

中华人民共和国国家标准

农业部 1862 号公告—3—2012

饲料中万古霉素的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of vancomycin 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。

本标准起草单位:河南省饲料产品质量监督检验站。

本标准主要起草人:班付国、吴宁鹏、彭丽、张发旺、周红霞、李慧素。

饲料中万古霉素的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中万古霉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、精料补充料和添加剂预混合饲料中万古霉素的测定。

本标准的检测限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.1 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。凡是注明日期的引用文件,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

以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液+乙腈(85+15)提取样品中的万古霉素,提取液经强阳离子交换固相萃取柱净化,用液相色谱—串联质谱法进行测定,基质匹配标准曲线校正,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,本法所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

- 4.1 盐酸万古霉素对照品:纯度 $\geq 80.0\%$ 。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 甲醇:色谱纯。
- 4.4 甲酸:色谱纯。
- 4.5 氨水。
- 4.6 盐酸。
- 4.7 磷酸二氢钾。
- 4.8 磷酸。
- 4.9 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液:称取 6.80 g 磷酸二氢钾,用水溶解并稀释至 1 000 mL,用磷酸调节 pH=3.20 \pm 0.05,即得。
- 4.10 提取液:取磷酸盐缓冲液 850 mL,加乙腈 150 mL,混匀,即得。
- 4.11 0.1%甲酸水溶液:取甲酸 1.0 mL 加水稀释至 1 000 mL,混匀,即得。
- 4.12 0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 9.0 mL,加水稀释至 1 000 mL,混匀,即得。
- 4.13 3%氨化甲醇溶液:取氨水 3 mL,加入甲醇稀释至 100 mL,混匀,即得。
- 4.14 强阳离子交换固相萃取柱:6 mL,200 mg,粒径 33 μ m,孔径 8.5 nm;或相当者。
- 4.15 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取适量的盐酸万古霉素对照品,用水溶解并定容,配制成 1 mg/mL 的标准储备液。-20 $^{\circ}$ C 下保存,有效期为 3 个月。
- 4.16 标准工作液(10 μ g/mL):准确移取标准储备液适量,用水稀释成浓度为 10 μ g/mL 的标准工作液。

液。4℃下保存,有效期为 1 周。

5 仪器和设备

除实验室常用仪器和设备外,实验还需用如下装置:

- a) 液相色谱—串联质谱仪(带电喷雾离子源)。
- b) 分析天平:感量 0.01 mg。
- c) 天平:感量 0.01 g。
- d) 离心机:可达 8 000 r/min(相对离心力为 7 012 g)。
- e) 涡旋混合器。
- f) 水平振荡器。
- g) 超声清洗器。
- h) 固相萃取装置。
- i) 氮吹仪。

6 采样和试样制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取约 200 g。按照 GB/T 20195 规定的方法制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入提取液 20 mL,涡旋混合后振荡 10 min,超声提取 10 min,期间摇动 2 次。取出后,于离心机上 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

7.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇和 0.1 mol/L 盐酸各 3 mL 活化,准确移取上清液 5 mL 过柱。用甲醇 3 mL 淋洗,抽干。3%氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40℃下氮气吹干。准确加入 0.1%甲酸水溶液 1 mL 溶解定容,涡动混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,上 LC-MS/MS 测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

准确移取万古霉素标准溶液适量,依次加入同类基质的空白样品中,分别制得浓度为 50 μg/kg、100 μg/kg、200 μg/kg、400 μg/kg、1 000 μg/kg、2 000 μg/kg 的系列空白添加试料。经 7.1~7.2 步骤处理,制得理论浓度为 25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL 的基质匹配标准溶液,过滤后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm,柱内径 2.1 mm,粒度 1.7 μm;或相当的分析柱。

柱温:40℃。

流动相:A相:0.1%甲酸溶液;B相:乙腈。梯度洗脱,梯度见表 1。

流速:0.30 mL/min。

进样量:10 μL。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱条件

时间, min	A 相, %	B 相, %
0	95	5
1.2	60	40
2	10	90
3	95	5
4	95	5

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应监测 MRM。

电离电压:3.2 kV。

源温:110℃。

雾化温度:400℃。

锥孔气流速:50 L/h。

雾化气流速:700 L/h。

定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 2。

表 2 万古霉素定性、定量离子、锥孔电压和碰撞能量参考值

药物名称	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
万古霉素	725.4>1 306.6 ^a	725.4>1 306.6	20	15
	725.4>143.6			15

^a 万古霉素母离子带双电荷。

7.4.3 定性测定

万古霉素选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,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

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

7.4.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质匹配标准溶液进样,以峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标绘制工作曲线,用单点或多点对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图参见图 A. 1。

8 结果计算和表示

8.1 结果计算

试样中万古霉素含量 *X* 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

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

式中:

- A——试样溶液中万古霉素的峰面积;
- A_s ——标准工作液中万古霉素峰面积;
- C_s ——标准工作液中万古霉素浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V——上机前最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品的质量,单位为克(g);
- V_1 ——提取液中加入 SPE 小柱的体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——总提取液体积,单位为毫升(mL);
- n ——稀释倍数。

8.2 结果表示

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的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)
万古霉素基质匹配标准溶液质量色谱图

万古霉素基质匹配标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的色谱图见图 A. 1。

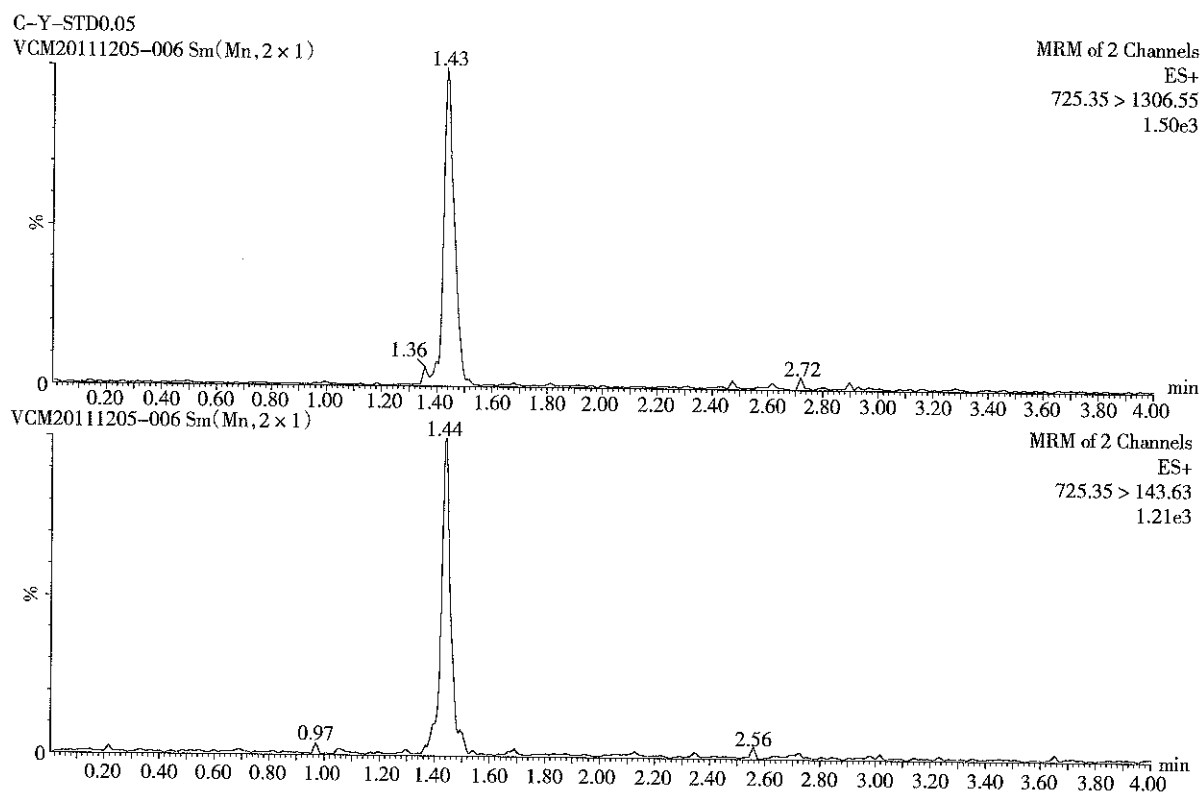


图 A. 1 基质匹配标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的色谱图