

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4360—2023

饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin and kanamycin in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2023-04-11 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。

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：江苏省农业科学院。

本文件主要起草人：魏瑞成、栾枫婷、王冉、龚兰、何涛、朱磊、唐敏敏。



饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的测定。

本文件的检出限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.1 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

试样中的链霉素、双氢链霉素和卡那霉素用混合提取溶液提取,经亲水-亲脂平衡型固相萃取柱净化,用液相色谱-串联质谱仪检测,基质匹配标准溶液校准,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。与链霉素、双氢链霉素和卡那霉素溶液接触的容器应使用聚丙烯材质。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 甲醇:色谱纯。

5.3 乙腈:色谱纯。

5.4 甲酸:色谱纯。

5.5 乙酸铵:色谱纯。

5.6 异丙醇:色谱纯。

5.7 磷酸二氢钾溶液(0.2 mol/L):称取 2.72 g 磷酸二氢钾,加水溶解并稀释至 100 mL,混匀。

5.8 乙二胺四乙酸二钠溶液(0.2 mol/L):称取 6.72 g 乙二胺四乙酸二钠,加水溶解并稀释至 100 mL,混匀。

5.9 20%三氯乙酸溶液:称取 200 g 三氯乙酸,加水溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。

5.10 混合提取溶液:量取 50 mL 磷酸二氢钾溶液(5.7)、10 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(5.8)和 500 mL 三氯乙酸溶液(5.9),加水至 900 mL,混匀,用氨水调节 pH 至 7.50 ± 0.20 ,用水稀释、定容至 1 000 mL,混匀。

5.11 10%甲醇溶液:取 10 mL 甲醇(5.2),加水稀释至 100 mL,混匀。

5.12 乙酸铵溶液(0.1 mol/L):称取 0.77 g 乙酸铵(5.5),加水溶解并稀释至 100 mL,混匀。

- 5.13 乙酸铵溶液(0.002 mol/L):移取 2 mL 乙酸铵溶液(5.12),加水稀释至 100 mL,混匀。
- 5.14 洗脱溶液:取 10 mL 甲酸(5.4)、5 mL 异丙醇(5.6)和 85 mL 乙酸铵溶液(5.13)混合,用甲酸调节 pH 至 0.80 ± 0.10 ,混匀。
- 5.15 乙酸铵-甲酸溶液:移取 10 mL 乙酸铵溶液(5.12)、5 mL 甲酸(5.4),用水稀释并定容至 500 mL,混匀。
- 5.16 乙酸铵-甲酸乙腈溶液:移取 10 mL 乙酸铵溶液(5.12)、5 mL 甲酸(5.4),用乙腈(5.3)稀释并定容至 500 mL,混匀。
- 5.17 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取硫酸链霉素(CAS 号:3810-74-0,纯度不低于 99%)、硫酸双氢链霉素(CAS 号:5490-27-7,纯度不低于 97%)和单硫酸卡那霉素(CAS 号:25389-94-0,卡那霉素 A 纯度不低于 96%)标准品或对照品各 10 mg(以有效成分计,精确至 0.01 mg),分别于 10 mL 聚丙烯容量瓶中,用水溶解,定容,混匀。储存于聚丙烯瓶中,2℃~8℃保存,有效期 1 个月。
- 5.18 混合标准中间溶液(10 µg/mL):准确移取硫酸链霉素、硫酸双氢链霉素和单硫酸卡那霉素标准储备溶液(5.17)1 mL 于 100 mL 聚丙烯容量瓶中,用洗脱溶液(5.14)稀释至刻度,混匀。储存于聚丙烯瓶中,2℃~8℃保存,有效期 1 周。
- 5.19 混合标准系列工作溶液:准确移取适量体积的混合标准中间溶液(5.18)于 10 mL 聚丙烯容量瓶中,用洗脱溶液(5.14)稀释配制成浓度分别为 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 500 ng/mL、5 000 ng/mL 混合标准系列工作溶液。临用现配。
- 5.20 固相萃取小柱:亲水-亲脂(HLB)平衡型固相萃取柱,500 mg/6 mL。
- 5.21 尼龙微孔滤膜:0.22 µm。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平:精度 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 离心机:转速不低于 10 000 r/min。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 氮吹仪。
- 6.8 酸度计:精度 0.01。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备样品,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,备用。选取与待测样品类型相同,均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为基质空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做 2 份试验。称取 2 g(精确至 0.1 mg)试样于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 30 mL 混合提取溶液(5.10),涡旋混合 1 min,超声提取 15 min,其间充分摇动 2 次,于 10 000 r/min 离心 10 min,准确移取 15 mL 上清液,用 20%三氯乙酸溶液(5.9)调节 pH 至 6.50 ± 0.10 ,备用。

8.2 净化

依次用 5 mL 甲醇(5.2)和 5 mL 水活化固相萃取小柱(5.20),将备用液(8.1)全部过柱,用 5 mL 水、5 mL 10%甲醇溶液(5.11)分别淋洗,真空负压抽干,准确移取 5 mL 洗脱溶液(5.14)进行洗脱,收集洗脱

液,再次真空负压抽干,涡旋混合 1 min,过微孔滤膜(5.21),待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取基质空白试样,按 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液。准确移取混合标准系列工作溶液(5.19)各 100 μ L 分别置于 1.5 mL 聚丙烯进样瓶,用氮气吹干,准确加入 1 mL 空白基质溶液,涡旋混合 30 s,配制成浓度为 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液,待测。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:酰胺柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒度 1.7 μ m;或者性能相当者。

柱温:35 $^{\circ}$ C。

流速:0.3 mL/min。

进样量:4 μ L。

流动相:A 相为乙酸铵-甲酸溶液(5.15);B 相为乙酸铵-甲酸乙腈溶液(5.16)。

梯度洗脱:洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

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

8.4.2 质谱参考条件

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)。

喷雾电压:5.5 kV。

雾化温度:550 $^{\circ}$ C。

多反应监测(MRM)离子对、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多反应监测离子对、去簇电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对, m/z	去簇电压,V	碰撞能量,eV
链霉素	582.4>221.4	270	49
	582.4>263.2 ^a	270	44
双氢链霉素	584.4>246.2	244	57
	584.4>263.1 ^a	244	40
卡那霉素 A	485.2>324.3	50	24
	485.2>163.2 ^a	50	33
^a 为定量离子。			

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录 A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹

配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对应的待测物。

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

8.4.5 定量

以浓度为横坐标、色谱峰面积(响应值)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。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围,应将试样和基质空白样品净化(8.2)得到的溶液用洗脱溶液作同比例稀释后,从“8.3”开始按步骤重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素 A 的含量以质量分数 w_i 计,单位为毫克每千克(mg/kg)。标准曲线校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V \times n}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ρ_i ——由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——混合提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 ——最终洗脱体积的数值,单位为毫升(mL);
- n ——试样净化液稀释后的倍数;
- V_2 ——固相萃取净化时备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V_1 \times V \times n}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;
- ρ_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——混合提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 ——最终洗脱体积的数值,单位为毫升(mL);
- n ——试样净化液稀释后的倍数;
- V_2 ——固相萃取净化时备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- A_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物的色谱峰面积;
- m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

测定结果以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,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)

链霉素、双氢链霉素和卡那霉素 A 基质匹配标准溶液定量离子色谱图

基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图 A. 1。

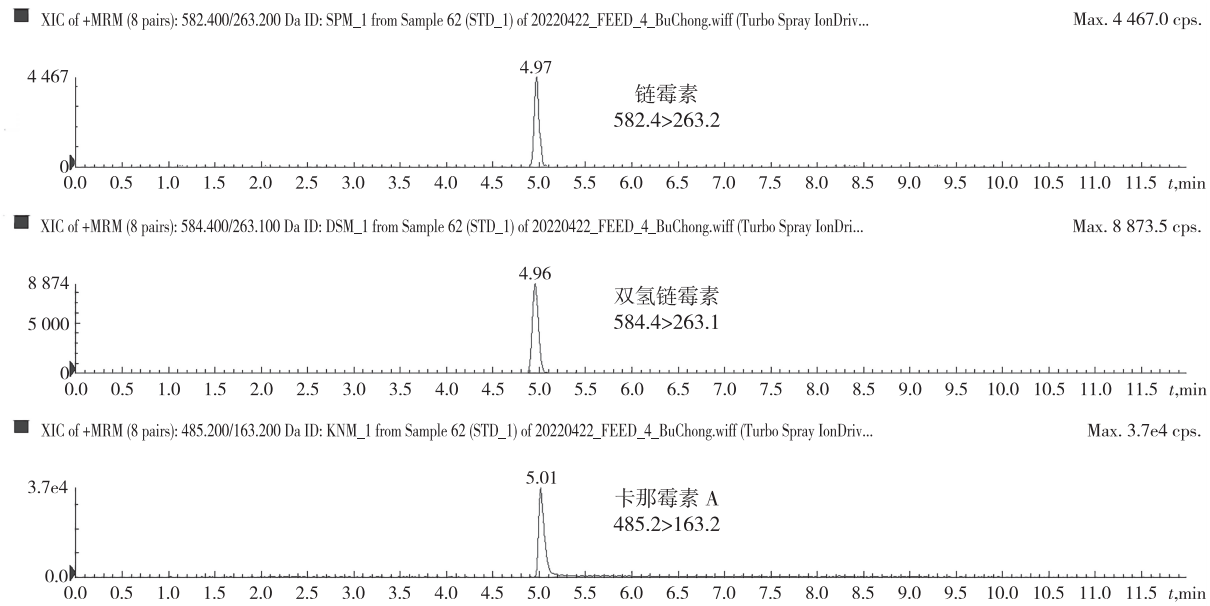


图 A. 1 链霉素、双氢链霉素和卡那霉素 A 基质匹配标准溶液(20 ng/mL)定量离子色谱图