

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX-20XX

饲料中米诺地尔的测定

Determination of minodixil in feeds

(公开征求意见稿)

20XX-XX-XX发布

20XX-XX-XX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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国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：上海市兽药饲料检测所、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：

# 饲料中米诺地尔的测定

## 1 范围

本文件规定了饲料中米诺地尔的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件中高效液相色谱法适用于浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中米诺地尔含量的测定；液相色谱-串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中米诺地尔含量的测定。

本文件高效液相色谱法的检出限为1.0 mg/kg，定量限为2.0 mg/kg；液相色谱-串联质谱法检出限为5.0 µg/kg，定量限为10.0 µg/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，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 高效液相色谱法

### 4.1 原理

试样中的米诺地尔用甲醇振荡提取，混合型强阳离子固相萃取小柱净化，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

### 4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 磷酸。

4.2.3 甲醇。

4.2.4 甲醇：色谱纯。

4.2.5 乙腈：色谱纯。

4.2.6 甲酸：色谱纯。

4.2.7 5%氨水甲醇溶液：取5 mL氨水，加甲醇（4.2.3）稀释至100 mL，混匀。

- 4.2.8 0.1%甲酸溶液：取1 mL甲酸（4.2.6），加水稀释至1000 mL，混匀。
- 4.2.9 0.1%磷酸溶液：取1 mL磷酸（4.2.2），加水稀释至1000 mL，混匀。
- 4.2.10 乙腈-0.1%磷酸溶液：取15 mL乙腈（4.2.5）与85 mL0.1%磷酸溶液（4.2.9）混匀。
- 4.2.11 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取米诺地尔标准品（CAS：38304-91-5，纯度不低于98%）10 mg（精确至0.00001 g）于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇（4.2.4）溶解定容。于-18℃以下避光保存，有效期为6个月。
- 4.2.12 标准中间溶液（100 μg/mL）：准确移取标准储备溶液（4.2.11）1 mL于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈-0.1%磷酸溶液（4.2.10）定容。于2℃~8℃避光保存，有效期为3个月。
- 4.2.13 标准系列工作溶液：分别准确移取适量标准中间溶液（4.2.12）于棕色容量瓶中，用乙腈-0.1%磷酸溶液（4.2.10）稀释定容配成标准系列工作溶液，浓度分别为：0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL。临用现配。
- 4.2.14 混合型强阳离子固相萃取小柱：200 mg/6 mL。
- 4.2.15 微孔滤膜：0.22 μm，水系。

### 4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 4.3.2 天平：感量0.01 g和0.000 01 g。
- 4.3.3 振荡器：转速500~3 000 r/min。
- 4.3.4 离心机：转速不低于9 000 r/min。
- 4.3.5 涡旋混合器。
- 4.3.6 固相萃取装置。
- 4.3.7 氮吹仪。

### 4.4 样品

按GB/T 20195制备试样，不少于200 g，粉碎使其全部通过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶，备用。

### 4.5 试验步骤

#### 4.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样2 g（精确至0.01 g），于50 mL离心管中，准确加入20 mL甲醇（4.2.3），1500 r/min振荡提取20 min，9000 r/min离心5 min，准确移取上清液1.0 mL于10 mL离心管中，加入4 mL 0.1%甲酸溶液（4.2.8），涡旋混匀，提取液备用。

#### 4.5.2 净化

固相萃取小柱（4.2.14）依次用3 mL甲醇（4.2.3）和3 mL水预淋洗，取提取液（4.5.1）全部过柱，分别依次用3 mL水和3 mL甲醇（4.2.3）淋洗，用3 mL 5%氨水甲醇（4.2.7）洗脱，收集洗脱液，于50℃下用氮气吹干，用1 mL乙腈-0.1%磷酸溶液（4.2.10）溶解，涡旋混匀，用0.22 μm滤膜（4.2.15）过滤备用。

#### 4.5.3 测定

#### 4.5.3.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；  
 流动相：0.1%磷酸溶液(4.2.9)：乙腈(4.2.5)= 85 : 15 (v/v)；  
 柱温：35 °C；  
 流速：1 mL/min；  
 检测波长：280 nm；  
 进样量：50 μL。

#### 4.5.3.2 标准系列工作溶液和试样溶液测定

分别取标准系列工作溶液和试样溶液（4.5.2）上机测定。米诺地尔标准溶液的高效液相色谱图参见附录A。

#### 4.5.3.3 定性测定

试样溶液中米诺地尔的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中米诺地尔的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

#### 4.5.3.4 定量测定

以米诺地尔的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.999。用单点或多点进行定量，试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用乙腈-0.1%磷酸溶液（4.2.10）稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

### 4.6 试验数据处理

试样中米诺地尔含量以质量分数 $w_i$ 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (1)$$

式（1）中：

- $\rho_1$  ——由标准曲线得到的试样溶液中米诺地尔的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
- $V_1$  ——试样中加入提取液体积，单位为毫升（mL）；
- $V_2$  ——用于净化的上清液体积，单位为毫升（mL）；
- $V_3$  ——试样中最终定容体积，单位为毫升（mL）；
- $m$  ——试样的称样量，单位为克（g）；
- $n$  ——稀释倍数；

$$w_i = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho_s \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (2)$$

式（2）中：

- $A$  ——试样溶液的色谱峰面积；

$A_s$  ——标准溶液色谱峰面积；

$\rho_s$  ——米诺地尔标准工作溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V_1$  ——试样中加入提取液体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$  ——用于净化的上清液体积，单位为毫升（mL）；

$V_3$  ——试样中最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$  ——试样的称样量，单位为克（g）；

$n$  ——稀释倍数；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

#### 4.7 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10%。

### 5 液相色谱-串联质谱法

#### 5.1 原理

试样中的米诺地尔用甲醇振荡提取，混合型强阳离子固相萃取小柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

#### 5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 甲醇。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 乙腈：色谱纯。

5.2.5 甲酸：色谱纯。

5.2.6 5%氨水甲醇溶液：取 5 mL 氨水，加甲醇（5.2.2）稀释至 100 mL，混匀。

5.2.7 0.1%甲酸溶液：取 1 mL 甲酸（5.2.5），加水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.8 0.1%甲酸乙腈：取 1 mL 甲酸（5.2.5），加乙腈（5.2.4）稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.9 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取米诺地尔标准品（CAS：38304-91-5，纯度不低于 98%）10 mg（精确至 0.00001 g）于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.2.3）溶解定容。于  $-18^{\circ}\text{C}$  以下避光保存，有效期为 6 个月。

5.2.10 标准中间溶液 I（100  $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准储备溶液（5.2.9）2 mL 于 20 mL 棕色容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液（5.2.7）定容。于  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$  避光保存，有效期为 3 个月。

5.2.11 标准中间溶液 II（1  $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准中间溶液 I（5.2.10）1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液（5.2.7）定容，临用现配。

5.2.12 标准系列工作溶液：分别准确移取适量标准中间溶液 II（5.2.11）于棕色容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液（5.2.7）稀释定容配成标准系列工作溶液，浓度分别为 0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL。临用现配。

5.2.13 混合型强阳离子固相萃取小柱：60 mg/3 mL。

5.2.14 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，水系。

### 5.3 仪器设备

- 5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。
- 5.3.2 天平：感量 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 5.3.3 振荡器：转速 500 ~ 3 000 r/min。
- 5.3.4 离心机：转速不低于 9000 r/min。
- 5.3.5 涡旋混合器。
- 5.3.6 固相萃取装置。
- 5.3.7 氮吹仪。

### 5.4 样品

按GB/T 20195制备试样，不少于200 g，粉碎使其全部通过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶，备用。

### 5.5 试验步骤

#### 5.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至 0.01 g），于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 甲醇（5.2.2），1500 r/min 振荡提取 20 min，9000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 0.5 mL 于 10 mL 离心管中，加入 2 mL 0.1 % 甲酸溶液（5.2.7），涡旋混匀，提取液备用。

#### 5.5.2 净化

固相萃取小柱（5.2.13）依次用 3 mL 甲醇（5.2.2）和 3 mL 水预淋洗，取提取液（5.5.1）全部过柱，分别依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇（5.2.2）淋洗，用 3 mL 5% 氨水甲醇（5.2.6）洗脱，收集洗脱液，于 50 °C 下用氮气吹干，用 1 mL 0.1% 甲酸溶液（5.2.7）溶解，涡旋混匀，用 0.22 μm 滤膜（5.2.14）过滤备用。

#### 5.5.3 测定

##### 5.5.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.7 μm，或性能相当者；  
 流动相：A相为0.1%甲酸溶液（5.2.7），B相为0.1%甲酸乙腈（5.2.8），梯度洗脱程序见表1；  
 柱温：35°C；  
 流速：0.3 mL/min；  
 进样量：10 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	80	20

2.00	80	20
2.10	5	95
3.00	5	95
3.10	80	20
6.00	80	20

### 5.5.3.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI<sup>+</sup>）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

鞘气：800 L/Hr；

反吹气：50 L/Hr；

雾化器温度：500 °C；

电离电压：3.5 kV；

源温度：150 °C。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表2。

表2 米诺地尔多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
米诺地尔	210.0 > 163.9	30	25
	210.0 > 192.9 <sup>a</sup>	30	15

<sup>a</sup>为定量离子。

### 5.5.3.3 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液和试样溶液（5.5.2）上机测定。米诺地尔特征离子质量色谱图参见附录B。

### 5.5.3.4 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液与标准系列工作溶液（浓度相当）中米诺地尔的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的监测离子对，比较试样谱图中米诺地尔监测离子对的相对离子丰度与浓度接近的标准系列工作溶液中监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在米诺地尔。

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

### 5.5.3.5 定量测定

以米诺地尔的浓度为横坐标，定量离子对峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。用单点或多点进行定量，试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用0.1%甲酸溶液（5.2.7）稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。



## 5.6 试验数据处理

试样中米诺地尔含量以质量分数 $w_2$ 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）表示。多点校准按公式（3）计算；单点校准按公式（4）计算：

$$w_2 = \frac{\rho_2 \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (3)$$

式（3）中：

- $\rho_2$  ——由标准曲线得到的试样溶液中米诺地尔的浓度，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；
- $V_1$  ——试样中加入提取液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $V_2$  ——用于净化的上清液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $V_3$  ——试样中最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $m$  ——试样的称样量，单位为克（ $\text{g}$ ）；
- $n$  ——稀释倍数；

$$w_2 = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho'_s \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (4)$$

式（4）中：

- $A$  ——试样溶液的色谱峰面积；
- $A_s$  ——标准溶液色谱峰面积；
- $\rho'_s$  ——米诺地尔标准工作溶液浓度，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；
- $V_1$  ——试样中加入提取液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $V_2$  ——用于净化的上清液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $V_3$  ——试样中最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $m$  ——试样的称样量，单位为克（ $\text{g}$ ）；
- $n$  ——稀释倍数；

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。

## 5.7 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15%。

附录 A  
(资料性)  
米诺地尔标准溶液高效液相色谱图

米诺地尔标准溶液高效液相色谱图见图 A.1。

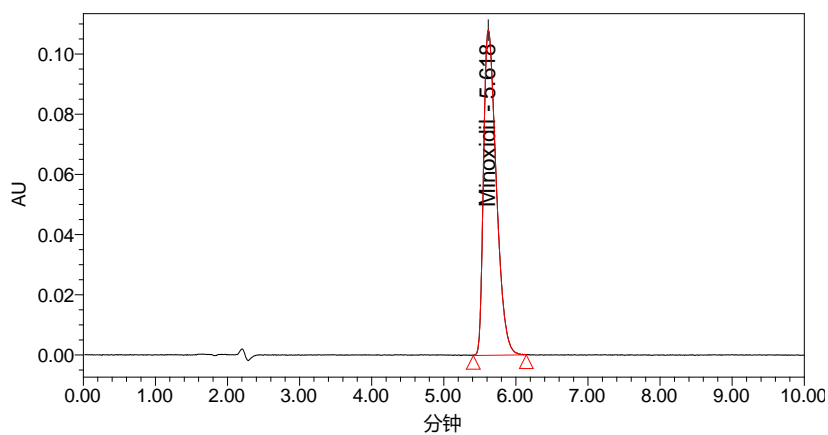


图 A.1 米诺地尔标准溶液 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 高效液相色谱图

附录 B  
(资料性)  
米诺地尔标准溶液特征离子质量色谱图

米诺地尔标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。

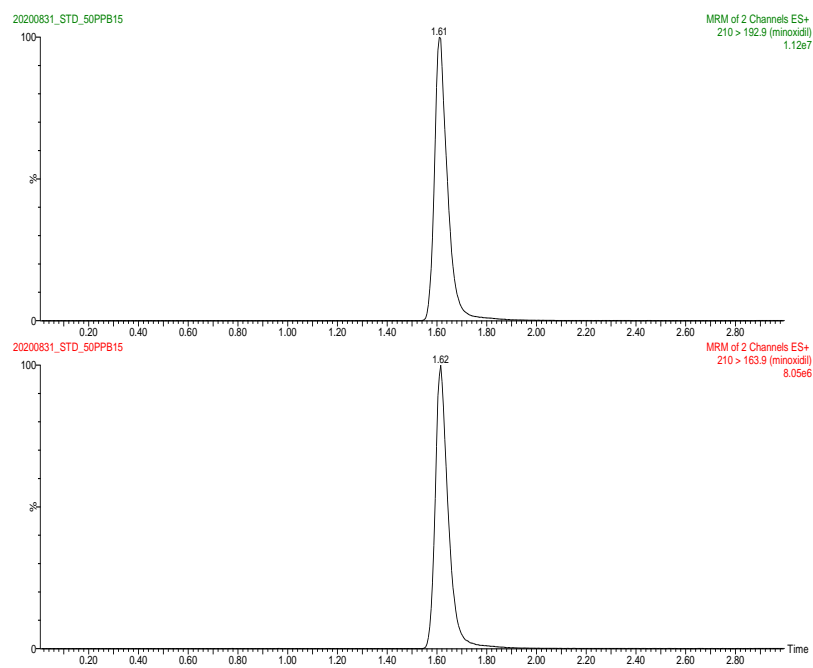


图 B.1 米诺地尔标准溶液（50 ng/mL）特征离子质量色谱图

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中米诺地尔的测定》

编制说明  
(公开征求意见稿)

上海市兽药饲料检测所

标准制定编制组

二〇二一年十一月

# 目 录

一、标准制定背景及任务来源.....	1
(一) 标准制定背景.....	1
(二) 任务来源.....	2
二、主要工作过程.....	2
(一) 成立标准编制小组.....	2
(二) 查询国内外相关标准和文献资料.....	3
(三) 确定标准制定技术路线, 制定原则.....	3
(四) 进行论证实验, 确定方法主要试验技术内容制定的合理性.....	3
(五) 编写标准征求意见稿.....	4
(六) 征求意见.....	4
(七) 组织方法验证.....	4
(八) 组织修订方法的预审.....	4
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	5
(一) 标准编制原则.....	5
(二) 主要技术内容确定的依据.....	5
1 与国内外相关标准的对比情况 .....	5
2 方法主要试验技术制定与验证 .....	5
2.1 高效液相色谱法试验技术制定.....	6
2.1.1 仪器条件的确定.....	6
2.1.1.1 色谱柱的选择.....	6
2.1.1.2 检测波长和流动相的确定.....	6
2.1.1.3 定容溶剂的选择.....	8
2.1.1.4 柱温的选择.....	8
2.1.1.5 高效液相条件的确定.....	9
2.1.2 样品前处理方法的确定.....	9
2.1.2.1 提取剂的选择.....	9
2.1.2.2 净化条件的确定.....	10
2.1.2.3 实验步骤的确定.....	11

2.2 高效液相色谱法试验技术验证.....	11
2.2.1 方法的线性和范围.....	11
2.2.2 方法的检出限和定量限.....	12
2.2.3 标准品稳定性的考察.....	18
2.2.4 方法的准确度和精密度.....	18
2.2.5 专属性试验.....	21
2.3 液相色谱-串联质谱试验技术制定.....	21
2.3.1 仪器条件的确定.....	21
2.3.1.1 流动相的确定.....	21
2.3.1.2 色谱柱的选择.....	22
2.3.1.3 柱温的选择.....	22
2.3.1.4 液相条件的确定.....	24
2.3.1.5 监测离子对的选择及质谱条件优化.....	24
2.3.2 提取条件的确定.....	25
2.3.2.1 提取剂的确定.....	25
2.3.2.2 净化条件的确定.....	26
2.3.2.3 提取前处理方法的确定.....	26
2.4 高效液相色谱-串联质谱试验技术验证.....	26
2.4.1 线性范围.....	26
2.4.2 方法的检出限和定量限.....	27
2.4.3 方法准确度及精密度考察.....	35
2.4.4 标准工作液（1 μg/mL）的稳定性试验.....	38
2.4.5 基质效应.....	39
2.5 结论.....	43
四、采用国际标准.....	43
五、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系.....	43
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	43
七、作为强制性标准或推荐性标准的建议.....	44
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	44

九、废止现行有关标准的建议.....	44
十、其他应予说明的事项.....	44
参考文献.....	44

# 《饲料中米诺地尔的测定》

## 农业行业标准制定的编制说明

### （公开征求意见稿）

## 一、标准制定背景及任务来源

### （一）标准制定背景

2018年5月28日至6月1日，根据《农业农村部办公厅关于印发<2018年全国饲料质量安全监管工作方案>的通知》（农办牧〔2018〕21号）的要求，上海市兽药饲料检测所承担并完成了福建省饲料样品的见证抽样任务（上半年）。2018年6月至8月，上海市兽药饲料检测所依据全国饲料质量安全监管工作方案完成了检测工作，并结合饲料预警监测工作对该省的样品进行了非法添加物风险筛查。2018年9月经过反复确认与对比，在1批大猪用复合预混料中发现了新型非法添加物“米诺地尔”，含量为30mg/kg，此添加量符合药物使用特征。此次发现引起农业农村部畜牧兽医局高度重视，经溯源证实为湖南一家企业生产经营，长沙县行政执法局对此事进行立案侦查，我所还在后续追踪中受其委托检测1批混合型饲料添加剂淫羊藿提取物（大猪专用贰号K005生长素），生产日期2018年11月1日。经筛查，样品中检出米诺地尔浓度为0.4%。针对此案，相关部门对涉案人员进行抓捕判刑，对涉案企业判处数百万元的罚款，此事引起了较高的社会关注。

米诺地尔化学名为6-(1-哌啶基)-2,4-嘧啶二胺,3-氧化物，别名长压定、降压定，为白色或类白色结晶性粉末，分子式： $C_9H_{15}N_5O$ ，化学结构式见图1，其是美国普强公司在20世纪60年代率先推出的一种口服有效、具有舒张血管作用的降压药。临床上作为钾离子通道开放剂，能直接松弛血管平滑肌，有强大的小动脉扩张作用，使外周阻力下降，血压下降。在降压时能反射性兴奋交感神经而使心率加快、心输出量增加，血浆肾素活性增加和水钠潴留。目前关于该化合物用于动物的研究较少，有专利<sup>[1]</sup>表明该类化合物亦可用于促进动物，尤其是家畜的生长。该等化合物会增加动物增重的速度、增加所得肉的瘦肉度及改良饲料



利用效率。另有文献资料显示，长期使用米诺地尔，可能会有一种副作用，即身上毛发可能会随着药物的持续使用而略有增多。

目前我国尚没有饲料中米诺地尔的测定的行业标准。因此，亟需建立饲料中米诺地尔的检测方法。通过制定《饲料中米诺地尔的测定》标准，可有效对饲料中米诺地尔进行监测，确保饲料的安全性，保障动物食品的安全。

## （二）任务来源

根据全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料工业国家标准、行业标准制定文件，上海市兽药饲料检测所承担了《饲料中米诺地尔的测定》农业行业标准制定工作（合同编号：14192063），该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

## 二、主要工作过程

### （一）成立标准编制小组

2019年12月，上海市兽药饲料检测所和上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所接到《饲料中米诺地尔的测定》农业行业标准制定任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，并成立了标准制定工作组，制定工作计划，落实人员与分工（具体见表1）。

表1 标准编制组成员与分工

姓名	职称	承担任务
黄士新	推广研究员	项目主持人，负责项目的全面工作
曹莹	高级畜牧师	负责标准方法技术的论证
严凤	高级畜牧师	检测方法研究、文本和编制说明修改完善
张婧	畜牧师	高效液相检测方法研究、文本和编制说明修改完善
王博	助理畜牧师	液相色谱-串联质谱检测方法研究、文本和编制说明修改完善

吴剑平	畜牧师	标准文本和编制说明修改完善
白冰	副研究员	检测方法研究、文本和编制说明修改完善
杨海锋	高级实验师	检测方法研究、文本和编制说明修改完善
司文帅	助理研究员	样品采集、数据汇总处理
黄家莺	畜牧师	样品采集、数据汇总处理
徐汀	助理畜牧师	样品采集、数据复核
陶玉洁	助理畜牧师	采集样品信息汇总、征求各方意见汇总处理
潘娟	畜牧师	采集样品信息汇总、征求各方意见汇总处理
贡松松	畜牧师	实验数据汇总处理

## （二）查询国内外相关标准和文献资料

2019年12月~2020年2月，本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定的指导思想，形成了开题报告和标准草案，并制定了初步的实验方案。

## （三）确定标准制定技术路线，制定原则

2020年3月~2020年4月，召开了标准开题论证会，会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

## （四）进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性

2020年4月~2020年5月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，在参照国际和国外先进标准的基础上，结合目前的实际情况，初步确定了标准的制定和相应的试验方法，形成了标准草案。之后，2020年6月~2020年9月，工作组对标准草案进行了多次讨论研究，同时对标准中采用的试验方法进行了研究与方法验证工作，积累了研究数据。

## **（五）编写标准征求意见稿**

2020年9月~2020年11月，对方法研究过程中出现的问题和困难，标准工作组进行了认真研究和分析，并得以解决。完善了方法的准确性和可靠性，在此基础上完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。

## **（六）征求意见**

2020年12月~2月，发函29个单位对标准征求意见，其中回函单位29个，未回函单位0个；提出意见单位29个，无意见单位0个，共提出意见175条；其中采纳141条，部分采纳或不采纳34条。根据征求的意见对标准文本和编制说明进行了修改完善，形成了标准文本及编制说明的预审稿。

## **（七）组织方法验证**

2021年1月，组织3家有资质的检测单位，对标准中制定的技术指标等内容进行验证。汇总相关验证数据后，对数据的合理性进行检验，通过检验的验证数据进行汇总，编写数据汇总报告和统计汇总报告。

## **（八）组织修订方法的预审**

2021年8月24日，组织专家对上海市兽药饲料检测所等单位制定的农业行业标准《饲料中米诺地尔的测定》（预审稿）进行了认真审查。由8位专家组成的专家组在听取制定专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，对修订标准提出如下修改意见：1. 标准名称修改为“饲料中米诺地尔的测定”。2. 建议进一步考察高效液相色谱法的检出限和定量限。3. 编制说明中补充高效液相色谱法检测波长、液相色谱-串联质谱法定性定量离子对选择依据。4. 按照GB/T 1.1-2020和GB/T 20001.4-2015的要求规范标准文本及编制说明。与会专家一致同意标准制定单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

### 三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

#### （一）标准编制原则

- 1 依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求，以参照国内外相关标准与文献为基础进行制定。
- 2 制定后的方法性能够满足相关饲料标准和饲料质量监管工作的需要。
- 3 制定后的方法性具科学性、可靠性及普遍适用性，易于推广使用。

#### （二）主要技术内容确定的依据

本标准的主要技术内容（包括技术要求和试验方法）说明如下：

##### 1 与国内外相关标准的对比情况

目前国内关于米诺地尔的相关检测方法标准只有 GB/T 35837-2018《化妆品中禁用物质米诺地尔的测定 高效液相色谱法》，但尚没有饲料中米诺地尔含量检测的方法或标准。国外亦尚无相关法律法规对饲料中米诺地尔做出规定。

##### 2 方法主要试验技术制定与验证

本标准所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

试样的制备均按 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 制备样品，粉碎后过 0.42 mm 孔径的分析筛，混匀，装入磨口瓶中，备用。

## 2.1 高效液相色谱法试验技术制定

### 2.1.1 仪器条件的确定

#### 2.1.1.1 色谱柱的选择

鉴于饲料样品基质复杂,为确保杂质和米诺地尔目标峰的分离,在方法研制过程中,本试验考察了不同的色谱柱,分别为 MGIII C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm, 5 μm) 色谱柱、Hypersil GOLD(100mm×2.1mm, 1.9 μm) 色谱柱、ACQUITY BEH C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.7 μm) 色谱柱以及 SB-C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.8 μm) 色谱柱。结果表明,C<sub>18</sub> 色谱柱均较适合饲料中米诺地尔的检测,不同品牌的分离效果区别不大。因此本标准确定较普遍的 MGIII C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm, 5 μm) 色谱柱作为最优条件。

#### 2.1.1.2 检测波长和流动相的确定

根据《中国药典》(2015年版二部)中米诺地尔药物性质可知,其在 229nm 和 280 nm 波长处有最大紫外吸收。根据药典中含量测定部分的要求,并避免常见杂质吸收波长的影响,选择检测波长为 280 nm。米诺地尔光谱图如图 1 所示。

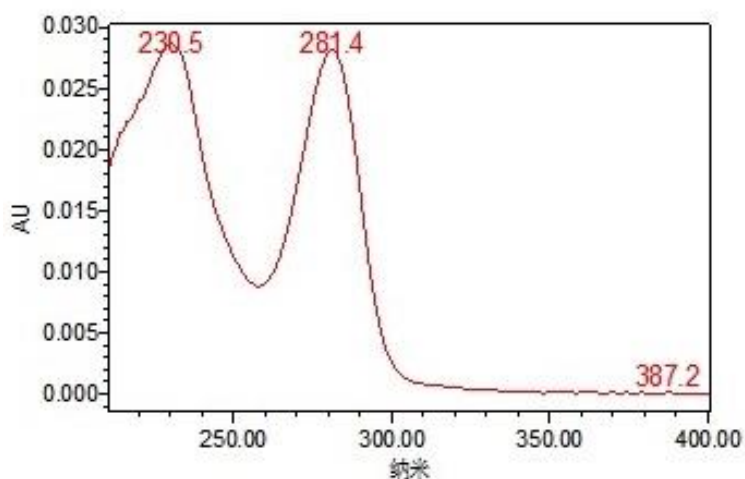


图 1 米诺地尔标准工作液(0.2 μg/mL)紫外扫描图

高效液相色谱中流动相的组成会影响目标化合物的分离,从而影响目标化合物的灵敏度。因此本实验流动相的选择中,比较了乙腈-水,乙腈-0.1%甲酸水溶液,乙腈-0.1%磷酸溶液,乙腈-0.5%磷酸溶液,甲醇-水,甲醇-0.1%甲酸水,作为流动相条件时米诺地尔的检测灵敏度及出峰情况。流动相中没有酸性溶液存在

的情况，如乙腈-水，甲醇-水，目标物会出现峰拖尾、峰型较宽且对称性差、灵敏度下降等情况。当有机相溶液采用甲醇时，目标物在相同洗脱程序下出峰时间明显晚于有机相为乙腈溶液，同时，考虑到乙腈与水相互溶时柱压小于甲醇与水互溶时的柱压，可以有效延长色谱柱的耐用性，流动相选择乙腈及酸性水溶液。为避免甲酸紫外吸收的干扰影响，本实验优化选择了磷酸溶液，并考察了不同酸度的磷酸溶液。结果发现，酸性越强（pH 越低），保留时间越往后移，米诺地尔保留效果越强。然而考虑到目标药物只有单一的化合物，且 0.1%磷酸溶液可以基本满足分离效果，因此，本实验的流动相选择乙腈-0.1%磷酸溶液。同时，为有效分离目标药物，本实验采用了乙腈：0.1%磷酸溶液为 15：85（v/v）的等度洗脱程序。

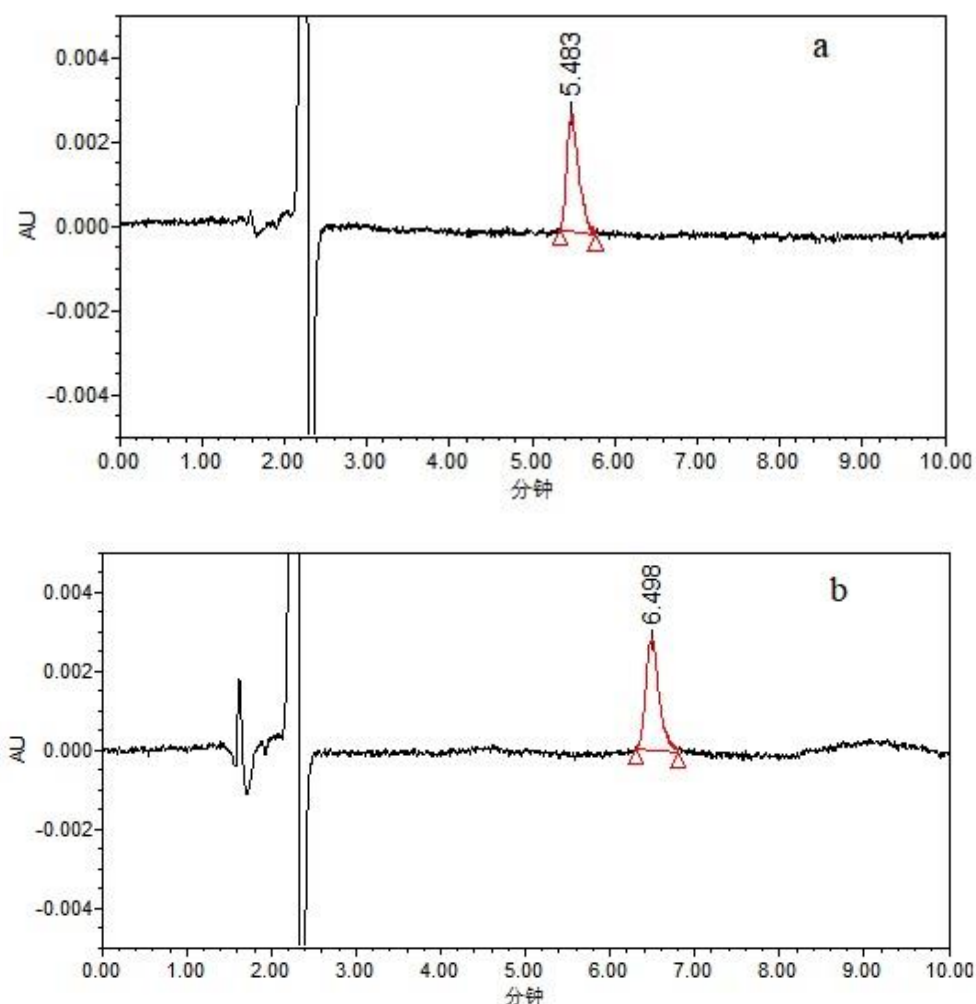


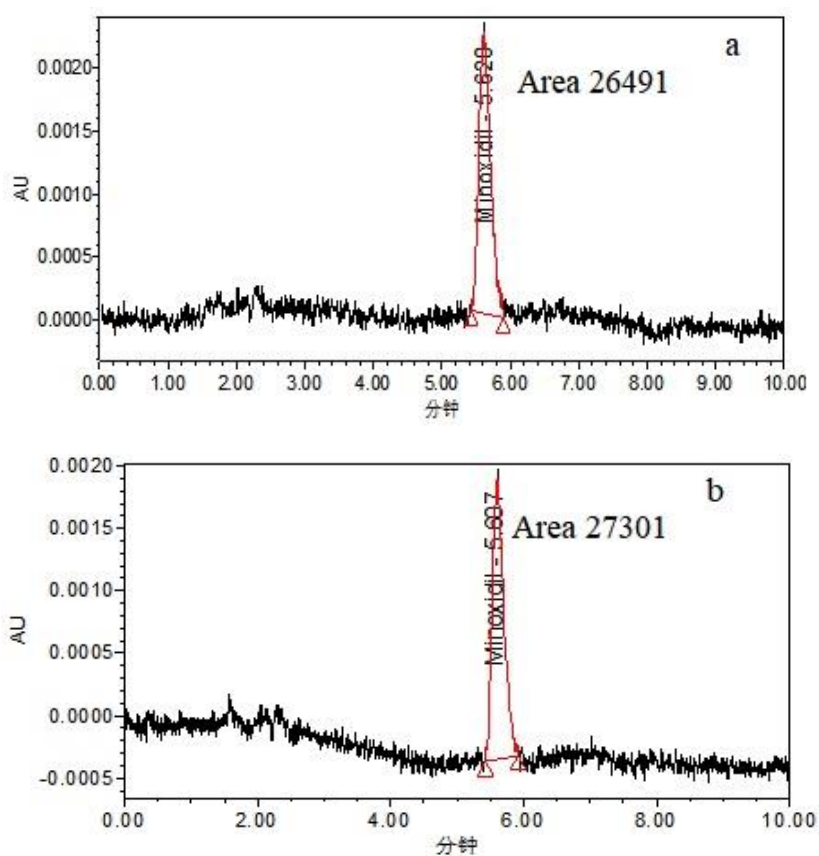
图 2 不同酸度磷酸溶液条件下米诺地尔的高效液相色谱图 (a.0.1% 磷酸溶液；b.0.5% 磷酸溶液)

### 2.1.1.3 定容溶剂的选择

本实验尝试选择中性溶剂水、0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液（85：15，v/v）作为最终进样前的样品定容溶剂进行实验。试验结果发现，采用流动相比比例的乙腈-0.1%磷酸溶液（15：85，v/v）作为样品进样前的定容溶剂，可以有效避免其他杂质的干扰，目标物峰型和目标物响应较好。

### 2.1.1.4 柱温的选择

实验选择 30°C、35°C和 40°C对色谱柱的柱温进行了考察，如图 3 所示，不同柱温条件对实验结果影响不大，因此，实验选择 35°C作为色谱柱的柱温进行实验。



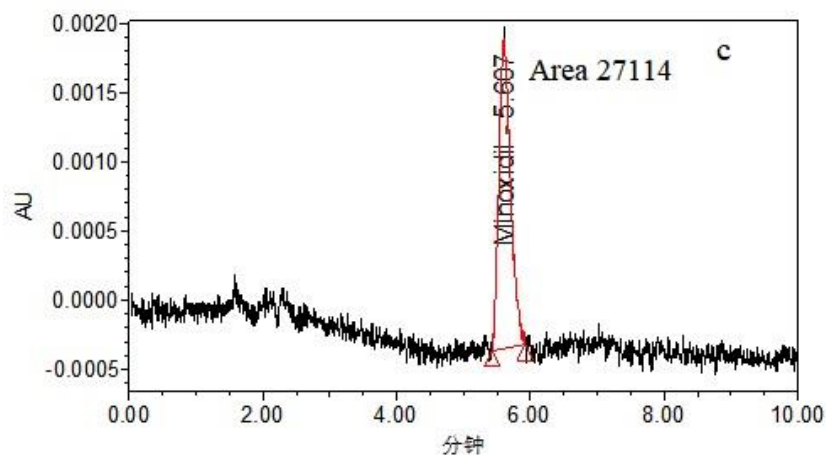


图 3 不同柱温条件下米诺地尔的色谱图 (a.柱温为 30°C; b.柱温为 35°C; c.柱温为 40°C)

### 2.1.1.5 高效液相条件的确定

参考优化后的色谱柱、流动相等，确定高效液相条件为：色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm 或者性能相当；柱温：35°C；流动相：A 相为 0.1% 磷酸溶液，B 相为乙腈；85: 15 (体积比) 等度洗脱；流速：1 mL/min；进样量：50 μL。典型色谱图见图 4。

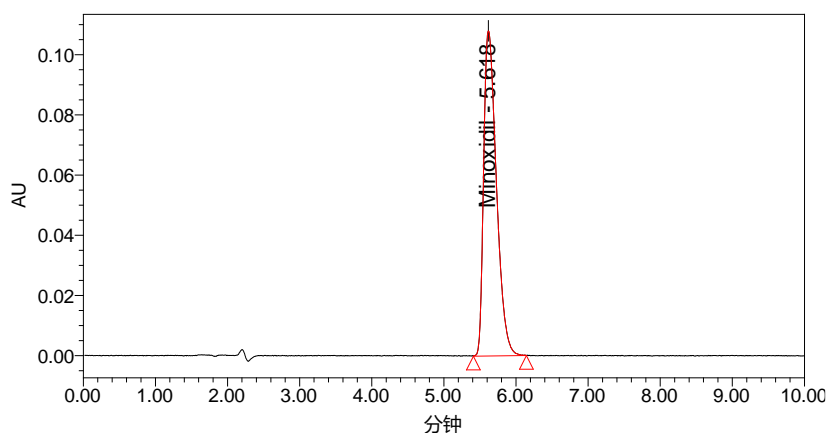


图 4 米诺地尔标准溶液 (5 μg/mL) 高效液相相色谱图

### 2.1.2 样品前处理方法的确定

#### 2.1.2.1 提取剂的选择

向空白基质中进行浓度为 20 mg/kg 的添加，比较甲醇、乙腈、乙酸乙酯、



叔丁基甲醚、甲醇：0.1M 盐酸（50：50，v:v）和甲醇：0.1%甲酸（50：50，v:v）7 种不同提取溶剂的提取效率。如表 2 所示，当提取溶剂为纯有机试剂时，甲醇的提取效果最高。当甲醇中加入水系溶液时，如 0.1M 盐酸和 0.1%甲酸，米诺地尔的提取效率略有下降，同时出峰位置会出现干扰物质。此外，将甲醇提取后的残渣进行二次提取，残渣中未检出米诺地尔，说明甲醇的提取效率较高，故确定甲醇为提取剂，提取一次。

表 2 不同提取剂提取效率考察表（n = 5）

提取剂	添加浓度 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)
甲醇	20	21.02	105.10
乙腈	20	6.19	30.95
乙酸乙酯	20	4.84	24.20
叔丁基甲醚	20	1.37	6.85
0.1M 盐酸（50：50，v:v）	20	17.20	86.00
甲醇：0.1%甲酸（50：50，v:v）	20	17.88	89.40
甲醇提取后残渣二次提取	/	未检出	/

### 2.1.2.2 净化条件的确定

由于本实验目标药物只有一种物质，分离要求相对简单，因此对比了甲醇提取后直接稀释法、经PRiME HLB固相萃取小柱（60 mg/3cm）和混合型强阳离子（MCX）固相萃取小柱（200 mg/6 mL）3种前处理方法。其中，直接稀释法是将2 g 样品经20 mL甲醇提取，取1.0 mL上清液氮气吹干后用1 mL定容液复溶，进样分析。PRiME HLB（60 mg/3cm）固相萃取法是样品经提取后，上清液过柱，再取1.0 mL上清液氮气吹干后用1 mL定容液复溶，进样分析。MCX（200 mg/6 mL）固相萃取法是样品经提取后，取1.0 mL上清液与4 mL0.1%甲酸溶液混合，通过经活化的MCX（200 mg/6 mL）固相萃取柱后，用5%氨水甲醇洗脱，氮气吹干后用1 mL定容液复溶，进样分析。

如图 5 所示，试验结果表明，直接稀释法对配合饲料中添加米诺地尔的回收率较好，但当是预混合饲料或浓缩饲料或精料补充料时，不能很好地除去饲料中

的杂质，因此目标药物的回收率都在 50%~70%之间。当选用 PRiME HLB（60 mg/3cm）固相萃取法时，回收率几乎没有改变。当选用 MCX（200 mg/6 mL）固相萃取时，样品净化效果明显，杂质明显减少，且所有不同饲料中目标药物的回收率均可达到 70%以上。因此实验选择 MCX（200 mg/6 mL）固相萃取小柱更为合适。

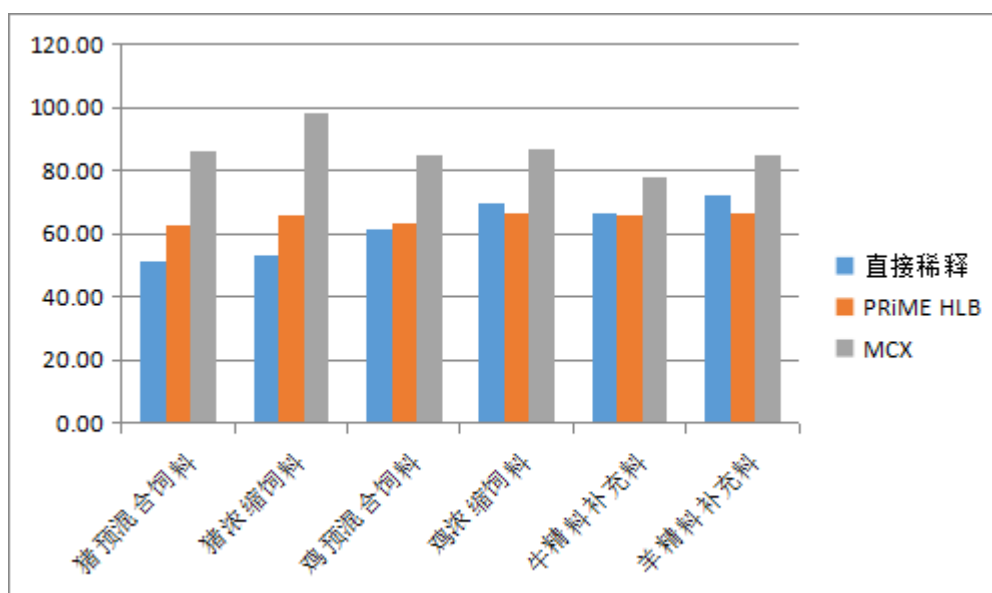


图 5 不同净化手段的样品中米诺地尔回收率比较结果 (添加浓度为 10 mg/kg)

### 2.1.2.3 实验步骤的确定

称取试样 2 g，准确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 甲醇，1500 r/min 振荡提取 20 min，9000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 1.0 mL 于离心管中，加入 4 mL 0.1% 甲酸溶液，涡旋混匀，备用。

取 MCX（200 mg/6 mL）固相萃取小柱，依次加入 3 mL 甲醇、3 mL 水预淋洗，取备用液全部上柱，然后依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗，挤干后用 3 mL 5% 氨水甲醇洗脱，收集洗脱液，于 50 °C 下用氮气吹干，用 1 mL 乙腈：0.1% 磷酸溶液（15：85，v/v）复溶，复溶液过 0.22 μm 滤膜，待测。

## 2.2 高效液相色谱法试验技术验证

### 2.2.1 方法的线性和范围

根据前期调研工作的结果，预混合饲料样品中米诺地尔的含量主要在 10

mg/kg~100 mg/kg 之间。因此，本实验精密取适量米诺地尔标准工作液，用定容液将其稀释至浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$  的标准曲线系列工作溶液，以目标物峰面积对其质量浓度绘制标准曲线，计算线性方程、线性范围及相关系数。结果显示，在 0.1 $\mu\text{g/mL}$  ~50  $\mu\text{g/mL}$  范围内，线性良好。选择 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ~50  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围，绘制标准工作曲线，是合理的。标准曲线见图 6。

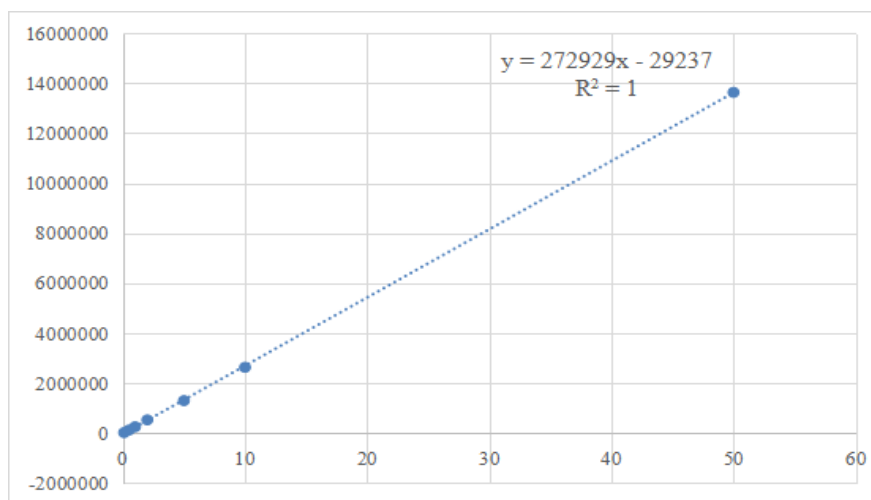
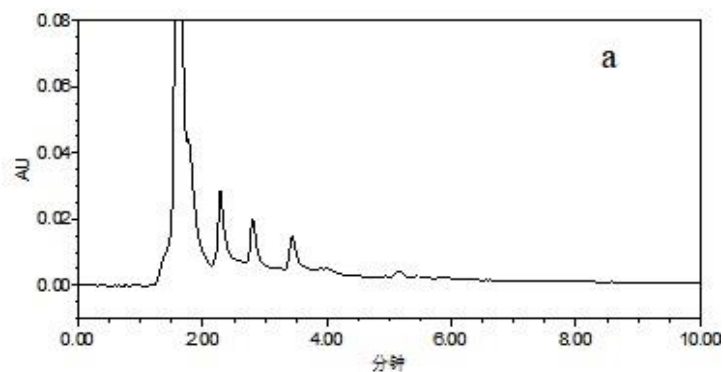
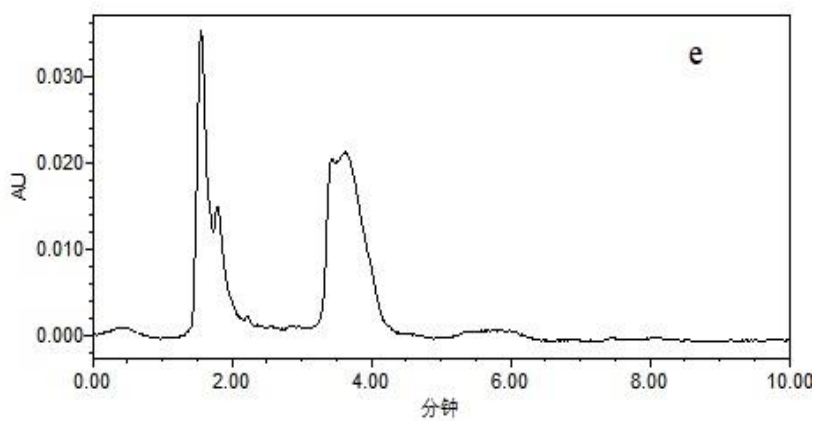
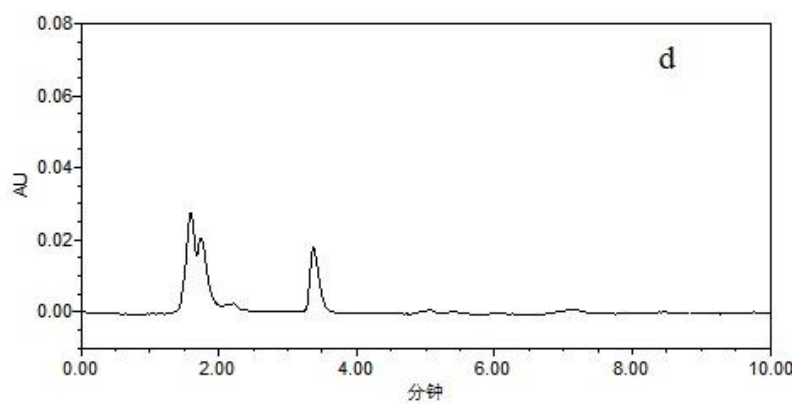
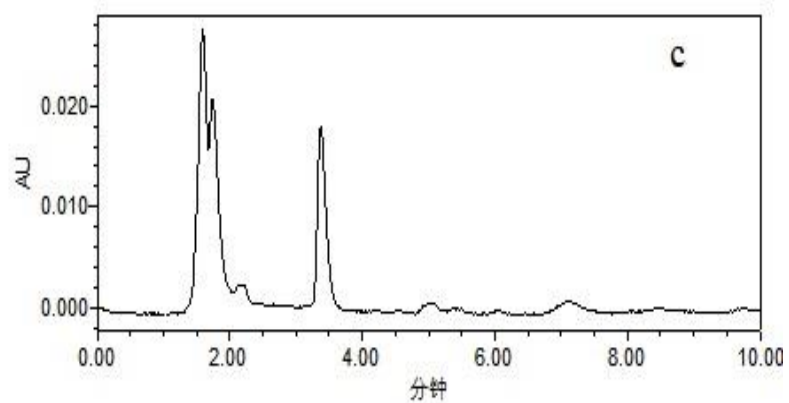
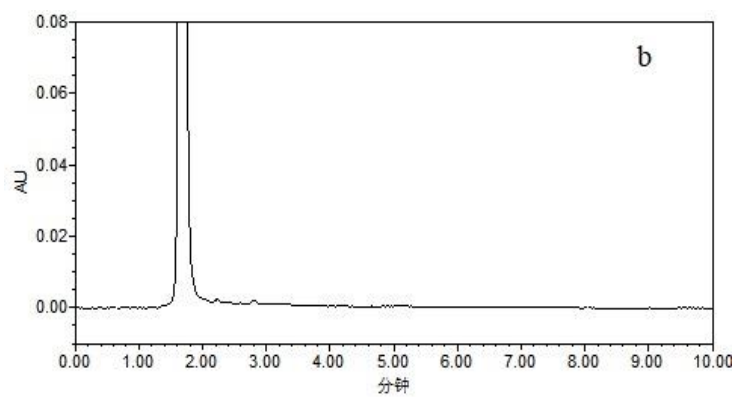


图 6 米诺地尔的标准曲线

## 2.2.2 方法的检出限和定量限

本实验选择猪预混合饲料、鸡预混合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充饲料和羊精料补充饲料 6 类饲料作为考察对象。在上述空白饲料中添加一定浓度的米诺地尔对照品，按照本标准方法进行试验。依据信号与噪声比例，即  $s/n \geq 3$  的浓度为检出限， $s/n \geq 10$  的浓度为定量限的原则，确定了本方法的检出限为 1 mg/kg，定量限为 2 mg/kg。结果见图 7~ 图 9 所示。





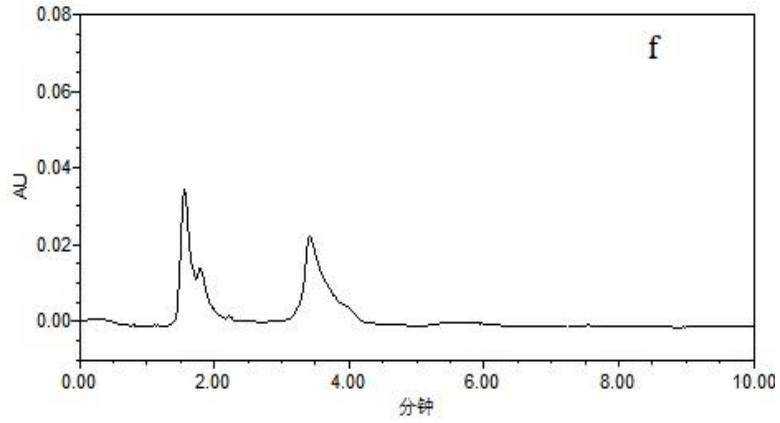
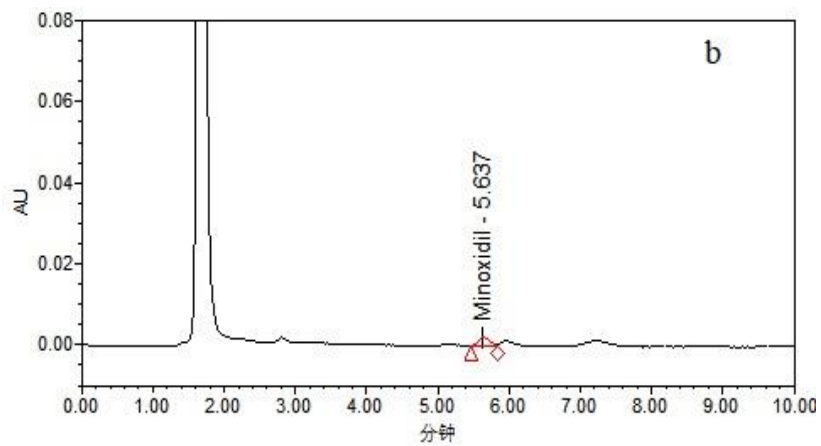
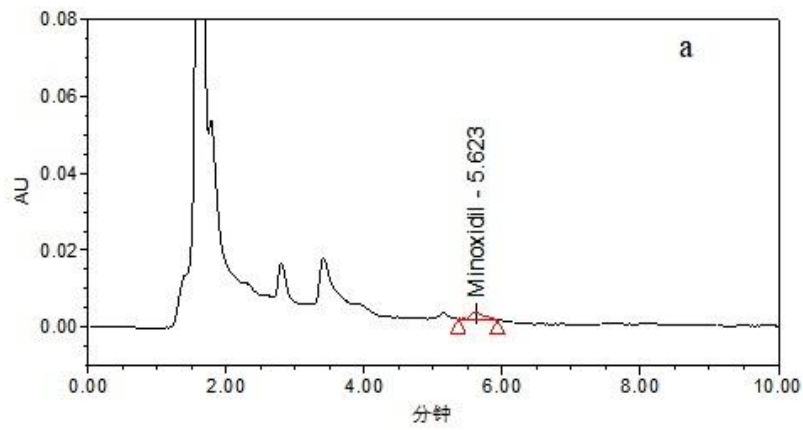
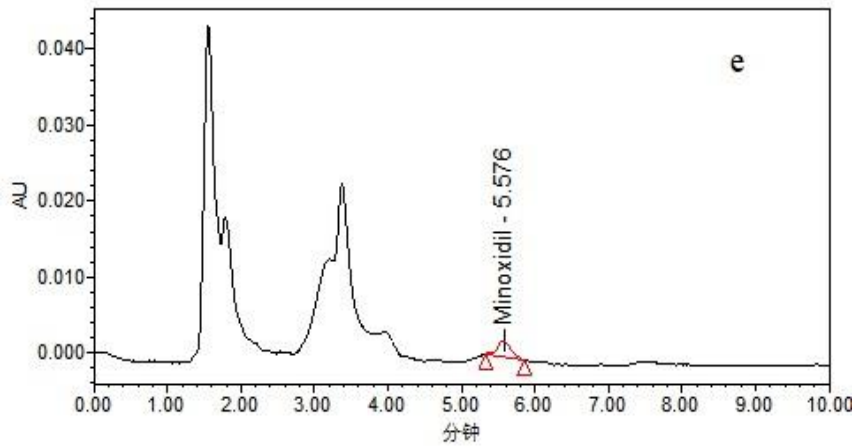
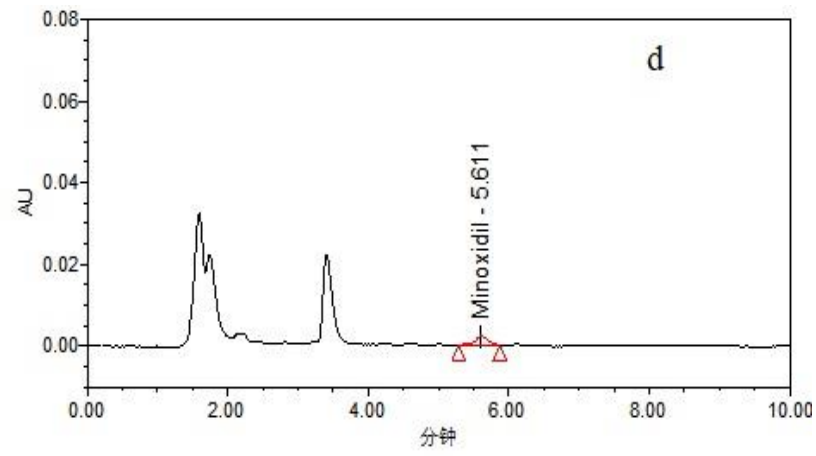
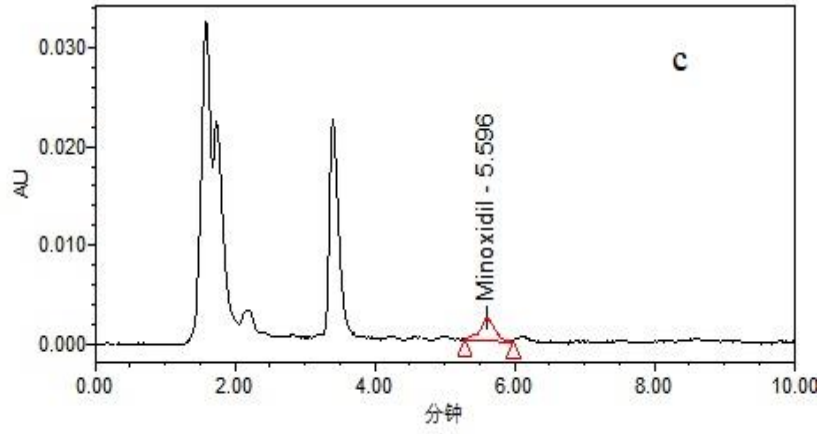


图 7 空白饲料高效液相色谱图：a.空白猪预混合饲料；b.空白鸡预混合饲料；c.空白猪浓缩饲料；d.空白鸡浓缩饲料；e.空白牛精料补充饲料；f. 空白羊精料补充饲料





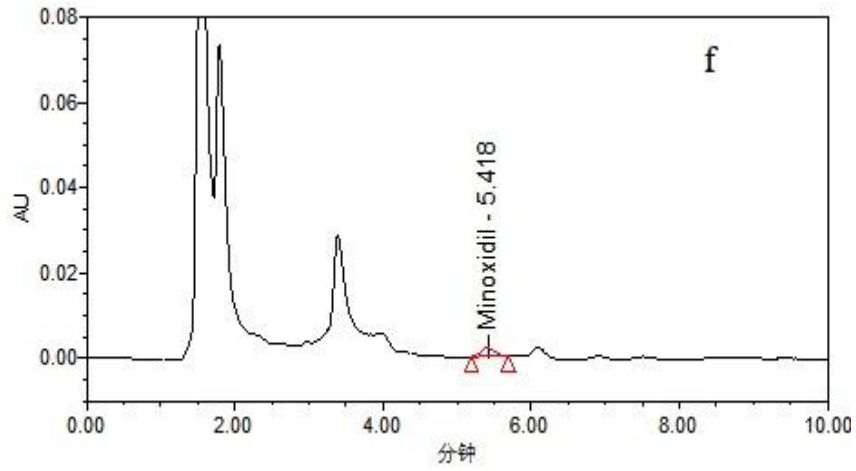
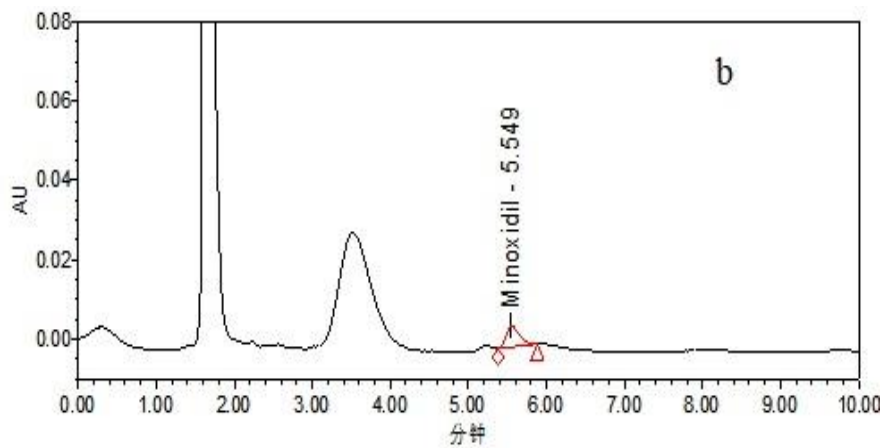
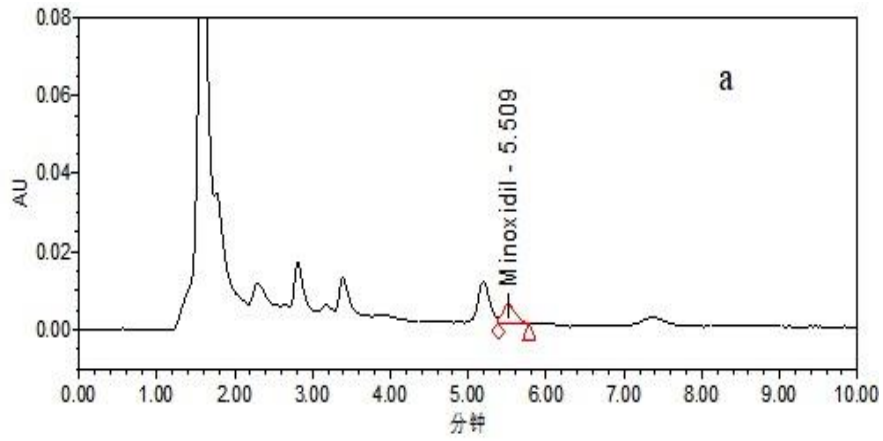
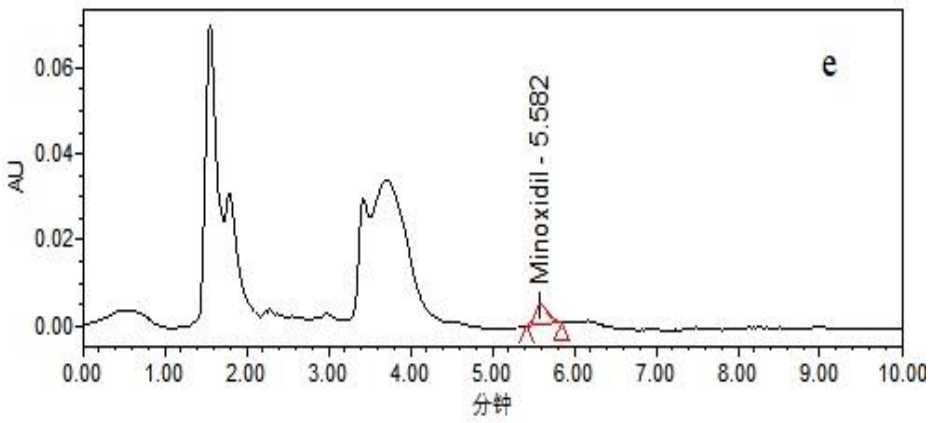
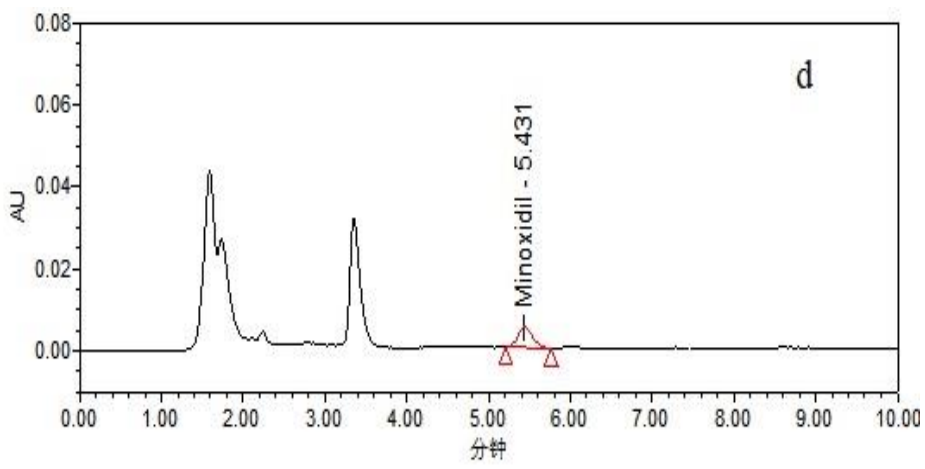
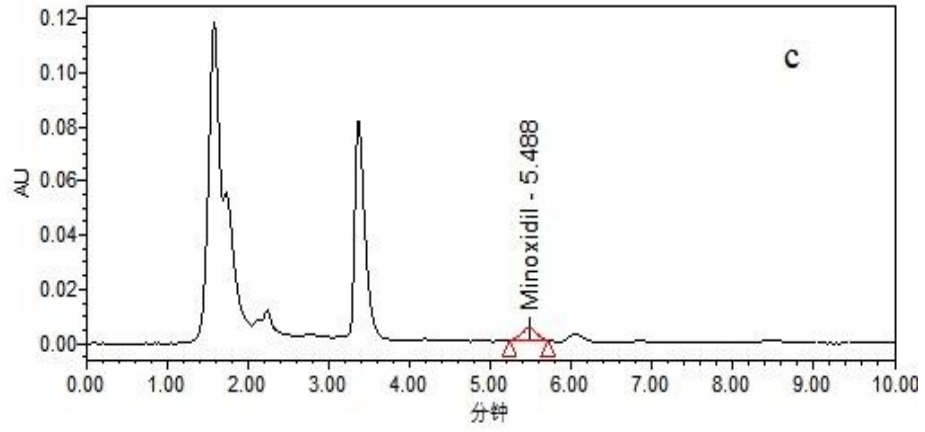


图 8 饲料检出限添加浓度高效液相色谱图: a.猪预混合饲料; b.鸡预混合饲料; c.猪浓缩饲料; d.鸡浓缩饲料; e.牛精料补充饲料; f. 羊精料补充饲料







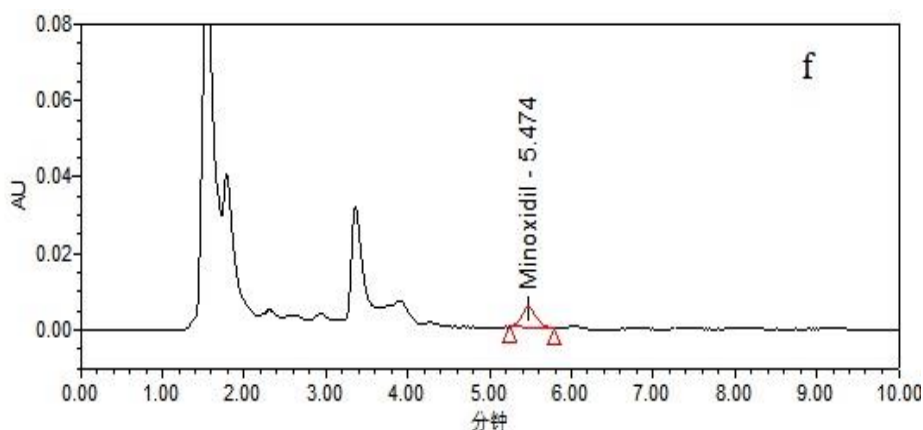


图 9 饲料定量限添加浓度高效液相色谱图: a.猪预混合饲料; b.鸡预混合饲料; c.猪浓缩饲料; d.鸡浓缩饲料; e.牛精料补充饲料; f. 羊精料补充饲料

### 2.2.3 标准品稳定性的考察

取配制好的标准储备溶液（1 mg/mL）于-20 °C避光保存，分别在刚配制完、3个月、6个月时取出，考察其稳定性。取配制好的标准工作溶液（100 μg/mL）于2~8 °C保存，分别在刚配制完、1个月、3个月时取出，考察其稳定性。

每次试验时，分别精确吸取米诺地尔标准储备溶液、工作溶液适量，逐级稀释配置成0.5 μg/mL的标准溶液，上机测定，平行测定两次。结果见表3和表4，储备溶液在-20 °C避光保存6个月内稳定，工作溶液在3个月内比较稳定。因此确定的米诺地尔标准储备溶液的保存期为6个月，标准工作溶液为3个月。

表 3 标准储备溶液稳定性试验结果

时间（月）	0	3	6
平均峰面积	126282	127642	123210

表 4 标准工作溶液稳定性试验结果

时间（月）	0	1	3
平均峰面积	126282	121589	127642

### 2.2.4 方法的准确度和精密度

在确定样品预处理方法后，选择空白猪预混合饲料、鸡预混合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、以及牛和羊精料补充料样品作为测试对象。米诺地尔为禁用药物，需要考察每种样品基质中定量限、2倍定量限、10倍定量限不同浓度的添

加回收实验。此外，由于米诺地尔在实际的混合型饲料添加剂中检出含量为0.4%，根据其说明书中配比计算，预混合饲料还将考察200 mg/kg高浓度的加标回收率实验。加标回收率实验每批次内同一浓度做5次平行实验，共重复3批次。结果见下表5~表10。

6种类型的饲料样品在2~200 mg/kg范围内的批内回收率在82.97%~106.46%之间，批内RSD在0.2%~8.0%之间；批间回收率在88.4%~105.0%之间，批间RSD在0.5%~6.7%之间。方法的回收率及精密度均符合GB/T 23182-2008《饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》要求。

表5 猪预混合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	93.06	2.4	100.7	6.6
	2	103.83	4.4		
	3	105.30	4.0		
4	1	89.75	3.4	92.1	5.2
	2	94.03	3.5		
	3	92.64	7.4		
20	1	106.10	1.6	104.8	2.0
	2	104.59	2.9		
	3	103.85	0.6		
200	1	103.17	2.6	104.1	3.3
	2	105.55	4.5		
	3	103.46	2.5		

表6 鸡预混合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n = 5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	90.00	4.9	88.4	6.0
	2	92.10	4.2		
	3	82.97	2.6		
4	1	97.28	2.0	96.7	1.9
	2	96.74	0.4		
	3	95.97	2.7		
20	1	101.45	0.4	101.7	0.5
	2	101.47	0.3		
	3	102.07	0.4		
200	1	97.55	2.4	94.1	4.1
	2	92.65	3.1		
	3	92.10	4.2		

表7 猪浓缩饲料的准确度及精密度的试验结果 (n = 5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	105.15	2.0	102.8	4.4
	2	102.24	5.6		
	3	101.01	4.8		
4	1	86.69	2.2	89.1	3.4
	2	89.70	2.9		
	3	91.01	3.5		
20	1	97.25	0.5	96.2	0.9
	2	95.67	0.5		
	3	95.57	0.5		

表 8 鸡浓缩饲料的准确度及精密度的试验结果 (n = 5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	98.03	7.4	102.5	5.7
	2	106.15	4.2		
	3	103.46	2.5		
4	1	105.09	2.2	105.0	2.5
	2	106.46	1.6		
	3	103.49	3.2		
20	1	105.08	2.0	103.4	2.8
	2	101.09	3.4		
	3	104.07	1.4		

表 9 牛精料补充料的准确度及精密度的试验结果 (n = 5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	100.64	6.7	95.9	6.7
	2	90.48	4.8		
	3	96.65	3.9		
4	1	100.65	3.6	99.5	2.8
	2	99.12	1.8		
	3	98.69	2.8		
20	1	89.05	0.7	88.8	0.7
	2	88.81	0.2		
	3	88.55	1.1		

表 10 羊精料补充料的准确度及精密度的试验结果 (n = 5)

添加量/mg/kg	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
2	1	97.20	4.0	98.5	4.8
	2	98.71	8.0		
	3	99.74	1.1		
4	1	104.87	1.9	103.1	2.9

	2	101.94	2.2		
	3	102.46	3.9		
	1	91.71	0.8		
20	2	92.87	0.4	92.1	1.1
	3	91.68	1.6		

### 2.2.5 专属性试验

考察常见苯乙醇胺类  $\beta$ -受体激动剂对本方法测定米诺地尔的影响，干扰药物选取苯乙醇胺 A、克伦特罗、西布特罗、西马特罗、溴布特罗，典型图谱见图 10。试验结果表明，上述常见药物对本方法测定米诺地尔无影响。

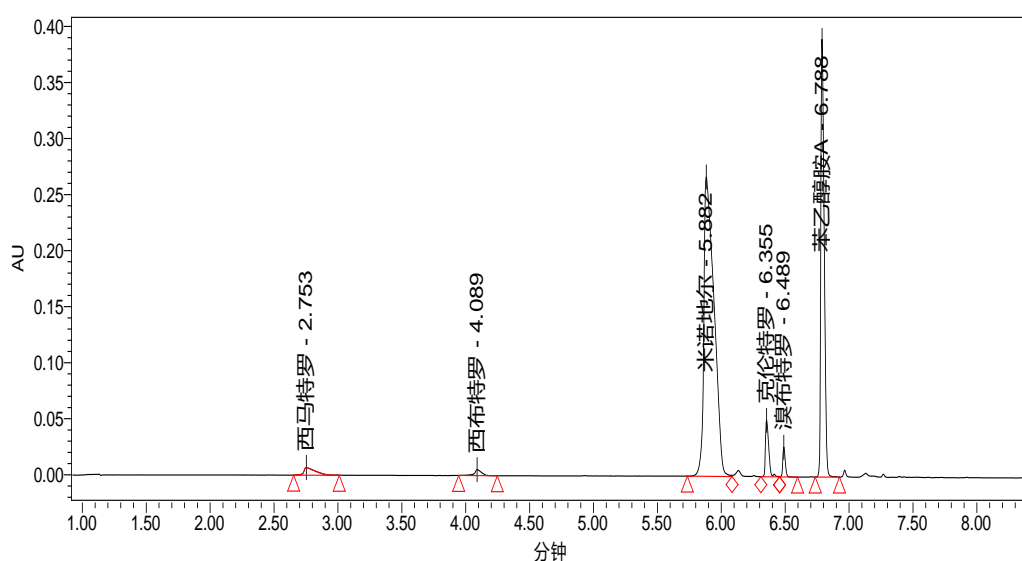


图 10 专属性试验色谱图

## 2.3 液相色谱-串联质谱试验技术制定

### 2.3.1 仪器条件的确定

#### 2.3.1.1 流动相的确定

实验对流动相进行考察，考察了 50% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸），40% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸），25% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸），50% 乙腈溶液（含 0.1% 甲酸），20% 乙腈（含 0.1% 甲酸）。当流动相为 50% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸）时，目标物出峰早，易受到基质中杂质干扰。当流动相为 40% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸）时，目标物峰型较好，但是响应较低。当流动相为 25% 甲醇溶液（含 0.1% 甲酸）时，目标物出峰较晚，但是峰型不对称，且峰型较宽。当流动相为 50%

乙腈溶液（含 0.1%甲酸）时，目标物峰型好，但是出峰早且干扰的杂质多。而当流动相为 20%乙腈（含 0.1%甲酸）时，峰型较好，响应高。因此实验选用 20%乙腈（含 0.1%甲酸）作为流动相。考虑到饲料样品基质较复杂，因此实验选择梯度程序洗脱，洗脱程序见下表 11。

表 11 液相梯度洗脱程序

时间	流速	A相（0.1%甲酸溶液）	B相（0.1%甲酸乙腈）
0		80	20
2		80	20
2.1	0.3	5	95
3.0		5	95
3.1		80	20

### 2.3.1.2 色谱柱的选择

考虑到饲料基质复杂的情况，在方法研制过程中，实验比较了 Waters HSS T3(100mm×2.1mm, 1.8 μm)色谱柱、Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.7 μm) 色谱柱、Thermo C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 2.6 μm) 色谱柱和 Agilent SB-C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.8 μm)色谱柱对目标物的分离度和灵敏度的不同影响。

结果表明，Thermo C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 2.6 μm)色谱柱条件下，目标物出峰时间太早，较容易受到杂质干扰；Agilent SB-C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.8 μm)色谱柱响应高，但是峰型较宽，柱效差；Waters HSS T3(100mm×2.1mm, 1.8 μm)色谱柱峰型较好，出峰时间也更适合，但是峰的响应低，不适合实际检测。而 Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.7 μm)色谱柱峰型更对称，出峰时间较早，响应高，适合实际检测需求。因此，实验最终选择 Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub>(100mm×2.1mm, 1.7 μm)色谱柱进行本次检测方法的开发。

### 2.3.1.3 柱温的选择

试验选择 30℃、35℃和 40℃对色谱柱的柱温进行了考察，如图 11 所示，不同柱温条件对实验结果影响不大，因此，实验选择 35℃作为色谱柱的柱温进行实验。

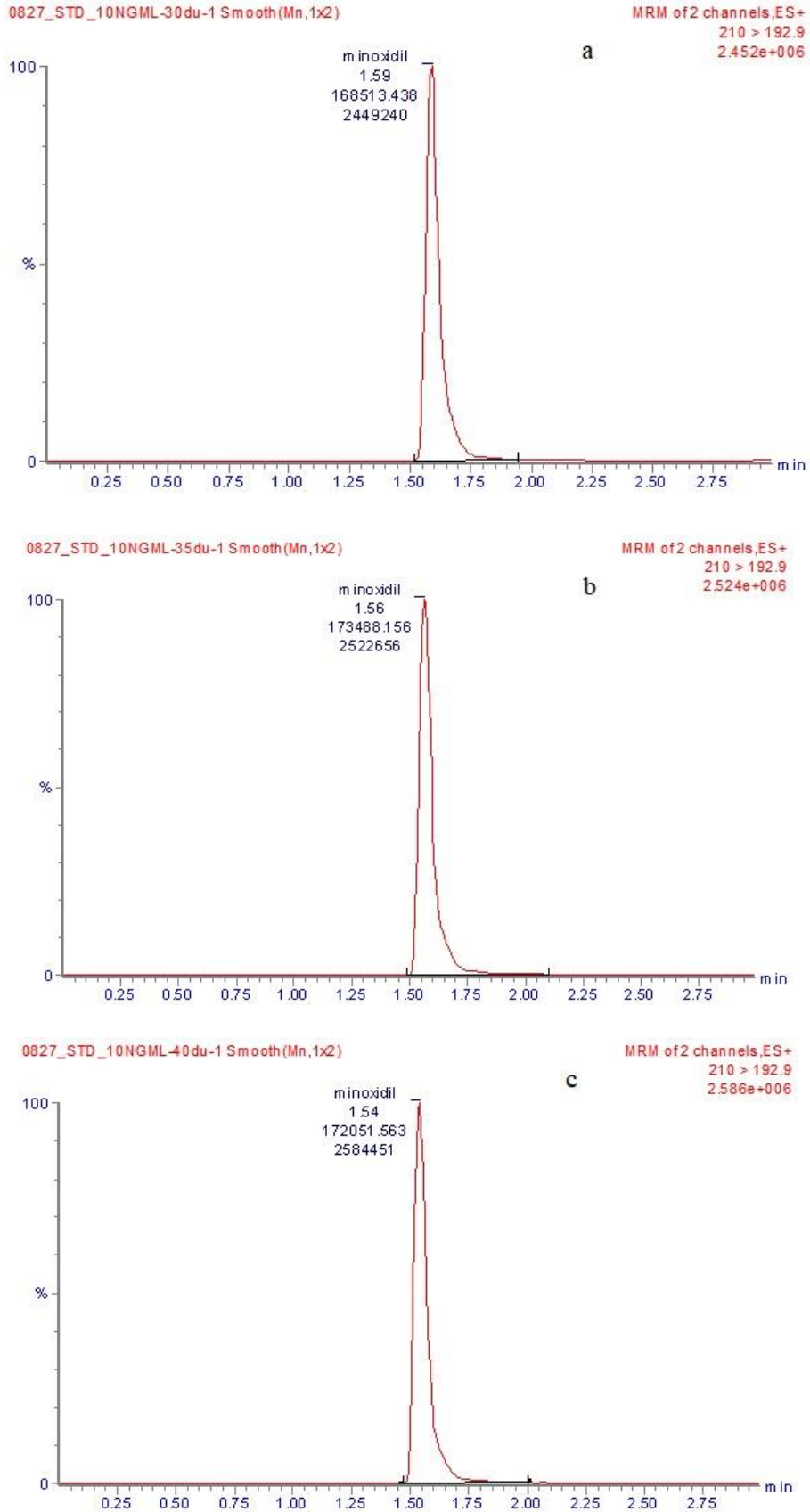


图 11 不同柱温条件下米诺地尔（10 ng/mL）的特征离子质量色谱图（a.柱温为 30°C；  
b.柱温为 35°C；c.柱温为 40°C）

### 2.3.1.4 液相条件的确定

参考优化后的色谱柱和流动相，确定液相条件为：色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm 或者性能相当；柱温：35°C；流动相：A 相为 0.1%甲酸溶液，B 相为 0.1%甲酸乙腈；流速：0.3 mL/min；进样量：10 μL。典型色谱图见图 12。

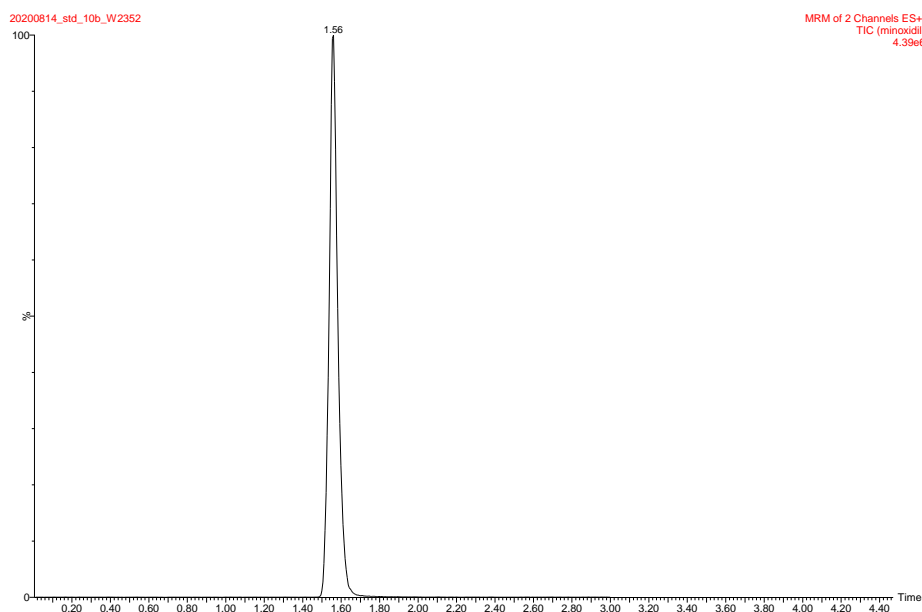


图 12 基于 C<sub>18</sub> 色谱柱的 MRM 色谱图

### 2.3.1.5 监测离子对的选择及质谱条件优化

ESI<sup>+</sup>离子化模式下，采用液相色谱-静电场轨道阱质谱在 50 ~ 1000 m/z 范围内对米诺地尔作二级碎片质谱全扫描，得到米诺地尔的二级碎片全扫描图谱。如图 13 所示，碎片通道 193 和 164 处响应较高。因此，经过液相色谱-串联质谱优化后，选择 210.0 > 192.9 和 210.0 > 163.9 作为监测定性离子对，其中 210.0 > 192.9 作为定量离子对。

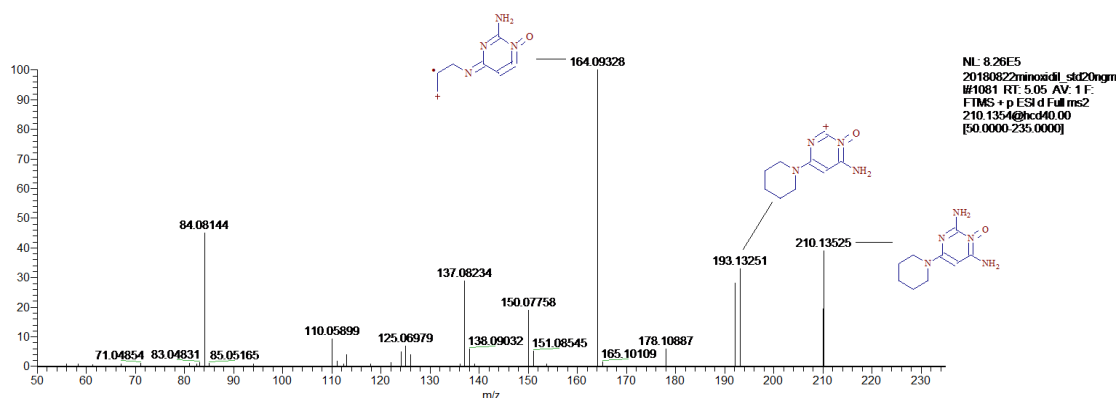


图 13 米诺地尔二级碎片全扫描图谱

比较其提取离子色谱图的响应和峰型，依次优化鞘气流速、辅助气、吹扫气、离子传输温度和雾化器温度，并优化电离电压，在定性分析软件中，选择最优电压参数（表 12）。

质谱参考条件如下

- 电离方式：电喷雾电离（ESI<sup>+</sup>）；
- 采集模式：多反应监测模式（MRM）（采集离子对信息见表 10）；
- 鞘气：800 L/Hr；
- 反吹气：50 L/Hr；
- 雾化器温度：500 °C；
- 电离电压：3.5 kV；
- 孔电压：30 V；
- 源温度：150 °C。

表 12 采集离子对信息

化合物	化学式	理论分子量	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)
米诺地尔	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	209.3	210.0	163.9 192.9*

注：带“\*”为定量离子对。

### 2.3.2 提取条件的确定

#### 2.3.2.1 提取剂的确定

实验向空白基质中添加米诺地尔标准品，通过 70% 甲醇、70% 乙腈、甲醇、乙腈、乙酸乙酯和叔丁基甲醚进行提取来考察提取剂的种类，如表 13 所示，结果表明，当提取剂为甲醇和 70% 甲醇时，提取效率较高，而另外 4 种提取效率低，考虑到后续实验操作的简便性，因此，实验选择甲醇作为提取剂。

表 13 不同提取剂对饲料中米诺地尔的提取效率（n=3）

提取剂	添加量（μg/kg）	回收率/%	rsd/%
70% 甲醇	50	74.8	0.6
70% 乙腈	50	60.7	0.4
甲醇	50	81.8	0.8
乙腈	50	57.2	0.2
乙酸乙酯	50	42.1	1.1
叔丁基甲醚	50	12.1	2.1



### 2.3.2.2 净化条件的确定

实验通过向空白基质中添加米诺地尔标准品，经甲醇提取后，准确取上清 0.5 mL，加入 2 mL 0.1% 甲酸溶液混匀，选择直接稀释法和常用的 HLB (60mg/3mL) 及 MCX (60mg/3 mL) 固相萃取小柱进行净化条件考察。如下表 14 所示，当使用 HLB (60mg/3 mL) 时，添加回收结果较直接稀释法并没有显著提高，这有可能是因为米诺地尔在 HLB (60mg/3 mL) 上的保留较差，在淋洗过程中有部分米诺地尔被洗脱，导致部分损失；而当使用 MCX (60mg/3 mL) 时，添加回收率上升到 95.0%，这有可能是因为 MCX (60mg/3 mL) 小柱对米诺地尔的保留较好，能有效减少基质带来的干扰。因此实验选择 MCX (60mg/3 mL) 作为净化用的固相色谱小柱。

表 14 不同净化条件对饲料中米诺地尔的提取效率 (n=3)

小柱类型	添加量 (μg/kg)	回收率/%	rsd/%
/	50	81.8	0.8
HLB (60mg/3mL)	50	80.9	0.6
MCX (60mg/3mL)	50	95.0	1.0

### 2.3.2.3 提取前处理方法的确定

结合优化后的提取剂和净化条件，最终确定的前处理方法如下：称取试样 2 g，准确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 甲醇，1500 r/min 振荡提取 20 min，9000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 0.5 mL 于离心管中，加入 2 mL 0.1% 甲酸溶液，涡旋混匀，备用。

取 MCX (60 mg/3 mL) 固相萃取小柱，依次加入 3 mL 甲醇、3 mL 水预淋洗，取备用液全部上柱，然后依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗，挤干后用 3 mL 5% 氨水甲醇洗脱，收集洗脱液，于 50 °C 下用氮气吹干，用 1 mL 0.1% 甲酸溶液复溶，复溶液过 0.22 μm 滤膜，待测。

## 2.4 高效液相色谱-串联质谱试验技术验证

### 2.4.1 线性范围

精密取适量米诺地尔标准工作液，用 0.1% 甲酸溶液将其稀释至米诺地尔浓度为 0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准

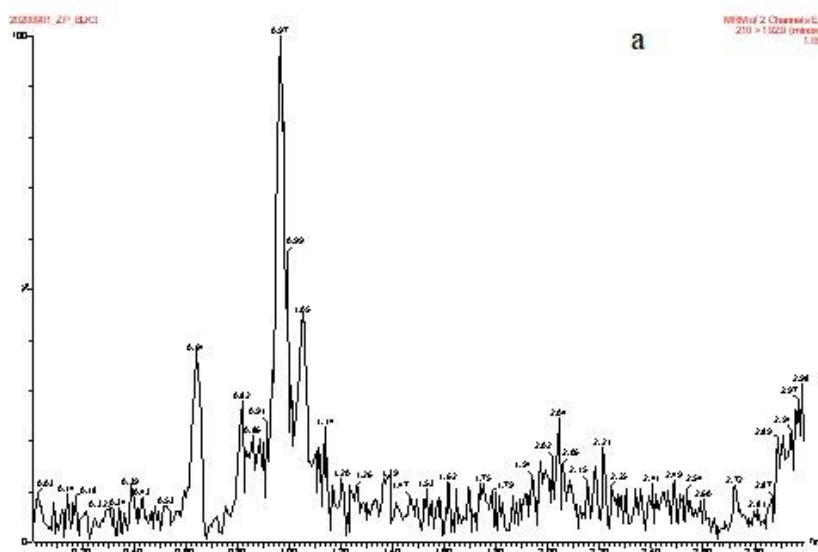
曲线系列工作溶液，在优化的色谱和质谱条件下进行测定，以各组分的峰面积对其质量浓度绘制标准曲线，计算线性方程、线性范围及相关系数，具体结果见表 15。

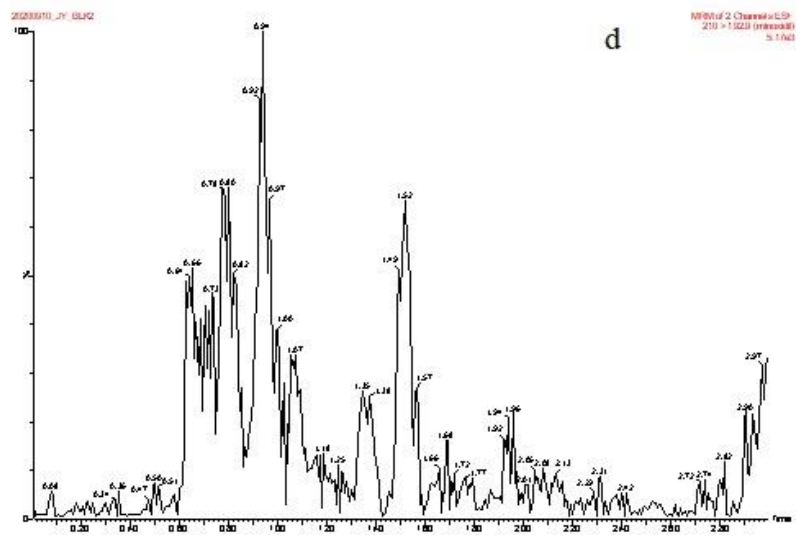
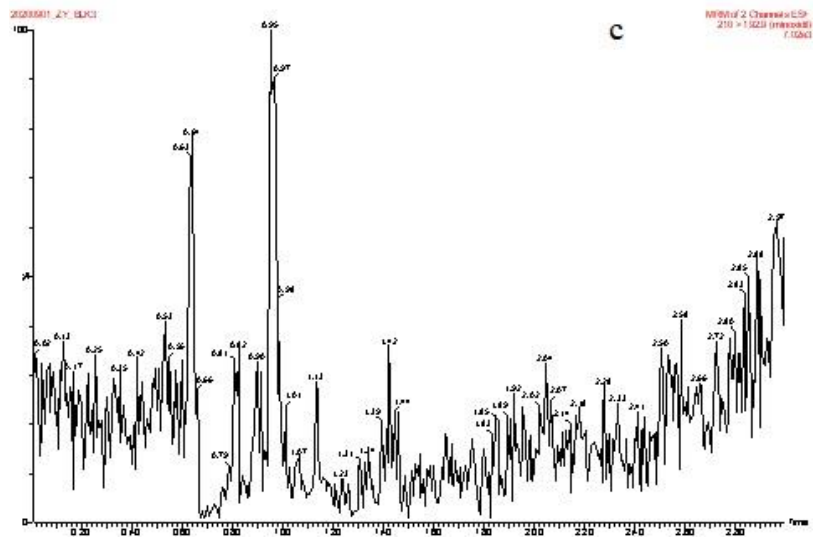
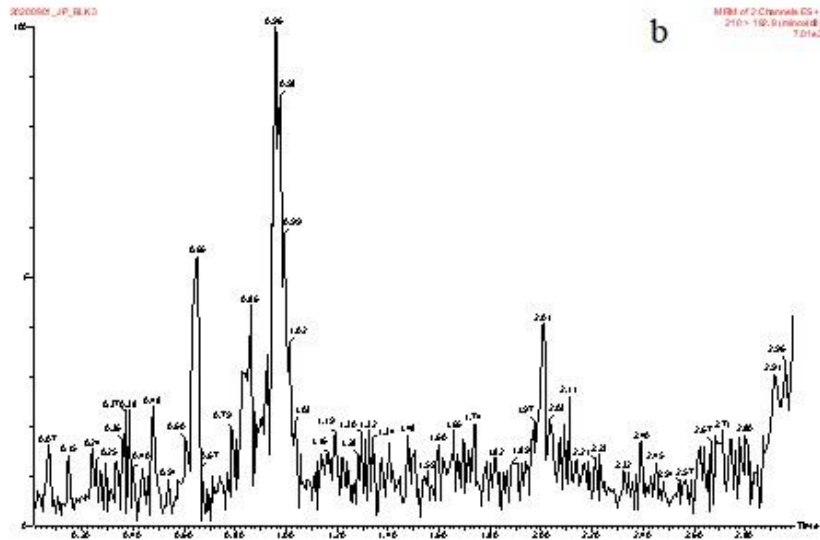
表 15 米诺地尔的线性方程、线性范围、相关系数

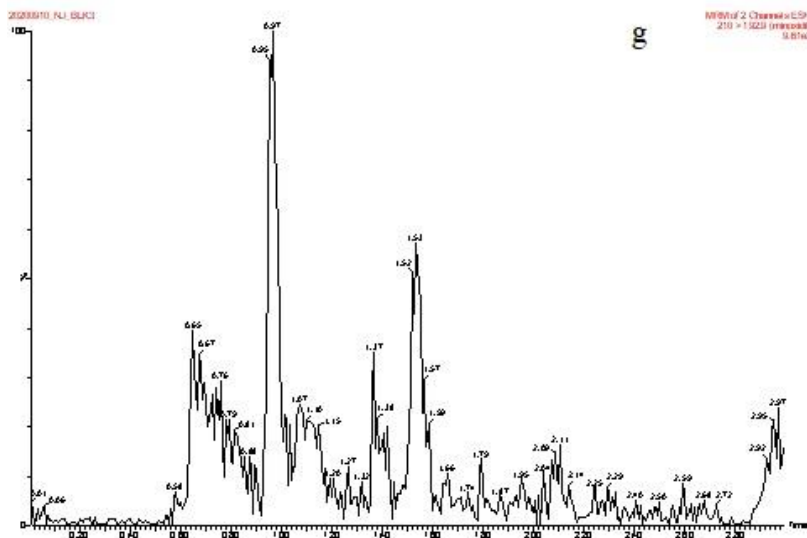
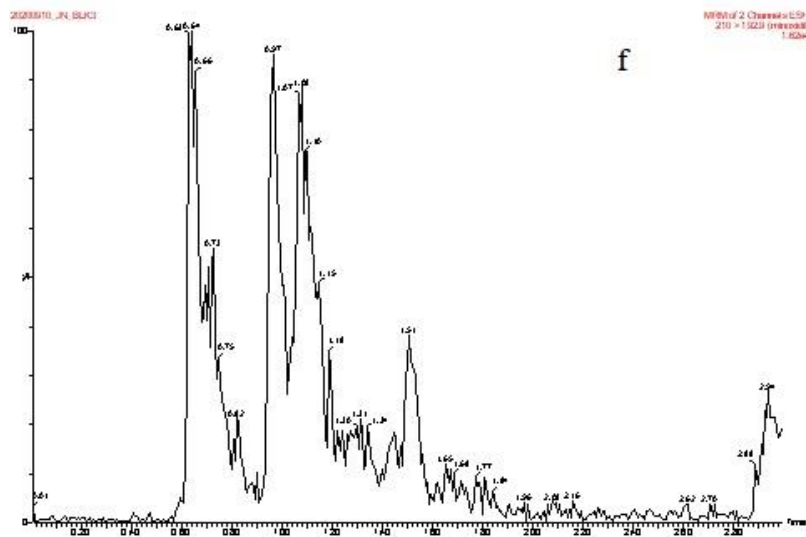
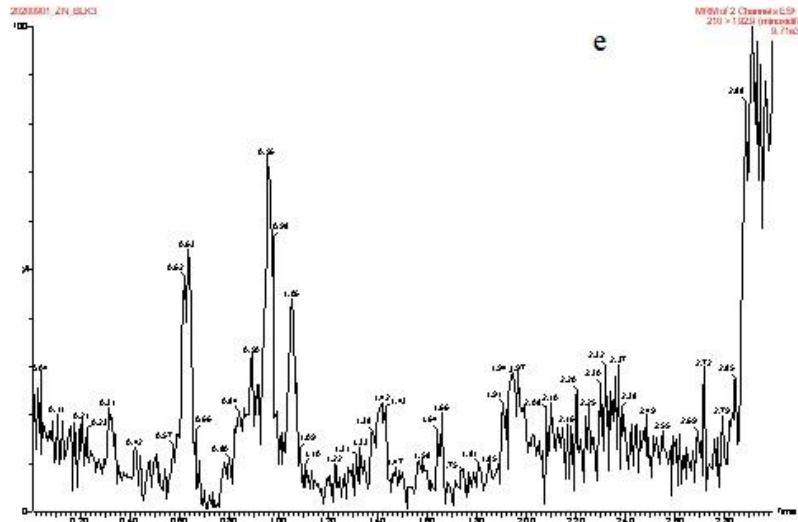
化合物	线性方程	线性范围/ (ng/mL)	$r^2$
米诺地尔	$Y=10887X+48790$	0.1 ~ 200	0.9954

#### 2.4.2 方法的检出限和定量限

本实验选择猪配合饲料、鸡配合饲料、猪预混合饲料、鸡预混合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充饲料和羊精料补充饲料 8 类饲料作为考察对象。在上述空白饲料中添加一定浓度的米诺地尔对照品，按照本标准方法进行试验。依据信号与噪声比例，即  $s/n \geq 3$  的浓度为检出限， $s/n \geq 10$  的浓度为定量限的原则，确定了本方法的检出限为  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果见图 14~图 16。







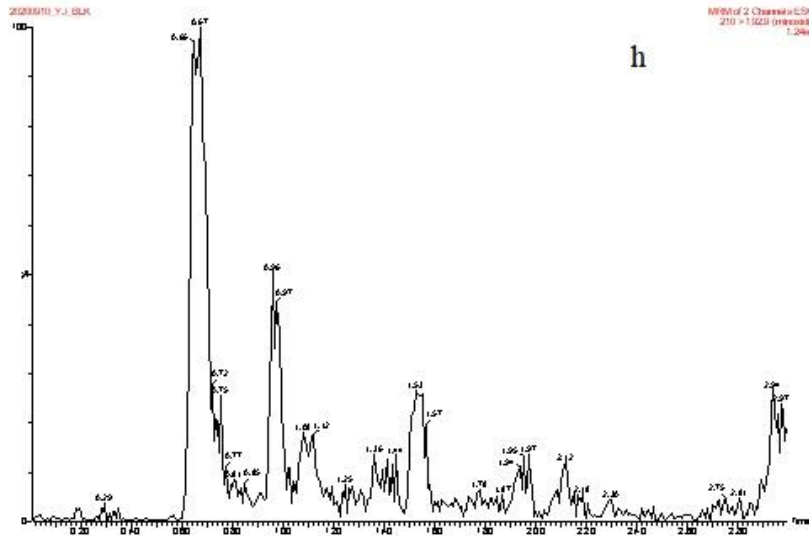
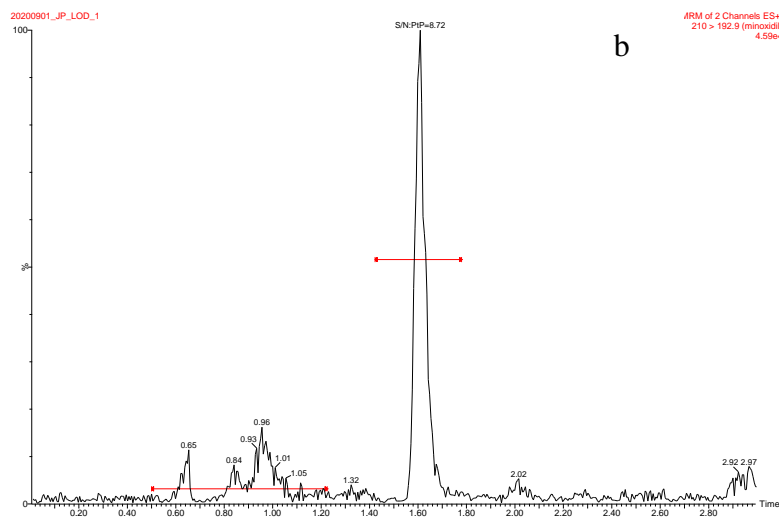
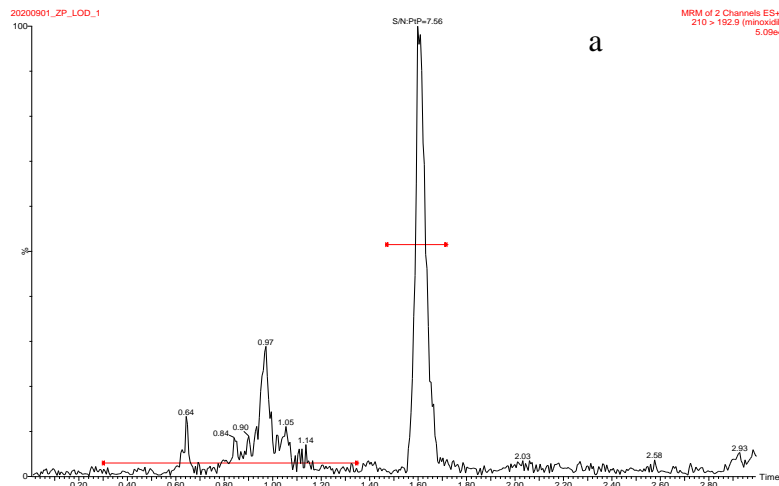
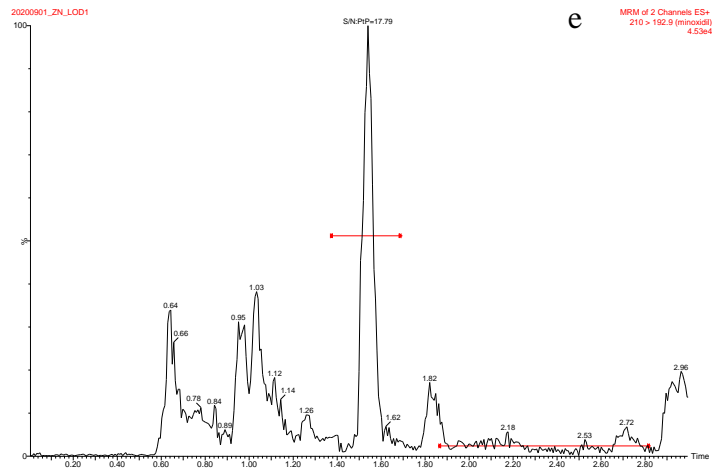
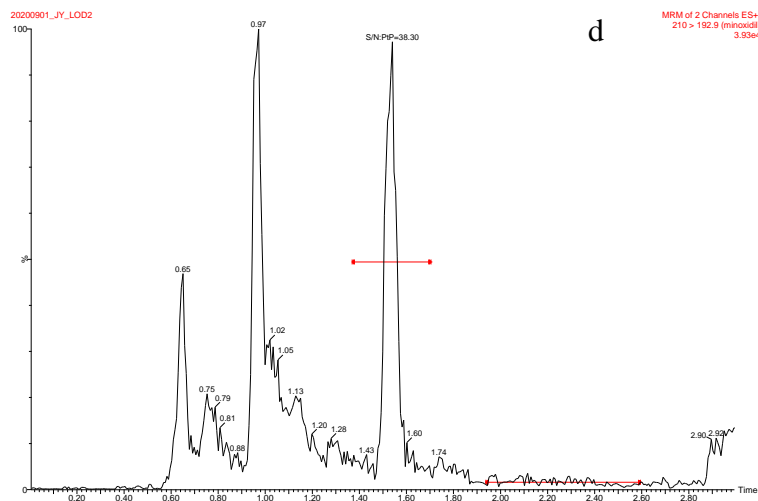
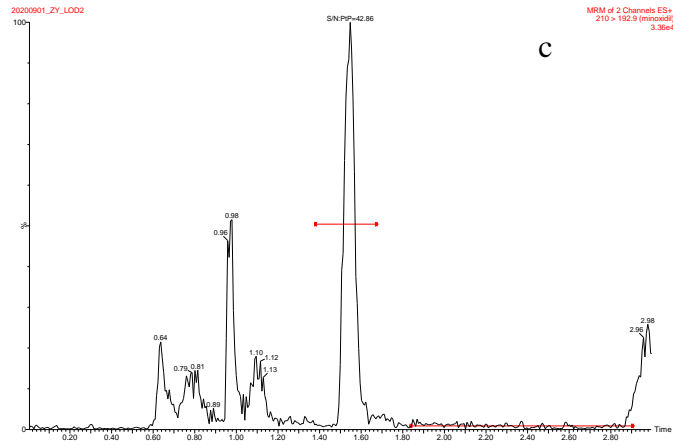


图 14 空白饲料试验特征离子质量色谱图：a.空白猪配合饲料；b.空白鸡配合饲料；c.空白猪预混合饲料；d.空白鸡预混合饲料；e.空白猪浓缩饲料；f.空白鸡浓缩饲料；g.空白牛精料补充饲料；h.空白羊精料补充饲料





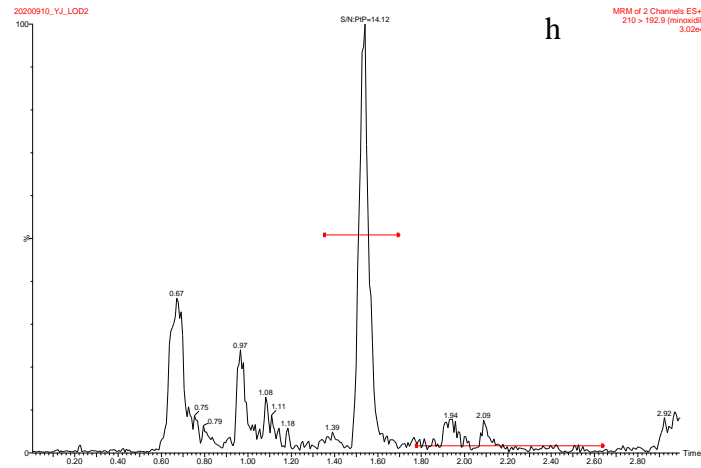
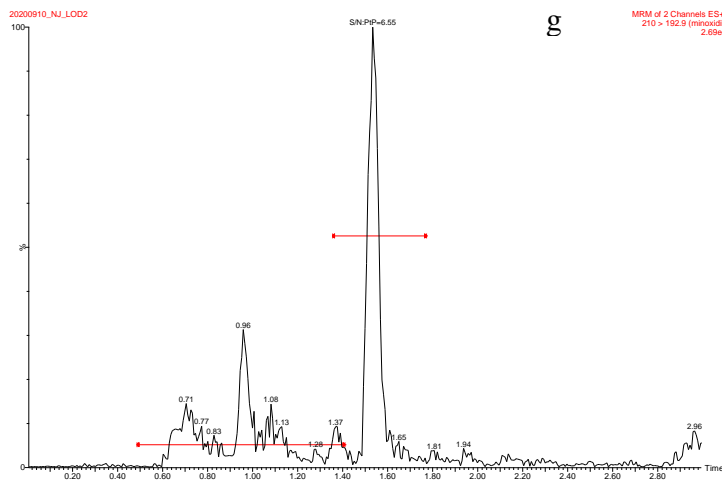
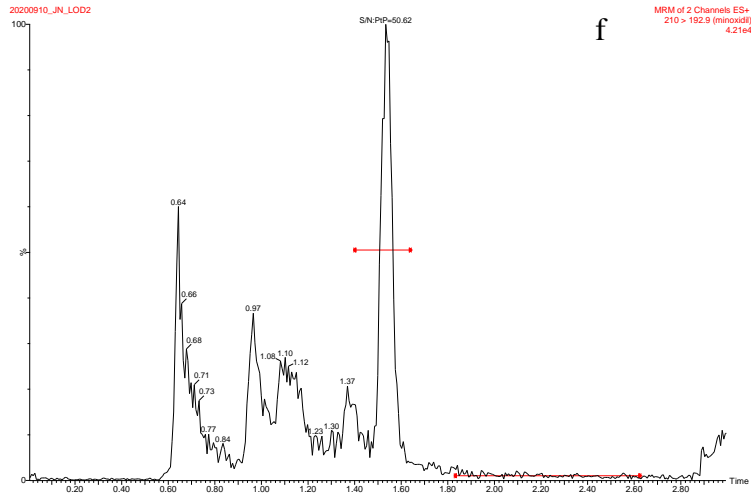
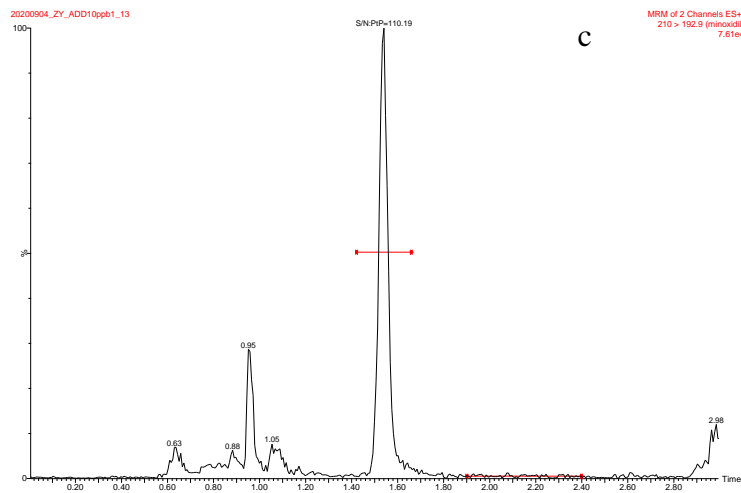
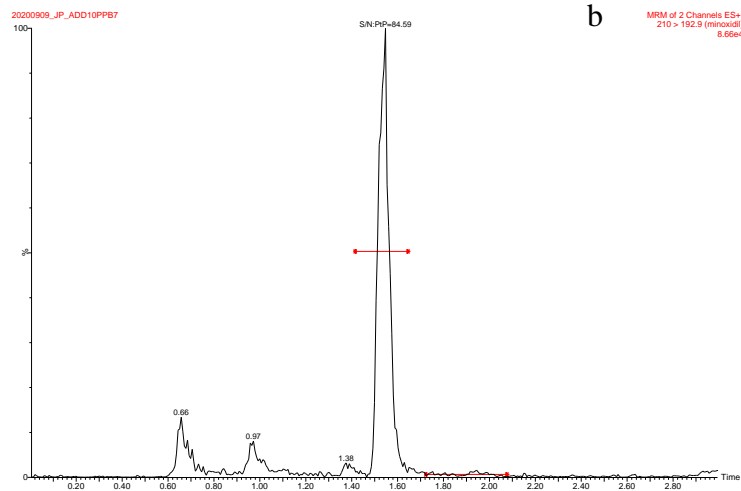
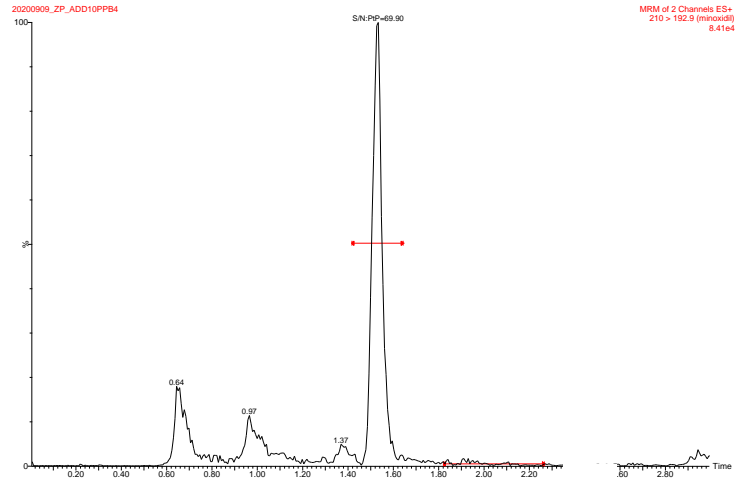
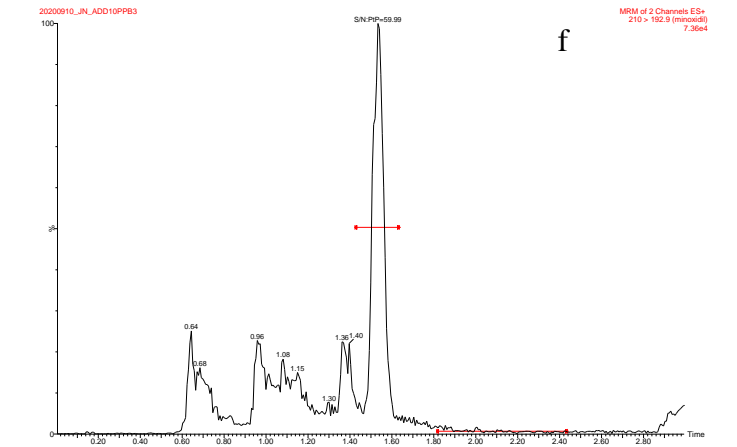
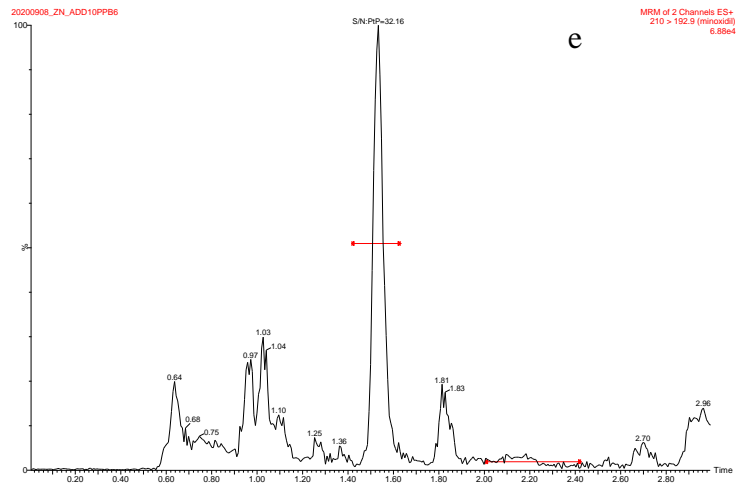
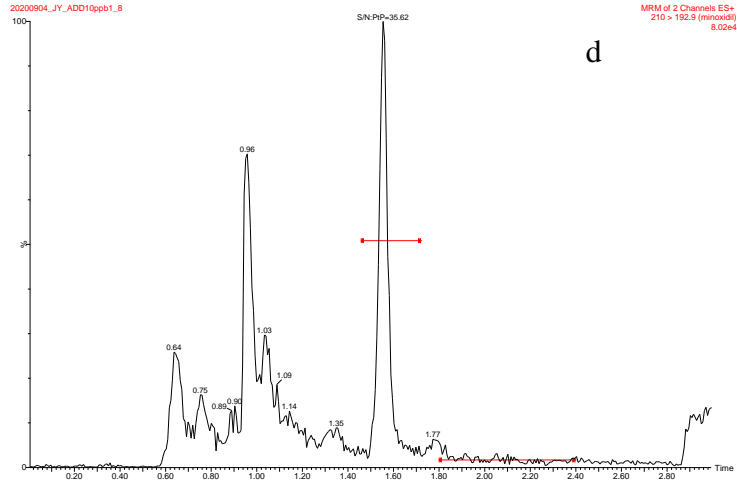


图 15 饲料检出限添加浓度特征离子质量色谱图：a.猪配合饲料；b.鸡配合饲料；c.猪预混合饲料；d.鸡预混合饲料；e.猪浓缩饲料；f.鸡浓缩饲料；g.牛精料补充饲料；h.羊精料补充饲料

a







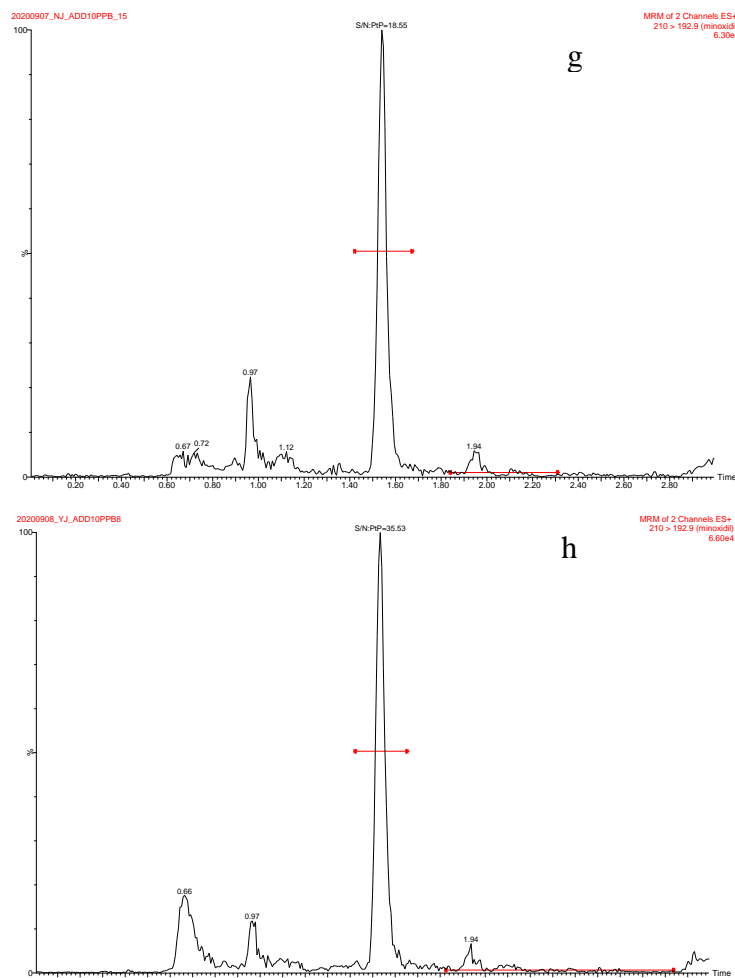


图 16 饲料定量限添加浓度特征离子质量色谱图：a.猪配合饲料；b.鸡配合饲料；c.猪预混合饲料；d.鸡预混合饲料；e.猪浓缩饲料；f.鸡浓缩饲料；g.牛精料补充饲料；h.羊精料补充饲料

### 2.4.3 方法准确度及精密度考察

在确定样品预处理方法后，选择空白猪配合饲料、鸡配合饲料、猪预混合饲料、鸡预混合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、以及牛和羊精料补充料 8 类空白饲料样品作为测试对象。分别添加低、中、高 4 个浓度的标准溶液进行添加回收实验。每批次内同一浓度做 5 次平行实验，共重复 3 批次。结果见下表 16~表 23。

不同类饲料中米诺地尔各浓度的批内回收率在 66.20% ~ 102.96%之间，批内 RSD 在 0.5% ~ 14.5%之间；批间回收率在 66.3% ~ 101.8%之间，批间 RSD 在 0.5 ~ 11.5%之间。结果均符合 GB/T 23182-2008 《饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》相应要求。

表 16 猪配合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收率	批内 rsd	批间平均回收率	批间 rsd
10	1	94.96	3.4	94.1	3.3
	2	93.52	3.5		
	3	93.76	3.7		
50	1	89.79	6.1	89.7	5.5
	2	89.36	6.3		
	3	90.04	5.1		
100	1	83.85	6.7	84.0	6.3
	2	84.31	7.1		
	3	83.86	6.5		
5000	1	73.48	0.5	73.3	0.5
	2	73.04	0.6		
	3	73.30	0.5		

表 17 鸡配合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收率	批内 rsd	批间平均回收率	批间 rsd
10	1	80.12	8.3	79.4	6.4
	2	79.00	6.4		
	3	79.04	5.4		
50	1	82.24	2.2	82.1	1.8
	2	81.97	1.1		
	3	82.19	2.3		
100	1	79.19	7.7	79.0	7.1
	2	79.01	7.6		
	3	78.74	7.8		
5000	1	73.21	3.5	73.0	3.4
	2	73.11	3.6		
	3	72.77	3.9		

表 18 猪预混合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收率	批内 rsd	批间平均回收率	批间 rsd
10	1	81.00	3.2	80.7	2.5
	2	80.00	1.9		
	3	81.16	2.7		
50	1	83.64	9.0	84.9	8.2
	2	83.94	8.5		
	3	87.10	8.4		
100	1	79.76	2.3	80.1	2.8
	2	80.02	2.7		
	3	80.58	3.7		

5000	1	89.43	4.6	89.0	4.5
	2	89.65	4.6		
	3	87.83	4.9		

表 19 鸡预混合饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
10	1	78.04	3.5	77.3	3.8
	2	77.64	2.7		
	3	76.12	5.3		
50	1	74.54	0.9	74.7	1.1
	2	74.82	0.8		
	3	74.83	1.5		
100	1	71.47	3.9	71.1	3.4
	2	71.28	3.7		
	3	70.65	3.1		
5000	1	101.16	5.4	101.8	5.2
	2	101.33	5.6		
	3	102.96	5.7		

表 20 猪浓缩饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
10	1	91.32	2.0	90.4	2.6
	2	90.04	3.1		
	3	89.88	2.9		
50	1	84.12	3.7	84.7	3.6
	2	84.24	4.1		
	3	85.64	3.5		
100	1	86.07	7.0	85.3	6.4
	2	86.17	6.5		
	3	83.78	6.7		
5000	1	85.34	0.9	85.4	1.0
	2	85.08	0.9		
	3	85.78	1.1		

表 21 鸡浓缩饲料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
10	1	84.40	1.7	84.7	2.9
	2	86.36	3.0		
	3	83.32	3.0		
50	1	82.01	3.1	82.3	2.0
	2	82.52	1.8		
	3	82.40	0.7		

100	1	80.55	3.3	80.9	3.0
	2	80.84	2.7		
	3	81.31	3.5		
5000	1	93.57	4.5	93.6	4.1
	2	93.60	4.5		
	3	93.71	4.2		

表 22 牛精料补充料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
10	1	66.20	7.9	66.3	10.0
	2	66.28	14.5		
	3	66.56	8.8		
50	1	77.07	3.5	77.6	3.8
	2	78.27	3.7		
	3	77.49	4.8		
100	1	72.13	9.6	72.1	8.6
	2	72.07	8.8		
	3	72.03	9.6		
5000	1	94.96	2.1	94.7	2.0
	2	94.76	2.2		
	3	94.47	2.4		

表 23 羊精料补充料的准确度及精密度的试验结果 (n=5)

添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	批次	批内平均回收		批间平均回收	
		率	批内 rsd	率	批间 rsd
10	1	74.16	6.9	73.3	5.5
	2	72.68	6.8		
	3	73.00	3.3		
50	1	79.92	13.4	80.1	11.5
	2	80.33	12.6		
	3	79.95	11.1		
100	1	73.43	2.9	73.7	2.6
	2	73.56	2.9		
	3	74.24	2.6		
5000	1	82.55	6.3	82.5	5.9
	2	82.29	6.2		
	3	82.64	6.5		

#### 2.4.4 标准工作液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的稳定性试验

鉴于标准工作溶液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 浓度较高, 故每次测定其稳定性时, 临时稀

释成浓度为 40 ng/mL 的标准溶液，上机测定。结果如表 24 所示，标准工作液于 2℃ ~ 8℃ 保存，有效期为 2 个月。

表 24 标准工作溶液稳定性试验结果 (n = 3)

时间 (月)	0	1	2
平均峰面积	383042.0	382719.0	381864.9

#### 2.4.5 基质效应

化学分析中，基质指的是样品中被分析物以外的组分，基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰。质谱检测是基于化合物离子化并通过特定的核质比来检测和定量，因此任何干扰待测物离子化的物质都可能影响检测方法的灵敏度和选择性。

基质效应是指在样品测试过程中，由待测物以外的其他物质的存在，直接或间接影响待测物响应的现象。基质效应主要是由质谱检测器的离子化过程产生的，在电喷雾时，基质内的组分与目标化合物共同流出喷雾针，对电荷产生竞争，它们将产生的雾滴牢牢吸在一起，改变了带电雾滴的表面张力，影响目标物的雾化、挥发、分裂、化学反应以及带电过程，致使进入质谱的离子减少或增加，从而影响定量分析的可靠性和准确性。

基质效应可通过公式  $ME (\%) = \frac{\text{基质溶液中分析物峰面积}}{\text{纯溶剂中分析物峰面积}} \times 100\%$ ，来评价。ME 在 85% ~ 115% 之间一般认为不存在基质效应；当 ME 低于 85% 时，则认为基质对目标化合物的响应产生抑制作用；当 ME 高于 115% 时，则认为基质对目标化合物的响应存在增强作用。在此步骤中分别比较了不同空白基质中添加 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  检测结果，ME 值在 85.1% ~ 109.8% 之间，结果显示基质对目标物质检测并没有抑制或增强作用，典型离子色谱图见图 17 ~ 图 25。因此在实际检测的过程中，实验选择外标法进行定量。

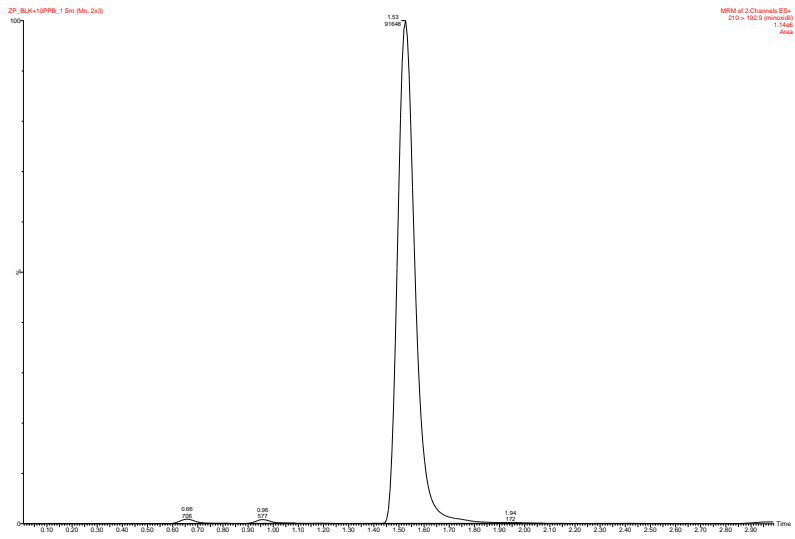


图 17 猪配合饲料提取效率实验特征离子质量色谱图

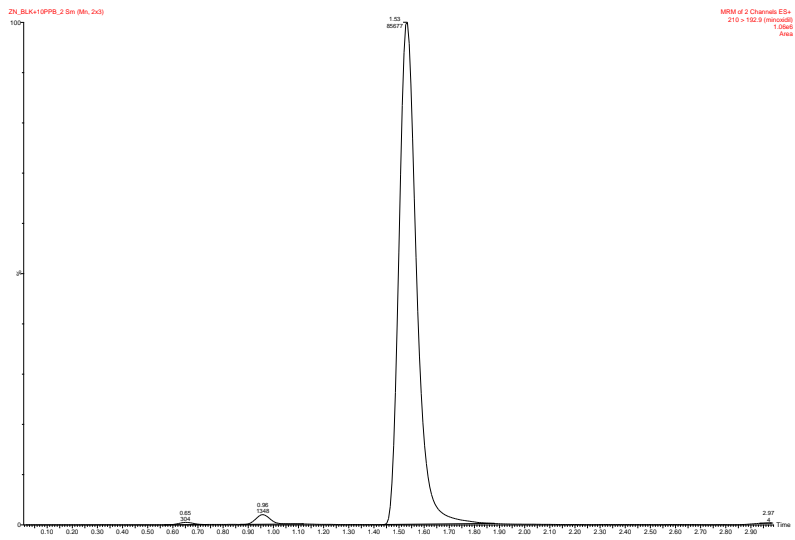


图 18 猪浓缩饲料提取效率实验特征离子质量色谱图

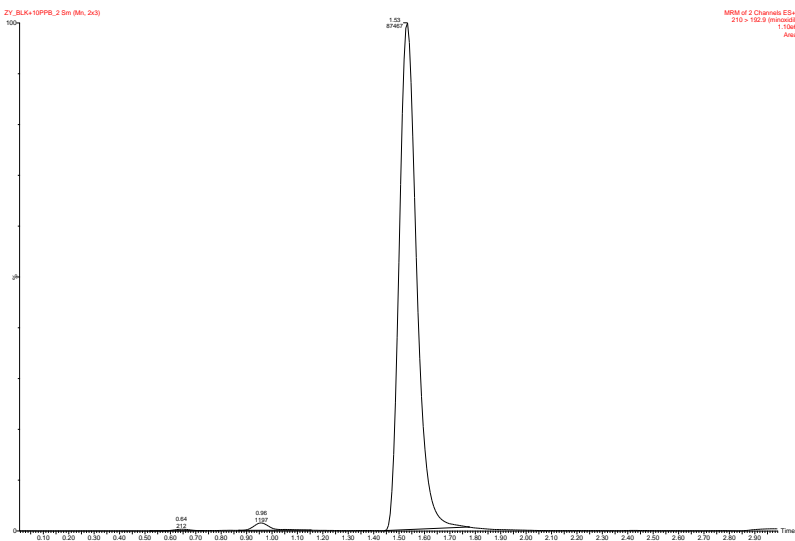


图 19 猪预混合饲料提取效率实验特征离子质量色谱图

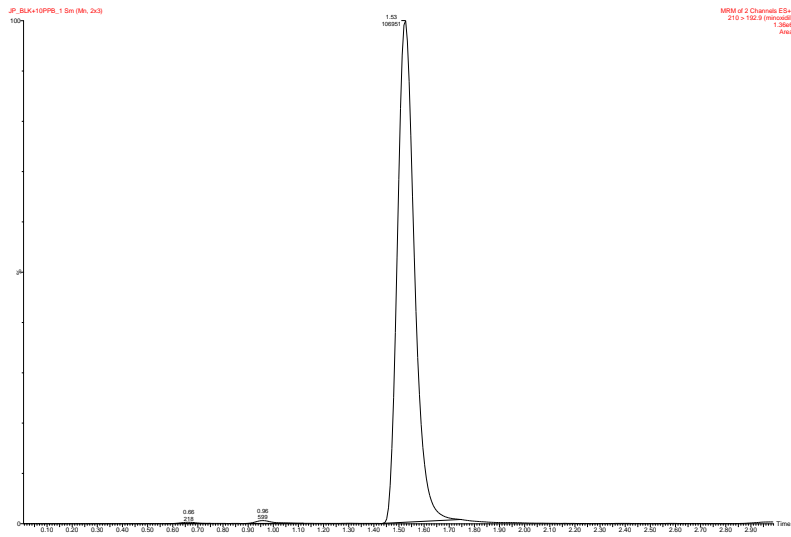


图 20 鸡配合饲料提取效率实验特征离子质量色谱图

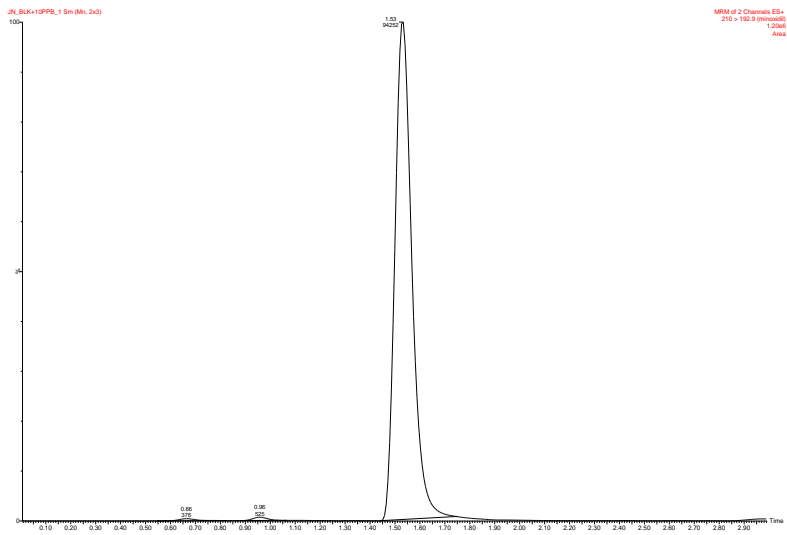


图 21 鸡浓缩饲料提取效率实验特征离子质量色谱图

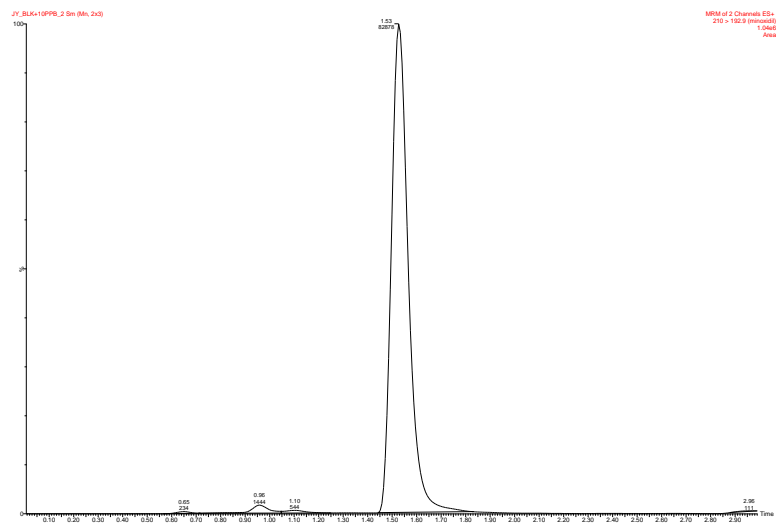


图 22 鸡预混合饲料提取效率实验特征离子质量色谱图



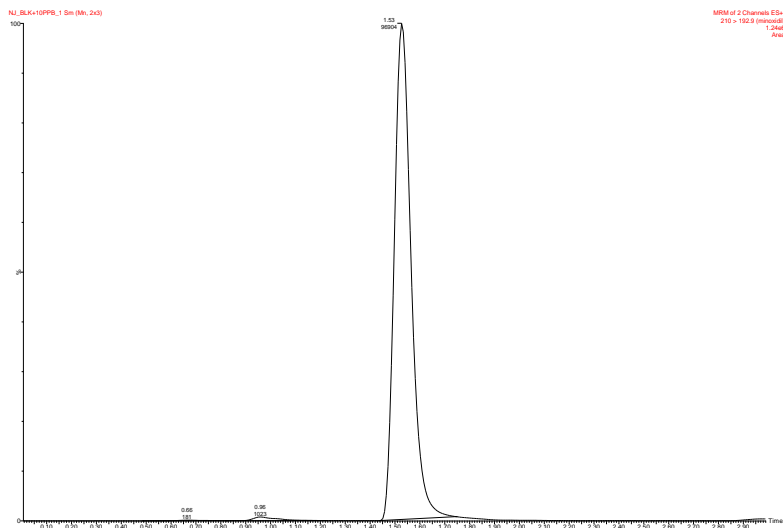


图 23 牛精补料提取效率实验特征离子质量色谱图

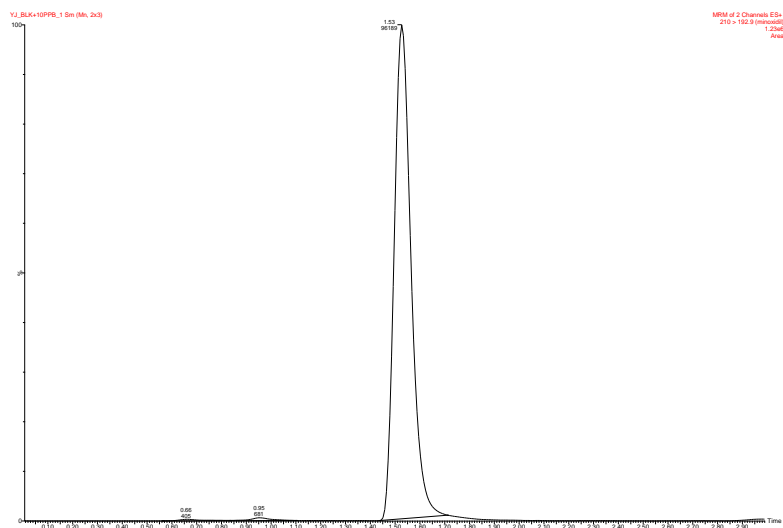


图 24 羊精补料提取效率实验特征离子质量色谱图

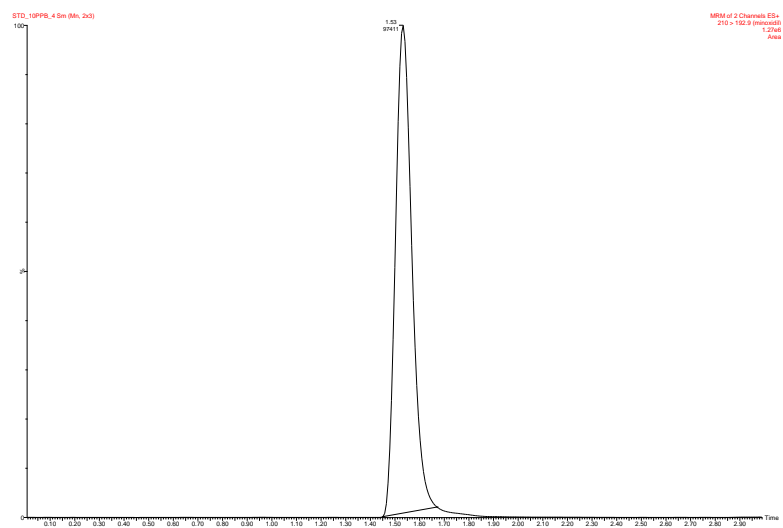


图 25 标准品浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  实验特征离子质量色谱图

## 2.5 结论

经上述方法学验证, 高效液相色谱法的线性范围为在 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ~50  $\mu\text{g/mL}$ , 线性相关性良好, 在不同饲料样品中的最低检出限为 1  $\text{mg/kg}$ , 定量限为 2  $\text{mg/kg}$ , 6 类饲料样品中米诺地尔在 2 ~ 200  $\text{mg/kg}$  范围内的批内回收率在 82.97%~106.46%之间, 批内 RSD 在 0.2%~8.0%之间; 批间回收率在 88.4%~105.0%之间, 批间 RSD 在 0.5%~6.7%之间。

液相色谱-串联质谱法的线性范围为 0.1 ~ 200  $\text{ng/mL}$ , 线性相关性良好, 在不同饲料样品中的最低检出限为 5  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 10  $\mu\text{g/kg}$ , 不同类饲料中米诺地尔各浓度的批内回收率在 66.20% ~ 102.96%之间, 批内 RSD 在 0.5% ~ 14.5%之间; 批间回收率在 66.3% ~ 101.8%之间, 批间 RSD 在 0.5 ~ 11.5%之间。

两种方法结果均符合 GB/T 23182-2008 《饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》相应要求。本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料及精料补充料中米诺地尔的测定。

## 四、采用国际标准

无。

## 五、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接, 遵循政策性和协调统一性的原则。

## 六、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中, 标准编制组收集调研了国内外相关信息资料, 组织行业内各位专家对标准内容的制定, 进行了详细研讨, 并达成统一制定方案。无重大分歧意见。

## 七、作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准发布后，作为推荐性标准执行。

## 八、贯彻标准的要求和措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本。这是保证新标准贯彻实施的基础。

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

(3) 实施的过渡期宜定为 6 个月。

## 九、废止现行有关标准的建议

无

## 十、其他应予说明的事项

无。

## 参考文献

[1] S.D.伯雷特, V.菲迪耶, 胡梁燕, 等. 雄性激素调节剂. 中国发明专利, 申请号 200680014500.4, 2008.4.23.