

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 914—2022

代替 NY/T 914—2004

饲料中氢化可的松的测定

Determination of hydrocortisone in feeds

2022-07-11 发布

2022-10-01 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。

本文件代替 NY/T 914—2004《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》，与 NY/T 914—2004 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了方法的适用范围(见第1章,2004版的第1章)；
- b) 更改了高效液相色谱法的检出限,增加了定量限(见第1章,2004版的第1章)；
- c) 更改了原理的表述(见第4章,2004版的第3章)；
- d) 增加了试样净化步骤(见4.5.2)；
- e) 更改了检测波长(见4.5.3.1,2004版的7.2.1)；
- f) 增加了液相色谱-串联质谱法(见第5章)。

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：张静、赵立军、李云、王宇萍、岳琴、晁娟娟、廖峰、程传民、蒋刘柱。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2004年首次发布的为 NY/T 914—2004；

——本次为第一次修订。

饲料中氢化可的松的测定

1 范围

本文件规定了饲料中氢化可的松的高效液相色谱和液相色谱-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氢化可的松的测定。

本文件高效液相色谱法配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 0.5 mg/kg,定量限为 1.0 mg/kg; 添加剂预混合饲料的检出限为 1.0 mg/kg,定量限为 2.0 mg/kg。液相色谱-串联质谱法配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 2 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 5 $\mu\text{g/kg}$; 添加剂预混合饲料的检出限为 4 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

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 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中的氢化可的松用甲醇提取,经石墨化炭黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化,高效液相色谱仪测定,外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2.2 甲醇:色谱纯。

4.2.3 乙腈:色谱纯。

4.2.4 二氯甲烷:色谱纯。

4.2.5 淋洗液:甲醇+水=50+50。

4.2.6 洗脱液:二氯甲烷+甲醇=10+90。

4.2.7 30%乙腈溶液:30 mL 乙腈加水稀释至 100 mL,混匀。

4.2.8 标准储备溶液(1.0 mg/mL):准确称取氢化可的松标准品(CAS 号:50-23-7,纯度不低于 97%) 50 mg(精确至 0.01 mg)于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解定容,混匀,于-18℃以下避光保存,有效期为 3 个月。

4.2.9 标准中间溶液(100.0 $\mu\text{g/mL}$):准确移取标准储备溶液(4.2.8)10 mL 于 100 mL 棕色容量瓶,用 30%乙腈溶液(4.2.7)定容,于 2℃~8℃避光保存,有效期为 1 个月。

4.2.10 标准系列工作溶液:准确移取适量体积的标准中间溶液(4.2.9),用 30%乙腈溶液(4.2.7)稀释,配制成浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作溶液,混匀,于 2℃~8℃避光保存,有效期为 1 个月。

4.2.11 石墨化炭黑固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

4.2.12 氨基固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

4.2.13 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

4.3.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

4.3.4 涡旋混合器。

4.3.5 振荡器。

4.3.6 固相萃取装置。

4.3.7 氮吹仪。

4.4 样品

按 GB/T 20195 的规定制备试样,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入密闭容器中,避光保存,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

4.5.1.1 平行做 2 份试验。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料 2 g(精确至 0.000 1 g),置于 50 mL 离心管中,准确加入甲醇(4.2.2)20 mL,涡旋混匀 30 s,振荡提取 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 10 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加入 2 mL 甲醇(4.2.2)溶解残渣,涡旋,再加入 8 mL 水,混匀,备用。

4.5.1.2 平行做 2 份试验。称取添加剂预混合饲料 1 g(精确至 0.000 1 g),置于 50 mL 离心管中,准确加入甲醇(4.2.2)20 mL,涡旋混匀 30 s,振荡提取 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 10 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,准确加入 1 mL 30%乙腈溶液(4.2.7)溶解残渣,涡旋,备用。

4.5.2 净化

4.5.2.1 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料:石墨化炭黑固相萃取柱(4.2.11)依次用 6 mL 二氯甲烷(4.2.4)、6 mL 甲醇(4.2.2)、6 mL 水活化,取备用液(4.5.1.1)全部过柱。用 3 mL 淋洗液(4.2.5)淋洗,抽干。将预先用 6 mL 洗脱液(4.2.6)活化好的氨基固相萃取柱(4.2.12)串接在石墨化炭黑固相萃取柱(4.2.11)下方,6 mL 洗脱液(4.2.6)洗脱,收集洗脱液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,准确加入 1 mL 30%乙腈溶液(4.2.7)溶解,用 0.22 μm 微孔滤膜(4.2.13)过滤后待测。

4.5.2.2 添加剂预混合饲料:取备用液(4.5.1.2)1 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜(4.2.13)过滤后待测。

4.5.3 测定

4.5.3.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,柱内径 4.6 mm,粒径 5 μm ,或性能相当者。

流动相:乙腈+水=30+70。

流速:1.0 mL/min。

柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:20 μL 。

检测波长:245 nm。

4.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列工作溶液(4.2.10)和试样溶液(4.5.2)上机测定。氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图见附录 A。

4.5.3.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中氢化可的松保留时间应与标准系列工作溶液中氢化可的松的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

4.5.3.4 定量

以氢化可的松的标准系列工作溶液的浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准系列工作溶液中氢化可的松的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应将试样溶液用 30%乙腈溶液(4.2.7)稀释(稀释倍数 n)至线性范围内,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中氢化可的松的浓度与标准系列工作溶液浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中氢化可的松的含量以质量分数计,多点校准按公式(1)计算。

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m_1 \times 1000} \times n \quad (1)$$

式中:

ω_1 ——试样中氢化可的松含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_1 ——从标准曲线查得的试样溶液氢化可的松的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 ——上机前最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);

V_1 ——移取上清液体积的数值,单位为毫升(mL);

m_1 ——试样质量的数值,单位为克(g);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

单点校准按公式(2)计算

$$\omega_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V \times V_2 \times 1000}{A_{s1} \times V_1 \times m_1 \times 1000} \times n \quad (2)$$

式中:

ρ_{s1} ——标准溶液中氢化可的松的质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_1 ——试样溶液中氢化可的松色谱峰面积;

A_{s1} ——标准溶液中氢化可的松的色谱峰面积。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

4.7 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 10%。

5 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样中的氢化可的松用甲醇提取,经石墨化炭黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2.2 甲醇:色谱纯。

5.2.3 乙腈:色谱纯。

5.2.4 二氯甲烷:色谱纯。

5.2.5 甲酸:色谱纯。

5.2.6 淋洗液:甲醇+水=50+50。

5.2.7 洗脱液:二氯甲烷+甲醇=10+90。

5.2.8 30%乙腈溶液:30 mL 乙腈加水稀释至 100 mL,混匀。

5.2.9 0.1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,加水稀释至 1 L,混匀。

5.2.10 标准储备溶液(1.0 mg/mL):准确称取氢化可的松标准品(CAS号:50-23-7,纯度不低于97%) 50 mg(精确至0.01 mg)于50 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解定容,混匀,于-18℃以下避光保存,有效期为3个月。

5.2.11 标准中间溶液(10.0 μg/mL):准确移取标准储备溶液(5.2.10)1 mL于100 mL棕色容量瓶,用甲醇定容,于2℃~8℃避光保存,有效期为1个月。

5.2.12 石墨化炭黑固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

5.2.13 氨基固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

5.2.14 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平:感量0.1 mg和0.01 mg。

5.3.3 离心机:转速不低于8 000 r/min。

5.3.4 涡旋混合器。

5.3.5 振荡器。

5.3.6 固相萃取装置。

5.3.7 氮吹仪。

5.4 样品

按GB/T 20195的规定制备试样,至少200 g,粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,避光保存,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,作为空白样品。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

5.5.1.1 平行做2份试验。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料2 g(精确至0.000 1 g),置于50 mL离心管中,准确加入甲醇(5.2.2)20 mL,涡旋混匀30 s,振荡提取15 min,8 000 r/min离心5 min,准确移取上清液10 mL,于50℃下氮气吹干,加入2 mL甲醇(5.2.2)溶解残渣,涡旋,再加入8 mL水,混匀,备用。

5.5.1.2 平行做2份试验。称取添加剂预混合饲料1 g(精确至0.000 1 g),置于50 mL离心管中,准确加入甲醇(5.2.2)20 mL,涡旋混匀30 s,振荡提取15 min,8 000 r/min离心5 min,准确移取上清液10 mL,于50℃下氮气吹干,准确加入1 mL 30%乙腈溶液(5.2.8)溶解残渣,涡旋,备用。

5.5.2 净化

5.5.2.1 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料:石墨化炭黑固相萃取柱(5.2.12)依次用6 mL二氯甲烷(5.2.4)、6 mL甲醇(5.2.2)、6 mL水活化,取备用液(5.5.1.1)全部过柱。用3 mL淋洗液(5.2.6)淋洗,抽干。将预先用6 mL洗脱液(5.2.7)活化好的氨基固相萃取柱(5.2.13)串接在石墨化炭黑固相萃取柱(5.2.12)下方,6 mL洗脱液(5.2.7)洗脱,收集洗脱液,于50℃下氮气吹干,准确加入1 mL 30%乙腈溶液(5.2.8)溶解,用0.22 μm微孔滤膜(5.2.14)过滤后待测。

5.5.2.2 添加剂预混合饲料:取备用液(5.5.1.2)1 mL,用0.22 μm微孔滤膜(5.2.14)过滤后待测。

5.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样,按5.5.1和5.5.2处理得到空白残余物,用30%乙腈溶液(5.2.8)稀释标准中间溶液(5.2.11),配制成2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL标准系列溶液,各取1.0 mL溶解空白残余物,配制成浓度为2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL基质匹配标准系列溶液。

5.5.4 测定

5.5.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈柱, 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 2.4 μm, 或性能相当者。
柱温: 30 ℃。
流速: 0.3 mL/min。
进样量: 5 μL。
流动相 A: 乙腈(5.2.3); 流动相 B: 0.1% 甲酸溶液(5.2.9)。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A 相, %	B 相, %
0.00	20	80
5.00	50	50
7.00	90	10
7.01	20	80
10.00	20	80

5.5.4.2 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 ℃。
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 氢化可的松的多反应监测(MRM)离子对、碎裂电压和碰撞能量参考值

被测物名称	监测离子对, <i>m/z</i>	碎裂电压, V	碰撞能量, eV
氢化可的松	362.9/120.9 ^a	100	20
	362.9/308.9	100	15
^a 定量离子对。			

5.5.4.3 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(5.5.3)和试样溶液(5.5.2)上机测定。氢化可的松基质匹配标准溶液的定性定量离子色谱图见附录 B。

5.5.4.4 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氢化可的松的保留时间相对偏差应在 ±2.5% 之内。根据表 2 选择的定性离子对, 比较试样谱图中氢化可的松定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度, 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氢化可的松。

表 3 定性测定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(含)	>10~20(含)	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

5.5.4.5 定量

以氢化可的松基质匹配标准系列溶液的浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中氢化可的松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 30% 乙腈溶液(5.2.8)稀释(稀释倍数 *n*)至线性范围内, 重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中氢化可的松的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中氢化可的松的含量以质量分数计,多点校准按公式(3)计算。

$$\omega_2 = \frac{\rho_2 \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- ω_2 ——试样中氢化可的松含量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 - ρ_2 ——由标准曲线得到的试样溶液中氢化可的松质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - m_2 ——试样质量的数值,单位为克(g)。
- 单点校准按公式(4)计算。

$$\omega_2 = \frac{A_2 \times \rho_{s2} \times V \times V_2 \times 1000}{A_{s2} \times V_1 \times m_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

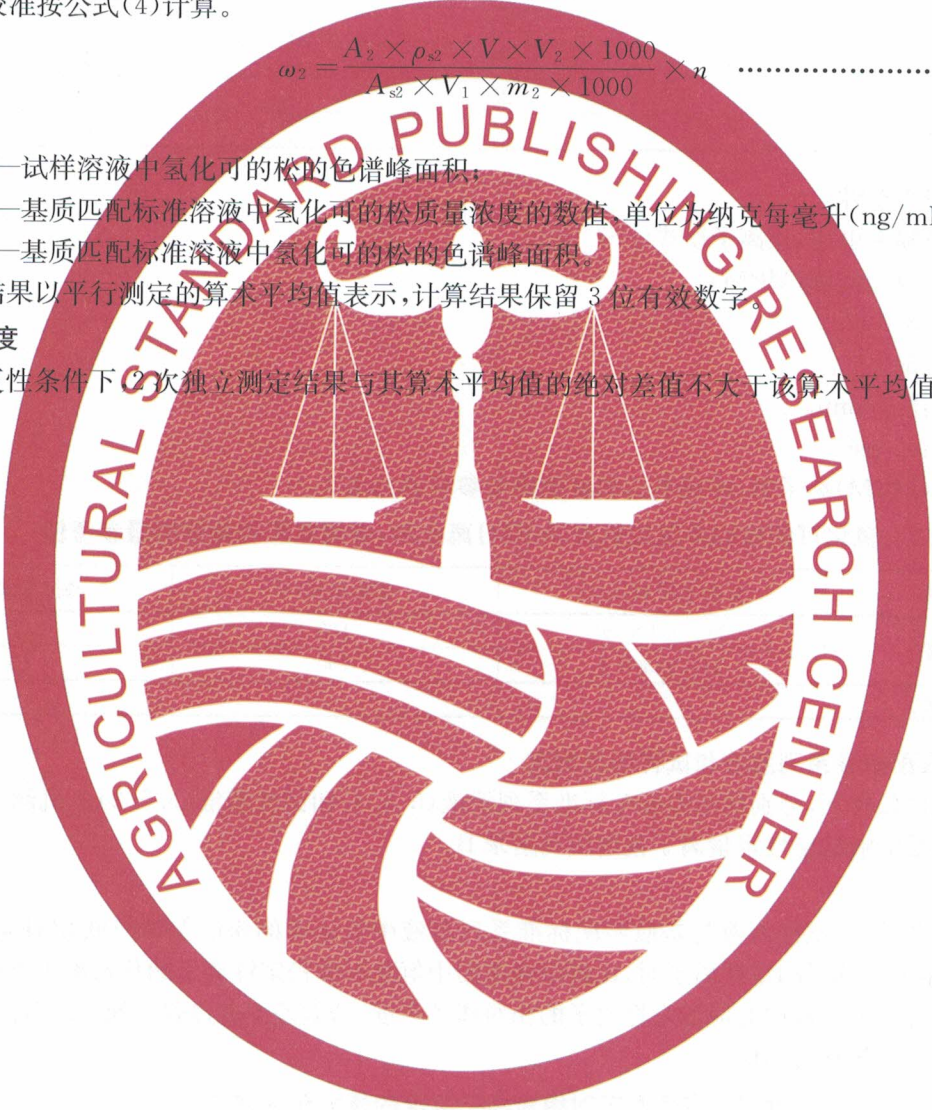
式中:

- A_2 ——试样溶液中氢化可的松的色谱峰面积;
- ρ_{s2} ——基质匹配标准溶液中氢化可的松质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_{s2} ——基质匹配标准溶液中氢化可的松的色谱峰面积。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字

5.7 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)

氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图

氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图见图 A.1。

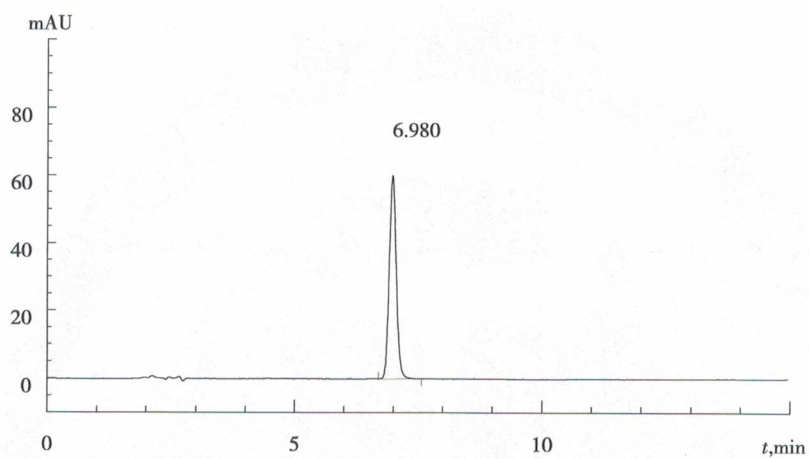


图 A.1 氢化可的松标准溶液(5.0 $\mu\text{g/mL}$)的高效液相色谱图

附录 B
(资料性)

氢化可的松基质匹配标准溶液的定性定量离子对色谱图

氢化可的松基质匹配标准溶液的定性定量离子对色谱图见图 B. 1。

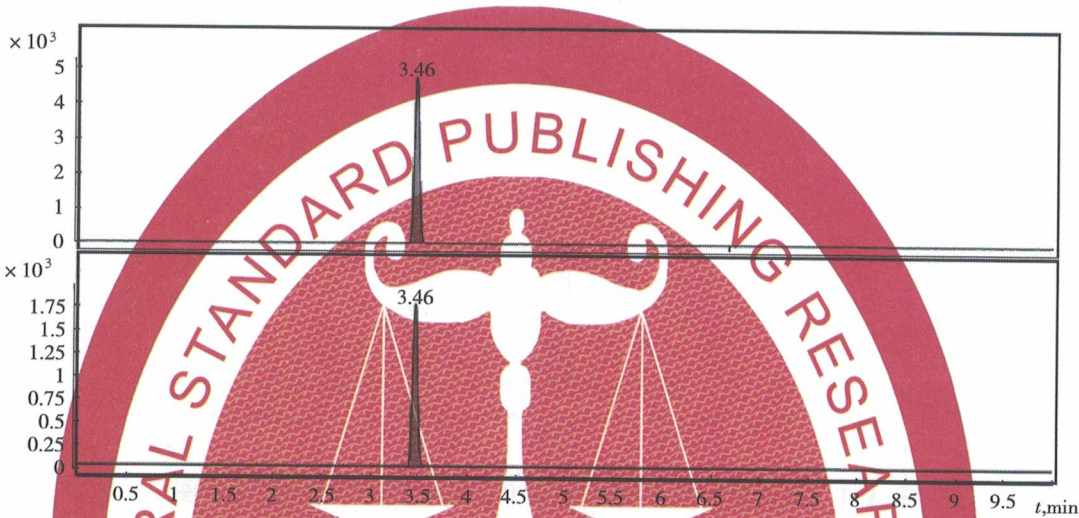


图 B. 1 氢化可的松基质匹配标准溶液(50 ng/mL)的定性定量离子对色谱图

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
饲料中氢化可的松的测定
NY/T 914—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

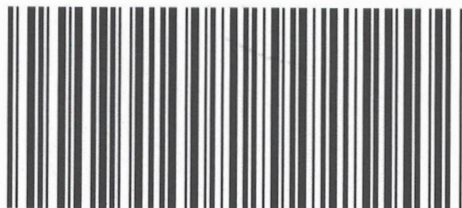
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2022 年 8 月第 1 版 2022 年 8 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·9087

定价: 32.00 元



NY/T 914—2022

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261