

中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—202×

饲料中泰乐菌素、泰万菌素、替米考星的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of tylosin, tylvalosin and tilmicosin in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：四川省饲料工作总站。

本文件主要起草人：

饲料中泰乐菌素、泰万菌素、替米考星的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中泰乐菌素、泰万菌素和替米考星的液相色谱-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泰乐菌素、泰万菌素和替米考星的测定。

本文件的检出限为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

试样中的待测物经乙腈溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，用液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

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 甲酸：色谱纯。

5.4 50%乙腈溶液：取500 mL乙腈，加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.5 0.1%甲酸溶液：取1 mL甲酸（5.3），加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.6 磷酸二氢钾溶液（0.1 mol/L）：称取磷酸二氢钾 13.61 g，加水溶解并稀释至1 000 mL，混匀。

5.7 5%氨化甲醇：取氨水 5 mL，加甲醇稀释至 100 mL，混匀。

5.8 标准贮备溶液（1 mg/mL）：称取泰乐菌素 A（CAS：1401-69-0，含量≥98.0%）、泰万菌素（CAS：63409-12-1，含量≥97.0%）、替米考星标准品（CAS：108050-54-0，含量≥94.0%）10 mg（精确至 0.01

mg)，用甲醇溶解，分别转移到 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，混匀。-18℃以下保存，有效期 3 个月。

注：如所用标准品为相应的盐，应折算成有效成份。

5.9 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：准确移取标准贮备溶液（5.8）各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释、定容，混匀。-18℃以下保存，有效期 3 个月。

5.10 内标贮备溶液（0.5 mg/mL）：称取替米考星-d₃（CAS：108050-54-0，含量≥98.0%）5 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，混匀。-18℃以下保存，有效期为 3 个月。

5.11 内标工作溶液（5 μg/mL）：准确移取 1 mL 内标贮备溶液（5.10）于 100 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，混匀。-18℃以下保存，有效期为 3 个月。

5.12 混合标准工作溶液：准确移取适量混合标准中间溶液（5.9）和内标工作液（5.11），于容量瓶中，用 5% 氯化甲醇（5.7）稀释定容，配制成浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL，内标浓度均为 5 ng/mL，混合标准系列溶液。临用现配。

5.13 固相萃取柱：混合型阳离子交换填料，60 mg/3 mL，或性能相当者。

5.14 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 电子天平：精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 旋涡混合器。

6.4 振荡器。

6.5 离心机：转速不低于 7 000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

7 样品

按 GB/T 20195 制备试样，取样品至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

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 0.1 mg）于 50 mL 离心管中，加入内标工作溶液（5.11）100 μL，加入 50% 乙腈溶液（5.4）10 mL，300 r/min 振荡提取 15 min，于 7 000 r/min 离心 5 min，移取上清液至另一 50 mL 离心管。残渣用 50% 乙腈溶液（5.4）10 mL 重复提取一次，合并两次上清液，混匀。准确移取混合上清液 1 mL，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（5.6）5 mL，混匀，备用。

8.2 净化

混合型阳离子交换固相萃取柱（5.13）依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（5.6）3 mL 活化。取全部备用液（8.1）过柱，流速小于 2 mL/min。依次用 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（5.6）和水各 3 mL 淋洗，抽干。准确移取 5% 氯化甲醇（5.7）5 mL 洗脱，收集洗脱液，混匀，用微孔滤膜（5.14）过滤，作为试样溶液，待测。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱, 柱长50 mm, 内径2.1 mm, 粒径1.8 μm, 或性能相当者;
 b) 柱温: 35 °C;
 c) 进样量: 5 μL;
 d) 流动相: A: 乙腈; B: 0.1%甲酸溶液, 梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0.0	0.3	10	90
4.0	0.3	90	10
4.1	0.3	100	0
6.0	0.3	100	0
6.1	0.3	10	90
8.0	0.3	10	90

8.3.2 质谱参考条件

- 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: 3.5 kV。
 d) 离子源温度: 350 °C。
 e) 干燥气流速: 7 L/min。
 f) 雾化气压力: 35 psi。
 g) 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 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
泰乐菌素 A	916.5 > 772.5	916.5 > 174.2	252	32
	916.5 > 174.2			40
泰万菌素	1042.5 > 814.4	1042.5 > 174.1	280	32
	1042.5 > 174.1			44
替米考星	869.5 > 696.3	869.5 > 174.2	232	42
	869.5 > 174.2			50
替米考星-d ₃	872.6 > 696.5	872.6 > 696.5	232	40

注: 待测物均用替米考星-d₃进行校正。

8.3.3 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下, 分别取混合标准工作溶液 (5.12) 和试样溶液 (8.2) 上机测定。泰乐菌素、泰万菌素、替米考星和替米考星-d₃的多反应监测 (MRM) 色谱图见附录A.1。

8.3.4 定性

在相同试验条件下，如果试样溶液与混合标准工作溶液（5.10）中待测物质保留时间的相对偏差在±2.5%之内，且根据表2选择的监测离子对，比较试样图谱中待测物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，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为试样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

相对离子丰度/ (%)	>50	20~50	10~20	≤10
最大允许偏差/ (%)	±20	±25	±30	±50

8.3.5 定量

按照8.3.1和8.3.2设定仪器条件，取试样溶液和混合标准工作溶液上机分析，以标准工作溶液浓度为横坐标，以待测物与内标的色谱峰面积（响应值）之比为纵坐标，绘制标准曲线，作单点或多点校准。试样溶液与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，应重新试验。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中泰乐菌素A、泰万菌素和替米考星的含量以质量分数 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：

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

式中：

- ρ_i ——由标准曲线查得试样溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——固相萃取时洗脱液的体积，单位为毫升（mL）；
- n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数。
- V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
- m ——试样的质量，单位为克（g）；

$$w_i = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V \times V_2}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times V_1 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (2)$$

式中：

- A_i ——试样溶液中待测物的峰面积；
- A'_{is} ——标准溶液中内标的峰面积；
- C_s ——标准溶液中待测物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- C'_{is} ——标准溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——固相萃取时洗脱液的体积，单位为毫升（mL）；
- n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数。
- A_{is} ——试样溶液中内标的峰面积；

A_S ——标准溶液中待测物的峰面积；

C_{IS} ——试样溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_I ——净化时所用试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

10 精密度

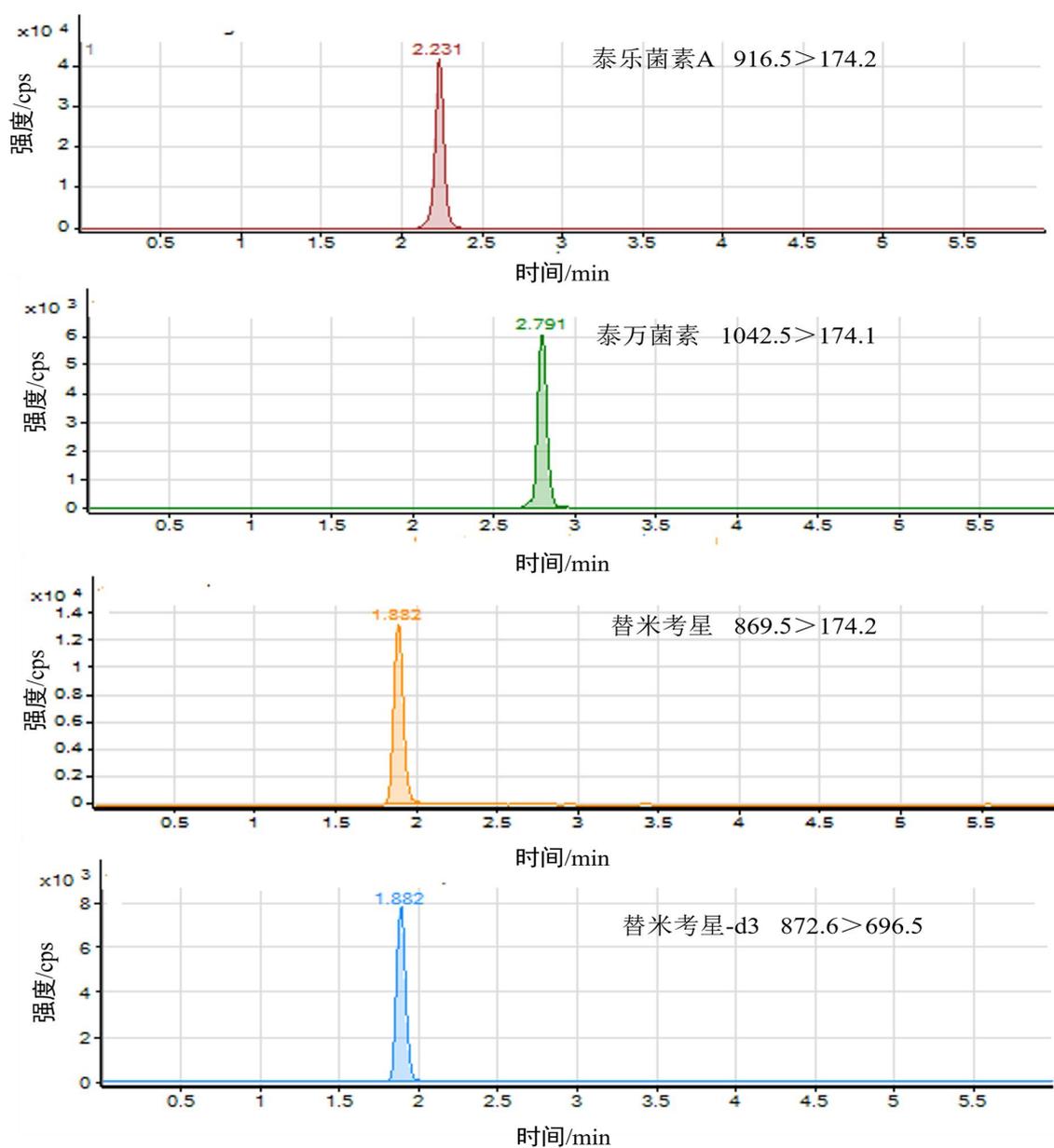
在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附录A

(资料性)

泰乐菌素A、泰万菌素、替米考星标准溶液定量离子色谱图

泰乐菌素A、泰万菌素、替米考星标准溶液（5 ng/mL）定量离子色谱图见图A.1。



图A.1 泰乐菌素A、泰万菌素、替米考星标准溶液（5 ng/mL）定量离子色谱图