

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4842—2025

饲料中恩拉霉素的测定  
液相色谱-串联质谱法

Determination of enramycin in feeds—  
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2025-12-09 发布

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：河南省农畜水产品检验技术研究院、河南牧业经济学院。

本文件主要起草人：吴宁鹏、彭丽、李慧素、孟蕾、张盼盼、杨洁、李灵平、崔超、张晶晶、李华玮。



# 饲料中恩拉霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件描述了饲料中恩拉霉素的液相色谱-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、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中恩拉霉素（以恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 之和计）的测定。

本文件恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 的检出限均为 0.05 mg/kg，定量限均为 0.10 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

试样中待测物用盐酸甲醇溶液或甲酸甲醇溶液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，基质匹配外标法定量。

## 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 甲酸：色谱纯。

5.4 乙酸乙酯。

5.5 盐酸溶液（0.1 mol/L）：取盐酸 4.2 mL，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.6 盐酸甲醇溶液：移取甲醇 55 mL 与盐酸溶液（5.5）45 mL，混匀。

5.7 2%甲酸甲醇溶液：移取甲酸 2 mL，用甲醇稀释至 100 mL，混匀。

5.8 5%氨水溶液：移取氨水 5 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.9 甲醇氨水溶液：移取甲醇 20 mL 与 5%氨水（5.8）80 mL，混匀。

5.10 1%甲酸乙酸乙酯：移取甲酸 1 mL，用乙酸乙酯稀释至 100 mL，超声混匀。

5.11 盐酸甲醇溶液（0.1 mol/L）：移取盐酸 1 mL，用甲醇稀释至 120 mL，混匀。

5.12 0.1%甲酸溶液：移取甲酸（5.3）0.5 mL，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.13 复溶液：移取甲醇（5.2）80 mL 与 0.1%甲酸溶液（5.12）20 mL，混匀。

5.14 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取恩拉霉素 A（CAS：34438-27-2，纯度不低于 95%）和恩拉霉素 B（CAS：34304-21-7，纯度不低于 83%）标准品各适量（折算成有效成分 5 mg，精确至 0.01 mg）分别于 5 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2）溶解定容。-18℃以下保存，有效期 6 个月。

- 5.15 混合标准中间液 (100 $\mu$ g/mL): 准确吸取恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 标准储备溶液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (5.2) 定容, 混匀。-18 $^{\circ}$ C 以下保存, 有效期 6 个月。
- 5.16 混合标准系列溶液 I: 精密量取适量混合标准中间液 (5.15), 用复溶液 (5.13) 稀释, 配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的混合标准系列溶液 I。
- 5.17 混合标准系列溶液 II: 精密量取适量混合标准中间液 (5.15), 用 2% 甲酸甲醇 (5.7) 稀释, 配制成质量浓度分别为 40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、4 000 ng/mL 的混合标准系列溶液 II。
- 5.18 固相萃取柱 A: 填料为改性苯乙烯-二乙烯基苯聚合物, 200 mg/ 3 mL, 或性能相当者。
- 5.19 固相萃取柱 B: 填料为极性脲基改性苯乙烯-二乙烯基苯共聚物, 200 mg/ 6 mL, 或性能相当者。
- 5.20 微孔滤膜: 0.22  $\mu$ m, 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: 精度为 0.01 g 和 0.01 mg。
- 6.3 离心机: 转速不低于 10 000 r/min。
- 6.4 涡旋振荡器。
- 6.5 涡旋混合器。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 超声波清洗器。
- 6.8 氮吹仪。

## 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, 装入密闭容器中, 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

#### 8.1.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 准确加入盐酸甲醇溶液 (5.6) 20 mL, 涡旋混匀, 超声提取 30 min, 涡旋振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min。准确移取 1 mL 上清液, 加入盐酸溶液 (5.5) 10 mL, 涡旋混匀, 备用。

#### 8.1.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 准确加入 2% 甲酸甲醇溶液 (5.7) 20 mL, 涡旋混匀, 超声 30 min, 涡旋振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液备用。

### 8.2 净化

#### 8.2.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化固相萃取柱 A (5.18), 将全部备用液 (8.1.1) 过柱, 待溶液全部流出之后, 用甲醇氨水溶液 (5.9) 5 mL 淋洗, 抽干 1 min, 再用 1% 甲酸乙酸乙酯 (5.10) 5 mL 淋洗, 抽干 2 min。用盐酸甲醇溶液 (5.11) 6 mL 洗脱, 抽干 1 min, 洗脱液于 40 $^{\circ}$ C 下氮气吹干, 准确加入 1 mL 复溶液 (5.13), 超声 1 min, 涡旋混匀, 过微孔滤膜 (5.20) 后待测。

### 8.2.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

移取 2 mL 备用液 (8.1.2) 通过固相萃取柱 B (5.19), 收集流出液, 涡旋混匀, 过微孔滤膜 (5.20), 待测。

## 8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

### 8.3.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

取空白试样, 按 8.1 和 8.2 处理至氮气吹干, 准确移取混合标准系列溶液 I (5.16) 各 1 mL 溶解残余物, 配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液 I。

### 8.3.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

取空白试样, 按 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液, 准确移取混合标准系列工作液 II (5.17) 各 50  $\mu$ L, 加空白基质溶液稀释至 1 mL, 配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液 II。

## 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:

- 色谱柱: C<sub>18</sub>柱, 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 1.8  $\mu$ m, 或性能相当者;
- 柱温: 35  $^{\circ}$ C;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 进样量: 5  $\mu$ L;
- 流动相: A 相为 0.1% 甲酸溶液 (5.12), B 相为甲醇 (5.2), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0	90	10
1.5	50	50
3.3	30	70
3.5	5	95
4.4	5	95
4.5	90	10
6.0	90	10

### 8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式 (ESI<sup>+</sup>);
- 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- 喷雾电压: 3.0 kV;
- 离子源温度: 150  $^{\circ}$ C;
- 脱溶剂气温度: 500  $^{\circ}$ C;
- 锥孔气流速: 150 L/h;
- 脱溶剂气流速: 1 000 L/h;

多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量参考值见表 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

待测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
恩拉霉素 A	785.8>1 089.0 <sup>a</sup>	30	22
	785.8>95.1		30
恩拉霉素 B	790.7>1 089.1 <sup>a</sup>	30	22
	790.7>95.0		30

<sup>a</sup> 为定量离子。

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

41. 在仪器的最佳条件下, 分别取基质匹配标准系列溶液 (8.3) 和试样溶液 (8.2) 上机测定, 恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 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

在相同试验条件下, 试样溶液 (8.2) 与基质匹配标准溶液 (质量浓度相当) 中待测物的保留时间相对偏差应在±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质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液 (8.3) 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

以基质匹配标准系列溶液质量浓度为横坐标, 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 (8.2) 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 (8.2) 中待测物的质量浓度与基质匹配标准溶液的质量浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

9.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

试样中待测物的含量以质量分数  $w_{1i}$  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。

$$w_{1i} = \frac{\rho_{1i} \times V \times V_2}{m_1 \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $\rho_{1i}$  ——由标准曲线得到的试样溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 质量浓度的数值, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);
- $V$  ——提取溶液体积的数值, 单位为毫升 (mL);
- $V_2$  ——复溶液体积的数值, 单位为毫升 (mL);
- $V_1$  ——所用试样提取上清液体积的数值, 单位为毫升 (mL);
- $m_1$  ——试样质量的数值, 单位为克 (g);
- 1000 ——换算系数。

$$w_{1i} = \frac{A_{1i} \times \rho_{s1i} \times V \times V_2}{A_{s1i} \times m_1 \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $A_{1i}$  ——试样溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 的色谱峰面积；  
 $\rho_{s1i}$  ——标准溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 质量浓度的数值，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；  
 $A_{s1i}$  ——标准溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 的色谱峰面积；  
 1000 ——换算系数。

## 9.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

试样中待测物的含量以质量分数  $w_{2i}$  计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示。多点校准按公式 (3) 计算；单点校准，按公式 (4) 计算。

$$w_{2i} = \frac{\rho_{2i} \times V_3}{m_2 \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- $\rho_{2i}$  ——由标准曲线得到的试样溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 质量浓度的数值，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；  
 $V_3$  ——提取溶液体积的数值，单位为毫升 (mL)；  
 $m_2$  ——试样质量的数值，单位为克 (g)；  
 1000 ——换算系数。

$$w_{2i} = \frac{A_{2i} \times \rho_{s2i} \times V_3}{A_{s2i} \times m_2 \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- $A_{2i}$  ——试样溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 色谱峰面积；  
 $\rho_{s2i}$  ——标准溶液中恩拉霉素 A 或恩拉霉素 B 的质量浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；  
 $A_{s2i}$  ——标准溶液中恩拉霉素 A、恩拉霉素 B 的色谱峰面积；  
 1000 ——换算系数。

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。

## 9.3 恩拉霉素质量分数计算

试样中恩拉霉素的含量以质量分数计，按公式 (5) 计算。

$$w = w_3 + w_4 \dots\dots\dots (5)$$

式中：

- $w$  ——试样中恩拉霉素质量分数的数值，单位为毫克每千克 (mg/kg)；  
 $w_3$  ——试样中恩拉霉素 A 质量分数的数值，单位为毫克每千克 (mg/kg)；  
 $w_4$  ——试样中恩拉霉素 B 质量分数的数值，单位为毫克每千克 (mg/kg)。

## 10 精密度

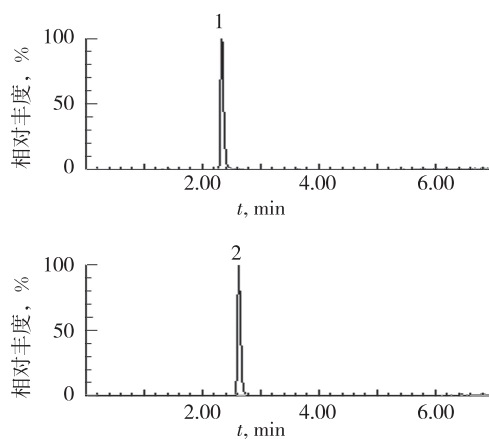
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附录 A

(资料性)

恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 基质匹配标准溶液定量离子色谱图

恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

1——恩拉霉素 A；

2——恩拉霉素 B。

图 A.1 恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 基质匹配标准溶液 (5 ng/mL) 的定量离子色谱图