

中华人民共和国国家标准

农业部 1862 号公告—1—2012

饲料中巴氯芬的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of baclofen in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2012-12-03 发布

2012-12-03 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 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。

本标准主要起草单位：上海市兽药饲料检测所。

本标准主要起草人：黄土新、王蓓、顾欣、曹莹、李丹妮、严凤、张鑫、吴剑平、张文刚。

饲料中巴氯芬的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中巴氯芬的液相色谱—串联质谱测定方法(LC-MS/MS)。

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巴氯芬的测定。

方法的检出限为 0.01 mg/kg,定量限为 0.02 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

试样经盐酸—甲醇溶液提取,固相萃取净化,洗脱液蒸干后用含 0.2%甲酸的乙腈水溶液溶解,定容,液相色谱—串联质谱法测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级用水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 甲酸:色谱纯。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 盐酸。

4.5 氨水。

4.6 氢氧化钠。

4.7 0.1 mol/L 盐酸:取盐酸 9 mL,用水定容至 1 000 mL。

4.8 0.2%甲酸溶液:取 1 mL 甲酸,用水定容至 500 mL。

4.9 0.2%甲酸乙腈水溶液:取 0.2%甲酸溶液 80 mL,与 20 mL 乙腈混合。

4.10 盐酸甲醇提取液:取 0.1 mol/L 盐酸 50 mL,加入甲醇 50 mL 混匀。

4.11 5%氨水甲醇溶液:取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。

4.12 1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠 40 g,用水溶解并稀释至 1 L,混匀即得。

4.13 巴氯芬标准品:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.14 巴氯芬标准贮备液配制:精密称取巴氯芬标准品 10 mg,加 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶解,甲醇定容至 10 mL,配成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液,4℃保存,有效期 6 个月。

4.15 巴氯芬中间液:准确量取巴氯芬标准贮备液 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。

该溶剂中巴氯芬的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 4℃保存, 有效期 1 个月。

4. 16 巴氯芬标准工作液: 准确量取巴氯芬中间液适量, 置于容量瓶中, 用 0. 2% 甲酸乙腈水溶液分别稀释成巴氯芬浓度为 0. 5 $\mu\text{g/L}$ 、1. 0 $\mu\text{g/L}$ 、5. 0 $\mu\text{g/L}$ 、10. 0 $\mu\text{g/L}$ 和 50. 0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作液, 现配现用。

4. 17 固相萃取小柱: 混合型阳离子交换柱, 60 mg/3 mL; 或其他性能类似的小柱。

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 天平: 感量为 0. 000 01 g 和 0. 01 g 各一台。

5. 3 旋转蒸发仪或氮吹仪。

5. 4 离心机: 最大离心力不低于 8 000 g。

5. 5 振荡器。

5. 6 旋涡振荡器。

5. 7 滤膜: 0. 22 μm , 水系。

6 试样制备

按 GB/T 14699. 1 采样。选取有代表性的饲料样品至少 500 g, 按 GB/T 20195 制备试样, 粉碎过 0. 45 mm 孔径筛, 充分混匀, 装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7. 1 提取

称取饲料样品 2 g (精确至 0. 01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 20. 0 mL 盐酸甲醇提取液, 充分振荡 20 min, 离心 10 min (离心力 8 000 g), 上清液备用。

7. 2 净化

固相萃取小柱先依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。取备用液 2. 0 mL 过柱, 依次用 2 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗。用 5% 氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱、挤干, 收集洗脱液, 旋转蒸发 (60℃) 至干或在氮吹装置上 60℃ 下氮气吹干。准确加入 1. 0 mL 0. 2% 甲酸乙腈水溶液溶解, 过 0. 22 μm 滤膜后上机测定。若样品液中含有的药物浓度超出线性范围, 进样前用一定体积的 0. 2% 甲酸乙腈水溶液稀释, 使稀释后上机液中的药物浓度在线性范围内。

7. 3 样品测定

7. 3. 1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱长 100 mm, 内径 3. 0 mm, 粒径 1. 8 μm ; 或其他效果等同的 C_{18} 柱。

柱温: 30℃。

进样量: 10 μL 。

流动相: A: 乙腈; B: 0. 2% 甲酸溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

流速: 0. 3 mL/min。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	乙腈, A %	0. 2% 甲酸溶液, B %
0. 00	20	80
2. 00	50	50

表 1 (续)

时间 min	乙腈, A %	0.2%甲酸溶液, B %
3.00	50	50
3.50	80	20
4.00	80	20
5.00	20	80

7.3.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾正离子源。

检测方式:多反应监测(MRM)。

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

毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最佳灵敏度。

定性离子对、定量离子对及对应的保留时间、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 巴氯芬定性、定量离子对、锥孔电压、保留时间和碰撞能量参考值

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	保留时间 min	碰撞能量 eV
巴氯芬	214.1>179.0	214.1>151.0	22	2.22	14
	214.1>151.0				18

7.3.3 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标准工作液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且样品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液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较,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 %

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,将标准工作液进样,以标准工作液中被测组分峰面积为纵坐标,被测组分浓度为横坐标绘制工作曲线,用单点或工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在标准曲线测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,巴氯芬标准品的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

试样中巴氯芬的含量(X)以质量分数计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{C_s \times A \times V_1 \times V_2}{A_s \times m \times V_3 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m ——试样的称样量,单位为克(g);

C_s ——标准工作液浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

A ——样品溶液的色谱峰面积;

A_s ——标准工作液色谱峰面积;

V_1 ——试样中加入提取液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——上机前最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——提取液加入 SPE 小柱的体积,单位为毫升(mL);

n ——测试样品稀释倍数。

8.2 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 20%。

附录 A

(资料性附录)

巴氯芬的液相色谱—串联质谱图

巴氯芬标准品的多反应监测(MRM)色谱图见图 A. 1。

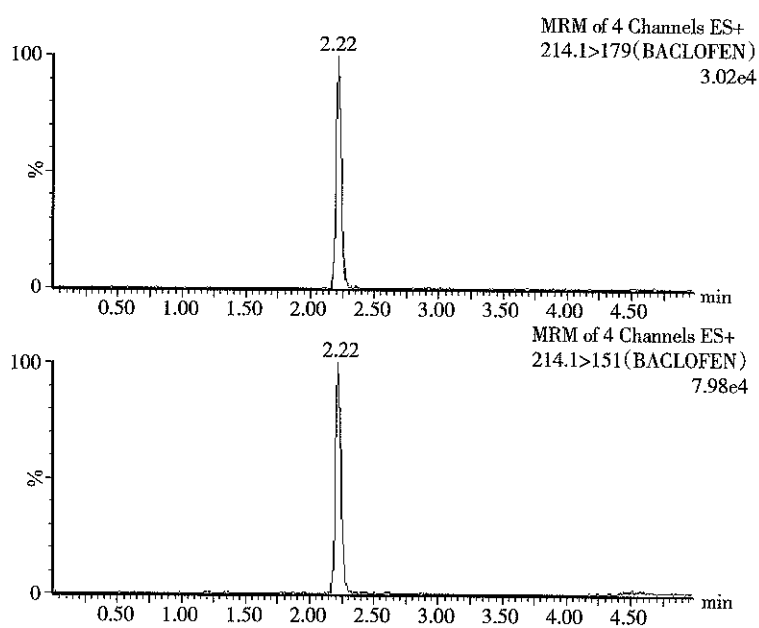


图 A. 1 标准溶液(10 µg/L)的色谱图