

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4425—2023

饲料中米诺地尔的测定

Determination of minodixil in feeds

2023-12-22 发布

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：上海市兽药饲料检测所、上海市农业科学院。

本文件主要起草人：黄土新、张婧、王博、严凤、吴剑平、曹莹、白冰、商军、杨海锋、黄家莺、华贤辉、徐汀、潘娟、司文帅、陶玉洁、贡松松。



饲料中米诺地尔的测定

1 范围

本文件描述了饲料中米诺地尔的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。

本文件液相色谱-串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中米诺地尔的测定；高效液相色谱法适用于浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中米诺地尔的测定。

本文件液相色谱-串联质谱法检出限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、定量限为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，高效液相色谱法的检出限为 1.0 mg/kg 、定量限为 2.0 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 液相色谱-串联质谱法(仲裁法)

4.1 原理

试样中的米诺地尔用甲醇振荡提取，经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。

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 甲醇。

4.2.3 甲醇：色谱纯。

4.2.4 乙腈：色谱纯。

4.2.5 甲酸：色谱纯。

4.2.6 5%氨水甲醇溶液：取 5 mL 氨水，加甲醇(4.2.2)稀释至 100 mL，混匀。

4.2.7 0.1%甲酸溶液：取 1 mL 甲酸(4.2.5)，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

4.2.8 0.1%甲酸乙腈溶液：取 1 mL 甲酸(4.2.5)，加乙腈(4.2.4)稀释至 1 000 mL，混匀。

4.2.9 标准储备溶液(1 mg/mL)：称取米诺地尔标准品(CAS 号：38304-91-5，纯度不低于 98%)10 mg (精确至 0.000 01 g)于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.3)溶解定容。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，有效期为 6 个月。

4.2.10 标准中间溶液 I (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确移取标准储备溶液(4.2.9)2 mL 于 20 mL 棕色容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液(4.2.7)定容。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 3 个月。

4.2.11 标准中间溶液 II (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确移取标准中间溶液 I (4.2.10)1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液(4.2.7)定容。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 3 个月。

4.2.12 标准系列溶液:分别准确移取适量标准中间溶液Ⅱ(4.2.11)于棕色容量瓶中,用0.1%甲酸溶液(4.2.7)稀释、定容,配制成浓度为0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL标准系列溶液。临用现配。

4.2.13 混合型强阳离子固相萃取小柱:60 mg/3 mL。

4.2.14 微孔滤膜:0.22 μm,水系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

4.3.2 天平:精度为0.01 g和0.000 01 g。

4.3.3 振荡器:转速500 r/min~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的规定制备试样,不少于200 g,粉碎使其全部通过0.425 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2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(4.2.2),1 500 r/min振荡提取20 min,9 000 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(4.2.7),涡旋混匀,备用。

4.5.2 净化

固相萃取小柱(4.2.13)依次用3 mL甲醇(4.2.2)和3 mL水预淋洗,取备用液(4.5.1)全部过柱,依次用3 mL水和3 mL甲醇(4.2.2)淋洗,用3 mL 5%氨水甲醇溶液(4.2.6)洗脱,收集洗脱液,于50℃下用氮气吹干,准确加入1 mL 0.1%甲酸溶液(4.2.7),溶解,涡旋混匀,用微孔滤膜(4.2.14)过滤,待测。

4.5.3 测定

4.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,柱长100 mm,内径2.1 mm,粒径1.7 μm,或性能相当者;
- b) 流动相:A相为0.1%甲酸溶液(4.2.7),B相为0.1%甲酸乙腈溶液(4.2.8),梯度洗脱程序见表1;
- c) 柱温:35℃;
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 进样量:10 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间, min	A相, %	B相, %
0.00	80	20
2.00	80	20
2.10	5	95
3.00	5	95
3.10	80	20
6.00	80	20

4.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式(ESI⁺)；
- b) 检测方式：多反应监测(MRM)；
- c) 脱溶剂气：800 L/h；
- d) 反吹气：50 L/h；
- e) 雾化器温度：500 ℃；
- f) 电离电压：3.5 kV；
- g) 离子源温度：150 ℃。
- h) 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 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
米诺地尔	210.0>163.9	30	25
	210.0>192.9 ^a	30	15
^a 为定量离子。			

4.5.3.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液(4.2.12)和试样溶液(4.5.2)上机测定。米诺地尔特征离子质量色谱图见附录 A。

4.5.3.4 定性测定

在相同试验条件下，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。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

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

4.5.3.5 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(4.2.7)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%。

4.6 试验数据处理

试样中米诺地尔含量以质量分数计。多点校准按公式(1)计算，单点校准按公式(2)计算。

$$w_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- w_1 —— 试样中米诺地尔含量的数值，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；
- ρ_1 —— 由标准曲线得到的试样溶液中米诺地尔的浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- V_1 —— 试样提取液体积的数值，单位为毫升(mL)；
- V_3 —— 净化后最终定容体积的数值，单位为毫升(mL)；
- 1 000 —— 换算系数；

- V_2 ——用于净化的上清液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g);
- n ——稀释倍数。

$$\omega_1 = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho'_s \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A ——试样溶液的色谱峰面积;
- ρ'_s ——标准溶液中米诺地尔浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_s ——标准溶液色谱峰面积。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的米诺地尔用甲醇振荡提取,经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。

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 1 000 mL,混匀。
- 5.2.8 0.1%磷酸溶液:取 1 mL 磷酸,用水稀释至 1 000 mL,混匀,过滤。
- 5.2.9 乙腈-0.1%磷酸溶液:取 15 mL 乙腈(5.2.4)与 85 mL 0.1%磷酸溶液(5.2.8)混匀。
- 5.2.10 标准储备溶液(1 mg/mL):称取米诺地尔标准品(CAS 号:38304-91-5,纯度不低于 98%)10 mg (精确至 0.000 01 g)于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.2.3)溶解定容。-18 ℃以下避光保存,有效期为 6 个月。
- 5.2.11 标准中间溶液(100 μg/mL):准确移取标准储备溶液(5.2.10)1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈-0.1%磷酸溶液(5.2.9)定容。2 ℃~8 ℃避光保存,有效期为 3 个月。
- 5.2.12 标准系列溶液:分别准确移取适量标准中间溶液(5.2.11)于棕色容量瓶中,用乙腈-0.1%磷酸溶液(5.2.9)稀释、定容,配制成浓度为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL 标准系列溶液。临用现配。
- 5.2.13 混合型强阳离子固相萃取小柱:200 mg/6 mL。
- 5.2.14 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

5.3 仪器设备

- 5.3.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 5.3.2 天平:精度为 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 5.3.3 振荡器:转速 500 r/min~3 000 r/min。
- 5.3.4 离心机:转速不低于 9 000 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 的规定制备试样,不少于 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 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 2 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),1 500 r/min 振荡提取 20 min,9 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 1 mL 于 10 mL 离心管中,加入 4 mL 0.1%甲酸溶液(5.2.7),涡旋混匀,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,取备用液(5.5.1)全部过柱,依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇(5.2.2)淋洗,用 3 mL 5%氨水甲醇溶液(5.2.6)洗脱,收集洗脱液,于 50 °C 下用氮气吹干,准确加入 1 mL 乙腈-0.1%磷酸溶液(5.2.9),溶解,涡旋混匀,用微孔滤膜(5.2.14)过滤,待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者;
- b) 流动相: 0.1%磷酸溶液(5.2.8)+乙腈(5.2.4)=85+15;
- c) 柱温: 35 °C;
- d) 流速: 1 mL/min;
- e) 检测波长: 280 nm;
- f) 进样量: 50 μL。

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(5.2.12)和试样溶液(5.5.2)上机测定。米诺地尔标准溶液高效液相色谱图见附录 B。

5.5.3.3 定性测定

在相同试验条件下,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。

5.5.3.4 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 0.99。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,应将试样溶液用乙腈-0.1%磷酸溶液(5.2.9)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计。多点校准按公式(3)计算,单点校准按公式(4)计算。

$$\omega_2 = \frac{\rho_2 \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中:

ω_2 —— 试样中米诺地尔含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_2 —— 由标准曲线得到的试样溶液中米诺地尔浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL)。

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

式中：

ρ_s ——标准溶液中米诺地尔浓度的数值，单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

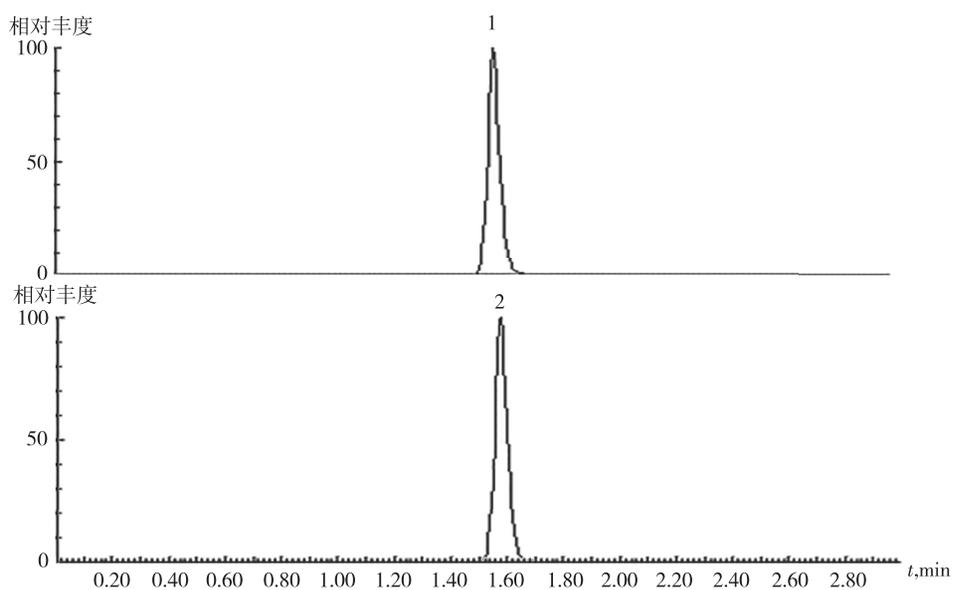
在重复性条件下，2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

附录 A

(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 A.1。



标引序号说明：

1——米诺地尔定量监测离子(210.0>192.9)；

2——米诺地尔监测离子(210.0>163.9)。

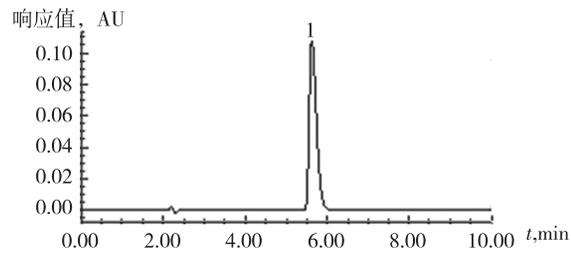
图 A.1 米诺地尔标准溶液(50 ng/mL)特征离子质量色谱图

附录 B

(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 B.1。



标引序号说明：

1——米诺地尔。

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