

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3142—2017

---

## 饲料中溴吡斯的明的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of pyridostigmine bromide 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:广东省农业科学院农产品公共监测中心。

本标准主要起草人:何绮霞、王威利、张展、续倩、吴维辉、林雪贤、殷秋妙。

## 饲料中溴吡斯的明的测定 液相色谱-串联质谱法

### 1 范围

本标准规定了饲料中溴吡斯的明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溴吡斯的明的测定。

本标准检出限为  $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为  $2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 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

试样中溴吡斯的明经甲醇或乙腈超声提取, 提取液氮气吹干, 超纯水溶解, WCX 固相萃取柱净化, 液相色谱-串联质谱仪测定, 内标法定量。

### 4 试剂

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯试剂, 水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈: 色谱纯。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 甲酸: 色谱纯。

4.4 甲酸铵: 色谱纯。

4.5 正己烷: 分析纯。

4.6 1%甲酸甲醇溶液: 取 1 mL 甲酸, 用甲醇定容至 100 mL。

4.7 5 mmol/L 甲酸铵甲酸溶液: 取甲酸铵 0.315 g 和甲酸 1.0 mL, 用水定容至 1 000 mL。

4.8 复溶液: 甲酸铵甲酸溶液(4.7)+乙腈=90+10。

4.9 复溶液饱和的正己烷: 在正己烷中加入复溶液(4.8), 直至分层, 振荡后静置待用。

4.10 溴吡斯的明标准品: 纯度 $\geq 98.0\%$ 。

4.11 溴吡斯的明- $D_6$  标准品(同位素内标物): 纯度 $\geq 98.0\%$ 。

4.12 溴吡斯的明标准储备液( $1\ \text{mg}/\text{mL}$ ): 准确称取适量溴吡斯的明标准品, 用色谱纯甲醇配制成  $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液,  $-20^\circ\text{C}$  储藏, 有效期 6 个月。

4.13 溴吡斯的明标准工作液( $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确量取溴吡斯的明标准储备液(4.12), 用色谱纯甲醇稀释成溴吡斯的明浓度为  $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液,  $4^\circ\text{C}$  储藏, 有效期 1 个月。

4.14 溴吡斯的明- $D_6$ (4.11)标准储备液( $1\ \text{mg}/\text{mL}$ ): 准确称取适量溴吡斯的明- $D_6$  标准品, 用色谱纯甲醇配制成  $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液,  $-20^\circ\text{C}$  储藏, 有效期 6 个月。

4.15 溴吡斯的明- $D_6$  标准工作液( $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确量取溴吡斯的明- $D_6$  标准储备液(4.14), 用色谱

纯甲醇稀释成溴吡斯的明浓度为  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液,  $4^{\circ}\text{C}$  储藏, 有效期 1 个月。

## 5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱联用仪: 配电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 分析天平: 感量  $0.1 \text{ mg}$ 。
- 5.3 分析天平: 感量  $0.01 \text{ mg}$ 。
- 5.4 涡旋振荡器。
- 5.5 超声水浴。
- 5.6 离心机: 最高转速  $12\,000 \text{ r}/\text{min}$  或以上。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 滤膜:  $0.22 \mu\text{m}$ 。
- 5.10 固相萃取小柱: 混合型弱阳离子交换柱(WCX),  $150 \text{ mg}/3 \text{ mL}$ ; 或相当者。

## 6 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, 按照 GB/T 20195 的规定制备样品, 粉碎后过  $0.45 \text{ mm}$  孔径的分析筛, 混匀, 装入磨口瓶中, 备用。

## 7 测定步骤

### 7.1 提取

#### 7.1.1 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料

称取试样约  $2 \text{ g}$  (精确至  $0.1 \text{ mg}$ ), 准确加入溴吡斯的明- $\text{D}_6$  标准工作液(4.15)  $100 \mu\text{L}$ , 加入甲醇(4.2)  $20 \text{ mL}$ , 涡旋  $30 \text{ s}$ , 超声提取  $10 \text{ min}$ ,  $10\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 准确取上清液  $10 \text{ mL}$ , 置于水浴锅中  $50^{\circ}\text{C}$  氮气吹干, 准确加水  $10 \text{ mL}$  溶解, 加入  $10 \text{ mL}$  正己烷(4.5), 涡旋  $30 \text{ s}$ ,  $10\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 准确取下层液体  $5 \text{ mL}$ , 为样品提取液。

#### 7.1.2 添加剂预混合饲料

称取试样约  $2 \text{ g}$  (精确至  $0.1 \text{ mg}$ ), 准确加入溴吡斯的明- $\text{D}_6$  标准工作液(4.15)  $100 \mu\text{L}$ , 加入乙腈(4.1)  $20 \text{ mL}$ , 涡旋  $30 \text{ s}$ , 超声提取  $10 \text{ min}$ ,  $10\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 准确取上清液  $10 \text{ mL}$ , 置于水浴锅中  $50^{\circ}\text{C}$  氮气吹干, 准确加水  $10 \text{ mL}$  溶解, 加入  $10 \text{ mL}$  正己烷(4.5), 涡旋  $30 \text{ s}$ ,  $10\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 准确取下层液体  $5 \text{ mL}$ , 为样品提取液。

### 7.2 净化

取混合型弱阳离子交换柱(WCX), 依次用甲醇  $6 \text{ mL}$ 、水  $6 \text{ mL}$  活化, 取样品提取液(7.1)过柱, 弃去流出液, 再依次用水  $6 \text{ mL}$ 、甲醇  $6 \text{ mL}$  淋洗, 减压抽干, 用  $1\%$  甲酸甲醇溶液(4.6)  $10 \text{ mL}$  洗脱, 洗脱液于水浴锅中  $50^{\circ}\text{C}$  氮气吹干, 用复溶液(4.8)  $0.5 \text{ mL}$  超声溶解, 加入  $0.5 \text{ mL}$  复溶液饱和的正己烷(4.9), 涡旋  $30 \text{ s}$ ,  $12\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 取下层液体, 过  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 7.3 标准曲线的制备

精密吸取溴吡斯的明标准工作液(4.13)和溴吡斯的明- $\text{D}_6$  标准工作液(4.15), 用复溶液稀释成  $0.5 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $1 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $2 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $5 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $20 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ 、 $100 \text{ ng}/\text{mL}$  的系列标准溶液(溴吡斯的明- $\text{D}_6$  均为  $5 \text{ ng}/\text{mL}$ ), 供液相色谱-串联质谱法测定。

### 7.4 测定

#### 7.4.1 色谱参考条件

色谱柱:  $C_{18}$  柱, 柱长 150 mm, 内径 3.0 mm, 粒径  $3\ \mu\text{m}$ ; 或相当者;  
 流动相 A: 5 mmol/L 甲酸铵/0.1% 甲酸水溶液(4.7); 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序见表 1;  
 流速: 0.3 mL/min;  
 柱温: 40°C;  
 进样量: 5  $\mu\text{L}$ 。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间, min | 流动相 A, % | 流动相 B, % |
|---------|----------|----------|
| 0.0     | 97       | 3        |
| 1.2     | 85       | 15       |
| 5.8     | 85       | 15       |
| 6.5     | 50       | 50       |
| 8.0     | 50       | 50       |
| 8.5     | 97       | 3        |
| 12.0    | 97       | 3        |

#### 7.4.2 质谱参考条件

离子源: 电喷雾离子源;  
 扫描方式: MRM;  
 电离模式: 正离子模式;  
 检测方式: 多反应监测(MRM);  
 电离电压: 4.5 kV;  
 雾化温度: 400°C;  
 脱溶剂温度: 250°C;  
 雾化气流速: 3.0 L/min;  
 干燥气流速: 15.0 L/min。

溴吡斯的明和溴吡斯的明- $D_6$  定性离子对、定量离子对及碰撞能量参数见表 2。

表 2 溴吡斯的明和溴吡斯的明- $D_6$  的定性离子对、定量离子对及碰撞能量

| 化合物          | 定性离子对<br>$m/z$ | 定量离子对<br>$m/z$ | 碰撞能量<br>eV |
|--------------|----------------|----------------|------------|
| 溴吡斯的明        | 181.15/72.10   | 181.15/72.10   | 21         |
|              | 181.15/124.20  |                | 16         |
| 溴吡斯的明- $D_6$ | 187.10/78.20   | 187.10/78.20   | 21         |

#### 7.4.3 定性测定

在相同试验条件下, 待测物在样品中的保留时间与标准溶液中的保留时间偏差在  $\pm 2.5\%$  之内, 并且色谱图中各组分定性离子对的相对丰度与浓度接近标准液中相应定性离子对的相对丰度进行比较, 若偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判断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误差

单位为百分率

| 相对离子丰度  | >50      | 20~50(含) | 10~20(含) | $\leq 10$ |
|---------|----------|----------|----------|-----------|
| 允许的相对偏差 | $\pm 20$ | $\pm 25$ | $\pm 30$ | $\pm 50$  |

#### 7.4.4 定量测定

取试样溶液和标准溶液上机测定, 以色谱峰保留时间和离子对定性, 以溴吡斯的明和溴吡斯的明- $D_6$  的色谱峰面积比做单点或标准曲线校准, 用内标法定量。试样溶液中目标物与内标的峰面积比均应

在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,溴吡斯的明标准溶液特征离子的质量色谱图参见附录 A。按以上步骤对同一试样进行平行测定。

## 8 结果计算

试样中溴吡斯的明的含量( $X$ )以质量分数表示,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),按式(1)或式(2)计算。

$$\text{单点校准: } X = \frac{A \times A_b \times C_i \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times A_i \times C_b \times m \times 1000} \times N \quad \text{..... (1)}$$

式中:

$A$  —— 试样溶液中溴吡斯的明的峰面积;

$A_b$  —— 标准溶液中内标溴吡斯的明- $D_6$  的峰面积;

$C_i$  —— 试样溶液中内标溴吡斯的明- $D_6$  的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$C_s$  —— 标准溶液中溴吡斯的明的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$V$  —— 最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$A_s$  —— 标准溶液中溴吡斯的明的峰面积;

$A_i$  —— 试样溶液中内标溴吡斯的明- $D_6$  的峰面积;

$C_b$  —— 标准溶液中内标溴吡斯的明- $D_6$  的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$m$  —— 试样质量,单位为克( $\text{g}$ );

$N$  —— 提取液稀释倍数。

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。

$$\text{或标准曲线校准: } X = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times N \quad \text{..... (2)}$$

式中:

$\rho$  —— 由标准曲线得出的试样溶液中相应的溴吡斯的明浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$V$  —— 最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ )。

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 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对值不大于这 2 个测定值算术平均值的 25%。

附 录 A  
(资料性附录)  
溴吡斯的明标准溶液色谱图

溴吡斯的明标准溶液色谱图参见图 A. 1。

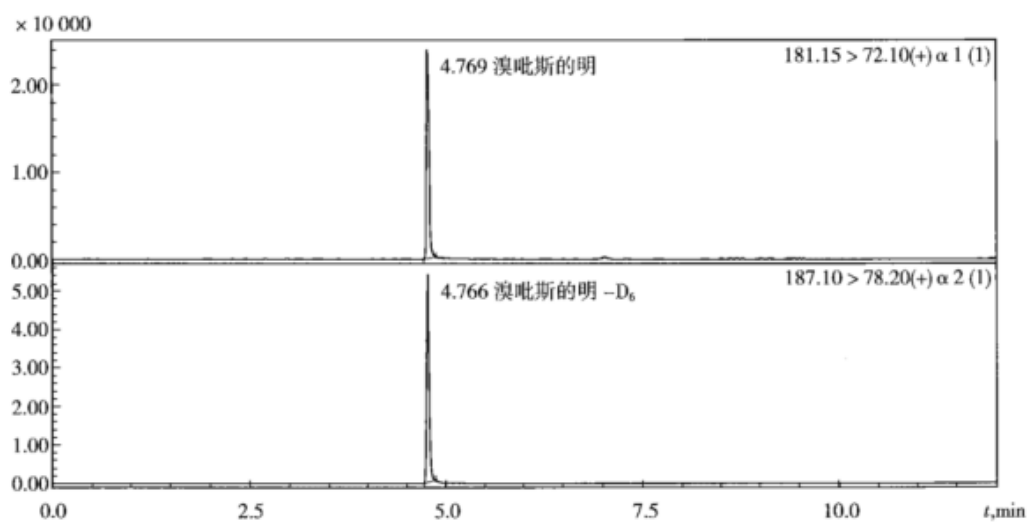


图 A. 1 溴吡斯的明标准溶液色谱图(溴吡斯的明浓度为 2.0 ng/mL,  
溴吡斯的明-D<sub>6</sub> 浓度为 5.0 ng/mL)