

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3141—2017

饲料中2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4- 二氢吡啶的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylic acid diethyl
ester in feeds—Liquid chromatography—tandem mass spectrometry

2017-12-22 发布

2018-06-01 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:农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)。

本标准主要起草人:赵立军、张静、李宏、林顺全、廖峰、曾晓芳、魏敏、李云。

饲料中 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶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 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶的测定。

本标准方法的检出限为 0.1 mg/kg,定量限为 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

试样中的 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶经提取,固相萃取柱净化后用高效液相色谱—串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 乙酸铵:色谱纯。

4.4 甲酸:色谱纯。

4.5 95%甲醇溶液:取甲醇(4.1)95 mL 加水定容至 100 mL,摇匀,即得。

4.6 90%乙腈溶液:取乙腈(4.2)90 mL 加水定容至 100 mL,摇匀,即得。

4.7 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶对照品:纯度大于 98.0%。

4.8 标准储备溶液:准确称取适量 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶对照品(精确到 0.1 mg),用乙腈溶解、定容,配成储备溶液浓度为 1 mg/mL,转移至棕色瓶。—20℃冰箱内保存,有效期为 3 个月。

4.9 标准中间溶液:准确吸取 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶储备溶液(4.8)0.2 mL,用乙腈稀释、定容至 100 mL,使之浓度为 2.0 μg/mL,转移至棕色瓶。—20℃冰箱内保存,有效期为 1 个月。

4.10 0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵水溶液:称取乙酸铵(4.3)0.385 g 加水定容至 1 000 mL,加入甲酸(4.4)1 mL,摇匀,即得。

4.11 固相萃取柱:C₁₈固相萃取柱(200 mg/3 mL);或性能相当的分析柱。

4.12 微孔滤膜:0.22 μm ,有机相。

4.13 密封盖塑料离心管:50 mL。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱—串联质谱仪(带电喷雾离子源)。

5.2 分析天平:感量为0.1 mg和0.01 g各1台。

5.3 离心机:转速为8 000 r/min及以上。

5.4 超纯水器。

5.5 涡旋混合器。

5.6 振荡器。

5.7 固相萃取装置。

6 采样和试样制备

按照 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 GB/T 20195 的规定制备试样,全部通过 0.28 mm 孔筛,充分混匀,装入密闭容器中,避光低温保存,备用。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 配合饲料、浓缩饲料或精料补充料:准确称取 2 g(精确到 0.01 g),置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 95%甲醇(4.5)50 mL。置于振荡器上中速振荡 30 min,静置 2 min。移取适量上清液于离心管中,以 8 000 r/min 离心 5 min。准确吸取上清液 0.2 mL,用 95%甲醇(4.5)定容至 10 mL,作为备用液。

7.1.2 添加剂预混合饲料:准确称取 1 g(精确到 0.01 g),置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 90%乙腈(4.6)50 mL。置于振荡器上中速振荡 30 min,静置 2 min。移取适量上清液于离心管中,以 8 000 r/min 离心 5 min。准确吸取上清液 0.1 mL,用 90%乙腈(4.6)定容至 10 mL,作为备用液。

7.2 净化

7.2.1 配合饲料、浓缩饲料或精料补充料:固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化(活化后萃取柱内水相液面高于柱筛板 1 mm~2 mm),取备用液(7.1.1)3.0 mL 过柱,收集流出液至 10 mL 试管内,涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜。

7.2.2 添加剂预混合饲料:取适量备用液(7.1.2),过 0.22 μm 滤膜。

7.3 标准曲线的制备

根据测定试样种类不同,按 7.1 和 7.2 步骤分别制备配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料空白试样备用液。精密量取适量 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶标准中间溶液(4.9),用上述空白试样备用液稀释定容,制得 0.000 4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.002 $\mu\text{g/mL}$ 、0.005 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 各系列工作溶液,供高效液相色谱—串联质谱测定。

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 2.1 mm,粒径 2.4 μm ;或性能相当的分析柱;

流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵水溶液,梯度洗脱条件见表 1;

柱温:30℃;

进样量:10 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱参考条件

时间,min	流动相 A,%	流动相 B,%	流速,mL/min
0	20.0	80.0	0.20
2.00	80.0	20.0	0.20
5.00	80.0	20.0	0.20
5.01	95.0	5.00	0.40
12.00	95.0	5.00	0.40
12.01	20.0	80.0	0.20
15.00	20.0	80.0	0.20

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;
毛细管电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度;
定性离子对、定量离子对等参数见表 2。

表 2 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶的定性、定量离子对及碰撞能量参考值

名称	定性离子对,m/z	定量离子对,m/z	碰撞能量,V
2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶	254/208	254/208	6
	254/108		22

7.4.3 定性测定

在相同试验条件下,试样中待测物的保留时间与标准工作溶液的保留时间偏差在±2.5%以内,且试样谱图中各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准工作溶液中对应的定性离子相对离子丰度进行比较,若偏差不得超过表 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误差

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

7.4.4 定量测定

取试样制备液(7.2.1 或 7.2.2)和相应浓度的标准工作溶液(7.3),作单点或多点校准,以色谱峰面积定量。当待测物浓度超出线性范围时,应适当调整稀释倍数后测定。2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶标准工作溶液多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

8 结果计算

试样中 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶的含量 X,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),单点校正按式(1)计算。

$$X = \frac{A_i \times C_s \times V_s \times V \times n}{A_s \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:
X——试样中 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
A_i——试样溶液峰面积值;
C_s——标准工作溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
V_s——标准工作溶液进样体积,单位为微升(μL);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准工作溶液峰面积值;

m ——称取试样的质量,单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL);

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。

多点校正按式(2)计算。

$$X = \frac{C_x \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_x ——标准曲线上查得的试样中 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

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 2 次独立测定结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%。

附 录 A

(资料性附录)

2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶标准溶液多反应监测(MRM)色谱图

2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶标准溶液多反应监测(MRM)色谱图见图 A.1。

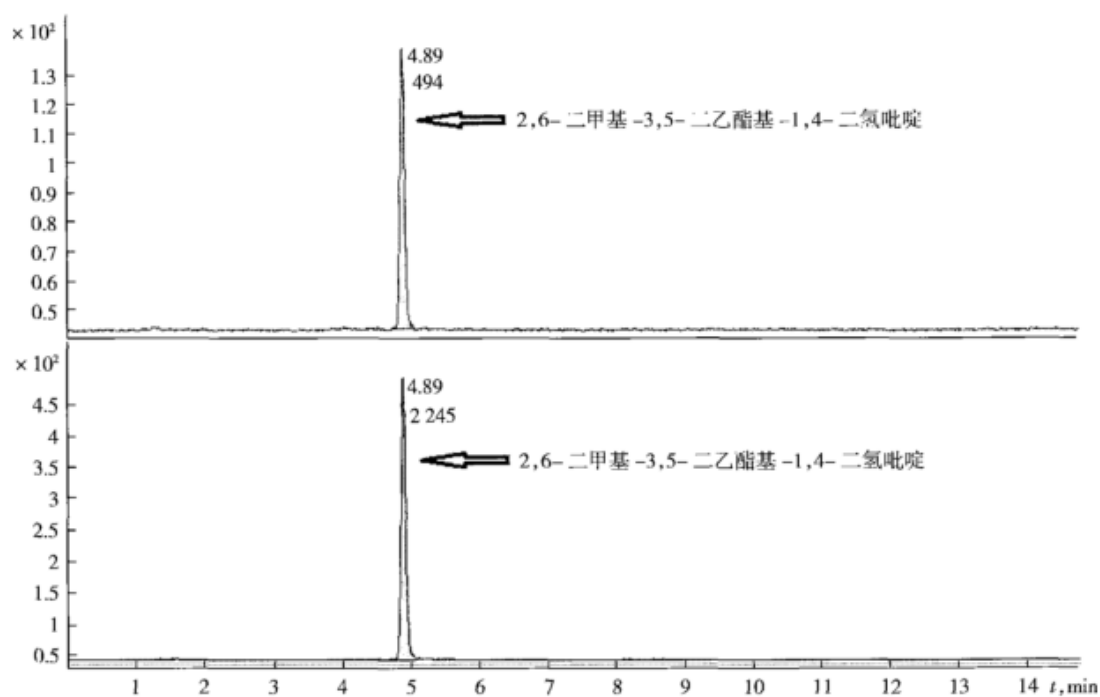


图 A.1 2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶标准溶液(5.0 ng/mL)多反应监测(MRM)色谱图