ICS 65.120
B 46

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第197号—3—2019

饲料中硫酸新霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of neomycin sulfate in feeds—Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019-08-01 发布　　2020-01-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:四川省饲料工作总站[农业农村部饲料质量监督检验测试中心(成都)]。

本标准主要起草人:张静、岳琴、赵立军、魏敏、王宇萍、林顺全、程传民。

饲料中硫酸新霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中硫酸新霉素含量测定的液相色谱-串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、精料补充料中硫酸新霉素的测定。

本标准的检出限为 0.2 mg/kg，定量限为 0.4 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 14669.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中硫酸新霉素用磷酸盐缓冲液提取后，经 C_{18} 固相萃取柱净化，供液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯。

4.1 水：符合 GB/T 6682 中的一级水的规定。

4.2 硫酸新霉素对照品：纯度大于 90.0%。

4.3 甲醇：色谱纯。

4.4 乙腈：色谱纯。

4.5 盐酸溶液：取盐酸 9 mL，加水至 100 mL，混匀。

4.6 磷酸盐缓冲液（含 0.15 g/L 乙二胺四乙酸二钠和 20 g/L 三氯乙酸溶液）：准确称取磷酸二氢钾 1.36 g，用 980 mL 水溶解，用盐酸溶液（4.5）调 pH 至 4.0，分别加入乙二胺四乙酸二钠 0.15 g 和三氯乙酸 20 g，溶解混匀并定容至 1 000 mL。

4.7 七氟丁酸溶液（13 mL/L）：准确量取 13 mL 七氟丁酸，用水稀释至 1 000 mL，2℃～8℃避光保存，有效期为 6 个月。

4.8 七氟丁酸溶液（2.6 mL/L）：准确量取七氟丁酸溶液（13 mL/L）（4.7）50 mL，用水稀释至 250 mL，2℃～8℃避光保存，有效期为 6 个月。

4.9 洗脱液：准确量取甲醇（4.3）70 mL、氨水 10 mL、七氟丁酸溶液（2.6 mL/L）（4.8）20 mL，混匀。

4.10 标准储备溶液：准确称取硫酸新霉素对照品（4.2）50 mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液，2℃～8℃保存，有效期为 3 个月。

4.11 标准中间溶液：准确吸取标准储备溶液（4.10）1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水稀释并定容，配制成浓度为 10 μg/mL 的标准中间溶液，2℃～8℃保存，有效期为 1 个月。

4.12 标准工作溶液：准确吸取标准中间溶液（4.11）适量，用空白样品基质配制成不同浓度系列的标准工作溶液。临用现配。

4.13 固相萃取柱：C_{18} 固相萃取柱（500 mg/3 mL），或性能相当者。

4.14 0.22 μm 有机滤膜。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源)。

5.2 分析天平:感量 0.01 mg。

5.3 天平:感量 0.001 g。

5.4 离心机:转速为 8 000 r/min 以上。

5.5 超纯水器。

5.6 涡旋混合器。

5.7 振荡器。

5.8 固相萃取装置。

5.9 氮吹仪。

6 样品

按照 GB/T 14669.1 的规定,抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 的规定制备,粉碎后过 0.42 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验,准确称取试样 2 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 20 mL 磷酸盐缓冲液(4.6),振荡提取 20 min,以 8 000 r/min 离心 5 min,准确吸取上清液 5 mL,加入七氟丁酸溶液(13 mL/L)(4.7)1 mL,混匀,作为备用液。

7.2 净化

固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水、3 mL 七氟丁酸溶液(2.6 mL/L)(4.8)活化,备用液(7.1)全部过柱,用 3 mL 水淋洗,抽干,用 4 mL 洗脱液(4.9)洗脱,收集洗脱液于刻度试管中。40℃ 氮吹至 1 mL 左右,用七氟丁酸溶液(2.6 mL/L)(4.8)定容至 2 mL,涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜后,上机测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

准确称取空白饲料样品,按 7.1、7.2 步骤分别制备多个饲料空白基质样品溶液。精密量取适量标准中间溶液(4.11),用上述空白基质样品溶液稀释定容,配制成浓度分别为 0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.00 μg/mL、2.00 μg/mL、5.00 μg/mL 系列标准工作溶液,供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:C_{18}柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 2.4 μm,或性能相当者。

流动相 A:乙腈;流动相 B:七氟丁酸溶液(2.6 mL/L)(4.8),梯度洗脱条件见表 1。

柱温:30℃。

流速:0.3 mL/min。

进样量:5 μL。

表 1 流动相梯度洗脱参考条件

时间,min	流动相 A,%	流动相 B,%
0.00	10	90
6.00	80	20
6.01	10	90
10.00	10	90

7.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源。

扫描方式：正离子扫描。

检测方式：多反应监测。

毛细管电压：3.5 kV。

碰撞能量、定性离子对、定量离子对等参数见表 2。

表 2 硫酸新霉素的定性、定量离子对及碰撞能量参考值

名称	定性离子对，m/z	定量离子对，m/z	碰撞能量，eV
硫酸新霉素	615.0/160.9	615.0/160.9	33
	615.0/293.0		25

7.4.3 定性测定

在相同试验条件下，试样中待测物的保留时间与标准工作液的保留时间偏差在±2.5%以内，且试样谱图中各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准工作溶液中对应的定性离子相对离子丰度进行比较，若偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分率

相对离子丰度	>50	20～50(含)	10～20(含)	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.4 定量测定

取试样制备液(7.2)和相应浓度的标准工作溶液(7.3)，作单点或多点校准，以色谱峰面积定量。当待测物浓度不在线性范围内时，应将提取液继续稀释后测定。硫酸新霉素标准溶液(0.50 μg/mL)特征离子色谱图参见附录 A。

8 试验数据处理

试样中硫酸新霉素的含量以质量分数 ω 表示，按式(1)计算。

$$\omega = \frac{A_i \times C_s \times V \times n}{A_s \times m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

ω ——试样中硫酸新霉素的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

A_i ——试样溶液峰面积值；

C_s ——标准工作液浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V ——定容体积，单位为毫升(mL)；

n ——稀释倍数；

A_s ——标准工作液峰面积值；

m ——称取试样的质量，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。

9 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其平均值的 20%。

附 录 A
(资料性附录)
硫酸新霉素标准溶液(0.50μg/mL)特征离子色谱图

硫酸新霉素标准溶液(0.50 μg/mL)特征离子色谱图见图 A.1。

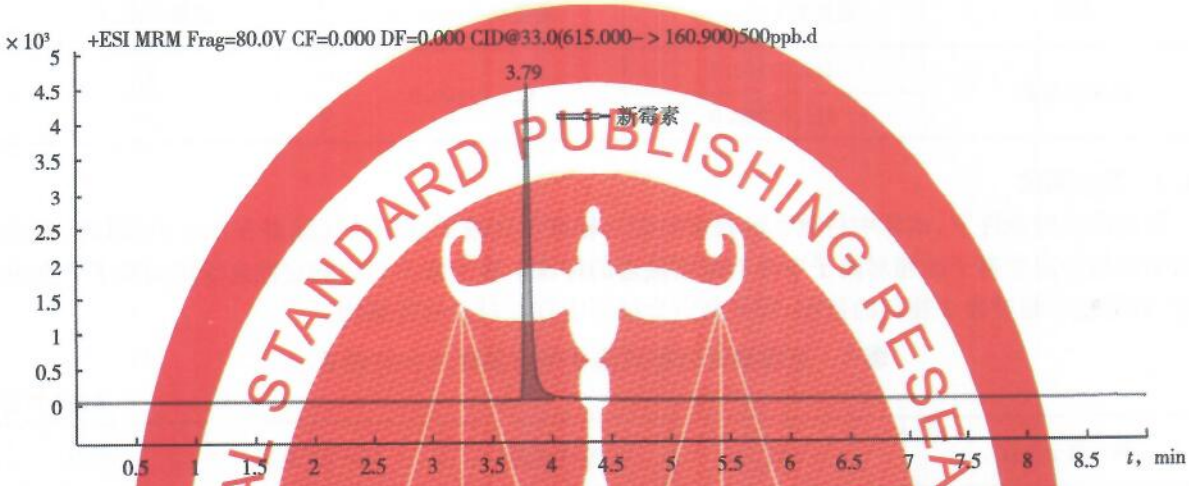

图 A.1 硫酸新霉素标准溶液(0.50 μg/mL)特征离子色谱图

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

农业农村部公告第197号—3—2019

中华人民共和国
国家标准
饲料中硫酸新霉素的测定
液相色谱-串联质谱法
农业农村部公告第197号—3—2019
*　*　*
中国农业出版社出版
（北京市朝阳区麦子店街18号楼）
（邮政编码：100125　网址：www.ccap.com.cn）
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
*　*　*
开本 880mm×1230mm 1/16　印张 0.75　字数 15千字
2019年12月第1版　2019年12月北京第1次印刷
书号：16109·4958
定价：18.00元

版权专有　侵权必究
举报电话：（010）59194261

农业农村部公告第197号—3—2019