

ICS 65.120
CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4678—2025

代替农业部 1486 号公告—3—2010

饲料中安普霉素的测定

Determination of apramycin in feeds

2025-01-09 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。

本文件代替农业部 1486 号公告—3—2010《饲料中安普霉素的测定 高效液相色谱法》，与农业部 1486 号公告—3—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围、检出限和定量限(见第 1 章,农业部 1486 号公告—3—2010 的第 1 章)；
- b) 增加了仲裁法“液相色谱-串联质谱法”(见第 4 章)；
- c) 更改了试样提取方法(见 5.5.1,农业部 1486 号公告—3—2010 的 7.1)。

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：西南民族大学、四川特驱农牧科技集团有限公司、四川众检四方检验检测技术有限公司。

本文件主要起草人：柏雪、何利梅、梅绍锋、虞洁、付晓、黄李蓉、史海涛、陈柳、胡易容、林涛。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2010 年首次发布为农业部 1486 号公告—3—2010；

——本次为第一次修订。



饲料中安普霉素的测定

1 范围

本文件描述了饲料中安普霉素的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和复合预混合饲料中安普霉素的测定。

本文件中液相色谱-串联质谱法的检出限为 0.04 mg/kg、定量限为 0.10 mg/kg, 高效液相色谱法的检出限为 2 mg/kg、定量限为 5 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

试样中的安普霉素用盐酸溶液提取, 经混合型强阳离子固相萃取柱净化后, 用液相色谱-串联质谱仪测定, 内标法定量。

4.2 试剂或材料

注意: 标准溶液配制和贮存、样品溶液不应使用玻璃材质容器。

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水: GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.2 甲醇: 色谱级。

4.2.3 乙腈: 色谱级。

4.2.4 甲酸: 色谱级。

4.2.5 异丙醇: 色谱级。

4.2.6 盐酸溶液(0.1 mol/L): 移取 8.4 mL 浓盐酸, 用水稀释定容至 1 000 mL, 混匀。

4.2.7 5%氨水甲醇溶液: 量取 20 mL 甲醇(4.2.2)于 100 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 氨水, 然后用甲醇(4.2.2)定容, 混匀。

4.2.8 乙酸铵溶液(0.01 mol/L): 称取 0.77 g 乙酸铵, 用水溶解并稀释至 1 000 mL, 混匀。

4.2.9 乙酸铵溶液(0.002 mol/L): 取 100 mL 乙酸铵溶液(4.2.8), 加水稀释至 500 mL, 混匀。

4.2.10 复溶液: 取 20 mL 甲酸(4.2.4)、10 mL 异丙醇(4.2.5)和 170 mL 乙酸铵溶液(4.2.9), 混匀, 用甲酸(4.2.4)调节 pH 至 0.8。

4.2.11 标准储备溶液(1 mg/mL): 准确称取 29.5 mg 硫酸安普霉素标准品(CAS:65710-07-8, 纯度不低于 96%)于 25 mL 聚丙烯容量瓶中, 加水溶解, 并定容, 混匀。于 2 °C~8 °C 保存, 有效期为 1 个月。

4.2.12 标准中间溶液(100 μg/mL): 准确移取 10 mL 标准储备溶液(4.2.11)于 100 mL 聚丙烯容量瓶

中,用水稀释定容,混匀。于2℃~8℃保存,有效期为5天。

4.2.13 标准工作溶液(10 μg/mL):准确移取10 mL标准中间溶液(4.2.12),置于100 mL聚丙烯容量瓶中,用复溶液(4.2.10)稀释定容,混匀。临用现配。

4.2.14 内标储备溶液(0.02 mg/mL):准确称取1.11 mg醋酸安普霉素-D₇标准品(纯度不低于96%)于50 mL聚丙烯容量瓶中,加水溶解,并定容,混匀。于2℃~8℃保存,有效期为1个月。

4.2.15 内标工作溶液(10 μg/mL):准确移取5 mL内标储备溶液(4.2.14)于10 mL聚丙烯容量瓶中,用水稀释定容,混匀。于2℃~8℃保存,有效期为2周。

4.2.16 混合标准系列溶液:准确移取适量标准工作溶液(4.2.13)和内标工作溶液(4.2.15)于10 mL聚丙烯容量瓶中,用复溶液(4.2.10)稀释定容配成混合标准系列溶液,质量浓度分别为20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL。内标浓度为250 ng/mL。临用现配。

4.2.17 流动相A:移取5 mL甲酸(4.2.4),10 mL乙酸铵溶液(4.2.8),加乙腈(4.2.3)定容至500 mL,混匀。

4.2.18 流动相B:移取5 mL甲酸(4.2.4),10 mL乙酸铵溶液(4.2.8),加水定容至500 mL,混匀。

4.2.19 混合型强阳离子固相萃取柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

4.2.20 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

4.3.2 分析天平:精度为0.1 mg。

4.3.3 离心机:转速不低于7 000 r/min。

4.3.4 涡旋混合器。

4.3.5 超声波清洗器。

4.3.6 固相萃取装置。

4.3.7 pH计:精度为0.01。

4.4 样品

按GB/T 20195制备样品,至少200 g,粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛,充分混匀,装入密闭容器中保存,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做2份试验。称取试样约2 g(精确至0.1 mg),置于50 mL聚丙烯离心管中,加入0.1 mL内标工作溶液(4.2.15),准确加入20 mL盐酸溶液(4.2.6),涡旋混合1 min,超声提取30 min,7 000 r/min离心10 min,上清液备用。

4.5.2 净化

依次用5 mL甲醇(4.2.2)、5 mL盐酸溶液(4.2.6)活化固相萃取柱(4.2.19),准确移取5 mL上清液(4.5.1)过柱,控制流速不超过1 mL/min。分别用5 mL盐酸溶液(4.2.6)、5 mL甲醇(4.2.2)淋洗,抽干,用5 mL 5%氨水甲醇溶液(4.2.7)洗脱,收集洗脱液于聚丙烯离心管中,在60℃氮气吹干。准确加入1 mL复溶液(4.2.10)溶解,涡旋混匀,过微孔滤膜(4.2.20)于聚丙烯瓶中,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:酰胺柱,柱长100 mm,内径2.1 mm,粒径1.7 μm;或性能相当者。

b) 柱温:35℃。

c) 流速:0.3 mL/min。

d) 进样量:10 μL。

e) 流动相:梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序(液相色谱-串联质谱法)

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0.0	80	20
2.5	80	20
3.5	35	65
5.5	10	90
6.7	10	90
7.5	80	20
12.0	80	20

4.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 电离方式:电喷雾电离,正离子模式(ESI⁺)。
- 检测方式:多反应监测(MRM)。
- 毛细管电压:3.5 kV。
- 干燥气温度:300 ℃。

多反应监测(MRM)离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多反应监测(MRM)离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
安普霉素	540.1>216.9	92	28
	540.1>378.0 ^a	92	16
安普霉素-D ₇	547.3>217.0	154	28
	547.3>381.1 ^a	154	16

^a为定量离子对。

4.5.3.3 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取混合标准系列溶液(4.2.16)和试样溶液(4.5.2)上机测定。安普霉素混合标准溶液的定量离子对色谱图见附录 A。

4.5.3.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与混合标准系列溶液中安普霉素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,比较试样谱图中安普霉素定性离子的相对离子丰度与质量浓度接近的混合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安普霉素。

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

以安普霉素混合标准系列溶液的质量浓度为横坐标,待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中安普霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,需从 4.5.1 重新处理、测定。单点校准定量时,试样溶液中安普霉素的质量浓度与混合标准溶液中安普霉素的质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中安普霉素的含量以质量分数 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。

$$w = \frac{\rho \times V \times V_1 \times n \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中安普霉素质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 复溶后体积的数值,单位为毫升(mL);
- n —— 超出线性范围的稀释倍数;
- 1 000 —— 换算系数;
- V_2 —— 净化时移取上清液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

$$w = \frac{A \times A'_{is} \times \rho_s \times \rho_{is} \times V \times V_1 \times n \times 1\,000}{A_{is} \times A_s \times \rho'_{is} \times V_2 \times m \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A —— 试样溶液中安普霉素的色谱峰面积;
- A'_{is} —— 混合标准溶液中内标的峰面积;
- ρ_s —— 混合标准溶液中安普霉素质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- ρ_{is} —— 试样溶液中内标质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_{is} —— 试样溶液中内标的峰面积;
- A_s —— 混合标准溶液中安普霉素的峰面积;
- ρ'_{is} —— 混合标准溶液中内标质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 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该算术平均值的 15%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的安普霉素用盐酸溶液提取,经混合型强阳离子固相萃取柱净化、邻苯二甲醛衍生后,用高效液相色谱分离、荧光检测器检测,外标法定量。

5.2 试剂或材料

注意:标准溶液配制和贮存、样品溶液不应使用玻璃材质容器。

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.2 甲醇:色谱级。

5.2.3 乙腈:色谱级。

5.2.4 盐酸溶液(0.1 mol/L):移取 8.4 mL 浓盐酸,用水稀释定容至 1 000 mL,混匀。

5.2.5 5%氨水甲醇溶液:量取 20 mL 甲醇(5.2.2)于 100 mL 容量瓶中,加入 5 mL 氨水,然后用甲醇(5.2.2)定容,混匀。

5.2.6 氢氧化钠溶液(6 mol/L):称取 240 g 氢氧化钠,用水溶解,冷却至室温,并用水定容至 1 000 mL,混匀。

5.2.7 硼酸盐缓冲溶液:称取 24.73 g 硼酸,加入 900 mL 水溶解,用氢氧化钠溶液(5.2.6)调 pH 至 9.5,用水稀释定容至 1 000 mL,混匀。

5.2.8 衍生试剂:称取 0.134 g 邻苯二甲醛于 25 mL 棕色容量瓶中,依次加 5 mL 甲醇(5.2.2)、0.1 mL 2-巯基乙醇,混合溶解,并用硼酸盐缓冲溶液(5.2.7)定容至刻度,混匀。室温保存。

5.2.9 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取 29.5 mg 硫酸安普霉素标准品(CAS:65710-07-8,纯度不低于 96%)于 25 mL 聚丙烯容量瓶中,加水溶解,并定容,混匀。于 2 °C~8 °C 保存,有效期为 1 个月。

5.2.10 标准中间溶液(100 μg/mL):准确移取 10 mL 标准储备溶液(5.2.9)于 100 mL 聚丙烯容量瓶中,用水稀释定容,混匀。于 2 °C~8 °C 保存,有效期为 5 天。

5.2.11 标准系列溶液:准确移取适量安普霉素标准中间溶液(5.2.10),用硼酸盐缓冲溶液(5.2.7)稀释定容配成标准系列溶液,质量浓度分别为 0.500 μg/mL、1.00 μg/mL、2.00 μg/mL、5.00 μg/mL、10.0 μg/mL。临用现配。

5.2.12 乙酸-乙酸铵溶液:称取 0.77 g 乙酸铵,加入 800 mL 水,待其溶解后,加 40 mL 乙酸,用水稀释定容至 1 000 mL,混匀。

5.2.13 混合型强阳离子固相萃取柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.2.14 微孔滤膜:0.45 μm,水系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

5.3.2 分析天平:精度为 0.1 mg。

5.3.3 涡旋混合器。

5.3.4 超声波清洗器。

5.3.5 离心机:转速不低于 7 000 r/min。

5.3.6 固相萃取装置。

5.3.7 恒温水浴锅。

5.3.8 氮吹仪。

5.3.9 pH 计:精度为 0.01。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样约 2 g(精确至 0.1 mg),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 20 mL 盐酸溶液(5.2.4),涡旋混合 1 min,超声提取 30 min,7 000 r/min 离心 10 min,上清液备用。

5.5.2 净化

依次用 5 mL 甲醇(5.2.2)、5 mL 盐酸溶液(5.2.4)活化固相萃取柱(5.2.13),准确移取 5 mL 上清液(5.5.1)过柱,控制流速不超过 1 mL/min。分别用 5 mL 盐酸溶液(5.2.4)、5 mL 甲醇(5.2.2)淋洗,抽干,用 5 mL 5%氨水甲醇溶液(5.2.5)洗脱,收集洗脱液于聚丙烯离心管中,在 60 °C 氮气吹干。准确加入 1 mL 硼酸盐缓冲溶液(5.2.7)溶解,涡旋混匀,过微孔滤膜(5.2.14)于聚丙烯瓶中,待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 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 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者。

b) 柱温:30 °C。

c) 检测器:激发波长 230 nm,发射波长 389 nm。

d) 流速:1.0 mL/min。

e) 进样量:20 μL。

f) 流动相:A 相为乙酸-乙酸铵溶液(5.2.12),B 相为乙腈(5.2.3),梯度洗脱程序见表 4。

表 4 梯度洗脱程序(高效液相色谱法)

时间, min	A 相, %	B 相, %
0.00	95	5
3.00	95	5
5.50	75	25
8.50	30	70
8.51	95	5
15.00	95	5

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

准确移取标准系列溶液(5.2.11)和试样溶液(5.5.2)各 0.4 mL 于聚丙烯进样瓶中,加入 0.2 mL 衍生试剂(5.2.8),混匀,衍生 5 min 后,立即在仪器的最佳条件下测定标准系列溶液和试样溶液。安普霉素标准溶液的高效液相色谱图见附录 B。

5.5.3.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中安普霉素保留时间应与标准系列溶液(质量浓度接近)中安普霉素的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

5.5.3.4 定量

以安普霉素标准系列溶液的质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中安普霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应将净化后的待测液(5.5.2)用硼酸盐缓冲溶液(5.2.7)稀释(稀释倍数 n)至线性范围内,衍生,上机测定。单点校准定量时,试样溶液中安普霉素的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中安普霉素的含量以质量分数 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。

$$w = \frac{\rho \times V \times V_1 \times n \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中安普霉素质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V —— 试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 复溶后体积的数值,单位为毫升(mL);
- n —— 超出线性范围的稀释倍数;
- 1 000 —— 换算系数;
- V_2 —— 净化时移取上清液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_1 \times n \times 1\,000}{A_s \times V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- A —— 试样溶液中安普霉素的色谱峰面积;
- ρ_s —— 标准溶液中安普霉素的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- A_s —— 标准溶液中安普霉素的色谱峰面积;

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 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该算术平均值的 15%。

附录 A

(资料性)

安普霉素混合标准溶液定量离子对色谱图

安普霉素混合标准溶液(20 ng/mL)定量离子对色谱图见图 A。

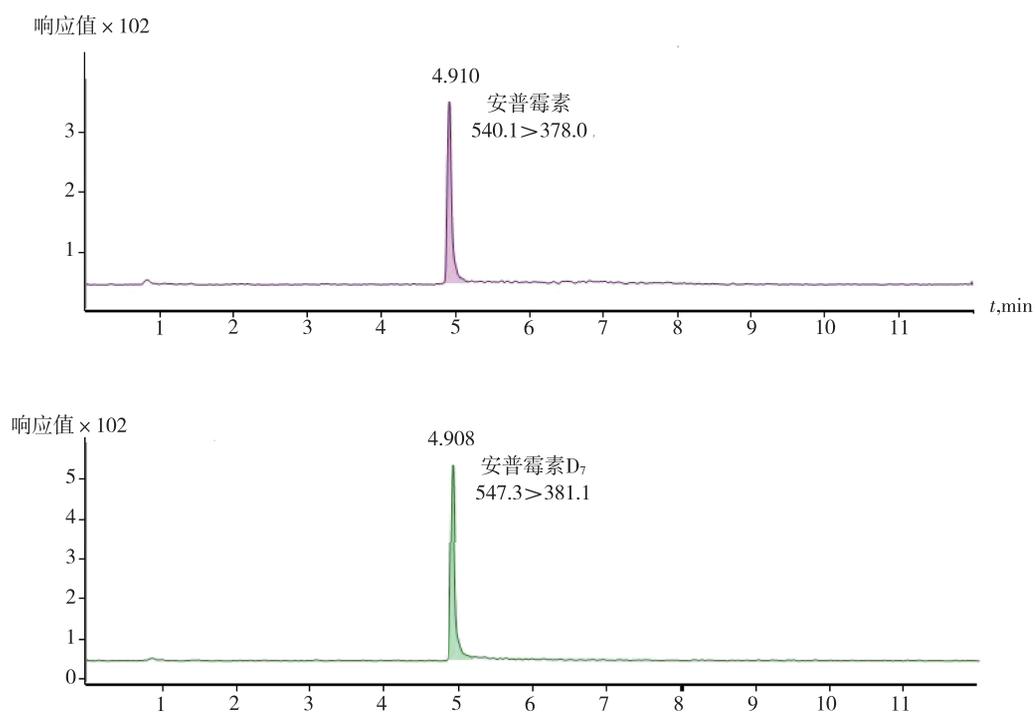


图 A 安普霉素混合标准溶液(20 ng/mL)定量离子对色谱图

附录 B

(资料性)

安普霉素标准溶液高效液相色谱图

安普霉素标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图见图 B。

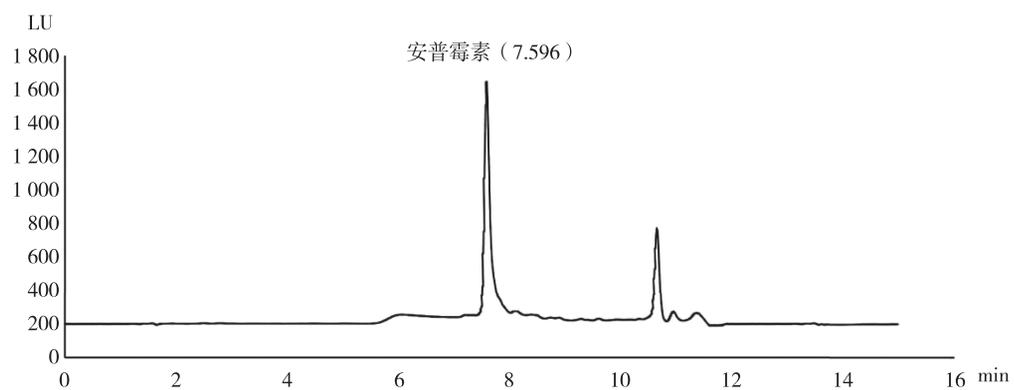


图 B 安普霉素标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图