

ICS 65.120

CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ×××××—×××××

饲料中环丙氨嗪的测定

Determination of cyromazine in feeds

(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 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》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：河南省兽药饲料监察所。

本文件主要起草人：吴宁鹏、张盼盼、李慧素、张崇威、彭丽、孟蕾、杨洁、袁聪、吴志明、马文涛、黄志伟。

饲料中环丙氨嗪的测定

1 范围

本文件规定了饲料中环丙氨嗪的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中环丙氨嗪的测定。

本文件高效液相色谱法检出限为0.5 mg/kg，定量限为1.0 mg/kg；液相色谱-串联质谱法的检出限为0.05mg/kg，定量限为0.1mg/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 高效液相色谱法（HPLC）

4.1 原理

试样中的环丙氨嗪经乙腈-三氯乙酸混合溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 乙腈：色谱纯。

4.2.3 甲醇：色谱纯。

4.2.4 1%三氯乙酸溶液：称取三氯乙酸 1.0 g，加水溶解并定容至 100 mL。

- 4.2.5 提取液：取 1%三氯乙酸溶液（4.2.4）15 mL，加乙腈定容至 100 mL。
- 4.2.6 0.1 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 9 mL，加水定容至 1 000 mL。
- 4.2.7 5%氨水乙腈溶液：取氨水 5 mL，加乙腈定容至 100 mL。
- 4.2.8 磷酸盐缓冲液：准确称取 3.72 g 磷酸氢二钾，6.48 g 磷酸二氢钾，用 930 mL 水溶解，混匀。
- 4.2.9 流动相：磷酸盐缓冲液（4.2.8）+ 甲醇 + 乙腈 = 93 + 5 + 2，过滤。
- 4.2.10 环丙氨嗪标准储备液（1 mg/mL）：称取环丙氨嗪对照品（CAS：66215-27-8，含量≥95%）10 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容。-18℃以下保存，有效期为 8 个月。
- 4.2.11 环丙氨嗪标准工作液（10 μg/mL）：准确移取环丙氨嗪标准储备溶液（4.2.10）1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇（4.2.3）稀释定容。0℃~4℃保存，有效期为 2 个月。
- 4.2.12 环丙氨嗪标准系列溶液：精确移取适量标准工作液（4.2.11）于 10 mL 容量瓶中，用流动相（4.2.9）稀释定容配成标准系列溶液，浓度分别为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL。现用现配。
- 4.2.13 混合型阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL。
- 4.2.14 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 4.3.2 电子天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 4.3.3 旋涡混合器。
- 4.3.4 涡旋振荡器。
- 4.3.5 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
- 4.3.6 固相萃取装置。
- 4.3.7 氮吹仪。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，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（准确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 提取液（4.2.5），涡旋混匀，振荡提取 10 min，于 10 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至另一 50 mL 离心管。残渣用 10 mL 提取液重复提取一次，合并两次上清液，混匀，备用。

4.5.2 净化

混合型阳离子交换固相萃取柱（4.2.13）依次用甲醇、水和提取液（4.2.5）各 3 mL 活化。准确移取备用液（4.5.1）1 mL 过柱，用 3 mL 水、3 mL 甲醇和 3 mL 0.1mol/L 盐酸溶液（4.2.6）依次淋洗，抽干。用 5 mL 5%氨水乙醇溶液（4.2.7）洗脱，收集洗脱液，于 40℃氮吹至干。准确移取 1 mL 流动相（4.2.9）溶解残余物，混匀后过微孔滤膜，作为待测液，备用。

4.5.3 测定

4.5.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm，或性能相当者。

柱温：30 ℃。

检测波长：214 nm。

流速：1.0 mL/min。

进样量：20 μL。

流动相：4.2.9。

4.5.3.2 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（4.2.12）和试样溶液（4.5.2）上机测定。在上述色谱条件下，环丙氨嗪标准溶液图谱见附录 A。

4.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中环丙氨嗪保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中环丙氨嗪的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.4 定量

以环丙氨嗪的浓度为横坐标，以其色谱峰面积（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。试样溶液中环丙氨嗪的响应值应在标准曲线测定的线性范围内。如超出线性范围，应将试样用流动相稀释（n倍）后，重新进样分析。单点校准时，试样溶液与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（相差不超过30%）。

4.6 试验数据处理

试样中环丙氨嗪的含量以质量分数 w 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：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液环丙氨嗪的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化时所用的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮吹至干后溶解残渣用流动相的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中环丙氨嗪色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中环丙氨嗪的峰面积；

ρ_s ——环丙氨嗪标准溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化时所用的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留3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15%。

5 液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）

5.1 原理

试样中的环丙氨嗪经乙腈-三氯乙酸混合溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准曲线校正，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除另有规定外，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 乙腈：色谱纯。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 1%三氯乙酸溶液：称取三氯乙酸 1.0 g，加水溶解并定容至 100 mL。

- 5.2.5 试样提取溶液：取 1%三氯乙酸溶液（5.2.4）15 mL，加乙腈（5.2.2）定容至 100 mL。
- 5.2.6 0.1 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 9 mL，加水定容至 1 000 mL。
- 5.2.7 5%氨水乙腈溶液：取氨水 5 mL，加乙腈（5.2.2）定容至 100 mL。
- 5.2.8 0.1%甲酸溶液：准确移取 1 mL 甲酸，用水稀释定容至 1 000 mL。
- 5.2.9 0.1%甲酸乙腈溶液：取乙腈（5.2.2）5 mL，用 0.1%甲酸溶液（5.2.8）定容至 100 mL。
- 5.2.10 环丙氨嗪标准储备液（1 mg/mL）：称取环丙氨嗪对照品（CAS：66215-27-8，含量≥95%）10 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容。-18℃以下保存，有效期为 8 个月。
- 5.2.11 环丙氨嗪标准工作液（10 μg/mL）：准确移取环丙氨嗪标准储备溶液（5.2.10）1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释定容。0℃~4℃保存，有效期为 2 个月。
- 5.2.12 环丙氨嗪系列溶液：精确移取适量标准工作液（5.2.11）于 10 mL 容量瓶中，用 0.1%甲酸乙腈溶液稀释定容配成标准系列溶液，浓度分别为 10 ng/mL、20ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 和 500 ng/mL。现用现配。
- 5.2.13 混合型阳离子交换固相萃取小柱（MCX 柱）：60 mg/3 mL。
- 5.2.14 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

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 电子天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 5.3.3 旋涡混合器。
- 5.3.4 涡旋振荡器。
- 5.3.5 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
- 5.3.6 固相萃取装置。
- 5.3.7 氮吹仪。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。选取类型相同，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，作为空白样品。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

同 4.5.1。

5.5.2 净化

混合型阳离子交换柱（5.2.13）依次用甲醇、3 mL 水和试样提取液（5.2.5）各 3 mL 活化。准确移取上清液（5.5.1）2 mL 过柱，用 3 mL 水、3 mL 甲醇和 3 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液（5.2.6）依次淋洗，抽干。用 5 mL 5%氨水乙腈溶液（5.2.7）洗脱，收集洗脱液，于 40℃氮吹至干。准确移取 1 mL 0.1%甲酸乙腈溶液（5.2.9）溶解残渣，过 0.22 μm 滤膜，待测。

5.5.3 基质匹配标准曲线的制备

取 5.4 空白试样，按 5.5.1 和 5.5.2 处理得到氮气吹干的空白基质，分别取环丙氨嗪系列溶液（5.2.12）各 1.0 mL 溶解残余物，配制成 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 和 500 ng/mL 基质匹配标准系列溶液，待测。

5.5.4 测定

5.5.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：以硅胶基质双键键合 C₁₈ 为填料的色谱柱，柱长 150 mm，内径 3.0 mm，粒度 2.1 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：5 μL；

流动相：A：乙腈（5.2.2）；B：0.1%甲酸溶液（5.2.8），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0.0	0.3	5	95
1.0	0.3	5	95
3.0	0.3	85	15
5.0	0.3	5	95
7.0	0.3	5	95

5.5.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾电离，正离子模式（ESI+）；

检测方式：选择离子监测（SRM）；

离子源喷雾电压：3.5 kV；

离子传输杆温度：333℃；

喷雾器温度：300℃；

鞘气：氮气，30 Arb；

辅助气：氮气，5 Arb；

定性离子对、定量离子对及对应的射频电压和碰撞能量见表 2。

表 2 环丙氨嗪的多反应监测离子对、射频电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	射频电压 (V)	碰撞能量 (eV)
环丙氨嗪	167.2 > 85.1	43	19
Cyromazine	167.2 > 125.1 ^a		18
a 为定量离子。			

5.5.4.3 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，分别取环丙氨嗪基质匹配标准系列溶液（5.5.3）和试样溶液（5.5.2）上机测定。环丙氨嗪基质匹配标准溶液特征离子色谱图见附录 B。

5.5.4.4 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（5.5.3）中待测物质的保留时间的相对偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的环丙氨嗪定性离子对，比较试样图谱中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质标准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，则可判定为试样中存在环丙氨嗪。

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

5.5.4.5 定量

以环丙氨嗪的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的线性相关系数不低于 0.99。试样溶液与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，应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液用 0.1%甲酸乙腈溶液（5.2.9）作相应稀释（n 倍）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

试样中环丙氨嗪的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（3）计算；单点校准按公式（4）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

NY/T ××××—××××

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中环丙氨嗪的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A ——试样溶液中环丙氨嗪的色谱峰面积；

A_s ——基质匹配标准溶液中环丙氨嗪的峰面积；

ρ_s ——基质匹配标准溶液中环丙氨嗪的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化时所用试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

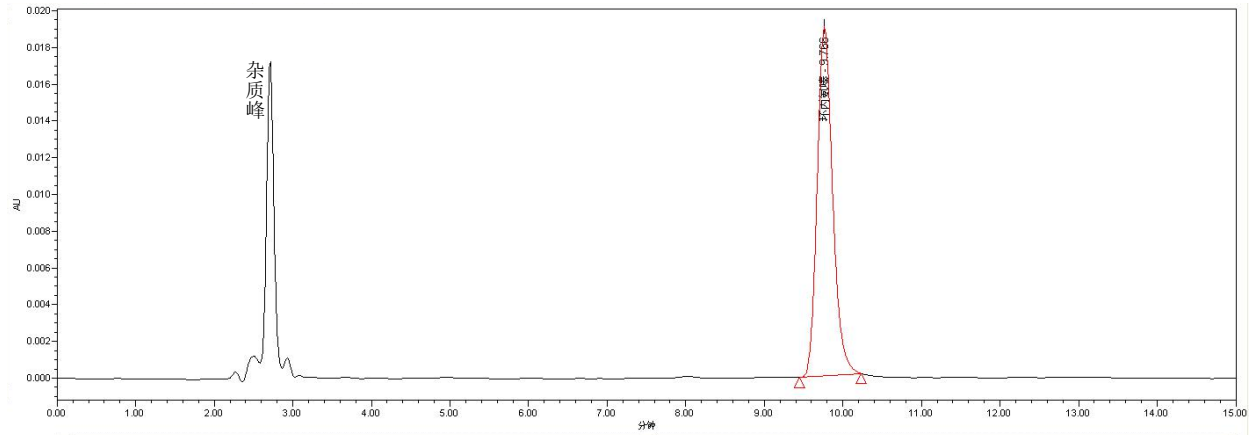
平行测定结果用算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测试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
(资料性附录)
环丙氨嗪标准溶液图谱

环丙氨嗪标准溶液的色谱图见图 A.1。

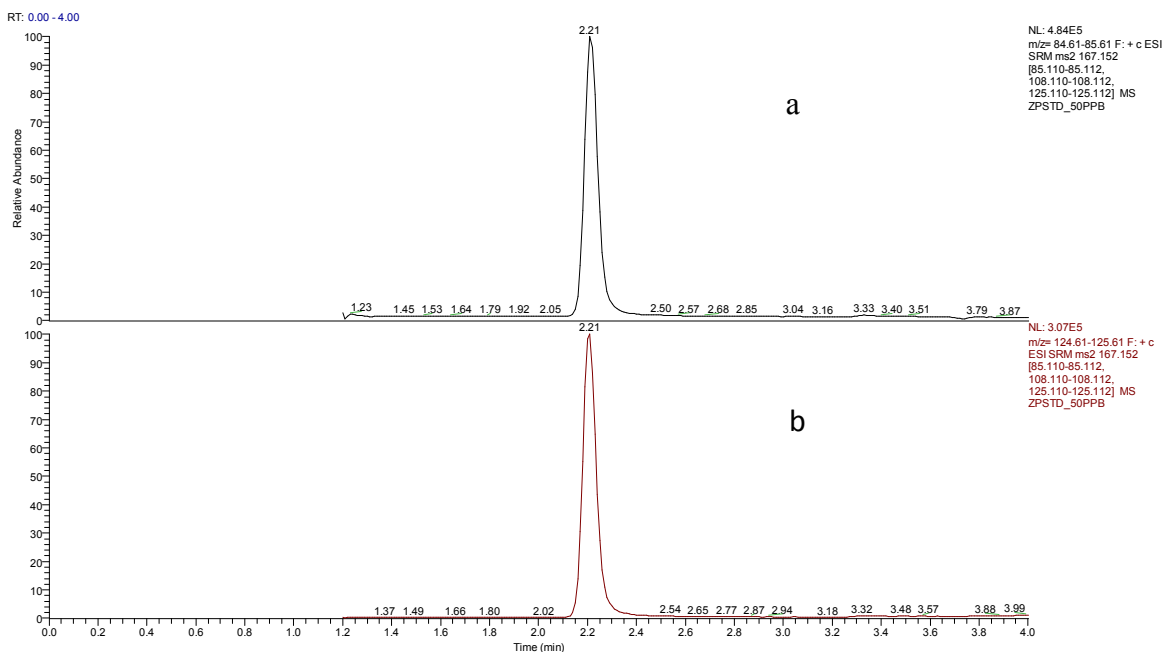


图A.1 环丙氨嗪标准溶液（1.0 µg/mL）的高效液相色谱图

附录 B
(资料性附录)

环丙氨嗪标准溶液的定性定量离子色谱图

环丙氨嗪基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 B.1。



图B.1 环丙氨嗪基质匹配标准溶液 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的定性定量离子色谱图
(a定量离子对通道, b定性离子对通道)

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中环丙氨嗪的测定》

编制说明

(公开征求意见稿)

起草单位： 河南省兽药饲料监察所

一、工作简况

环丙氨嗪（Cyromazine），又名灭蝇胺、灭蛆灵、灭蝇药或蝇得净，是一种1, 3, 5-三嗪类昆虫生长调节剂，该药的化学名称为2-环丙氨基-4, 6-二氨基-S-三嗪，CAS号为66125-27-8，分子式为C₆H₁₀N₆，分子量166，环丙氨嗪的结构式见图1。环丙氨嗪对双翅目及部分鞘翅目昆虫幼虫的发育有极佳的抑制作用，可抑制蝇类幼虫的生长发育，使之形成不正常蛹，从而达到灭虫的效果，是目前世界上公认的防治美洲斑潜蝇最有效的药剂。

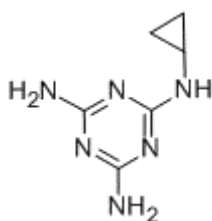


图1.环丙氨嗪的结构式

近几年，环丙氨嗪被广泛添加到动物饲料中用于控制动物厩舍内蝇蛆的生长发育，改善畜禽养殖场环境卫生。2002年农业部将环丙氨嗪批准为三类新兽药。目前，我国批准环丙氨嗪作为饲料添加剂使用。2017版兽药质量标准（化学药品卷）规定，环丙氨嗪预混剂为杀蝇药，用于控制动物厩舍内蝇幼虫的繁殖，每1000kg饲料中，鸡的使用量为5g（以环丙氨嗪计）。许多养殖户把环丙氨嗪长期应用于产蛋期鸡饲料和肥育猪饲料中而没有休药期，可能会造成鸡蛋和肉等动物产品中的药物残留。因此，《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650-2019）规定了环丙氨嗪在禽肌肉、脂肪、副产品中的最高残留限量为50μg/kg。而美国早在1991年就开始了环丙氨嗪的检测方法和毒性及暴露风险评估的研究，并制定了严格的饲料添加浓度和动物组织的最高残留限量。研究认为，虽然环丙氨嗪的毒性较小，但其在动物体内的代谢产物三聚氰胺，可能会导致膀胱肿瘤。

目前，对蔬菜、饲料、畜产品和其他样品中环丙氨嗪的检测，国内外已经应用的主要是高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱-串联质谱法（GC-MS）、液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）、酶联免疫法等方法。其中，HPLC法、酶联免疫法为筛选方法，气相色谱-串联质谱法、液相色谱-串联质谱法为确证方法，并且随着残留分析技术的发展，HPLC法、LC-MS/MS方法已逐渐在饲料和畜产品检测中成为主流，已成为完善检测标准体系的主要方法。而目前在环丙氨嗪的检测方法标准制定方面，《食品安全国家标准 动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法》（GB

29704-2013)和《农业行业标准 蔬菜中灭蝇胺残留量的测定 高效液相色谱法》(NY/T 1725-2009)分别规定了鸡肌肉、肾脏、蛋和部分蔬菜中的环丙氨嗪检测方法,目前,国内尚未见环丙氨嗪在饲料中的检测方法标准。因此,有必要建立我国饲料产品中环丙氨嗪的检测方法,以便对其规范使用进行必要的监控,从源头上保证食品安全。

本标准在查阅相关文献检测方法的基础上,采用高效液相色谱法建立饲料中环丙氨嗪的检测方法和高效液相色谱-串联质谱确证方法,标准编制过程中对样品的前处理方法和仪器条件进行了优化,得到了满意的效果。

2017年10月,河南省兽药饲料监察所完成了标准草案、项目建议书和起草说明书等书面材料,向全国饲料工业标准化技术委员会提出申报。本标准的制定任务来源于农业农村部文件农财发[2018]46号文件《农业农村部关于支付2018年农产品质量安全监管专项经费等项目资金的通知》,项目编号437号,任务名称为《饲料中环丙氨嗪的测定 高效液相色谱法》。本标准的技术归口单位是全国饲料工业标准化技术委员会,起草单位是河南省兽药饲料监察所。因此,我们依据2017版兽药质量标准(化学药品卷)规定并参考国内外相关检测方法,结合试验结果起草本标准。

二、主要工作过程

工作流程:立项—成立工作组—查阅国内外资料—收集样品并进行试验—起草标准文本—征求意见—预审—送审—报批。

2018年6月,我单位接到标准制定任务后,由河南省兽药饲料监察所成立了工作组负责标准的起草工作。同时对标准起草工作进行分工,明确各自任务和职责,以确保项目的顺利实施。

2018年7月到8月,河南省兽药饲料监察所组织技术人员通过大量查阅国内外有关文献,全面掌握了环丙氨嗪的化学结构、理化特性等。在此基础上,2018年9月到2019年3月,参考已有的文献资料,针对饲料中环丙氨嗪的检测方法、仪器条件、方法线性、灵敏度和精确度等进行探索,并在实验室进行了多次试验,结果发现,本方法能很好满足饲料中环丙氨嗪的检测要求。通过具体试验考察,2019年3月到4月,分别由上海市兽药饲料检测所、四川省饲料工作总站和浙江省兽药饲料监察所三家单位对本方法进行了复核试验,结果表明,该方法均满足各项技术要求,最终确定了该方法的可行性,完成了标准文本的征求意见稿。

2019年4月，向中国国农业科学院农业质量与标准检测技术研究所、中国农业大学等25家涉及国内科研、教学和管理等领域的有关单位的教授、专家和技术人员征求意见，将《饲料中环丙氨嗪的测定》征求意见稿、编制说明和征求意见表发送至各有关单位和专家。2019年5月，先后收到17份反馈意见并进行汇总。对各有关单位和专家共提出69条意见，起草小组对反馈意见逐条进行研究和讨论，查阅、搜集相关内容的科学依据，对有争议的问题通过电话和电子邮件等联系方式向有关单位的专家请教。起草小组通过讨论，统一意见后作出的处理意见并提出相应的依据、理由及修改结果（见意见汇总处理表），共采纳意见63条，部分采纳1条，不采纳5条。

2019年12月27日，河南省兽药饲料监察所组织专家对农业行业标准《饲料中环丙氨嗪的测定》（预审稿）进行了认真的审查。专家组由李俊玲、常碧影、黄士新、杨秀玉、贺平丽、于家丰、张明森七位专家组成，与会专家认为：标准数据可靠，标准预审稿可行。专家组提出进一步修改意见：1.建议标准名称改为《饲料中环丙氨嗪的测定》，并在编制说明中说明理由；2.建议考察方法是否适用于维生素预混合饲料样品；3.按GB/T1.1-2009和GB/T20001.4规范标准文本和编制说明。因此，按照预审意见要求我单位进一步完善了相关实验数据，规范相关材料。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

在本标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则的要求》^[1]、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》^[2]和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分：试验方法》^[3]的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

1、稳定性考察

采用高效液相色谱-紫外检测法进行稳定性试验，试验条件如下：

色谱柱：Waters XBridge C18柱；检测器：紫外检测器；检测波长：214 nm；进样量：20 μL；流动相：磷酸盐缓冲液 + 甲醇 + 乙腈 = 93 + 5 + 2，等度洗脱。环丙氨嗪标准储备液（1mg/mL）和工作液（10μg/mL）用流动相稀释至1μg/mL上机测定。环丙氨嗪标准

储备液稳定性如图2所示，环丙氨嗪标准工作液的稳定性如图3所示。结合稳定性考察结果和GB 29704-2013^[4]，我们将环丙氨嗪标准储备液（1.0mg/mL）的有效期定为8个月，将标准工作液(10 μg/mL)的有效期定为2个月。

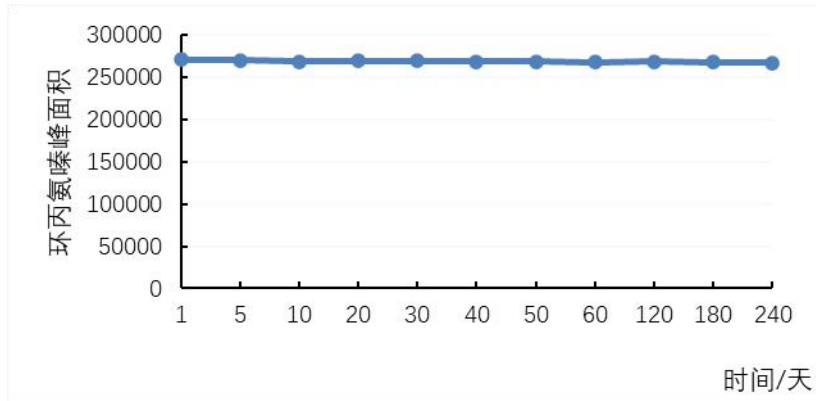


图 2. 环丙氨嗪标准储备液稳定性

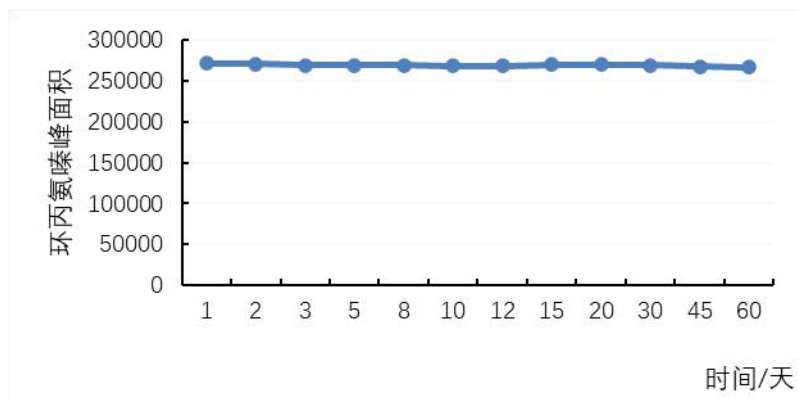


图 3. 环丙氨嗪标准工作液稳定性

2、高效液相色谱法试验条件的研究

2.1 检测波长的选择

目前，根据国内外文献报道，饲料和动物组织中环丙氨嗪的检测方法中最常用的检测器是紫外检测器，其测定波长主要为 214 nm，极少选择 230 nm^[5]。为确定最佳检测波长，我们通过紫外分光光度计对用甲醇稀释的 5 μg/mL 的环丙氨嗪进行测定，其紫外光吸收图谱见图 4。结果表明，采用紫外法检测环丙氨嗪时，在波长 214 nm 处有最大吸收，在 230nm 处吸收值相对较弱，因此，选择 214 nm 为环丙氨嗪的最佳紫外检测波长。

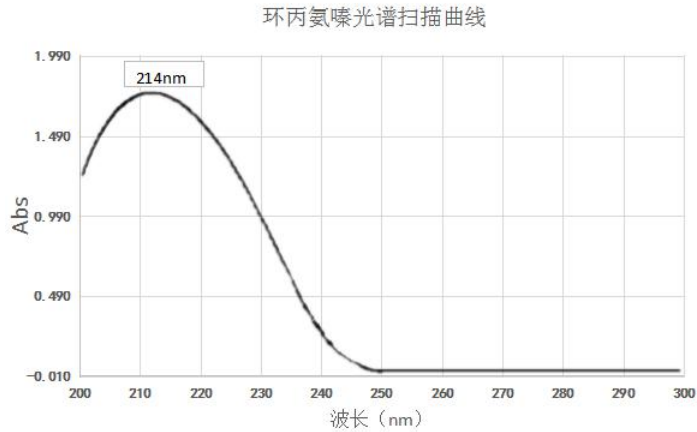


图 4. 环丙氨嗪紫外吸收光谱图

2.2 色谱柱和流动相的选择

由于环丙氨嗪的极性较强，文献报道采用 C18 柱和氨基柱作为分析柱，本项目组分别采用这两种色谱柱进行了分离条件的研究。采用 Agilent ZORBAX NH₂ 色谱柱（5.0 μm，250 mm×4.6 mm）色谱柱，流动相为乙腈 + 水 = 97 + 3，流速为 1.0 mL/min，检测波长 214 nm，进样量为 20 μL；经优化，结果表明，环丙氨嗪的保留时间在氨基柱上极易发生明显偏离。

C18 色谱柱适用范围广，重现性、选择性和分离效率均较高，《兽药使用指南》和相关文献报道中均有用 C18 色谱柱测定环丙氨嗪的应用。本试验分别比较了资生堂 CAPCELL PAK C18（5.0 μm，250 mm×4.6 mm）、Waters XBridge C18（5.0 μm，150 mm×4.6 mm）、Waters Symmetry C18（5.0 μm，250 mm×4.6 mm）和 Waters =93+5+2 为流动相等度洗脱。结果表明，以 CAPCELL PAK C18 色谱柱分离时，目标化合物在 15.6~17.6 min 出现双峰，不能达到有效分离；以 Waters Symmetry C18 色谱柱分离时，目标化合物在 10.6 min 左右出现单峰，但有明显拖尾现象，不能满足对称性等参数要求；以 150 mm Waters XBridge C18 色谱柱分离时，目标化合物在 5.5 min 左右出峰，但目标峰无法与其他杂质峰实现良好的有效分离；以 250 mm Waters XBridge C18 色谱柱分离时，目标化合物保留时间延长，在 9 min 左右出现单峰，峰形较好，可与杂质峰有效分离，效果最为理想。

由于饲料样本基质复杂，以 250 mm Waters XBridge C18 为分离色谱柱，柱温为 30 ℃，磷酸盐缓冲液 + 甲醇 + 乙腈 = 93 + 5 + 2，为流动相，等度洗脱，进样量为 20 μL 的条件，分别考察了鸡、猪的浓缩料、配合料和预混合饲料以及牛精料补充料多种基质的分离

效果。结果表明，在此色谱条件下，环丙氨嗪虽有杂质干扰，但目标峰与杂质峰均可实现较好的分离。猪配合料中添加 5 $\mu\text{g/g}$ 环丙氨嗪的色谱分离效果见图 5。

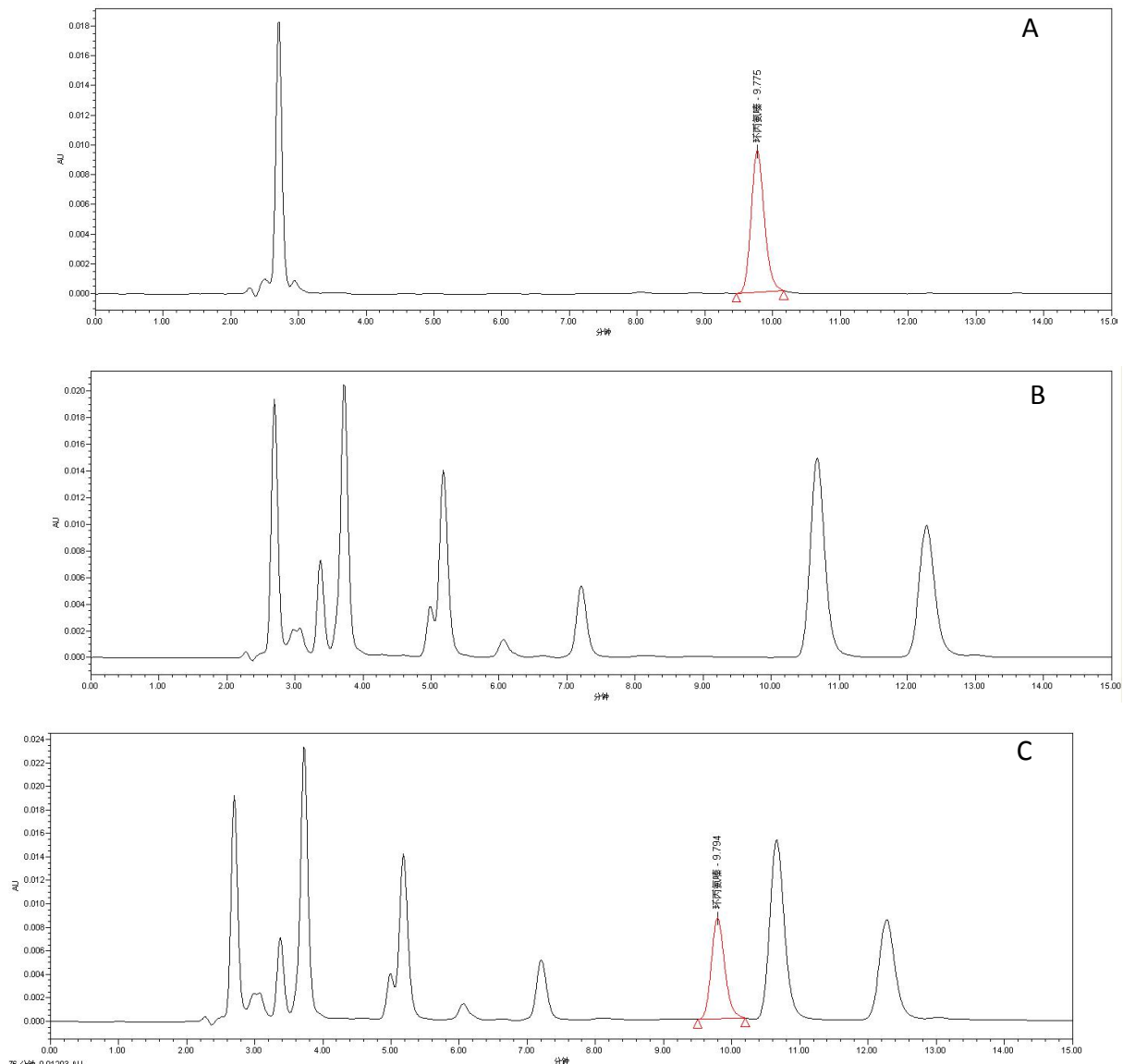


图 5. 猪配合料中环丙氨嗪在 C18 柱上的高效液相色谱图

A.标准工作液（浓度为 500 ng/mL） B.空白样品 C.空白加标样品（添加水平 5 $\mu\text{g/g}$ ）

2.3 前处理条件的选择

环丙氨嗪极性较强，本方法参考了美国农业部 FSIS 官方的分析方法以及其他的相关文献^[6-7]和检测方法^[8-10]。结果表明，饲料和畜产品中环丙氨嗪的提取液大多为 20%氨水+乙腈、1%三氯乙酸+乙腈、3%三氯乙酸等组合，且提取液酸碱性不同时所用固相萃取柱不同。因此，我们选择提取液和净化柱同时优化。首先，我们比较了 A：20%氨水乙腈+HLB 柱、B：20%氨水乙腈+Prime HLB 柱（通过式）、C：20%氨水乙腈+MCX 柱、D：1%三

氯乙酸/乙腈（15/85，v/v）+MCX柱、E：3%三氯乙酸+MCX柱五种组合，均取1mL提取液上柱。结果表明，A组合回收率最低，仅达14%左右；E组合回收率85%左右；B、C和D三个组合的回收率相对较高，可达87~92%。因基质不同，在预混合饲料基质中环丙氨嗪目标峰前后无杂质干扰峰，其余基质中均存在杂质干扰峰。综合比较B、C和D三个组合，D条件下杂质峰干扰相对较小，因此，将1%三氯乙酸/乙腈（15/85，v/v）+MCX柱组合作为最理想的前处理组合。

本试验还比较了提取两次、提取三次，振荡提取10 min、20 min和30 min条件下环丙氨嗪的回收率，发现差别不明显。最终确定用1%三氯乙酸/乙腈（15/85，v/v）溶液10 mL振荡10 min，提取两次。由于多种饲料基质在该条件下均有杂质干扰峰，且与目标峰性质相似、信号较强，所以我们对固相萃取柱净化过程中的淋洗液、洗脱液进行了优化。结果表明，淋洗液中增加3 mL 0.1%盐酸溶液时可有效降低干扰峰信号。

因此，最终前处理过程确定为：称取试样2 g（准确至0.002 g）样品于50 mL离心管中，加入10 mL 1%三氯乙酸：乙腈（15：85）溶液，涡旋混匀，振荡提取10 min，于10000 r/min离心10 min，移取上清液至另一50 mL离心管。残渣重复提取一次，合并两次上清液，混匀，备用。固相萃取小柱依次用3 mL甲醇、3 mL水和3 mL试样提取液活化。准确移取上清液1 mL过柱，再依次用3 mL水、3 mL甲醇和3 mL 0.1mol/L盐酸溶液淋洗，抽干。用5%氨水乙腈溶液5 mL洗脱，收集洗脱液，于40℃氮吹至干，准确移取1.0 mL流动相溶解残渣，过0.22 μm滤膜，待测。

2.4 干扰试验

考察在C18色谱柱条件下，其他类似药物对环丙氨嗪分析方法的干扰。环丙氨嗪在畜禽体内的主要代谢产物为三聚氰胺，因此，选用三聚氰胺进行干扰试验。根据环丙氨嗪的药物用途，我们选择阿维菌素、托曲珠利、马度米星、地克珠利、盐酸左旋咪唑、莫能菌素和二硝托胺等与其作用类似或相关的抗虫药进行干扰试验。同时，根据专家反馈意见增加磺胺、磺胺氯吡嗪钠、磺胺甲噻二唑、磺胺氯吡嗪、磺胺二甲氧苄啶等磺胺类药物以及土霉素、多西环素等四环素类药物，两类常用药物进行干扰试验。在检测环丙氨嗪的液相条件下，仅环丙氨嗪、三聚氰胺和二硝托胺有保留，出峰时间分别为9.9 min、3.1 min和6.3 min。由此表明，三聚氰胺、二硝托胺等药物对环丙氨嗪的检测没有干扰。环丙氨嗪和其他干扰药物的液相色谱图见图6。

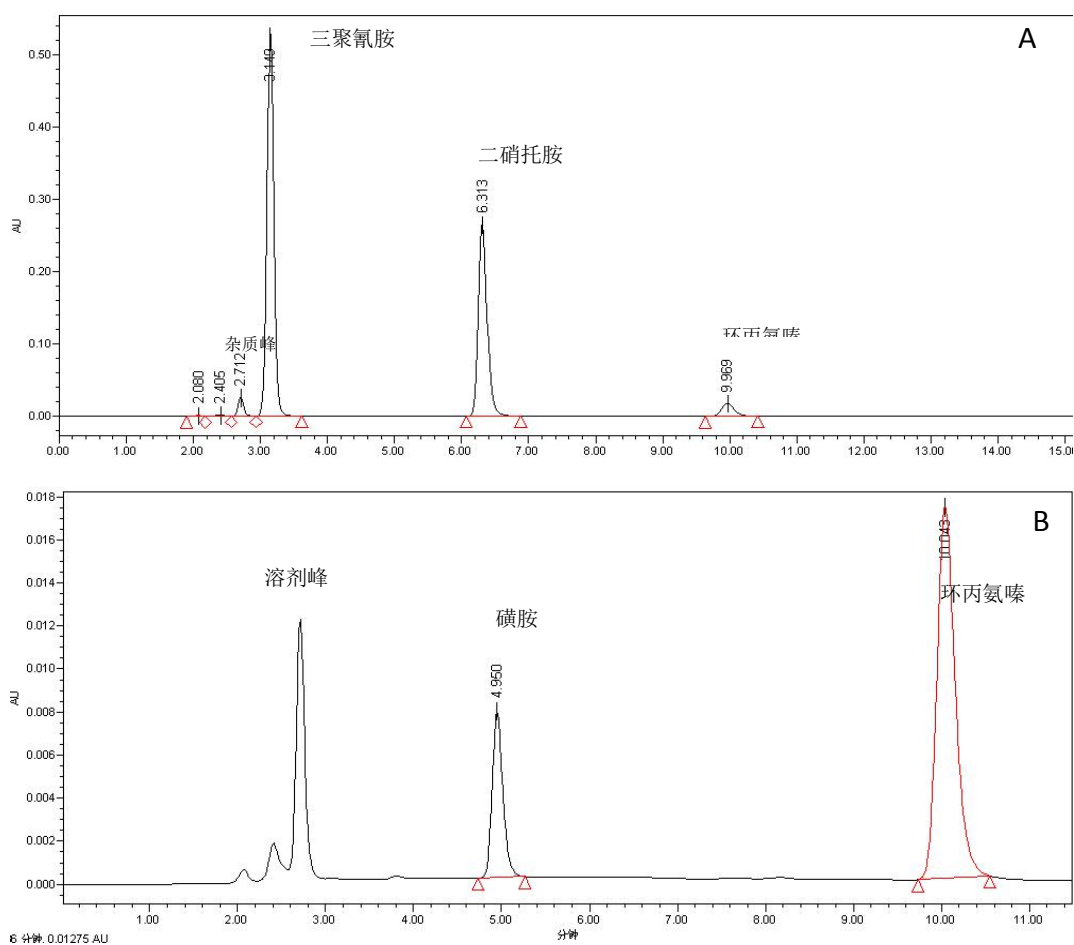


图6. 干扰试验图谱

2.5 方法学考察 (HPLC)

2.5.1 线性

精确移取适量标准工作液，用流动相稀释定容，制得浓度分别为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液（现用现配），由低浓度到高浓度供高效液相色谱仪测定。以色谱峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。求得环丙氨嗪的回归方程为 $Y=2.84e5X+3.76e2$ ， R^2 大于 0.9999，线性良好，见图 7。

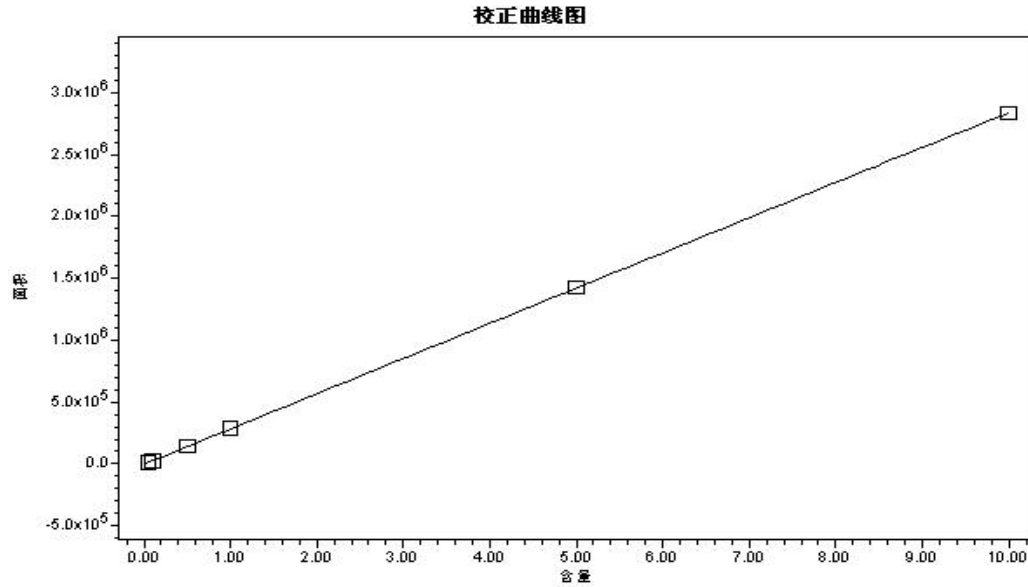


图 7. 环丙氨嗪标准曲线

2.5.2 方法的灵敏度

空白试样按相同步骤处理后，测定结果表明，在相应的保留时间处，空白试料对所测药物无干扰。

检测限 (LOD)：添加 1.0 μg 标准溶液于 2 g 空白配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 3$ (按 PtP 算)，确定环丙氨嗪在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中的检测限为 0.5 mg/kg。

定量限 (LOQ)：添加 2.0 μg 标准溶液于 2 g 配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 10$ (按 PtP 算)，确定环丙氨嗪在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中的定量限为 1.0 mg/kg。

2.5.3 方法的准确度和精密度考察 (HPLC-UV)

本方法采用液相色谱法-紫外法考察了环丙氨嗪在猪和鸡的配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和牛的精料补充料中的添加回收情况。采用标准添加法，在空白饲料中添加 3 个不同水平 1.0 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg (预混料添加浓度为 1.0 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg 和 100 mg/kg，配合料添加浓度为 1.0 mg/kg、5 mg/kg、25 mg/kg) 的环丙氨嗪进行准确度和精密度试验，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 1~表 8。

表 1 猪配合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	103.0	103.0	108.0	99.8	111.8	105.1	4.5	5.1
	II	100.7	106.1	97.8	115.6	102.0	104.4	6.6	
	III	109.7	110.5	105.9	108.7	97.2	106.4	5.1	
5	I	95.6	89.0	91.3	85.0	87.5	89.7	4.5	3.6
	II	92.8	94.2	88.4	91.5	92.3	91.8	2.3	
	III	85.6	88.6	88.2	86.2	92.1	88.1	2.9	
25	I	87.7	95.9	93.3	86.2	95.1	91.6	4.8	4.7
	II	100.7	95.7	94.5	100.8	97.1	97.8	3.0	
	III	94.4	91.0	95.9	102.8	94.3	95.7	4.6	

表 2 猪浓缩饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	76.9	76.4	74.1	77.4	78.7	76.7	2.2	5.0
	II	79.5	86.9	84.1	81.5	77.3	81.9	4.6	
	III	74.9	84.5	81.8	78.6	73.3	78.6	5.9	
10	I	82.2	84.6	97.0	80.9	94.0	87.7	8.3	6.5
	II	81.0	94.5	88.7	88.3	92.9	89.1	5.9	
	III	89.1	97.3	85.1	87.7	81.4	88.1	6.7	
50	I	92.6	91.2	88.8	82.5	82.9	87.6	5.4	5.1
	II	96.1	90.7	83.6	94.3	84.3	89.8	6.3	
	III	91.0	91.9	92.8	84.4	92.2	90.5	3.8	

表 3 猪复合预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	78.2	74.7	66.1	76.9	79.8	75.1	7.2	10.3
	II	71.6	88.4	88.2	87.5	67.7	80.7	12.6	
	III	67.9	73.0	88.8	78.0	71.8	75.9	10.6	
10	I	91.5	85.2	80.8	93.3	86.7	87.5	5.7	6.6
	II	84.7	84.0	81.2	82.4	97.2	85.9	7.5	
	III	98.6	95.0	91.1	89.7	93.4	93.6	3.7	
50	I	98.6	103.8	94.3	83.9	83.1	92.7	9.8	8.3
	II	98.2	102.2	96.5	90.5	87.8	95.0	6.2	
	III	92.7	104.4	86.8	103.3	83.4	94.1	10.1	
100	I	89.8	76.2	96.7	90.5	92.2	89.1	8.6	5.8
	II	93.6	88.4	94.0	86.1	97.0	91.8	4.8	
	III	91.4	89.7	92.6	94.8	85.6	90.8	3.8	

表 4 鸡配合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	96.0	92.9	98.7	107.5	96.2	98.3	5.6	
	II	95.1	105.4	97.2	103.2	103.1	100.8	4.4	5.3
	III	102.0	89.7	107.2	103.7	101.2	100.8	6.6	
5	I	92.6	97.5	89.7	98.6	93.2	94.3	3.9	
	II	91.2	94.3	89.1	99.1	94.6	93.7	4.1	4.7
	III	101.8	98.7	100.9	101.2	89.8	98.4	5.1	
25	I	86.4	95.0	95.4	99.9	89.2	93.2	5.8	
	II	92.5	95.6	95.2	92.5	90.6	93.3	2.2	4.1
	III	93.2	91.5	89.0	100.5	92.7	93.4	4.6	

表 5 鸡浓缩饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	95.8	100.1	94.5	93.4	91.8	95.1	3.3	
	II	97.1	100.6	98.7	90.6	94.5	96.3	4.1	3.7
	III	94.3	95.3	89.3	89.2	93.6	92.3	3.1	
10	I	95.5	89.5	98.9	86.0	85.1	91.0	6.6	
	II	91.8	87.7	91.6	95.3	85.3	90.3	4.3	5.3
	III	93.4	96.5	96.3	94.3	90.5	94.2	2.6	
50	I	104.1	92.7	98.8	103.4	81.3	96.1	9.8	
	II	104.5	87.0	86.4	83.9	90.0	90.3	9.1	8.0
	III	90.9	89.6	98.6	88.9	94.3	92.4	4.3	

表 6 鸡复合预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	82.3	63.9	77.4	65.4	75.1	72.8	10.8	
	II	76.6	64.1	62.6	67.5	61.5	66.4	9.2	11.6
	III	71.9	85.2	84.5	64.3	68.4	74.9	12.7	
10	I	98.5	84.7	95.8	86.5	92.1	91.5	6.4	
	II	88.9	89.3	88.9	81.1	88.7	87.4	4.0	6.2
	III	98.2	80.5	92.9	94.2	94.4	92.0	7.3	
50	I	94.8	102.5	103.0	104.9	88.4	98.7	7.0	
	II	98.4	94.5	104.4	91.1	88.4	95.4	6.6	7.2
	III	89.2	90.9	84.9	103.0	102.5	94.1	8.7	
100	I	105.6	90.4	89.6	104.2	93.5	96.6	7.9	
	II	90.7	108.6	82.8	100.9	95.4	95.7	10.2	8.3

III	105.8	95.8	97.7	84.5	90.3	94.8	8.4
-----	-------	------	------	------	------	------	-----

表 7 牛精料补充料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	92.7	94.8	93.9	80.8	90.4	90.5	6.3	6.0
	II	93.6	80.6	83.3	84.9	91.5	86.8	6.4	
	III	92.0	92.3	81.6	88.2	83.1	87.4	5.7	
10	I	96.5	99.6	90.9	91.5	96.6	95.0	3.9	5.7
	II	98.8	84.6	84.6	88.7	90.5	89.4	6.5	
	III	98.3	97.1	96.1	95.2	85.8	94.5	5.3	
50	I	89.3	96.7	91.8	104.9	88.5	94.3	7.2	5.9
	II	97.8	90.8	90.1	85.2	87.8	90.3	5.2	
	III	85.9	99.6	94.6	92.0	90.2	92.5	5.5	

表 8 维生素预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
1	I	76.3	79.2	78.5	82.1	80.6	79.3	2.8	3.0
	II	80.5	80.5	79.8	85.9	78.4	81.0	3.5	
	III	78.3	76.9	81.7	79.5	77.9	78.9	2.3	
10	I	92.7	92.1	94.2	91.7	93.9	92.9	1.2	1.7
	II	93.9	93.4	90.8	89.6	92.6	92.1	2.0	
	III	90.2	92.8	92.7	95.0	94.1	93.0	2.0	
50	I	80.5	78.9	81.4	81.2	79.2	80.2	1.4	2.3
	II	81.6	85.1	79.5	77.5	78.9	80.5	3.7	
	III	79.6	79.6	82.6	80.6	82.4	81.0	1.8	
100	I	83.6	81.1	84.2	83.9	85.5	83.7	1.9	3.8
	II	88.1	79.4	80.6	79.4	83.4	82.2	4.5	
	III	89.6	80.6	79.4	81.6	84.9	83.2	4.9	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 1 mg/kg~100 mg/kg 的环丙氨嗪，平均回收率为 61.5%~115.6%，批内、批间相对标准偏差均小于 12.7%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量环丙氨嗪的测定均有较好的准确度。见图 8~图 24。

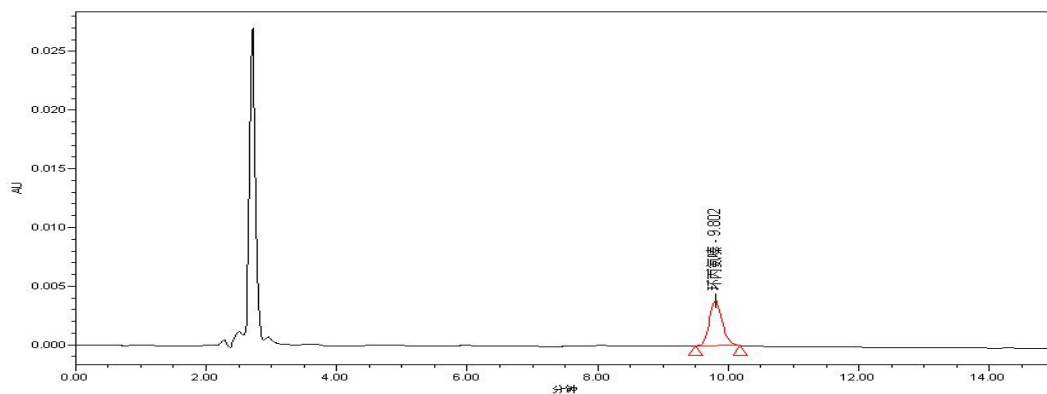


图 8. 环丙氨嗪标准溶液色谱图 (200 ng/mL)

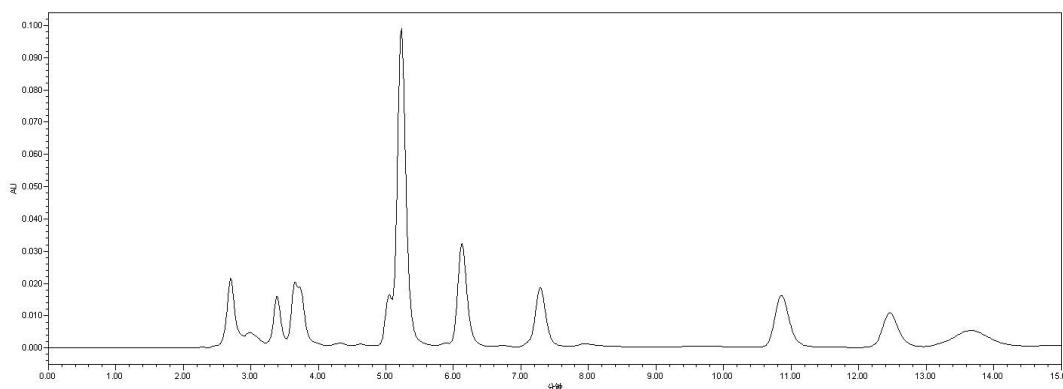


图 9. 鸡配合饲料空白色谱图

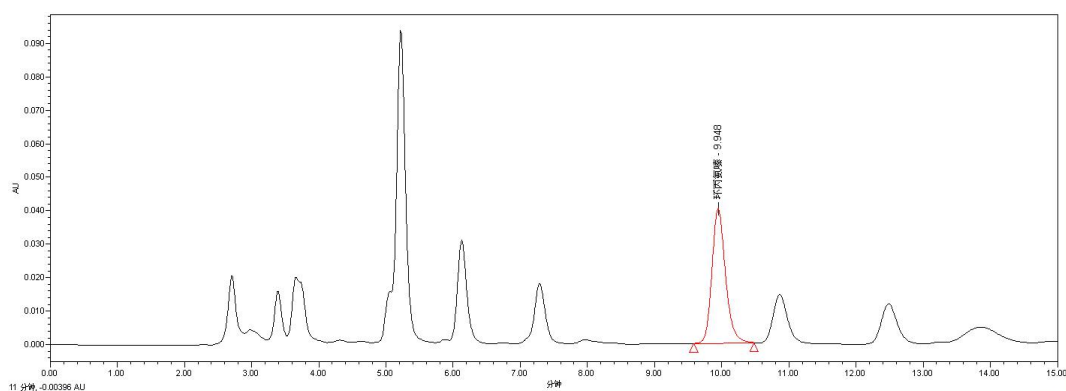


图 10. 鸡配合饲料空白添加色谱图 (25 ug/g)

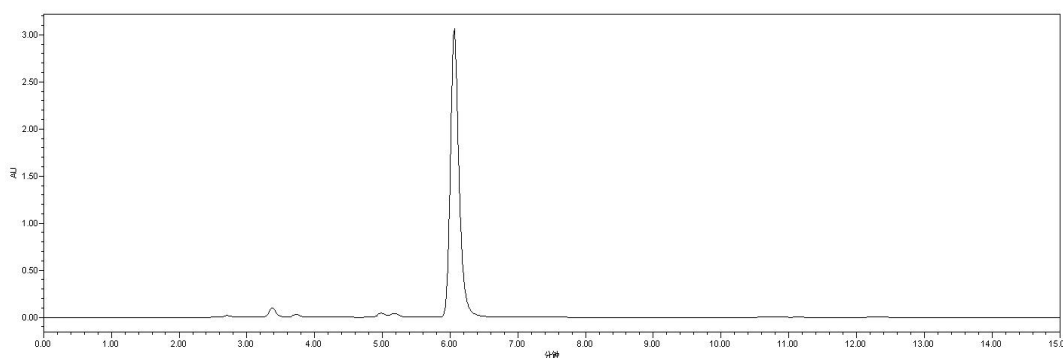


图 11. 鸡复合预混合饲料空白色谱图

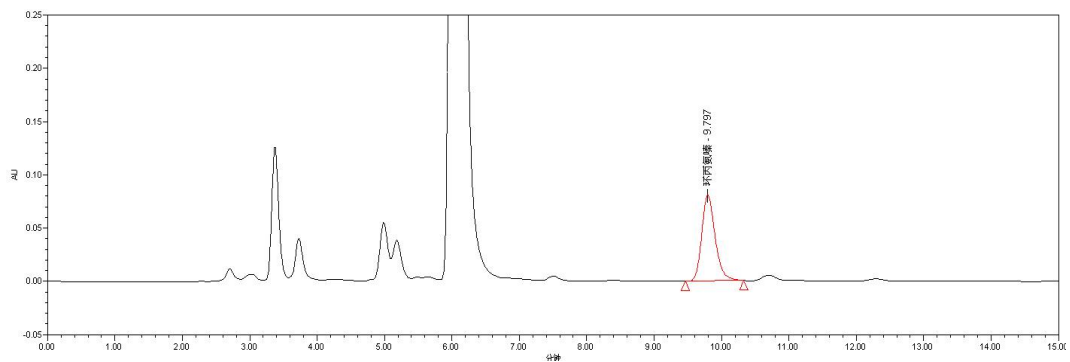


图 12. 鸡复合预混合饲料空白添加色谱图 (50 ug/g)

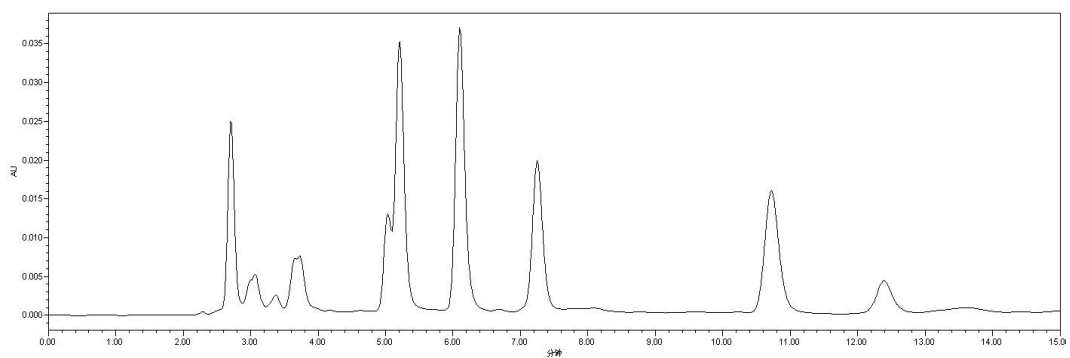


图 13. 鸡浓缩饲料空白色谱图

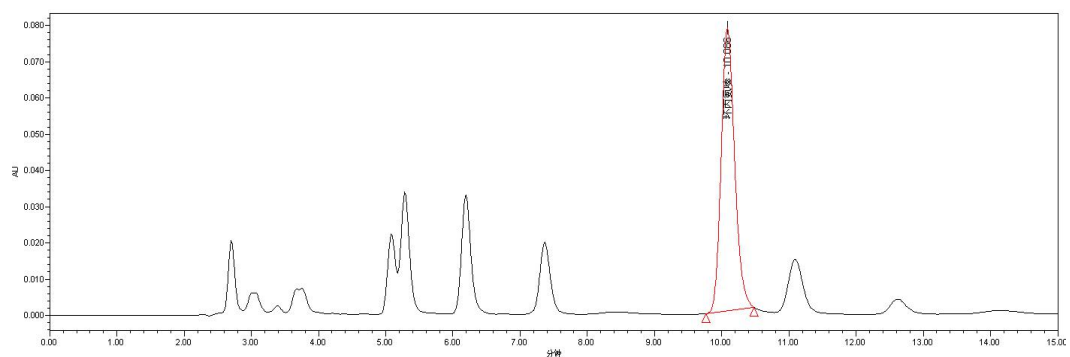


图 14. 鸡浓缩饲料空白添加色谱图 (50 ug/g)

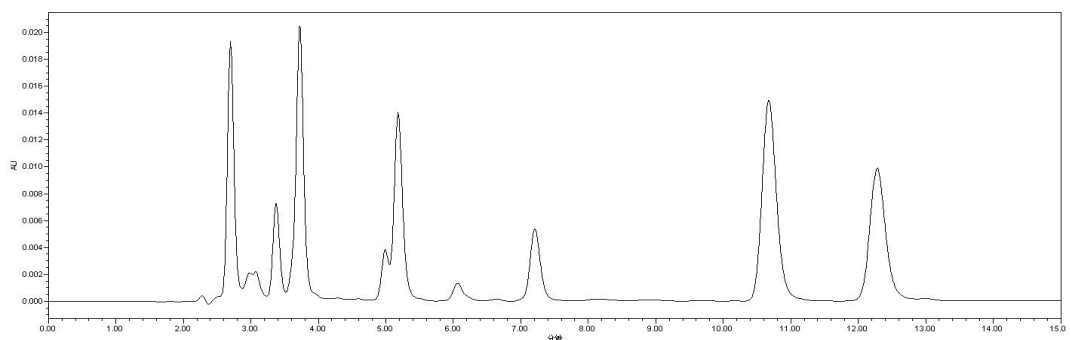


图 15. 猪配合饲料空白色谱图

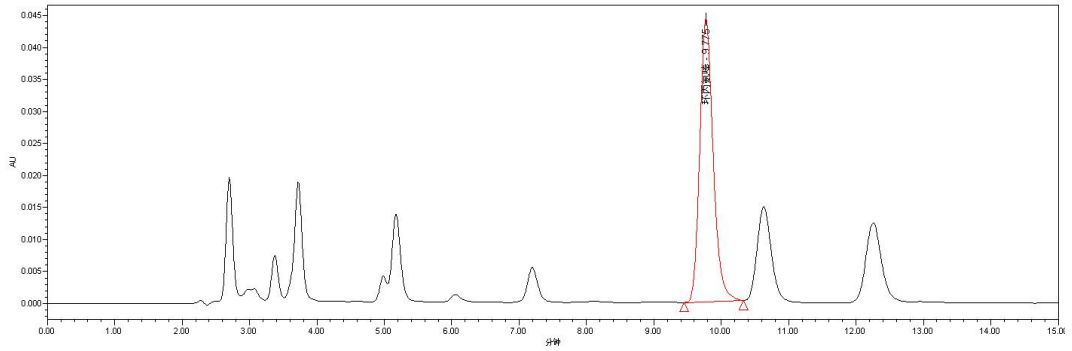


图 16. 猪配合饲料空白添加色谱图 (25 ug/g)

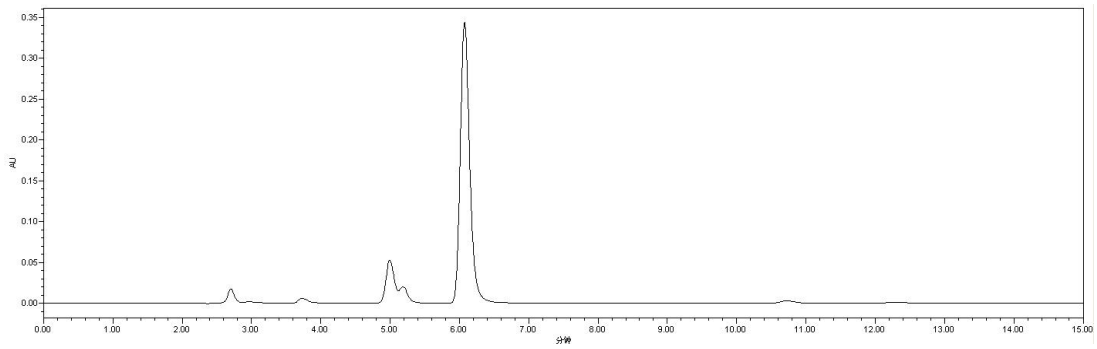


图 17. 猪复合预混合饲料空白色谱图

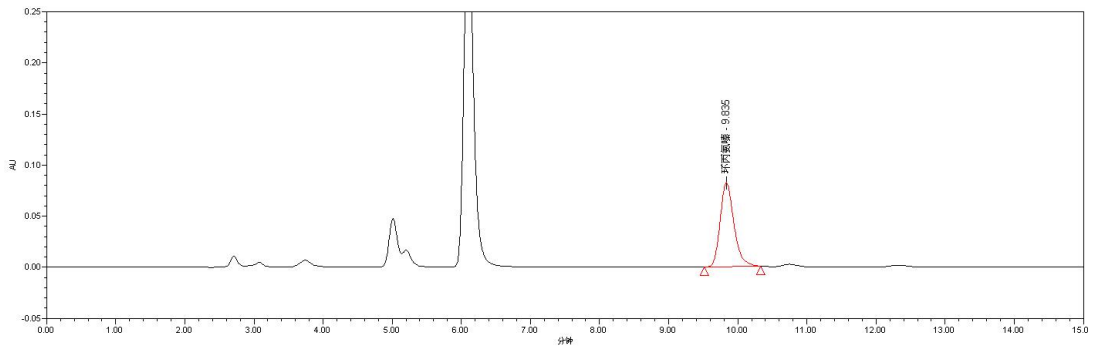


图 18. 猪复合预混合饲料添加色谱图 (50 ug/g)

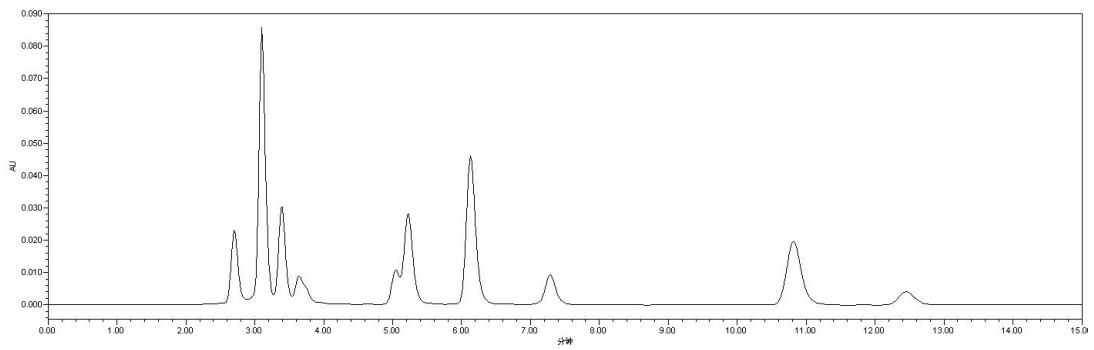


图 19. 猪浓缩饲料空白色谱图

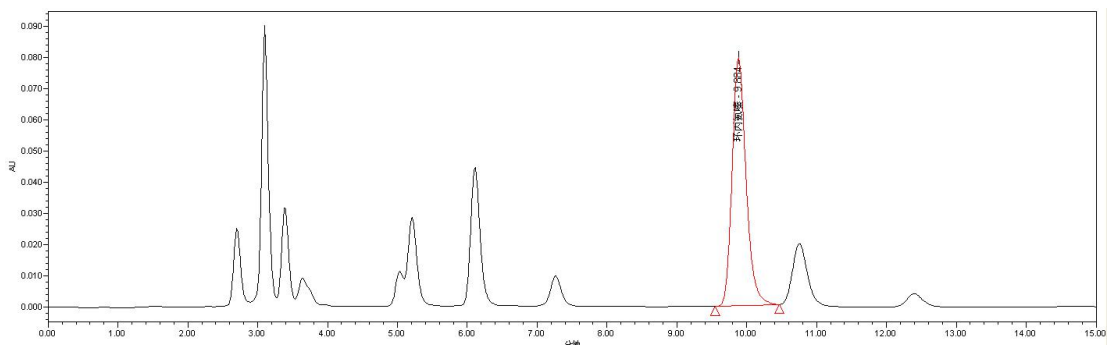


图 20. 猪浓缩饲料添加色谱图 (50 ug/g)

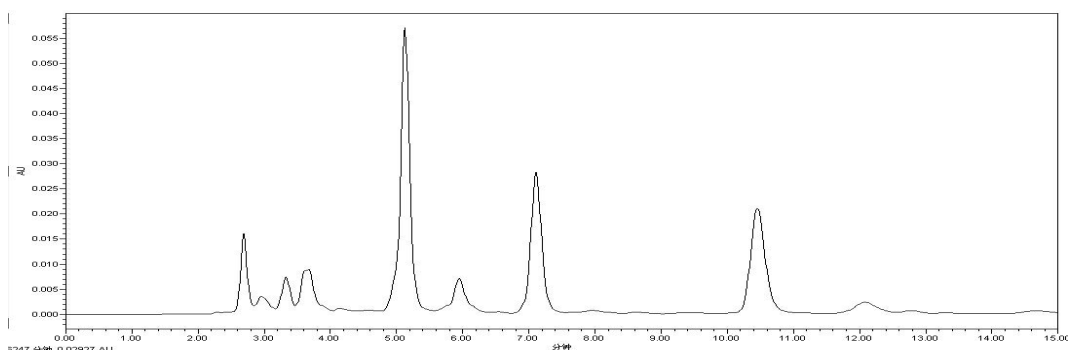


图 21. 精料补充料空白色谱图

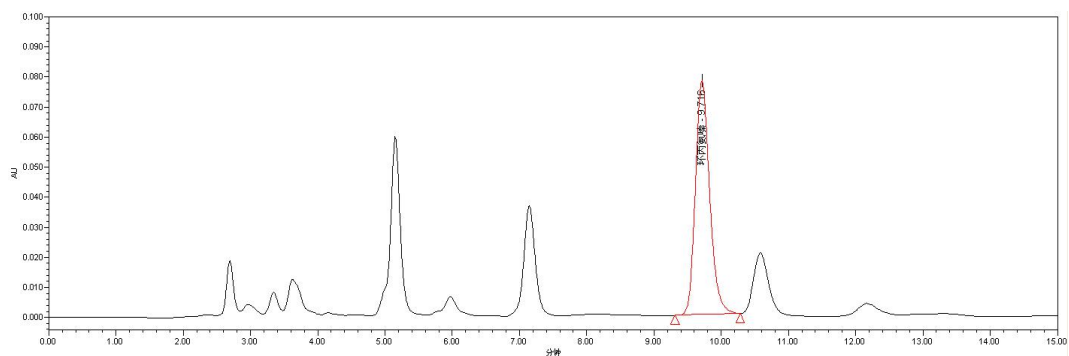


图 22. 精料补充料空白添加色谱图 (50 ug/g)

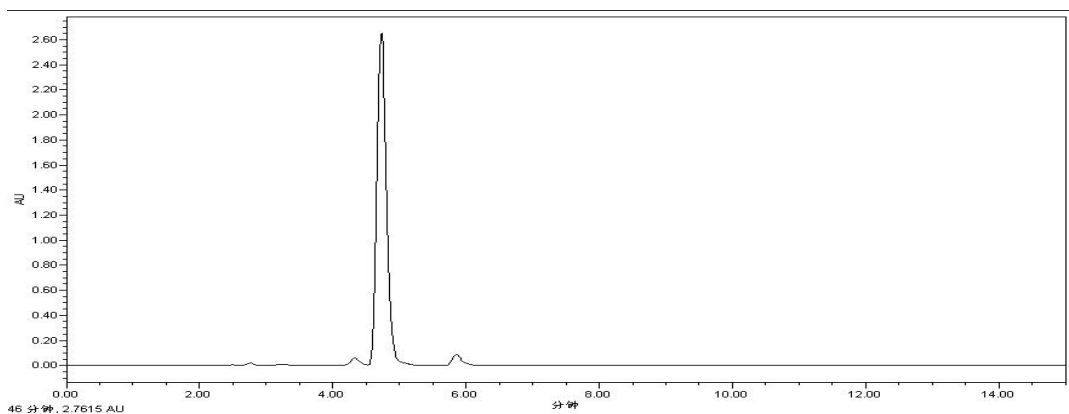


图 23. 维生素预混合饲料空白色谱图

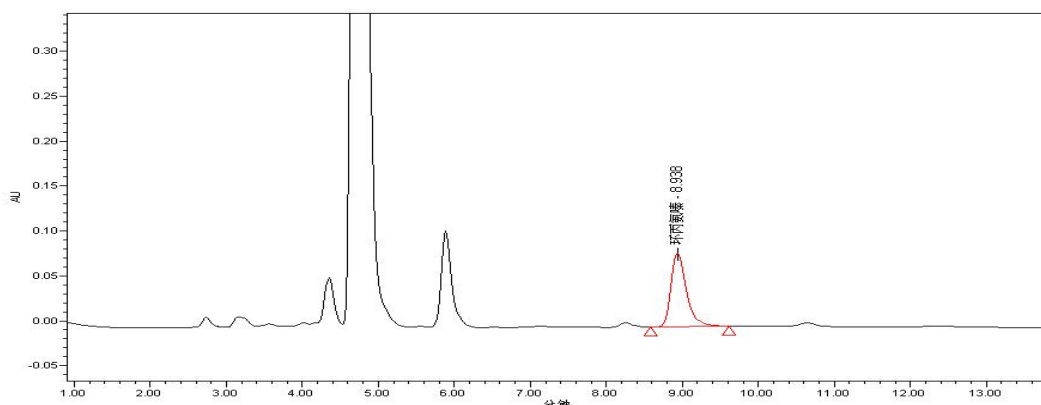


图 24 维生素预混合饲料空白添加色谱图（50 ug/g）

3、液相色谱-串联质谱法试验条件的研究

3.1 液相色谱试验条件的确定

根据带电喷雾离子源质谱的工作原理，目标化合物在溶液状态下电离，因此，流动相的种类和比例不仅影响目标化合物的保留时间和峰形，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。本实验分别考察了乙腈-水、甲醇-水等作为流动相，发现以乙腈-水为流动相时，响应值高，分离效果好，故选择乙腈-水作为流动相。以乙腈-水为流动相连续进样时，样品平行性差较差，故又考察了乙腈-0.1%甲酸水为流动相，结果显示，平行性好，峰形尖锐对称，因此最终选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。最终色谱条件如下：

色谱柱：dC18 柱，柱长 150 mm，内径 3.0 mm，粒度 2.1 μm ，或性能相当者；

柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。

流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液，梯度洗脱，洗脱程序见表 9。

流速：0.30 mL/min。

进样量：5 μL 。

表 9 流动相和梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	5	95
1.0	5	95
3.0	85	15
5.0	5	95
7.0	5	95

3.2 质谱试验条件的确定

环丙氨嗪易溶于水，在酸性条件下稳定，很易被质子化，同时由于电喷雾电离离子源 (ESI) 易操作和维护，本方法选择 ESI⁺ 进行分析。

采用 Thermo Scientific 公司 TSQ Quantiva 液相色谱-串联质谱仪，以乙腈/0.1% 甲酸溶液 (5:95, V/V) 为稀释液，蠕动泵 (10 μL/min) 对环丙氨嗪的质谱条件进行优化，在 ESI⁺ 离子模式进行全扫描。经过优化的条件为：离子源喷雾电压：3.5 kV；离子传输杆温度：333 °C；喷雾器温度：300 °C；鞘气：氮气 30 Arb；辅助气：氮气 5 Arb。选择丰度最强的碎片离子作为定量离子，次强的碎片离子作为定性离子，见图 25。定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 10。

在色谱柱选择上，我们对普通 C18 色谱柱进行了考察。但在该质谱条件下，环丙氨嗪出峰异常，表现为双峰。经摸索，以硅胶基质双键键合 C18 为填料的 C18 柱 (dC18)，pH 范围和碳载量与普通 C18 不同，对于化合物的选择性也有差异。应用该柱色谱时环丙氨嗪出峰效果最好，故选择 dC18 色谱柱。

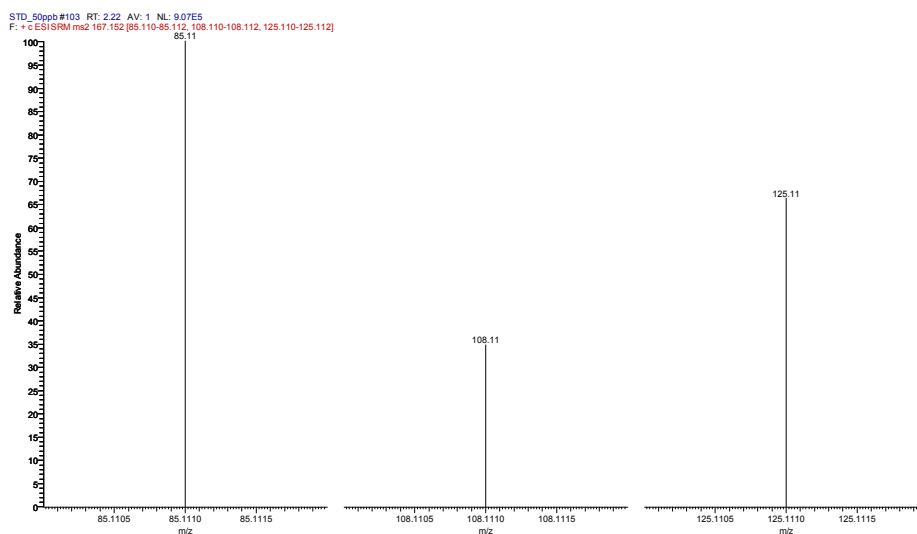


图 25. 环丙氨嗪离子质谱图

表 10 定性、定量离子的保留时间、锥孔电压和碰撞能量

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 <i>V</i>	碰撞能量 <i>eV</i>
环丙氨嗪	167.2 > 85.1	167.2 > 85.1	43	19
	167.2 > 125.1			18

3.3 稀释溶剂的确定

液质方法中的提取、净化步骤均同液相方法保持一致。因液相方法中的复溶液为磷酸盐缓冲液/甲醇/乙腈（93/5/2；v/v/v），含有大量缓冲盐，不适用于质谱条件。所以，根据优化后的质谱条件，将复溶液调整为液质流动相即乙腈/0.1%甲酸溶液(5/95，V/V)。经上机测定，该复溶液条件下，环丙氨嗪响应值高，峰形好，因此，选择乙腈/0.1%甲酸溶液(5/95，V/V)为液质方法的稀释溶剂。

3.4 基质匹配标准曲线

针对不同饲料基质的基质效应进行考察，结果表明，不同饲料基质均对环丙氨嗪的测定存在不同程度的抑制效应。其中，猪复合预混合饲料、猪配合饲料的基质抑制效应低于10%，鸡复合预混合饲料、鸡配合料的基质抑制效应约20%，鸡、猪浓缩料的抑制效应约为30%。因此，我们采用基质匹配标准曲线对结果进行校正定量计算。

精确移取适量标准工作液于10 mL容量瓶中，用0.1%甲酸乙腈溶液稀释定容配成标准系列溶液，浓度分别为：10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL和500 ng/mL。现用现配。取基质空白试样，按标准文本4.5.1和4.5.2处理得到氮气吹干的空白基质，分别取环丙氨嗪系列溶液1 mL复溶空白基质，配制成10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL和500 ng/mL基质匹配标准系列溶液，过滤膜后，由低浓度到高浓度供液相色谱-串联质谱仪测定。以特征离子色谱峰面积为纵坐标，基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。各饲料基质中环丙氨嗪的基质匹配标准曲线及相关系数见表11。

表 11 环丙氨嗪基质匹配标准曲线及相关系数

基质类型	线性方程	相关系数 (R ²)
猪配合饲料	Y=7.336e4X+6.325e4	0.9987
猪浓缩饲料	Y=6.63e4X+7.284e4	0.9978
猪复合预混合饲料	Y=7.411e4X+1.277e5	0.9974
鸡配合饲料	Y=5.768e4X+3.994e4	0.9997
鸡浓缩饲料	Y=4.834e4X-6.75e3	0.9998
鸡复合预混合饲料	Y=6.909e4X+5.539e4	0.9982
牛精料补充料	Y=4.019e4X+3.098e4	0.9981
维生素预混合饲料	Y=1.777e4X+2.147e5	0.9978

3.5 方法的灵敏度

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了空白试样按相同的步骤处理后，结果表明：在相应的保留时间，空白试料对所测环丙氨嗪无干扰。

检测限 (LOD)：添加 100 ng 标准溶液于 2 g 空白配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 3$ (按 PtP 算)，确定环丙氨嗪在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中的检测限 0.05 mg/kg。

定量限 (LOQ)：添加 200 ng 标准溶液于 2 g 空白配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 10$ (按 PtP 算)，确定环丙氨嗪在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中的检测限 0.1 mg/kg。

3.6 方法的准确度和精密度考察 (LC-MS)

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了环丙氨嗪在猪和鸡的配合料、预混料、浓缩料以及精料补充料中的添加回收情况。采用标准添加法，在空白饲料中添加 3 个不同浓度 0.1 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg (预混料添加浓度为 0.1 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg 和 100 mg/kg，配合料添加浓度为 0.1 mg/kg、5 mg/kg、25mg/kg) 的环丙氨嗪进行准确度和精密度试验，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 12~表 19。

表 12 猪配合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	85.2	92.0	90.4	103.5	99.8	94.2	7.8	
	II	93.0	100.4	97.0	89.7	102.7	96.6	5.5	6.1
	III	89.4	103.4	90.8	94.2	93.3	94.2	5.8	
5	I	97.3	91.0	100.0	87.1	88.1	92.7	6.1	
	II	90.1	86.8	85.8	91.0	88.9	88.5	2.5	6.1
	III	99.7	98.9	85.5	87.1	99.0	94.0	7.5	
25	I	89.8	92.9	97.7	95.3	88.0	92.7	4.2	
	II	90.5	89.2	92.4	98.8	94.6	93.1	4.1	4.2
	III	87.3	89.7	98.4	90.0	88.2	90.7	4.9	

表 13 猪浓缩饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	93.2	92.9	97.2	101.5	95.7	96.1	3.6	
	II	103.2	103.8	95.3	99.0	92.0	98.6	5.1	4.6
	III	103.5	102.9	105.8	101.7	103.1	103.4	1.4	
10	I	101.9	98.8	94.0	95.9	89.4	96.0	5.0	
	II	94.3	88.8	94.3	85.4	99.3	92.4	5.9	5.9
	III	88.4	91.0	86.2	100.5	101.0	93.4	7.4	

50	I	85.1	95.0	94.8	96.7	98.2	94.0	5.5	5.6
	II	96.8	90.1	85.7	90.7	82.6	89.2	6.1	
	III	94.5	90.3	85.7	88.7	84.7	88.8	4.4	

表 14 猪复合预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	83.7	81.8	78.0	78.8	84.0	81.3	3.4	8.1
	II	79.8	66.6	74.5	74.0	77.5	74.5	6.7	
	III	82.1	88.4	72.8	68.5	86.7	79.7	10.9	
10	I	85.3	75.9	89.0	92.1	91.1	86.7	7.6	9.4
	II	97.1	79.4	92.2	79.4	73.3	84.3	11.8	
	III	75.6	71.6	89.2	71.5	91.1	79.8	12.1	
50	I	84.5	96.9	92.3	68.7	80.6	84.6	12.9	11.3
	II	79.3	95.6	94.0	79.7	87.1	87.1	8.8	
	III	70.5	86.1	68.5	91.7	85.1	80.4	12.8	
100	I	83.7	81.8	78.0	78.8	84.0	81.3	3.4	8.1
	II	79.8	66.6	74.5	74.0	77.5	74.5	6.7	
	III	82.1	88.4	72.8	68.5	86.7	79.7	10.9	

表 15 鸡配合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	98.3	104.8	106.5	109.7	98.3	103.5	4.9	4.9
	II	114.0	108.5	109.2	99.8	110.8	108.4	4.9	
	III	114.1	113.3	108.7	111.1	107.7	111.0	2.5	
5	I	100.5	94.5	97.1	94.6	89.4	95.2	4.2	5.8
	II	91.4	102.4	89.5	100.1	91.1	94.9	6.2	
	III	98.1	97.9	98.8	85.6	85.1	93.1	7.6	
25	I	88.9	90.4	88.4	87.5	100.5	91.1	5.9	5.3
	II	94.2	86.4	95.0	93.0	86.8	91.1	4.6	
	III	90.6	88.6	98.4	101.3	90.0	93.8	6.1	

表 16 鸡浓缩饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	91.9	96.4	112.1	93.4	105.0	99.8	8.6	7.7
	II	102.2	95.6	107.3	111.9	112.7	105.9	6.7	
	III	99.4	110.2	113.6	100.0	115.9	107.8	7.1	
10	I	89.8	105.6	92.7	93.2	91.1	94.5	6.7	6.4
	II	105.2	98.9	92.2	106.2	99.5	100.4	5.6	

	III	92.1	98.2	104.4	99.0	107.8	100.3	6.0	
50	I	100.0	86.9	103.6	83.6	96.2	94.1	9.1	
	II	81.5	92.0	99.9	98.3	102.2	94.8	8.8	8.0
	III	94.9	99.9	84.7	104.4	91.4	95.1	8.0	

表 17 鸡复合预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	91.2	94.6	79.6	83.7	87.5	87.3	6.8	
	II	83.1	88.8	89.7	88.1	84.5	86.8	3.3	5.8
	III	87.8	79.6	78.0	82.1	92.5	84.0	7.2	
10	I	98.0	87.5	95.6	87.3	83.0	90.3	7.0	
	II	95.3	98.4	88.4	94.6	94.7	94.3	3.9	6.0
	III	86.7	88.6	95.7	84.3	99.5	91.0	7.0	
50	I	84.0	94.2	87.5	87.9	84.7	87.7	4.6	
	II	95.7	96.1	91.0	101.0	101.9	97.1	4.6	6.6
	III	101.3	91.9	88.1	87.9	98.4	93.5	6.5	
100	I	88.2	84.8	82.6	95.1	84.4	87.0	5.7	
	II	97.2	89.8	86.3	88.3	98.0	91.9	5.8	5.7
	III	92.2	91.6	97.6	94.4	96.7	94.5	2.8	

表 18 牛精料补充料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.1	I	92.6	82.4	80.6	89.4	83.3	85.6	6.0	
	II	83.3	92.3	78.3	81.1	94.7	86.0	8.4	6.7
	III	88.3	93.4	83.4	90.9	78.1	86.8	7.1	
10	I	86.4	97.9	95.0	92.5	86.3	91.6	5.6	
	II	94.6	98.6	95.9	95.5	87.1	94.3	4.6	4.8
	III	89.9	85.0	92.0	93.5	96.2	91.3	4.6	
50	I	101.9	83.4	97.9	83.3	87.9	90.9	9.4	
	II	90.0	84.3	83.1	85.0	96.1	87.7	6.1	7.9
	III	90.2	86.1	103.3	96.5	83.6	91.9	8.7	

表 19 维生素预混合饲料中环丙氨嗪添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
	I	96.2	89.4	99.5	91.3	94.3	94.1	4.2	

0.1	II	95.3	88.6	92.7	93.4	89.7	91.9	3.0	3.4
	III	98.1	90.6	94.1	92.5	91.6	93.4	3.1	
	I	102.5	96.7	101.7	99.4	100.8	100.2	2.3	
10	II	99.5	94.6	100.5	103.4	98.7	99.3	3.2	5.5
	III	91.6	100.6	98.6	87.6	85.6	92.8	7.1	
	I	82.4	83.8	89.6	80.5	84.5	84.2	4.0	
50	II	89.6	84.6	85.7	90.6	87.4	87.6	2.9	4.4
	III	92.1	89.6	80.5	86.9	91.4	88.1	5.3	
	I	100.9	87.9	95.8	99.3	94.7	95.7	5.3	
100	II	89.4	98.6	92.7	97.6	95.7	94.8	4.0	4.3
	III	95.6	94.8	89.6	88.7	92.6	92.3	3.3	
	I	100.9	87.9	95.8	99.3	94.7	95.7	5.3	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 0.1 mg/kg~100 mg/kg 的环丙氨嗪，平均回收率为 66.6%~115.9%，批内、批间相对标准偏差均小于 12.9%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量的环丙氨嗪测定均有较好的准确度。不同饲料的基质匹配标准溶液、空白及空白添加样品的特征离子色谱见图 26~图 49。

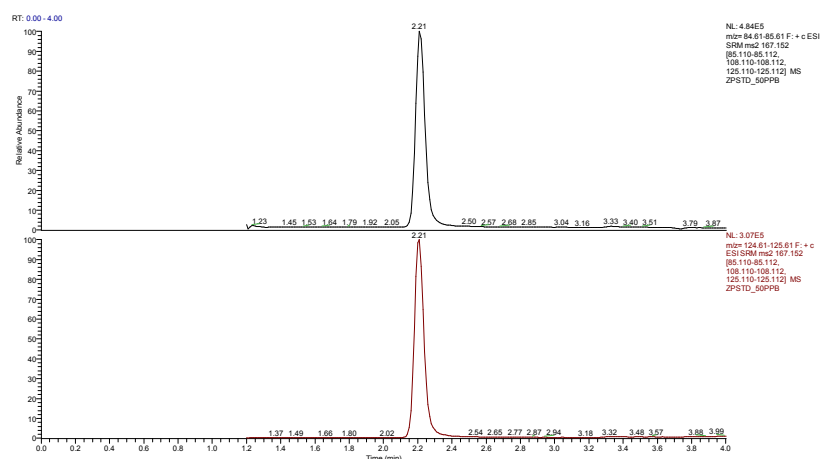


图 26. 猪配合饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图（50 ng/mL）

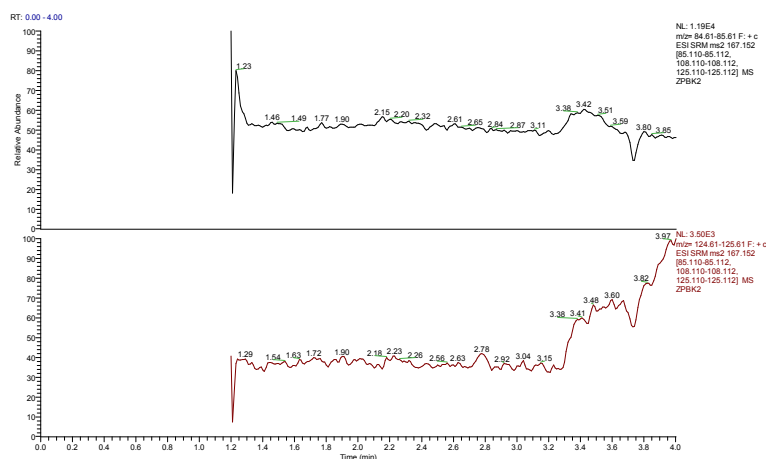


图 27. 猪配合饲料基质空白特征离子色谱图

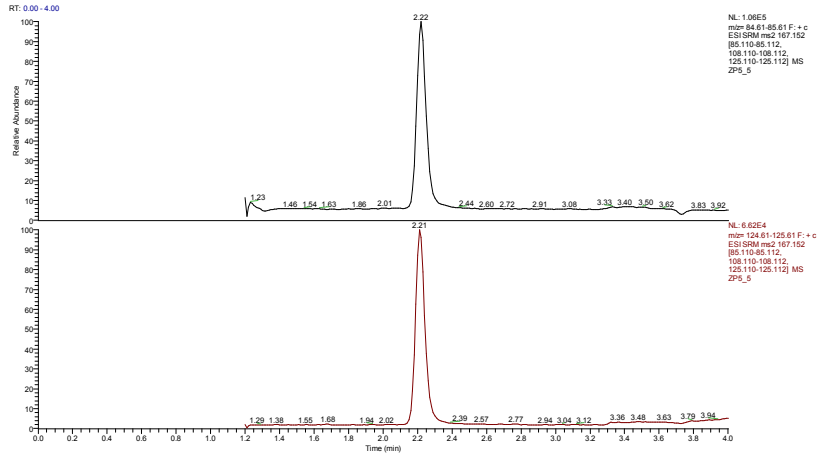


图 28. 猪配合饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (5 mg/kg)

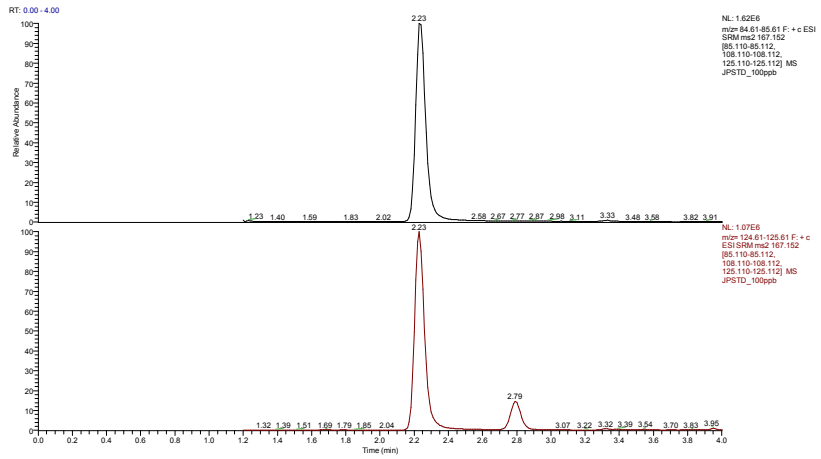


图 29. 鸡配合饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (100 ng/mL)

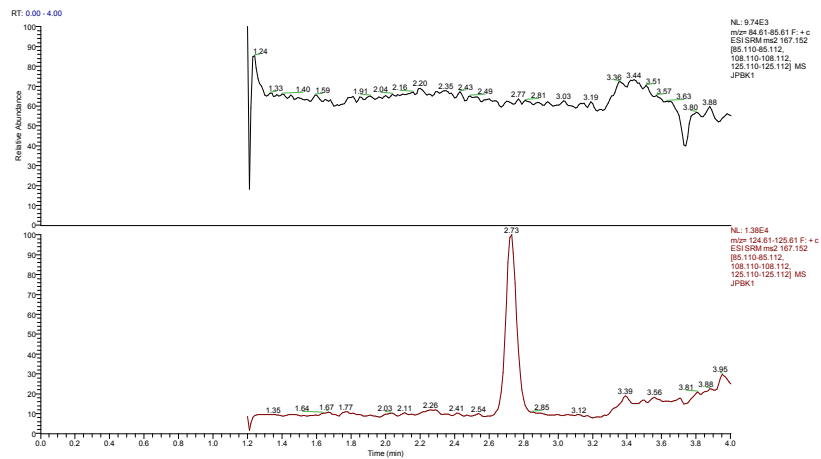


图 30. 鸡配合饲料基质空白特征离子色谱图

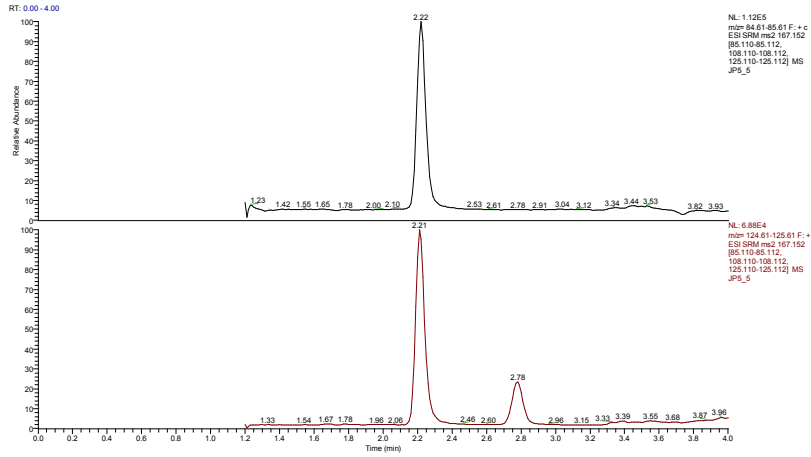


图 31. 鸡配合饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (5 mg/kg)

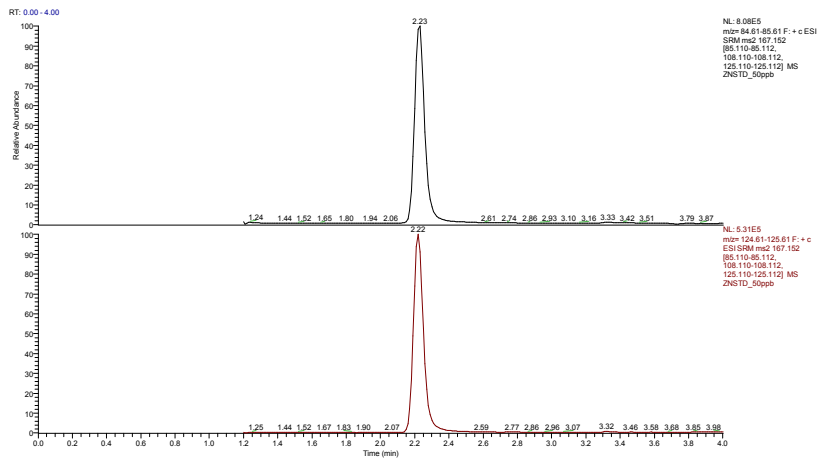


图 32. 猪浓缩饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (50 ng/mL)

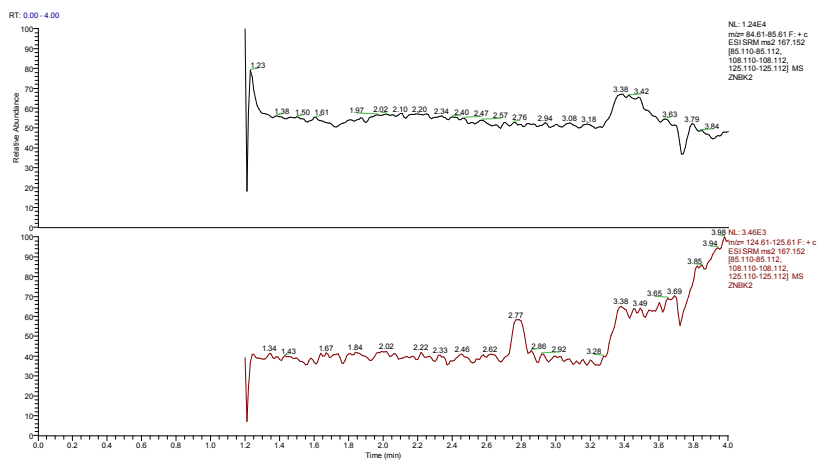


图 33. 猪浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

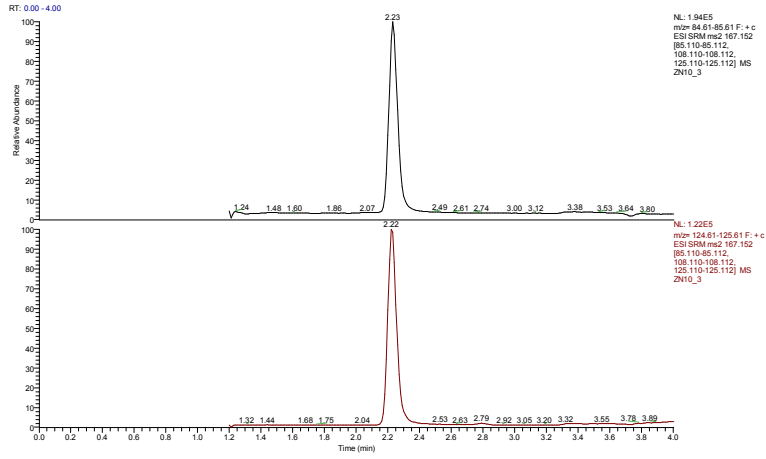


图 34. 猪浓缩饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (10 mg/kg)

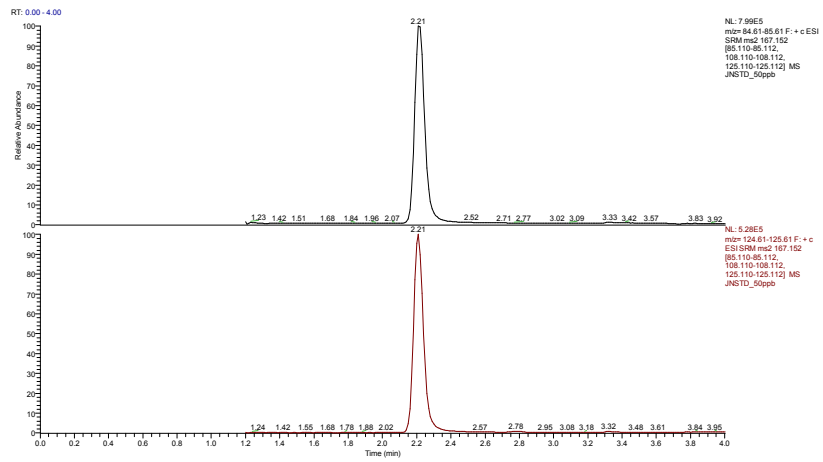


图 35. 鸡浓缩饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (50 ng/mL)

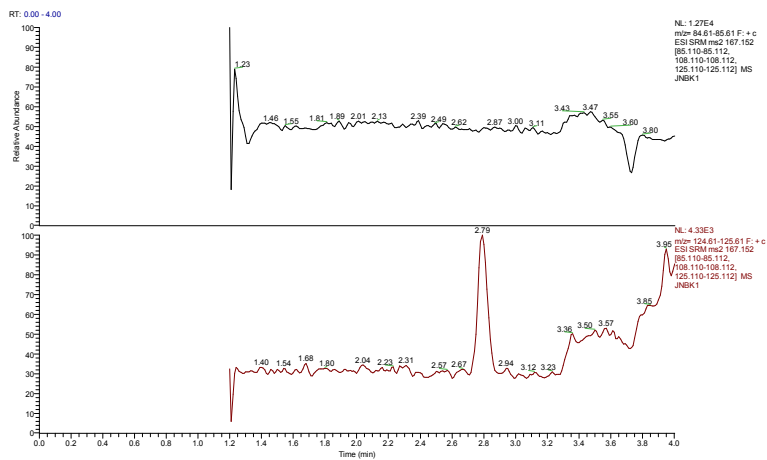


图 36. 鸡浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

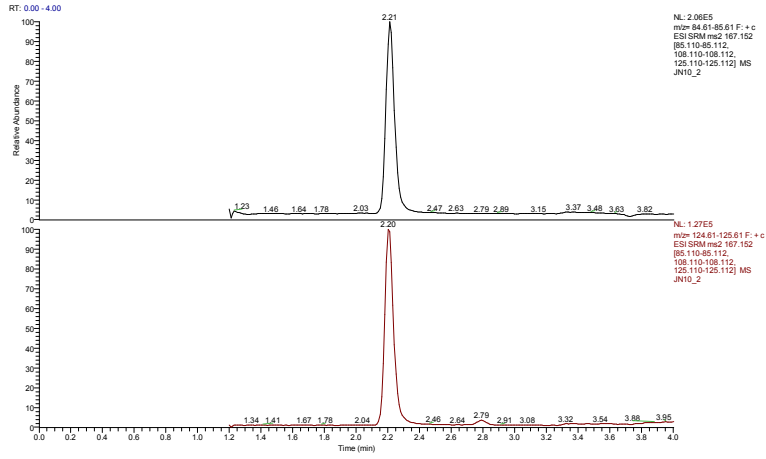


图 37. 鸡浓缩饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (10 mg/kg)

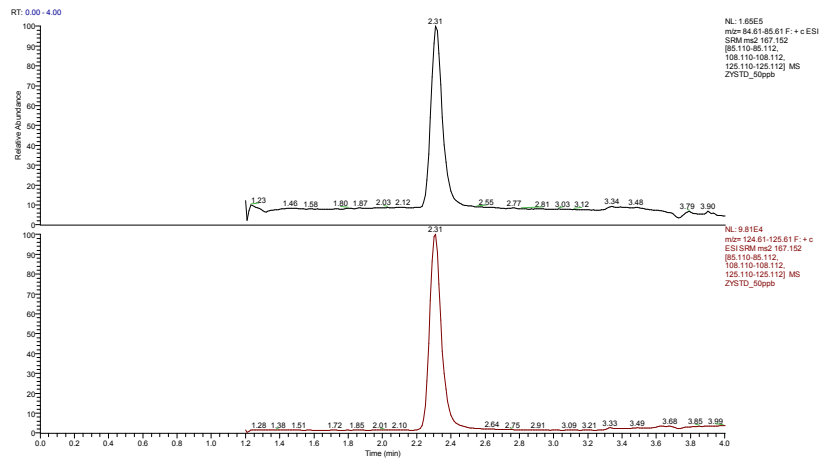


图 38. 猪复合预混合饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (50 ng/mL)

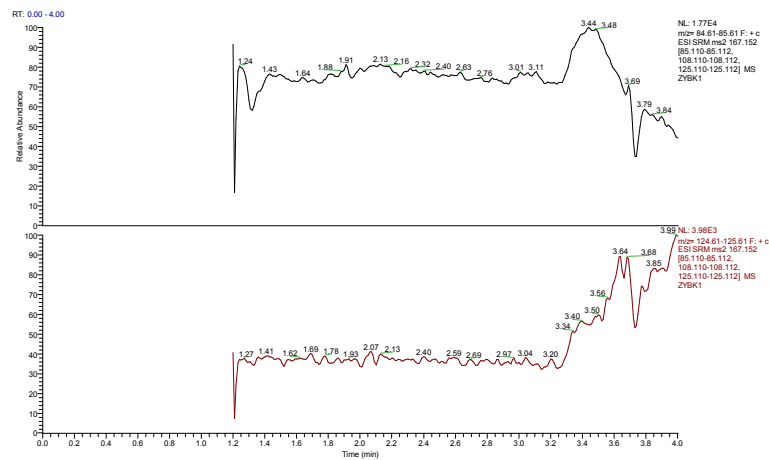


图 39. 猪复合预混合饲料基质空白特征离子色谱图

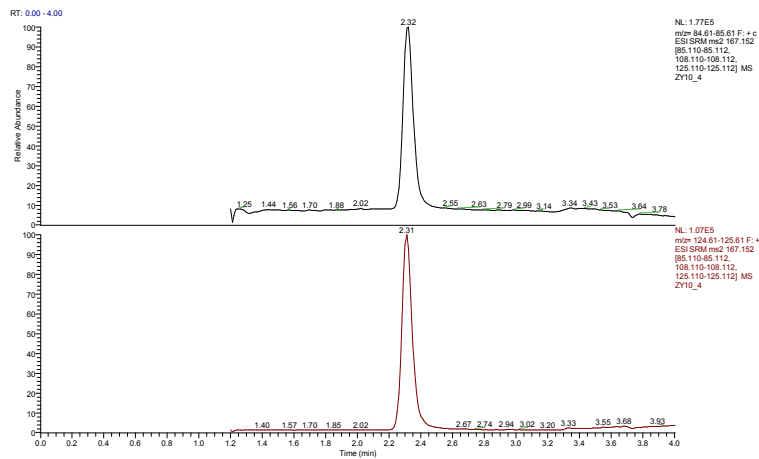


图 40. 猪复合预混合饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (10 mg/kg)

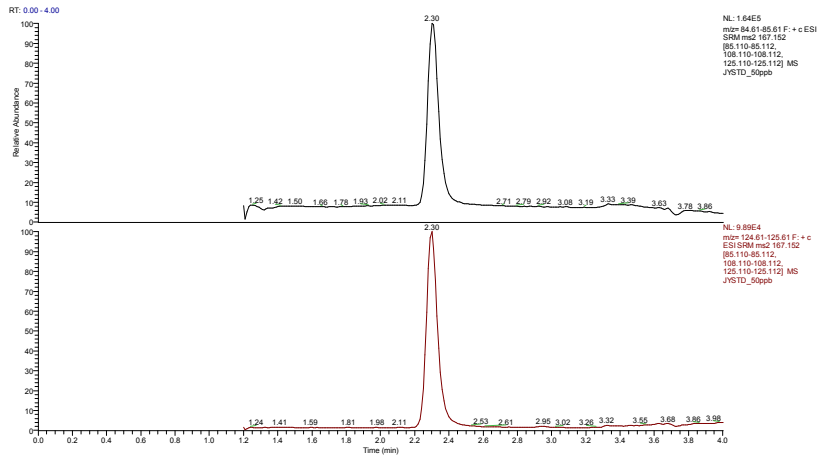


图 41. 鸡复合预混合饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (50 ng/mL)

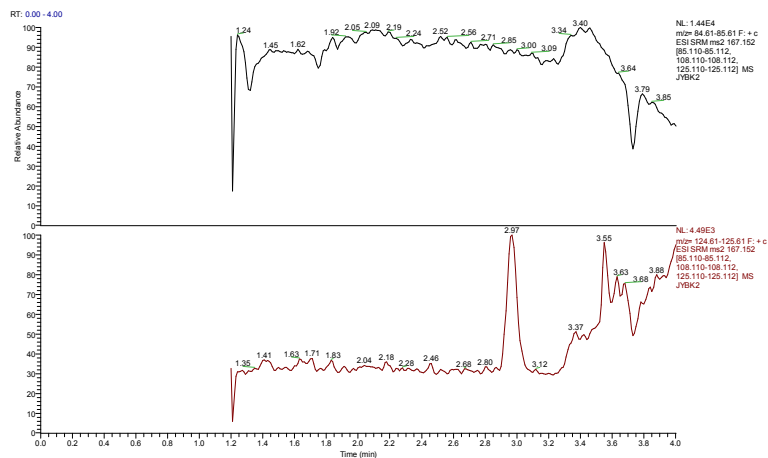


图 42. 鸡复合预混合饲料基质空白特征离子色谱图

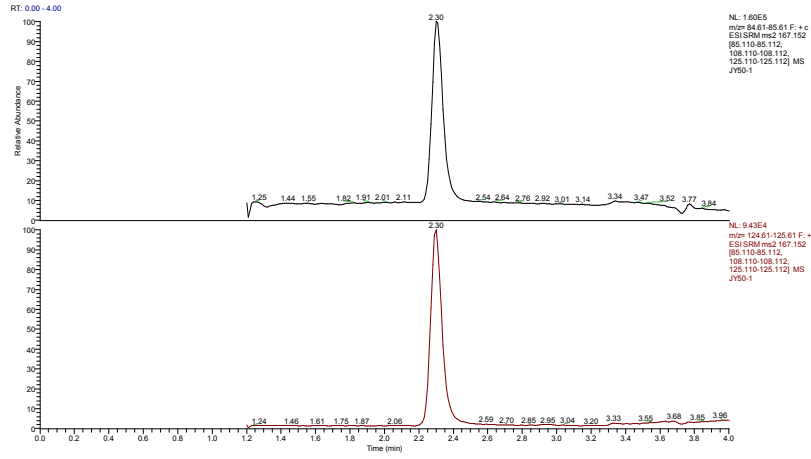


图 43. 鸡复合预混合饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (50 mg/kg)

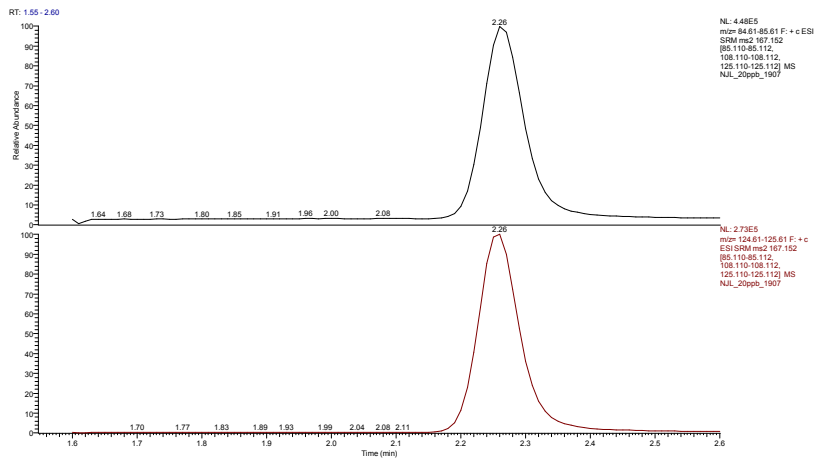


图 44. 牛精料补充料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (20 ng/mL)

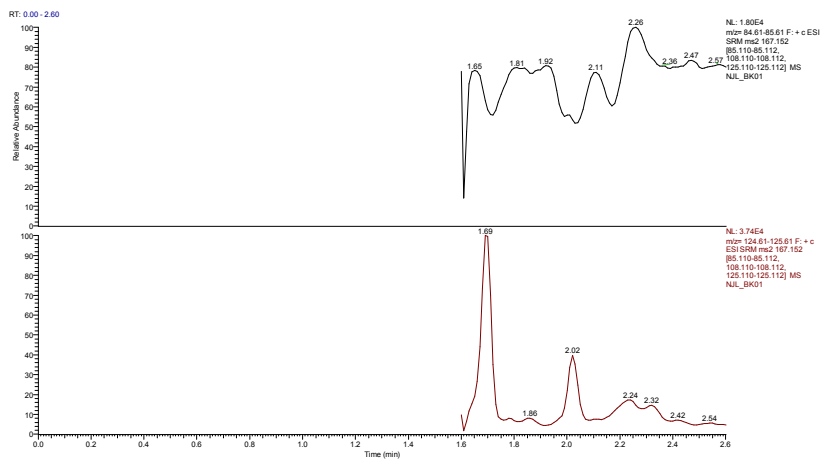


图 45. 精料补充料基质空白特征离子色谱图

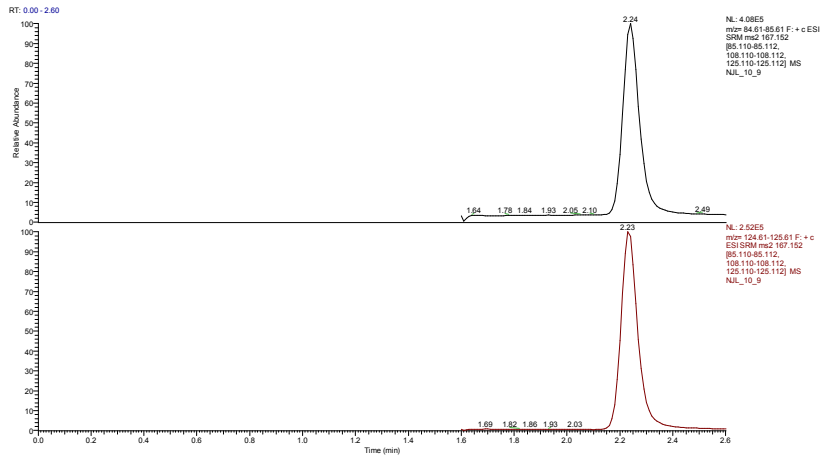


图 46. 精料补充料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图 (10 mg/kg)

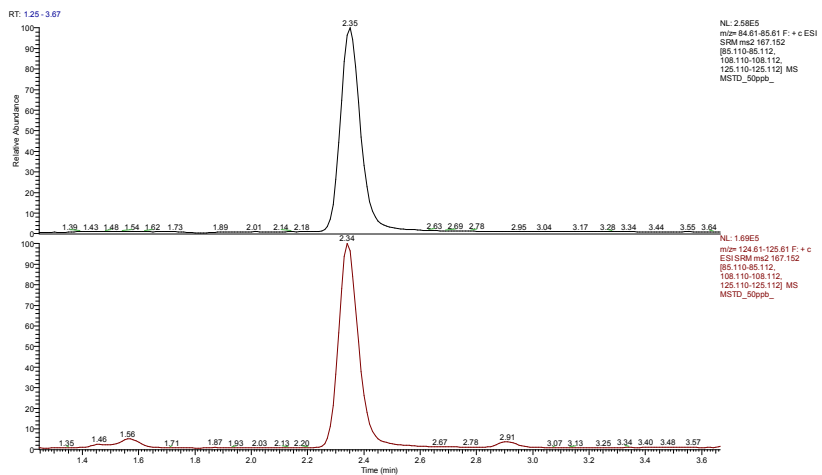


图 47. 维生素预混合饲料中环丙氨嗪基质标准溶液特征离子色谱图 (50 ng/mL)

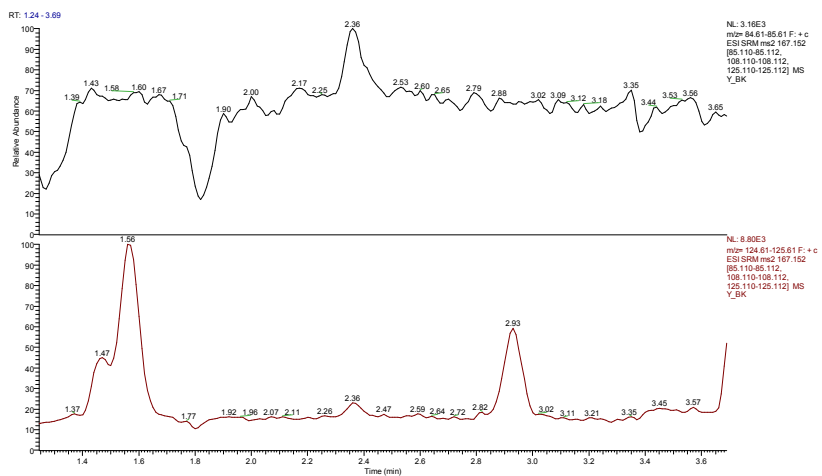


图 48. 维生素预混合饲料基质空白特征离子色谱图

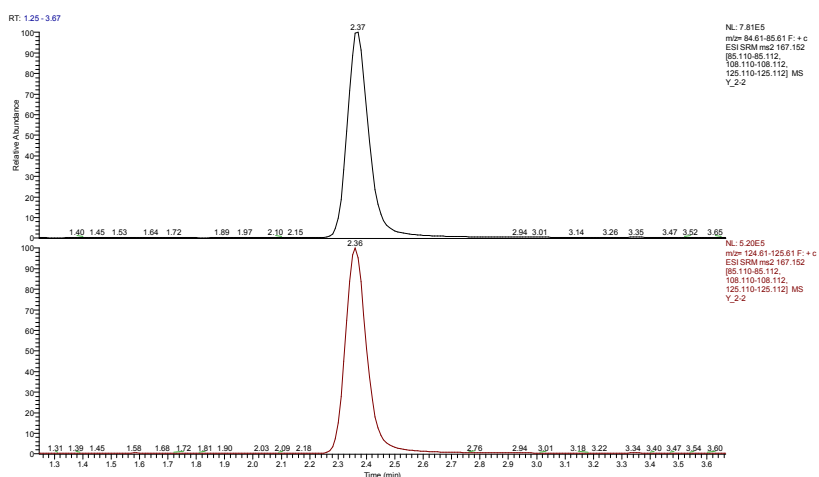


图 49. 维生素预混合饲料空白添加环丙氨嗪特征离子色谱图（10 mg/kg）

4、标准内容说明

4.1 检测方法基本原理

(1) 液相色谱法

试样经乙腈-三氯乙酸混合溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，洗脱液吹干后，用流动相溶液溶解，供高效液相色谱仪检测，外标法定量。

(2) 液相色谱-串联质谱法

试样经乙腈-三氯乙酸混合溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，洗脱液吹干后，用 0.1%甲酸乙腈溶液溶解，供液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

4.2 准确度结果

根据环丙氨嗪检测方法不同添加浓度的回收率原则要求，三个复核单位的高效液相色谱法回收率范围也都在 64%~115%之间，批内批间变异系数也都小于 11%；液相色谱-串联质谱法回收率范围也都在 68%~114%之间，批内批间变异系数也都小于 9.2%。因此本方法将回收率范围定在 60%~120%之间。

4.3 结论

采用高效液相色谱法/液相色谱-串联质谱法测定饲料中环丙氨嗪含量的方法标准，明确规定了适用范围、确定了检测波长、提取净化等方法以及高效液相色谱条件、质谱条件等，具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

四、 采用国际标准

本标准在制定过程中未采用国际标准。

五、 与有关现行法律法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

六、 重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集了国内外相关信息资料，组织技术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。标准编制过程中没有重大意见分歧。

七、 作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一，因此建议将其作为推荐性标准颁布实施。

八、 贯彻标准的要求和措施建议

本标准在实施前，每个使用者应得到有效的电子和纸质文本，保证新标准贯彻实施的基础。发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。实施的过渡期宜定为6个月。

九、 废止现行有关标准的建议

本标准为首次制定，无替代、废止现行有关标准。

十、 其他应予说明的事项

本标准在下达任务时的名称为《饲料中环丙氨嗪的测定 高效液相色谱法》，后按照全国饲料工业标准化技术委员会要求增加液相色谱-串联质谱法的确证方法，因此，为使标准

内容与名称相匹配，并结合预审会专家组意见，最终将标准名称改为《饲料中环丙氨嗪的测定》。

《饲料中环丙氨嗪的测定》课题组

二零二零年四月

参考文献

- [1] GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则的要求.
- [2] GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则.
- [3] GB/T 20001.4-2001 标准编写规则第4部分：化学分析方法.
- [4] GB 29704-2013 《食品安全国家标准 动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定 超高效液相色谱-串联质谱法》.
- [5] 邢云瑞,姚静静,王方雨,孙亚宁,邓瑞广,胡晓飞.环丙氨嗪在畜牧养殖业中的应用及其检测技术研究进展[J].河南农业科学,2017,46(03):20-24.
- [6] 王冉,柳伟荣,耿志明,陈明,刘铁铮.高效液相色谱法测定饲料中环丙氨嗪[J].中国饲料,2005(02):34-36.
- [7] 尚彬如.气相色谱-质谱法同步检测饲料中三聚氰胺和环丙氨嗪[A].中国畜牧兽医学.中国畜牧兽医学学会2009学术年会论文集(下册)[C].中国畜牧兽医学学会:中国畜牧兽医学学会,2009:1.
- [8] 魏瑞成,王冉,刘伟荣.高效液相色谱法测定鸡蛋、牛奶和猪肉中环丙氨嗪及三聚氰胺的实验研究[J].食品科学,2008,29(12):605-609.
- [9] 徐小艳.鸡组织中环丙氨嗪残留的HPLC检测法及消除规律研究[D].扬州大学,2005.
- [10] 刘德金,葛峰,吴若函,高士祥.高效液相色谱法同时测定青菜中环丙氨嗪和三聚氰胺残留[J].生态与农村环境学报,2012,28(05):595-598.