净化

依次用 5 mL 甲醇(4.3)、5 mL 水、5 mL 2%甲酸溶液(4.6)活化固相萃取小柱。准确移取 1 mL 提取液(7.1)至离心管中,加入 1 mL 0.1%甲酸溶液(4.7)混匀后过柱,用 2 mL 0.1%甲酸溶液(4.7)洗涤离心管,洗涤液一并过柱。依次用 5 mL 5%甲酸溶液(4.8)、5 mL 甲醇(4.3)淋洗固相萃取小柱,抽干淋洗液,用 5 mL 5%氨水-甲醇溶液(4.9)洗脱,收集洗脱液于 50℃ 氮气吹干,准确加入 2 mL 0.1%甲酸-乙腈水溶液(4.10)溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} ,柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm ,或相当者;
- 流动相:A:0.1%甲酸溶液;B:0.1%甲酸乙腈溶液;
- 梯度洗脱,洗脱程序见表 1;
- 流速:0.5 mL/min;
- 柱温:35℃;
- 进样量:2 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A, %	B, %
0.0	80	20
2.0	20	80
2.5	10	90
3.8	10	90
4.0	80	20
5.0	80	20

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 雾化气、干燥气为高纯氮气,碰撞气为高纯氩气或其他合适气体;
- e) 喷雾电压、碰撞能量等参数应优化至最优灵敏度;
- f) 监测离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 沃尼妙林和泰妙菌素的定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值

化合物	母离子, m/z	子离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
沃尼妙林	565.3	263.0	263.0	22	16
		163.9			32
泰妙菌素	494.3	192.0	192.0	32	22
		118.9			34

7.3.3 定性测定

待测物选择 1 个母离子和 2 个子离子,在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与标准系列工作溶液中对应该化合物的保留时间相对偏差在±2.5%之内,且试样中目标化合物 2 个子离子的相对丰度与浓度接近的标准系列工作溶液中对应该离子的相对丰度进行比较,偏差不得超过表 3 规定的范围,则可判定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

单位为百分率

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

7.3.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,依次测定盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准溶液与试样溶液,以标准溶液的浓度为横坐标、以定量离子的峰面积为纵坐标,绘制工作曲线(相关系数 R 应大于或等于 0.99),并对样品进行定量。试样测定溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围之内。若试样测定溶液中的盐酸沃尼妙林和泰妙菌素浓度超出线性范围,可用 0.1%甲酸-乙腈水溶液(4:10)进一步稀释(n 倍),重新测定。在上述色谱和质谱条件下,盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

8 试验数据处理

试样中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的含量(ω_i)以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$\omega_i = V \times \frac{c \times V_2 \times n}{m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- V ——提取液的定容体积,单位为毫升(mL);
- c ——试样测定溶液中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V_1 ——用于净化的提取液体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——净化后最终定容体积,单位为毫升(mL);
- n ——稀释倍数;
- m ——试样的质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果与这 2 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)

盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准溶液色谱图(MRM 图)

A.1 盐酸沃尼妙林标准溶液(25 $\mu\text{g/L}$)色谱图

见图 A.1。

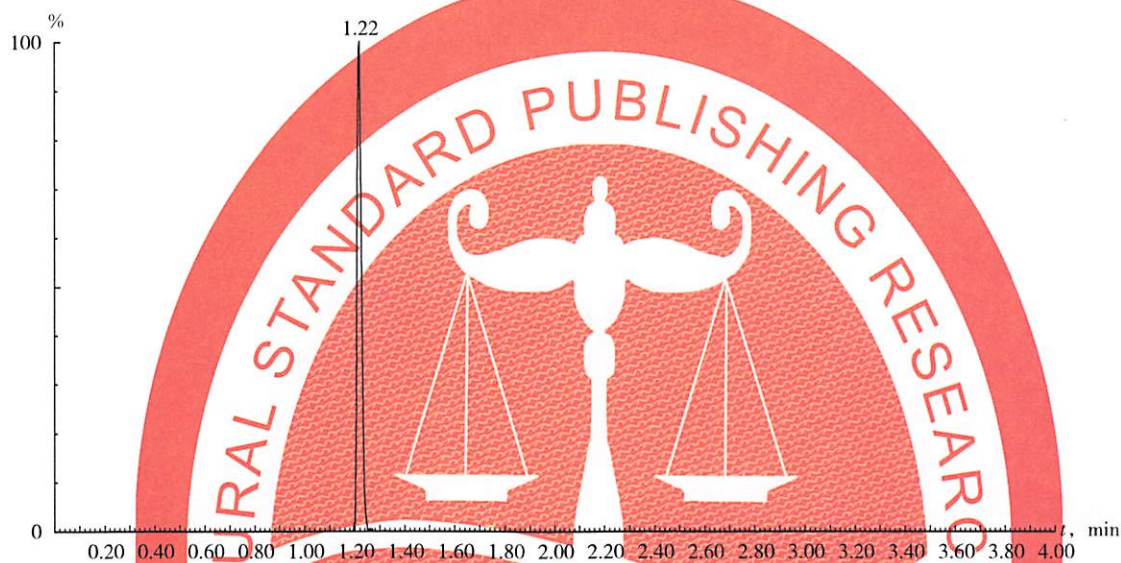


图 A.1 盐酸沃尼妙林标准溶液(25 $\mu\text{g/L}$)色谱图

A.2 泰妙菌素标准溶液(25 $\mu\text{g/L}$)色谱图

见图 A.2。

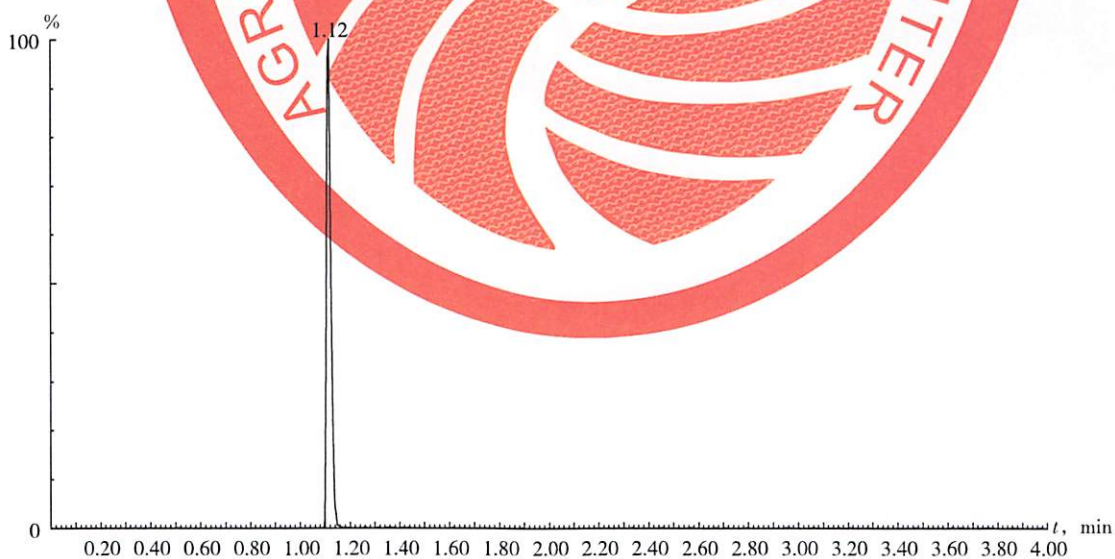


图 A.2 泰妙菌素标准溶液(25 $\mu\text{g/L}$)色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的测定
液相色谱—串联质谱法

农业农村部公告第197号—2—2019

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

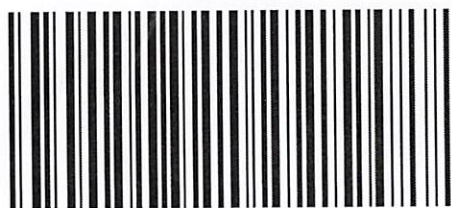
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2019年12月第1版 2019年12月北京第1次印刷

书号: 16109·4864

定价: 18.00 元



农业农村部公告第197号—2—2019

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261