

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

饲料中 15 种抗球虫药物的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of 15 coccidiostats in feeds—

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××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。

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：××。

本文件主要起草人：××。

饲料中 15 种抗球虫药物的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中15种抗球虫药物的液相色谱-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、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中氨丙啉、氯羟吡啶、磺胺喹噁啉、二硝托胺、乙氧酰胺苯甲酯、地克珠利、尼卡巴嗪、拉沙洛西钠、盐酸氯苯胍、癸氧喹酯、莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素、马杜霉素、海南霉素等15种抗球虫药物的测定。

本文件的检出限为0.05 mg/kg，定量限为0.10 mg/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 原理

试样中的抗球虫药物用甲酸-乙腈溶液提取，经固相萃取柱净化，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 乙酸铵：色谱纯。

5.5 甲酸：色谱纯。

5.6 乙酸铵溶液（5 mmol/L）：称取0.385 g乙酸铵（5.4），加水溶解并定容至1 000 mL，混匀。

5.7 甲酸-乙腈溶液：准确移取1 mL甲酸（5.5）和250 mL水，用乙腈（5.3）定容至1 000 mL，混匀。

5.8 标准储备溶液（1 mg/mL，以有效成分计）：准确称取氨丙啉、氯羟吡啶、磺胺喹噁啉、二硝托胺、乙氧酰胺苯甲酯、地克珠利、尼卡巴嗪、拉沙洛西钠、盐酸氯苯胍、癸氧喹酯、莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素、马杜霉素、海南霉素等15种抗球虫药物标准品（纯度均≥97%，标准品信息见附录A）适量（精确至0.01 mg），分别置于容量瓶中，用甲醇（5.2）溶解，定容，混匀。-18℃以下保存，有效期12个月。

5.9 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：分别准确移取标准储备溶液（5.8）0.5 mL于50 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释定容，混匀。-18℃以下保存，有效期3个月。

5.10 混合标准系列溶液：准确移取适量体积的混合标准中间溶液（5.9）于10 mL容量瓶中，用甲酸-乙腈溶液（5.7）稀释配制成浓度分别为20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、5 000 ng/mL的混合标准系列溶液。临用现配。

5.11 固相萃取小柱：通过式亲水-亲脂平衡型固相萃取柱，60 mg/3 mL。

5.12 尼龙微孔滤膜：0.22 μm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

6.2 电子天平：精度为0.01 mg和0.01 g。

6.3 离心机：转速不低于5 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 固相萃取装置。

6.6 超声波清洗器。

7 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孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。选取与待测样品类型相同，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，作为基质空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样2 g（精确至0.01 g），置于50 mL离心管中，准确加入20 mL甲酸-乙腈溶液（5.7），涡旋10 min，超声提取10 min，5 000 r/min离心5 min，移取上清液，备用。

8.2 净化

取固相萃取小柱（5.11），准确移取3.0 mL备用液（8.1）过柱，保持过柱流速1 mL/min~2 mL/min，收集流出液，加水1:1稀释，过微孔滤膜（5.12），待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取基质空白试样，按8.1和8.2处理得到空白基质溶液。准确移取混合标准系列溶液（5.10）各100 μL分别置于1.5 mL进样瓶中，用氮气吹干，准确加入1 mL空白基质溶液，涡旋混合30 s，配制成浓度为2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL的基质匹配标准系列溶液，待测。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C18色谱柱，柱长100 mm，内径3.0 mm，粒度2.7 μm；或性能相当者；

b) 柱温：45℃；

c) 流速：0.5 mL/min；

d) 进样量: 5 μ L;

e) 流动相: A相为乙酸铵溶液 (5.6), B相为甲醇 (5.2), 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	95	5
1.50	95	5
4.50	2	98
7.00	2	98
7.50	95	5
10.00	95	5

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

a) 离子源模式: 电喷雾电离, 正/负离子模式 (ESI+/ESI-);

b) 检测方式: 多反应监测 (MRM);

c) 离子化电压: 4500 V;

d) 离子源温度: 350°C;

e) 气帘气: 30 psi;

f) 喷雾气: 50 psi;

g) 辅助加热气: 50 psi。

多反应监测 (MRM) 离子对、去簇电压、碰撞能量及扫描模式见表2。

表 2 多反应监测 (MRM) 离子对、去簇电压及碰撞能量参考值

被测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 V	碰撞能量 eV	扫描模式
氨丙啉	243.0>150.0*	46	15	ESI ⁺
	243.0>94.0		15	
氯羟吡啶	192.0>101.0*	51	35	ESI ⁺
	192.0>87.0		39	
磺胺嘧啶	301.1>156.1*	80	24	ESI ⁺
	301.1>108.0		36	
二硝托胺	224.0>181.0*	-55	-15	ESI ⁻
	224.0>77.0		-30	
乙氧酰胺苯甲酯	235.8>191.8*	-86	-27	ESI ⁻
	235.8>133.6		-37	
地克珠利	404.9>334.0*	-15	-30	ESI ⁻
	404.9>335.0		-30	
尼卡巴嗪	301.0>136.8*	-82	-21	ESI ⁻
	301.0>106.5		-42	
拉沙洛西钠	613.0>377.0*	50	48	ESI ⁺
	613.0>359.0		48	
盐酸氯苯胍	334.1>155.0*	85	30	ESI ⁺

	334.1>138.1		32	
癸氧喹酯	418.0>372.0*	80	25	ESI ⁺
	418.0>204.0		35	
莫能菌素	688.0>635.0*	76	21	ESI ⁺
	688.0>461.0		33	
盐霉素	768.4>733.3*	61	25	ESI ⁺
	768.4>715.2		33	
甲基盐霉素	782.4>747.3*	106	27	ESI ⁺
	782.4>729.3		31	
马杜霉素	934.4>629.3*	36	35	ESI ⁺
	934.4>647.3		25	
海南霉素	907.5>845.5*	75	34	ESI ⁺
	907.5>863.4		31	
*为定量离子				

8.4.3 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（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录B。

8.4.4 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待测物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，比较试样溶液谱图中待测物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待测物。

表3 定性测定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
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以质量浓度为横坐标、色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围，重新测定应将试样溶液和基质空白样品净化（8.2）得到的溶液用甲酸-乙腈溶液作同比例稀释后，从“8.3”开始按步骤重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 计，单位为毫克每千克（mg/kg）。多点校准按式（1）计算；单点校准按式（2）计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ρ_i —由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度的数值，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 V —甲酸-乙腈溶液体积的数值，单位为毫升（mL）；
 m —试样质量，单位为克（g）；
 f —试样净化液稀释的倍数；
 1 000 —换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_n \times V \times f}{A_n \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- A_i —试样溶液中待测物的色谱峰面积；
 ρ_n —基质匹配标准溶液中待测物质量浓度的数值，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 V —甲酸-乙腈溶液体积的数值，单位为毫升（mL）；
 A_n —基质匹配标准溶液中待测物的色谱峰面积；
 m —试样质量，单位为克（g）；
 f —试样净化液稀释后倍数；
 1 000 —换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下，两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)

15种抗球虫药物中英文名称、化学分子式、CAS号和纯度

15种抗球虫药物中英文名称、化学分子式、CAS号和纯度见表A.1

表 A.1 15 种抗球虫药物中英文名称、化学分子式、CAS 号和纯度

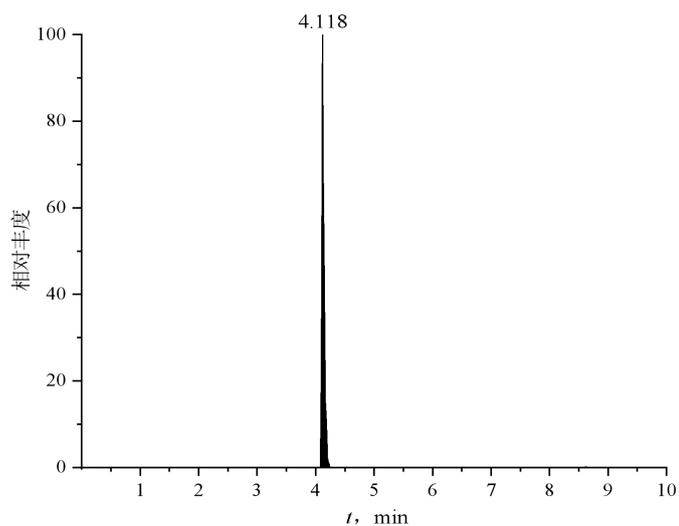
序号	中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号	纯度/%
1	氨丙啉	Amprolium	C ₁₄ H ₁₉ ClN ₄	121-25-5	99.9
2	氯羟吡啶	Clopidol	C ₇ H ₇ Cl ₂ NO	2971-90-6	99.2
3	磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	59-40-5	97.0
4	二硝托胺	Dinitolmide	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅	148-01-6	99.2
5	乙氧酰胺苯甲酯	Ethopabate	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	59-06-3	99.0
6	地克珠利	Diclazuril	C ₁₇ H ₉ Cl ₃ N ₄ O ₂	101831-37-2	98.0
7	尼卡巴嗪	Nicarbazin	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₅	587-90-6	99.0
8	拉沙洛西钠	Lasalocid	C ₃₄ H ₅₃ NaO ₈	25999-20-6	97.0
9	盐酸氯苯胍	Robenidine	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₃ N ₅	25875-50-7	97.0
10	癸氧喹酯	Decoquinate	C ₂₄ H ₃₅ NO ₅	18507-89-6	97.0
11	莫能菌素	Monensin	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	17090-79-8	99.0
12	盐霉素	Salinomycin	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₁	53003-10-4	99.9
13	甲基盐霉素	Narasin	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₁	55134-13-9	99.6
14	马杜霉素	Maduramicin ammonium	C ₄₇ H ₈₃ NO ₁₇	84878-61-5	99.9
15	海南霉素	Hainanmycin	C ₄₇ H ₇₉ O ₁₅ Na	/	97.0

附录 B

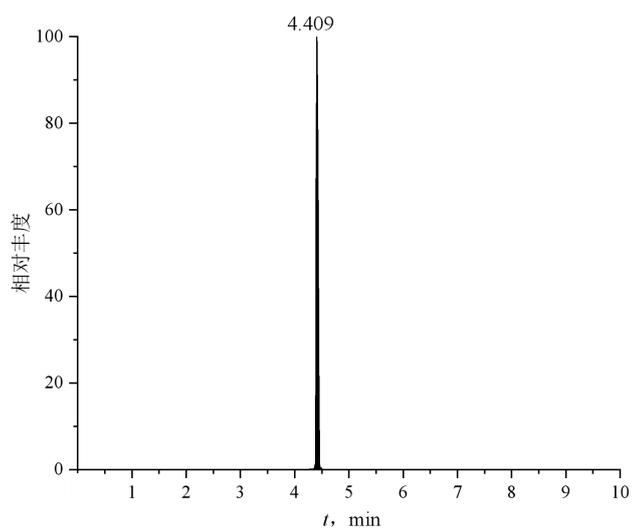
(资料性)

15种抗球虫药物的基质匹配标准溶液定量离子色谱图

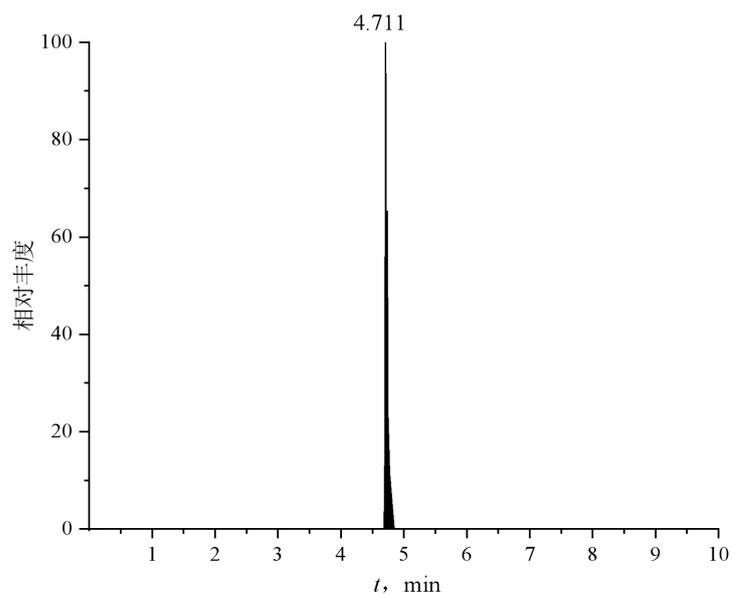
15种抗球虫药物的基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图B.1~B.15。



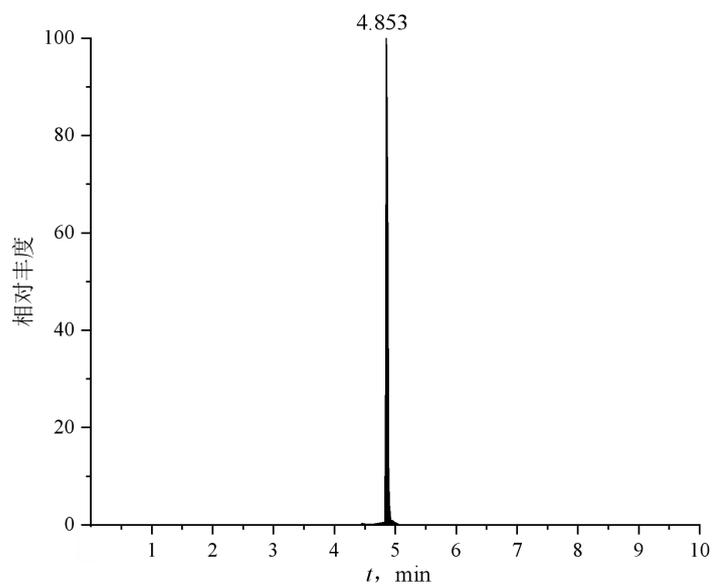
图B.1 氯丙啉基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



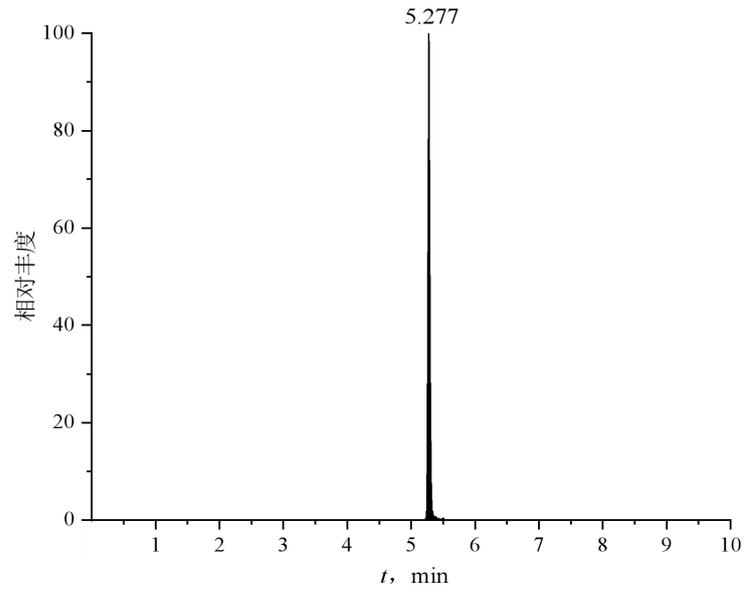
图B.2 氯羟吡啶基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



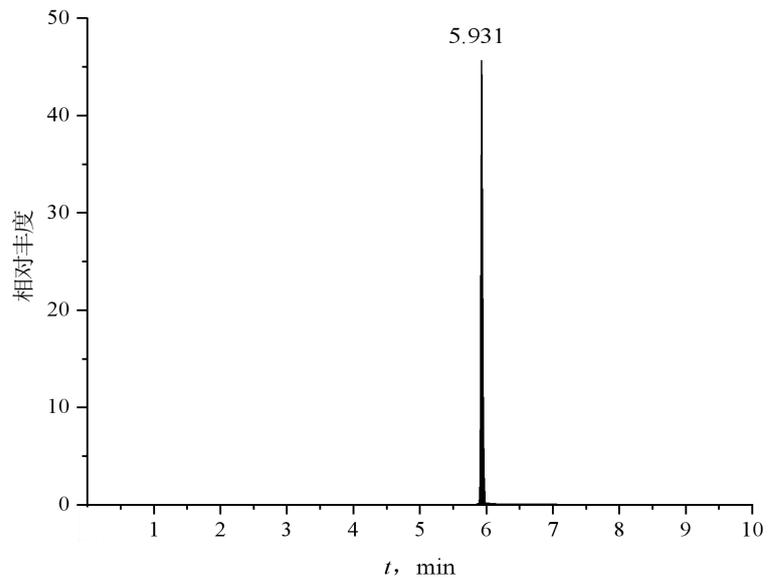
图B.3 磺胺喹噁啉基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



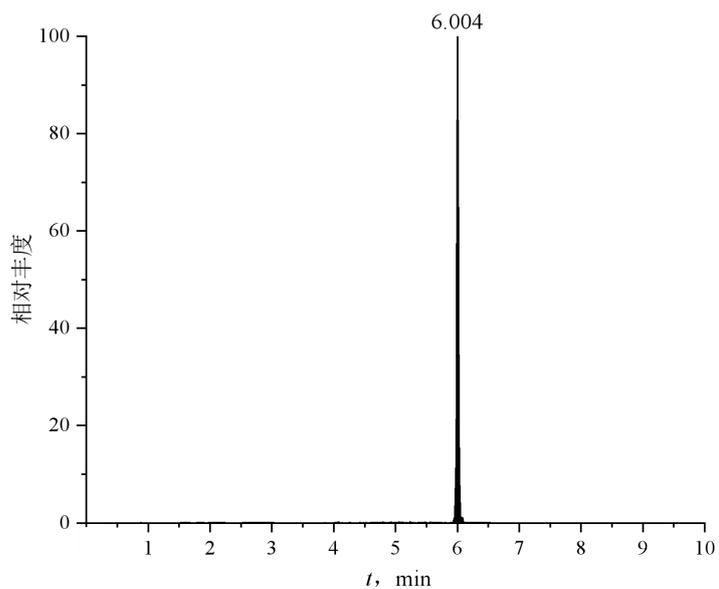
图B.4 二硝托胺基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



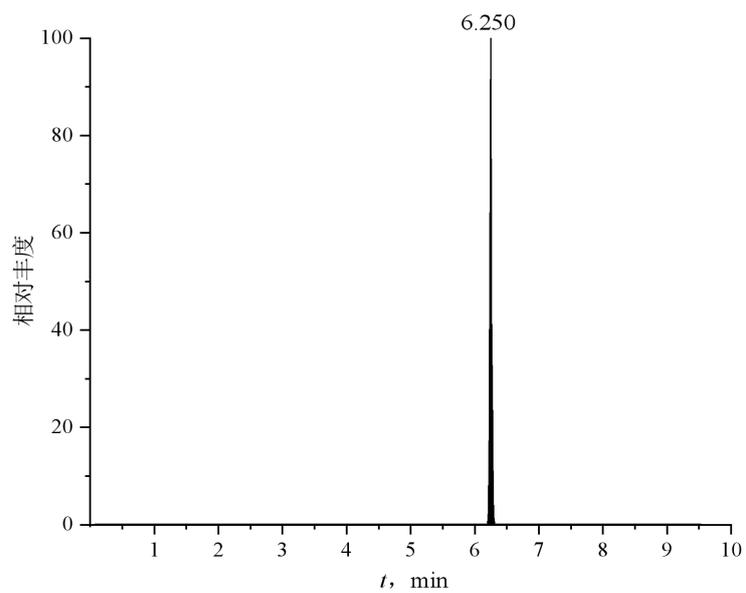
图B.5 乙氧酰氨苯甲酯基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



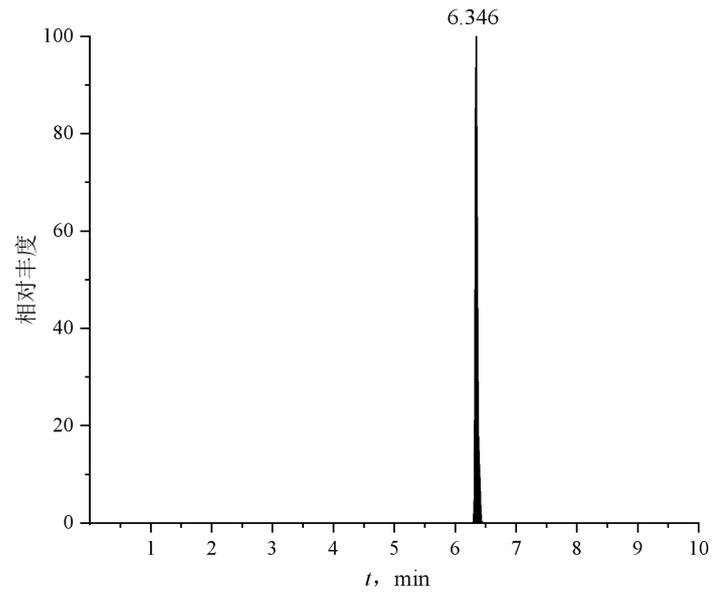
图B.6 地克珠利基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



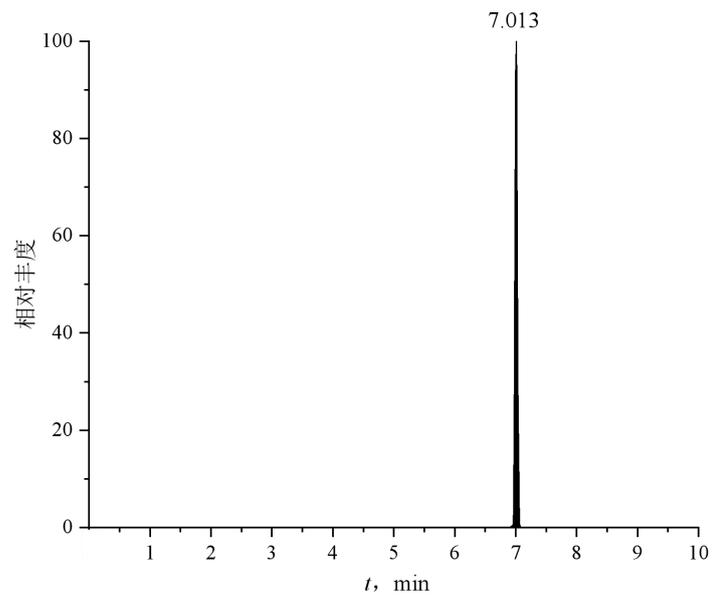
图B.7 尼卡巴嗪基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



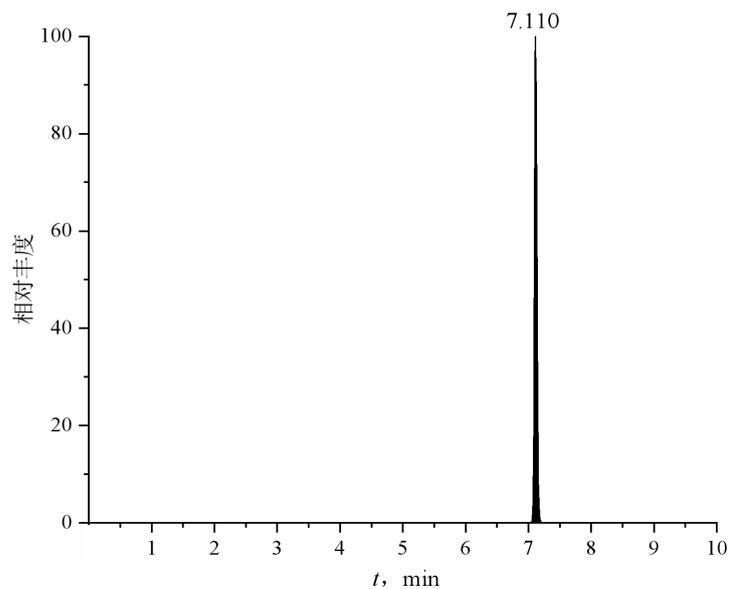
图B.8 拉沙洛西钠基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



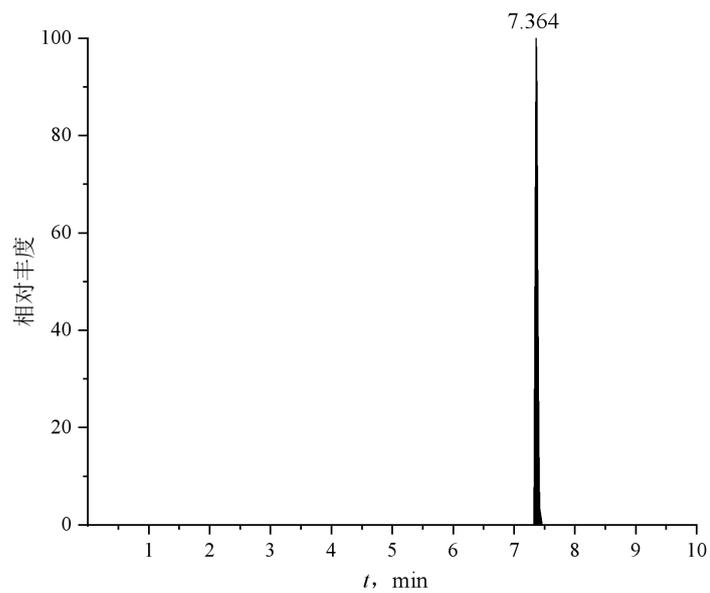
图B.9 盐酸氯苯胍基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



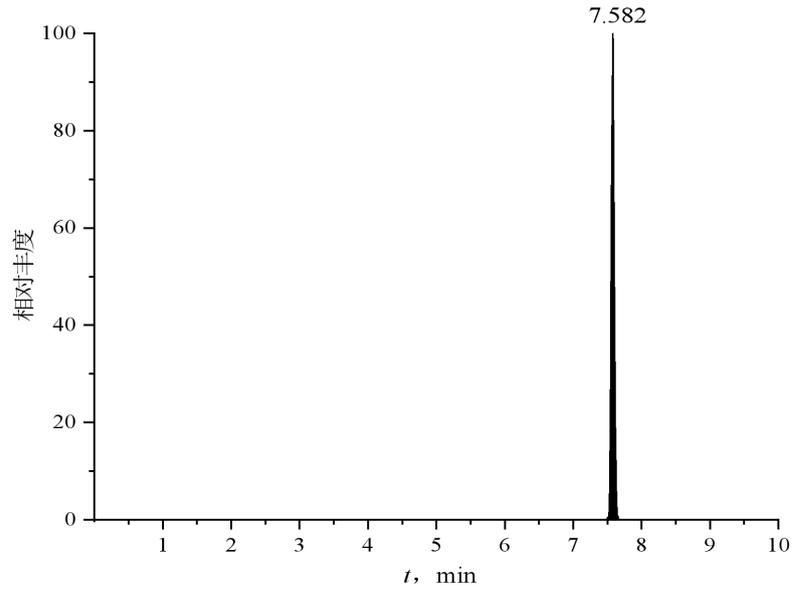
图B.10 癸氧喹酯基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



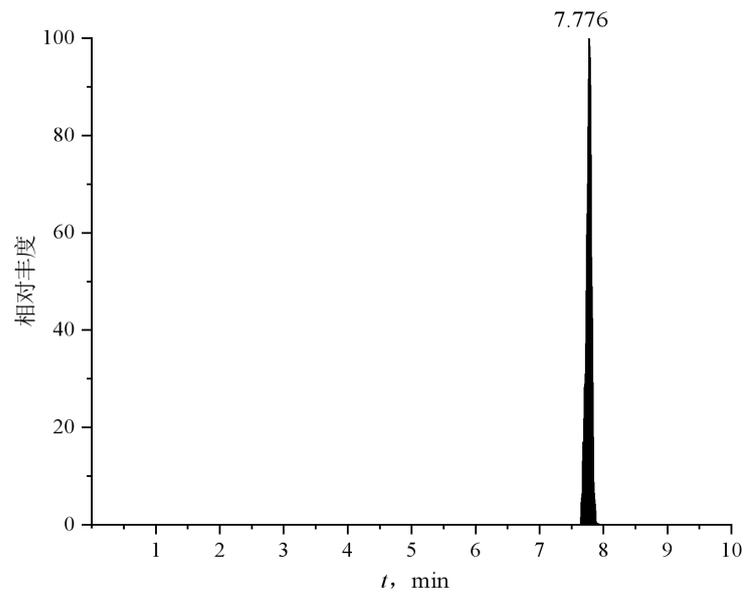
图B.11 莫能菌素基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



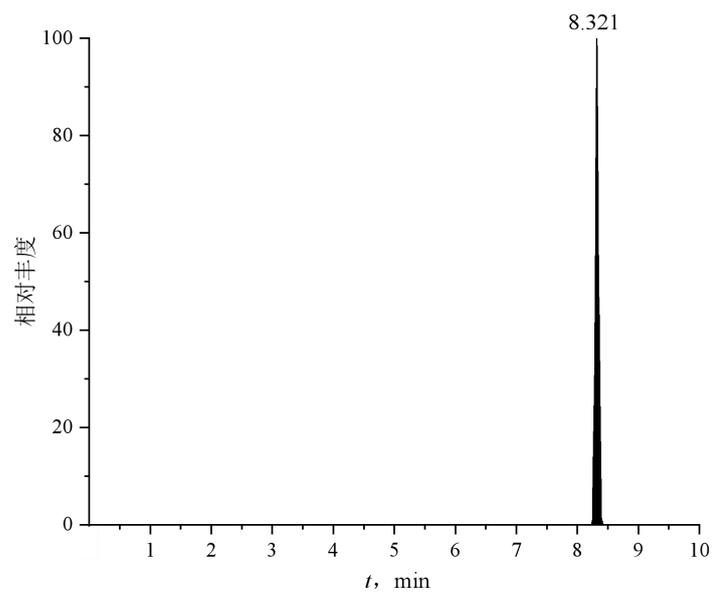
图B.12 盐霉素基质匹配标准溶液（5.0 ng/mL）定量离子色谱图



图B.13 甲基盐霉素基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



图B.14 马杜霉素基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图



图B.15 海南霉素基质匹配标准溶液 (5.0 ng/mL) 定量离子色谱图
