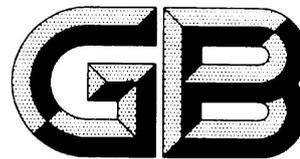


ICS 65.120

CCS B 46



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 22259-202×

代替GB/T 22259-2008

## 饲料中土霉素的测定

Determination of oxytetracycline in feeds

(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。

本文件代替 GB/T 22259—2008《饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法》，与 GB/T 22259—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 文件名称由《饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法》更改为《饲料中土霉素的测定》；
- b) 适用范围更改为“配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、水产饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂”，更改了检出限和定量限（见第1章，2008年版的第1章）；
- c) 更改了高效液相色谱法的原理（见4.1，2008年版的3）；
- d) 更改了高效液相色谱法的试剂或材料（见4.2，2008年版的4）；
- e) 更改了高效液相色谱法的仪器设备（见4.3，2008年版的5）；
- f) 更改了高效液相色谱法的试验步骤（见4.5，2008年版的7）；
- g) 更改了高效液相色谱法的计算公式（见4.6，2008年版的8）；
- h) 增加了液相色谱-串联质谱测定方法（见第5章）。

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：河南省农畜水产品检验技术研究院、陕西省畜牧技术推广总站。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008年首次发布为 GB/T 22259—2008；

——本次为第一次修订。

# 饲料中土霉素的测定

## 1 范围

本文件描述了饲料中土霉素的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、水产饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂中土霉素的测定。

本文件高效液相色谱法配合料、浓缩料和精补料的检出限为1 mg/kg、定量限为2 mg/kg，添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂的检出限为2 mg/kg、定量限为5 mg/kg，水产饲料的检出限为5.0 mg/kg，定量限为10.0 mg/kg；液相色谱-串联质谱法的检出限均为0.02 mg/kg、定量限均为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 高效液相色谱法（HPLC）

### 4.1 原理

配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用盐酸甲醇溶液提取样品中的土霉素并用水稀释，添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA缓冲液提取样品中的土霉素，高效液相色谱仪检测，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 甲醇：色谱纯。

4.2.3 盐酸甲醇溶液：移取 10 mL 盐酸于 1000 mL 甲醇中混匀。

4.2.4 50%甲醇溶液：移取 50 mL 甲醇，加水至 100 mL，混匀。

- 4.2.5 盐酸溶液（1 mol/L）：移取盐酸 9 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。
- 4.2.6 氢氧化钠溶液（10 mol/L）：称取氢氧化钠 40 g，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。
- 4.2.7 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液：分别称取一水柠檬酸 12.9 g，十二水磷酸氢二钠 27.6 g，二水乙二胺四乙酸二钠 37.2 g，加水 900 mL 溶解，用盐酸溶液（4.2.5）或氢氧化钠溶液（4.2.6）调 pH 至 4.0±0.5，加水稀释至 1000 mL，混匀，即得。
- 4.2.8 EDTA-CaCl<sub>2</sub>-乙酸盐缓冲液：取乙二胺四乙酸二钠（C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O）9.3 g，加水 500 mL，溶解，加氢氧化钠 4.0 g，溶解，冷至室温，再依次加无水氯化钙 5.5 g，乙酸 5.7 mL，混匀，加水至 1 000 mL，用氢氧化钠溶液（4.2.6）调 pH 至 6.6±0.1。
- 4.2.9 标准储备液（1 mg/mL）：准确称取土霉素对照品（CAS：79-57-2，纯度不低于 88%）适量，相当于土霉素 10 mg，于 10 mL 容量瓶中，加甲醇（4.2.2）溶解并定容，混匀。-20℃以下保存，有效期为 1 个月。
- 4.2.10 标准中间工作液（100 μg/mL）：准确移取标准储备液（4.2.9）1 mL，置 10 mL 容量瓶中，加甲醇稀释并定容，配制成浓度为 100 μg/mL 的土霉素标准中间液。-20℃以下保存，有效期为 1 周。
- 4.2.11 标准系列溶液：准确移取土霉素标准中间工作液（4.2.10）适量，配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用 50% 甲醇溶液（4.2.4），添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）稀释，制得浓度为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL 和 10 μg/mL 的标准系列溶液
- 4.2.12 尼龙微孔滤膜：0.45 μm。

### 4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器。
- 4.3.2 天平：感量 0.01g 和 0.01 mg。
- 4.3.4 离心机：转速≥10 000 r/min。
- 4.3.5 涡旋混合器。
- 4.3.6 旋涡振荡器。
- 4.3.7 超声波清洗器。
- 4.3.8 酸度计。

### 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，装入密闭容器中，备用。

### 4.5 试验步骤

#### 4.5.1 提取

##### 4.5.1.1 配合饲料、浓缩饲料及精料补充料

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入盐酸甲醇溶液（4.2.3）25 mL，涡旋混合后振荡 10 min，10 000 r/min 离心 5 min，移取上清液 0.5 mL，加入 0.5 mL 水（4.2.1），涡旋混匀，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液过微孔滤膜（4.2.12），供 HPLC 测定。

#### 4.5.1.2 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，置于 50 mL 离心管中，加入 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）20 mL，涡旋混合后振荡 10 min，超声提取 10 min，10 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至另一离心管中。残渣分别用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）20 mL、10 mL 重复提取两次，合并三次上清液，用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）定容至 50 mL，混匀备用。取备用液过微孔滤膜（4.2.12），供 HPLC 测定。

#### 4.5.2 测定

##### 4.5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；
- b) 柱温：30 ℃；
- c) 检测波长：激发波长 390nm，发射波长 512nm；
- d) 流速：1.0 mL/min；
- e) 进样量：20 μL；
- f) 流动相：A 相：EDTA-CaCl<sub>2</sub>-乙酸盐缓冲液，B 相：甲醇，梯度洗脱，见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间(min)	A 相(%)	B 相(%)
0	75	25
20	30	70
24	30	70
28	75	25
30	75	25

##### 4.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（4.2.11）和试样溶液（4.5.1）上机测定。在上述色谱条件下，土霉素标准溶液色谱图见附录 A。

##### 4.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中土霉素保留时间应与标准工作溶液（浓度相当）中土霉素的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

##### 4.5.3.4 定量

以土霉素的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其线性相关系数应不低于 0.99。试样溶液（4.5.1）中土霉素的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，配合饲料、浓缩饲料及精料补充料试样溶液用 50% 甲醇（4.2.4），添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂试样溶液用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）稀释（n 倍）后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液（4.5.1）中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

#### 4.6 试验数据处理

试样中土霉素的含量以质量分数  $w$  计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按式（1）计算；单点校准按式（2）计算：

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

式中：

$\rho$ ——从标准曲线查得的试样溶液土霉素的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——用于稀释/进样的提取液体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——最终上机溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）；

$n$ ——稀释倍数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A$ ——试样溶液中土霉素的峰面积；

$A_s$ ——标准溶液中土霉素的峰面积；

$\rho$ ——土霉素标准溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——用于稀释/进样的提取液体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——最终上机溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）；

$n$ ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留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 10%。

### 5 液相色谱-串联质谱法

#### 5.1 原理

配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用盐酸甲醇溶液提取样品中的土霉素并用水稀释；添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用McIlvaine- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 缓冲液提取样品中的土霉素，HLB固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准曲线校正，外标法定量。

#### 5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

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 10%甲醇溶液：取甲醇 10 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 5.2.5 20%甲醇溶液：取甲醇 20 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 5.2.6 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水溶解并稀释至 1000 mL。
- 5.2.7 标准工作液（10 μg/mL）：准确吸取标准储备液（4.2.9）1.0 mL，置 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容，配制成浓度为 10 μg/mL 的土霉素标准工作液。0~4℃ 保存，现配现用。
- 5.2.8 标准系列溶液 I：精密量取适量标准工作液（5.2.7），用甲醇稀释，制得浓度分别为 20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、1000 ng/mL 和 2000 ng/mL 的标准系列溶液。
- 5.2.9 标准系列溶液 II：精密量取适量标准工作液（5.2.7），用 20%甲醇（5.2.5）稀释，制得浓度分别为 1ng/mL、2ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准系列溶液。
- 5.2.10 亲水亲脂平衡固相萃取柱（HLB）：60 mg/3 mL，或性能相当者。
- 5.2.11 尼龙微孔滤膜：0.22 μm。

### 5.3 仪器设备

- 5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。
- 5.3.2 电子天平：感量 0.01 g 和 0.01 mg。
- 5.3.3 涡旋混合器。
- 5.3.4 涡旋振荡器。
- 5.3.5 超声波清洗器。
- 5.3.6 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
- 5.3.7 固相萃取装置。
- 5.3.8 氮吹仪。

### 5.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，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。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。

### 5.5 试验步骤

#### 5.5.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

提取步骤同 4.5.1.1，移取提取液 0.2 mL，加入 0.8 mL 水，涡旋混匀，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液过微孔滤膜（5.2.11），供液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 5.5.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

##### 5.5.2.1 提取

同 4.5.1.2。

##### 5.5.2.2 净化

HLB 固相萃取柱（5.2.10）依次用甲醇、水、McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液（4.2.7）各 3 mL 活化，准确移取备用液 1 mL 过柱，水 3 mL、10%甲醇溶液（5.2.4）3 mL 依次淋洗，抽干。用甲醇 3 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40℃下氮气吹干。准确加入 20%甲醇溶液（5.2.5）1 mL 溶解残余物，混匀后过微孔滤膜过滤（5.2.11），供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 5.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

#### 5.5.3.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

取空白试样，按5.5.1处理得到空白基质溶液，准确移取标准系列工作液 I（5.2.8）各50 μL，加空白基质溶液均稀释至1mL，制得浓度分别为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL的基质匹配标准系列溶液。

#### 5.5.3.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

取空白试样，按5.5.2处理至氮气吹干，准确移取系列标准溶液 II（5.2.9）各1mL溶解残余物，制得浓度分别为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL的基质匹配标准系列溶液。

### 5.5.4 测定

#### 5.5.4.1 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> 色谱柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者；
- 柱温：35 ℃；
- 进样量：2 μL；
- 流速：0.3 mL/min；
- 流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液（5.2.7），梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

时间(min)	A 相(%)	B 相(%)
0	10	90
1.0	10	90
3.0	40	60
4.0	40	60
4.1	10	90
5.5	10	90

#### 5.5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子扫描（ESI<sup>+</sup>）；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 毛细管电压：1.0 kV；
- 离子源温度：150 ℃；

- f) 雾化温度：500 ℃；  
 g) 锥孔气流速：50 L/h；  
 h) 雾化气流速：1000 L/h；  
 i) 多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 3。

表 3 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
土霉素	461.2 >426.1 <sup>a</sup>	38	18
	461.2 >337.0		26
a 为定量离子。			

#### 5.5.4.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取土霉素基质匹配标准系列溶液（5.5.3）和试样溶液（5.5.1 或 5.5.2）上机测定。土霉素标准溶液定量离子色谱图见附录 B。

#### 5.5.3.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液（5.5.1 或 5.5.2）与基质匹配标准系列溶液（5.5.3）中土霉素的保留时间的相对偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的土霉素定性离子对，比较试样图谱中土霉素定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 4 规定的范围，则可判定为试样中存在土霉素。

表 4 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

#### 5.5.3.5 定量

以土霉素的基质匹配标准溶液浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的线性相关系数不低于 0.99。试样溶液（5.5.1 或 5.5.2）与基质匹配标准溶液中土霉素的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样溶液用 20% 甲醇（5.2.5）稀释（ $n$  倍）后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中土霉素的浓度与基质匹配标准溶液浓度相差不超过 30%。

### 5.6 试验数据处理

试样中土霉素的含量以质量分数  $w$  计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按式（3）计算；单点校准按式（4）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$\rho$ ——由基质匹配标准曲线查得的试样溶液中土霉素的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

- $V$ ——提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；  
 $V_1$ ——用于稀释/净化的提取液体积，单位为毫升（mL）；  
 $V_2$ ——最终上机溶液的体积，单位为毫升（mL）；  
 $m$ ——试样的质量，单位为克（g）；  
 $n$ ——稀释倍数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- $A$ ——试样溶液中土霉素的色谱峰面积；  
 $A_s$ ——基质匹配标准溶液中土霉素的色谱峰面积；  
 $\rho_s$ ——标准溶液中土霉素的浓度，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）；  
 $V_1$ ——用于稀释/净化的提取液体积，单位为毫升（mL）；  
 $V_2$ ——最终上机溶液的体积，单位为毫升（mL）；  
 $m$ ——试样的质量，单位为克（g）；  
 $n$ ——稀释倍数。

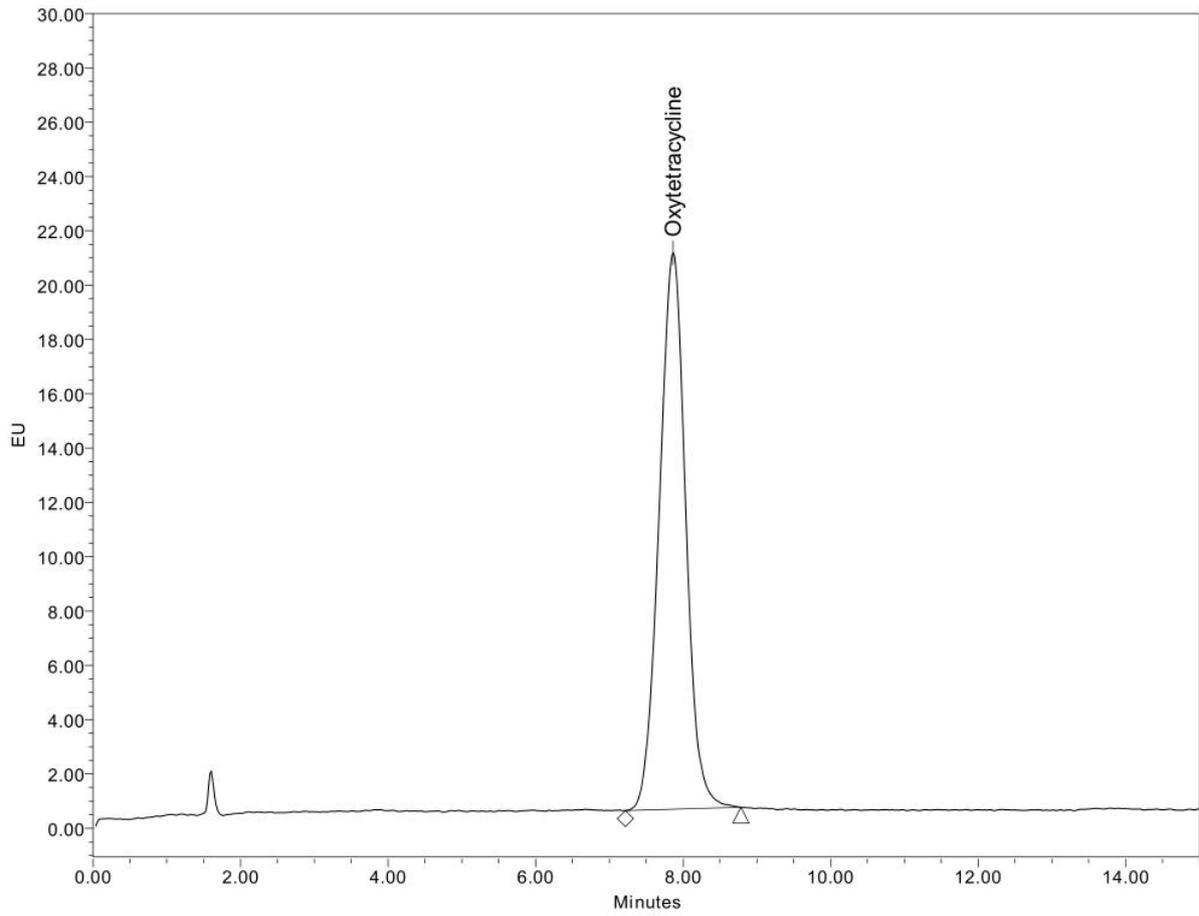
平行测定结果用算术平均值表示，结果保留3位有效数字。

## 5.7 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)  
土霉素标准溶液高效液相色谱图

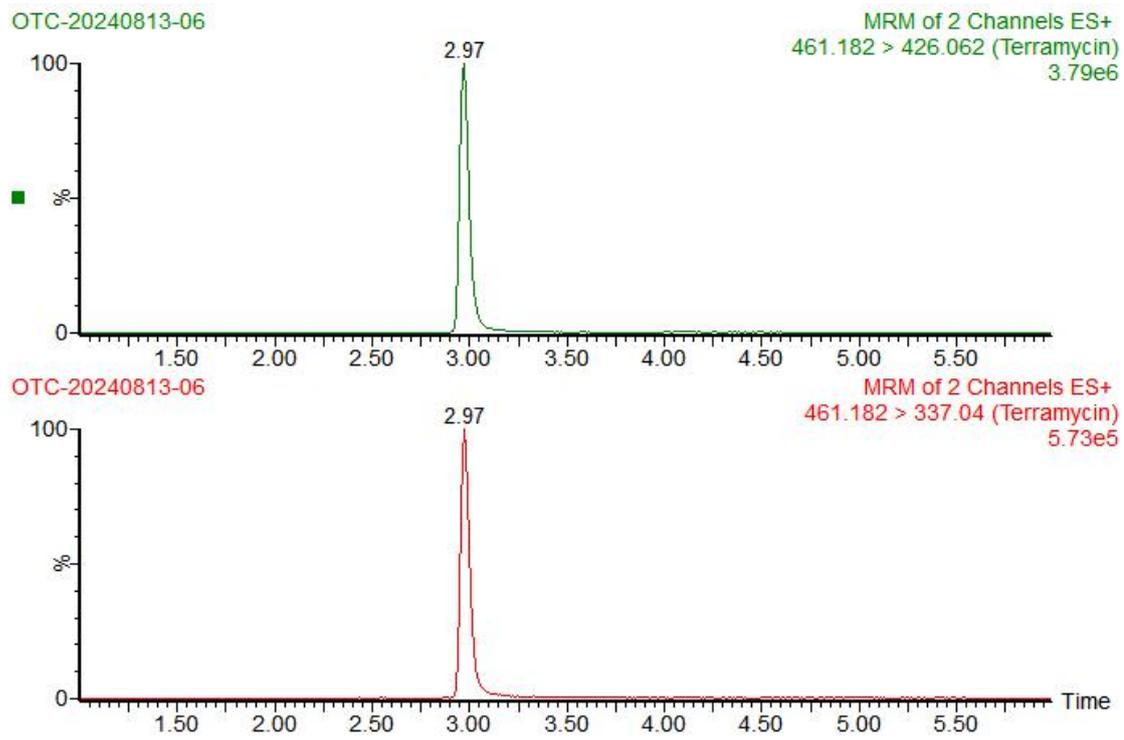
土霉素标准溶液高效液相色谱图见图A.1。



图A.1 土霉素标准溶液 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) 高效液相色谱图

附录 B  
(资料性)  
土霉素标准溶液定量离子色谱图

土霉素标准溶液定量离子色谱图见图B.1。



图B.1 土霉素标准溶液 (10 ng/mL) 定量离子色谱图