

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 282 号—2—2020

饲料中土霉素、四环素、金霉素、 多西环素的测定

Determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline,
doxycycline in feeds

2020-03-20 发布

2020-07-01 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。

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:河南省兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:吴宁鹏、李慧素、彭丽、李灵平、刘占通、杜红鸽、方忠意、刘凤美、张磊、于辉、班曼曼、陈少渠。

饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定

1 范围

本标准规定了饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素测定的高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法,液相色谱-串联质谱法为确证方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定。

本标准高效液相色谱法在配合饲料中的检测限为 3 mg/kg,定量限为 5 mg/kg;在添加剂预混合饲料、浓缩饲料和精料补充料中检测限为 10 mg/kg,定量限为 20 mg/kg。液相色谱-串联质谱法在配合饲料中的检测限为 0.01 mg/kg,定量限为 0.05 mg/kg;在添加剂预混合饲料、浓缩饲料和精料补充料中的检测限 0.025 mg/kg,定量限为 0.1 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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 样品

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取约 200 g,按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

4 高效液相色谱法(HPLC)

4.1 原理

用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液提取样品中的土霉素、四环素、金霉素、多西环素,高效液相色谱法-荧光法测定,外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、多西环素标准品,含量均 $\geq 93.0\%$ 。

4.2.2 甲醇:色谱纯。

4.2.3 枸橼酸溶液(0.1 mol/L):称取枸橼酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)21.01 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.2.4 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)71.63 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.2.5 盐酸溶液(1 mol/L):移取盐酸 9 mL,用水稀释至 100 mL。

4.2.6 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取氢氧化钠 4 g,用水溶解并稀释至 100 mL。

4.2.7 McIlvaine 缓冲溶液(pH 4.0):取 0.1 mol/L 枸橼酸溶液(4.2.3)1 000 mL、0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液(4.2.4)625 mL,混匀,用盐酸溶液(4.2.5)或氢氧化钠溶液(4.2.6)调 pH 至 4.0 ± 0.05 。

4.2.8 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液:取乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)60.5 g,加 McIlvaine 缓冲溶液(4.2.7)1 625 mL,溶解,混匀。

4.2.9 EDTA- $CaCl_2$ -乙酸盐缓冲液:取乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)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,用盐酸溶液(4.2.5)或氢氧化钠溶液(4.2.6)调 pH 至 6.6 ± 0.1 。

4.2.10 标准储备液(10 mg/mL):准确称取相当于土霉素、四环素、金霉素和多西环素各约 100 mg 的盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素和多西环素标准品,分别于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成浓度为 10 mg/mL 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液, -20°C 以下保存,有效期为 1 个月。

4.2.11 混合标准工作液(2 mg/mL):准确吸取标准储备液(4.2.10)2 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成浓度为 2 mg/mL 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准工作液。 -20°C 以下保存。有效期为 1 个月。

4.2.12 微孔滤膜($0.45\ \mu\text{m}$):亲水性聚丙烯滤膜或性能相当者。

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 分析天平:感量 0.01 mg。

4.3.3 天平:感量 1 mg。

4.3.4 离心机:转速 $\geq 10\ 000\ \text{r/min}$ 。

4.3.5 涡旋混合器。

4.3.6 涡旋振荡器。

4.3.7 超声波清洗器。

4.3.8 酸度计。

4.4 测定步骤

4.4.1 提取

称取适量试样约 2 g(配合料 5 g)精确至 0.002 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)20 mL,涡旋混合后振荡 10 min,超声提取 10 min, $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min,移取上清液至另一离心管中。残渣分别用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)20 mL、10 mL 重复提取 2 次,合并 3 次上清液,混匀,用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)定容至 50 mL 备用。取备用液过微孔滤膜(4.2.12),供 HPLC 测定。

4.4.2 标准曲线的制备

准确移取土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准工作液适量,用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)稀释,制得浓度为 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $1\ \mu\text{g/mL}$ 、 $2\ \mu\text{g/mL}$ 、 $5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $10\ \mu\text{g/mL}$ 和 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液,由低浓度到高浓度进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。土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准溶液色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

4.5 测定

4.5.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 $5\ \mu\text{m}$,或相当者。

流动相:A 相为 EDTA- CaCl_2 -乙酸盐缓冲液,B 相为甲醇,梯度洗脱条件见表 1。

检测波长:激发波长 380 nm,发射波长 495 nm。

柱温: 30°C 。

流速: $0.8\ \text{mL/min}$ 。

进样量: $20\ \mu\text{L}$ 。

表 1 梯度洗脱条件

时间, min	A 相, %	B 相, %
0	75	25

表 1 (续)

时间, min	A 相, %	B 相, %
20	30	70
24	30	70
28	75	25
30	75	25

4.5.2 定量测定

取试样溶液和标准工作液上机分析, 根据保留时间确定待测物, 得到色谱峰面积响应值, 作单点或多点校准, 外标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液浓度超过线性范围, 用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)稀释后重新测定。

4.6 试验数据处理

试样中待测物含量以质量分数 X_i 表示, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按式(1)和式(2)计算。

$$X_i = \frac{C_i \times V \times n \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

$$C_i = \frac{C_{si} \times A_i}{A_{si}} \quad (2)$$

式中:

C_i ——试样溶液中 i 药物浓度, 单点校准时, 由式(2)计算得到, 多点校准时, 从标准曲线查得, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

C_{si} ——混合标准工作液中 i 药物浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_i ——试样溶液中 i 药物的峰面积;

A_{si} ——混合标准工作液中 i 药物的峰面积;

V ——试样的提取液总体积, 单位为毫升(mL);

m ——试样的质量, 单位为克(g);

n ——稀释倍数;

1 000——换算系数。

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

在重复性条件下获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值算术平均值的 20%, 以大于 20% 的情况不超过 5% 为前提。

5 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)

5.1 原理

用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液提取样品中的土霉素、四环素、金霉素、多西环素, 提取液经 HLB 固相萃取柱净化, 氮气吹干, 30% 甲醇溶液溶解, 用液相色谱-串联质谱法测定, 外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明, 在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 乙腈: 色谱纯。

5.2.2 甲醇: 色谱纯。

5.2.3 30% 甲醇溶液: 取甲醇 30 mL, 用水溶解并稀释至 100 mL。

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 标准储备液(1 mg/mL): 准确称取相当于土霉素、四环素、金霉素和多西环素各约 50 mg 的盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素和盐酸多西环素标准品, 分别于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成浓度为 1 mg/mL 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液, -20°C 以下保存, 有效期为 1 个月。

5.2.6 混合标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):准确吸取标准储备液(5.2.5)1.0 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用 30%甲醇溶液(5.2.3)稀释并定容,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准工作液。0℃~4℃保存,现配现用。

5.2.7 亲水亲脂平衡固相萃取柱(HLB):60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.2.8 微孔滤膜(0.22 μm):通用型或性能相当者。

5.3 仪器和设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平:感量 0.01 mg。

5.3.3 天平:感量 1 mg。

5.3.4 离心机:转速 $\geq 10\,000$ r/min。

5.3.5 涡旋混合器。

5.3.6 涡旋振荡器。

5.3.7 超声波清洗器。

5.3.8 酸度计。

5.3.9 氮吹仪。

5.4 试验步骤

5.4.1 提取

同 4.4.1。

5.4.2 净化

HLB 固相萃取柱(5.2.7)依次用甲醇、水、EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.2.8)各 3 mL 活化,准确移取备用液 2 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 30%甲醇溶液(5.2.3)1 mL 溶解残余物,混匀后过微孔滤膜过滤(5.2.8),供液相色谱-串联质谱仪测定。

5.4.3 基质匹配标准曲线的制备

取 6 份空白试样,按 5.4.1~5.4.2 步骤处理,洗脱液中分别加入四环素混合标准工作液(5.2.6)适量,于 40℃下氮气吹干,加入 30%甲醇溶液(5.2.3)1.0 mL 溶解残余物,制成 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 系列标准溶液,混匀,过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

5.5 测定

5.5.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 100 mm,柱内径 2.1 mm,粒度 1.7 μm ,或相当的分析柱。

柱温:35℃。

流动相:A 相为 0.1%甲酸溶液,B 相为乙腈,梯度洗脱条件见表 2。

流速:0.3 mL/min。

进样量:2 μL 。

表 2 梯度洗脱条件

时间, min	A 相, %	B 相, %
0	90	10
4.0	60	40
5.0	60	40
6.0	90	10
7.5	90	10

5.5.2 质谱参考条件

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:1.0 kV。
源温:150℃。
雾化温度:400℃。
锥孔气流速:50 L/h。
雾化气流速:800 L/h。
定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 3。

表 3 定性离子对、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量

药物名称	保留时间 min	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
土霉素	2.48	461.2>426.1	461.2>426.1	38	18
		461.2>337.0			26
四环素	2.74	445.1>410.0	445.1>410.0	2	18
		445.1>154.0			26
金霉素	3.55	479.2>444.0	479.2>444.0	40	20
		479.2>154.0			26
多西环素	3.78	445.2>154.0	445.2>154.0	34	28
		445.2>321.0			28

5.5.3 定性测定

待测物选择 1 个母离子和 2 个子离子,在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与混合标准工作液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且试样中目标化合物 2 个子离子的相对丰度与浓度接近的混合标准工作液相对丰度进行比较,偏差不得超过表 4 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 4 定性确证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
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

5.5.4 定量测定

取试样溶液和混合标准工作液上机分析,得到色谱峰面积响应值,作单点或多点校准,外标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液浓度超过线性范围时,稀释后重新测定。土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准溶液的特征离子色谱图参见图 A. 2。

5.6 试验数据处理

试样中待测物含量以质量分数 X_i 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(3)计算。

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

式中:

- C_i ——试样溶液中 i 药物浓度,单点校准时,由式(2)计算得到,多点校准时,从标准曲线查得,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V ——试样的提取液总体积,单位为毫升(mL);
- V_1 ——过固相萃取柱的提取液体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数;

1 000——换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值,不大于这 2 个测定值算术平均值的 20%,以大于 20%的情况不超过 5%为前提。



附录 A
(资料性附录)
混合标准溶液色谱图

A.1 四环素类药物混合标准溶液(5 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图

见图 A.1。

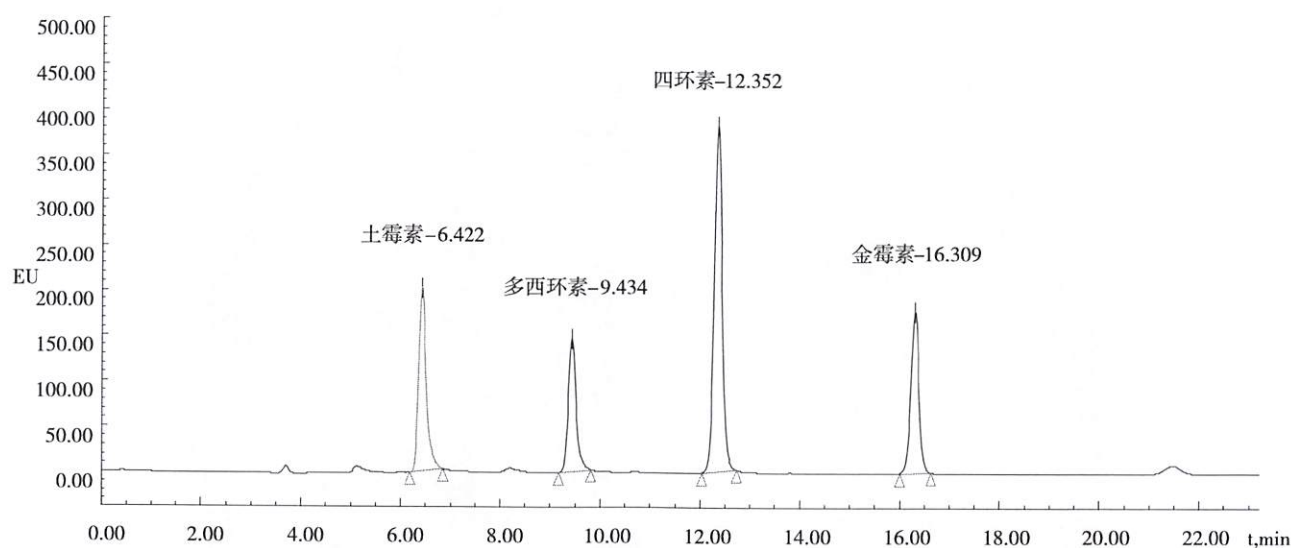
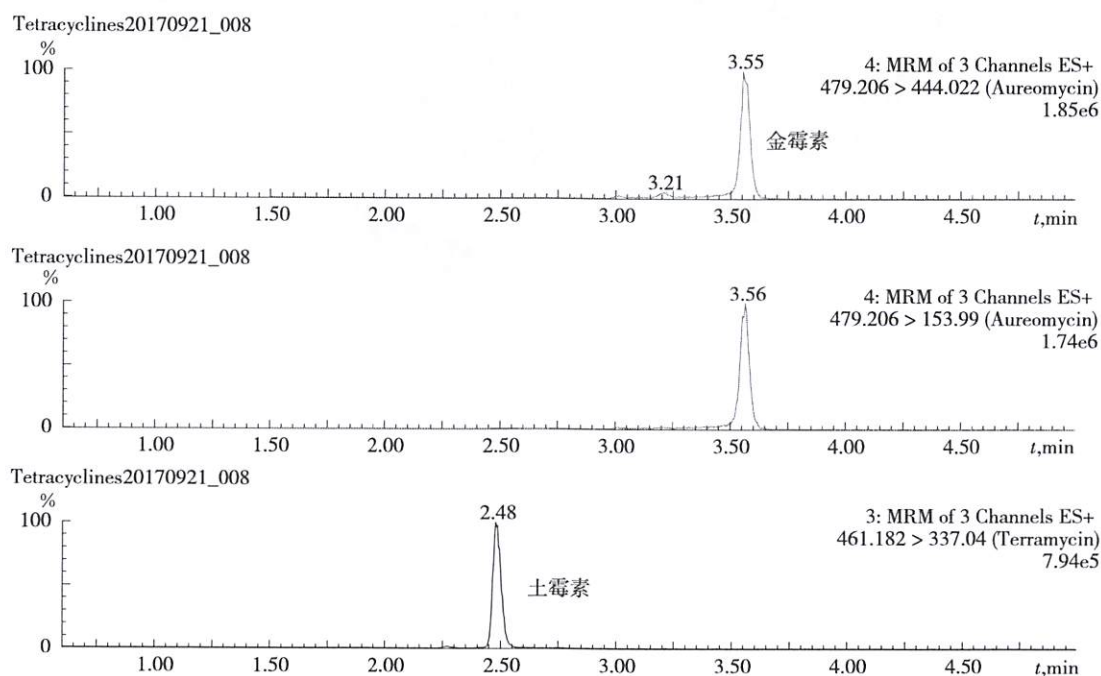


图 A.1 四环素类药物混合标准溶液(5 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图

A.2 四环素类药物基质匹配标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)的特征离子质量色谱图

见图 A.2。



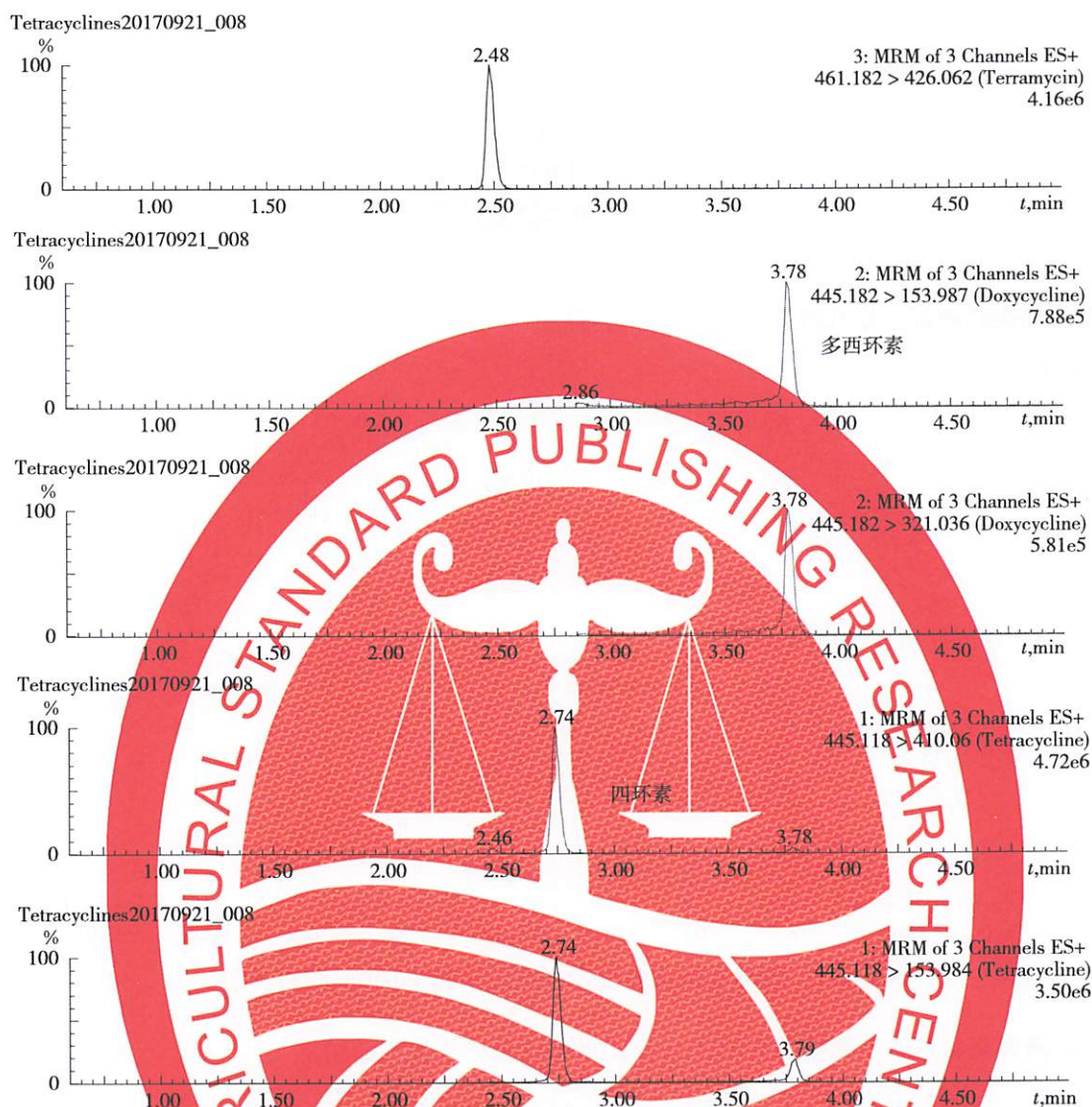


图 A.2 四环素类药物基质匹配标准溶液(20 µg/L)的特征离子质量色谱图

中华人民共和国
国家标准

饲料中土霉素、四环素、金霉素、
多西环素的测定

农业农村部公告第 282 号—2—2020

* * *

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 1 字数 20 千字

2020 年 6 月第 1 版 2020 年 6 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8079

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第 282 号—2—2020