

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3479—2019

饲料中氢溴酸常山酮的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of halofuginone hydrobromide in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

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:辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心。

本标准主要起草人:王丽娜、田晓玲、刘凯、张明、张秀芹、李欣南、李永才、刘笑、陈玉艳、张天姝。

饲料中氢溴酸常山酮的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中氢溴酸常山酮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氢溴酸常山酮的测定。

本标准的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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。凡是注明日期的引用文件, 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

试样用乙腈提取, 经过除脂净化后用液相色谱-串联质谱法测定, 内标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定, 本方法仅用分析纯试剂。

4.1 水: GB/T 6682, 一级。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 甲醇: 色谱纯。

4.4 正己烷。

4.5 50%甲醇溶液: 量取甲醇 50 mL, 加水至 100 mL, 混匀。

4.6 0.1%甲酸溶液: 量取甲酸 1 mL, 加入 999 mL 水, 混匀。

4.7 氢溴酸常山酮储备溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取氢溴酸常山酮标准品(CAS 号: 64924-67-0, 纯度 $\geq 99.0\%$) 10 mg(精确至 0.000 01 g)至 50 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇溶液溶解并定容至刻度, 摇匀。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 有效期为 3 个月。

4.8 氢溴酸常山酮- $^{13}\text{C}_6$ 内标储备溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取氢溴酸常山酮- $^{13}\text{C}_6$ 内标标准品 10 mg(精确至 0.000 01 g), 至 50 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇溶液溶解并定容至刻度, 摇匀。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 有效期为 3 个月。

4.9 氢溴酸常山酮标准中间溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确吸取 5 mL 的标准储备溶液(4.7), 至 100 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇溶液稀释并定容至刻度, 摇匀。临用现配。

4.10 氢溴酸常山酮- $^{13}\text{C}_6$ 内标中间溶液(1 000 ng/mL): 准确吸取 250 μL 氢溴酸常山酮- $^{13}\text{C}_6$ 内标储备溶液(4.8), 至 50 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇溶液稀释并定容至刻度, 摇匀。临用现配。

4.11 标准曲线的配制: 准确吸取氢溴酸常山酮标准中间溶液(4.9)和内标中间溶液(4.10)适量, 用 50%甲醇溶液(4.5)稀释配制成氢溴酸常山酮浓度为 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL 的标准工作溶液, 内标浓度均为 50 ng/mL。临用现配。

4.12 微孔滤膜: 孔径 0.22 μm , 有机相。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪: 配电喷雾离子源。

5.2 天平:感量 0.000 01 g 和感量 0.001 g。

5.3 离心机:转速不低于 10 000 r/min。

5.4 涡旋仪。

5.5 氮吹仪。

6 样品

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.42 mm 孔径的样品筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g(准确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,准确加入内标中间溶液(4.10) 100 μ L,加入乙腈(4.2)20 mL,涡旋 60 s,于 10 000 r/min 离心 5 min,将全部上清液转移至另一离心管中,加入 5 mL 正己烷(4.4),涡旋 30 s,于 10 000 r/min 离心 5 min。弃去上层溶液,将下层溶液 50℃氮气吹干,准确加入 50%甲醇(4.5)溶液 2 mL 溶解后,再加入 5 mL 正己烷(4.4),涡旋 30 s,10 000 r/min 离心 5 min。弃去上层溶液,取下层溶液过 0.22 μ m 滤膜过滤,上机测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} ,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μ m,或其他性能相当者。

柱温:40℃。

进样量:10 μ L。

流速:0.3 mL/min。

流动相:A 为甲醇(4.3);B 为 0.1%甲酸水溶液(4.6),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0.00	5	95
1.00	5	95
3.00	95	5
3.50	95	5
5.00	5	95

7.2.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

监测方式:多反应监测。

扫描方式:正离子扫描。

电离电压:3.2 kV。

离子源温度:120℃。

雾化气温度:350℃。

锥孔气流速:50 L/h。

雾化气流速:650 L/h。

药物定性定量离子对、碰撞能量见表 2。

表 2 定性定量离子对、碰撞能量

被测物名称	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	碰撞能量,eV
氢溴酸常山酮	414.0>119.5	414.0>138.2	20
	414.0>138.2		20
氢溴酸常山酮- $^{13}C_6$ 内标	420.0>138.2	420.0>138.2	20

7.3 定性测定

在相同的试验条件下,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 $\pm 2.5\%$ 之内,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误差

单位为百分率

相对离子丰度	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤ 10
允许最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4 定量测定

取试样溶液(7.1)和相应浓度的标准工作溶液(4.11)上机测定,得到色谱峰面积响应值。以氢溴酸常山酮峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标、浓度比为横坐标,绘制标准曲线。曲线相关系数不低于0.99。做单点或多点校准,以色谱峰面积比值定量。当待测物浓度高于线性范围内时,重新称取样品加入适量内标,处理,稀释后测定。氢溴酸常山酮标准品及内标物质量色谱图参见附录A。

8 试验数据处理

饲料中氢溴酸常山酮含量以质量分数 w 计,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(1)计算。

$$w = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A —— 试样溶液中氢溴酸常山酮峰面积;

A'_{is} —— 标准工作溶液中氢溴酸常山酮内标物峰面积;

C_s —— 标准工作溶液中氢溴酸常山酮浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{is} —— 试样中内标物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 溶解残余物所用溶液体积,单位为毫升(mL);

A_{is} —— 试样溶液中内标物峰面积;

A_s —— 标准工作溶液中氢溴酸常山酮峰面积;

C'_{is} —— 标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

m —— 试样的质量,单位为克(g)。

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 精密度

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得超过其算术平均值的20%。

附录 A
(资料性附录)

氢溴酸常山酮标准品及内标物质量色谱图

氢溴酸常山酮标准品及内标物质量色谱图分别见图 A.1、图 A.2、图 A.3。

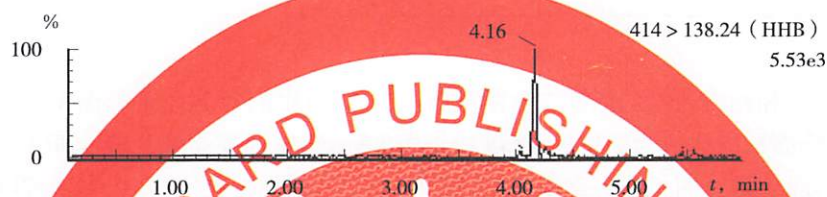


图 A.1 氢溴酸常山酮标准品定量离子质量色谱图(50 µg/L)

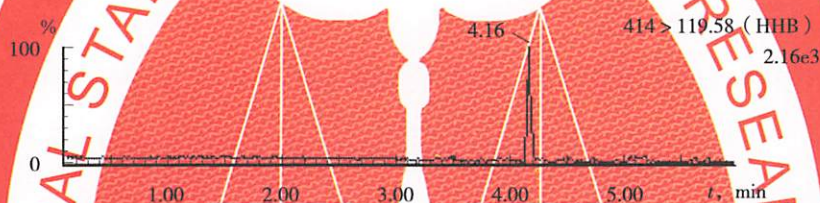


图 A.2 氢溴酸常山酮标准品定性离子质量色谱图(50 µg/L)

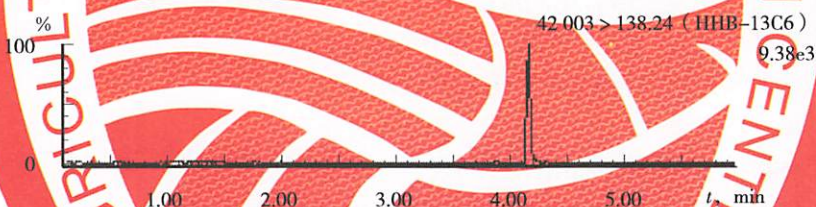


图 A.3 氢溴酸常山酮内标物质量色谱图(50 µg/L)

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
饲料中氢溴酸常山酮的测定
液相色谱-串联质谱法

NY/T 3479—2019

* * *

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

2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4844

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 3479—2019