

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3147—2017

饲料中肾上腺素和异丙肾上腺素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of epinephrine and isoprinoline in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

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:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人:索德成、魏书林、王培龙、李阳、王瑞国、苏晓鸥、樊霞、李宏、周炜、冯三令。

饲料中肾上腺素和异丙肾上腺素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中肾上腺素(epinephrine)和异丙肾上腺素(isoprenaline)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、添加剂预混合饲料及精料补充料中肾上腺素和异丙肾上腺素的测定。

肾上腺素检出限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$; 异丙肾上腺素检出限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

试样经提取液提取后, 用混合型阳离子固相萃取柱净化、吹干、稀释溶解, 液相色谱-串联质谱仪检测, 内标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯试剂, 实验室用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 甲酸: 色谱级。

4.3 七氟丁酸: 色谱级。

4.4 肾上腺素、异丙肾上腺素、肾上腺素-D6 对照品: 纯度 $\geq 98\%$ 。

4.5 试样提取液: 称取 1.90 g 焦亚硫酸钠溶液、 1.86 g 乙二胺四乙酸二钠加入 950 mL 水, 加 50 mL 乙腈混合均匀。

4.6 3.0 mmol/L 七氟丁酸溶液: 准确吸取七氟丁酸 0.40 mL , 加水 1000 mL , 混匀。

4.7 试样稀释液: 取乙腈 10 mL , 加 3.0 mmol/L 七氟丁酸溶液(4.6) 100 mL , 混匀。

4.8 肾上腺素和异丙肾上腺素标准储备液: 分别精密称取肾上腺素和异丙肾上腺素对照品(精确至 0.00001 g)至棕色容量瓶中, 用甲醇(4.1)配成浓度各为 1 mg/mL 的标准储备液, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存, 有效期 6 个月。

4.9 肾上腺素和异丙肾上腺素标准工作液: 分别吸取肾上腺素和异丙肾上腺素标准储备液(4.8), 用试样稀释液(4.7)稀释成浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存, 有效期 1 个月。

4.10 肾上腺素-D6 同位素内标储备溶液: 分别精密称取肾上腺素-D6 对照品(精确至 0.00001 g)至棕色容量瓶中, 用甲醇(4.1)配成浓度各为 1 mg/mL 的标准储备液, $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存, 有效期 6 个月。

4.11 肾上腺素-D6 同位素内标工作液: 临用前配制, 将肾上腺素-D6 同位素内标储备溶液(4.10)用甲

醇(4.1)稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.12 氨水甲醇溶液:取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。

4.13 氮气:纯度 99.9%。

4.14 固相萃取小柱:混合型阳离子交换柱(3 mL, 60 mg),或其他性能相当的小柱。

4.15 滤膜:0.22 μm ,有机系。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾电离源。

5.2 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

5.3 氮吹仪。

5.4 涡旋振荡器。

5.5 粉碎机。

5.6 恒温水浴振荡摇床。

5.7 固相萃取装置。

5.8 天平:感量 0.01 g;感量 0.000 01 g。

6 采样和试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的样品,用四分法缩减取样,按照 GB/T 20195 的规定制备试样,粉碎过 0.45 mm 孔径筛,混合均匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取配合饲料 5 g,浓缩饲料、添加剂预混合饲料及精料补充料 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 20 μL 肾上腺素-D6 同位素内标工作液(4.11)、20 mL 试样提取液(4.5),涡旋混合 30 s,超声提取 30 min,8 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

7.2 净化

固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。取适量或全部上清液过柱,依次用 3 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗,抽干,用 3 mL 氨水甲醇溶液(4.12)洗脱,收集洗脱液,速度控制在约 1 滴/s,用氮吹仪在 30℃条件下氮气吹干,用 1.0 mL 试样稀释液(4.7)溶解,过 0.22 μm 滤膜。如果检测含量超出线性范围(1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$),适当减少称样量重新处理或减少过固相萃取小柱的溶液量,将上机溶液所含药物的浓度稀释至线性范围内上样。

7.3 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 2.1 μm (或其他效果等同的 C_{18} 柱)。

柱温:30℃。

进样量:10 μL 。

流动相及参考梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相及参考梯度洗脱程序

时间,min	流速,mL/min	3.0 mmol/L 七氟丁酸溶液,%	乙腈,%
0	0.3	98	2
1	0.3	98	2
5.0	0.3	70	30

表 1 (续)

时间, min	流速, mL/min	3.0 mmol/L 七氟丁酸溶液, %	乙腈, %
6.0	0.3	70	30
6.1	0.3	98	2
8.0	0.3	98	2

注:七氟丁酸对检测负离子有抑制作用,如需检测其他药物,应用适量的 50%甲醇和水溶液冲洗色谱和质谱。

7.4 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子模式。

检测方式:多反应监测。

脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

毛细管电压、碰撞能量等电压值应优化至最佳灵敏度。

定性离子对、定量离子对及对应碰撞能量见表 2。

表 2 肾上腺素和异丙肾上腺素的定性离子对、定量离子对、碰撞能量的参考值

被测物名称	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	碰撞能量, eV
肾上腺素	184.1 > 166.2	184.1 > 166.2	20
	184.1 > 130.3		25
异丙肾上腺素	212.2 > 152.2	212.2 > 152.2	20
	212.2 > 194.1		25
肾上腺素-D6	190.2 > 172.0	190.2 > 172.0	20

7.5 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 在相同试验条件下, 样品中待测物质的保留时间与混合标准工作液中对应的保留时间偏差在 ± 0.5 之内, 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准工作液中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 若偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为样品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

7.6 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 取试样溶液和标准溶液分别进样, 以标准溶液中被测组分峰面积和其内标峰面积的比值为纵坐标, 被测组分浓度和内标浓度的比值为横坐标, 用标准系列进行单点或多点校准, 采用内标法定量, 以肾上腺素-D6 为内标物计算肾上腺素、异丙肾上腺素含量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围 ($1 \mu\text{g/L} \sim 100 \mu\text{g/L}$) 内, 在上述色谱和质谱条件下, 肾上腺素和异丙肾上腺素标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图参见附录 A。

8 计算

试样中肾上腺素和异丙肾上腺素的质量分数 X_i 以毫克每千克 (mg/kg) 表示, 按式(1)计算。

$$X_i = \frac{P_i \times V_1 \times c_i \times V_3 \times P_{\text{标}} \times c_{\text{标}} \times 1000}{P_s \times m \times V_2 \times P_{\text{内}} \times c_{\text{内}} \times 1000} \quad \text{..... (1)}$$

式中:

- P_i ——试样溶液中肾上腺素和异丙肾上腺素的峰面积值；
 V_1 ——试样提取液体积，单位为毫升(mL)；
 c_i ——肾上腺素和异丙肾上腺素标准溶液浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；
 V_3 ——上机前定容体积，单位为毫升(mL)；
 P_{is} ——肾上腺素内标的峰面积值；
 c_{is} ——样品溶液中肾上腺素内标溶液浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；
 P_g ——标准溶液峰面积平均值；
 m ——试样质量，单位为克(g)；
 V_2 ——净化时分取溶液的体积，单位为毫升(mL)；
 P_s ——试样溶液中肾上腺素内标的峰面积值；
 c_s ——标准溶液中肾上腺素内标溶液浓度，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。

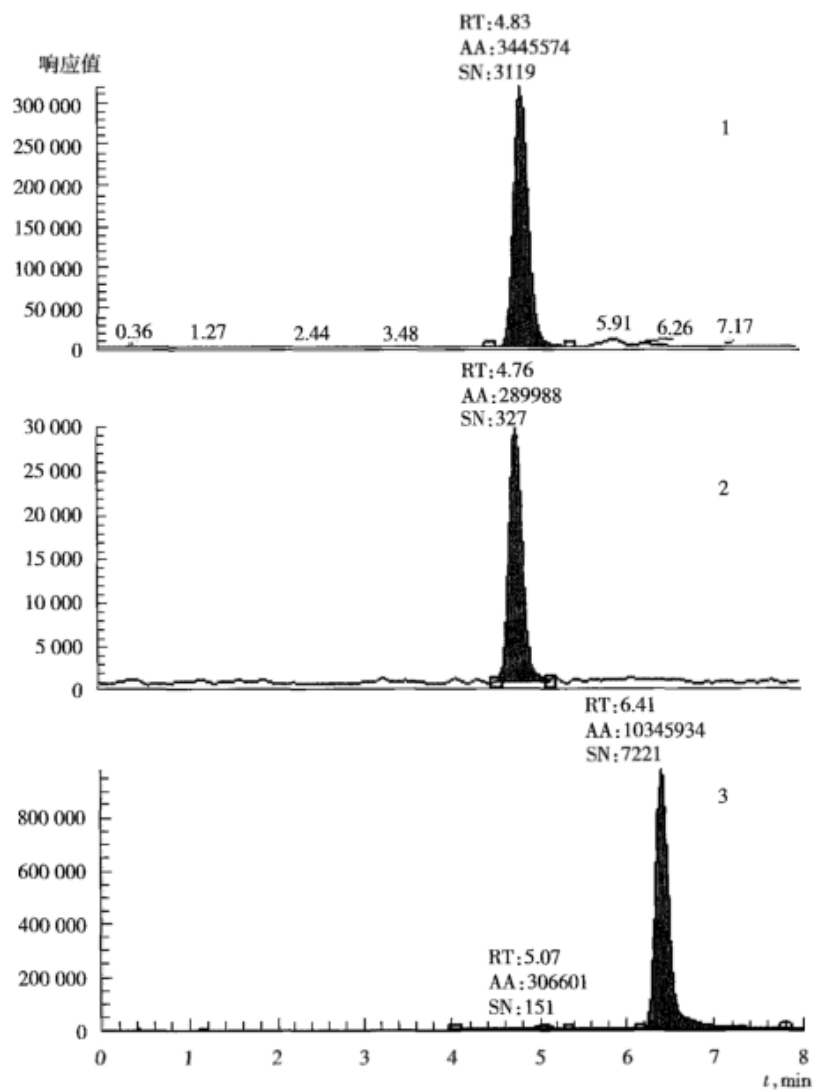
9 重复性

在重复性条件下，获得的 2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于这 2 个值的算术平均值的 20%。

附 录 A
(资料性附录)

肾上腺素和异丙肾上腺素标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图

肾上腺素和异丙肾上腺素标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图见图 A. 1。



说明:

1——肾上腺素;

2——肾上腺素-D6;

3——异丙肾上腺素。

图 A. 1 肾上腺素和异丙肾上腺素标准溶液(浓度为 100 μg/L)的液相色谱-串联质谱离子流色谱图