

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 197 号—4—2019

饲料中海南霉素的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of hainanmycin 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:中国农业大学动物医学院。

本标准主要起草人:沈建忠、程林丽、温凯、吴聪明、汤树生、武英豪、陈可心。

饲料中海南霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中海南霉素含量测定的液相色谱-串联质谱方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中海南霉素含量的测定。

本方法海南霉素的检出限为 0.02 mg/kg,定量限为 0.05 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的海南霉素用有机溶剂提取,蒸干转溶后经多次液液分配净化,用液相色谱-串联质谱法测定,基质匹配标准曲线校准,外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 甲酸:色谱纯。

4.5 正己烷。

4.6 醋酸铵(色谱纯)。

4.7 乙酸乙酯:色谱纯。

4.8 20%甲醇溶液:取甲醇 200 mL,加水定容至 1 000 mL,混匀。

4.9 90%甲醇溶液:取甲醇 900 mL,加水定容至 1 000 mL,混匀,加入正己烷,混和,形成正己烷饱和的甲醇溶液。

4.10 1 mmol/L 醋酸铵溶液:取 0.038 5g 醋酸铵(4.6),加水定容至 500 mL,混匀。

4.11 20%乙腈溶液:取乙腈 200 mL,加水定容至 1 000 mL,混匀。

4.12 海南霉素标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):准确称取 10.0 mg 的海南霉素(纯度 $\geq 97\%$)于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(4.3)溶解定容,配成 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 -20°C 下保存,有效期为 12 个月。

4.13 海南霉素标准中间溶液 I (100 $\mu\text{g/mL}$):准确量取适量海南霉素标准储备溶液(4.12)于容量瓶中,用乙腈(4.3)稀释定容。 -20°C 下保存,有效期为 6 个月。

4.14 海南霉素标准工作溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$):准确量取适量标准中间溶液 I (4.13)于容量瓶中,用乙腈(4.3)稀释定容。 -20°C 下保存,有效期为 6 个月。

4.15 0.22 μm 有机滤膜。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS):配有电喷雾电离源。

5.2 分析天平:感量 0.001 g 和感量 0.01 mg。

5.3 振荡仪。

5.4 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

5.5 涡旋混匀器。

5.6 氮吹仪。

6 样品

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.42 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 乙酸乙酯振荡提取 30 min,8 000 r/min 下离心 10 min,转移上清液至另一离心管中。残渣中准确加 10 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次,合并 2 次上清液,准确取 1 mL 直接于 40℃ 旋转蒸发至近干,准确各加 20% 甲醇溶液(4.8) 2.0 mL 复溶,为提取复溶液。

7.2 净化

于提取复溶液(7.1)中加 3 mL 正己烷,涡旋 2 min,8 000 r/min 离心 5 min。收集上层正己烷,下层溶液中再加 2 mL 正己烷重复萃取 1 次,弃去下层溶液,合并正己烷层。加 20% 甲醇溶液(4.8) 5 mL,涡旋 1 min,8 000 r/min 离心 2 min,除去下层水相。接着加 10 mL 经正己烷饱和过的 90% 甲醇溶液(4.9),涡旋 2 min,8 000 r/min 离心 5 min。弃去正己烷层,下层溶液于 40℃ 氮气吹干,准确加入 20% 乙腈溶液(4.11) 1 mL 涡旋溶解,过 0.22 μm 滤膜后,供 LC-MS/MS 分析。

7.3 基质匹配标准系列溶液的制备

准确移取海南霉素标准工作溶液(4.14)适量,40℃ 氮气吹干后,用空白样品经 7.1、7.2 处理得到的空白试样溶液稀释,分别制得浓度为 50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、5 000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈ 柱;柱长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm,或性能相当者。

柱温: 40℃。

流速: 0.3 mL/min。

进样体积: 2 μL。

流动相 A: 1 mmol/L 醋酸铵溶液(4.10);流动相 B: 甲醇,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	80	20
2	5	95
3	5	95
4	80	20
5	80	20

7.4.2 质谱参考条件

电离源: 电喷雾离子源(ESI)。

扫描: 正离子扫描方式。

检测:多反应监测模式(MRM)。
电喷雾毛细管电压:2.8 kV。
离子源温度:120℃。
去溶剂温度:300℃。
脱溶剂气体流量:600 L/h。
碰撞气流量:27 L/h。
其他质谱条件见表 2。

表 2 海南霉素测定的质谱条件

被测物名称	母离子, m/z	子离子, m/z	锥孔电压,V	碰撞能量,eV
海南霉素	907.5	845.3 ^a	28	35
		863.4	28	35
^a 为定量离子。				

7.4.3 定性测定

海南霉素选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。海南霉素标准溶液(500 ng/mL)定量离子色谱图参见附录 A。

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

在仪器最佳工作条件下,对基质匹配标准系列溶液和试样溶液分别进样,以峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标绘制工作曲线,该标准曲线的相关系数应不小于 0.99。可用单点或多点校准对试样中的待测物定量。试样溶液中待测物的响应值应在基质匹配标准曲线的线性范围内,若超过线性范围,需用 20%乙腈稀释后对试样溶液和基质匹配标准溶液做相应稀释后,重新测定。单点校准时,试样溶液中待测物响应与对应标准溶液中待测物的差异应在±30%之内。

8 试验数据处理

试样中海南霉素的含量以其质量分数 ω 表示,单点校准按式(1)计算,多点校正按式(2)计算。

$$\omega = \frac{A \times C_s \times V \times V_1}{A_s \times m \times V_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω ——海南霉素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- A ——试样中海南霉素的峰面积;
- C_s ——基质匹配标准溶液的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——试样溶液最终复溶体积,单位为毫升(mL);
- V_1 ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- A_s ——基质匹配标准溶液的峰面积;
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- V_2 ——净化时所分取试样溶液的体积,单位为毫升(mL);

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。

$$\omega = \frac{(A - b) \times V \times V_1}{a \times m \times V_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中:

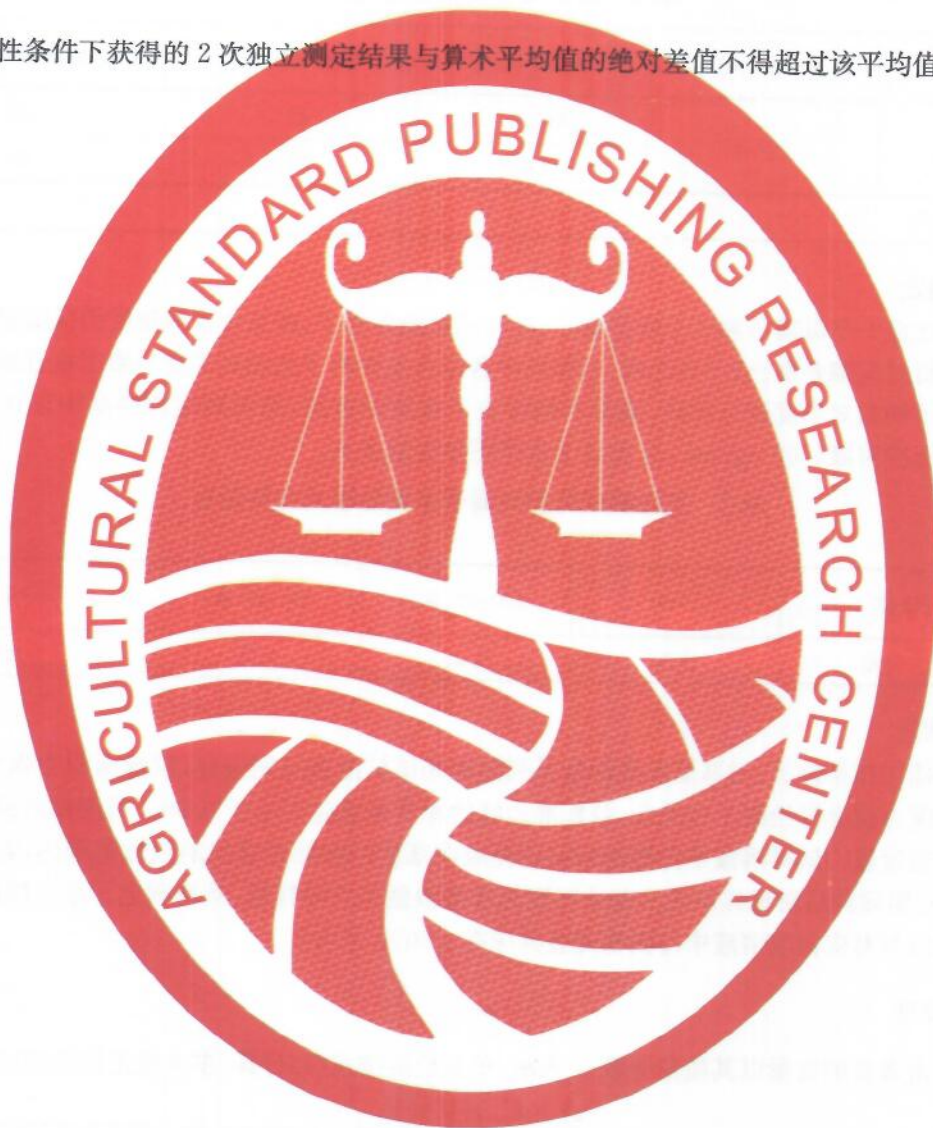
b ——通过标准溶液系列进行线性回归计算得出的直线与 Y 轴相交截距;

a ——标准工作曲线的斜率;

平行测定结果用算术平均值表示,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 次独立测定结果与算术平均值的绝对差值不得超过该平均值的 20%。



附录 A
(资料性附录)

海南霉素标准溶液(500 ng/mL)定量离子色谱图

海南霉素标准溶液(500 ng/mL)定量离子色谱图见图 A. 1。

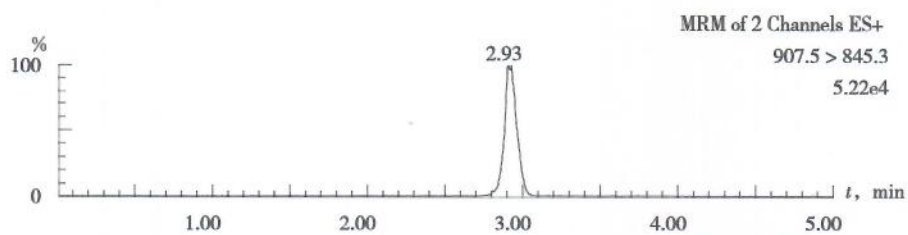


图 A. 1 海南霉素标准溶液(500 ng/mL)定量离子色谱图

中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

饲料中海南霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

农业农村部公告第197号—4—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

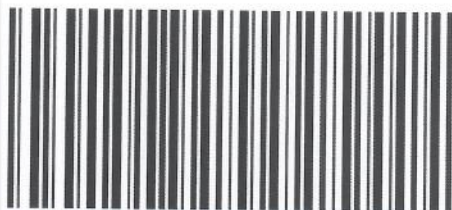
2019年12月第1版 2019年12月北京第1次印刷

书号:16109·4959

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—4—2019