

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3473—2019

饲料中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、 安赛蜜、糖精钠的测定 液相色谱- 串联质谱法

Determination of neotame, alitame, aspartame, sodium cyclamate,
acesulfame and sodium saccharin in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心。

本标准主要起草人:于家丰、田晓玲、郝立忠、陈玉艳、张天姝、杨慧杰、吕晓惠、李晶、纪源、孙玉飞。

饲料中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、 糖精钠的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料及精料补充料中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠的测定。

本标准方法纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜的检出限为 0.5 mg/kg, 定量限为 1.0 mg/kg; 糖精钠的检出限为 2.5 mg/kg, 定量限为 5.0 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样经提取后, 醋酸铅沉淀蛋白, 经 HLB 固相萃取小柱净化后, 供液相色谱-串联质谱仪测定, 基质匹配标准曲线, 外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定, 本方法仅用分析纯试剂。

- 4.1 水: GB/T 6682, 一级。
- 4.2 乙腈: 色谱纯。
- 4.3 饱和醋酸铅溶液: 在 100 mL 水中不断加入醋酸铅, 超声溶解, 直至固体不再溶解。
- 4.4 0.2% 甲酸溶液: 准确移取甲酸 1.0 mL, 加水定容至 500 mL, 混匀。
- 4.5 0.1% 甲酸溶液: 准确移取甲酸 1.0 mL, 加水定容至 1 000 mL, 混匀。
- 4.6 0.1% 甲酸乙腈溶液: 准确移取甲酸 1.0 mL, 加乙腈定容至 1 000 mL, 混匀。
- 4.7 纽甜(CAS 号: 165450-17-9)、阿力甜(CAS 号: 80863-62-3)、阿斯巴甜(CAS 号: 22839-47-0)、甜蜜素(CAS 号: 68476-78-8)、安赛蜜(CAS 号: 33665-90-6)、糖精钠(CAS 号: 128-44-9); 纯度均不少于 99.0%。
- 4.8 标准储备溶液(1 mg/mL): 准确称取对照品纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠各 50 mg(精确至 0.01 mg)分别置于 50 mL 容量瓶中, 用 0.2% 甲酸溶液(4.4)溶解定容。2℃~8℃保存, 有效期 6 个月。
- 4.9 标准中间溶液 I (10 mg/L): 移取纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜储备溶液(4.8)100 μL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 0.2% 甲酸溶液(4.4)定容, 摇匀。2℃~8℃冷藏保存, 有效期为 3 个月。
- 4.10 标准中间溶液 II (50 mg/L): 移取糖精钠储备溶液(4.8)500 μL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 0.2% 甲酸溶液(4.4)定容, 摇匀。2℃~8℃冷藏保存, 有效期为 3 个月。
- 4.11 HLB 固相萃取小柱: 3 mL/60 mg, 亲水亲脂平衡性的固相小柱或其他性能相当者。
- 4.12 滤膜: 0.22 μm, 水系。

5 仪器设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾电离源。
- 5.2 旋转蒸发仪。
- 5.3 氮吹仪。
- 5.4 离心机:转速不低于 7 000 r/min。
- 5.5 涡旋振荡器。
- 5.6 超声波清洗机。
- 5.7 天平:感量为 0.000 01 g 和感量为 0.001 g。

6 样品

按 GB/T 20195 制备试样,全部通过 0.42 mm 试验筛,混匀,装入密闭容器中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做两份试验。称取 2 g(精确到 0.001 g)试样于 50 mL 离心管中,准确加入 0.2%甲酸溶液(4.4) 19 mL 和饱和醋酸铅溶液(4.3)1 mL,充分振荡 15 min,超声提取 15 min,然后于 7 000 r/min 离心 10 min,上清液备用。

7.2 净化

固相萃取小柱依次用 3 mL 乙腈、3 mL 0.2%甲酸溶液(4.4)活化。准确吸取 3 mL 上清液(7.1)加到小柱上,用 3 mL 0.2%甲酸溶液(4.4)淋洗,减压抽干 2 min,用 6 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液,于 50℃下旋转蒸发或氮吹至干,准确加入 0.2%甲酸溶液(4.4) 3 mL 溶解,过 0.22 μm 滤膜后,上机测定。

7.3 基质匹配标准曲线系列溶液的制备

取基质相近的空白试样,按照 7.1 与 7.2 的规定制备空白基质溶液,用标准中间溶液 I 和标准中间溶液 II 适量,制备基质匹配标准系列。其中,糖精钠浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L;其他浓度均为 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒度 1.7 μm,或其他性能相当者。

柱温:40℃。

进样量:5 μL。

流速:0.3 mL/min。

流动相:A 为 0.1%甲酸溶液,B 为 0.1%甲酸的乙腈溶液,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度条件

时间, min	A, %	B, %
0	95	5
1.0	95	5
7.0	5	95
7.1	95	5
10	95	5

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:负离子模式。

监测方式:多反应监测(MRM)。

毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最佳灵敏度。

定性离子对、定量离子对及对应的保留时间和碰撞能量见表2。

表2 纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠的定性离子对、定量离子对及保留时间、碰撞电压的参考值

被测物名称	保留时间, min	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	碰撞能量, eV
阿斯巴甜	4.18	293.2>200.2	293.2>200.2	17
		293.2>261.2		10
安赛蜜	1.51	162.1>82.0	162.1>82.0	13
		162.1>77.9		20
甜蜜素	3.16	178.1>79.9	178.1>79.9	20
		178.1>96.0		10
糖精钠	2.48	182.1>42.0	182.1>42.0	23
		182.1>106.0		20
阿力甜	4.47	330.3>312.3	330.3>312.3	12
		330.3>167.2		20
纽甜	5.53	377.4>200.1	377.4>200.1	20
		377.4>345.4		10

7.4.3 定性

每种被测组分选择1个母离子、2个子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且待测各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较,若偏差不超过表3规定的范围,可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分率

相对离子丰度	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.4 定量

依次测定基质匹配标准曲线系列溶液(7.3)和试样溶液,得到色谱峰面积响应值,以基质匹配标准曲线系列溶液中被测组分峰面积为纵坐标、被测组分的浓度为横坐标,绘制工作曲线,曲线相关系数不小于0.99。试样溶液中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围内,当待测物浓度不在线性范围内时,基质匹配标准曲线与样品做相应倍数稀释,稀释倍数为 n 。上述条件下,纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠标准溶液的质量色谱图参见附录A。

8 试验数据处理

试样中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、糖精钠的含量以质量分数(w_i)计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,单点校准按式(1)计算,工作曲线校准按式(2)和式(3)计算。

$$w_i = \frac{A_i \times C_s \times V_1 \times V_2}{A_{s,i} \times m \times V_3} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_i —— 试样溶液中待测物的峰面积值;

$A_{s,i}$ —— 标准溶液中待测物的峰面积值;

C_s —— 标准溶液中待测物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V_1 —— 试样中加入试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

- V_2 ——上机前试样稀释溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——提取液加入固相萃取小柱的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- n ——试样稀释倍数。

工作曲线校准:由 $A_s = aC + b$,求得 a 和 b ,则 $C = \frac{A-b}{a}$ (2)

$$w_i = \frac{C \times V_1 \times V_2}{m \times V_3} \times n \text{ (3)}$$

式中:

- C ——试样中待测物的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V_1 ——试样中加入试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——上机前试样稀释溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——提取液加入固相萃取小柱的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- n ——试样稀释倍数。

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下,2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该平均值的 20%。



附录 A
(资料性附录)

安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、阿力甜、纽甜混合标准溶液的质量色谱图

安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、阿力甜、纽甜混合标准溶液的质量色谱图见图 A.1。

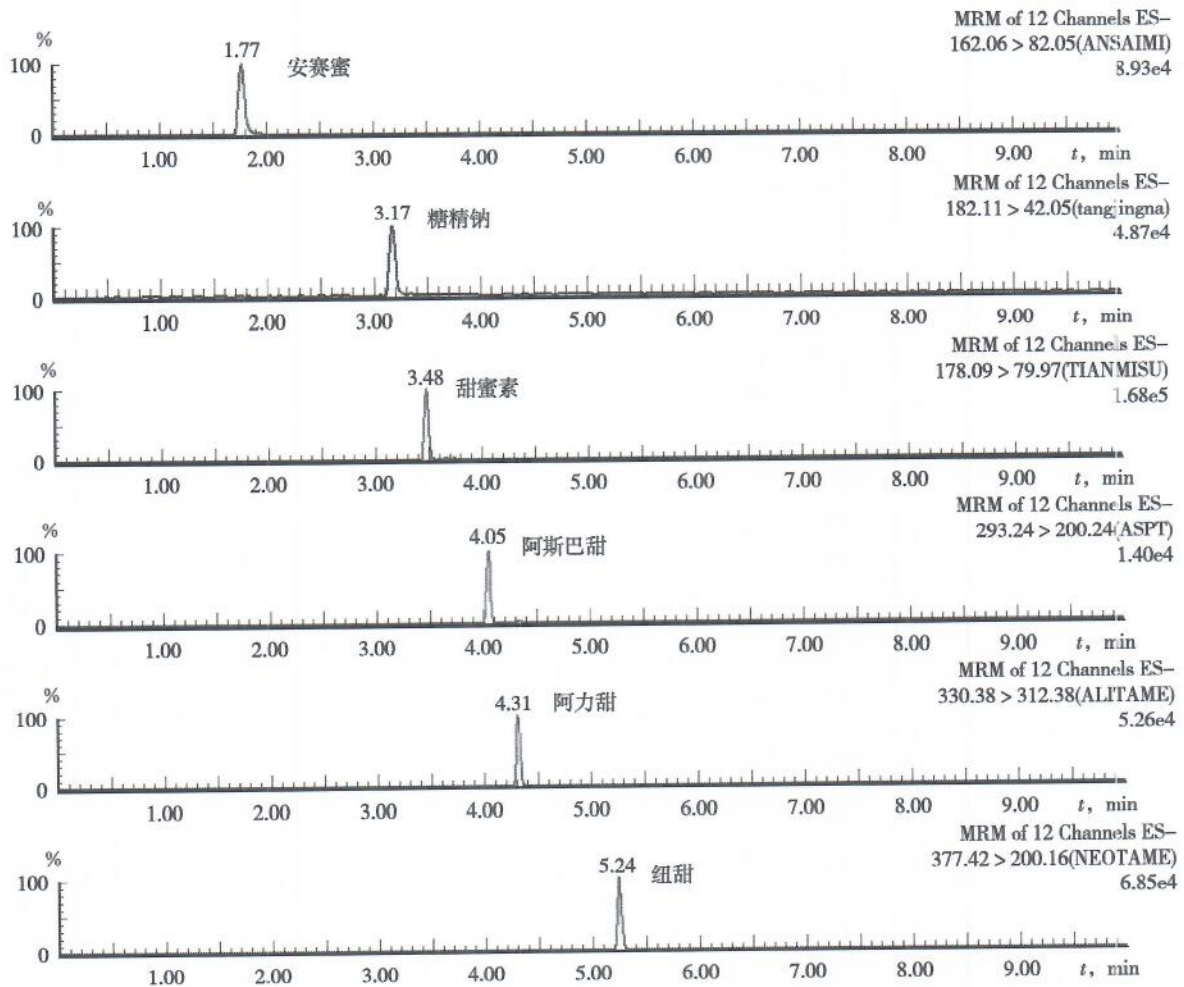


图 A.1 安赛蜜、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜、阿力甜、纽甜混合标准溶液的质量色谱图 (安赛蜜、甜蜜素、阿斯巴甜、阿力甜、纽甜浓度均为 0.1 mg/L, 糖精钠浓度为 0.5 mg/L)

中华人民共和国
农业行业标准
饲料中纽甜、阿力甜、阿斯巴甜、甜蜜素、安赛蜜、
糖精钠的测定 液相色谱-串联质谱法

NY/T 3473—2019

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

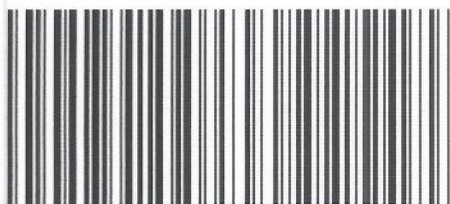
开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15千字

2019年10月第1版 2019年10月北京第1次印刷

书号: 16109·4838

定价: 18.00元

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261



NY/T 3473—2019