

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4748—2025

代替农业部 2086 号公告—7—2014

饲料中大观霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of Spectinomycin in feeds—Liquid
chromatography–tandem mass spectrometry

2025-04-27 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 2086 号公告—7—2014《饲料中大观霉素的测定》，与农业部 2086 号公告—7—2014 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 适用范围中增加了混合型饲料添加剂(见第 1 章)；
- b) 更改了原理(见第 4 章,2014 年版的第 3 章)；
- c) 删除了液相色谱法(见 2014 年版的第 4 章)；
- d) 更改了试剂或材料(见第 5 章,2014 年版的 5.1)；
- e) 更改了提取和净化方法(见 8.1 和 8.2,2014 年版的 5.3)；
- f) 更改了色谱和质谱的参考条件(见 8.4,2014 年版的 5.3.3.1)；
- g)增加了单点校准计算公式(见第 9 章)。

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：浙江大学、浙江万方生物科技有限公司

本文件主要起草人：王凤芹、汪以真、刘金松、程远之、路则庆、靳明亮、刘波静、冯杰、单体中、杜华华、宗鑫、开丽霞、王新霞、杨彩梅。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2014 年首次发布为农业部 2086 号公告—7—2014；

——本次为第一次修订。



饲料中大观霉素的测定液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中大观霉素的液相色谱-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、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中大观霉素的测定。

本文件检出限为 1 mg/kg,定量限为 2 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 原理

试样中大观霉素用三氯乙酸溶液和乙二胺四乙酸二钠溶液提取并络合金属离子,经混合型阳离子交换固相萃取小柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,基质添加标准曲线校准,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲酸:色谱纯。

5.3 甲醇:色谱纯。

5.4 乙腈:色谱纯。

5.5 甲酸铵:色谱纯。

5.6 2%三氯乙酸溶液:称取 20 g 三氯乙酸,加水溶解并稀释定容至 1 000 mL,混匀。

5.7 5%乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液:称取 5 g EDTA-2Na,加水溶解并稀释定容至 100 mL,混匀。

5.8 10%氨水溶液:取 10 mL 氨水,加水稀释定容至 100 mL,混匀。

5.9 10%氨化甲醇溶液:取 10 mL 氨水,加甲醇(5.3)稀释定容至 100 mL,混匀。

5.10 甲酸铵-甲酸溶液:称取 0.63 g 甲酸铵(5.5),用 100 mL 水溶解,再加入 4 mL 甲酸(5.2),用水定容至 1 000 mL,混匀。

5.11 甲酸铵-甲酸乙腈溶液:称取 0.63 g 甲酸铵(5.5),用 100 mL 水溶解,再加入 4 mL 甲酸(5.2),用乙腈(5.4)定容至 1 000 mL,混匀。

5.12 复溶液:甲酸铵-甲酸溶液(5.10)和甲酸铵-甲酸乙腈溶液(5.11)等体积混合。

5.13 标准储备溶液(1.0 mg/mL):称取 12.19 mg(精确至 0.01 mg)盐酸大观霉素(CAS:21736-83-4,纯度 $\geq 98.5\%$)于 10 mL 容量瓶中,加水溶解,定容。于 2℃~8℃保存,有效期 3 个月。

5.14 标准中间溶液(200.0 mg/L):准确移取大观霉素标准储备溶液(5.13)2.5 mL于50 mL容量瓶中,用复溶液(5.12)稀释并定容,混匀。于2℃~8℃保存,有效期14 d。

5.15 混合型阳离子交换固相萃取小柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.16 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平:精度为0.001 g和0.01 mg。

6.3 离心机:转速不低于8 000 r/min。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 固相萃取装置。

6.6 氮吹仪:控温精度±2℃。

6.7 酸度计:精度±0.01。

7 样品

按照GB/T 20195的规定制备试样,至少200 g,配合饲料、浓缩饲料和精料补充料粉碎使其全部过0.425 mm试验筛,充分混匀,添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂无需粉碎,混合均匀,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,其仪器响应值小于方法定量限相应值30%的饲料样品,作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做2份试验。称取2.5 g(精确至0.001 g)试样于50 mL塑料离心管中,准确加入23 mL三氯乙酸溶液(5.6)和2 mL EDTA-2Na溶液(5.7),超声提取20 min,其间振摇1次,于8 000 r/min离心5 min,转移上清液至另一50 mL塑料离心管中。重复提取1次并离心,合并上清液,混匀。准确移取3 mL提取液(V_1)至10 mL塑料离心管中,用氨水溶液(5.8)调节pH至 4.7 ± 0.2 后,于8 000 r/min离心5 min,备用。

8.2 净化

依次用3 mL甲醇和3 mL水活化固相萃取小柱(5.15),将样品备用液(8.1)全部过柱,分别用3 mL水(5.1)和3 mL甲醇(5.3)淋洗,抽干。用3 mL氯化甲醇溶液(5.9)洗脱,全部洗脱液于40℃氮气吹干,准确加入3 mL(V_2)复溶液(5.12),微孔滤膜(5.16)过滤,待测。

8.3 基质添加标准系列溶液的制备

取适量的标准中间溶液(5.14),加入到空白试样中(7),充分混匀,按8.1~8.2步骤处理,使得到的基质添加标准系列溶液中大观霉素浓度分别为0(g/mL)、0.1(g/mL)、0.2(g/mL)、0.5(g/mL)、1.0(g/mL)、2.0(g/mL)、5.0(g/mL)、10.0(g/mL)基质添加标准系列溶液。临用现配。

8.4 仪器参考条件

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:亲水相互作用(HILIC)色谱柱,柱长50 mm,内径2.1 mm,粒径1.7 μm。或性能相当者;
- 流动相:A相为甲酸铵-甲酸溶液(5.10),B相为甲酸铵-甲酸乙腈溶液(5.11),梯度洗脱,梯度洗脱程序见表1;
- 流速:0.5 mL/min;

- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:5 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A 相,%	B 相,%
0.0	0	100
1.0	0	100
1.5	50	50
3.0	50	50
3.1	0	100
5.0	0	100

8.4.2 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) 毛细管电压:0.5 kV;
- d) 脱溶剂气温度:550℃;
- e) 脱溶剂气流速:1 000 L/Hr;
- f) 雾化气、干燥气为高纯氮气,碰撞气为高纯氩气;
- g) 大观霉素的定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 大观霉素的定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值

化合物	母离子, m/z	子离子, m/z	锥孔电压,V	碰撞能量,eV
大观霉素	351.2	333.3 ^a	30	34
		207.2		22
^a 为定量离子。				

8.5 测定

8.5.1 基质添加标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质添加标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。基质添加标准溶液中大观霉素定量离子对色谱图见附录 A。

8.5.2 定性

在相同试验条件下,试样溶液中大观霉素的保留时间应与基质添加标准系列溶液(浓度相当者)中大观霉素的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样谱图中大观霉素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对应的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大观霉素。

表 3 定性确证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
允许的最大偏差/(%)	±20	±25	±30	±50

8.5.3 定量

在仪器最佳工作条件下,基质添加标准系列溶液与试样溶液依次进样,采用外标法定量。以基质添加标准溶液中大观霉素的峰面积为纵坐标,基质添加标准溶液中大观霉素的浓度为横坐标,绘制基质添加标准工作曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液与基质添加标准溶液中大观霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围内。当试样的上机浓度超出线性范围时,需根据测定浓度,用空白基质稀释后进行重新测

定。单点校准定量时,试样溶液中待测组分质量浓度与基质添加标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中大观霉素的含量以质量分数 w 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算。

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

式中:

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中大观霉素质量浓度的数值,单位为微克每毫升((g/mL);

V ——试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 ——复溶后试样溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数;

V_1 ——用于净化的试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

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

式中:

A ——试样溶液中大观霉素的色谱峰面积;

C_s ——基质添加标准系列溶液大观霉素质量浓度的数值,单位为微克每毫升((g/mL);

n ——超出线性范围后,试样溶液的稀释倍数;

A_s ——基质添加标准系列溶液大观霉素的色谱峰面积。

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。

10 精密度

在重复性条件下,获得的 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 20%。

附 录 A
(资料性)

大观霉素基质添加标准溶液定量离子色谱图

大观霉素基质添加标准溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)定量离子色谱图见图 A. 1。

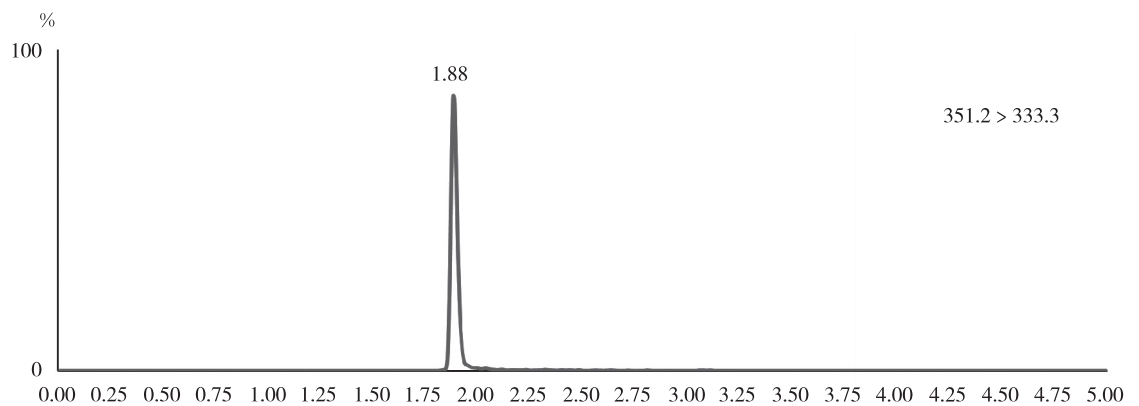


图 A. 1 大观霉素基质添加标准溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)定量离子色谱图