

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX-20XX

饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联 质谱法

Determination of flavomycinin feeds — Liquid chromatography-tandem
mass spectrometry

(公开征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

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：上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所。

本文件主要起草人：虞成华、严凤、卞华、吴剑平、葛宇、黄士新、陆志芸、张婧、郑国建、王博。

饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中黄霉素A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黄霉素A的测定。

本文件方法的检出限为0.1mg/kg，定量限为0.25 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

试样中的黄霉素A用0.1%甲酸甲醇溶液提取，经固相萃取净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准曲线校准，外标法定量。

5 试剂或材料

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 乙酸铵溶液（20 mmol/L）：称取 1.543g 乙酸铵（5.5）于 900 mL 水中，用甲酸（5.4）调节至 pH 5.0，用水定容至 1000 mL，混匀。

5.7 0.1%甲酸甲醇溶液（体积分数）：取 1 mL 甲酸（5.4），加甲醇（5.2）至 1000 mL，混匀。

5.8 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取黄霉素 A 标准品（CAS：76095-39-1，纯度≥97.2%）10 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容。-18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.9 标准中间溶液（10 μg/mL）：准确移取 1 mL 标准储备溶液（5.8）于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释、定容，摇匀。-18℃以下保存，有效期 1 个月。

5.10 亲水亲脂平衡性固相小柱：3mL/60mg，或其他性能相当者。

5.11 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：配有电喷雾电离源（ESI）。

6.2 分析天平：精度为 0.01 g 和 0.01 mg。

6.3 涡旋振荡器。

6.4 超声波清洗机。

6.5 pH 计：精度为 0.01。

6.6 离心机：转速不低于 10000 r/min。

6.7 氮吹仪。

7 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。选取类型相同，均匀一致且在黄霉素A保留时间处，仪器响应值小于方法定量限30%的饲料样品，作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取与净化

平行做两份试验。分别称取试样 5 g(精确至 0.01g)，置于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 0.1%甲酸甲醇溶液（5.7），涡旋振荡 5 min，超声 5 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液置于 50 mL 容量瓶中，重复提取一次，合并 2 次上清液，用 0.1%甲酸甲醇溶液（5.7）定容至刻度，摇匀。准确移取 2 ml 提取液过固相萃取小柱（5.10），保持流速为 1~2 滴/秒，收集滤液，过微孔滤膜（5.11），待测。

8.2 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品，按 8.1 处理得到空白基质溶液，取标准中间溶液（5.9）适量，用空白基质溶液稀释，配制成质量浓度分别为 10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：Atlantis T₃柱¹⁾，100 mm×2.1 mm，粒径3.0 μm，或性能类似的色谱柱；
- b) 流速：0.4 mL/min；
- c) 柱温：35 °C；
- d) 进样量：10 μL；
- e) 流动相：A相为乙酸铵溶液（5.6），B相为乙腈（5.3），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.00	90	10
1.00	90	10
1.10	5	95
4.00	5	95
4.10	90	10
7.00	90	10

8.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 电离电压：3.0 kV；
- d) 源温度：150 °C；
- e) 脱溶剂气流速：1000 L/h；
- f) 反吹气流速：150 L/h；
- h) 雾化器温度：550 °C。

¹⁾ Atlantis T₃ 是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。

黄霉素A的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值见表2。

表2 黄霉素A的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
黄霉素 A	789.9>553.9	25	30
	789.9>575.9 ^a	25	25
^a 为定量离子。			

8.3.3 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（8.2）和试样溶液（8.1）上机测定。黄霉素A基质匹配标准溶液定量离子对色谱图见附录A。

8.3.4 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（质量浓度相当）中黄霉素A的保留时间一致，其相对偏差应在±2.5%之内。根据表3选择的监测离子对，比较试样谱图中黄霉素A监测离子对的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液中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黄霉素A。

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

8.3.5 定量

以基质匹配标准系列溶液中黄霉素A的质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液（8.1）中黄霉素A的响应值应在标准曲线线性范围内。如超出范围，按第8章重新试验。单点校准定量时，试样溶液中黄霉素A的质量浓度与基质匹配标准溶液的质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中黄霉素A的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，多点校准按公式（1）

计算：单点校准按公式（2）计算：

$$W = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样液中黄霉素 A 的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V —— 试样定容的体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

$$W = \frac{A \times \rho_s \times V}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中黄霉素的色谱峰面积；

ρ_s ——基质匹配标准溶液中黄霉素的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——基质匹配标准溶液中黄霉素的峰面积；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

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

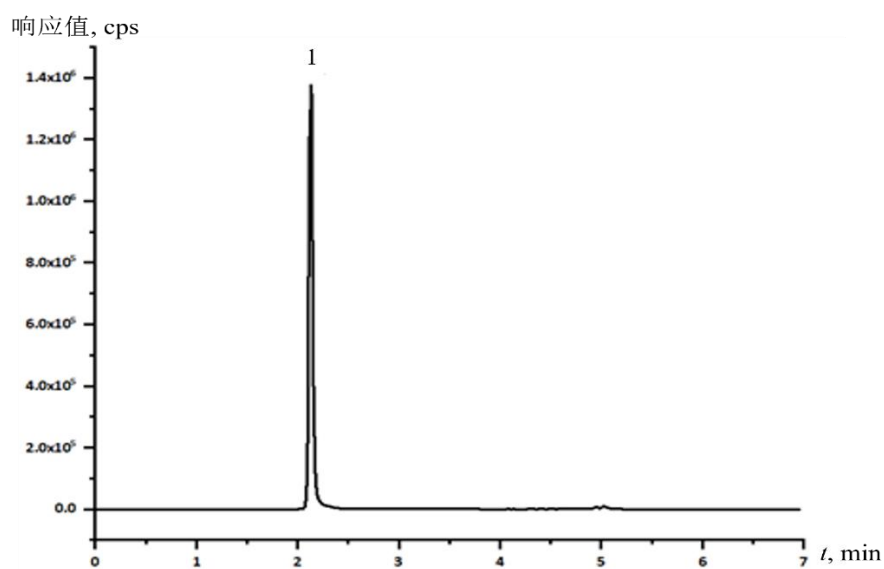
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附 录 A

(资料性)

黄霉素A基质匹配标准溶液的定量离子对色谱图

黄霉素 A 基质匹配标准溶液 (100 ng/mL) 定量离子对色谱图见图 A. 1。



标引序号说明:

1—黄霉素 A (789.9>575.9)。

图 A. 1 黄霉素A基质匹配标准溶液 (100 ng/mL) 定量离子对色谱图