

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 627 号—2—2022

饲料中二羟丙茶碱的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of diprophylline in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2022-12-19 发布

2023-03-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：四川省饲料工作总站[农业农村部饲料质量监督检验测试中心(成都)]。

本文件主要起草人：赵立军、张静、李云、冯波、高庆军、晁娟娟、李丽、蒋刘柱、林顺全。

饲料中二羟丙茶碱的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了饲料中二羟丙茶碱的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中二羟丙茶碱的测定。

本文件的检出限为 0.01 mg/kg,定量限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的二羟丙茶碱用甲酸溶液提取,经固相萃取柱净化,用液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配标准溶液校准,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 甲醇:色谱纯。

5.3 甲酸:色谱纯。

5.4 乙酸铵:色谱纯。

5.5 25%甲醇溶液:取甲醇 250 mL,加水稀释至 1 L,混匀。

5.6 0.2%甲酸溶液:取甲酸 2 mL,加水稀释至 1 L,混匀。

5.7 乙酸铵溶液(200 mmol/L):称取乙酸铵 3.1 g,加水溶解并稀释至 200 mL,混匀。

5.8 乙酸铵-甲酸溶液:移取乙酸铵溶液(5.7)12.5 mL和甲酸 1 mL,加水定容至 500 mL,混匀。

5.9 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取二羟丙茶碱标准品(CAS号:479-18-5,纯度不低于 98%)50 mg(精确至 0.01 mg)于 50 mL 容量瓶中,用 25%甲醇溶液(5.5)溶解定容。于 2℃~8℃保存,有效期为 3 个月。

5.10 标准中间溶液(10 μg/mL):准确移取二羟丙茶碱标准储备溶液(5.9)1 mL于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(5.2)稀释至刻度,混匀。于 2℃~8℃保存,有效期为 1 个月。

5.11 固相萃取柱:混合型阳离子交换柱,60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.12 微孔滤膜:0.22 μm,水系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

- 6.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 6.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 6.4 往复式振荡器。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 涡旋混合器。
- 6.7 氮吹仪。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备试样,至少 200 g,粉碎后通过 0.425 mm 孔筛,充分混匀,装入容器,密闭保存,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,作为空白试样。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g(精确至 0.000 1 g),于 50 mL 离心管中,准确加入 20 mL 0.2% 甲酸溶液(5.6),摇匀,振荡 20 min,以 8 000 r/min 离心 5 min,移取上清液作为备用液。

8.2 净化

8.2.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料:将固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇(5.2)、3 mL 水活化。准确移取 5 mL 备用液(8.1)过柱,用 3 mL 水淋洗,抽干,再用 3 mL 甲醇(5.2)洗脱,收集洗脱液,于 50 °C 氮吹至干,准确加入 1 mL 0.2% 甲酸溶液(5.6)溶解,涡旋混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜(5.12),备用。

8.2.2 添加剂预混合饲料:取适量备用液(8.1)过 0.22 μm 微孔滤膜(5.12)2 次,备用。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样,按 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液,取适量标准中间溶液(5.10),用甲醇配制成浓度分别为 2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、200.0 ng/mL、500.0 ng/mL 的标准系列溶液,各取 1 mL 于 50 °C 氮吹至干,准确加入 1 mL 空白基质溶液,涡旋混匀,待测。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈ 柱,柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.8 μm,或性能相当者。

流动相 A: 甲醇(5.2); 流动相 B: 乙酸铵-甲酸溶液(5.8)。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	15	85
0.50	15	85
2.50	95	5
3.20	98	2
4.20	98	2
4.21	15	85
6.50	15	85

流速: 0.3 mL/min。

柱温: 30 °C。

进样量: 2 μL。

8.4.2 质谱参考条件

电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式(ESI⁺)。

检测方式: 多反应监测(MRM)。

毛细管电压:3.5 kV。

干燥气温度:300 °C。

干燥气流速:5 L/min。

雾化器压力:45 psi。

多反应监测(MRM)离子对、碎裂电压和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 二羟丙茶碱的多反应监测(MRM)离子对、碎裂电压和碰撞能量参考值

待测物名称	监测离子对, m/z	碎裂电压, V	碰撞能量, eV
二羟丙茶碱	255. 0/180. 9 ^a	380	22
	255. 0/123. 9	380	34
^a 定量离子对。			

8.4.3 基质匹配标准系列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溶液和试样溶液上机测定。基质匹配标准溶液多反应监测色谱图见附录 A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差在±2.5%以内,且试样谱图中二羟丙茶碱定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的定性离子相对离子丰度进行比较,若偏差超过表 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

单位为百分号

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

8.4.5 定量

分别取适量试样溶液和基质匹配标准系列溶液,以浓度为横坐标、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溶液用 0.2%甲酸溶液稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与基质匹配标准溶液浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中二羟丙茶碱的含量以质量分数计。标准曲线校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算。

$$w = \frac{\rho \times V \times n}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

$$w = \frac{A \times C_s \times V \times n}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

w ——试样中二羟丙茶碱含量的数值,单位为毫克/千克(mg/kg);

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中二羟丙茶碱质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数;

m ——试样质量的数值,单位为克(g);

A ——试样溶液中二羟丙茶碱的色谱峰面积;

C_s ——基质匹配标准溶液中二羟丙茶碱质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_s ——基质匹配标准溶液中二羟丙茶碱的色谱峰面积。

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。

10 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术平均值的 20%。



附录 A

(资料性)

二羟丙茶碱基质匹配标准溶液定量离子色谱图

二羟丙茶碱基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图 A. 1。

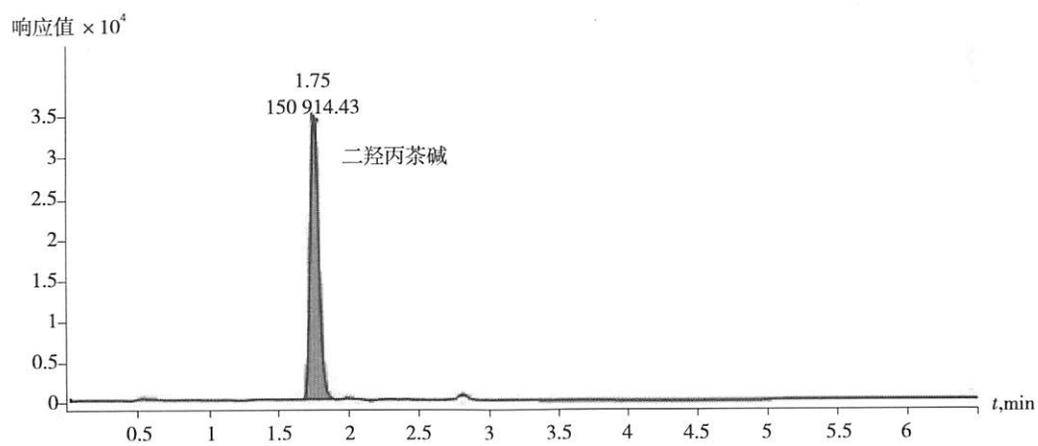


图 A. 1 二羟丙茶碱基质匹配标准溶液(100.0 ng/mL)定量离子色谱图

中华人民共和国
国家标准

饲料中二羟丙茶碱的测定
液相色谱-串联质谱法

农业农村部公告第627号—2—2022

* * *

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

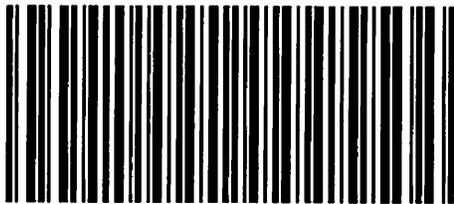
2023年2月第1版 2023年2月北京第1次印刷

书号:16109·9338

定价:24.00元

版权专有 侵权必究

举报电话:(010) 59194261



农业农村部公告第627号—2—2022