



中华人民共和国国家标准

GB/T 23873—2009

饲料中马杜霉素铵的测定

Determination of maduramicin ammonium in feeds

2009-05-26 发布

2009-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量监督检验测试中心(济南)。

本标准主要起草人:梁萌、汤文利、任爱丽、赵金毅、黄莹、李永山、刘学江。

饲料中马杜霉素铵的测定

1 范围

本标准规定了测定饲料中马杜霉素铵含量的高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱法(LC-MS)。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料。HPLC法为定量测定方法,定量限为1 mg/kg。LC-MS法为定性测定方法,最低检测含量为0.5 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 采样

3.1 采样步骤:按GB/T 14699.1的规定执行。

3.2 试样的制备:按GB/T 20195的规定执行。

4 HPLC法

4.1 原理

用乙腈提取饲料中的马杜霉素铵,蒸干提取液用乙腈溶解,用对-二甲氨基苯甲醛溶液进行柱后衍生,HPLC测定。

4.2 试剂和材料

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:色谱纯。

4.2.3 乙腈:色谱纯。

4.2.4 四氢呋喃:色谱纯。

4.2.5 磷酸二氢钾:优级纯。

4.2.6 磷酸:优级纯。

4.2.7 对-二甲氨基苯甲醛:纯度99%。

4.2.8 硫酸:优级纯。

4.2.9 磷酸-磷酸二氢钾缓冲溶液(pH3.0):准确称取2.04 g磷酸二氢钾(4.2.5),加900 mL水溶解,加磷酸(4.2.6)数滴调节pH至3.0,转移到1 000 mL容量瓶中,用水定容、摇匀。

4.2.10 流动相:磷酸-磷酸二氢钾缓冲溶液(4.2.9)+四氢呋喃(4.2.4)+甲醇(4.2.2)=100+40+860。

4.2.11 对-二甲氨基苯甲醛衍生化溶液:准确称取16 g对-二甲氨基苯甲醛(4.2.7)于1 000 mL棕色试剂瓶中,加入400 mL甲醇(4.2.2),在磁力搅拌器上搅拌至完全溶解后,逐滴加入8 mL硫酸(4.2.8),继续搅拌至溶液均匀,冷却至室温,24 h内使用。

4.2.12 马杜霉素铵贮备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):准确称取 107.0 mg(精确到 0.1 mg)马杜霉素铵化学对照品(纯度 $\geq 93.7\%$)于 100 mL 容量瓶中,用乙腈(4.2.3)溶解、定容,配制成浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的贮备溶液。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期为 1 个月。

4.2.13 马杜霉素铵中间溶液 I (100 $\mu\text{g/mL}$):准确移取马杜霉素铵贮备溶液(4.2.12)5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期为 1 周。

4.2.14 马杜霉素铵中间溶液 II (10.0 $\mu\text{g/mL}$):准确移取马杜霉素铵中间溶液 I (4.2.13)5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期为 1 周。

4.2.15 马杜霉素铵工作溶液:准确移取马杜霉素铵中间溶液 II (4.2.14)1.00 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,马杜霉素铵中间溶液 I 1.00 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,马杜霉素铵贮备溶液 1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释、定容,配制成浓度分别为 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 的工作溶液。现用现配。

4.3 仪器

4.3.1 实验室用样品粉碎机。

4.3.2 分析天平:感量 0.1 mg。

4.3.3 碘量瓶:150 mL。

4.3.4 超声波清洗器。

4.3.5 往复式振荡器。

4.3.6 带盖塑料离心管:100 mL。

4.3.7 离心机。

4.3.8 旋转蒸发器:配置 150 mL 鸡心瓶。

4.3.9 旋涡混合器。

4.3.10 高效液相色谱仪:具紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.11 柱后衍生系统。

4.4 分析步骤

4.4.1 提取

称取约 5 g 试样(精确到 0.1 mg)于碘量瓶(4.3.3)中,加入乙腈 50 mL,置于超声波清洗器(4.3.4)中超声 15 min,然后置于往复式振荡器(4.3.5)中快速振荡提取 20 min。转移到离心管(4.3.6)中,用适量乙腈清洗碘量瓶三次,清洗液合并到离心管中。置离心机(4.3.7)4 360g 离心 3 min;上清液转移到鸡心瓶(4.3.8)中,在旋转蒸发器上 60 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩定容至 5.00 mL,旋涡(4.3.9)混匀,分取适量提取液过有机滤膜上机测定。根据试料溶液中马杜霉素铵的浓度用乙腈进行稀释,使其上机浓度不高于 300 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.4.2 测定

4.4.2.1 液相色谱测定参数的设定

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 2.1 mm,粒度 5 μm 或类似的分析柱。

柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

检测波长:585 nm。

进样量:25 μL 。

流动相:磷酸-磷酸二氢钾缓冲溶液(pH3.0)+四氢呋喃+甲醇=100+40+860(4.2.10)。

流速:0.4 mL/min。

4.4.2.2 柱后衍生系统测定参数的设定

衍生化溶液:对-二甲氨基苯甲醛衍生化溶液(4.2.11)。

衍生化溶液流速:0.5 mL/min。

反应器容积:1.00 mL。

反应器温度:90℃。

4.4.2.3 定量测定

在上述仪器条件下,分别注入马杜霉素铵工作溶液(4.2.15)和试料溶液(4.4.1)进行测定。用工作溶液做单点校准或多点校准,以色谱峰的峰面积进行定量计算。

4.5 结果计算

饲料中马杜霉素铵的含量 X 以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times V}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A ——试料溶液中马杜霉素铵峰面积的响应值对应的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试料溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试料的质量,单位为克(g)。

每个试样取两份试料进行平行测定,以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果,保留三位有效数字。

4.6 重复性

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于10%。

5 LC-MS 法

5.1 原理

用乙腈提取饲料中的马杜霉素铵,提取液蒸干后用乙腈溶解,用 LC-MS 测定。

5.2 试剂和材料

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 乙腈:色谱纯。

5.2.3 流动相:乙腈(5.2.2)+水(5.2.1)=90+10。超声脱气 5 min。

5.2.4 其他同 4.2.12~4.2.15。

5.3 仪器

5.3.1 液相色谱-质谱仪。

5.3.2 其他同 4.3.1~4.3.9。

5.4 分析步骤

5.4.1 提取

同 4.4.1,但需要根据试料溶液中马杜霉素铵的含量用乙腈进行稀释,使上机溶液浓度不高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.4.2 测定

5.4.2.1 液相色谱测定参数的设定

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 2.1 mm,粒度 5 μm 或类似的分析柱。

进样量:5 μL 。

流速:0.2 mL/min。

柱温:30℃。

流动相:乙腈+水=90+10(5.2.3)。

5.4.2.2 质谱测定参数的设定

离子化模式:电喷雾离子源,负离子模式(ESI-)。雾化气压力: 2.76×10^5 Pa(40.0 psi)。干燥气流速:9.0 L/min。干燥气温度:350℃。毛细管出口电压:-3 500 V。碰撞气:氦气。离子电荷控制

(ICC):on。扫描范围:100 m/z ~1 200 m/z 。化合物稳定性:30%。质谱振幅:1.00 V。开始振幅:30%。结束振幅:100%。定性离子:母离子(m/z):915,子离子(m/z):613,871。

5.4.2.3 定性测定

在相同试验条件下,利用质谱定性离子定性。样品与标准溶液中马杜霉素铵的保留时间偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内;样品与浓度相近的标准溶液中马杜霉素铵的质谱定性离子进行比较,子离子匹配度在700~1 000之间(或者子离子相对丰度的偏差在表1规定的范围内)则判定样品中存在马杜霉素铵。

表1 定性确证时子离子相对丰度的允许偏差

子离子相对丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

附录 A
(资料性附录)
马杜霉素铵谱图

A.1 马杜霉素铵色谱图(HPLC 法)见图 A.1

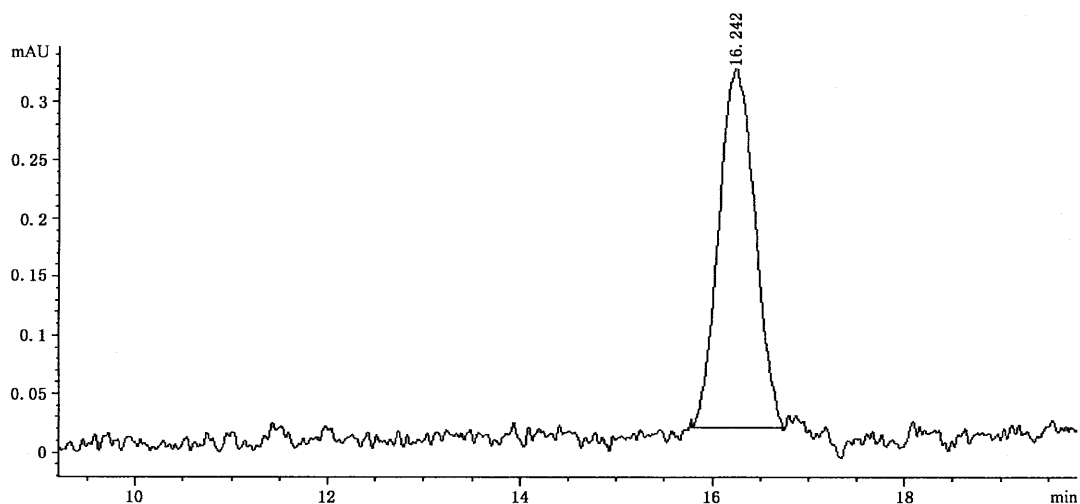


图 A.1 马杜霉素铵色谱图(1.00 $\mu\text{g/mL}$, HPLC 法)

A.2 马杜霉素铵质谱图见图 A.2

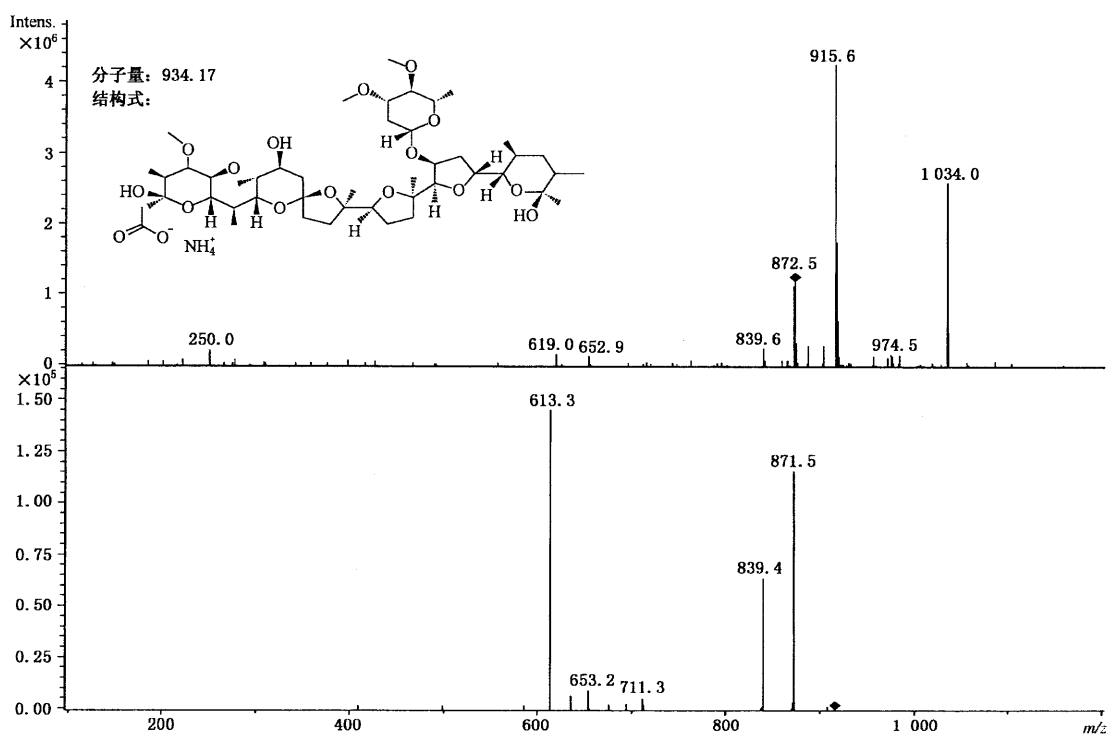


图 A.2 马杜霉素铵(Maduramicin Ammonium)质谱图