ICS 65.120
CCS B 46

NY

中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T ××××－202×

饲料中杆菌肽的测定 液相色谱－串联质谱法

Determination of bacitracin 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。

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：宁波市农产品质量检测中心、浙江正明检测有限公司。

本文件主要起草人：。

饲料中杆菌肽的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中杆菌肽的液相色谱-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杆菌肽（以杆菌肽A、杆菌肽B_1、杆菌肽B_2和杆菌肽B_3之和计）的测定。

本文件杆菌肽A、杆菌肽B_1、杆菌肽B_2和杆菌肽B_3的检出限均为0.02 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中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

试样中的待测物用乙腈、甲醇和氨水混合溶液提取，经C_{18}固相萃取柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪测定，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 乙腈：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 20 g 氢氧化钠溶于 400 mL 水中，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.6 乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）溶液（1.5 mmol/L）：称取 0.25 g EDTA-2Na 溶于 450 mL 水中，用氢氧化钠溶液（5.5）调 pH 至 7.0 后，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.7 氨水溶液：取 12 mL 氨水，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.8 提取液：分别量取乙腈（5.2）、甲醇（5.3）和氨水溶液（5.7）各 100 mL，混匀。

5.9 乙腈溶液（15%，体积分数）：移取 15 mL 乙腈（5.2），用水稀释至 100 mL，混匀。

5.10 甲酸溶液（0.1%，体积分数）：移取 1 mL 甲酸（5.4），用水稀释至 1 000 mL，混匀。
5.11 甲醇溶液（20%，体积分数）：移取 200 mL 甲醇（5.3），用水稀释至 1 000 mL，混匀。
5.12 甲酸甲醇溶液（0.1%，体积分数）：移取 1 mL 甲酸（5.4），用甲醇稀释至 1 000 mL，混匀。
5.13 标准储备溶液（0.2 mg/mL）：称取适量杆菌肽 A（$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$，CAS：22601-59-8，纯度不低于 90%）、杆菌肽 B_1（$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$，CAS：57762-79-5，纯度不低于 90%）、杆菌肽 B_2（$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$，CAS：57762-78-4，纯度不低于 90%）和杆菌肽 B_3（$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$，CAS：149146-32-7，纯度不低于 90%）标准品，分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲酸甲醇溶液（5.12）溶解并定容。－18 ℃以下保存，有效期 6 个月。
5.14 混合标准储备溶液（0.05 mg/mL）：准确移取标准储备溶液（5.13）各 5 mL 于 20 mL 容量瓶中，用甲酸甲醇溶液（5.12）定容，混匀。－18 ℃以下保存，有效期 3 个月。
5.15 混合标准中间溶液（0.01 mg/mL）：准确移取 2 mL 混合储备溶液（5.14）于 10 mL 容量瓶中，用甲酸甲醇溶液（5.12）定容，混匀。－18℃以下保存，有效期 2 个月。
5.16 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准中间溶液（5.15），用甲醇溶液（5.11）稀释配制成质量浓度分别为 0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL 和 1 μg/mL 的混合标准系列溶液，混匀。临用现配。
5.17 C_{18} 固相萃取柱：500 mg/6 mL，或相当者。
5.18 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：配电喷雾离子源。
6.2 离心机：转速不低于 9 500 r/min。
6.3 分析天平：精度为 0.01 mg 和 0.01g。
6.4 振荡器：转速不低于 300 r/min。
6.5 旋涡混合器。
6.6 固相萃取装置。
6.7 氮吹仪。
6.8 pH 计：精度为 ± 0.1。

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孔径的试验筛，充分混匀，装入磨口瓶中，备用。选取类型相同，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0.01 g），置于50 mL离心管中，准确加入10 mL提取液（5.8），涡旋30 s后，振荡提取15 min，9 500 r/min离心3 min，移取上清液至另一离心管中。重复提取1次，合并上清液，准确移取5 mL上清液，加入10 mL EDTA-2Na溶液（5.6），混匀，备用。

8.2 净化

依次用5 mL甲醇（5.3）、5 mL水（5.1）活化固相萃取小柱（5.17），取备用液（8.1）过柱，用3 mL乙腈溶液（5.9）淋洗，3 mL甲醇（5.3）洗脱，收集洗脱液于10 mL离心管中，40℃氮气吹干，准确加入甲醇溶液（5.11）1 mL溶解残渣，涡旋30 s，微孔滤膜（5.18）过滤，待测。

8.3 基质匹配混合标准系列溶液的制备

称取相同质量的空白试样，按照8.1和8.2步骤操作至“40℃氮吹至干”后，残渣分别准确加入混合系列标准溶液（5.16）溶解，混匀，配制成质量浓度分别为0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL和1 μg/mL的基质匹配混合标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C_{18}柱，100 mm×2.1 mm，1.7 μm，或性能相当者；
b) 柱温：35 ℃；
c) 进样量：10 μL；
d) 流速：0.3 mL/min；
e) 流动相：A相为甲酸溶液（5.10）；B相为乙腈（5.2），梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 （min）	A （%）	B （%）
0	80	20
0.2	80	20
6.0	72	28
6.1	20	80
7.0	20	80
7.1	80	20
9.0	80	20

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI^+）；
b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
c) 毛细管电压：3.0 kV；
d) 离子源温度：150 ℃；
e) 脱溶剂温度：600 ℃；
f) 脱溶剂气：氮气 1000 L/Hr；

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2　待测物的多反应监测（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
杆菌肽 A	712.0>227.0	60	35
	712.0>199.1[a]	60	35
杆菌肽 B_1、B_2 和 B_3	705.0>227.0	40	35
	705.0>199.3[a]	40	45
[a] 为定量离子对。			

8.4.3　基质匹配混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配混合标准系列溶液（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定。基质匹配混合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混合标准系列溶液（质量浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±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对的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配混合标准系列溶液中对应的定性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

以基质匹配混合标准溶液质量浓度为横坐标，定量离子对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。试样溶液与基质匹配混合标准溶液中待测物的响应值均应在线性范围内，如超出线性范围，应重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的质量浓度与基质匹配混合标准溶液的质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数w_i计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

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

[在此处键入]

式中：

ρ_i——由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

$$w_i=\frac{A_i\times C_s\times V\times V_2\times 1000}{A_s\times V_1\times m\times 1000} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

A_i——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

A_s——基质匹配标准溶液中待测物的峰面积；

C_s——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

试样中杆菌肽以杆菌肽A、杆菌肽B_1、杆菌肽B_2和杆菌肽B_3的质量分数之和计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。按公式（3）计算：

$$w= w_1+ w_2+ w_3+ w_4 \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

w_1——杆菌肽A的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_2——杆菌肽B_1的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_3——杆菌肽B_2的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_4——杆菌肽B_3的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 精密度

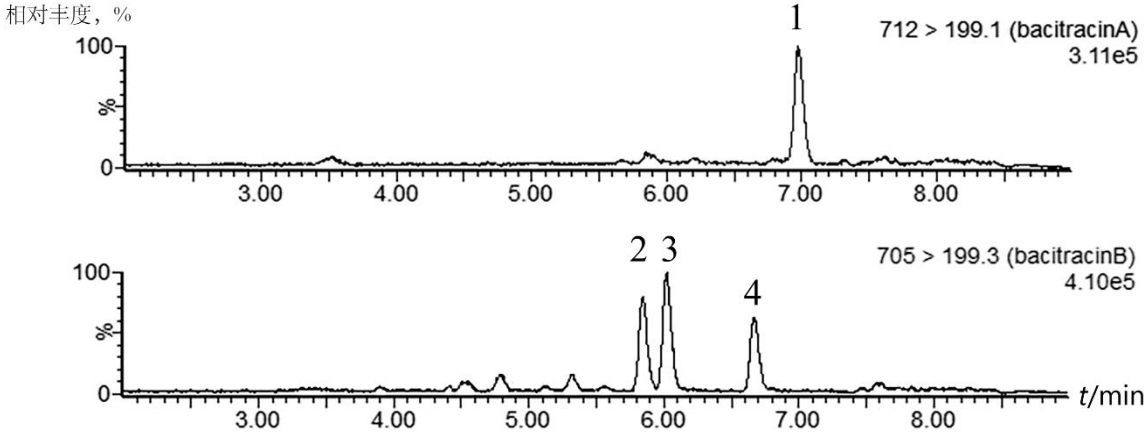
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的15%。

附 录 A

（资料性）

基质匹配混合标准溶液的定量离子色谱图

基质匹配混合标准溶液的定量离子色谱图见图A



标引序号说明：

1——杆菌肽A；

2——杆菌肽B_1；

3——杆菌肽B_2；

4——杆菌肽B_3。

图A 基质匹配混合标准溶液(0.02 μg/mL)定量离子色谱图