ICS 65.120
CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××－202×

饲料中吉他霉素的测定

Determination of kitasamycin in feeds

（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：　。

饲料中吉他霉素的测定

1 范围

本文件描述了饲料中吉他霉素的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。

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吉他霉素（以吉他霉素A_1、吉他霉素A_4、吉他霉素A_5和吉他霉素A_{13}之和计）的测定。

本文件方法的检出限和定量限按附录A执行。

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 液相色谱-串联质谱法（仲裁法）

4.1 原理

试样中的吉他霉素用乙腈提取，经固相萃取柱净化后，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。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 乙腈：色谱纯。

4.2.3 甲醇：色谱纯。

4.2.4 甲酸铵：优级纯。

4.2.5 甲酸铵溶液（0.01 mol/L）：称取 0.63 g 甲酸铵（4.2.4），加水溶解，定容至 1000 mL，混匀。

4.2.6 甲醇溶液（10%，体积分数）：取 100 mL 甲醇（4.2.3）与 900 mL 水混匀。

4.2.7 标准储备溶液（1 mg/mL）：分别称取吉他霉素 A_1、吉他霉素 A_4、吉他霉素 A_5 和吉他霉素 A_{13} 标

准物质（相关信息见附录 B）各 10 mg（精确至 0.01 mg），分别置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.2）溶解定容。－18℃以下保存，吉他霉素 A_{13} 标准储备溶液有效期为 3 个月，吉他霉素 A_1、吉他霉素 A_4 和吉他霉素 A_5 标准储备溶液有效期为 6 个月。

4.2.8 混合标准储备溶液（0.1 mg/mL）：分别准确移取标准储备溶液（4.2.7）各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.2）稀释定容，混匀。－18℃以下保存，有效期 2 个月。

4.2.9 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：准确移取 1 mL 混合标准储备溶液（4.2.8）于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.2）稀释定容，混匀。－18℃以下保存，有效期 1 个月。

4.2.10 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准中间溶液（4.2.9），用甲醇（4.2.3）稀释配制成质量浓度分别为 0.005 μg/mL、0.01 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL 和 5 μg/mL 的混合标准系列溶液，混匀。临用现配。

4.2.11 增强型脂肪去除固相萃取柱：EMR-lipid[1]柱，300 mg/3 mL。

4.2.12 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

4.3.2 离心机：转速不低于 10 000 r/min。

4.3.3 分析天平：精度为 0.01 mg 和 0.01g。

4.3.4 振荡器：转速不低于 300 r/min。

4.3.5 旋涡混合器。

4.3.6 固相萃取装置。

4.4 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。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

4.5.1.1 配合饲料和精料补充料

平行做两份试验。称取试样 5 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 20 mL 乙腈（4.2.2），涡旋 30 s，300 r/min 振荡提取 15 min，9 500 r/min 离心 3 min，上清液备用。

4.5.1.2 浓缩饲料和添加剂预混合饲料

平行做两份试验。称取试样2 g（精确至0.01 g）于50 mL塑料离心管中，准确加入10 mL乙腈（4.2.2），涡旋30 s，300 r/min振荡提取15 min，9 500 r/min离心3 min，上清液备用。

4.5.2 净化

[1] EMR-lipid 是由 Agilent 公司提供产品的商品名。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。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

准确移取2.5 mL备用液（4.5.1）过固相萃取柱（4.2.11），用2 mL甲醇（4.2.3）洗脱，收集洗脱液至5 mL容量瓶中，用甲醇（4.2.3）定容，混匀；准确移取1 mL此溶液于10 mL容量瓶中，用水稀释定容，混匀，微孔滤膜（4.2.12）过滤，待测。

4.5.3 基质匹配混合标准系列溶液的制备

称取空白试样，按照4.5.1和4.5.2操作制得的空白基质试样溶液。分别准确移取50 μL混合系列标准溶液（4.2.10），用空白基质试样溶液定容至5 mL，配制成质量浓度为0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL和50 ng/mL的基质匹配混合标准系列溶液。临用现配。

4.5.4 测定

4.5.4.1 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，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒度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相为甲酸铵溶液（4.2.5）；B相为乙腈（4.2.2），梯度洗脱程序见表1。

表 1 液相色谱串联质谱法梯度洗脱程序

时间 min	A相 %	B相 %
0.0	90	10
4.0	10	90
4.5	10	90
4.6	90	10
6.0	90	10

4.5.4.2 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
吉他霉素 A_1	786.5>109.1	22	36
	786.5>174.2[a]	22	30
吉他霉素 A_4	814.5>109.1	66	42
	814.5>174.2[a]	66	30
吉他霉素 A_5	772.5>109.1	86	36
	772.5>174.2[a]	86	30
吉他霉素 A_{13}	800.5>109.1	10	40
	800.5>174.2[a]	10	32
[a] 为定量离子对。			

4.5.4.3　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（4.5.3）和试样溶液（4.5.2）上机测定。标准溶液的定量离子对色谱图见附录C中C.1。

4.5.4.4　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中待测物（质量浓度相当）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

4.5.4.5　定量

以待测物基质匹配标准溶液质量浓度为横坐标，待测物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标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，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标准溶液质量浓度相差不超过30%。

4.6　试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数w_i表示，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：

$$w_i=\frac{\rho_i\times V\times V_2\times V_4}{V_1\times V_3\times m\times 1000} \quad \cdots\cdots（1）$$

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（ng/mL）；

V——试样提取溶液的体积，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）；

V_2——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_3——净化液定容后分取体积，单位为毫升（mL）；

V_4——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数。

$$w_i=\frac{A_i\times C_s\times V\times V_2\times V_4}{A_s\times V_1\times V_3\times m\times 1000} \quad \cdots\cdots（2）$$

式中：

A_i——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

C_s——标准溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每升（ng/mL）；

V——试样提取溶液的体积，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）；

V_2——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_3——净化液定容后分取体积，单位为毫升（mL）；

V_4——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s——标准溶液中待测物的峰面积；

m——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数。

试样中吉他霉素含量以吉他霉素A_1、吉他霉素A_4、吉他霉素A_5和吉他霉素A_{13}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——吉他霉素A_1的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_2——吉他霉素A_4的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_3——吉他霉素A_5的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_4——吉他霉素A_{13}的质量分数，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。

4.7 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%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的吉他霉素用乙腈提取，经固相萃取柱净化后，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，所有试剂均为分析纯。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。
5.2.2 乙腈：色谱纯。
5.2.3 甲醇：色谱纯。
5.2.4 乙酸铵：色谱纯。
5.2.5 磷酸：优级纯。
5.2.6 乙酸铵溶液（0.1 mol/L）：称取 7.7 g 乙酸铵（5.2.4），用 300 mL 水溶解，加水至 850 mL，用磷酸（5.2.5）调至 pH 值为 4.5，再用水定容至 1 L。
5.2.7 甲醇溶液（60%，体积分数）：量取 600 mL 甲醇（5.2.3）与 400 mL 水混合。
5.2.8 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取吉他霉素 A_1、吉他霉素 A_4、吉他霉素 A_5 和吉他霉素 A_{13} 标准物质（相关信息见附录 B）各 10 mg（精确至 0.01 mg），分别置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）溶解定容。－18℃以下保存，吉他霉素 A_{13} 标准储备溶液有效期 3 个月，吉他霉素 A_1、吉他霉素 A_4 和吉他霉素 A_5 标准储备溶液有效期 6 个月。
5.2.9 混合标准储备溶液（0.1 mg/mL）：分别准确移取标准储备溶液（5.2.8）各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）稀释定容，混匀。－18℃以下保存，有效期 2 个月。
5.2.10 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准储备溶液（5.2.9），用甲醇溶液（5.2.7）稀释配制成质量浓度分别为 0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL 和 100 μg/mL 混合标准系列溶液，混匀。临用现配。
5.2.11 增强型脂肪去除固相萃取柱：EMR-lipid 柱，300 mg/3 mL。
5.2.12 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
5.3.2 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
5.3.3 分析天平：精度为 0.01 mg 和 0.01g。
5.3.4 振荡器：转速不低于 300 r/min。
5.3.5 旋涡混合器。
5.3.6 固相萃取装置。
5.3.7 氮吹仪。

5.4 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。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

5.5.1.1 配合饲料和精料补充料

平行做两份试验。称取试样 5 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 20 mL 乙腈（5.2.2），涡旋 30 s，300 r/min 振荡提取 15 min，9 500 r/min 离心 3 min，上清液备用。

5.5.1.2 浓缩饲料和添加剂预混合饲料

平行做两份试验。称取试样2 g（精确至0.01 g）于50 mL塑料离心管中，准确加入10 mL乙腈（5.2.2），涡旋30 s，300 r/min振荡提取15 min，9 500 r/min离心3 min，上清液备用。

5.5.2 净化

准确移取5 mL备用液（5.5.1）过固相萃取柱（5.2.11），用3 mL甲醇（5.2.3）洗脱，收集洗脱液，45℃下氮气吹干，准确加入0.5 mL甲醇溶液（5.2.7）溶解残渣，涡旋混匀，微孔滤膜（5.2.12）过滤，待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：

a）色谱柱：C_{18}柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒度5 μm，或性能相当者；

b）柱温：35℃；

c）检测波长：238 nm；

d）进样量：20 μL；

e）流动相：乙酸铵溶液（5.2.5）+ 甲醇（5.2.2）= 40+60；

f）流速：1.0 mL/min。

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.2.10）和试样溶液（5.5.2）上机测定。标准溶液的高效液相色谱图见附录C中C.2。

5.5.3.3 定性

在相同试验条件下，试样溶液与标准系列溶液中待测物（质量浓度相当）的保留时间一致，其相对偏差在±2.5％之内。

5.5.3.4 定量

以待测物的质量浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出线性范围，应将试样溶液用甲醇溶液（5.2.7）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液的质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数w_i表示，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（4）计算；单点校准按公式（5）计算：

$$w_i=\frac{\rho_i\times V\times V_2\times 1000}{V_1\times m\times 1000}\quad\cdots\cdots(4)$$

式中：

ρ_i——由标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度，单位为毫克每升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的体积，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）；

V_2——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数。

$$w_i=\frac{A_i\times C_s\times V\times V_2\times V_4\times 1000}{A_s\times V_1\times m\times 1000}\times f\quad\cdots\cdots(5)$$

式中：

A_i——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

A_s——标准溶液中待测物的峰面积；

C_s——标准溶液中待测物的质量浓度，单位为毫克每升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的体积，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）；

V_2——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

f——稀释倍数；

1 000——换算系数。

试样中吉他霉素含量以吉他霉素A_1、A_4、A_5和A_{13}之和计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。按公式（6）计算：

$$w=w_1+w_2+w_3+w_4\quad\cdots\cdots(6)$$

式中：

w_1——吉他霉素A_1的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_2——吉他霉素A_4的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_3——吉他霉素A_5的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；

w_4——吉他霉素A_{13}的质量分数，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。

5.7 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
（规范性）
液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法的检出限、定量限

液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法的检出限和定量限见表A.1

表A.1 液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法的检出限和定量限

方法	被测物名称	检出限 mg/kg	定量限 mg/kg
液相色谱-串联质谱法	吉他霉素A_1	0.003	0.01
	吉他霉素A_4	0.003	0.01
	吉他霉素A_5	0.003	0.01
	吉他霉素A_{13}	0.003	0.01
高效液相色谱法	吉他霉素A_1	0.5	1
	吉他霉素A_4	0.5	1
	吉他霉素A_5	0.5	1
	吉他霉素A_{13}	1	2

附　录　B
（资料性）
4种吉他霉素中英文通用名称、化学分子式和CAS号

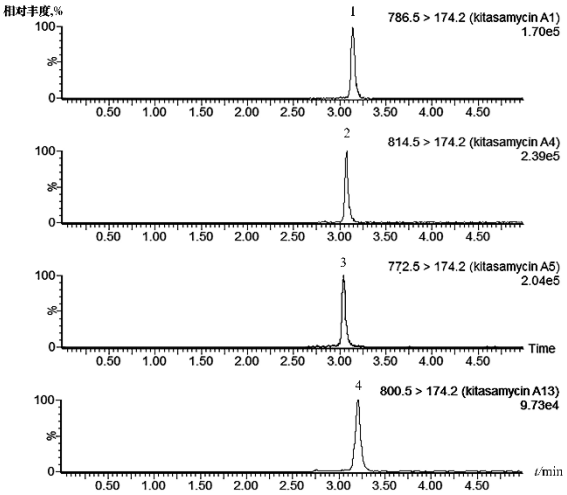
4种吉他霉素中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表B.1

表B.1 4种吉他霉素中英文通用名称、化学分子式和CAS号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS号	纯度
吉他霉素A_1	kitasamycin A_1	$C_{40}H_{67}NO_{14}$	16846-34-7	≥98%
吉他霉素A_4	kitasamycin A_4	$C_{41}H_{67}NO_{15}$	18361-46-1	≥98%
吉他霉素A_5	kitasamycin A_5	$C_{39}H_{65}NO_{14}$	18361-45-0	≥98%
吉他霉素A_{13}	kitasamycin A_{13}	$C_{41}H_{69}NO_{14}$	78897-52-6	≥98%

附　录　C
（资料性）
基质匹配混合标准溶液定量离子对色谱图和混合标准溶液高效液相色谱图

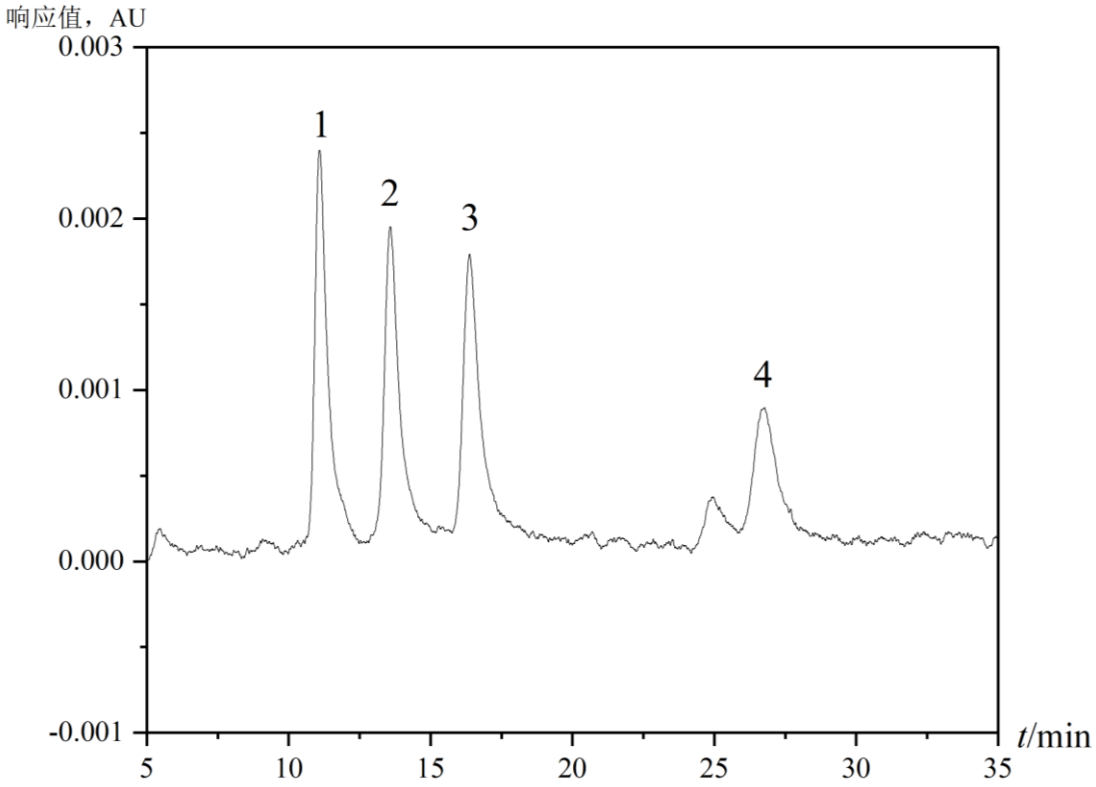
C.1 基质匹配混合标准溶液定量离子对色谱图见图C.1。



标引序号说明：
1—吉他霉素A_1；
2—吉他霉素A_4；
3—吉他霉素A_5；
4—吉他霉素A_{13}。

图 C.1 基质匹配混合标准溶液(0.05 ng/mL)定量离子对色谱图

C.2 混合标准溶液高效液相色谱图见图C.2。



标引序号说明：

1—吉他霉素A_5；

2—吉他霉素A_4；

3—吉他霉素A_1；

4—吉他霉素A_{13}。

图 C.2 混合标准溶液(2.5 μg/mL)高效液相色谱图