

中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—6—2014

饲料中硫酸黏杆菌素的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of colistin sulfate in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2014-04-01 发布

2014-07-01 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：中国畜牧兽医学会饲料工业分会。

本标准主要起草人：肖希龙、汤树生、毕延峰、程林丽、张素霞、沈建忠。

饲料中硫酸黏杆菌素的测定

液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中硫酸黏杆菌素含量测定的液相色谱—串联质谱方法。
本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中硫酸黏杆菌素含量的测定。
本方法硫酸黏杆菌素的检测限为 0.01 mg/kg, 定量限为 0.03 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 方法提要

饲料中的硫酸黏杆菌素经三氯乙酸溶液提取, 同时用乙酸铅沉淀蛋白, 再经 HLB 固相萃取柱净化, 浓缩后采用液相色谱—串联质谱法检测, 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 中规定的一级水。

- 4.1 硫酸黏杆菌素标准品(Colistin Sulfate): 纯度 $\geq 97\%$ 。
- 4.2 乙腈: 色谱纯。
- 4.3 甲醇: 色谱纯。
- 4.4 甲酸: 分析纯(样品前处理用)和色谱纯(仪器检测时配流动相用)。
- 4.5 三氯乙酸。
- 4.6 乙酸铅。
- 4.7 2%和 4%三氯乙酸溶液: 分别准确称取 20 g 和 40 g 三氯乙酸(4.5), 分别用水溶解至 1 000 mL。
- 4.8 4%乙酸铅溶液: 准确称取 40 g 乙酸铅(4.6), 用水溶解至 1 000 mL。
- 4.9 0.1%甲酸水溶液: 准确量取 1 mL 分析纯的甲酸(4.4), 用水稀释至 1 000 mL。
- 4.10 硫酸黏杆菌素标准储备液(1 mg/mL): 准确称取硫酸黏杆菌素标准品(4.1) 10 mg(精确到 0.000 1 g), 用 0.1%甲酸水溶液(4.9)溶解定容到 10 mL, 4℃保存, 有效期 6 个月。
- 4.11 硫酸黏杆菌素标准储备液 I (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确量取适量的 1 mg/mL 标准储备液(4.10), 用 0.1%甲酸水溶液(4.9)稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, 4℃保存, 有效期 6 个月。
- 4.12 硫酸黏杆菌素标准储备液 II (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确量取适量的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液(4.11), 用 0.1%甲酸水溶液(4.9)稀释成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列硫酸黏杆菌素标准溶液, 4℃保存, 有效期 6 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 超高效液相色谱—串联质谱联用仪: 配电喷雾离子源。

- 5.2 超声仪。
- 5.3 旋涡混合器。
- 5.4 氮吹仪。
- 5.5 高速离心机。

- 5.6 天平:感量 0.01 g。
- 5.7 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.8 HLB 固相萃取柱:规格为 500 mg/6 mL。
- 5.9 固相萃取装置。
- 5.10 0.22 μm 有机滤膜。

6 采样与试样制备

按 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 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 提取

称取配合饲料或浓缩饲料 5 g(精确到 0.01 g),或预混合饲料 2 g(精确到 0.01 g)于 100 mL 离心管中,加入 4%三氯乙酸溶液(4.7)25 mL 和 4%乙酸铅溶液(4.8)25 mL,超声提取 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,转移上清液备用,为总提取液。

7.1.2 净化

依次用甲醇(4.3)5 mL、水 5 mL、2%三氯乙酸溶液(4.7)5 mL 活化 HLB 固相萃取柱,准确量取提取液(为分取液:配合饲料 10 mL、浓缩饲料 5 mL、预混合饲料 1 mL)过柱,用 2%三氯乙酸溶液(4.7)5 mL 淋洗 2 次,负压抽干残余的水分,用甲醇(4.3)10 mL 洗脱药物。将洗脱液在 30°C 水浴中氮气吹干,加入 0.1%甲酸水溶液(4.9)1.0 mL 溶解残留物,为净化液。经 0.22 μm 滤膜过滤后,供液相色谱—串联质谱仪测定。

7.2 基质匹配标准工作液的制备

准确移取硫酸黏杆菌素标准溶液(4.12)适量,分别加入 6 份空白样品中。经提取、净化及浓缩后,加 0.1%甲酸水溶液(4.9)定容至 1 mL,充分混匀,制得浓度为 10 ng/mL、30 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、5 000 ng/mL 的基质匹配标准工作液,现配现用。

7.3 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm ;或相当者。

流动相:A 为 0.1%甲酸乙腈溶液,B 为 0.1%甲酸水溶液。

流速:0.4 mL/min。

进样量:10 μL 。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 (续)

序号	时间, min	A, %	B, %
4	4.0	90	10
5	5.5	2	98

7.4 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源,正离子模式。

检测方式:多反应监测(MRM)。

毛细管电压:1.5 kV。

源温度:120℃。

去溶剂温度:350℃。

二级碰撞气:氦气。

锥孔气流速:50 L/h。

去溶剂气流速:600 L/h。

硫酸黏杆菌素的特征离子对及其相应的锥孔电压、碰撞电压见表 2。

表 2 硫酸黏杆菌素的特征离子对、锥孔电压和碰撞能量

分析物	特征离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
硫酸黏杆菌素 A	390.8>384.9	390.8>384.9	25	12
	390.8>379.1			13
硫酸黏杆菌素 B	386.2>380.2	386.2>380.2	25	12
	386.2>374.4			12

7.5 定性测定

在相同试验条件下,样品中待测物的保留时间与标准工作液的保留时间偏差在±2.5%之内,并且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近标准工作液中对应的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偏差

单位为百分率				
相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.6 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液,做单点校准或多点校准,以色谱峰面积的积分值定量。标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。试样液进样过程中

V ——净化液体积,单位为毫升(mL);

m ——样品的质量,单位为克(g);

V_1 ——分取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——总提取液体积,单位为毫升(mL)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,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与这两个测定值算术平均值的绝对差值不大于该平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

硫酸黏杆菌素基质匹配标准溶液特征离子色谱图

硫酸黏杆菌素基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 A.1。

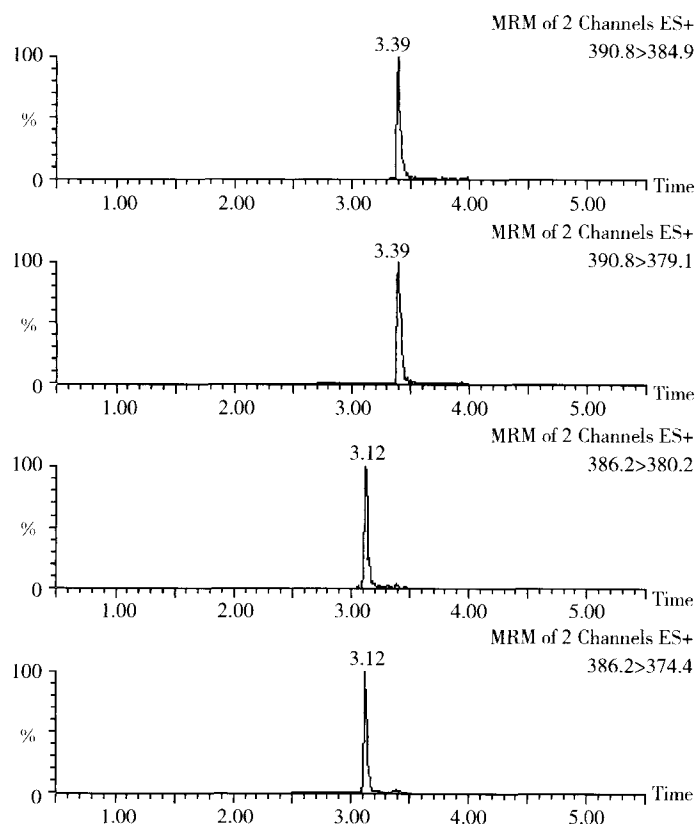


图 A.1 硫酸黏杆菌素基质匹配标准溶液(10 ng/mL)特征离子质量色谱图

注:硫酸黏杆菌素 A:390.8>384.9,390.8>379.1;硫酸黏杆菌素 B:386.2>380.2,386.2>374.4。