



中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX-202X

饲料中抗生素滤渣的鉴别
液相色谱-高分辨质谱法

Identify of antibiotic filter in feeds—
Liquid chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

(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。

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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：

饲料中抗生素滤渣的鉴别 液相色谱-高分辨质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中抗生素滤渣的液相色谱-高分辨质谱鉴别方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣的鉴别。

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 6041 质谱分析方法通则

GB/T 13966 分析仪器术语

GB/Z 35959 液相色谱-质谱联用分析方法通则

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

GB/T 6041、GB/T 13966、GB/Z 35959、GA/T 122 中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

抗生素滤渣：是抗生素类产品在生物发酵生产过程中产生的工业三废,因含有微量抗生素成份，在饲料和饲养过程中使用后对动物有一定的促生长作用，存在各种安全隐患。

4 原理

试样中抗生素滤渣用提取液溶液提取，液相色谱-高分辨质谱仪测定，利用已经建立数据库或对应标志物鉴别试样中抗生素滤渣的存在。

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 甲酸: 色谱纯。

5.3 甲醇: 色谱纯。

5.4 乙腈: 色谱纯。

5.5 0.1% 甲酸溶液: 移取 1 mL 甲酸 (5.2), 用水稀释至 1000 mL, 混匀。

5.6 0.5%乙二胺四乙酸二钠溶液: 称取 5 g 乙二胺四乙酸, 用水溶解稀释至 1000 mL。

5.7 试样提取溶液: 取 50 mL 0.5%乙二胺四乙酸溶液 (4.5), 加入 750 mL 乙腈、100mL 甲醇、100mL 二甲基亚砜, 混匀。

5.8 抗生素药渣标示物的标准品: 如相关的标示物能获得, 应收集相关中英文名称、化学文摘(CAS)登录号、分子式、配制溶剂以及色谱保留时间、特征碎片离子等信息参见附录。

5.9 标示物标准溶液配制

5.9.1 标准储备溶液 (1.0 mg/mL) : 固体标准品根据标准物质纯度和盐型换算药物原型, 分别精密称取 (精确至 0.01 mg) 标准品, 采用附录中对应溶剂配制成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。液体标准品 (单标或混标) 直接用溶剂稀释配制成 1.0 mg/mL 的 标准储备溶液。密封, -18°C及以下避光保存, 有效期6个月。氨基糖苷类抗生素标准品需使用聚丙烯材质容器保存。

5.9.2 混合标准中间溶液 (10 μ g/mL) : 准确移取匹配溶剂配制的同类药物 1.0 mg/mL 单一标准储备溶液各0.1 mL , 用溶剂稀释并定容至10 mL, 混匀, 配制成10 μ g/mL的混合标准中间溶液。液体标准品 (混标) 配制的标准储备溶液直接用溶剂稀释成 10 μ g/mL的混合标准中间溶液。-18°C及以下避光保存, 有效期7 d。

5.9.3 混合标准工作溶液 (500 ng/mL~1000 ng/mL) : 准确移取一份或多份混合标准中间溶液各0.5 mL~1.0 mL , 用溶剂稀释并定容至10 mL, 混匀。于-18°C及以下避光保存。临用现配

5.10 微孔滤膜: 0.22 μ m, 有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-高分辨质谱仪: 一级分辨率不小于 20000 [以利血平 m/z=609.2807 为基准, 按半峰宽 (FWHM)计], 质量准确性相对偏差不大于 5 ppm (m/z=609.2807); 二级分辨率不小于 10000。仪器应定期进行校准调谐, 确保筛查过程中处于正常工作状态。

6.2 分析天平: 精度 0.1 mg 和 0.01 mg。。

6.3 离心机: 转速不低于8 000 r/min。

6.4 超声波清洗仪。

7 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g、粉碎使其全部过 0.425 mm 试验筛，充分均匀。装入密闭容器中，备用。

8 试验步骤

8.1 试样的提取

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.1 mg，置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 试样提取溶液（5.7），超声提取 30 min，每 10 min 振摇一次，8000 r/min 离心 5 min，取上清液，用 0.22 μm 滤膜（4.11）过滤，上机测定。

8.2 液相色谱-高分辨质谱参考条件

8.2.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C18色谱柱，柱长100 mm，内径3.0 mm，粒径1.7μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A-0.1%甲酸水溶液；B-乙腈，梯度洗脱，洗脱程序见表2。
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样量：5 μL。

表 1 色谱柱梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%
0.00	0.3	90	10
1.50	0.3	90	10
4.00	0.3	70	30
9.00	0.3	5	95
10.00	0.3	5	95
10.01	0.3	90	10
12.00	0.3	90	10

8.2.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)
- b) 电离模式：正离子扫描（ESI +）
- c) 采集模式：一级全扫描和子离子二级全扫描(FULL-DD-MS²,高灵敏度模式);或效果相当的其他扫描模式
- d) 扫描质量范围：MS扫描范围： m/z 100~2000。
- e) 毛细管电压：4.0 KV,
- f) 离子源温度：120°C
- j) 去溶剂温度：320°C

8.2.3 测定

在仪器的最佳条件下，分别取抗生素药渣溶液（8.1）上机测定。

8.3 抗生素药渣的识别

8.3.1 筛查

将质量数据提取窗口调整至一级母离子为10 ppm, 二级子离子为20 ppm, 对试样溶液的全扫描所获得的总离子流图进行提取，选择可辨识的色谱（质谱）峰，将其与经验证的抗生素滤渣高分辨质谱数据库（见附录 A）中的化合物信息和标示物（见附录C）进行对比。对比结果同时符合表3 中所示条件时，可认为筛查到疑似阳性样品。

表 2 筛查判定条件

判别项	判定条件
采样点数	单个目标物峰不少于 5 个采样点
信号响应要求	1) 信噪比 (S/N) 存在时，应使 S/N≥3 2) 当 S/N 不存在时，以 95%置信度水平上可准确定性该化合物的最低检测浓度作为检测限
质量准确性	1) 一级母离子 m/z≥200 时，其相对偏差应≤ 10 ppm 2) 一级母离子 m/z < 200 时，其绝对偏差应 < 1 mDa

8.4.2 确认

筛查到疑似阳性样品后，如有对应品，应使用参考标准品进行对照试验，参考标准品浓度应与样

品中目标化合物的浓度接近。如能获得与样品相似的空白基质，应将其添加到基质中进行试验。将质量数提取窗口调整至一级母离子为5 ppm, 二级子离子为10 ppm, 对全扫描所获得的总离子流图进行提取, 选择可辨识的色谱(质谱)峰, 对照试验结果同时符合表3所示条件要求时, 可确认为筛查阳性, 否则为阴性。

若无对应得标准品, 观察其采集到的·离子质谱图, 在相同碰撞电压(CE)下, 主要离子全部出现, 且与相应得抗生素药渣的质谱库匹配(若仪器软件采用匹配度进行计算, 推荐匹配度 $\geq 70\%$ 为匹配), 可确认为筛查阳性, 否则为阴性。

表 3 目标物确认判定条件

判别项	判定条件
保留时间	化合物的保留时间大于死时间的2倍, 目标物与参考标准品以相同条件测定所获保留时间的绝对偏差应不大于0.2 min。
质量准确性	一级母离子的 m/z 相对偏差 ≤ 5 ppm; 二级子离子的 m/z 相对偏差 ≤ 10 ppm; 当 $m/z < 200$ 时, 其绝对偏差应 < 1 mDa。
同位素峰	应将确认样品调整至适当的进样浓度确保主要同位素 峰可测, 同位素峰的 m/z 应符合目标物确认的质量准确性要求。
碎片相对离子丰度比	比较二级碎片质谱图, 其主要碎片离子有2个或2个以上符合表中质量准确性要求, 且其相对离子丰度比符合表4的最大允许偏差要求。

表 4 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
允许的最大偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

8.5 标示物的定量

将标示物标准工作溶液和待测溶液分别注入液相色谱-高分辨质谱仪中, 样品中目标化合物质量浓

度应在标准工作曲线质量浓度范围内,超过标准工作曲线质量浓度上限的样品应用相对应的提取液稀释后进样,采用母离子([M+H]+)的峰面积进行计算,外标法定量。同时做空白试验。标示物一级全扫描模式下色谱图见附录C。

9 试验数据处理

试样中标示物含量以质量分数 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按式(1)计算;单点校准按式(2)计算:

$$w_i = \frac{\rho_i \leftrightarrow V_1 \leftrightarrow V_3}{V_2 \leftrightarrow m \leftrightarrow 1000} \dots \quad (1)$$

式中:

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 ——试样提取溶液总体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——净化用试样提取溶液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \leftrightarrow c_s \leftrightarrow V_1 \leftrightarrow V_3}{A_s \leftrightarrow V_2 \leftrightarrow m \leftrightarrow 1000} \dots \quad (2)$$

式中:

A_i ——试样溶液待测物色谱峰面积;

C_s ——标准溶液组分i的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 ——试样提取溶液总体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准溶液待测物色谱峰面积;

V_2 ——净化用试样提取溶液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

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)

抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱库构建及阈值确定实施例

A.1 抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱库构建

A.1.1 抗生素滤渣要求

用于建立抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱数据库的抗生素滤渣试样应具有代表性，涵盖各种影响因素：

- a) 地域和原料的不同；
- b) 加工技术和工艺的不同；
- c) 储存条件的不同。

A.1.2 一般要求

每次检测前，应保证环境温度的稳定以及供电系统电源质量符合液相色谱-高分辨质谱仪的要求，应按液相色谱-高分辨质谱仪器厂商规定的操作指南要求对仪器进行预热和自检，保证仪器设备的稳定性和可靠性，如有必要，应进行按 GB/T 6041 的要求进行相应的调谐和校准工作。

A.1.3 抗生素药渣的提取

见 8.1

A.1.4 液相色谱-高分辨质谱参考条件

见 8.2

A.1.5 抗生素滤渣高分辨质谱数据库的构建

采集代表性抗生素滤渣试样的液相色谱高分辨的质谱数据，利用基于 Duplex 等算法从每个抗生素滤渣质谱数据中选取相关代表性数据（代表性抗生素滤渣试样的液相色谱高分辨图参见附录 B）¹，建立抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱库及特征标志物质谱数据库。计算未参与质谱库建立的样品与抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱中数据及特征标志物的数值，根据 2.5%下百分位数来确定判别阈值²。

注1：代表性抗生素滤渣液相色谱高分辨质谱数据的选取。

注2：确定阈值的百分位数可有用户根据分析要求自行确定。

A.1.6 标示物的筛选与构建

根据各种抗生素的生物合成路径,通过相应的数据库对推断出涉及合成相关得标示物。由软件计算得到每个化合物母离子($[M+ H]^+$)的精确理论质量数,结合获得的抗生素药渣的质谱数据库,应用Duplex算法找到相应的标示物,并对标示物进行子离子二级全扫描,采集每个标示物的二级碎片离子质谱图,分别导入到质谱库,构建标示物的二级谱库,完成标示物一级和二级谱库的构建。抗生素滤渣标示物的液相色谱高分辨质谱应包含化合物中英文通用名称、主要母离子(分子离子、质子化离子/去质子化离子或加成离子)的精确质荷比、2个以上特征碎片离子的精确质荷比、特征碎片离子的相对丰度比和保留时间。采用500 ng/mL~1000 ng/mL的标准工作液在数据依赖模式下采集二级碎片质谱图,母离子质量相对偏差应 ≤ 5 ppm,二级碎片离子相对偏差应 ≤ 10 ppm。碰撞能量的设置应采用高、中、低不同的碰撞能量,以获得更为丰富的碎片离子。典型抗生素药渣的典型标示物的母离子与子离子二级全扫描质谱图见附录B。

如有可能可根据采集的代表性滤渣自行建立相关数据库和标示物

附录 B

(资料性)

典型抗生素药渣相关全扫描质谱信息图

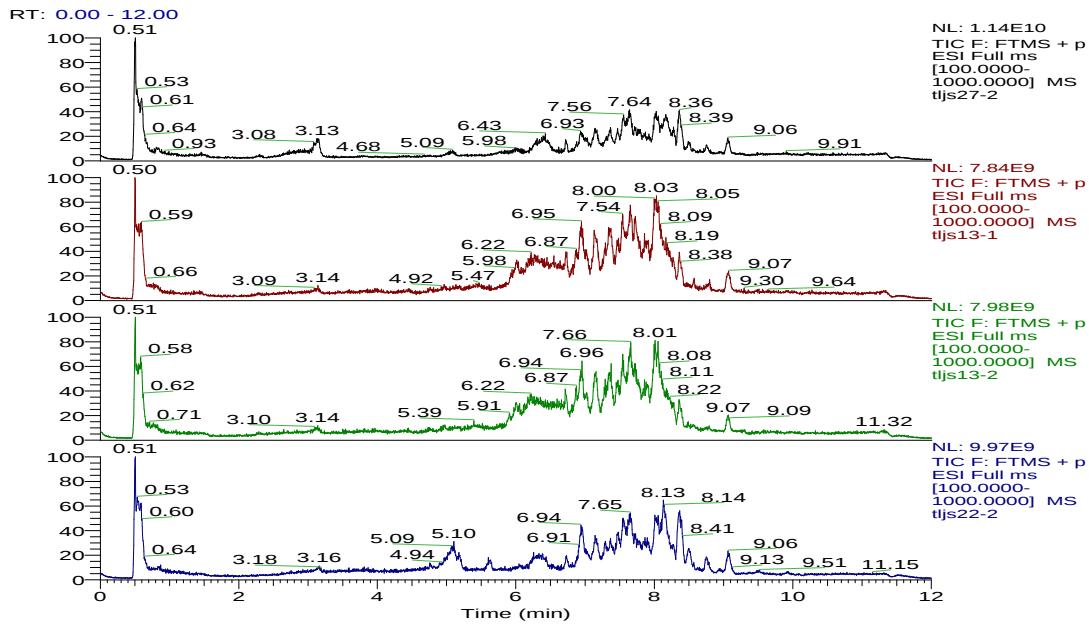


图 3 泰乐菌素滤渣全面全扫描质谱图

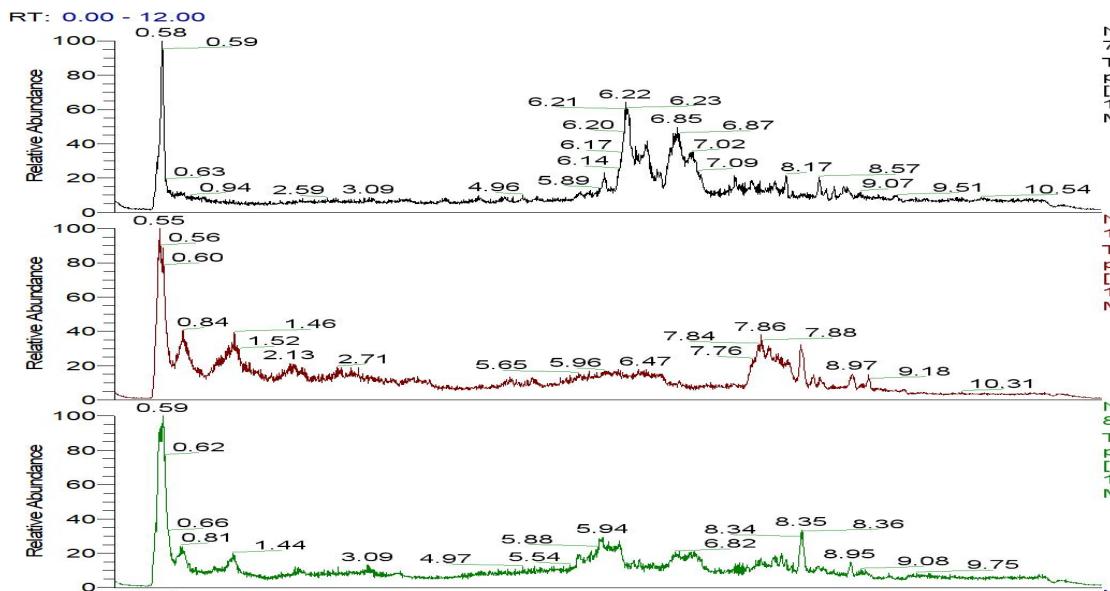


图 4 泰万菌素滤渣全面全扫描质谱图

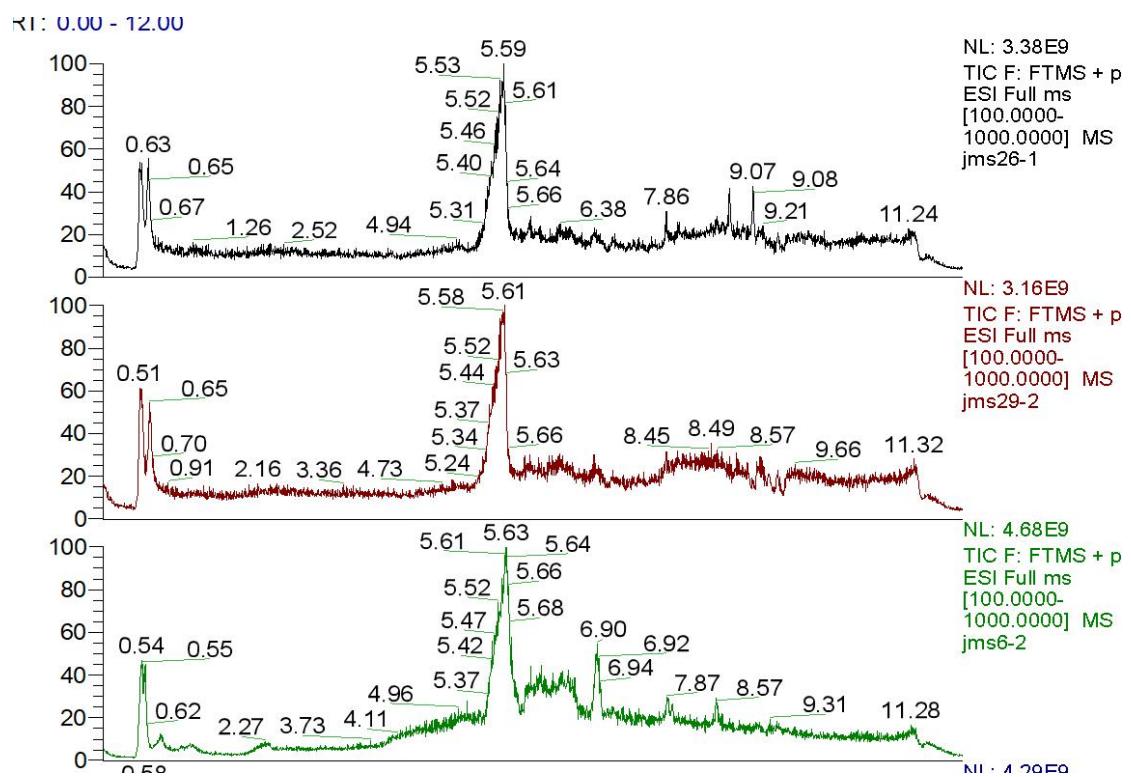


图 5 金霉素滤渣全面全扫描质谱图、

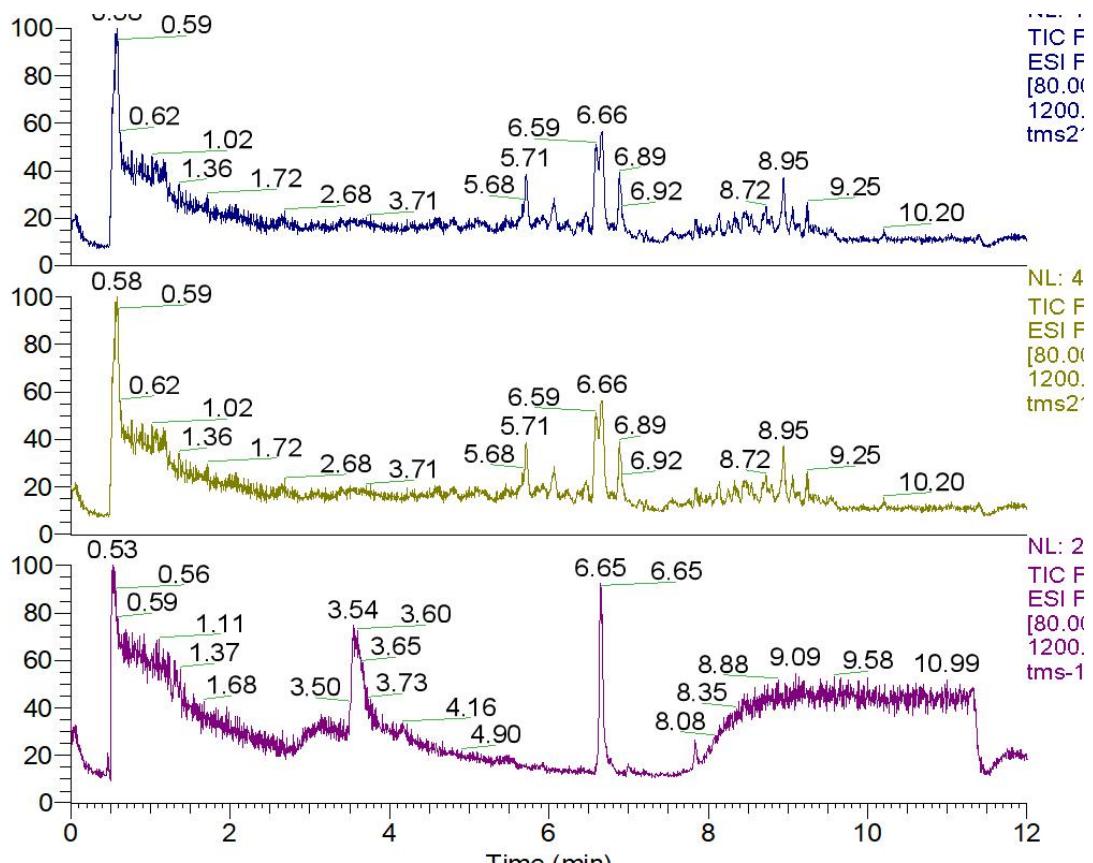


图 6 土霉素滤渣全面全扫描质谱图

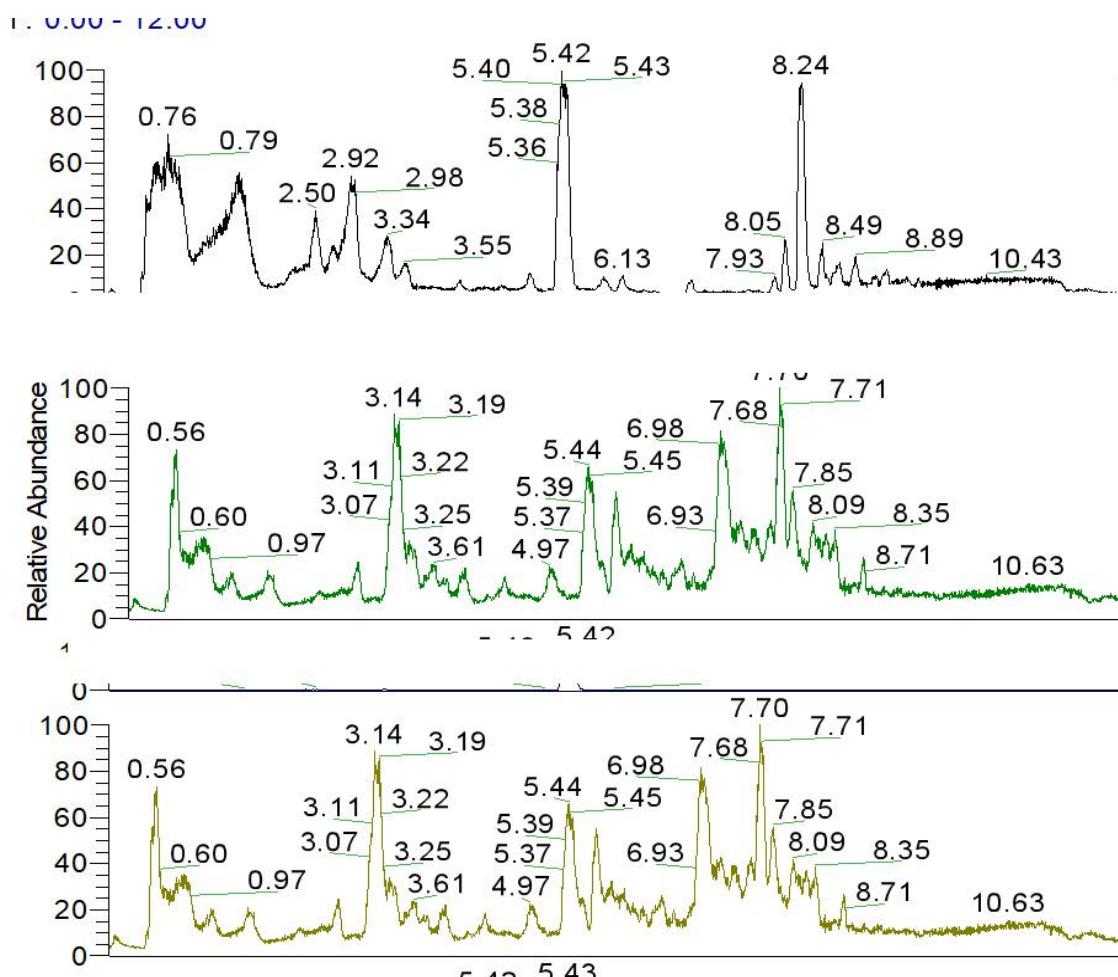


图 7 青霉素滤渣全面全扫描质谱图

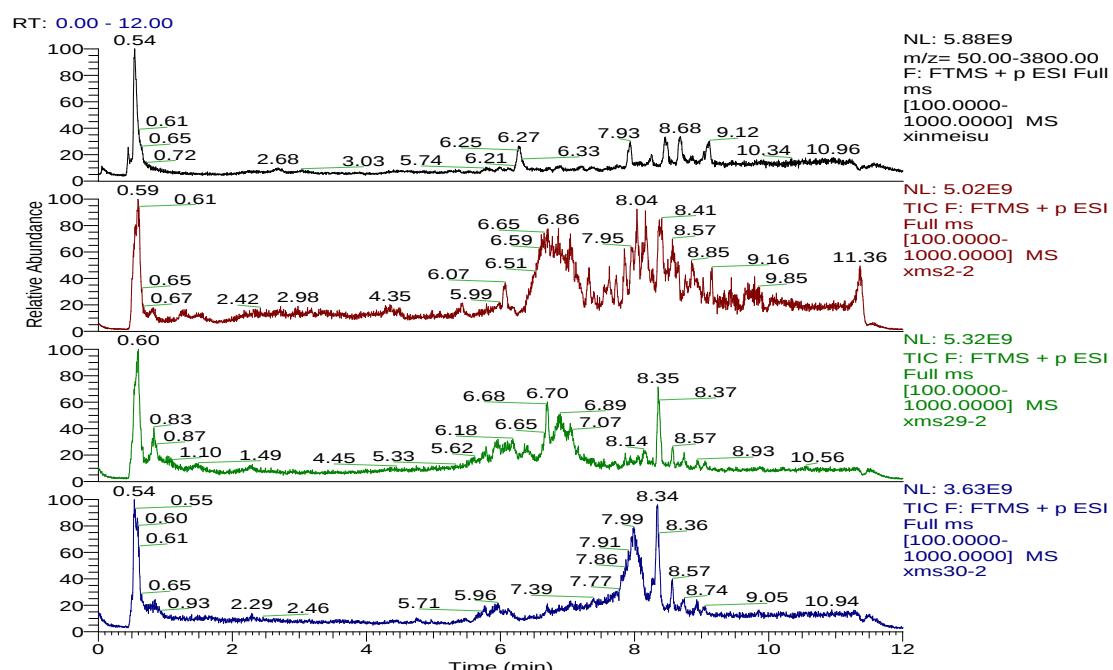


图 8 新霉素滤渣全面全扫描质谱图

附录 C

(资料性)

抗生素药渣及部分标志物相关质谱信息

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
金霉素药渣	金霉素	478.12	479.1215	292.1054,307.1287,335.1237,367.1499
	去甲基金霉素	464.1063	465.1065	428.0749、410.0643、358.0921
	四环素四并苯骨架	357.10	358.1029	323.0659,308.0428,341.0708
	脱水四环素	442.14	443.1448	154.0500,201.0549,426.1186,226.0712
土霉素药渣	土霉素	460.15	461.1554	154.0500,201.0549,337.0708,426.1186
	四环素	444.16	445.1605	154.0500,201.0549,392.1129,410.1235
	4-氨基脱水四环素	442.14	443.1448	154.0500,201.0549,426.1186, 358.0921
	脱水四环素	426.14	427.1453	358.0921, 409.1350, 392.1085
泰乐菌素药渣	泰乐菌素、	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,814.1421
	泰乐酮	394.54	395.2836	189.1652,207.1842
泰万菌素药渣	泰乐菌素	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,229.1421
	Methylmalonyl-CoA	867.60	868.5124	174.1139,109.0659,640.3743

	泰乐酮	394.54	295.28	189.1652,207.1842
新霉 素药 渣	帕罗马明	337.33	338.1372	295.1313,177.0559
	Ribostamycin	466.47	467.2128	338.1375,295.1316
青霉 素药 渣	盘尼西林 N	359.39	360.2224	201.1257,243.1442
	不明标志物		309.1367	174.0603,128.0544,263.1314
	ACV 三肽	361.41	3622.2019	144.0672,219.1445,245.12236