

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××-202×
代替农业部 2086 号公告-6-2014

饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联 质谱法

Determination of colistin sulfate in feeds

— Liquid chromatography- tandem mass spectrometry

（公开征求意见稿）

202×-××-××发布

202×-××-××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。

本文件代替农业部2086号公告-6-2014《饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联质谱法》。与农业部2086号公告-6-2014相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了标准的适用范围（见1，2014年版1）；
- 更改了提取溶剂（见8.1，2014年版7.1）；
- 增加了正己烷脱脂（见8.1）；
- 更改了液相色谱流动相与梯度洗脱程序（见8.3.1，2014版的7.3.1）；
- 更改了标准曲线范围（见8.3，2014版的7.2）；
- 更改了试验数据处理（见9，2014版8）。

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。

本标准由中华人民共和国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、辽宁省检验检测认证中心、农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心（大连）。

本标准主要起草人：

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

- 2014年首次发布的为农业部2086号公告-6-2014；
- 本次为第一次修订。

饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中硫酸黏菌素的液相色谱-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、添加剂预混合饲料中硫酸黏菌素的测定。

本文件检出限为0.01 mg/kg，定量限为0.03 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

试样中的硫酸黏菌素用5%草酸提取，经正己烷脱脂、HLB固相萃取柱净化后，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。

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 5%草酸溶液：称取 5.0 g 草酸，用水溶解，定容至 100 mL。

5.6 0.1%甲酸溶液：移取 1mL 甲酸，加水至 1000mL，混匀。

5.7 0.2%甲酸溶液：准确移取 2mL 甲酸至 1000mL 容量瓶中，加水定容，混匀。

5.8 0.2%甲酸甲醇溶液：准确移取 2mL 甲酸至 1000mL 容量瓶中，加水定容，混匀。

5.9 乙腈甲酸溶液：0.2%甲酸溶液（5.7）+乙腈（5.3）=800+200。

5.10 标准储备溶液（1 mg/mL）：分别称取 10 mg（精确到 0.01 mg）的黏菌素 A（CAS 号：7722-44-3，纯度不低于 98%，折换算成硫酸黏菌素 A 的质量），和硫酸黏菌素 B（CAS 号：1338055-88-1，纯度不低于 98%），用 0.1%甲酸溶液（5.6）溶解定容至 10 mL，混匀。—18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.11 标准中间溶液 I（100 μg/mL）：准确移取 1 mL 标准储备液（5.10），用 0.1%甲酸水溶液（5.6）稀释定容至 10 mL，混匀。—18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.12 标准中间溶液 II (10 µg/mL): 准确移取 1 mL 标准中间溶液 I (5.11), 用 0.1%甲酸水溶液 (5.6) 稀释定容至 10 mL, 混匀。—18 °C 以下保存, 有效期 6 个月。

5.13 亲水亲脂平衡 (HLB) 固相萃取小柱: 500 mg/6mL。

5.14 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: 配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 精度 0.001 g 和 0.01 mg。

6.3 旋涡混合器。

6.4 离心机: 转速不低于 8000 r/min。

6.5 固相萃取装置。

6.6 氮吹仪。

7 样品

按照 GB/T 20195 制备样品, 取样品至少 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

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确至 0.001 g) 置于 20 mL 离心管中, 准确加入 5% 草酸溶液 (5.5) 20 mL, 涡旋混合 1 min, 超声提取 15 min (每隔 5 min 取出涡旋混合 10 s), 于 8000 r/min 离心 5 min, 转移上清液至另一管中, 加入 10 mL 正己烷, 涡旋混合 30 s, 8000 r/min 离心 5 min, 除去上层正己烷, 备用。

8.2 净化

依次用 5 mL 甲醇 (5.2) 和 5 mL 0.1% 甲酸 (5.6) 预淋洗 HLB 小柱 (5.13)。将上清液 (8.1) 全部通过小柱, 用 0.1% 甲酸 (5.6) 5 mL、水 5 mL 淋洗, 用乙腈 5 mL 洗脱, 收集洗脱液于玻璃试管中, 于 40 °C 下用氮气吹至近干, 准确加入 1 mL 乙腈甲酸溶液 (5.9) 溶解, 涡旋混匀, 过微孔滤膜 (5.14), 待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品, 按 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液, 分别取标准中间溶液 II (5.12) 适量, 于 40 °C 下氮气吹至近干, 以空白基质溶液进行稀释, 配制成 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、5000 ng/mL 基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

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

柱温: 40 °C。

流速: 0.3 mL/min。

进样体积: 10 µL。

流动相：A 相，0.2%甲酸溶液（5.8）；B 相，含 0.2%甲酸的甲醇溶液（5.9），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	95	5
2.0	95	5
3.0	10	90
4.0	10	90
5.0	95	5

8.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾离子源，正离子模式（ESI⁺）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

毛细管电压：1.5 kV。

离子源温度：120 ℃。

去溶剂温度：340 ℃。

脱溶剂气：氮气 600 L/Hr。

二级碰撞气：氦气 29 L/hr。

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 多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

待测物	监测离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
黏菌素 A	390.7>379.0	25	12
	390.7>384.8*	40	13
黏菌素 B	386.2>374.3	25	12
	386.2>380.2*	40	12

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（8.4）和试样溶液（8.2或8.3）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

待测组分选择1个母离子，2个子离子，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偏差应在±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 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

按照8.4.1和8.4.2设定仪器条件进行样品检测。标准曲线校准时，以基质匹配标准溶液的色谱峰面积（响应值）为纵坐标，浓度为横坐标绘制工作曲线，标准曲线的相关系数应不小于0.99。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，若超出线性范围时，应将试样溶液和基质匹配标准溶液用乙腈甲酸溶液做相应稀释后重新测定。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

9.1 待测物的含量

试样中待测物含量以质量分数 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：

$$W_i = \frac{\rho_s \times V \times V_2}{V_l \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_s ——基质匹配标准曲线中查得待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取体积，单位为毫升（mL）；

V_l ——净化时所用试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——超出基质匹配标准曲线范围后的稀释倍数。

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

式中：

A_i ——试样上机溶液中待测物的峰面积；

ρ_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取体积，单位为毫升（mL）；

V_l ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——超出基质匹配标准曲线范围后的稀释倍数。

9.2 硫酸粘菌素的含量

试样中硫酸黏菌素（包括黏菌素A和黏菌素B）以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。
按公式（3）计算：

$$W=w_1+w_2\cdots\cdots\cdots (3)$$

w_1 ——黏菌素A的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_2 ——黏菌素B的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）。

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。

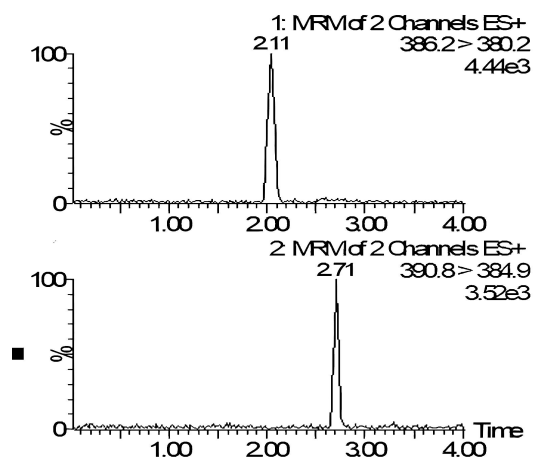
10 精密度

在重复性条件下，获得的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)

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。



说明：1为黏菌素B：386.2>380.2，2为黏菌素A，390.8>384.9

图A.1 基质匹配标准溶液（200 ng/mL）定量离子色谱图