

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 316 号— 8 — 2020

饲料中他唑巴坦的测定 液相色谱-串联质谱法

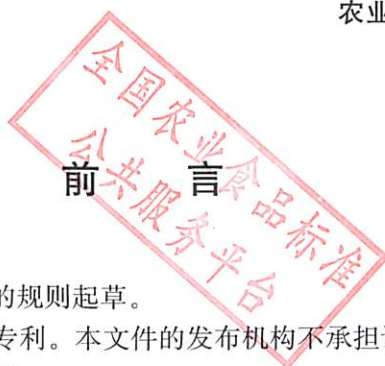
Determination of tazobactam in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2020-07-17 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布



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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、北京大北农科技集团股份有限公司。

本标准主要起草人：陈刚、王安如、胡剑、贾曼、朱丹、李强强、逢秀梅、刘悦。

饲料中他唑巴坦的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中他唑巴坦的液相色谱-串联质谱测定方法。

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他唑巴坦的测定。

本标准的检出限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.2 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的他唑巴坦经乙二胺四乙酸-氨水混合溶液提取,反相固相萃取柱(苯乙烯-二乙烯基苯聚合物)净化后,用液相色谱-串联质谱测定,基质匹配曲线校准,外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 乙酸铵:色谱纯。

4.5 0.3 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)溶液:称取 Na_2EDTA 111.96 g 用水溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。

4.6 20%乙腈溶液:取乙腈 20 mL 加水定容至 100 mL,混匀。

4.7 乙酸铵溶液(5 mmol/L):称取乙酸铵(4.4)3.85 g 用水溶解,并稀释至 1 000 mL,混匀。

4.8 提取液:取 0.3 mol/L Na_2EDTA 溶液(4.5)990 mL,与 10 mL 氨水混匀,备用。

4.9 他唑巴坦标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):准确称取他唑巴坦对照品(CAS 号:89786-04-9,纯度 $\geq 99\%$)10 mg(精确至 0.01 mg),用甲醇(4.3)溶解并定容至 10 mL,配制成浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 -20°C 以下避光保存,有效期为 3 个月。

4.10 他唑巴坦标准工作溶液:准确移取他唑巴坦标准储备溶液(4.9)适量,用甲醇(4.3)逐级稀释配制成他唑巴坦浓度分别为 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的标准工作溶液。临用现配。

4.11 苯乙烯-二乙烯基苯聚合物(PPL)固相萃取小柱:200 mg/3 mL,或性能相当者。

4.12 微孔滤膜:0.22 μm ,水系。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.001 g。

5.3 涡旋混合器。

5.4 高速冷冻离心机:转速不低于 10 000 r/min。

5.5 超声波清洗器。

5.6 固相萃取装置。

6 样品

按 GB/T 20195 制备样品,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,备用。选取类型相同、均匀一致且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为空白样品。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 1 g(精确至 0.001 g)置于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 20 mL 提取溶液(4.8),涡旋混匀 1 min,超声提取 5 min,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,备用。

7.2 净化

固相萃取小柱(4.11)依次用 3 mL 乙腈、6 mL 水活化。准确移取上清液(7.1)2 mL 过柱,控制流速每秒 1 滴~2 滴,待其流干。用 4 mL 水淋洗,抽干。用 20%乙腈水溶液(4.6)2 mL 洗脱,挤压或真空抽干。收集洗脱液,混合均匀。过 0.22 μ m 微孔滤膜(4.12)后上机测定。

7.3 基质匹配标准系列工作溶液的制备

取空白试样,按 7.1 和 7.2 处理,得到空白基质溶液,分别移取他唑巴坦标准工作溶液(4.10)适量,用空白基质溶液进行稀释,配制成 5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 基质匹配标准系列工作溶液。

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,内径 3.0 mm,粒径 2.7 μ m,或性能相当者。

柱温:35℃。

进样量:5 μ L。

流速:0.3 mL/min。

流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液(4.7),B 为乙腈(4.2),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0.00	95	5
2.00	75	25
4.00	5	95
6.00	5	95
6.50	95	5
8.00	95	5

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:负离子模式(ESI^-)。

检测方式:多反应监测(MRM)。

毛细管电压:2 500 V。

气体温度:300℃。

干燥气流速:7 L/min。

雾化气压力:40 psi。

多反应监测(MRM)离子对、碰撞能量见表 2。

表 2 他唑巴坦的多反应监测(MRM)离子对、碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对, m/z	碰撞能量, eV
他唑巴坦	299. 1>207. 0	5
	299. 1>137. 9 ^a	10
^a 为定量离子。		

7.4.3 基质匹配标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列工作溶液(7.3)和试样溶液(7.2)上机测定。他唑巴坦标准溶液定量离子色谱图参见附录 A。

7.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列工作溶液中待测物的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列工作溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.5 定量

以他唑巴坦基质匹配标准系列工作溶液(7.3)的浓度为横坐标、以色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准工作溶液作相应稀释后重新测定。

8 试验数据处理

试样中他唑巴坦的含量以质量分数 w 计,数值以微克每千克($\mu\text{g/kg}$)表示。单点校准按式(1)计算,多点校准按式(2)计算。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- A ——试样溶液中他唑巴坦的色谱峰面积;
- A_s ——基质匹配标准工作溶液中他唑巴坦的峰面积;
- ρ_s ——基质匹配标准工作溶液中他唑巴坦的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V_1 ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——净化时所用试样溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——洗脱溶液体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g)。

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中他唑巴坦的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)。
- 测定结果以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,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算数平均值的 15%。

附 录 A
(资料性附录)
他唑巴坦标准溶液定量离子色谱图

他唑巴坦标准溶液定量离子色谱图见图 A. 1。

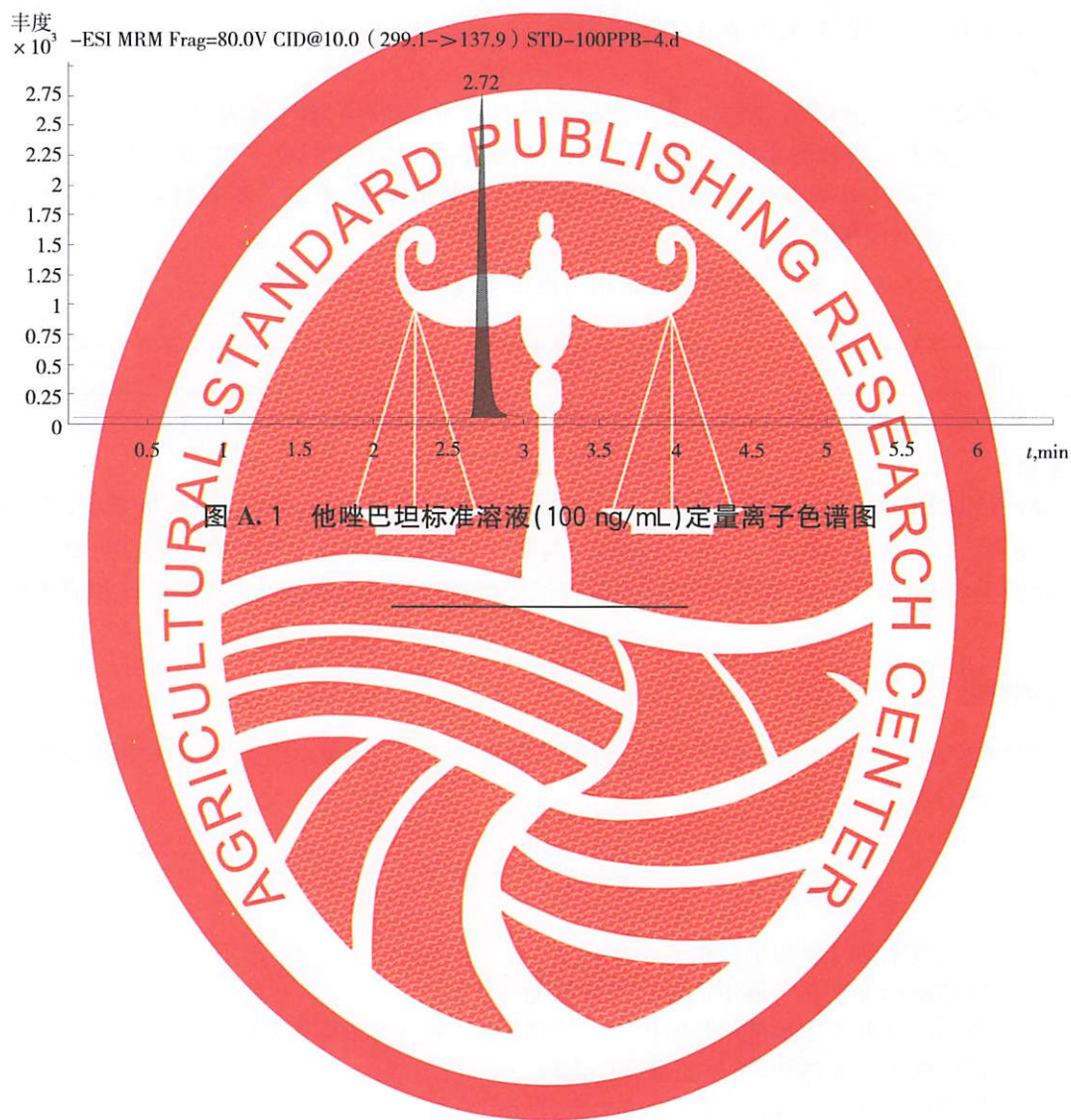


图 A. 1 他唑巴坦标准溶液(100 ng/mL)定量离子色谱图

中华人民共和国
国家标准

饲料中他唑巴坦的测定
液相色谱-串联质谱法

农业农村部公告第316号—8—2020

* * *

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

2020年10月第1版 2020年10月北京第1次印刷

书号: 16109·8157

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第316号—8—2020