

# 中华人民共和国国家标准

农业部 2086 号公告—7—2014

---

## 饲料中大观霉素的测定

Determination of spectinomycin in feeds

2014-04-01 发布

2014-07-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

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:北京市饲料监察所。

本标准主要起草人:魏秀莲、孙志文、怀文辉、王有月、冯秀燕、左文霞、邓程君、郑君杰、赵营、贾涛、李月、卢光菊、徐理奇。

## 饲料中大观霉素的测定

### 1 范围

本标准规定了饲料中大观霉素含量测定的高效液相色谱法和高效液相色谱—串联质谱法。

本标准高效液相色谱法适用于配合饲料中大观霉素的测定；高效液相色谱—串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、精料补充料中大观霉素的测定。

高效液相色谱法检测限为 2.0 mg/kg，定量限为 5.0 mg/kg；高效液相色谱—串联质谱法检测限为 1.0 mg/kg，定量限为 2.0 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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

### 3 原理

饲料中大观霉素用酸化甲醇溶液提取，强阳离子柱净化，氨化甲醇洗脱，浓缩后流动相溶解，高效液相色谱法或液相色谱—串联质谱法测定，外标法定量。

### 4 液相色谱法

#### 4.1 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1.1 甲醇：色谱纯。

4.1.2 三氟乙酸：色谱纯。

4.1.3 氨水。

4.1.4 5%草酸溶液：取草酸 5 g，加水溶解并稀释至 100 mL。

4.1.5 80%甲醇草酸提取液：取 80 mL 甲醇，加 5%草酸溶液(4.1.4)稀释至 100 mL。

4.1.6 10%氨化甲醇：取氨水 10 mL，加甲醇稀释至 100 mL。

4.1.7 0.05 mol/L 三氟乙酸溶液：取 1.8 mL 三氟乙酸，加水稀释至 1 000 mL。

4.1.8 大观霉素对照品：纯度大于 98.5%。

4.1.9 大观霉素标准储备液：称取大观霉素对照品适量，用水溶解并定容配制成含大观霉素 1 mg/mL 的标准储备液。4℃ 保存，有效期为 3 个月。

4.1.10 大观霉素标准工作液：精密量取适量大观霉素储备液，流动相稀释成 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 的标准工作溶液。现配现用。

4.1.11 强阳离子固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

4.1.12 微孔滤头：0.22 μm。

#### 4.2 仪器和设备

4.2.1 高效液相色谱:配蒸发光散射检测器。

4.2.2 涡旋振荡器。

4.2.3 离心机。

4.2.4 氮吹仪。

4.2.5 分析天平:感量 0.1 mg。

4.2.6 天平:感量 0.01 g。

4.2.7 固相萃取装置。

#### 4.3 试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 规定的方法制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,避光低温保存,备用。

#### 4.4 测定步骤

##### 4.4.1 提取

称取配合饲料 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 塑料离心管中,加 20 mL 提取液(4.1.5),充分涡旋提取,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残留物用 10 mL 提取液重复提取一次,合并上清液,混匀,做净化备用液。

##### 4.4.2 净化

阳离子固相萃取小柱依次用甲醇、水各 5 mL 活化,取备用液 15 mL 过柱。依次用水、甲醇各 5 mL 淋洗,烘干。用 10%氯化甲醇(4.1.5)10 mL 洗脱,洗脱液 40℃下氮气吹干,残余物用流动相 1 mL 溶

解,涡旋溶解,过 0.22 μm 滤膜,定容至 1 mL,供高效液相色谱仪测定。

4.4.2 测定

- $m$  ——试样的质量,单位为克(g);  
 $V_1$  ——提取液过固相萃取柱的体积,单位为毫升(mL);  
 $V_2$  ——提取液总体积,单位为毫升(mL)。

#### 4.5.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

#### 4.6 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

### 5 高效液相色谱—串联质谱法(确证法)

#### 5.1 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1.1 乙腈:色谱纯。  
 5.1.2 甲酸:色谱纯。  
 5.1.3 草酸。  
 5.1.4 氨水。  
 5.1.5 5%草酸溶液:取草酸 5 g,加水溶解并稀释至 100 mL。  
 5.1.6 80%甲醇草酸提取液:取 80 mL 甲醇,加 5%草酸溶液(5.1.5)稀释至 100 mL。  
 5.1.7 10%氨化甲醇:取氨水 10 mL,加甲醇稀释至 100 mL。  
 5.1.8 0.3%甲酸溶液:取 3 mL 甲酸,加水稀释至 1 000 mL。  
 5.1.9 大观霉素对照品:纯度大于 98.5%。  
 5.1.10 大观霉素标准储备液:称取大观霉素对照品适量,用水溶解并定容配制成含大观霉素 1 mg/mL 的标准储备液。4℃保存,有效期为 3 个月。  
 5.1.11 大观霉素基质匹配标准工作液的制备:准确移取大观霉素标准储备液适量,依次加入 6 个空白饲料样品中,充分混匀,经 5.3.1~5.3.2 步骤处理,制得理论浓度为 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的基质匹配系列标准溶液。现配现用。  
 5.1.12 强阳离子固相萃取柱:200 mg/6 mL;或相当者。  
 5.1.13 微孔滤头:0.22  $\mu\text{m}$ 。

#### 5.2 仪器和设备

- 5.2.1 高效液相色谱—串联质谱仪:带电喷雾(ESI)离子源。  
 5.2.2 涡旋振荡器。  
 5.2.3 离心机。  
 5.2.4 氮吹仪。  
 5.2.5 分析天平:感量 0.1 mg。  
 5.2.6 天平:感量 0.01 g。  
 5.2.7 固相萃取装置。

#### 5.3 测定步骤

##### 5.3.1 提取

称取饲料 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 塑料离心管中,加 20 mL 提取液(5.1.6),充分涡旋提取,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,残留物用 10 mL 提取液重复提取一次,合并上清液,混匀,做净化备用液。

5.3.2 净化

阳离子固相萃小柱依次用甲醇、水各 5 mL 活化。取备用液 6 mL 过柱,依次用水、甲醇各 5 mL 淋洗,抽干。用 10% 氨化甲醇(5.1.7)10 mL 洗脱,洗脱液 40°C 下氮气吹干,残余物用 2% 甲酸 1 mL 溶解,涡旋溶解,过 0.22 μm 滤膜,定容至 1 mL,供测定。

5.3.3 测定

5.3.3.1 液相色谱条件

色谱柱:亲水相互作用(Hilic)色谱柱,柱长 50 mm,柱内径 2.1 mm, 粒径 1.7 μm;或相当者。

柱温:30°C。

进样量:10 μL。

流动相:A:乙腈;B:0.3% 甲酸水。

流速:0.4 mL/min。

梯度洗脱:见表 1。

表 1 大观霉素梯度洗脱程序

序号	时间,min	流速,mL/min	A,%	B,%	线性
1	起始	0.4	98	2	起始
2	1.0	0.4	98	2	6
3	3.5	0.4	20	80	6
4	4.0	0.4	20	80	6
5	5.0	0.4	98	2	6
6	6.0	0.4	98	2	6

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应监测。

雾化气、锥孔气均为高纯氮气;碰撞气为高纯氦气;使用前,应调节各气体流量,以使质谱灵敏度达到检测要求;定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 大观霉素定性、定量离子和锥孔电压、碰撞能量

药物名称	定性离子对,m/z	定量离子对,m/z	锥孔电压,V	碰撞能量,eV
大观霉素	351.6>207.2	351.6>333.3	40	20
	351.6>333.3			15

5.3.3.3 定性测定

大观霉素选择 1 个母离子和 2 个特征离子,在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与基质

准工作液外标法定量,或以基质匹配标准工作液中被测组分峰面积为纵坐标、相应被测组分浓度为横坐标绘制工作曲线,用工作曲线对试样进行定量,试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,基质匹配标准工作液多反应监测(MRM)色谱图参见图 A. 2。

#### 5.4 计算与表示

##### 5.4.1 结果计算

试样中大观霉素含量  $X$  以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$A$  —— 试样溶液中大观霉素的峰面积;

$A_s$  —— 基质匹配标准工作液大观霉素峰面积;

$C_s$  —— 基质匹配标准工作液中大观霉素浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

$V$  —— 上机前最终定容体积,单位为毫升(mL);

$m$  —— 试样的质量,单位为克(g);

$V_1$  —— 提取液过固相萃取柱的体积,单位为毫升(mL);

$V_2$  —— 总提取液体积,单位为毫升(mL)。

##### 5.4.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

##### 5.4.3 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

附录 A  
(资料性附录)  
大观霉素色谱图

A.1 大观霉素标准工作液(5 mg/mL)色谱图

见图 A.1。

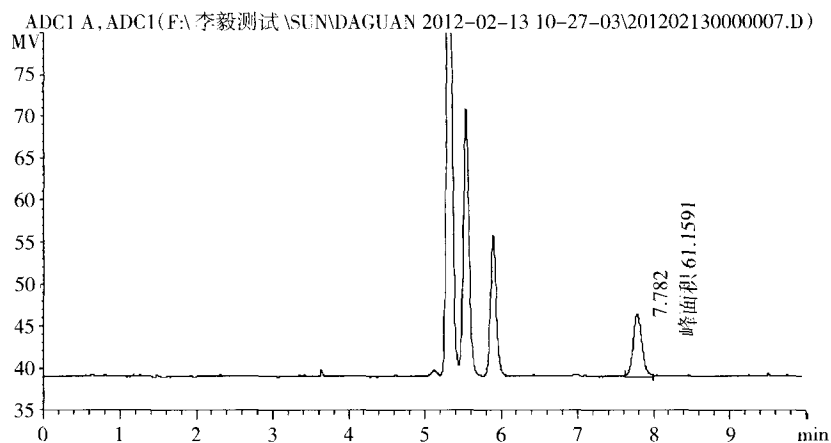


图 A.1 大观霉素标准工作液(5 mg/mL)色谱图

A.2 大观霉素基质匹配标准工作液(0.5 µg/mL)多反应监测(MRM)色谱图

见图 A.2。

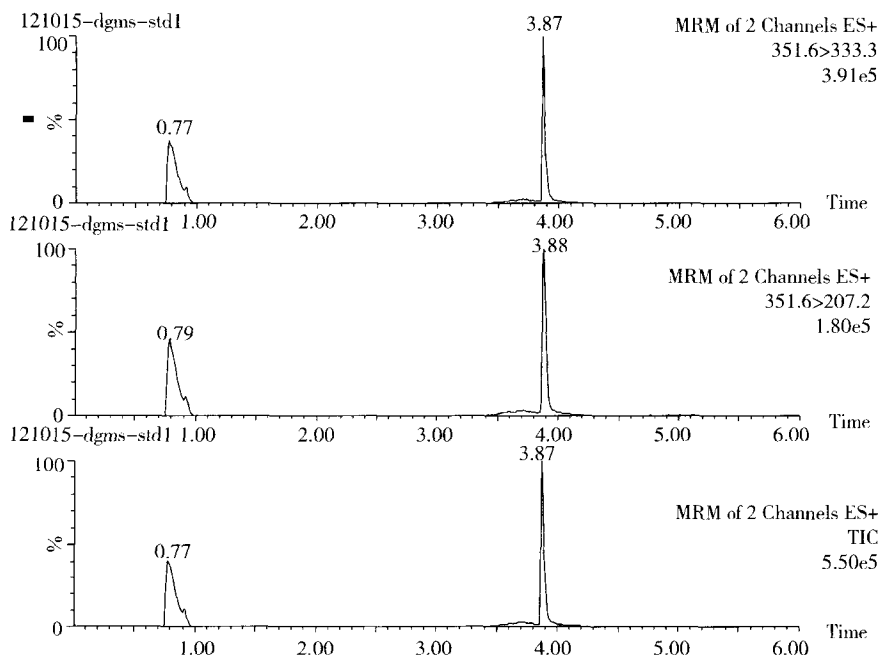


图 A.2 大观霉素基质匹配标准工作液(0.5 µg/mL)多反应监测(MRM)色谱图