

中华人民共和国农业农村部公告

第 312 号

根据《兽药管理条例》《饲料和饲料添加剂管理条例》规定,我部组织制定了《饲料中风险物质的筛查与确认导则 液相色谱-高分辨质谱法(LC-HRMS)》标准,现予发布,自发布之日起实施。

特此公告。

附件: 饲料中风险物质的筛查与确认导则 液相色谱 - 高分辨质谱法(LC-HRMS)

农业农村部

2020 年 7 月 3 日

饲料中风险物质的筛查与确认导则

液相色谱-高分辨质谱法(LC-HRMS)

1 范围

本导则确立了饲料、饲料添加剂和饲料原料中药物等风险物质的筛查与确认程序,规定了用液相色谱-高分辨质谱仪筛查确认程序的步骤以及步骤之间的判定条件,描述了筛查确认的方法。

2 筛查准备

2.1 仪器要求

本导则中所使用的高分辨质谱仪在执行目标物筛查确认程序时应符合实际分辨率不小于 20000[质荷比(m/z)等于 200,按半峰宽(FWHM)计],质量准确性相对偏差不大于 5 ppm(m/z 等于 200)的基本要求;在同时执行非目标物分析程序时应符合实际分辨率不小于 70000(m/z 等于 200,按 FWHM 计),质量准确性相对偏差不大于 3 ppm(m/z 等于 200)的基本要求。仪器应定期进行校准调谐,确保筛查过程中处于正常工作状态,达到以上要求。

2.2 目标化合物列表(库)

化合物列表(库)应包含化合物中英文通用名称、分子式、化学文摘社(CAS)号、主要母离子(分子离子、质子化离子/去质子化

离子或加成离子)的精确质荷比、2个以上特征碎片离子的精确质荷比。如有参考标准品,应在特定色谱条件下,通过实际进样分析获得列表中化合物的准确信息、保留时间和特征碎片离子的相对丰度比。

3 筛查流程

高分辨质谱筛查与确认饲料中添加物质的流程包含:样品前处理、目标物筛查、目标物确认、非目标物筛查等,具体流程见图1。

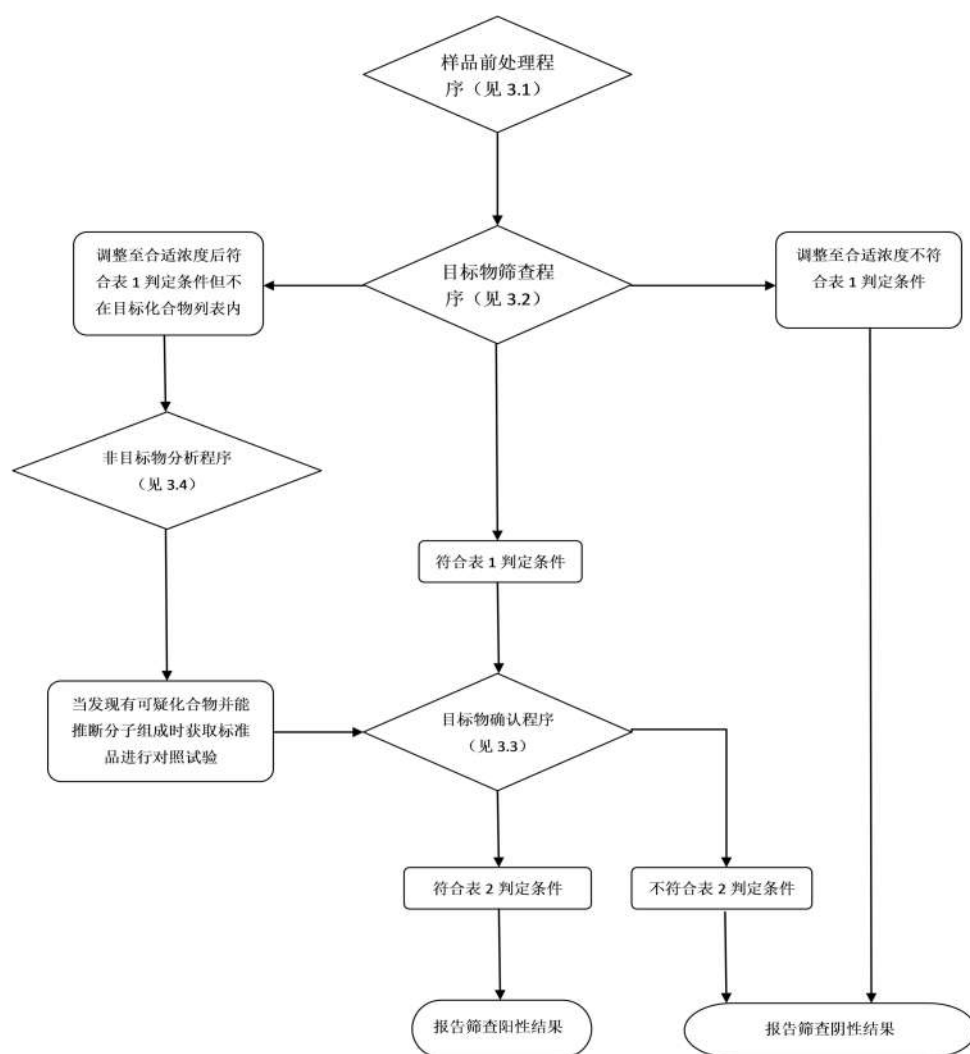


图1 高分辨质谱筛查确认饲料中添加物质流程图

3.1 样品前处理程序

一般包含提取、净化、稀释(或富集)等操作,原则上应尽可能涵盖、兼顾多种(类)化合物,前处理方法应与样品基质和目标化合物的性质相匹配。单个化合物的回收率不作严格要求。前处理参考条件见附录。

3.2 LC-HRMS 工作条件的确定

3.2.1 色谱条件的确定

色谱条件(色谱柱、流动相和梯度洗脱程序等)的确定原则:

(1)在可接受的单针分析时间内,在进样溶液中获得尽可能多的、各组分能充分分离的、且更适合质谱定性检测的总离子流色谱图。

(2)流动相应尽可能有利于被测成分的离子化,以获取足够的信号响应。

(3)目标分析物的可接受的最短保留时间应至少是色谱柱死时间的2倍。

对此,提出的色谱参考条件见附录。

3.2.2 质谱条件的确定

高分辨质谱筛查方法的质谱工作条件设定原则:

(1)有利于准确获取样品中尽可能多的化合物的精确质量数信息,包括可能分子离子(包括质子化离子、去质子化离子)、加成离子(Adduct)和同位素组成的离子簇和碎片离子。

(2) 有利于获取足够信息的仪器采集频率。

(3) 有利于在检测限水平以上获取足够的信号响应。

(4) 有利于获取足够数量的碎片离子。

参考质谱的工作条件见附录。

3.3 目标物筛查确认程序

3.3.1 目标物筛查

将质量数提取窗口 (MEW) 调整至一级母离子为 10 ppm, 二级子离子为 20 ppm, 对全扫描所获得的总离子流图进行提取, 选择可辨识的色谱 (质谱) 峰, 将其与经验证的目标化合物列表 (库) 中的化合物信息进行对比。

对比结果符合表 1 中所示条件时, 可认为筛查到疑似阳性样品 (目标化合物), 须进入目标物确认程序, 否则应视情况进入非目标物筛查程序或直接判为阴性。

表 1 目标物筛查判定条件

判别项	判定条件
采样点数	单个目标物峰不少于 5 个采样点
信号响应要求	1) 信噪比 (S/N) 存在时, 应使 $S/N \geq 3$ 2) 当 S/N 不存在时, 以 95% 置信度水平上可准确定性该化合物的最低检测浓度作为检测限
质量准确性	1) 一级母离子 $m/z \geq 200$ 时, 其相对偏差应 ≥ 10 ppm; 2) 一级母离子 $m/z < 200$ 时, 其绝对偏差应 < 1 mDa;

3.3.2 目标物确认

筛查到疑似阳性样品(目标化合物),进入目标物确认程序后,应使用参考标准品与样品进行对照实验,需要注意:

(1)参考标准品浓度应与样品中目标物浓度接近。

(2)如能获得与样品相似的空白基质,应将其添加在基质中进行实验,如不能获得则可进行样品添加标准品实验。将质量数提取窗口(MEW)调整至一级母离子为 5 ppm,二级子离子为 10 ppm,对全扫描所获得的总离子流图进行提取,选择可辨识的色谱(质谱)峰,对照实验结果符合表 2 所示条件、碎片相对离子丰度比同时满足表 3 要求时,应确认为阳性,否则为阴性。

表 2 目标物确认判定条件

判别项	判定条件
保留时间	化合物的保留时间应至少大于死时间的 2 倍。目标物与参考标准品以相同条件测定所获保留时间的绝对偏差应不大于 0.2 min。
质量准确性	一级母离子的 m/z 相对偏差 ≥ 5 ppm; 二级子离子的 m/z 相对偏差 ≥ 10 ppm; 当 $m/z < 200$ 时,其绝对偏差应 < 1 mDa。
同位素峰	应将确认样品调整至适当的进样浓度确保主要同位素峰可测,同位素峰的 m/z 应符合目标物确认的质量准确性要求。
碎片相对离子丰度比	比较二级碎片质谱图,其主要碎片离子有 2 个或 2 个以上符合表中质量准确性要求,且其相对离子丰度比符合表 3 的最大允许偏差要求。

表 3 定性确认时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度(%)	≥50	20 ~ 50	10 ~ 20	≤10
允许的最大偏差(%)	±20	±25	±30	±50

3.4 非目标物的筛选与确证

选择可辨识的色谱(质谱)峰进行评估,结合提取离子流色谱(EIC)图提取的色谱(质谱)峰和一级全扫描质谱图,确定该非目标物的精确质荷比以及同位素峰的相对离子丰度比,通过获取的精确质量数信息推断元素组成与分子式,对该分子式进行检索推断可能的化合物,获取相应的参考标准品,按目标物确认要求进行确认。

在非目标物分析程序中,要注意以下几点:

(1) 色谱条件应在合理范围内进行优化,以尽可能多地保留和分离化合物。

(2) 质量数提取窗口(MEW)的选择应根据所使用的仪器分辨率进行调整,当基质干扰不强又需要防止漏筛时可以将其调整至高于 20 ppm,而当背景干扰严重为避免一些质荷比接近的杂质干扰时,可将其调整至低于 5ppm。

(3) 在非目标物分析中可以使用一些软件自带的去卷积算法、条件峰值选取、扣除背景算法等。

(4) 如果采用轮廓图(Profile)记录质谱原始数据,则应注意质谱峰形,任何肩峰都意味着有可能存在质荷比接近的杂质干扰,可

进一步提高色谱分离或质谱分辨率进行分析。

(5) 分子式的推断可以根据不同厂商提供的软件来实现,要符合一定的化合物构成基本原则。

4 结果表述

筛查结果中应注明前处理方法与高分辨质谱仪器条件。对于已得到参考标准品确认的化合物,应补充相应的筛查检测限,其含量值应选择或建立定量方法进行测定,对于有定量需求的目标化合物应另行使用现有标准或经过验证的自建方法进行定量。对于无法得到确认的化合物应给出特征离子的精确质量数,通知其他实验室予以关注、尽可能收集更多信息进一步确认。

附录:参考条件

附录

参考条件

1 前处理参考条件

称取试料 2.00 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈:0.1 mol/L 盐酸=1:1 提取溶液,振荡提取 5 min,8000 g 离心 3 min,移取上层清液适量,用 0.1% 甲酸溶液稀释至适当浓度,14000 g 高速离心 4 min,取上清液上机检测。

2 色谱参考条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(100 mm×3.0 mm,粒径 1.8 μm),或效果等同的色谱柱;

柱温:30℃;

进样量:10 μL;

流速:0.3 mL/min;

流动相:A:含 0.1% 甲酸的水溶液;B:含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,梯度洗脱,见表 4。

表 4 梯度洗脱程序表

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
15	5	95
18	5	95
20	95	5
23	95	5

3 质谱参考条件

电离模式:电喷雾电离(ESI+与ESI-);

扫描方式:正、负离子切换扫描或正、负离子分别扫描;

检测方式:全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/ddMS2),或效果相当的其他扫描模式;

脱溶剂气、锥孔气和碰撞气均为纯度高于98%氮气;

毛细管电压:3.2 kV(ESI+)2.8 kV(ESI-);

离子传输管温度:325 °C;

脱溶剂温度:350 °C;

鞘气:40 arb;

辅助气:10 arb;

一级全扫描范围: m/z 100 ~ 1500,分辨率:70000;

碰撞能量:20、40、60 eV。