

中华人民共和国国家标准

GB/T 45643—2025



饲料中异噻唑啉酮类化合物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of isothiazolinone compounds in feeds—Liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

2025-05-30 发布

2025-12-01 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：上海市动物疫病预防控制中心、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国农业科学院饲料研究所。

本文件主要起草人：黄土新、张婧、吴雨珊、严凤、曹莹、吴剑平、樊霞、马莹、李俊、谷旭、商军、索德成、黄家莺、潘娟、张浩然、徐汀、王博、贾铭。



饲料中异噻唑啉酮类化合物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中 3 种异噻唑啉酮类化合物的液相色谱-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、添加剂预混合饲料及混合型饲料添加剂中甲基异噻唑啉酮(MIT)、甲基氯异噻唑啉酮(CIT)、噻霉酮(BIT)的测定。

本文件检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

试样中的待测物用乙腈提取,经通过式亲水亲脂平衡固相萃取柱净化,用液相色谱-串联质谱仪检测,基质匹配标准曲线校准,外标法定量。

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 甲醇:色谱纯。

5.3 乙腈。

5.4 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取标准品 MIT(CAS 号:2682-20-4,纯度不低于 99%)、CIT(CAS 号:26172-55-4,纯度不低于 99%)、BIT(CAS 号:2634-33-5,纯度不低于 99%)适量(精确至 0.01 mg),分别用甲醇(5.2)溶解、定容、混匀,配制成 1 mg/mL 的标准储备溶液,或购买市售有证标准溶液。于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期为 6 个月。

5.5 混合标准中间溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确移取标准储备溶液(5.4)各 100 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.2)稀释、定容,混匀。于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.6 混合标准系列溶液:准确移取适量混合标准中间溶液(5.5)于容量瓶中,分别用水稀释配制成质量

浓度分别为 2.5 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的混合标准系列溶液。临用现配。

5.7 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。

5.8 通过式亲水亲脂平衡固相萃取柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6.2 分析天平:精度 0.01 mg 和 0.01 g。

6.3 振荡器:转速不低于 1 500 r/min。

6.4 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备样品,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。选取类型相同、均匀一致,且在待测物保留时间处的仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为空白样品。



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 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 乙腈(5.3),涡旋混匀 1 min,振荡提取 10 min,4 000 r/min 离心 5 min,移取上清液于另一离心管中。重复提取一次,合并上清液,混匀,备用。

8.2 净化

移取 2 mL 备用液(8.1)过固相萃取柱(5.8),收集滤出液于 10 mL 离心管中,充分混匀。准确移取 0.5 mL 滤出液,加水定容至 2 mL,涡旋混匀,微孔滤膜(5.7)过滤,待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取空白试样,按照 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液,准确移取混合标准系列溶液(5.6)各 100 μL ,用空白基质溶液定容至 1 mL,涡旋混合 30 s,配制质量浓度分别为 0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液,待测。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 柱,长 100 mm,内径 3.0 mm,粒径 1.8 μm ,或性能相当者;
- 流动相:A 相为水(5.1),B 相为甲醇(5.2),梯度洗脱程序见表 1;
- 流速:0.3 mL/min;
- 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;

e) 进样量:5 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间 min | A % | B % |
|-----------|--------|--------|
| 0.00 | 70 | 30 |
| 6.50 | 10 | 90 |
| 7.40 | 10 | 90 |
| 7.50 | 70 | 30 |
| 11.00 | 70 | 30 |

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源模式:电喷雾电离源;
- b) 扫描方式:正离子;
- c) 监测方式:多反应监测(MRM);
- d) 电离电压:4.0 kV;
- e) 源温度:350 $^{\circ}\text{C}$;
- f) 鞘气:4.6 L/min;
- g) 反吹气:1 L/min;
- h) 辅助气:8 L/min;
- i) 雾化器温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。

MRM 离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 异噻唑啉酮类化合物 MRM 离子对、锥孔电压及碰撞能量参考值

| 被测物名称 | 监测离子对 m/z | 锥孔电压 V | 碰撞能量 eV |
|-------|--------------------------|-----------|------------|
| MIT | 116.1>71.0 | 58 | 21 |
| | 116.1>101.1 ^a | | 24 |
| CIT | 150.2>87.0 ^a | 109 | 37 |
| | 150.2>115.0 | | 20 |
| BIT | 152.0>105.0 | 87 | 23 |
| | 152.0>109.0 ^a | | 22 |

^a 定量离子。

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子对色谱图见附录 A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液(质量浓度相当)中待测物的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样谱图中待测物定性离子对的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子对的相对离子丰度,若偏差超过表 3 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性确证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 |

%

8.4.5 定量

以基质匹配标准溶液中待测物质量浓度为横坐标,定量离子对色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液与基质匹配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,应用空白基质溶液稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物质量浓度与基质匹配标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 计,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- ρ_i ——由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 ——提取溶液总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- V_2 ——移取的滤出液体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g);
- f ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中待测物的峰面积;
- ρ_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 ——提取溶液总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- A_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物的峰面积;



V_2 ——移取的滤出液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

f ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

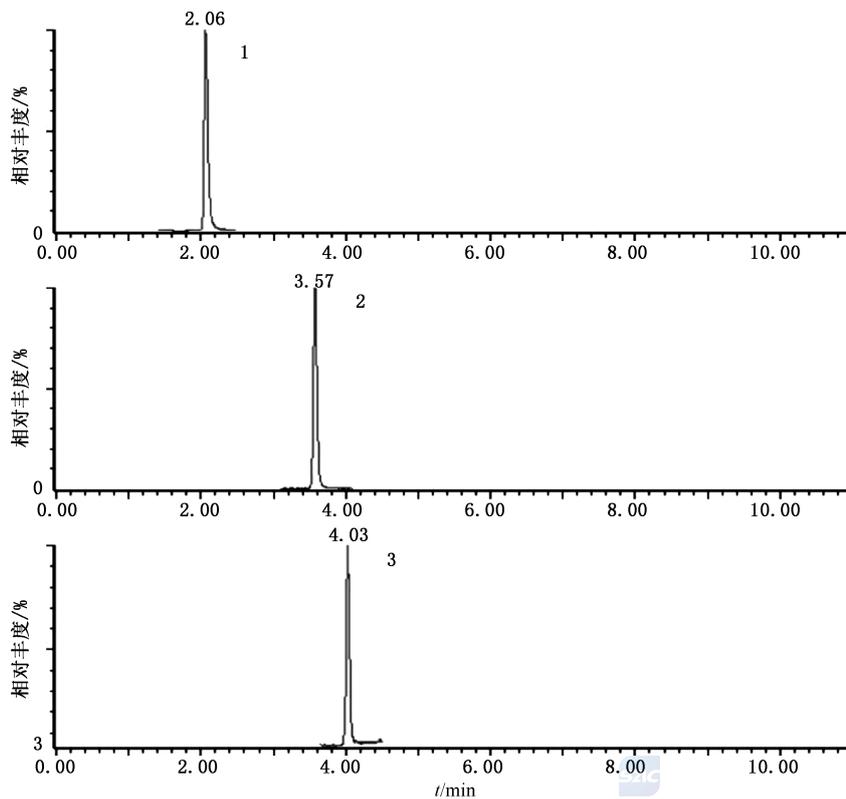
10 精密度

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 20%。

附录 A
(资料性)

3 种异噻唑啉酮类化合物基质匹配标准溶液定量离子色谱图

3 种异噻唑啉酮类化合物基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

- 1——MIT；
- 2——CIT；
- 3——BIT。

图 A.1 3 种异噻唑啉酮类化合物基质匹配标准溶液(5 ng/mL)定量离子色谱图