

ICS 65.120

CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××-××××

饲料中泰万菌素的测定

Determination of tylvalosin in feeds

(送审稿)

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：河南省农畜水产品检验研究院、河南牧业经济学院。

本文件主要起草人：吴宁鹏，张盼盼

饲料中泰万菌素的测定

1 范围

本文件描述了饲料中泰万菌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、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中泰万菌素的测定。

本文件高效液相色谱法中配合饲料、浓缩饲料和精料补充料的检出限为1.0 mg/kg，定量限为2.0 mg/kg，添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂的检出限为2.0 mg/kg，定量限为5.0 mg/kg；液相色谱-串联质谱法的检出限为0.01mg/kg，定量限为0.02mg/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

4.1 原理

试样中的泰万菌素用乙腈溶液提取，磺酸型阳离子交换柱净化，高效液相色谱仪测定，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 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液：称取磷酸二氢钾 13.61g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

4.2.5 5%氨水乙腈溶液：移取氨水 5 mL，加乙腈稀释至 100 mL，混匀。

4.2.6 0.15 mol/L 乙酸铵-乙酸溶液 (8:1)：称取乙酸铵 10.41 g，加 800 mL 水溶解，加入乙酸 100 mL，混匀。

4.2.7 复溶液：乙腈+0.15mol/L 乙酸铵-乙酸溶液 (4.2.6) = 52 + 48，混匀。

4.2.8 泰万菌素标准储备溶液 (5 mg/mL)：准确称取泰万菌素对照品 (CAS: 63409-12-1，纯度不低于 97%) 50 mg (精确至 0.01 mg) 于 10 mL 容量瓶中，加乙腈 (4.2.2) 溶解并定容。-18℃ 以下保存，有效期 8 个月。

4.2.9 泰万菌素标准中间工作溶液 (100 µg/mL)：准确移取泰万菌素标准储备溶液 (4.2.8) 2 mL 于 100 mL 容量瓶中，加乙腈 (4.2.2) 稀释并定容，混匀。0℃~4℃ 保存，有效期 3 个月。

4.2.10 泰万菌素标准工作溶液：准确移取适量标准中间工作溶液 (4.2.9) 于 10 mL 容量瓶中，用复溶液 (4.2.7) 稀释配制成浓度分别为 1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、50 µg/mL 和 100 µg/mL 的标准系列溶液。临用现配。

4.2.11 磺酸型阳离子交换固相萃取柱：200 mg/6 mL，或性能相当者。

4.2.12 微孔滤膜：0.22 µm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.2 电子天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。

4.3.3 涡旋混合器。

4.3.4 涡旋振荡器。

4.3.5 超声波清洗器。

4.3.6 离心机：转速不低于 10000 r/min。

4.3.7 固相萃取装置。

4.3.8 氮吹仪。

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 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 5 g (添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂称 2 g)，精确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，加入乙腈 20 mL，涡旋混匀，超声提取 10 min，振荡提取 20 min，于 10 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至另一 50 mL 离心管。残渣用乙腈 20 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 2 mL~10 mL，40℃氮吹至约 1 mL，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（4.2.4）5 mL，混匀，备用。

4.5.2 净化

磺酸型阳离子交换固相萃取柱（4.2.11）依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（4.2.4）各 5 mL 活化。取全部备用液（4.5.1）过柱，依次用水、0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（4.2.4）和甲醇各 5 mL 淋洗，抽干。用 5%氨水乙腈溶液（4.2.5）5 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40℃氮吹至干。准确移取复溶液（4.2.7）1 mL 溶解残余物，涡旋混匀，超声 1 min，用 0.22 μm 滤膜（4.2.12）过滤，待测。

4.5.3 测定

4.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；
- b) 柱温：35 ℃；
- c) 检测波长：280 nm；
- d) 流速：1.0 mL/min；
- e) 进样量：20 μL；
- f) 流动相：乙腈+ 0.15 mol/L 乙酸铵-乙酸溶液（4.2.6）= 52 + 48。

4.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（4.2.10）和试样溶液（4.5.2）上机测定。在上述色谱条件下，泰万菌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，试样溶液中泰万菌素保留时间应与标准工作溶液（浓度相当）中泰万菌素的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.4 定量

以泰万菌素的浓度为横坐标，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（4.5.2）中泰万菌素的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液（4.5.2）用流动相稀释（*n*倍）后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液（4.5.2）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

试样中泰万菌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:

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液泰万菌素的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

V ——提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 ——氮吹至干后溶解残渣所用复溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_1 ——净化时所用的试样提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

m ——试样的质量, 单位为克 (g);

n ——稀释倍数。

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

式中:

A ——试样溶液中泰万菌素的峰面积;

A_s ——标准溶液中泰万菌素的峰面积;

ρ_s ——泰万菌素标准溶液浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_1 ——净化时所用的试样提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 ——氮气吹干后所用复溶液的体积, 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

试样中的泰万菌素用乙腈溶液提取, 磺酸型阳离子交换柱净化, 液相色谱-串联质谱仪检测, 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 甲酸：色谱纯。

5.2.5 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液：称取磷酸二氢钾 13.61 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.6 5%氨水乙腈溶液：移取氨水 5 mL，加乙腈稀释至 100 mL，混匀。

5.2.7 0.1%甲酸水溶液：取甲酸（5.2.4）1 mL 加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.8 复溶液：乙腈（5.2.2）+ 0.1%甲酸水溶液（5.2.7）= 20 + 80，混匀。

5.2.9 泰万菌素标准储备液（5 mg/mL）：准确称取泰万菌素对照品（CAS：63409-12-1，纯度不低于 97%）50 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，加乙腈（5.2.2）溶解并定容。-18℃以下保存，有效期为 8 个月。

5.2.10 泰万菌素标准中间工作溶液（100 μg/mL）：准确移取泰万菌素标准储备溶液（5.2.9）2 mL 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）稀释并定容，混匀。0℃~4℃保存，有效期为 3 个月。

5.2.11 泰万菌素标准工作溶液：准确移取适量标准中间工作溶液（5.2.10）于 10 mL 容量瓶中，用复溶液（5.2.8）稀释，配制成浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 和 20 ng/mL 的标准系列溶液。临用现配。

5.2.12 磺酸型阳离子交换固相萃取柱：200 mg/6 mL，或性能相当者。

5.2.13 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

5.3.2 电子天平：精度 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 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

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，准确加入乙腈 20 mL，涡旋混匀，超声提取 10 min，振荡提取 20 min，于 10 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至另一 50 mL 离心管。残渣用乙腈 20 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（5.2.5）5 mL，混匀，备用。

5.5.2 净化

磺酸型阳离子交换固相萃取柱（5.2.12）依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（5.2.5）各 5 mL 活化。取全部备用液（5.5.1）过柱，依次用水、0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（5.2.5）和甲醇各 5 mL 淋洗，抽干。用 5%氨水乙腈溶液（5.2.6）5 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40 °C 氮吹至干。准确移取 1 mL 复溶液（5.2.8）溶解残余物，涡旋混匀，超声 1 min，用 0.22 μm 滤膜（5.2.13）过滤，待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者；
- b) 柱温：35 °C；
- c) 进样量：5 μL；
- d) 流速：0.3 mL/min；
- e) 流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液（5.2.7），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间min	A%	B%
0.0	20	80
0.5	20	80
4.0	80	20
5.5	80	20
7.0	20	80

5.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描（ESI⁺）；
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）；

- d) 毛细管电压：3.2 kV；
- e) 离子源温度：150 ℃；
- f) 脱溶剂气温度：200 ℃；
- g) 脱溶剂气流速：550 L/h；
- h) 锥孔气流速：150 L/h；
- i) 多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 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

被测物名称	监测离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
泰万菌素	1042.5 > 109.19 ^a	38	46
	1042.5 > 174.19		38
a 为定量离子。			

5.5.3.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取泰万菌素标准系列溶液（5.2.11）和试样溶液（5.5.2）上机测定。泰万菌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（5.5.2）与标准系列溶液（5.2.11）中泰万菌素的保留时间的相对偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的泰万菌素定性离子对，比较试样图谱中泰万菌素定性离子的相对离子丰度与浓度接近的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 3 规定的范围，则可判定为试样中存在泰万菌素。

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

5.5.3.5 定量

以泰万菌素的浓度为横坐标，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（5.5.2）与标准溶液中泰万菌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，应将试样溶液用复溶液（5.2.8）稀释（ n 倍）后重新测定。单点校准定量时，试样溶液（5.5.2）中泰万菌素的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中泰万菌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：

ρ ——由标准曲线查得的试样溶液中泰万菌素的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

V ——提取溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——氮气吹干后所用复溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

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)；

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 ——试样溶液中泰万菌素的色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中泰万菌素的色谱峰面积；

ρ_s ——标准溶液中泰万菌素的浓度，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 ——净化时所用试样溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——氮气吹干后所用复溶液的体积，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

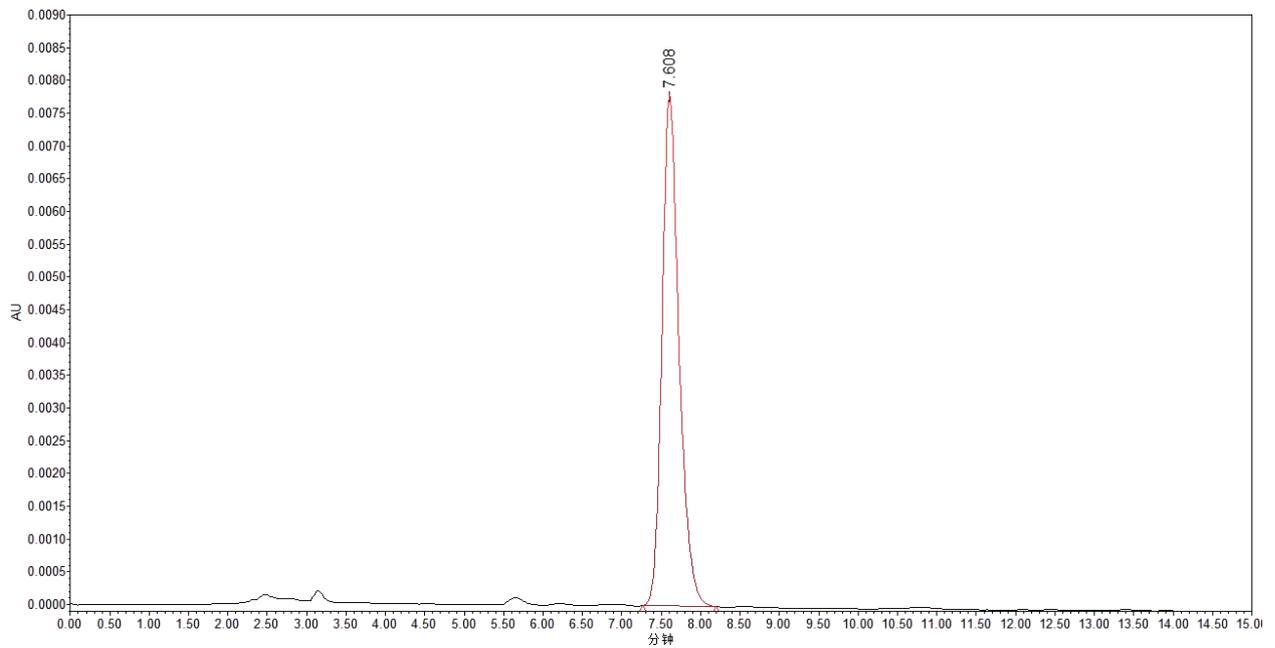
在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附录A

(资料性)

泰万菌素标准溶液高效液相色谱图

泰万菌素标准溶液高效液相色谱图见图A。

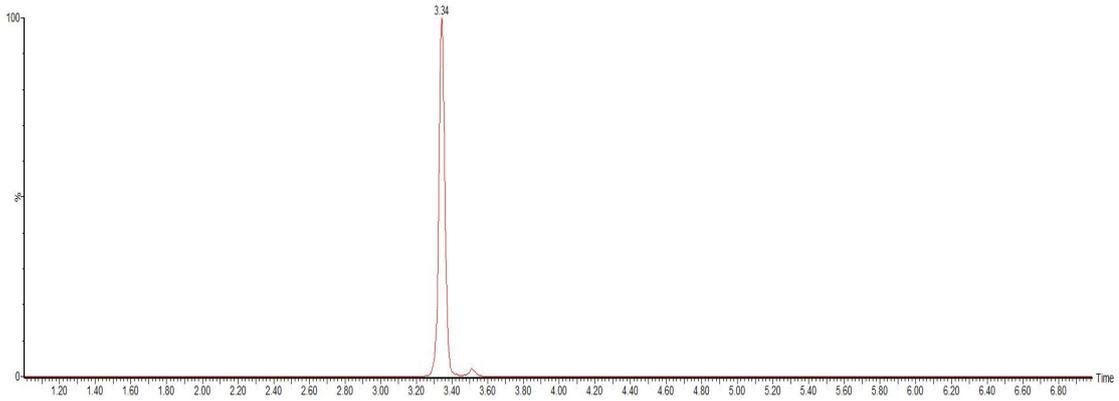


图A 泰万菌素标准溶液高效液相色谱图 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

附录 B
(资料性)

泰万菌素标准溶液定量离子色谱图

泰万菌素标准溶液定量离子色谱图见图B。



图B 泰万菌素标准溶液定量离子色谱图 (1 ng/mL)