

《饲料中泰万菌素的测定》编制说明（送审稿）

一、工作简况

1.1 任务来源

2020年河南省兽药饲料监察所与河南牧业经济学院合作承担了农业农村部农产品质量安全监管司下达的农业行业标准制修订任务，任务名称为“饲料中泰万菌素的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法”，政府购买服务合同编号为14202123，本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。因此，我们在参考国内相关检测方法基础上结合实验结果起草本标准。

1.2 制订背景

泰万菌素（Tylvalosin），即乙酰异戊酰泰乐菌素，是新一代的大环内酯类抗生素，该药的CAS号为63409-12-1，分子式为 $C_{53}H_{87}NO_{19}$ ，分子量1042.25，泰万菌素的结构式见图1。该药的常见形态多为酒石酸盐，即酒石酸泰万菌素（Tylvalosin Tartrate）。该产品以泰乐菌素为原料，经过多步反应获得，在2007年之前曾用名是酒石酸乙酰异戊酰泰乐菌素（Acetylisovaleryl tylosin Tartrate）。酒石酸泰万菌素是一种畜禽专用的抗生素，其能抑制细菌蛋白质的合成，从而抑制细菌的繁殖。泰万菌素的抗菌谱与泰乐菌素的相似，对支原体、螺旋体、大部分革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌有较强的抗菌活性，对支原体的抗菌活性尤其强大。泰万菌素具有高效、低毒、低残留、不会产生大环内酯类药物间的耐药性等优点，克服了其他大环内酯类药物的不足，在兽医临床上应用比较广泛。

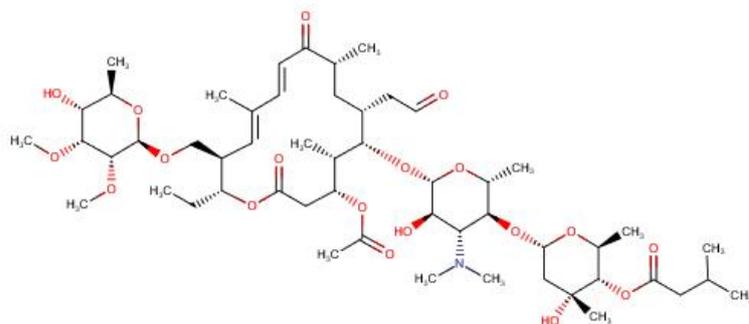


图1.泰万菌素的结构式

泰万菌素最早由英国伊科动物保健有限公司开发，现已在多个国家获得注册批准和销售。目前，酒石酸泰万菌素作为抗生素类药收载于《兽药质量标准（2017年版 化学药品卷）》，批准有酒石酸泰万菌素可溶性粉和酒石酸泰万菌素预混剂两种剂型，主要用于猪、鸡的支原体感染。《兽药质量标准》中规定酒石酸泰万菌素预混剂的用药剂量为：以泰万菌素计，混饲，每1000kg饲料，猪添加50~75g，鸡添加100~300g，连用7日，蛋鸡产蛋期禁用，休药期为猪3日，鸡5日。为维护我国动物源性食品安全和公共卫生安全，2019年，农业农村部发布第194号公告，规定“自2020年1月1日起，退出（除中药外）所有促生长类药物饲料添加剂品种”，并废止原农业部公告第168号和第220号。2020年，农业农村部相继颁布第246号和第307号公告，进一步明确禁止使用药物饲料添加剂。保证畜禽饲料的安全，才能从源头保证畜产品的安全，因此，有必要建立饲料中泰万菌素的检测方法，用于监控饲料质量安全。

目前，泰万菌素仅作兽用治疗用药，但在利益驱动下，泰万菌素被用于商品饲料的现象屡见不鲜，而泰万菌素用于产蛋期鸡饲料和肥育猪饲料中而没有休药期，可能会造成鸡蛋和肉等动物产品中的药物残留，危害食品安全。《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650-2019）规定了禽蛋中泰万菌素的最大残留限量（MRL）为200 μ g/kg，家禽、猪的其他组织中泰万菌素和3-O-乙酰泰乐菌素的总和的MRL为50 μ g/kg。

目前，泰万菌素的检测方法多为效价法、高效液相色谱法（HPLC）和液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）等，且多为兽药、动物性产品中的检测方法。随着分析技术的发展，HPLC法、LC-MS/MS方法已逐渐在饲料和畜产品检测中成为主流，成为完善检测标准体系的主要方法。通过查阅资料，有关泰万菌素的测定，我国仅有《动物源食品中泰万菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》（DB37/T 3234-2018）一项标准。目前，国内尚未见泰万菌素在饲料中的检测方法标准。因此，有必要建立我国饲料产品中泰万菌素的检测方法，以便对其规范使用进行必要的监控，从源头上保证食品安全。

因此，我们依据2017版《兽药质量标准（化学药品卷）》规定并参考国内外相关检测方法，结合试验结果起草本标准。本标准在查阅相关文献的基础上，采用高效液相色谱法建立饲料中泰万菌素的检测方法和高效液相色谱-串联质谱确证方法，标准编制过程中对样品的前处理方法和仪器条件进行了优化，得到了满意

的效果。

1.3 主要工作过程

本标准由河南省农畜水产品检验技术研究院（原河南省兽药饲料监察所）与河南牧业经济学院负责制定工作。技术归口单位是全国饲料工业标准化技术委员会。工作流程：立项—成立工作组—查阅国内外资料—收集样品并进行试验—起草标准文本—标准复核—征求意见—预审—送审—报批。

1.3.1 成立标准起草小组

2020年8月，我单位接到标准制定任务后，由河南省兽药饲料监察所和河南牧业经济学院共同成立了工作组负责本标准的起草工作。同时对标准起草工作进行了分工，明确各自任务和职责，以确保项目的顺利实施。

1.3.2 文献研究和试验

2021年2月到3月，课题组组织技术人员通过大量查阅国内外有关文献，全面掌握了泰万菌素的化学结构、理化特性等。在此基础上，2021年3月到2021年6月，参考已有的文献资料，针对饲料中泰万菌素的检测方法、仪器条件、方法线性、灵敏度和精确度等进行探索，确定了饲料中泰万菌素的检测方法。并在实验室进行了多次试验验证，结果发现，本方法能很好满足饲料中泰万菌素的检测要求。2021年7月，通过对试验数据进行整理、分析，撰写标准文本和编制说明，形成了《饲料中泰万菌素的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法》（定向征求意见稿）。

1.3.3 方法验证情况

2021年7月到2022年4月，分别由北京英泰格瑞检测技术有限公司、上海市兽药饲料检测所和农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心（宁波）三家单位对本方法进行了复核试验，不同实验室间两种药物的平均回收率均在60%~120%范围内，检测结果的相对标准偏差（RSD）均小于20%，线性范围、检出限及定量限也与标准文本一致。结果表明，该方法均满足各项技术要求，最终确定了该方法的可行性。

1.3.4 定向征求意见情况

2021年8月，向中国农业科学院农业质量与标准检测技术研究所、中国农业大学等25家涉及国内科研、教学和管理等领域的有关单位的教授、专家和技术人

员征求意见，将《饲料中泰万菌素的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法》标准文本和编制说明征求意见稿及征求意见表发送至各有关单位和专家。2021年10月，先后收到20份反馈意见并进行汇总。对各有关单位和专家共提出129条意见，起草小组对反馈意见逐条进行研究和讨论，查阅、搜集相关内容的科学依据，对有争议的问题通过电话和电子邮件等联系方式向有关单位的专家请教。起草小组通过讨论，统一意见后作出的处理意见并提出相应的依据、理由及修改结果（见意见汇总处理表），共采纳意见87条，部分采纳9条，不采纳33条。

根据以上工作得到意见和建议，标准编制小组对标准进行认真地修改、完善，于2024年4月形成农业行业标准《饲料中泰万菌素的测定》标准文本和编制说明（预审稿）。

1.3.5 预审情况

2024年4月29日，课题组组织专家对农业行业标准《饲料中泰万菌素的测定》（预审稿）进行了认真审查。专家组由李俊玲、樊霞、李云、李宏、吴银良、周炜和王金荣七位专家组成，与会专家认为：标准数据可靠，标准预审稿可行。专家组提出进一步修改意见：1.建议适用范围修改为“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”，并进一步考察其适用性；2.补充固相萃取柱过载试验及相关数据，进一步增加磺胺类药物对泰万菌素的干扰试验；3.补充本标准与GB/T 42956-2023的技术内容及检测结果的一致性；4.建议根据实测值调整高效液相色谱法精密度要求；5.按照GB/T 1.1-2020和GB/T 20001.4-2015的要求规范标准文本及编制说明。因此，按照预审意见要求，进一步扩展本标准的适用范围，其中，植物提取物类和微生态制剂类混合型饲料添加剂样品的方法学考察数据详见表10、12和表23、24，结果表明本标准适用于混合型饲料添加剂样品；固相萃取柱过载试验数据见表3，结果表明无过载效应，干扰试验结果见图9，结果表明磺胺类药物对泰万菌素无干扰；经考察，本标准与GB/T 42956-2023的检测结果基本一致。同时，按照制定和编写要求进一步规范了本材料中的相关内容。最终形成《饲料中万菌素的测定》送审稿。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

在本标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的

编写规则及表述按照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》^[1]、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》^[2]和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》^[3]的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2.2 方法试验条件研究

2.2.1 标准溶液稳定性考察

采用高效液相色谱-紫外检测法进行标准溶液稳定性试验，试验条件如下：

色谱柱：C₁₈柱；检测器：紫外检测器；检测波长：280 nm；进样量：20 μL；流动相：乙腈 + 0.15 mol/L 乙酸铵-乙酸溶液 = 52 + 48，等度洗脱。泰万菌素标准储备液（50 mg/mL）和标准中间工作液（100 μg/mL）用流动相稀释至2 μg/mL上机测定。泰万菌素标准储备液稳定性如图2所示，泰万菌素标准中间工作液的稳定性如图3所示。结合稳定性考察结果，我们将-18℃下保存的泰万菌素标准储备液的有效期定为8个月，将0℃~4℃下保存的标准中间工作液的有效期定为3个月。稳定性数据见表1。

表1 泰万菌素标准溶液稳定性考察

标准储备液		标准中间液	
时间/天	峰面积	时间/天	峰面积
0	51339	0	51339
2	51028	2	51108
5	51136	5	50985
10	51099	10	50647
20	50893	20	50537
30	50782	30	50682
50	50600	50	50600
70	50894	70	50317
100	49934	90	49879
240	49672	/	/

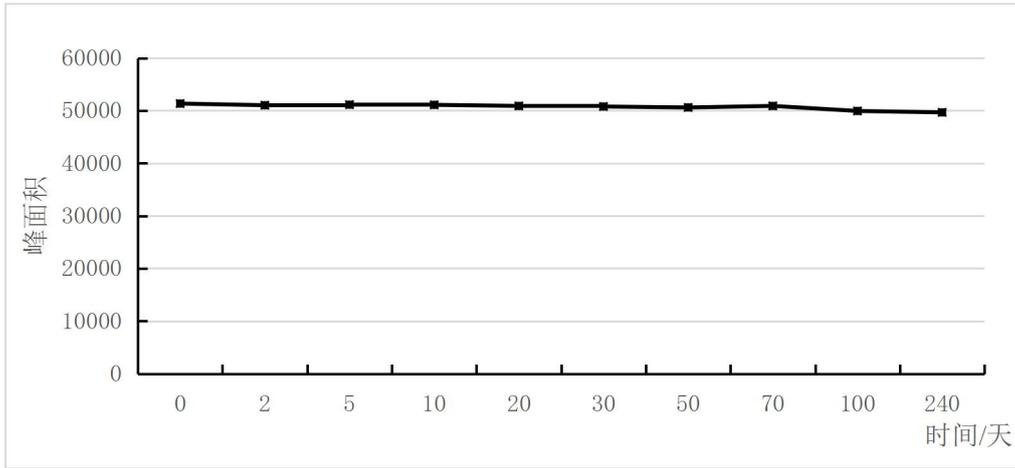


图 2. 泰万菌素标准储备液稳定性

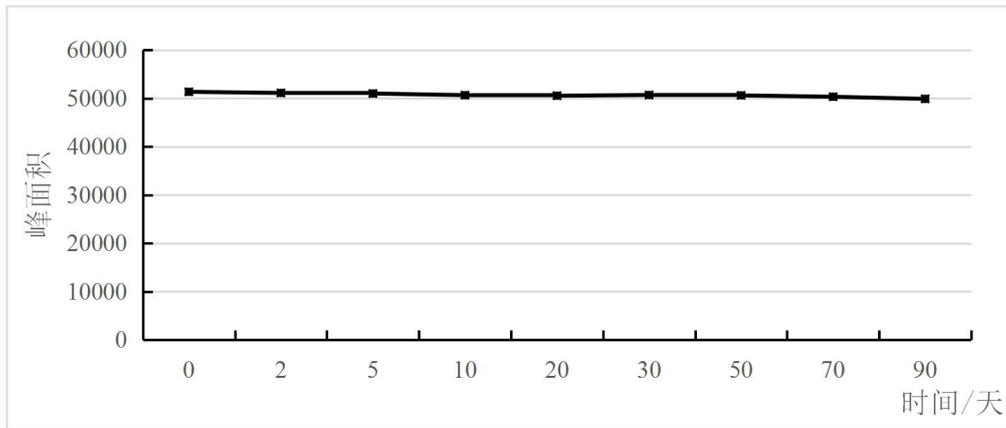


图 3. 泰万菌素标准中间工作溶液稳定性

2.2.2 高效液相色谱法试验条件的研究

2.2.2.1 检测波长的选择

为确定最佳检测波长，我们通过紫外分光光度计对用乙腈稀释的 $5\mu\text{g/mL}$ 的泰万菌素进行测定，其紫外光吸收图谱见图 4。结果表明，采用紫外法检测泰万菌素时，在波长 280nm 处有最大吸收，因此，选择 280nm 为泰万菌素的紫外检测波长。

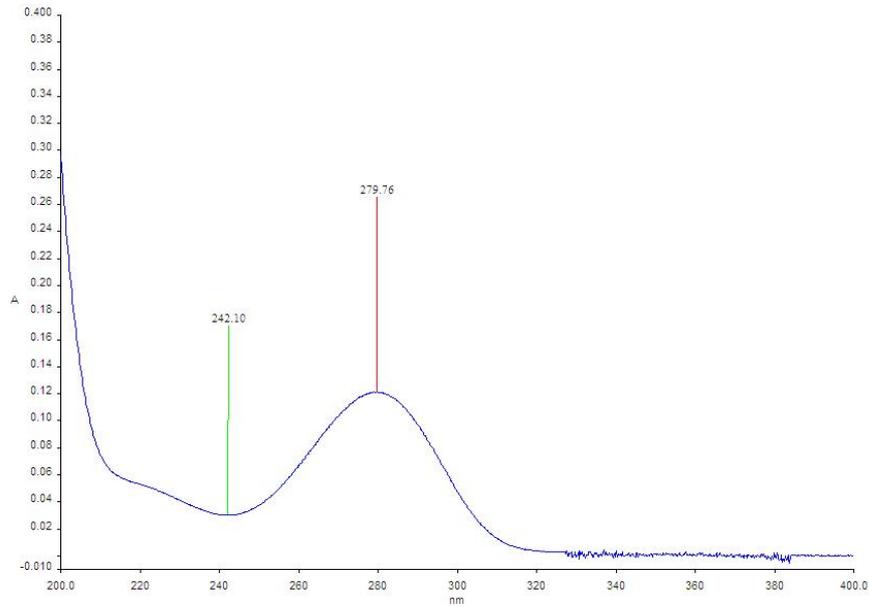


图 4. 泰万菌素紫外吸收光谱图

2.2.2.2 色谱柱和流动相的选择

泰万菌素的极性较强，结合 C₁₈ 色谱柱的适用范围广，重现性、选择性和分离效率较高等特点，本试验首先尝试了文献《泰万菌素颗粒剂的研制及其在猪体内的药动学研究》^[4]中的液相条件，即流动相为乙腈+0.15 mol/L 乙酸铵缓冲液（54+46），色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈（5.0μm，4.6×250mm），结果显示，该条件下，2μg/mL 的泰万菌素在 7.49min 出峰，但目标峰较宽，响应低（见图 5A）。进一步结合《兽药使用指南》中有关泰万菌素的测定条件，流动相优化为乙腈：0.15mol/L 乙酸铵缓冲液：乙酸（55:35:10），该条件下泰万菌素在 4.2min 处峰形良好，响应较高（见图 5B）。此条件下，分别尝试多个 C₁₈ 色谱柱，如 Waters X-Bridge C₁₈（5.0 μm，150 mm×4.6 mm）、Waters Symmetry C₁₈（5.0 μm，250 mm×4.6 mm）和资生堂 CAPCELL PAK C₁₈（5.0 μm，250 mm×4.6 mm）等，均可获得较好的泰万菌素目标峰。

由于饲料基质较为复杂，不同种类饲料样品会产生不同影响，因此，结合不同样品基质，逐步优化仪器条件。针对配合饲料和预混合饲料中的杂质干扰，着重优化流动相比例，后将其优化为 A 相乙腈，B 相 0.15mol/L 乙酸铵-乙酸（8:1）溶液。最终确定的仪器条件为：色谱柱为 C₁₈ 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5μm；柱温 35℃；检测波长 280 nm；流速 1.0mL/min；进样量 20μL；流动相为乙腈+0.15mol/L 乙酸铵-乙酸溶液（52:48），见图 5C。

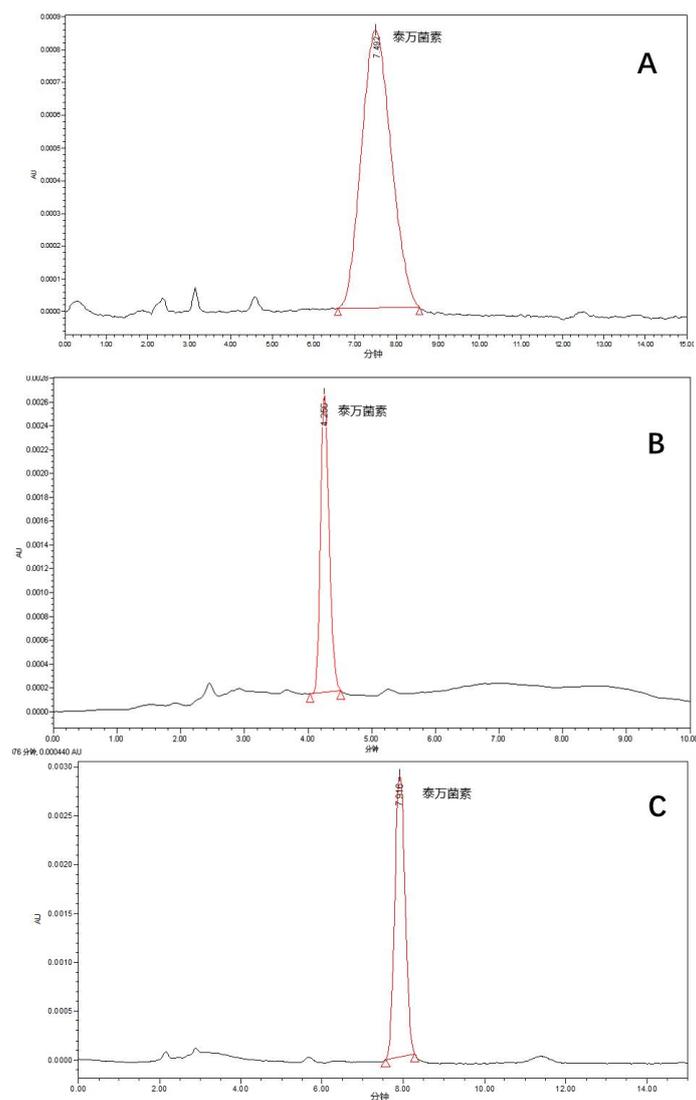


图 5. 泰万菌素色谱图 (2 µg/mL)

(A-《泰万菌素颗粒剂的研制及其在猪体内的药动学研究》文献条件；

B-《兽药使用指南》条件；C-流动相优化后)

2.2.2.3 前处理条件的选择

本方法首先参考了文献中有关 3-乙酰泰乐菌素残留检测的方法，尝试使用乙腈提取，酸性氧化铝净化。结果表明，该条件下目标物峰形和回收率均相对较好（94%左右），但基质中杂质峰响应太高，拉高基线，影响目标物积分。尤其是在预混合饲料基质中杂质峰干扰严重，杂质峰与目标峰的分离度达不到要求，经调整流动相、更换色谱柱等条件优化后仍未能有效分离（图 6），故探索其他方法。

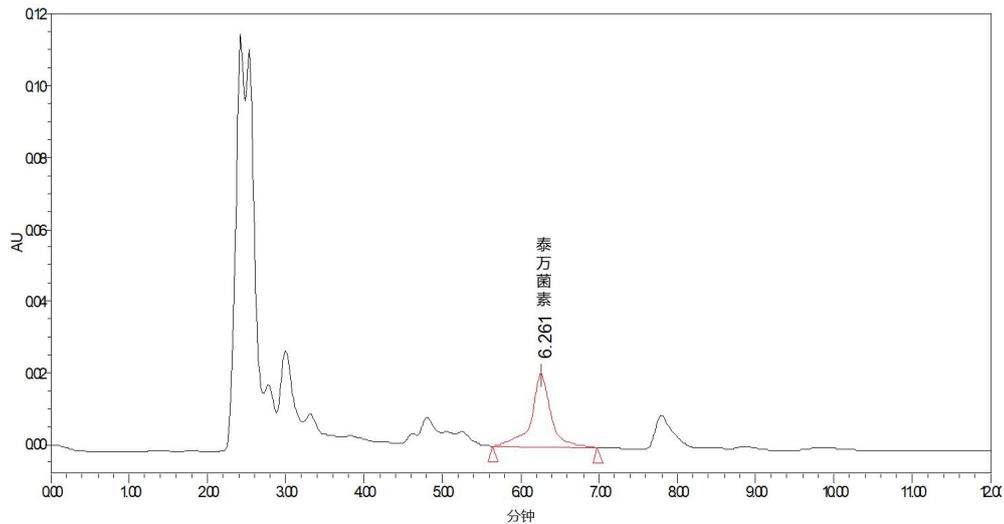


图 6.酸性氧化铝净化后泰万菌素色谱图
(预混合饲料中 20 μ g/kg 添加, 上机浓度 10 μ g/mL。)

根据泰万菌素的理化特性, 结合相关文献^[5], 考察不同前处理条件对泰万菌素提取效率的影响。泰万菌素与泰乐菌素属同类药物, 性质相近, 故参考其他基质中泰乐菌素测定方法中提取、净化部分的条件。

称取 5g 饲料, 用乙腈 20 mL 提取, 涡旋振荡 20 min, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液 5 mL, 氮气吹干后 1ml 乙腈复溶, 加入磷酸二氢钾缓冲溶液 5mL, 涡旋混匀。净化步骤中对 Waters PCX、Waters MCX、Waters WCX、Phenomenon Strata-X-C、C18 和 HLB 固相萃取柱, 具体条件和结果见表 2。结果表明, PCX 和 Strata-X-C 净化效果相对较好。相较 PCX 柱而言, Strata-X-C 柱净化效果和回收率更优, 因此, 选择 Strata-X-C 柱做进一步条件优化。

表 2 考察不同固相萃取柱对泰万菌素的净化效果

固相萃取柱型号及规格	净化步骤	结果	结论
Agela PCX (150mg/6cc)	活化: 甲醇、水、磷酸二氢钾缓冲液各 5mL 淋洗: 水、磷酸二氢钾缓冲液、甲醇各 5mL 洗脱: 5%氨化甲醇 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	杂质峰较少, 回收率约 60%。	可进一步优化条件。
Waters MCX (150mg/6cc)	活化: 甲醇、水、磷酸二氢钾缓冲液各 5mL 淋洗: 水、磷酸二氢钾缓冲液、甲醇各 5mL 洗脱: 5%氨化甲醇 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	有杂质峰, 回收率约 40%。	不适用。
Waters WCX (150mg/6cc)	活化: 甲醇、氨水 (PH=8) 各 5mL 淋洗: 5%氨水、甲醇各 5mL 洗脱: 2%甲酸甲醇 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	洗脱液中几乎无目标物, 而甲醇淋洗液中目标物的含量约 80%, 杂质峰较多。	不适用。

Phenomenon Strata-X-C (200mg/6cc)	活化: 甲醇、水、磷酸二氢钾缓冲液各 5mL 淋洗: 水、磷酸二氢钾缓冲液、甲醇各 5mL 洗脱: 5%氨化甲醇 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	净化效果较好, 无杂质峰干扰, 回收率约 65%。	可进一步优化条件。
Agilent C18 (200mg/6cc)	活化: 甲醇、水各 5mL 淋洗: 水、5%乙腈各 5mL 洗脱: 乙腈 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	几乎无目标峰。	不适用。
Waters HLB (150mg/6cc)	活化: 甲醇、水各 5mL 淋洗: 2%甲酸水、甲醇各 5mL 洗脱: 10%氨化甲醇 5mL 洗脱液氮气吹干后 1 mL 流动相复溶。过膜后上机。	几乎无目标峰。	不适用。

结合泰万菌素易溶于乙腈等有机溶剂, 且乙腈的洗脱能力大于甲醇, 故尝试将洗脱液 5%氨化甲醇改为 5%氨化乙腈。结果表明, 5%氨化乙腈洗脱条件下泰万菌素回收率可提高至 90%左右, 且杂质峰并未明显增加或产生干扰。此外, 我们在提取步骤还进一步考察并比较了乙腈提取 1 次、2 次; 仅振荡、超声后振荡; 上清液氮吹至干、上清液吹至约 1 mL 等条件对泰万菌素提取效率的影响, 结果见图 7。结果表明, 试样在提取时先超声 10min 后再振荡 20min、重复提取 2 次、上清液吹至约 1 mL 的条件下, 泰万菌素的提取效率最高, 可达 95~100%。

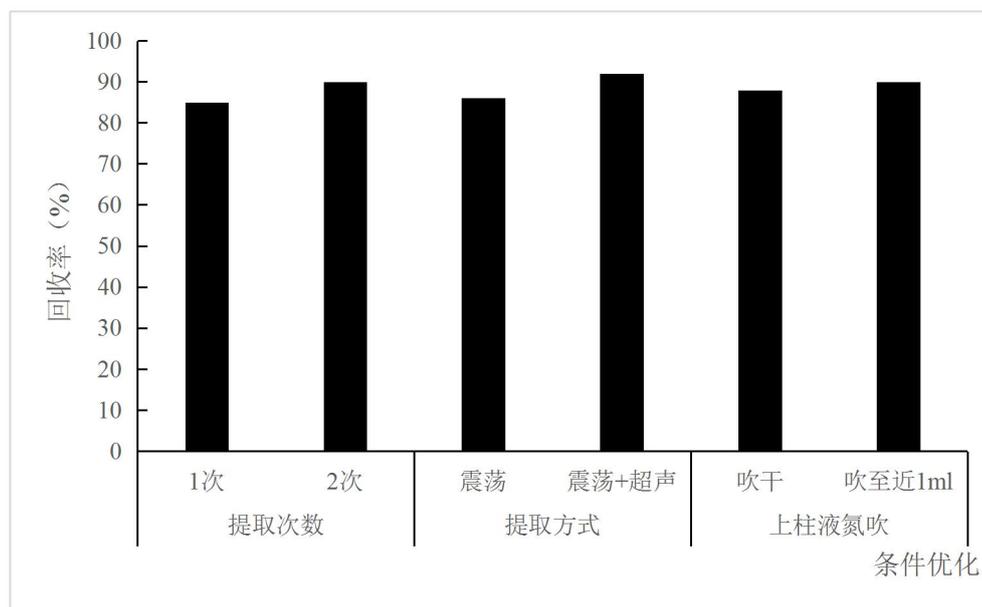


图 7. 提取条件优化

最终前处理过程确定为: 称取试样 5 g (准确至 0.02 g) (预混合饲料称取 2 g) 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 10000 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 10 mL,

40℃氮吹至约 1 mL，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 5 mL，混匀，备用。磺酸型阳离子交换固相萃取柱依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液各 5 mL 活化。取全部备用液过柱，依次用水、0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇各 5 mL 淋洗，抽干。用 5%氨水乙腈溶液 5 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40℃氮吹至干。准确移取复溶液 1 mL 溶解残余物，超声 1 min，混匀，过微孔滤膜后进高效液相色谱仪测定。

根据预审意见，补充固相萃取柱的过载实验。采用 1mg/mL 标准储备液，按照净化步骤处理，最后将进样浓度稀释至 50 μ g/mL，同时与标准储备液直接稀释至 50 μ g/mL，通过比较两者的峰面积，结果表明，偏差范围在 1.1%~1.7%，故未发现固相萃取柱存在明显过载效应，结果见表 3。

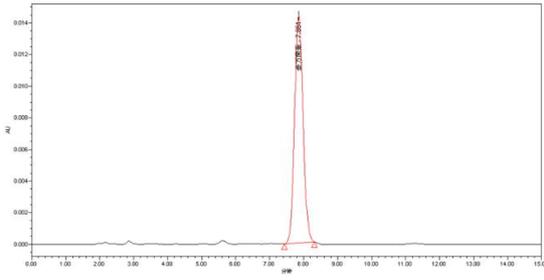
表 3 固相萃取柱过载效应考察

目标物	重复	过柱后峰面积	标准溶液峰面积	与标准溶液之间的偏差 (%)
泰万菌素	1	1216627	1231844	1.2
	2	1218795	1239874	1.7
	3	1216875	1229864	1.1

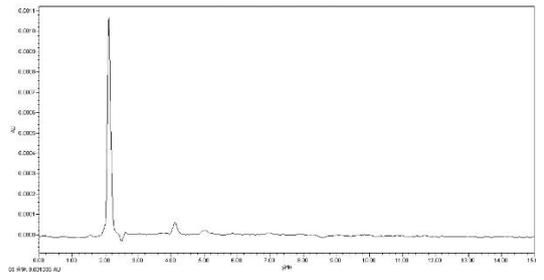
2.2.2.4 干扰试验

在泰万菌素液相条件下，考察其他类似或有关药物对泰万菌素检测的干扰。根据泰万菌素的药物用途和性质，我们选择泰乐菌素、泰妙菌素、阿奇霉素、罗红霉素、吉他霉素、克拉霉素、红霉素和替米考星等与药物进行干扰试验。同时，根据专家反馈意见，增加磺胺、磺胺氯吡嗪钠、磺胺氯吡嗪、磺胺二甲氧苄啶、磺胺嘧啶等磺胺类药物以及土霉素、四环素、多西环素等四环素类药物以及氨苄西林的干扰试验。结果表明，在泰万菌素的液相检测条件下，无药物在泰万菌素 7.8min 处出峰。由此表明，泰乐菌素、泰妙菌素等药物对泰万菌素的检测无干扰。干扰试验的液相色谱图见图 8。

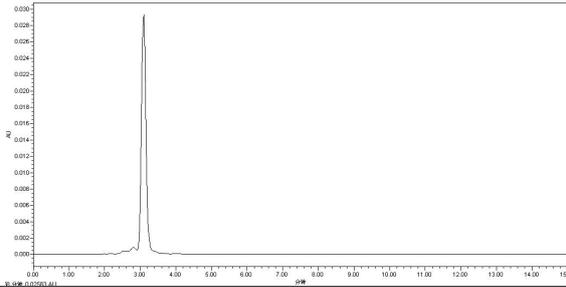
泰万菌素



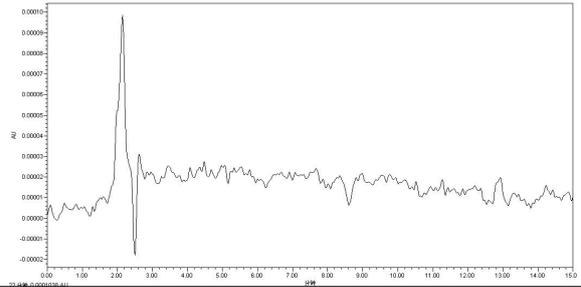
泰妙菌素



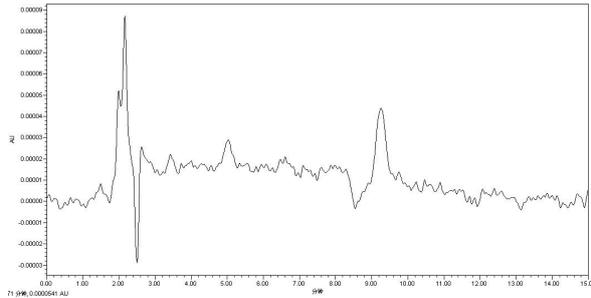
泰乐菌素



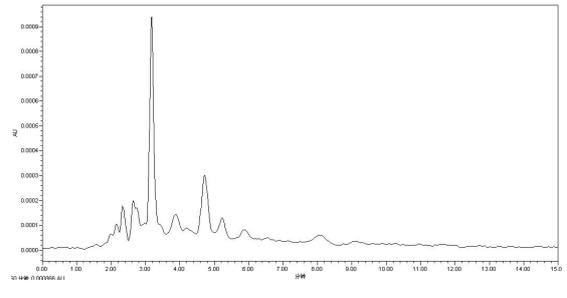
阿奇霉素



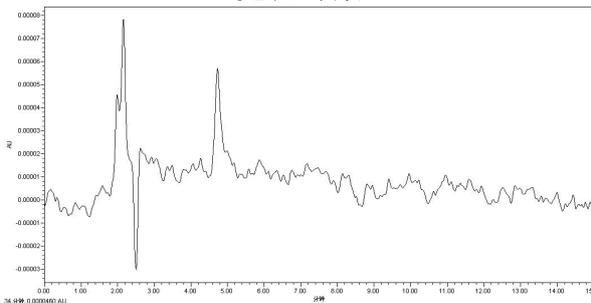
罗红霉素



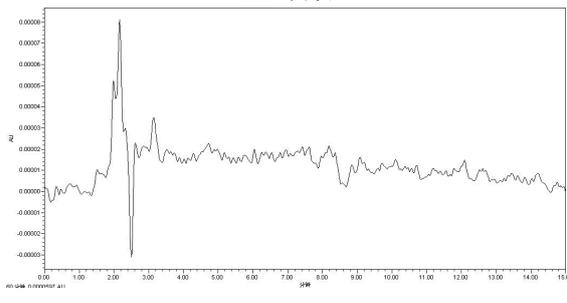
吉他霉素



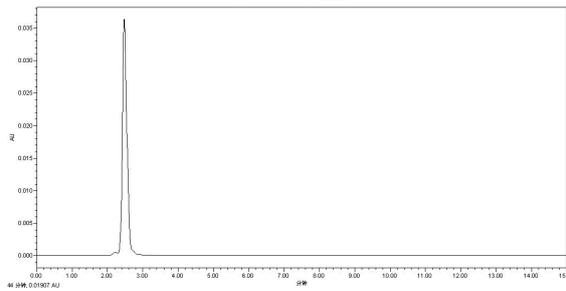
克拉霉素



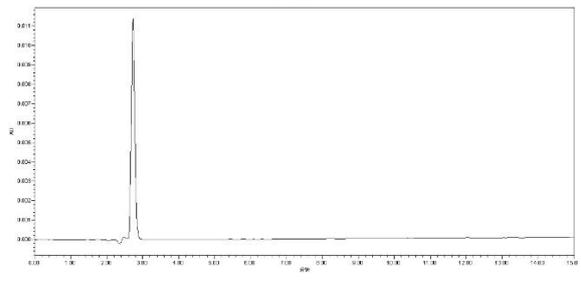
红霉素



替米考星



磺胺



磺胺氯吡嗪

磺胺氯吡嗪钠

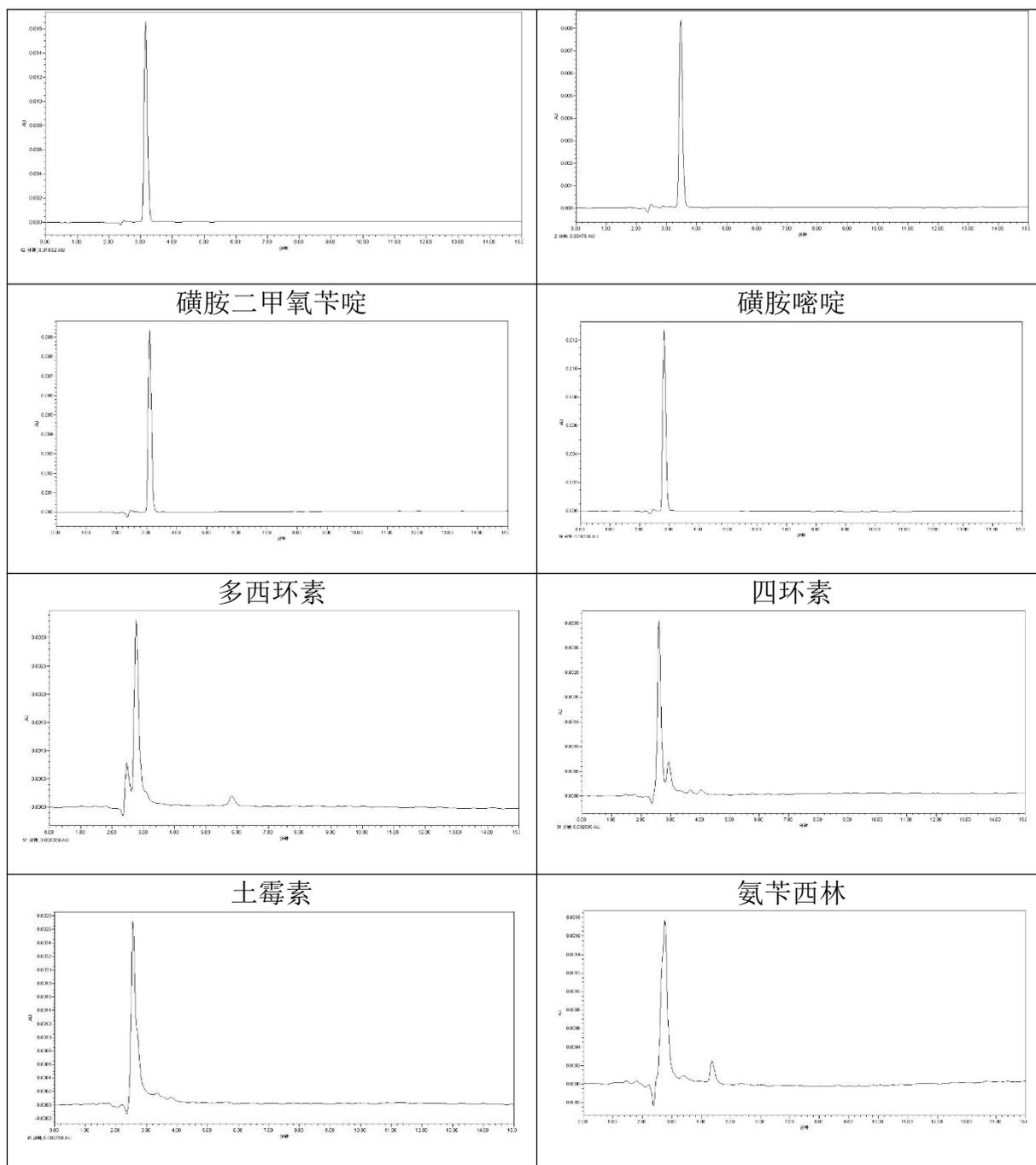


图8 泰万菌素干扰试验图谱

根据预审意见，补充增加磺胺类药物磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺异噁唑、甲氧苄啶、磺胺多辛、磺胺甲二唑、磺胺甲基嘧啶和磺胺间二甲氧嘧啶的干扰试验，结果表明，在泰万菌素的液相检测条件下，在泰万菌素出峰处（6.3min）无干扰峰，因此，上述药物对泰万菌素均无干扰。补充干扰试验的液相色谱图见图9。

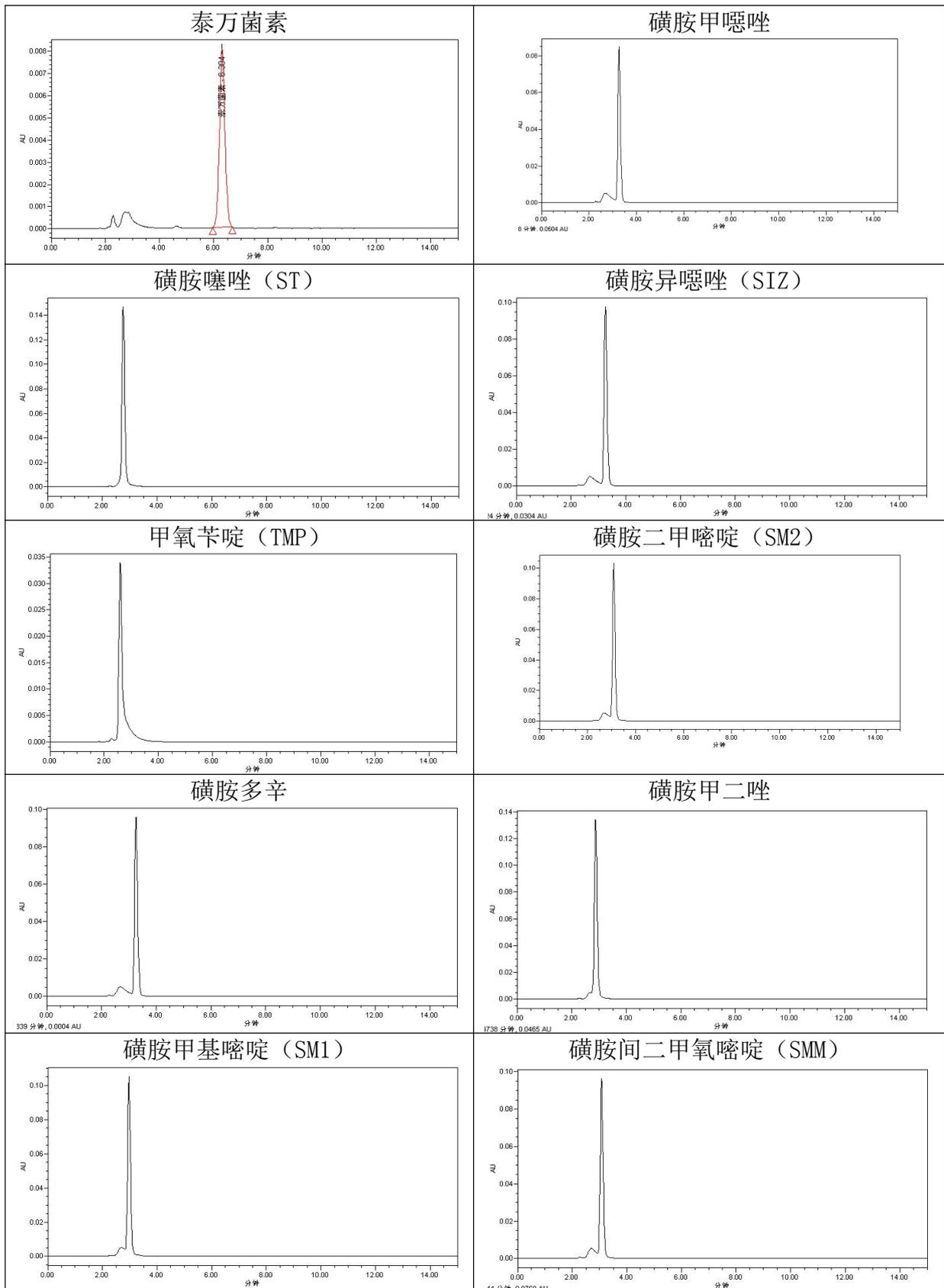


图9 泰万菌素补充干扰试验图谱

2.2.2.5 方法学考察

(1) 线性

精确移取适量标准中间工作液，用复溶液稀释，制得浓度分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液（现用现配），由低浓度到高浓度供高效液相色谱仪测定。以色谱峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。求得泰万菌素的回归方程为 $Y=2.49e^4X+4.21e^3$ ， $R^2=0.999994$ ，大于 0.999，线性良好，见图 10。

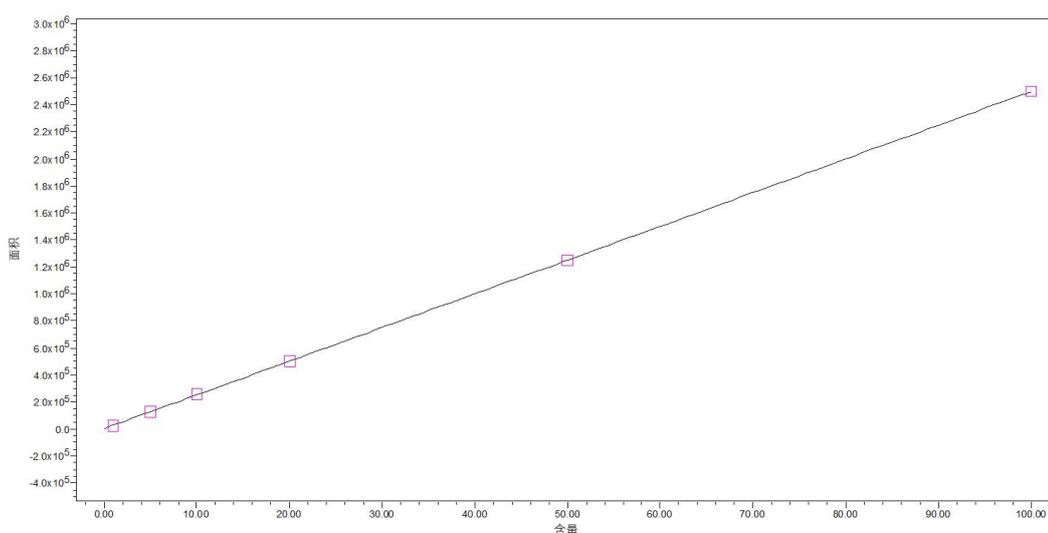


图 10. 泰万菌素标准曲线

(2) 方法的灵敏度

空白试样按相同步骤处理后，测定结果表明，在相应的保留时间处，空白试料对所测药物无干扰。

检出限 (LOD): 根据要求，添加适量泰万菌素标准溶液于 5 g 空白配合饲料、浓缩饲料和精料补充料（预混合饲料 2g）中，提取后测定，依据信噪比 $S/N \geq 3$ ，确定其检出限。试验结果表明，泰万菌素在配合饲料、浓缩饲料中的检测限为 1 mg/kg，在预混合饲料中的检出限为 0.5 mg/kg。

定量限 (LOQ): 根据要求，添加适量泰万菌素标准溶液于 5 g 空白配合饲料、浓缩饲料和精料补充料（预混合饲料 2g）中，提取后测定，依据信噪比 $S/N \geq 10$ 且添加回收试验中回收率在 60%~120%、批间批内 RSD 小于 20%，确定其定量限。试验结果表明，泰万菌素在配合饲料、浓缩饲料中的定量限为 2 mg/kg，预混合饲料定量限为 1.0 mg/kg。

(3) 方法的准确度和精密度考察

本方法采用标准添加法考察了泰万菌素在猪、鸡的配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料合精料补充料中的添加回收情况。结合泰万菌素的批准用量，在空白饲料中添加 3 个不同水平泰万菌素进行准确度和精密度试验，猪配合饲料为 2 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg，猪浓缩饲料为 2 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg，猪预混料添加浓度为 5.0 mg/kg、50 mg/kg、500 mg/kg，鸡配合饲料为 2 mg/kg、250 mg/kg、500 mg/kg，鸡浓缩饲料为 2 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg，鸡预混料添加浓度为 5.0 mg/kg、500 mg/kg、2000 mg/kg。根据专家反馈意见增加精料补充料实验数据，精料补充料添加水平为 2 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg。各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 4~表 10。

表 4 猪配合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	71.7	75.4	70.9	76.6	74.1	73.7	3.3	4.8
	II	68.0	69.5	74.4	73.7	67.7	70.7	4.5	
	III	68.4	73.4	78.2	67.6	69.4	71.4	6.2	
50	I	81.4	82.3	87.6	86.8	96.9	87.0	7.1	5.2
	II	85.0	90.8	89.8	94.4	90.2	90.0	3.7	
	III	81.7	89.8	91.6	86.2	84.7	86.8	4.6	
100	I	88.2	95.8	83.2	84.4	89.9	88.3	5.7	5.1
	II	94.2	97.7	90.5	93.6	87.1	92.6	4.3	
	III	86.5	85.9	96.9	89.3	93.9	90.5	5.3	

表 5 猪浓缩饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	76.2	75.4	80.9	69.0	85.2	77.4	7.9	7.3
	II	77.3	78.9	66.5	79.5	78.8	76.2	7.2	
	III	74.7	79.4	69.3	83.8	69.7	75.4	8.3	
100	I	95.5	92.6	96.1	100.8	99.7	96.9	3.4	4.2
	II	90.7	91.3	99.8	91.3	91.2	92.9	4.2	
	III	91.7	90.6	100.3	97.5	98.6	95.8	4.5	
200	I	85.1	86.0	88.3	77.6	92.5	85.9	6.4	5.6
	II	84.6	88.3	84.7	92.1	86.0	87.1	3.6	
	III	76.4	91.0	87.8	89.0	80.3	84.9	7.3	

表 6 猪预混合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	71.9	73.6	71.9	68.3	67.2	70.6	3.8	5.6
	II	68.6	66.6	62.4	73.2	64.6	67.1	6.1	
	III	72.0	69.3	71.0	72.2	61.2	69.1	6.6	
50	I	72.7	85.6	72.4	84.1	78.5	78.7	7.8	6.9
	II	87.5	82.4	73.2	73.1	84.0	80.0	8.1	
	III	73.3	79.5	76.6	75.8	85.0	78.0	5.7	
500	I	95.3	97.0	97.3	88.7	89.1	93.5	4.5	5.7
	II	96.5	83.7	88.2	86.5	83.8	87.7	6.0	
	III	83.8	89.9	97.7	94.2	89.3	91.0	5.8	

表 7 鸡配合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	64.3	62.9	64.3	70.4	60.9	64.6	5.5	5.3
	II	70.5	65.8	70.6	68.2	62.8	67.6	4.9	
	III	64.0	61.8	60.2	64.0	65.7	63.1	3.4	
250	I	79.3	79.6	84.9	80.1	94.8	83.7	7.9	7.3
	II	82.6	92.6	94.5	91.4	90.7	90.4	5.0	
	III	88.1	78.2	78.2	83.9	92.9	84.3	7.6	
500	I	88.5	81.3	79.6	95.6	80.7	85.1	8.0	6.0
	II	90.0	88.3	78.4	81.5	93.3	86.3	7.1	
	III	84.9	89.1	88.8	89.8	86.9	87.9	2.3	

表 8 鸡浓缩饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	83.9	79.0	80.1	86.9	82.8	82.5	3.8	4.5
	II	79.7	79.5	83.5	76.9	75.8	79.1	3.8	
	III	86.7	75.9	81.8	76.0	81.7	80.4	5.6	
300	I	79.2	92.8	82.9	88.0	90.3	86.6	6.4	6.6
	II	89.3	90.0	94.9	78.1	78.6	86.2	8.7	
	III	86.6	95.9	84.2	92.8	86.6	89.2	5.5	
600	I	78.7	88.4	88.6	90.6	80.2	85.3	6.4	5.2
	II	79.8	91.9	82.9	84.1	79.5	83.6	6.0	
	III	84.6	84.3	86.0	87.6	91.0	86.7	3.1	

表 9 鸡预混合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	77.0	70.4	75.7	78.7	74.7	75.3	4.1	5.0
	II	80.9	79.2	75.7	76.0	74.1	77.2	3.6	
	III	84.4	81.6	79.2	72.6	72.5	78.1	6.9	
500	I	92.8	88.4	93.3	100.0	96.5	94.2	4.6	4.6
	II	99.0	91.5	89.9	96.9	93.3	94.1	4.0	
	III	87.1	89.2	91.3	85.4	93.7	89.3	3.7	
2000	I	79.1	81.3	79.9	78.2	81.4	80.0	1.7	6.4
	II	92.7	91.5	89.0	80.5	84.3	87.6	5.8	
	III	81.8	80.5	92.6	91.8	83.0	85.9	6.7	

表 10 精料补充料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	94.8	93.1	94.2	78.2	87.2	89.5	7.8	6.6
	II	83.6	82.9	93.0	89.2	78.6	85.4	6.6	
	III	95.5	93.4	88.4	93.4	86.4	91.4	4.2	
100	I	107.9	102.1	94.1	100.3	105.1	101.9	5.2	5.0
	II	107.6	103.9	99.7	95.0	107.8	102.8	5.3	
	III	93.2	101.2	98.3	104.8	95.9	98.7	4.6	
300	I	97.4	92.8	94.1	90.7	94.6	93.9	3.0	3.1
	II	92.9	94.1	93.3	99.5	96.7	95.3	2.9	
	III	97.2	96.6	91.2	92.2	99.7	95.4	3.8	
600	I	102.3	105.4	97.9	99.3	105.0	102.0	3.3	3.0
	II	97.9	105.7	100.1	101.2	99.1	100.8	3.0	
	III	104.1	106.4	97.3	96.3	95.3	99.9	5.0	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 2 mg/kg~2000 mg/kg 的泰万菌素，回收率为 60.2%~107.9%，批内、批间相对标准偏差均小于 8.7%。说明该方法对不同饲料样品中不同含量泰万菌素的测定均有较好的准确度。色谱图见图 11~图 25。

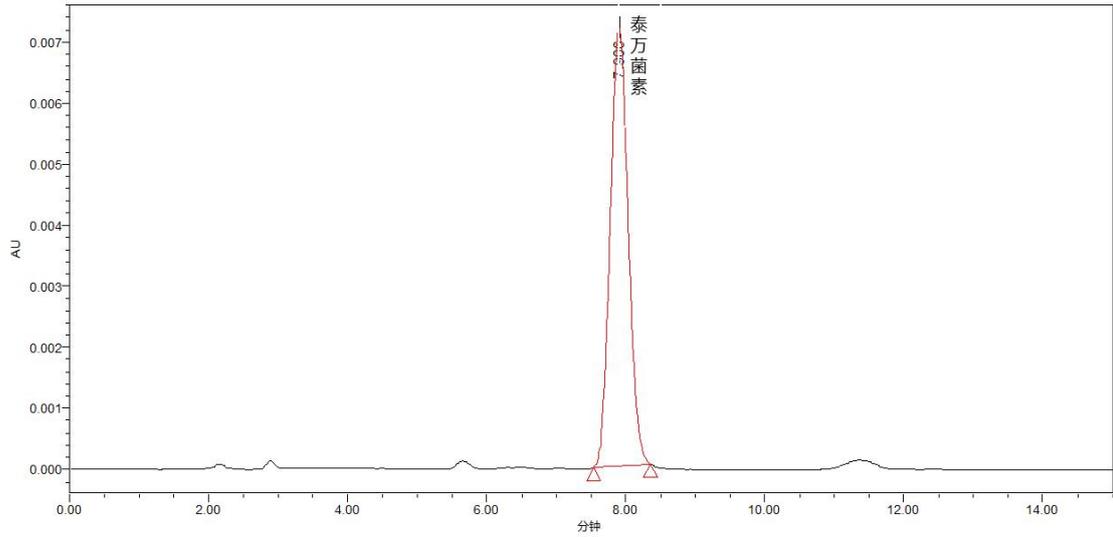


图 11. 泰万菌素标准溶液色谱图 (5 µg/mL)

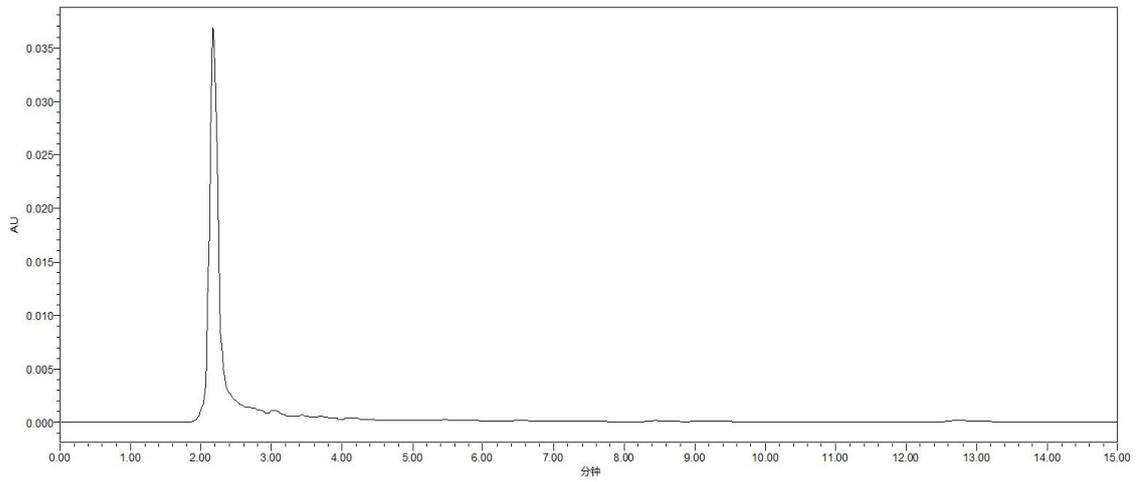


图 12. 猪配合饲料空白色谱图

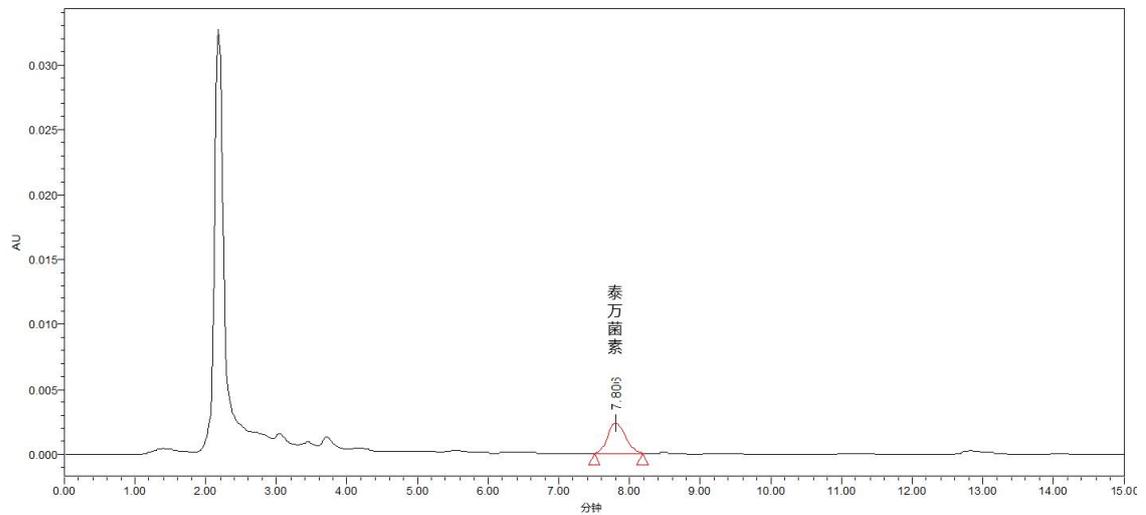


图 13. 猪配合饲料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

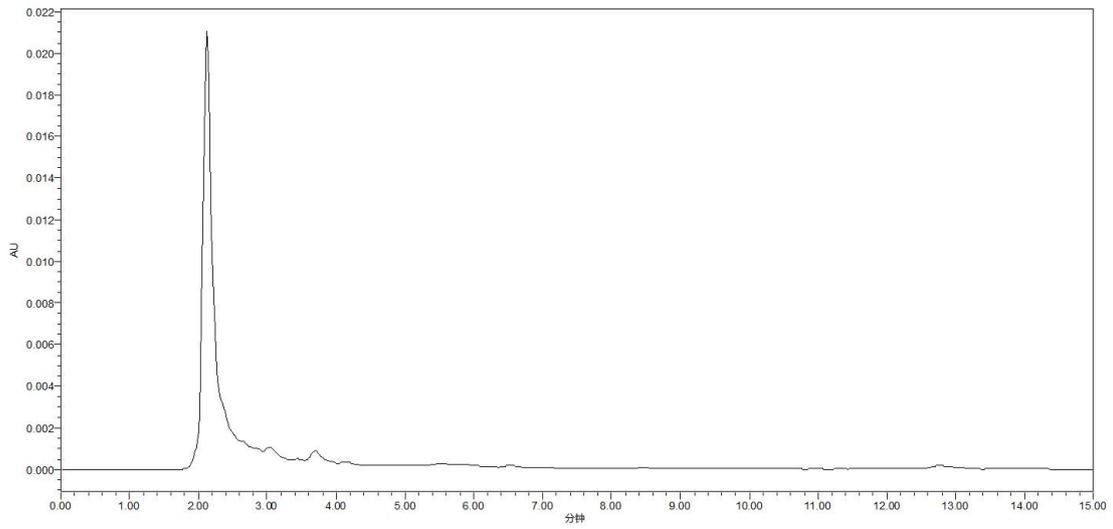


图 14. 猪浓缩饲料空白色谱图

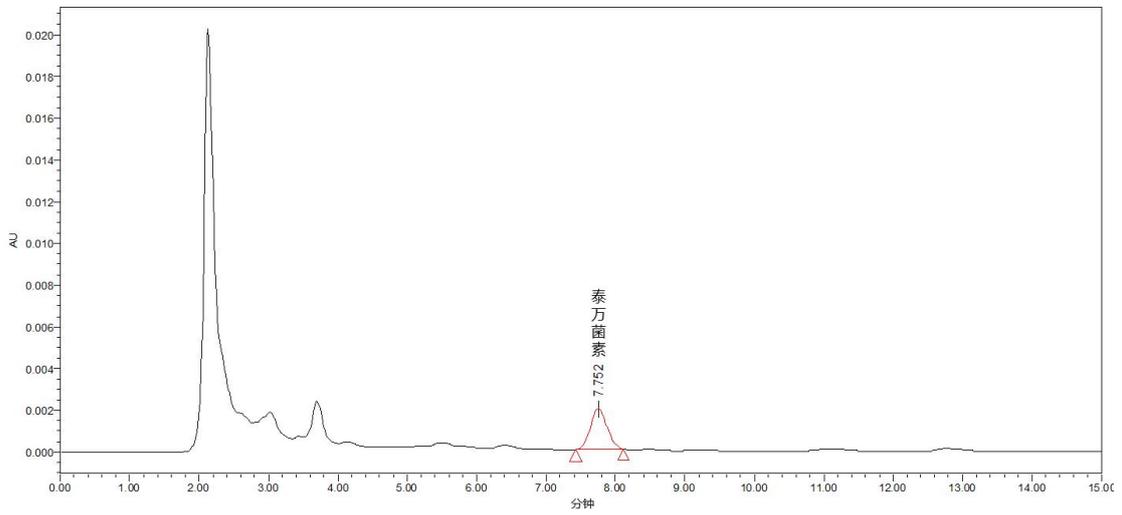


图 15. 猪浓缩饲料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

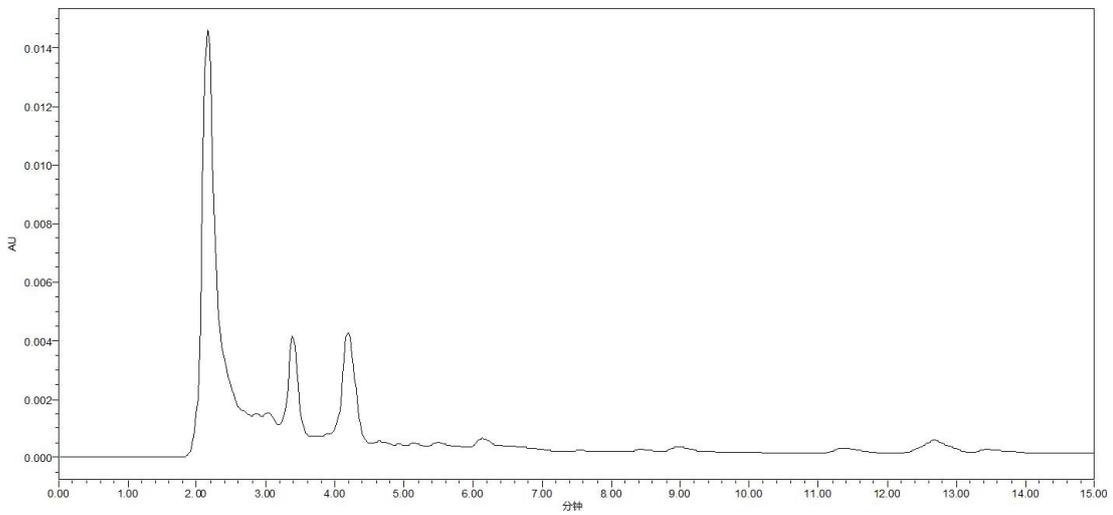


图 16. 猪预混合饲料空白色谱图

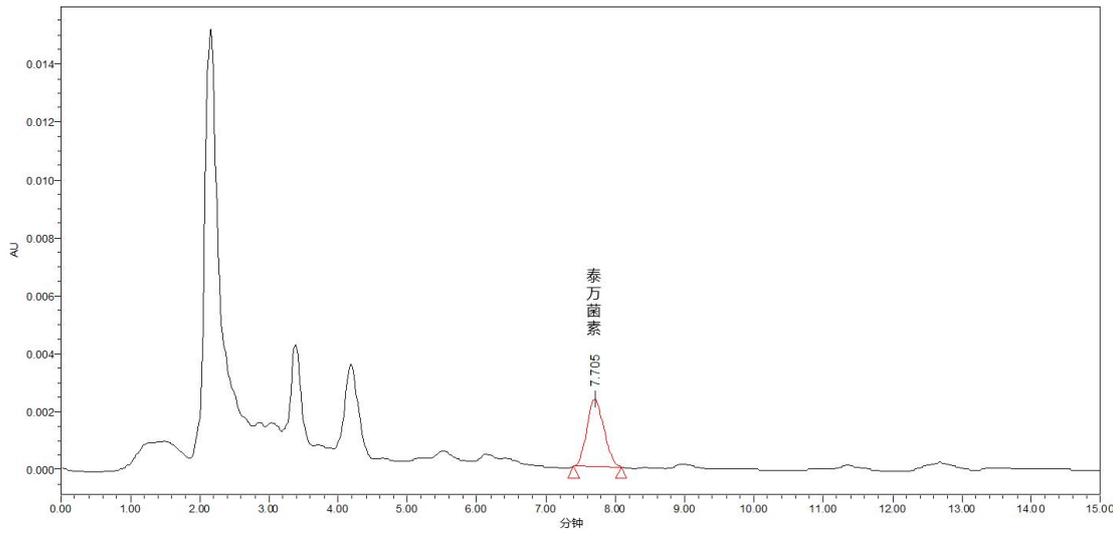


图 17. 猪预混合饲料空白添加色谱图 (5 mg/kg)

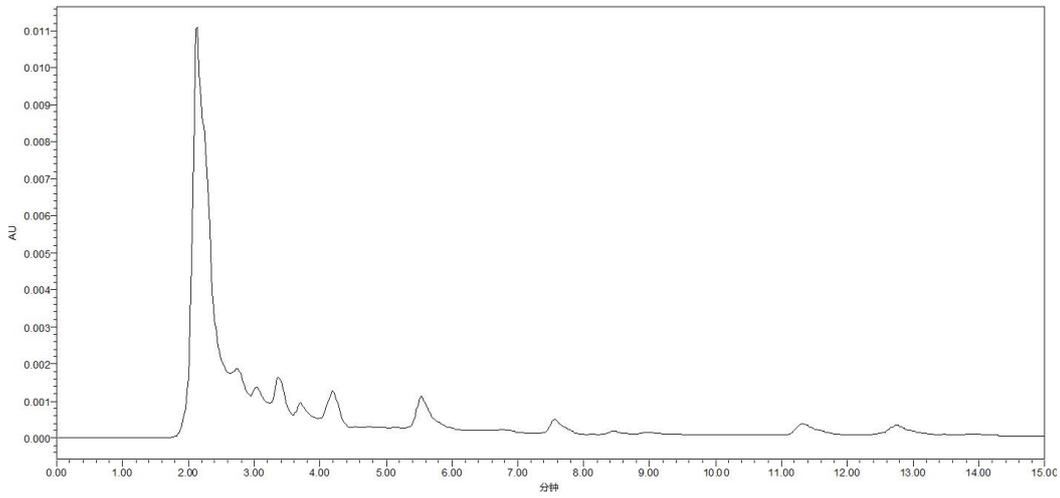
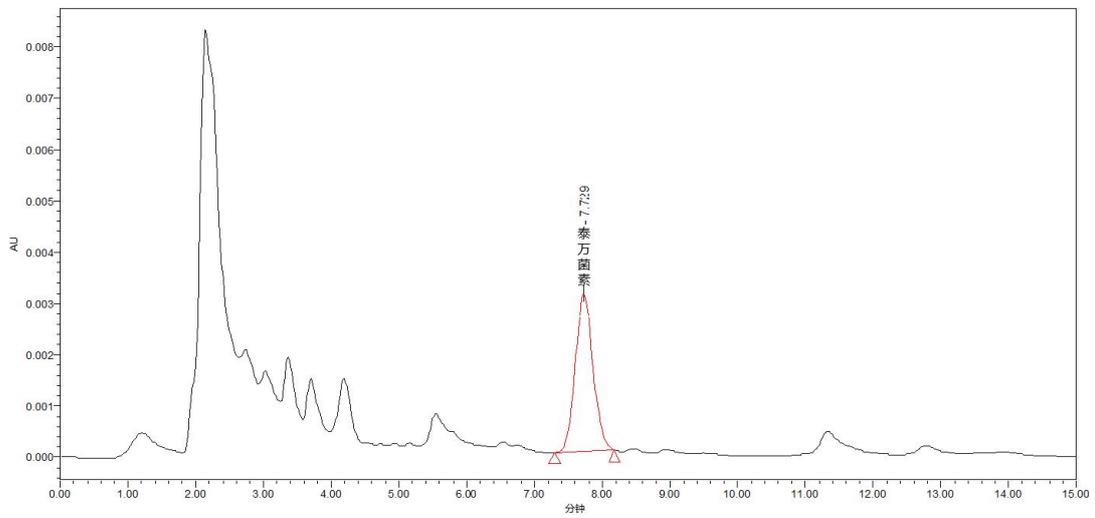


图 18. 鸡配合饲料空白色谱图



19. 鸡配合饲料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

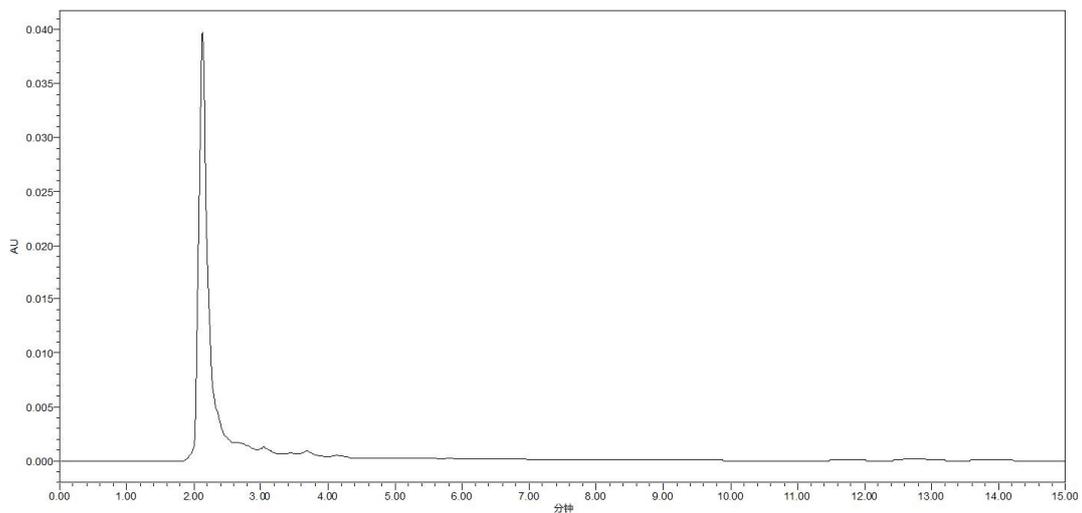


图 20. 鸡浓缩饲料空白色谱图

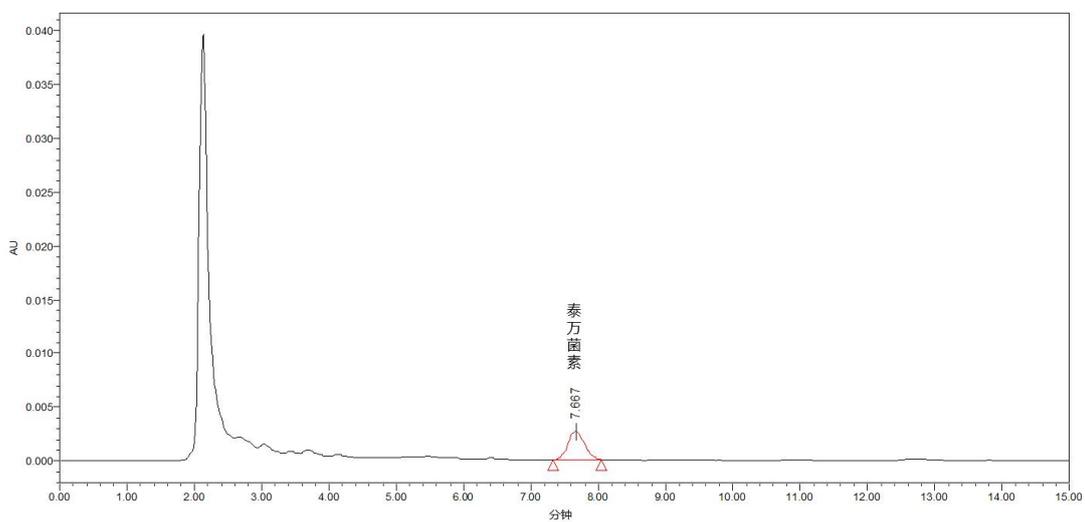


图 21. 鸡浓缩饲料添加色谱图 (2 mg/kg)

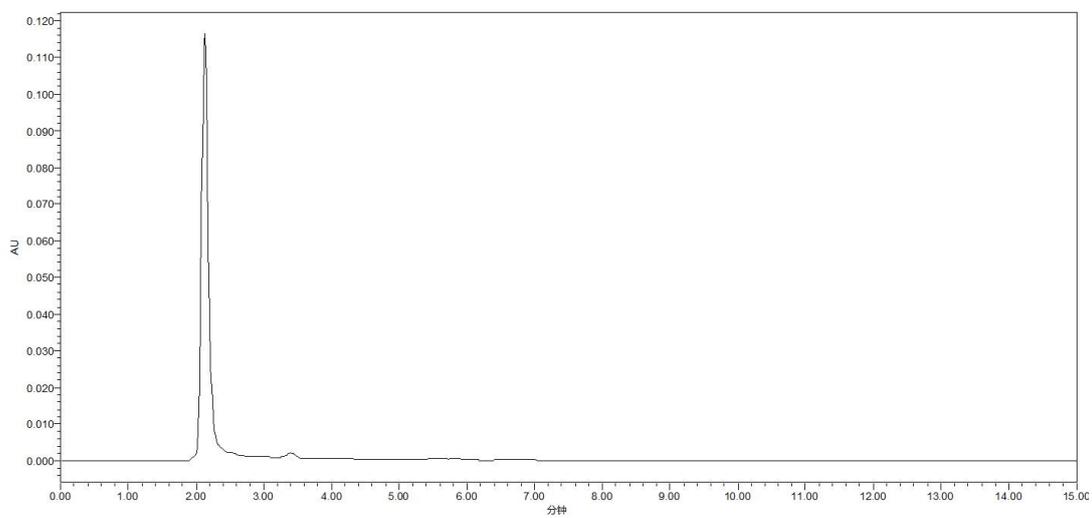


图 22. 鸡预混合饲料空白色谱图

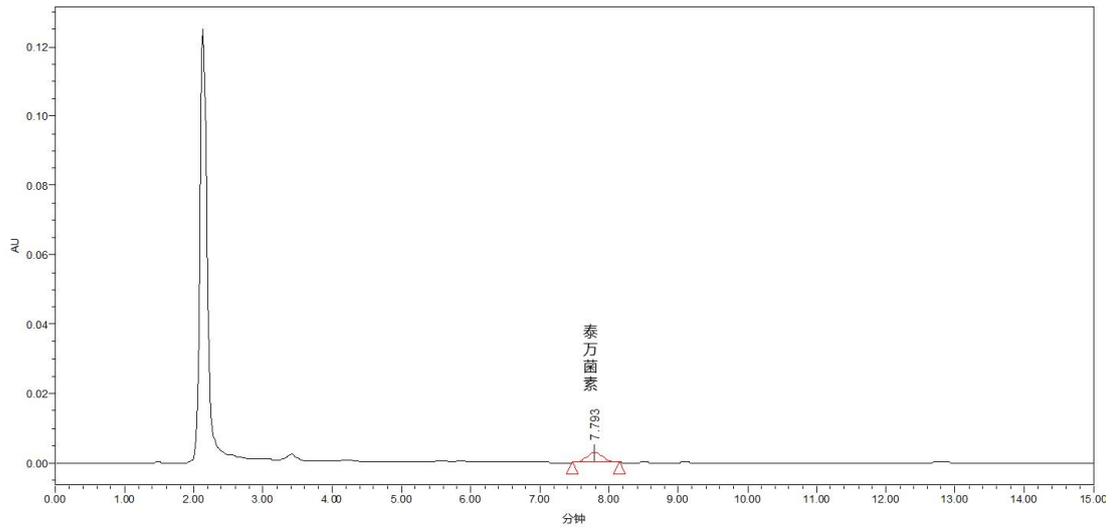


图 23. 鸡预混合饲料空白添加色谱图 (5 mg/kg)

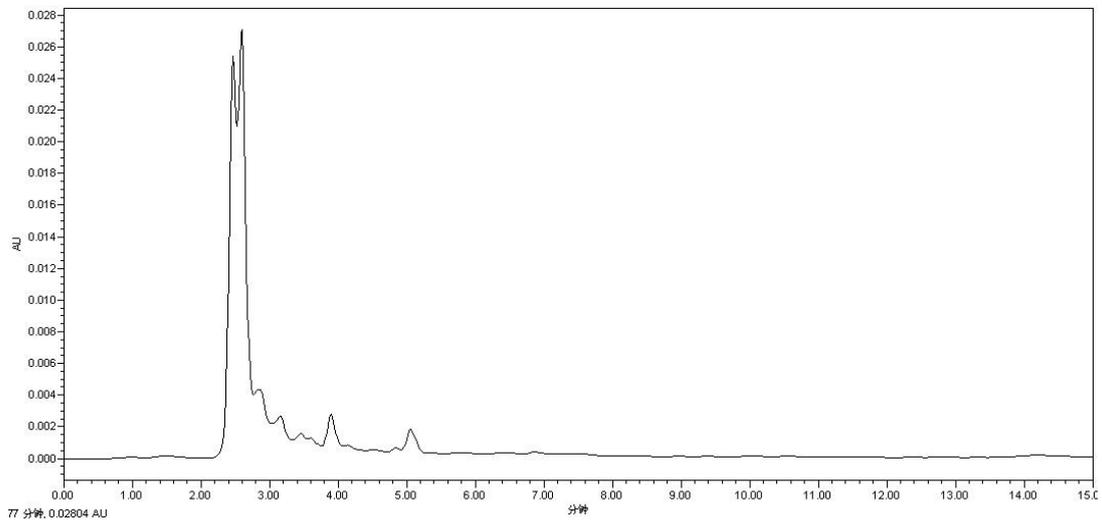


图 24. 精料补充料空白色谱图

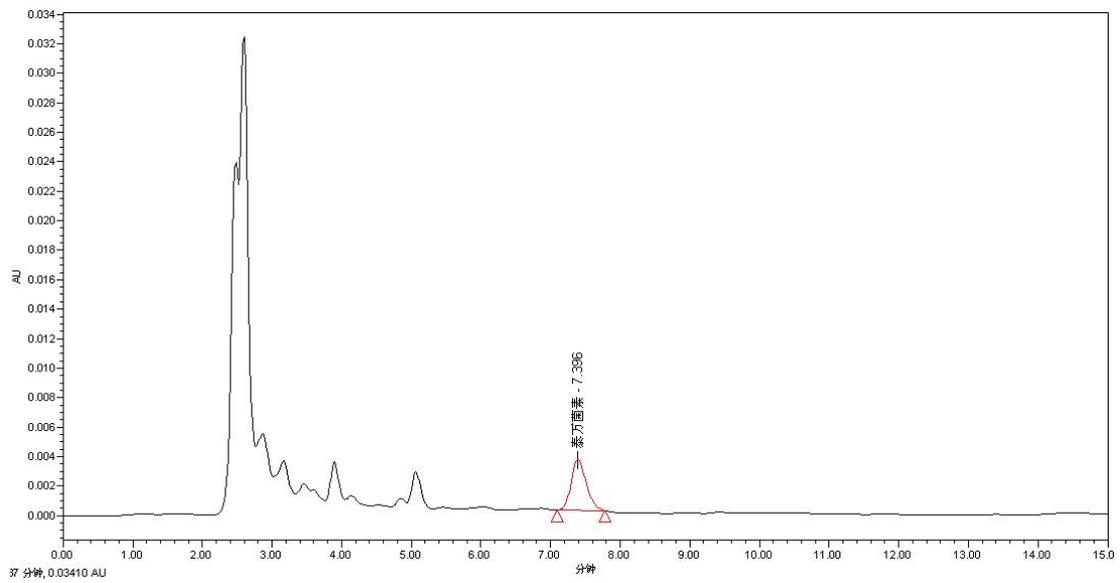


图 25. 精料补充料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

根据预审会专家意见，本方法的适用范围增加“混合型饲料添加剂”，并进一步考察其适用性。因此，采用标准添加法考察泰万菌素在植物提取物和微生物制剂类型的混合型饲料添加剂中的添加回收情况。在空白饲料中添加 5.0 mg/kg、500 mg/kg 和 2000 mg/kg 3 个不同水平泰万菌素进行准确度和精密度试验，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 11 和表 12。

表 11 微生物制剂类混合型饲料添加剂中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	90.0	85.1	90.4	92.9	85.6	88.8	3.8	
	II	87.4	90.3	93.4	88.8	94.8	90.9	3.4	3.7
	III	94.6	89.4	86.4	92.3	94.8	91.5	3.9	
500	I	97.5	98.9	97.5	91.8	90.6	95.3	4.0	
	II	92.4	91.1	93.7	99.6	97.4	94.8	3.8	3.3
	III	96.1	91.7	98.9	95.8	96.9	95.9	2.7	
2000	I	103.0	99.4	99.7	95.3	98.9	99.2	2.8	
	II	95.3	95.1	95.7	96.1	96.9	95.8	0.7	2.8
	III	97.4	101.9	94.0	98.9	94.1	97.3	3.4	

表 12 植物提取物类混合型饲料添加剂中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	94.6	90.8	90.9	91.1	91.9	91.9	1.7	
	II	91.3	93.3	90.6	92.1	98.9	93.2	3.6	3.1
	III	98.7	91.5	90.6	92.5	96.7	94.0	3.7	
500	I	101.6	105.3	99.1	98.1	97.9	100.4	3.1	
	II	102.4	102.7	99.8	98.9	100.1	100.8	1.7	2.5
	III	102.3	97.0	103.7	96.9	102.2	100.4	3.2	
2000	I	96.9	95.5	94.2	100.4	94.7	96.4	2.6	
	II	96.2	98.0	98.9	98.9	98.7	98.1	1.2	1.9
	III	94.5	96.4	96.9	97.6	96.5	96.4	1.2	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 5 mg/kg~2000 mg/kg 的泰万菌素，回收率为 85.1%~105.3%，批内、批间相对标准偏差均小于 4.0%。说明该方法对不同饲料样品中不同含量泰万菌素的测定均有较好的准确度。色谱图见图 26~图 29。

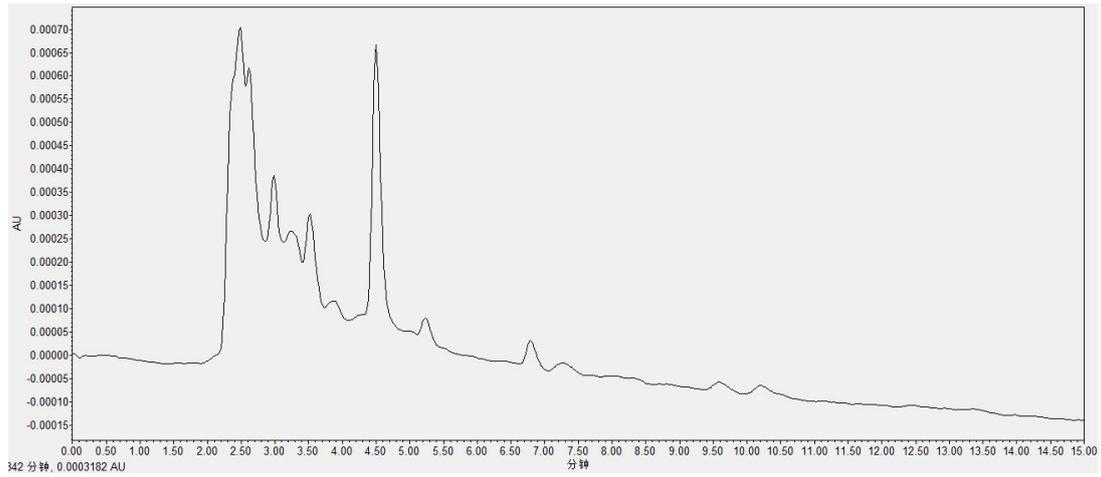


图 26. 微生物制剂类混合型饲料添加剂空白色谱图

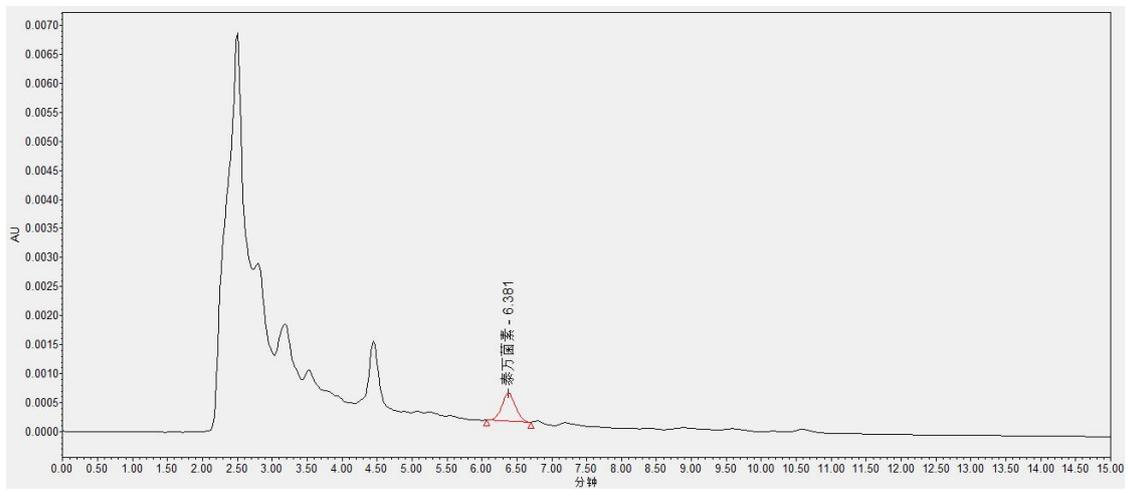


图 27. 微生物制剂类混合型饲料添加剂空白添加色谱图 (5 mg/kg)

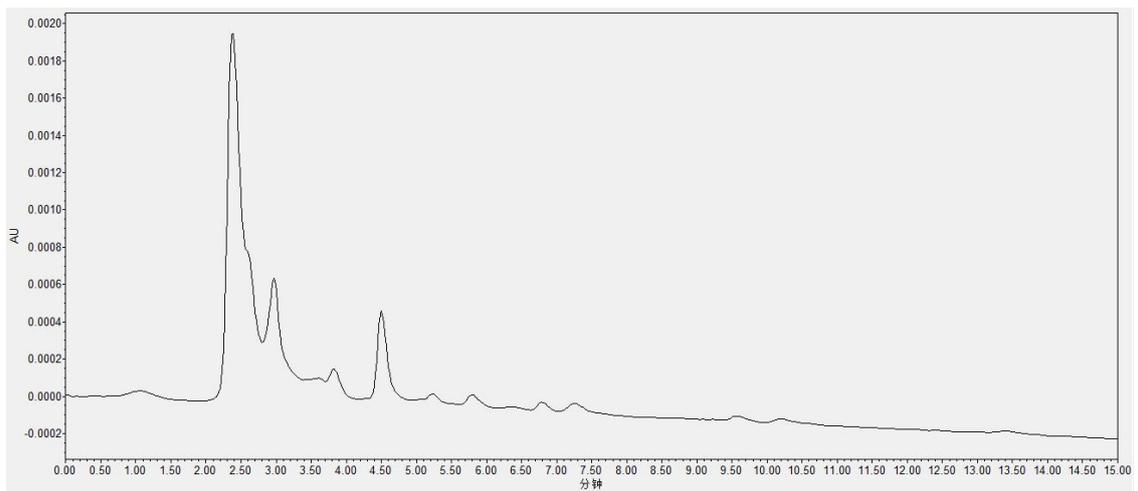


图 28. 植物提取物类混合型饲料添加剂空白色谱图

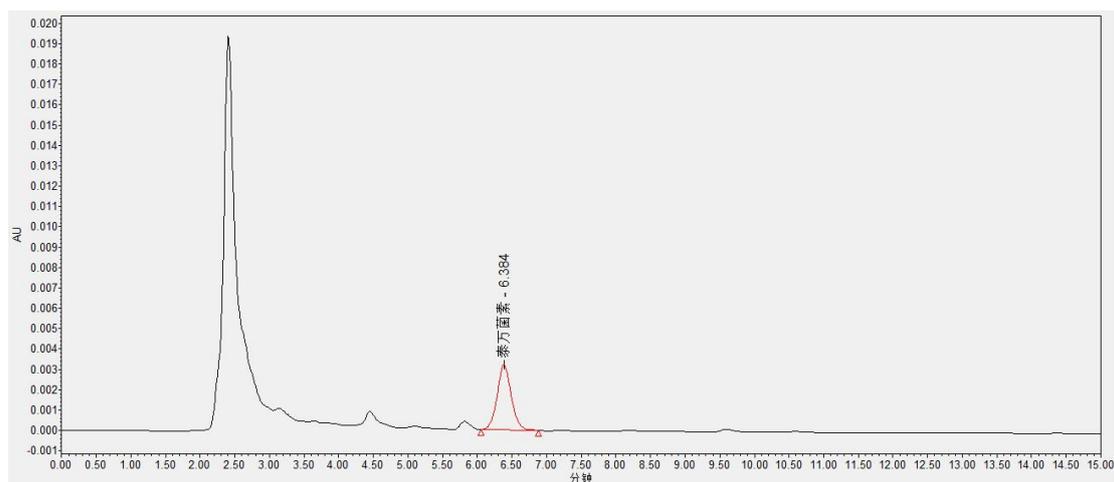


图 29. 植物提取物类混合型饲料添加剂空白添加色谱图 (5 mg/kg)

2.2.3 液相色谱-串联质谱法试验条件的研究

2.2.3.1 液相色谱试验条件的确定

根据带电喷雾离子源质谱的工作原理，目标化合物在溶液状态下电离，因此，流动相的种类和比例不仅影响目标化合物的保留时间和峰形，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。本实验分别考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水等作为流动相，发现以乙腈-0.1%甲酸水为流动相时，响应值高，分离效果好，故选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。最终色谱条件如下：

色谱柱：C₁₈柱，柱长 150 mm，内径 3.0 mm，粒度 2.1 μm，或性能相当者；

柱温：35 °C。

流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液，梯度洗脱，洗脱程序见表 13。

流速：0.3 mL/min。

进样量：5 μL。

表 13 流动相和梯度洗脱条件

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

2.2.3.2 质谱试验条件的确定

根据泰万菌素药物性质和相关文献^[6~7]，本方法选择 ESI+ 进行分析。本方法在研制过程中使用 Waters 公司的 ACQUITY UPLC-Xevo TQ-S 液相色谱-串联质谱仪。以乙腈/0.1%甲酸溶液为流动相，在 ESI+ 离子模式进行全扫描。经优化，最终所获得仪器条件如下：

离子源：电喷雾离子源。

扫描方式：正离子扫描。

检测方式：多反应监测（MRM）。

电离电压：1.5 kV。

源温：150 °C。

雾化温度：500 °C。

锥孔气流速：150 L/h。

雾化气流速：1000 L/h。

定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 14。

表 14 定性、定量离子的锥孔电压和碰撞能量

药物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 <i>V</i>	碰撞能量 <i>eV</i>
泰万菌素	1042.5>109.19	1042.5>109.19	38	46
	1042.5>174.19			38

2.2.3.3 前处理条件的选择

液质灵敏度远高于液相，且泰万菌素在质谱上的响应很高，因此，前处理过程中样品称样量均定为 2g。此外，在液相方法前处理中通过对过柱前氮吹的影响的考察结果表明，减少氮吹步骤有助于提升方法的整体优异性，同时结合液质灵敏度高的特点，最终移取 1mL 提取液进行过柱净化。

最终前处理过程确定为：称取试样 2 g（准确至 0.02 g）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 1 mL 混合上清液，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 5 mL，混匀，备用。磺胺型阳离子交换固相萃取柱依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液各 5 mL 活化。取全部备用液过柱，依次用水、0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇各 5 mL 淋洗，抽干。用 5%氨水乙腈溶液 5 mL 洗脱，收集

洗脱液，于 40 °C 氮吹至干。准确移取 1 mL 复溶液溶解残余物，超声 1 min，混匀，过微孔滤膜后进液相色谱-串联质谱仪测定。

2.2.3.4 稀释溶剂的确定

液质方法中的提取、净化步骤均同液相方法保持一致。因液相方法中的复溶液中含有乙酸铵缓冲液，不适用于质谱条件。所以，根据优化后的质谱条件，将复溶液调整为液质流动相即乙腈/0.1%甲酸溶液（20/80，V/V）。经上机测定，该复溶液条件下，泰万菌素响应高，峰形好，因此，选择乙腈/0.1%甲酸溶液（20/80，V/V）为液质方法的稀释溶剂。

2.2.3.5 基质效应考察

采用将空白基质匹配标准溶液与纯溶剂配制标准溶液所制得的标准曲线的斜率进行比较的方法，来评价基质效应的强弱。计算公式为 $ME = S_m$ （空白基质匹配标准溶液制得的工作曲线的斜率）/ S_s （纯溶剂配制的标准溶液制得的工作曲线的斜率）。当 $|ME| \leq 20\%$ 时，说明基质对信号干扰较低，可忽略不计；当 $20\% < |ME| < 50\%$ 时，表现为中等强度的基质干扰，而当 $|ME| \geq 50\%$ ，则为强基质干扰。

针对不同种类饲料的基质效应进行考察，结果表明，不同饲料基质均对泰万菌素的测定存在不同程度的抑制效应，但猪和鸡的配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和精料补充料的基质抑制效应均低于 12%。根据专家反馈意见，我们进一步考察了泰万菌素在 Waters TSQ 和 Thermo Fisher Quantiva 不同质谱仪上的基质效应，结果表明各种饲料基质的基质效应均小于 12%。因此，我们采用标准溶液曲线对结果进行校正定量计算。各饲料基质的基质效应见表 15。

表 15 各饲料基质的基质效应考察结果

基质名称	质谱类型	基质效应 (%)
鸡配合饲料	Waters (TSQ)	9.3
	Thermo Fisher (Quantiva)	8.1
鸡浓缩饲料	Waters (TSQ)	7.5
	Thermo Fisher (Quantiva)	8.0
鸡预混合饲料	Waters (TSQ)	6.4
	Thermo Fisher (Quantiva)	8.9
猪配合饲料	Waters (TSQ)	5.3
	Thermo Fisher (Quantiva)	5.0
猪浓缩饲料	Waters (TSQ)	11.1
	Thermo Fisher (Quantiva)	10.8
猪预混合饲料	Waters (TSQ)	6.4
	Thermo Fisher (Quantiva)	7.1
精料补充料	Waters (TSQ)	5.6
	Thermo Fisher (Quantiva)	6.2
混合型饲料添加剂 植物提取物	Waters (TSQ)	9.3
	Thermo Fisher (Quantiva)	8.4
混合型饲料添加剂 微生物制剂	Waters (TSQ)	9.8
	Thermo Fisher (Quantiva)	10.3

2.2.3.6 方法学考察

(1) 线性

精确移取适量标准中间工作液，用流动相稀释定容，制得浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 的标准系列溶液（现用现配），由低浓度到高浓度供液相色谱-串联质谱仪测定。以色谱峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。求得泰万菌素的回归方程为 $Y=116618X+3364.2$ ， $R^2=0.9998$ ，大于 0.999，线性良好，见图 30。

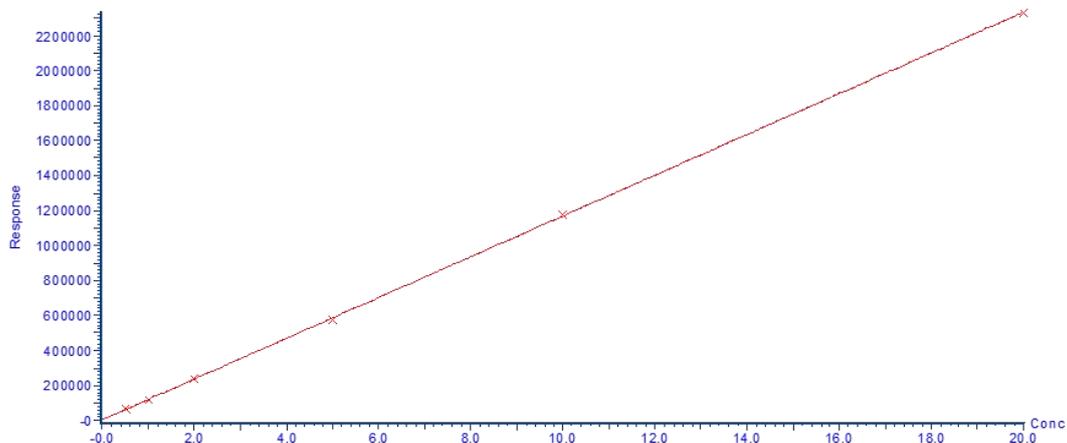


图 30. 泰万菌素标准曲线

(2) 方法的灵敏度

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了空白试样按相同的步骤处理后，结果表明：在相应的保留时间，空白试料对所测泰万菌素无干扰。

检出限 (LOD)：根据要求，添加适量泰万菌素标准溶液于 2 g 空白配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中，提取后测定，依据信噪比 $S/N \geq 3$ ，确定其检出限。试验结果表明，泰万菌素在配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中的检出限为 0.01 mg/kg。

定量限 (LOQ)：根据要求，添加适量泰万菌素标准溶液于 2 g 空白配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中，提取后测定，依据信噪比 $S/N \geq 10$ (按 PtP 算) 且添加回收试验中回收率在 60%~120%、批间批内 RSD 小于 15%，确定其定量限。试验结果表明，泰万菌素在配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中的定量限为 0.02 mg/kg。

(3) 方法的准确度和精密度考察 (LC-MS)

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了泰万菌素在猪和鸡的配合料、浓缩料以及预混合饲料中的添加回收情况。采用标准添加法，结合泰万菌素的批准用量，在空白饲料中添加 3 个不同水平泰万菌素进行准确度和精密度试验，猪配合饲料为 0.02 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg，猪浓缩饲料为 0.02 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg，猪预混料添加浓度为 0.02 mg/kg、50 mg/kg、500 mg/kg，鸡配合饲料为 0.02 mg/kg、250 mg/kg、500 mg/kg，鸡浓缩饲料为 0.02 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg，鸡预混料添加浓度为 0.02 mg/kg、500 mg/kg、2000 mg/kg。根据专家反馈意见增加精料补充料实验数据，精料补充料添加水平为 0.02 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg。各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 16~表 22。

表 16 猪配合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	78.5	73.3	74.2	74.6	71.5	74.4	3.4	4.0
	II	72.3	72.8	80.9	75.0	73.3	74.8	4.7	
	III	79.3	71.1	74.0	76.0	70.9	74.3	4.7	
50	I	84.4	87.7	82.8	88.3	84.8	85.6	2.7	3.9
	II	81.0	82.3	89.3	81.4	87.0	84.2	4.4	
	III	81.5	89.2	82.3	88.9	90.0	86.4	4.8	
100	I	97.1	98.2	92.6	92.4	93.9	94.8	2.8	3.7
	II	93.0	91.6	93.9	90.9	89.4	91.7	1.9	
	III	93.4	93.8	86.8	86.0	88.6	89.7	4.1	

表 17 猪浓缩饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	82.0	88.2	86.5	70.6	79.0	81.3	8.6	7.9
	II	75.2	77.5	81.5	84.4	79.6	79.6	4.4	
	III	72.6	88.5	70.8	71.3	76.2	75.9	9.7	
100	I	85.0	85.6	82.9	89.0	95.3	87.6	5.5	6.6
	II	82.9	96.7	95.1	97.4	94.7	93.4	6.4	
	III	95.5	83.1	89.3	84.4	82.2	86.9	6.4	
200	I	75.4	84.7	80.0	83.7	83.5	81.5	4.7	6.5
	II	83.0	75.3	78.8	83.9	84.2	81.0	4.8	
	III	76.6	95.0	85.8	75.9	87.6	84.2	9.6	

表 18 猪预混合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	86.5	75.3	81.4	77.7	76.9	79.5	5.6	4.8
	II	78.7	82.3	76.3	84.4	86.8	81.7	5.2	
	III	80.5	84.7	80.0	84.2	85.7	83.0	3.1	
50	I	92.6	84.3	89.1	96.0	84.2	89.3	5.8	5.7
	II	95.3	97.5	84.3	88.4	93.8	91.9	5.9	
	III	92.6	87.7	92.7	84.7	84.2	88.3	4.7	
500	I	94.7	96.0	92.6	94.3	99.2	95.3	2.6	3.0
	II	93.8	96.8	92.7	90.6	95.0	93.8	2.5	
	III	94.6	91.6	98.6	98.5	90.1	94.7	4.1	

表 19 鸡配合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	77.3	85.0	79.1	72.9	70.8	77.0	7.2	7.1
	II	85.2	79.0	70.4	71.3	67.5	74.7	9.7	
	III	78.8	76.1	71.6	80.3	72.7	75.9	4.9	
250	I	80.2	87.2	83.8	85.6	96.6	86.7	7.1	7.0
	II	97.4	92.2	89.1	80.7	77.3	87.3	9.5	
	III	87.9	91.9	89.8	94.3	79.4	88.7	6.4	
500	I	92.8	81.5	80.5	93.7	96.0	88.9	8.2	7.0
	II	75.7	85.4	77.8	86.4	80.7	81.2	5.7	
	III	82.6	82.0	83.2	90.4	85.5	84.7	4.0	

表 20 鸡浓缩饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	76.7	81.1	80.6	71.4	81.5	78.3	5.5	5.3
	II	72.7	76.4	73.4	72.4	77.8	74.6	3.3	
	III	81.7	84.4	72.0	77.5	77.7	78.7	6.0	
300	I	84.5	92.6	77.5	92.6	77.2	84.9	9.0	6.5
	II	80.7	89.9	77.3	84.4	83.9	83.2	5.7	
	III	89.1	87.0	81.2	85.6	92.5	87.1	4.8	
600	I	85.3	89.7	84.5	91.7	80.5	86.4	5.2	4.7
	II	87.7	80.4	89.2	82.8	83.1	84.6	4.3	
	III	85.3	84.8	79.1	82.7	91.6	84.7	5.4	

表 21 鸡预混合饲料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	83.5	70.2	80.4	81.0	79.5	78.9	6.4	5.8
	II	70.1	75.1	73.5	75.5	75.8	74.0	3.2	
	III	84.7	76.8	82.7	80.2	76.4	80.1	4.5	
500	I	90.3	88.9	85.2	95.0	92.9	90.5	4.1	5.2
	II	95.6	87.6	91.6	86.1	88.3	89.8	4.2	
	III	96.1	99.2	92.4	85.3	99.3	94.5	6.2	
2000	I	79.1	82.6	82.0	89.7	87.6	84.2	5.1	6.3
	II	92.1	91.4	78.5	90.1	90.5	88.5	6.4	
	III	81.3	94.2	79.8	81.9	82.8	84.0	6.9	

表 22 精料补充料中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	72.6	80.5	78.1	66.9	65.3	72.7	9.2	7.6
	II	65.8	75.6	64.7	73.4	71.9	70.3	6.8	
	III	76.7	79.0	65.5	70.9	76.7	73.8	7.5	
100	I	103.0	101.4	93.8	93.5	96.2	97.6	4.5	3.6
	II	96.4	97.9	92.1	98.8	98.5	96.7	2.9	
	III	90.0	99.8	102.4	97.4	89.8	95.9	6.0	
300	I	94.1	86.3	87.9	92.6	92.9	90.7	3.8	3.5
	II	95.9	92.0	95.1	94.1	88.2	93.0	3.3	
	III	89.4	91.4	87.8	86.4	91.2	89.3	2.5	
600	I	101.4	103.5	98.1	97.5	100.1	100.1	2.4	2.8
	II	101.6	104.4	105.5	97.4	101.1	102.0	3.1	
	III	97.7	106.7	102.7	101.4	98.5	101.4	3.6	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 0.02 mg/kg~2000 mg/kg 的泰万菌素，回收率为 67.5%~99.3%，批内、批间相对标准偏差均小于 9.7%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量的泰万菌素测定均有较好的准确度。不同饲料的空白及空白添加样品的特征离子色谱见图 31~图 45。

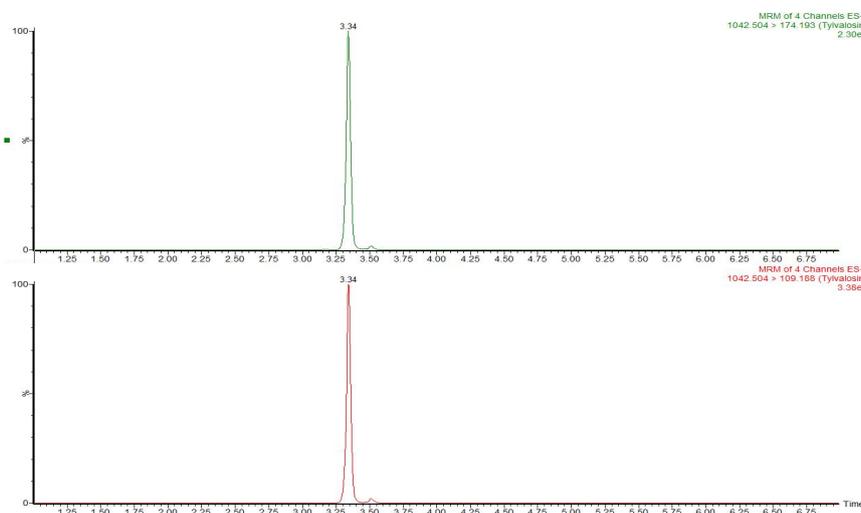


图 31.泰万菌素标准溶液特征离子色谱图 (1 ng/mL)

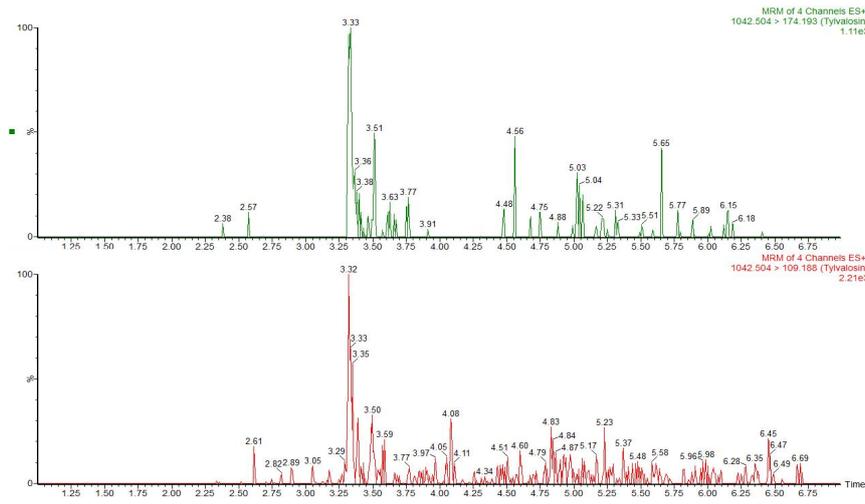


图 32.猪配合饲料基质空白特征离子色谱图

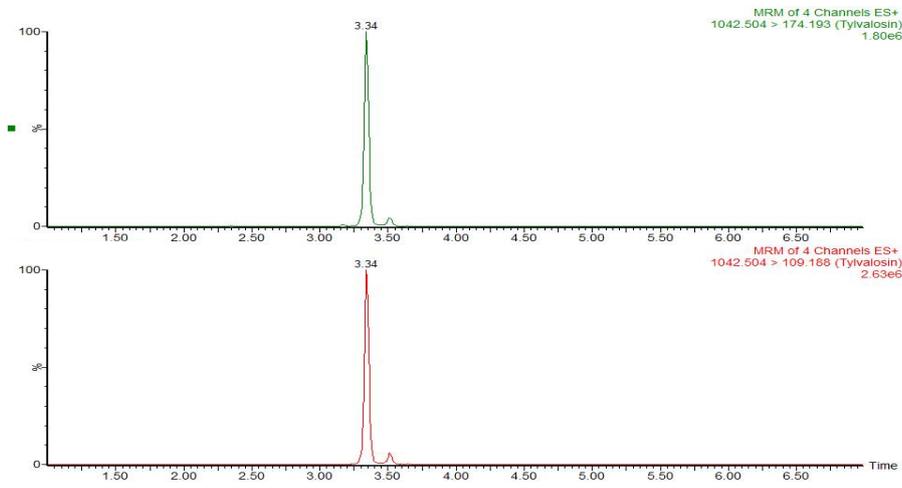


图 33.猪配合饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

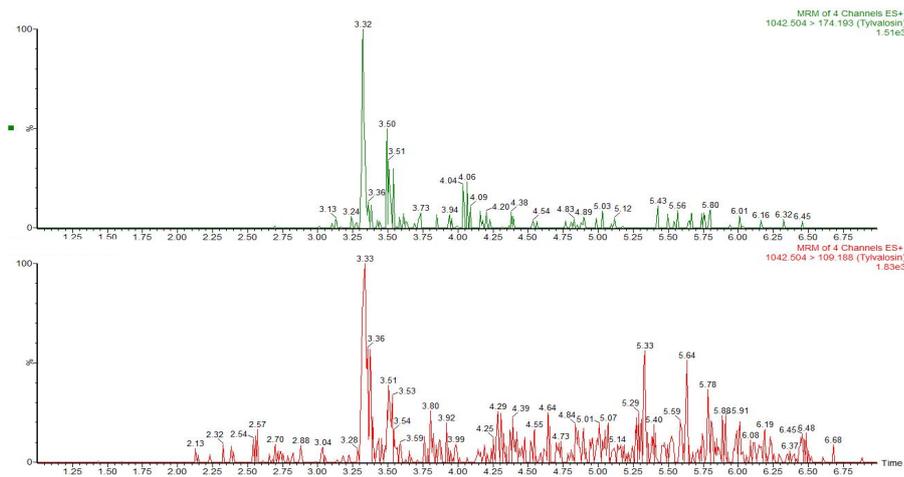


图 34.猪浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

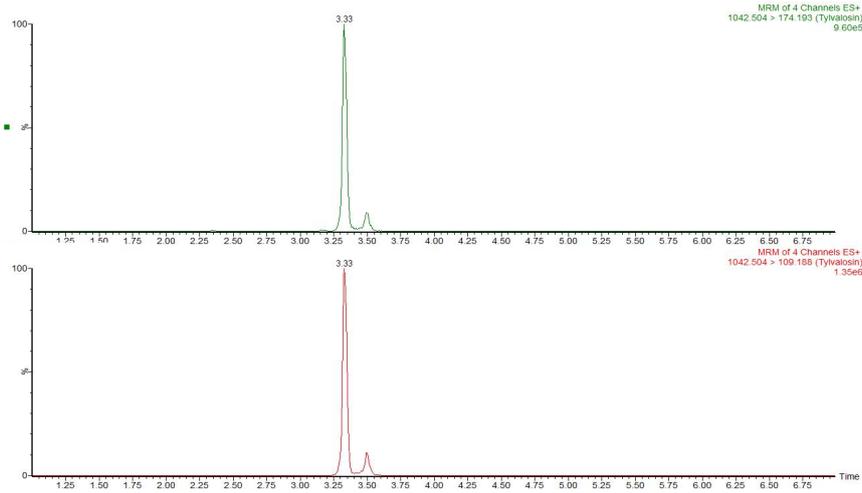


图 35.猪浓缩饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

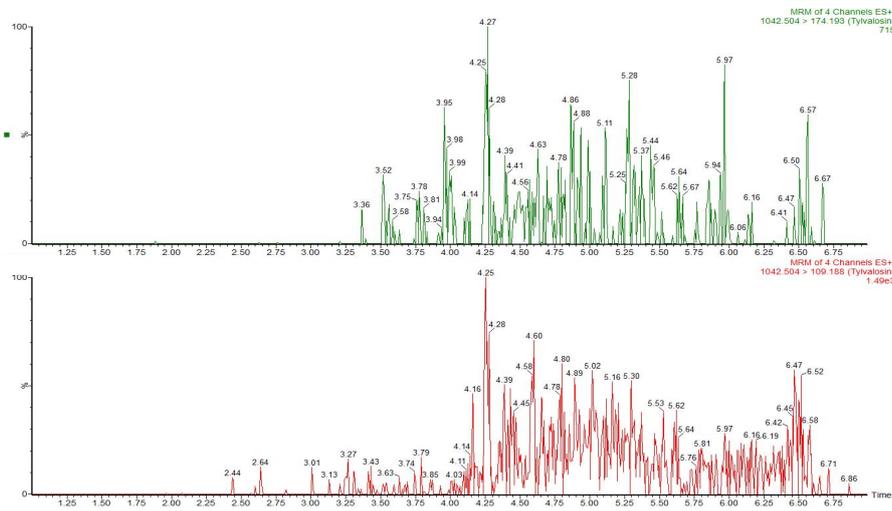


图 36.猪预混合饲料基质空白特征离子色谱图

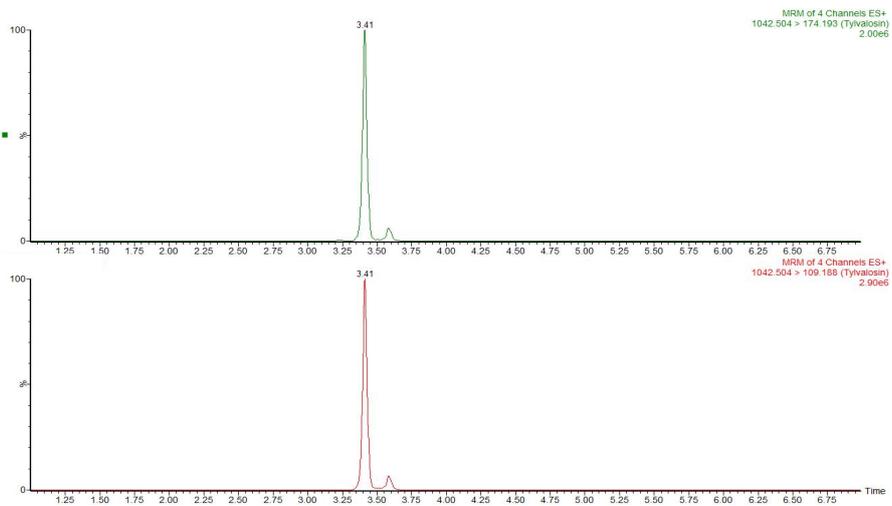


图 37.猪预混合饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

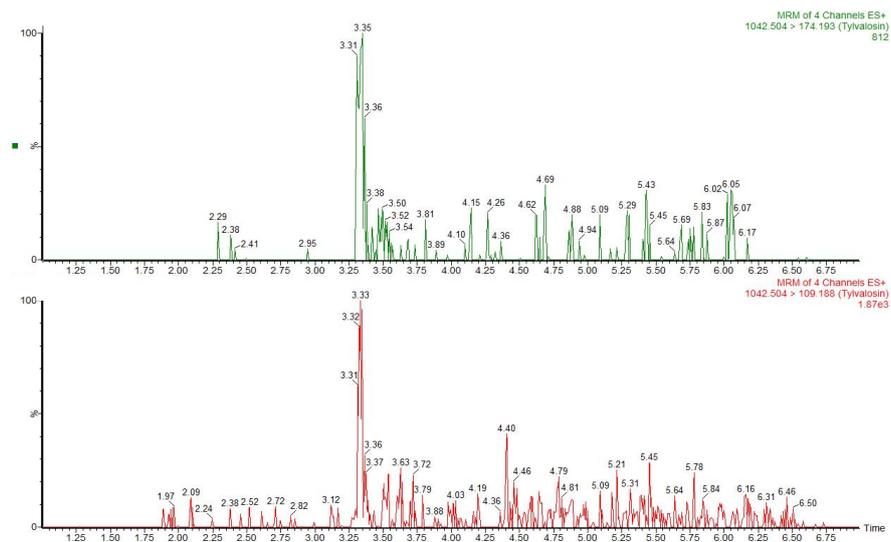


图 38.鸡配合饲料基质空白特征离子色谱图

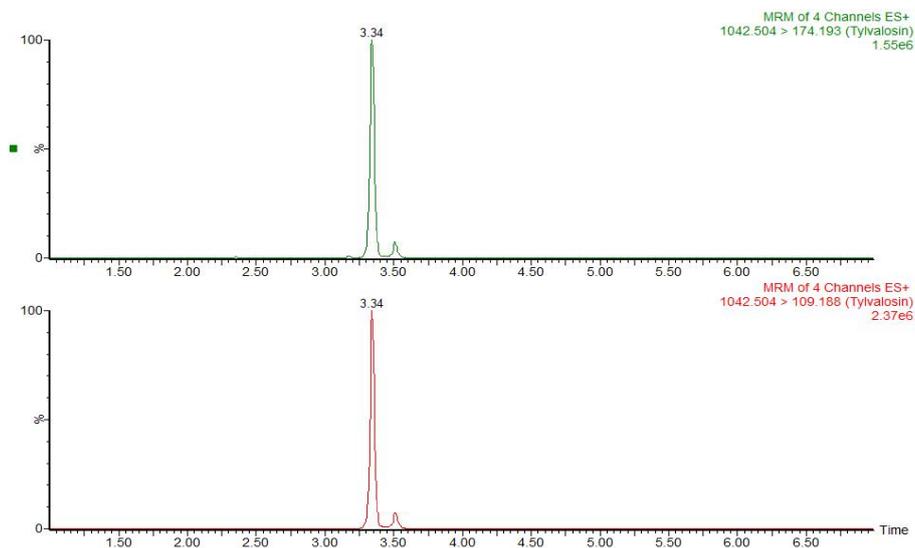


图 39.鸡配合饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

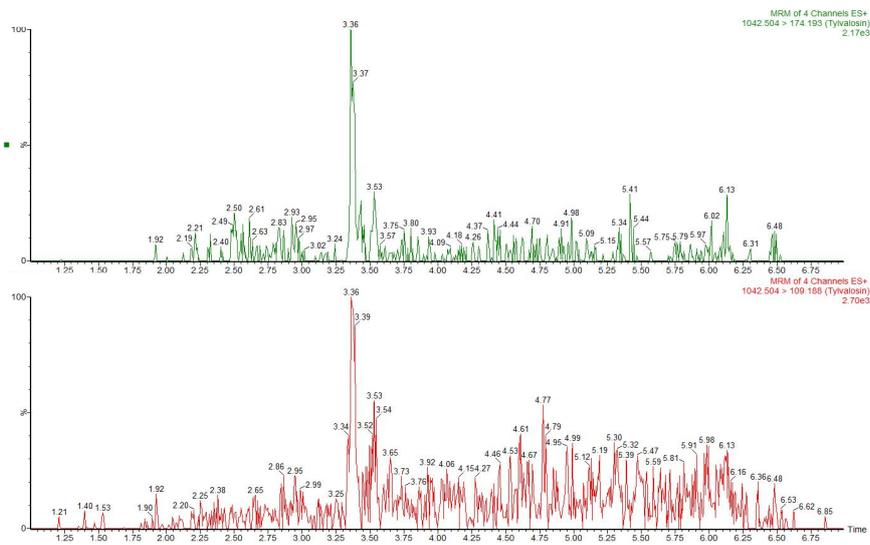


图 40.鸡浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

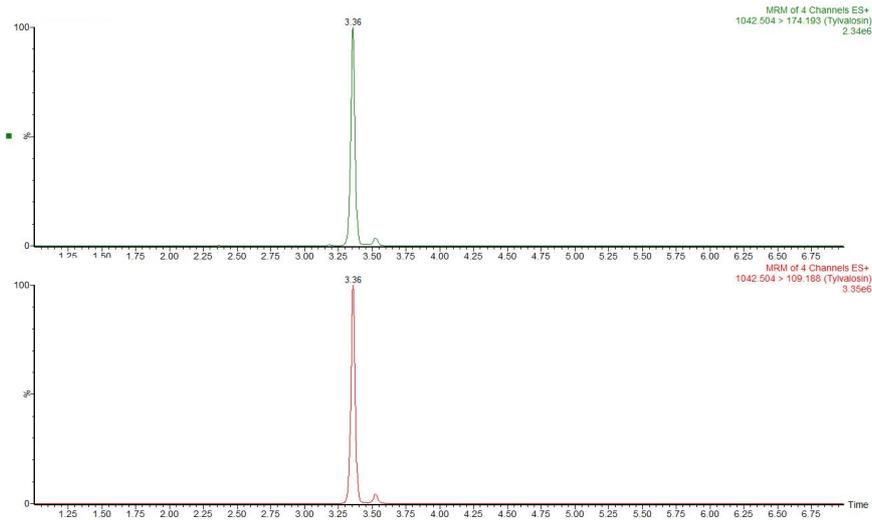


图 41.鸡浓缩饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

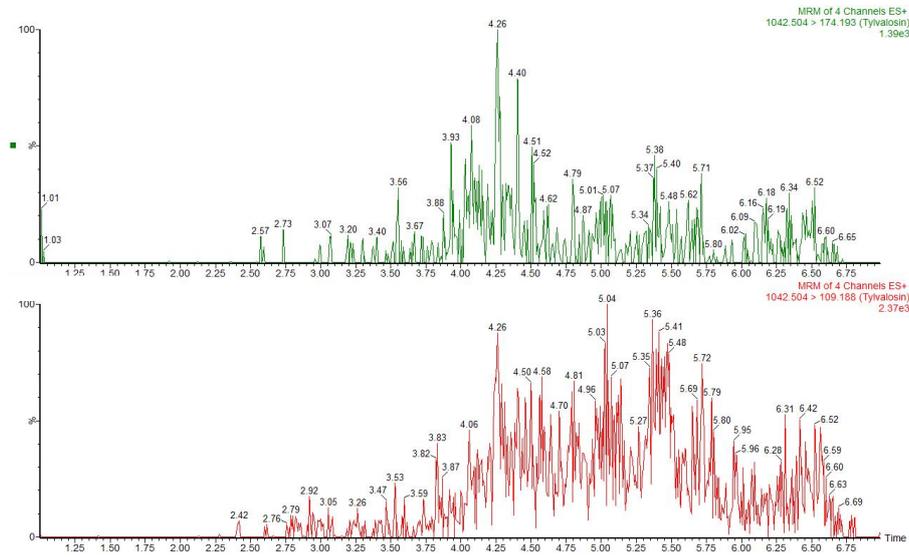


图 42.鸡预混合饲料基质空白特征离子色谱图

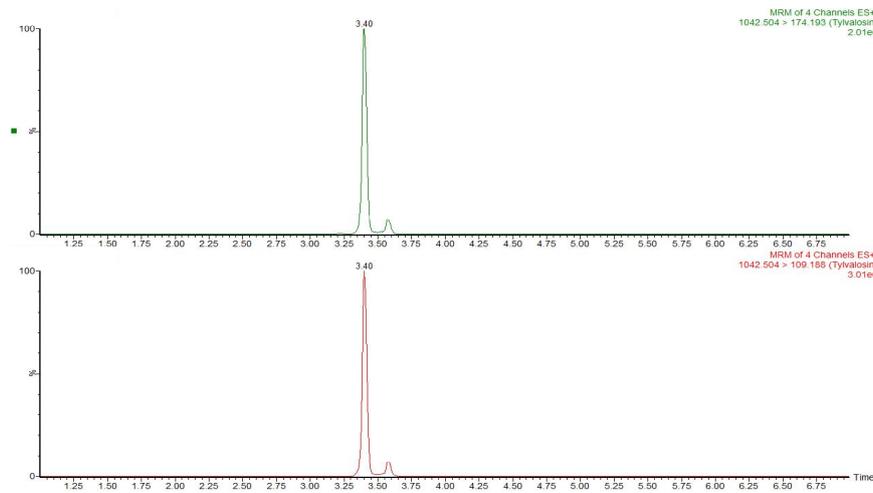


图 43.鸡预混合饲料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

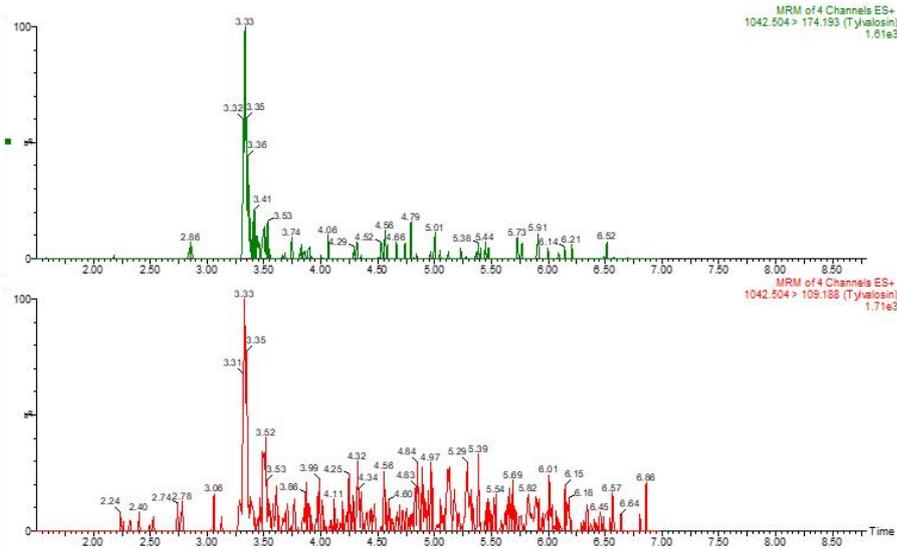


图 44.精料补充料基质空白特征离子色谱图

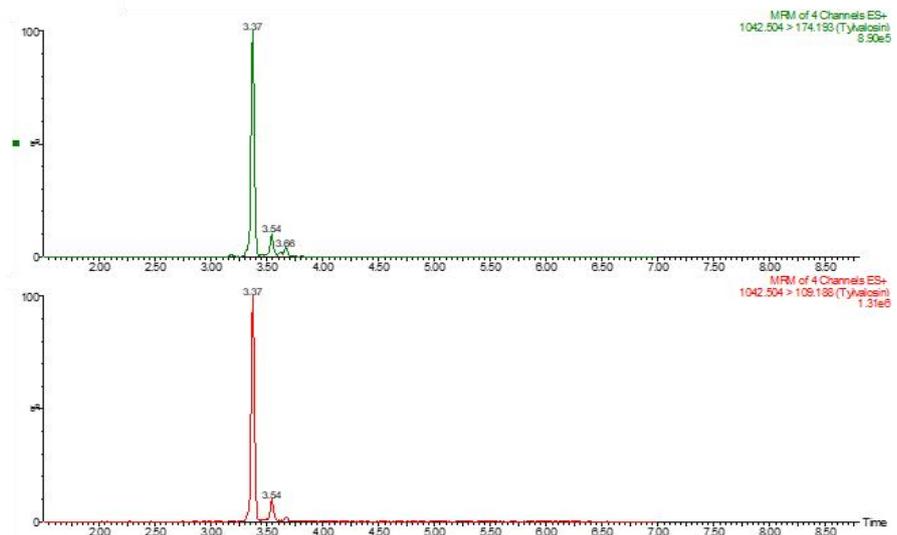


图 45.精料补充料空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

根据预审会专家意见，本方法的适用范围增加“混合型饲料添加剂”，并进一步考察其适用性。因此，采用标准添加法考察泰万菌素在植物提取物和微生态制剂类型的混合型饲料添加剂中的添加回收情况。在空白饲料中添加 0.02 mg/kg、500 mg/kg 和 2000 mg/kg 3 个不同水平泰万菌素进行准确度和精密度试验，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 23 和表 24。

表 23 微生物制剂类混合型饲料添加剂中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	95.2	98.2	96.4	100.3	95.1	97.1	2.3	
	II	97.4	97.5	99.0	98.3	99.8	98.4	1.0	1.8
	III	95.7	96.5	100.7	98.6	97.2	97.7	2.0	
500	I	99.3	93.0	100.1	97.3	97.9	97.5	2.8	
	II	100.3	99.1	94.6	96.0	93.9	96.8	2.9	2.6
	III	95.6	94.0	96.5	95.8	100.6	96.5	2.6	
2000	I	107.0	108.0	107.0	102.5	99.2	104.7	3.6	
	II	103.5	100.7	104.7	103.0	102.3	102.8	1.4	2.7
	III	106.3	104.9	105.2	109.7	106.0	106.4	1.8	

表 24 植物提取物类混合型饲料添加剂中泰万菌素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.02	I	98.5	97.3	104.3	96.6	102.3	99.8	3.4	
	II	99.2	104.5	101.4	97.4	101.3	100.7	2.7	2.9
	III	103.2	101.4	96.9	100.2	95.8	99.5	3.1	
500	I	96.5	100.2	99.4	99.4	98.5	98.8	1.4	
	II	98.2	99.3	99.2	100.2	100.3	99.4	0.9	1.5
	III	98.4	97.7	96.1	97.1	96.4	97.1	1.0	
2000	I	98.5	98.2	95.7	101.1	94.0	97.5	2.8	
	II	98.1	96.4	97.8	99.2	97.6	97.8	1.0	2.3
	III	99.5	98.3	100.0	103.1	95.7	99.3	2.7	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 0.02 mg/kg~2000 mg/kg 的泰万菌素，回收率为 94.0%~104.5%，批内、批间相对标准偏差均小于 3.4%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量的泰万菌素测定均有较好的准确度。不同基质的空白及空白添加样品的特征离子色谱见图 46~图 49。

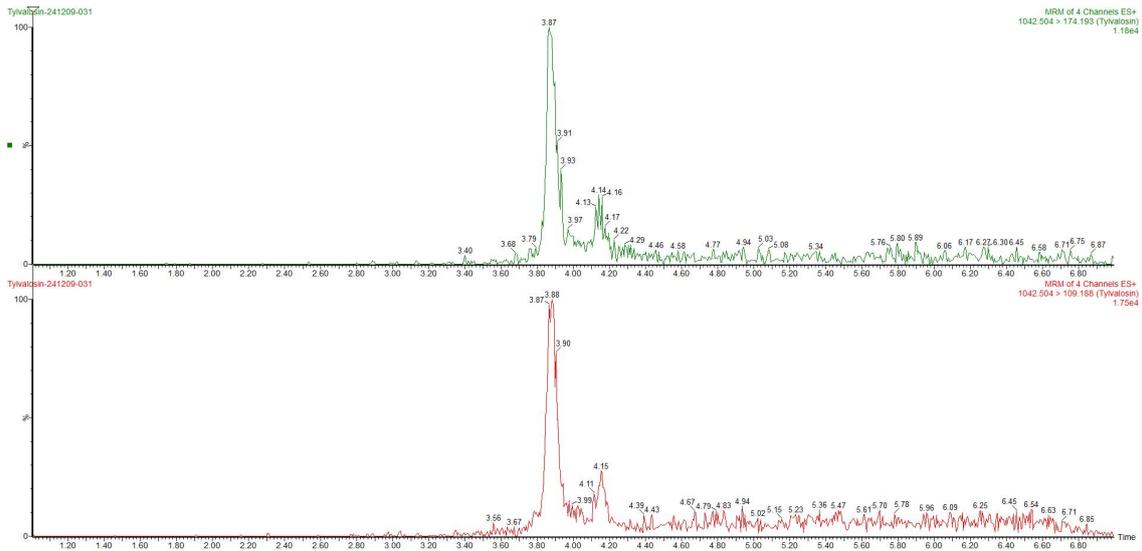


图 46. 微生物制剂类混合型饲料添加剂基质空白特征离子色谱图

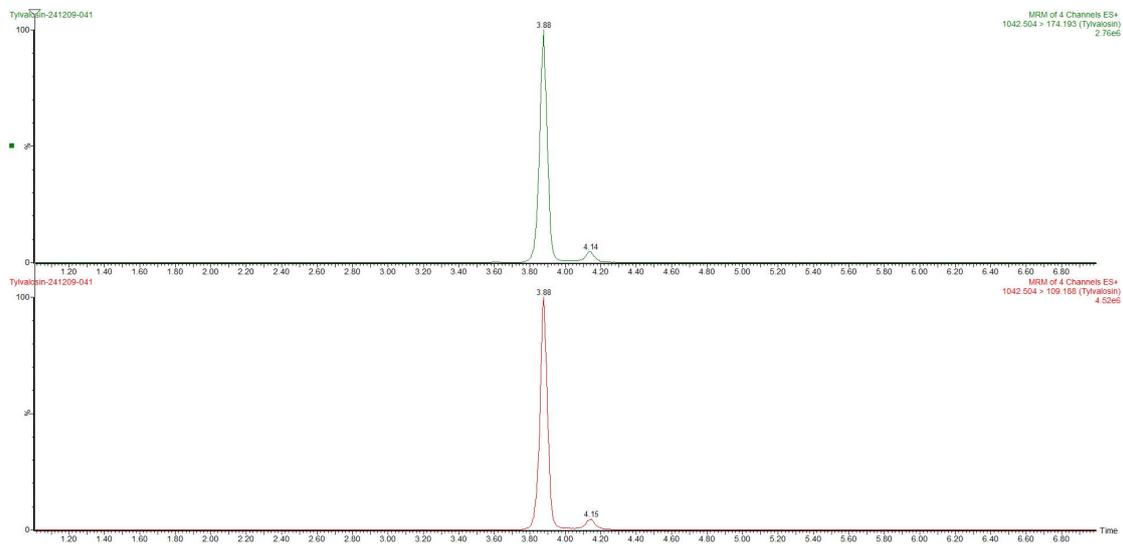


图 47. 微生物制剂类混合型饲料添加剂空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

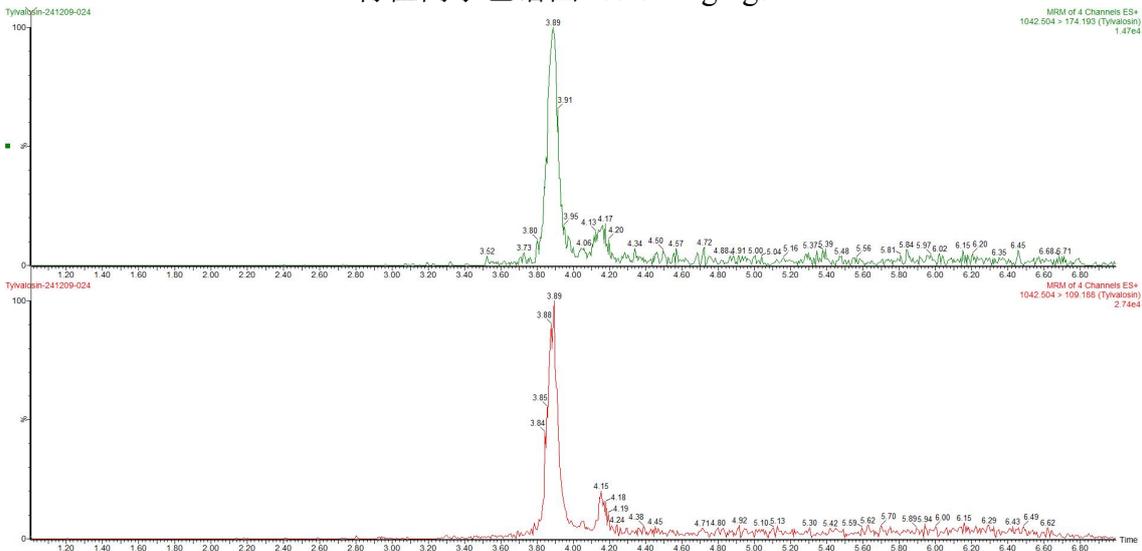


图 48. 植物提取物类混合型饲料添加剂基质空白特征离子色谱图

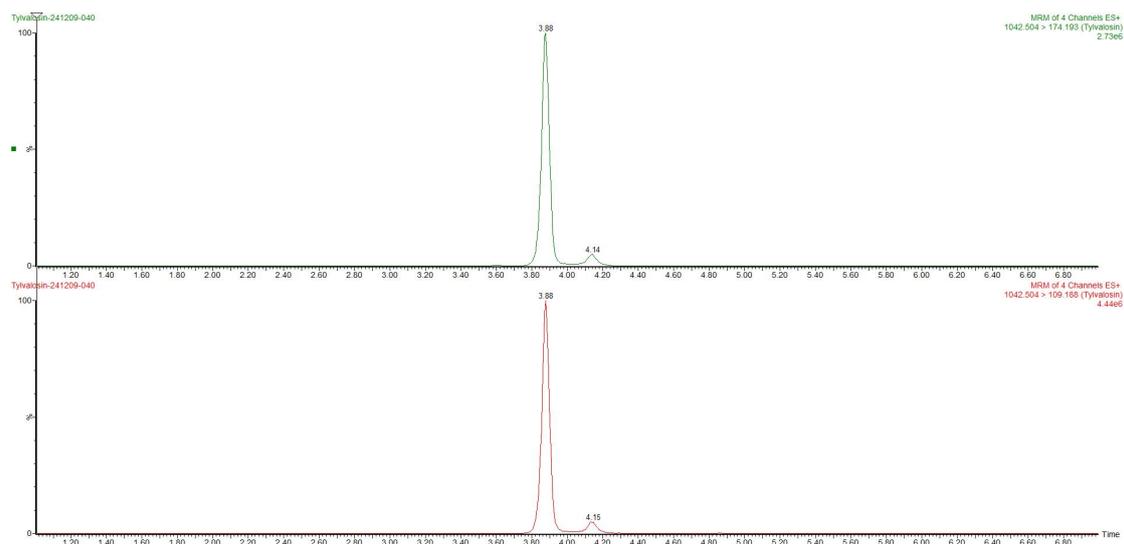


图 49. 植物提取物类混合型饲料添加剂空白添加泰万菌素特征离子色谱图 (0.02 mg/kg)

2.2.3.7 实际样品检测

根据专家反馈意见，采用本方法对鸡、猪配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料以及牛羊精料补充料等 24 份样品进行泰万菌素含量的测定。样品先采用液相法进行测定，液质法进行确证，其中阳性样品含量较高的稀释后进样，检测结果见表 25。结果表明，部分样品检出泰万菌素，表明该方法适用于鸡、猪配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料以及牛羊精料补充料中泰万菌素的测定。

表 25 实际样品测定结果

样品类别	泰万菌素含量 (mg/kg)		样品类别	泰万菌素含量 (mg/kg)	
	液相法	液质法		液相法	液质法
肉用仔鸡中期配合饲料	ND	ND	生长育肥猪浓缩饲料	<LOQ	0.04
肉小鸡配合饲料	ND	ND	哺乳母猪浓缩饲料	ND	ND
蛋鸡后备鸡前期配合饲料	ND	ND	乳猪浓缩饲料	ND	ND
肉中鸡配合饲料	ND	ND	高档猪用浓缩饲料	<LOQ	0.15
母猪妊娠后期配合饲料	ND	ND	猪复合预混合饲料	<LOQ (0.8)	0.78
生长育肥猪配合饲料	ND	<LOQ	猪复合预混合饲料	ND	ND
乳猪教槽配合饲料	ND	ND	仔猪前期复合预混料	<LOQ	0.15
仔猪后期配合饲料	ND	ND	种猪用复合预混料	ND	ND
肉羊育肥期精料补充料	ND	<LOQ	蛋鸡产蛋期复合预混合饲料	ND	ND
母羊精料补充料	ND	ND	产蛋鸡产蛋期复合预混合饲料	ND	ND
肉牛精料补充料	ND	ND	肉中鸡复合预混合饲料	ND	ND
育肥牛羊精料补充料	ND	ND	产蛋鸡产蛋期复合预混合饲料	ND	ND

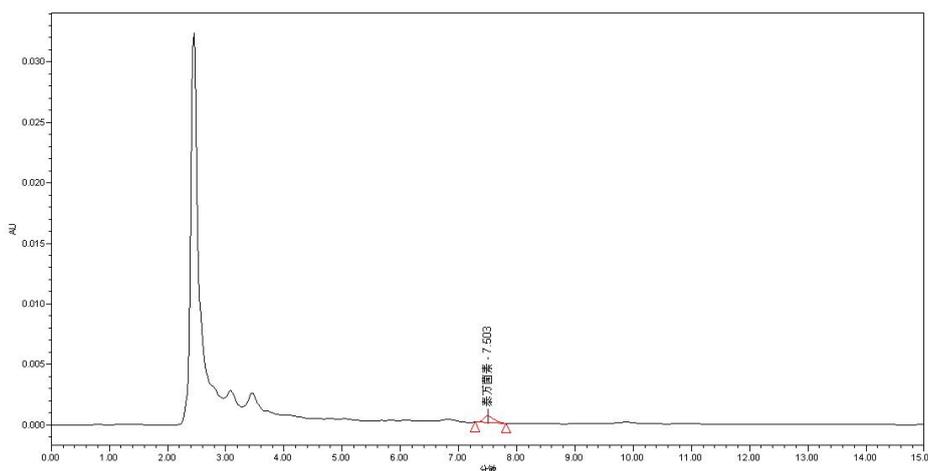


图 50.猪预混合饲料阳性样品色谱图

2.2.3.8 与《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》GB/T 42956-2023 的比较

对本标准中的液相色谱-串联质谱法与 GB/T 42956-2023 方法进行比较，并用标准添加法比较两种方法的检测结果，主要比较内容及相关结果见表 26。

表 26 本标准与 GB/T 42956-2023 方法的比较

项目	本标准	GB/T 42956-2023
目标物	泰万菌素	泰乐菌素 泰万菌素 替米考星
检测方法	液相法 + 液质法	液质法
定量方法	外标定量	内标定量
适用范围	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	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料
检出限与定量限	检出限为 0.01mg/kg， 定量限为 0.02mg/kg	检出限为 0.02mg/kg， 定量限为 0.05mg/kg
曲线范围	0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、 10 ng/mL 和 20 ng/mL	0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL
前处理	<p>提取：称取试样 2 g，准确加入 <u>乙腈 20 mL</u>，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 mL，混匀，备用。</p> <p>净化：磺酸型阳离子交换固相萃取柱依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液各 5 mL 活化。取全部备用液过柱，依次用水、0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇各 5 mL 淋洗，抽干。用 <u>5%氨水乙腈溶液 5 mL 洗脱</u>，收集洗脱液，于 40 °C 氮吹至干。准确移取 1 mL 复溶液溶解残余物，涡旋混匀，</p>	<p>提取：称取试样 2 g，准确加入 <u>50%乙腈 10 mL</u>，涡旋混匀，超声提取 10 min，300r/min 振荡提取 15 min，于 70 000 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 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 mL，混匀，备用。</p> <p>净化：混合型阳离子交换固相萃取柱依次用甲醇、水和 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液各 3 mL 活化。取全部备用液过柱，依次用 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液和水各 3 mL 淋洗，抽干。用 <u>5%氨水甲醇溶液 3 mL 洗脱</u>，收集洗脱液，混匀，滤膜过滤，待测。</p>

	超声 1 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 待测。	
检测结果	采用标准添加法, 泰万菌素添加水平为 50mg/kg, 按照标准方法进行处理, 结果回收率为 98.2%。	采用标准添加法, 泰万菌素添加水平为 50mg/kg, 按照标准方法进行处理, 结果回收率为 97.6%。

通过比较, 本标准包括液相和液质两种方法, 检测方法更多样; 本标准的液质检测方法相较于 GB/T 42956-2023 灵敏度更高, 适用范围更广; 添加回收试验结果表明两种检测方法的检测结果基本一致。

2.2.4 标准内容说明

2.2.4.1 检测方法基本原理

(1) 液相色谱法

试样经乙腈溶液提取, 磺酸型阳离子交换柱净化, 洗脱液吹干后, 用流动相溶液溶解, 供高效液相色谱仪检测, 外标法定量。

(2) 液相色谱-串联质谱法

试样经乙腈溶液提取, 磺酸型阳离子交换柱净化, 洗脱液吹干后, 用 20% 乙腈-0.1% 甲酸水溶液溶解, 供液相色谱-串联质谱仪检测, 外标法定量。

2.2.4.2 准确度结果

根据泰万菌素检测方法不同添加浓度的回收率原则要求, 三个复核单位的高效液相色谱法回收率范围也都在 60%~108% 之间, 批内批间变异系数也都小于 13%; 液相色谱-串联质谱法回收率范围也都在 64%~107% 之间, 批内批间变异系数也都小于 10%。因此本方法将回收率范围定在 60%~120% 之间。

2.2.5 结论

高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法测定饲料中泰万菌素的方法标准, 明确规定了适用范围、检测波长、提取净化等方法以及高效液相色谱条件、质谱条件等, 具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

三、试验验证的分析、综述报告, 技术经济论证, 预期的经济效果

本标准在制定过程中, 起草组委托分别北京英泰格瑞检测技术有限公司、上海市兽药饲料检测所和农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)三家单位对本方法进行了复核试验, 结果表明, 该方法均满足各项技术要求, 最终

确定了该方法的可行性。

本标准的制定和实施，一方面将大幅度提高饲料产品的安全性，把好饲料关口，提高相关农畜产品的安全性；另一方面也将为国家饲料质量安全监控提供有效的技术支撑，实现饲料工业和畜牧业绿色可持续发展。本标准的发布实施将为生产者提供技术服务，保证安全饲料产品的生产，避免生产者受到损失，间接提高生产者的经济效益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在制定过程中，起草组收集了国内相关行业标准，并结合国内外相关文献资料，对上述标准、文献进行分析和总结的基础上，通过实验室试验研究，完成了标准文本的起草。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准在制定过程中未采用国际标准。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等、严格执行国家强制性标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和 实施日期的建议等措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作。

(3) 建议本标准正式发布后，设定 6 个月的过渡期，过渡 6 个月后实施。

十、其他应当说明的事项

下达任务名称为《饲料中泰万菌素的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法》，根据专家反馈意见，并依据《标准编写规则—第4部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4-2015）中“6.1 标准名称”中的规定，将标准名称更改为《饲料中泰万菌素的测定》。

《饲料中泰万菌素的测定》课题组

二零二四年十二月

参考文献

- [1] 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.
- [2] GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则.
- [3] GB/T 20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准.
- [4] 姬竹玲. 泰万菌素颗粒剂的研制及其在猪体内的药动学研究[D]. 华南农业大学, 2016.
- [5] 汪莎莎. 动物性食品中泰乐菌素、泰万菌素、替米考星残留检测研究[D]. 华中农业大学, 2012.
- [6] 吴剑平, 张婧, 李丹妮, 严凤, 潘娟. 分散固相萃取法结合液相色谱串联质谱法检测鸡可食性组织中泰万菌素及3-乙酰泰乐菌素残留量[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(08): 30-39.
- [7] 吴家鑫, 尚飞, 张国栋, 刘敏, 张传良, 徐金雷, 赵梅仙, 宋敏, 齐鹏, 陶蓓蓓. UPLC-Q-TOF-MS 测定酒石酸泰万菌素可溶性粉中的泰万菌素[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(09): 108-110.