

ICS 65.120
CCS B 46

团 体 标 准

T/CFIAS 6017—2025

饲料中 4 种解热镇痛类药物的测定

Determination of four antipyretic and analgesic drugs in feeds

2025-8-1 发布

2025-9-1 实施

中国饲料工业协会 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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：上海市兽药饲料检测所、浙江省兽药饲料监察所、江苏省兽药饲料质量检验所、安徽省兽药饲料监察所、中国农业科学院饲料研究所。

本文件主要起草人：徐汀、张婧、黄家莺、张浩然、黄士新、曹莹、华贤辉、商军、陶玉洁、严凤、吴雨珊、张传亮、储瑞武、吴昊、谷旭、王彬、耿士伟、刘发全、贾铭、吴贊竑、郑胜兰、明文庆、王杰、柴娟、贾书静、宋亚伟、张博、尹原妍、丁在亮、吴玲、束玲玲。

饲料中 4 种解热镇痛类药物的测定

1 范围

本文件描述了饲料中对乙酰氨基酚、安乃近、氨基比林、安替比林4种解热镇痛类药物的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件中高效液相色谱法适用于混合型饲料添加剂、添加剂预混合饲料、浓缩饲料和配合饲料中对乙酰氨基酚、安乃近、氨基比林、安替比林的测定；液相色谱-串联质谱法适用于饲料和饲料添加剂中对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林（安乃近标识物）、氨基比林、安替比林的测定。

本文件对乙酰氨基酚、氨基比林、安替比林的高效液相色谱法检出限为5 mg/kg、定量限为25 mg/kg，安乃近检出限为15 mg/kg、定量限为35 mg/kg；本文件对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林、氨基比林、安替比林的液相色谱-串联质谱法的检出限为25 μ g/kg、定量限为50 μ g/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

试样中的待测物用甲醇提取，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 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙腈：色谱纯。

4.2.4 磷酸盐缓冲液：取磷酸氢二钠3.0 g，加水1 000 mL，用磷酸调pH值至7.0，混匀。

4.2.5 标准储备溶液(5 mg/mL)：根据纯度，称取对乙酰氨基酚标准品(CAS: 103-90-2，纯度≥98%)、安乃近标准品(CAS: 5907-38-0，纯度≥94.5%)、氨基比林标准品(CAS: 58-15-1，纯度≥98%)、安替比林标准品(CAS: 60-80-0，纯度≥98%)适量（精确至0.1 mg），分别置于棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)溶解并定容，混匀。于-18 ℃以下避光保存，有效期为6个月。

4.2.6 混合标准中间溶液(250 μ g/mL)：准确移取标准储备溶液(4.2.5)各5 mL于100 mL棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)稀释定容。于2 ℃~8 ℃避光保存，有效期为3个月。

4.2.7 混合标准系列溶液：分别准确移取适量混合标准中间溶液(4.2.6)于棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)稀释定容，混匀，配成待测物质量浓度为0 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL的标准曲线系列溶液。临用现配。

4.2.8 微孔滤膜：0.22 μ m，有机系。

4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 4.3.2 天平：精度为 0.01 g 和 0.1 mg。
- 4.3.3 振荡器：转速不低于 500 r/min。
- 4.3.4 离心机：转速不低于 9000 r/min。
- 4.3.5 涡旋混合器。

4.4 样品

按GB/T 20195制备试样，不少于200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入棕色磨口瓶，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 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25 mL甲醇（4.2.2），涡旋1 min，振荡提取20 min，9000 r/min离心5 min，准确移取上清液5 mL于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇定容，混匀，微孔滤膜（4.2.8）过滤，待测。

4.5.2 测定

4.5.2.1 高效液相色谱参考条件

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5.0 μ m，或性能相当者；
- b) 柱温：40 $^{\circ}$ C；
- c) 检测波长：245 nm；
- d) 流速：1.0 mL/min；
- e) 进样量：20 μ L。
- f) 流动相：A相为磷酸盐缓冲液（4.2.4），B相为乙腈（4.2.3），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间	A相	B相
0.00	87	13
9.00	87	13
9.10	75	25
18.00	75	25
18.10	87	13
30.00	87	13

4.5.2.2 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（4.2.7）和试样溶液（4.5.1）上机测定。混合标准系列溶液中待测物的高效液相色谱图参见附录A。

4.5.2.3 定性

在仪器的最佳条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与混和标准系列溶液（质量浓度相当）中对应药物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.2.4 定量

在相同试验条件下,以混合标准系列工作溶液中待测物的质量浓度为横坐标,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。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液用甲醇稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

4.6 试验数据处理

试样中待测物的含量 w_i 以质量分数计,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:

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times f \quad (1)$$

式中:

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液解热镇痛类药物的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V_1 ——试样中加入提取液体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——试样中最终定容体积,单位为毫升(mL);

f ——超出线性范围后,试样溶液稀释倍数;

V_2 ——移取上清液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

1000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho_{si} \times 1000}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \times f \quad (2)$$

式中:

A ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;

V_1 ——试样中加入提取液体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——试样中最终定容体积,单位为毫升(mL);

ρ_{si} ——待测物标准工作溶液质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

f ——超出线性范围后,试样溶液稀释倍数;

A_{si} ——标准溶液色谱峰面积;

V_2 ——移取上清液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

1000 ——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

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

试样中的待测物用甲醇提取,经混合型强阳离子固相萃取小柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,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 甲醇: 色谱纯。

5.2.3 乙腈: 色谱纯。

5.2.4 甲酸: 色谱纯。

5.2.5 5%氨水甲醇溶液(体积分数): 取5 mL氨水, 用甲醇(5.2.2)稀释至100 mL, 混匀。

5.2.6 0.1%甲酸溶液(体积分数): 取1 mL甲酸(5.2.4), 加水稀释至1000 mL, 混匀。

5.2.7 标准储备溶液(1 mg/mL): 称取对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林(CAS: 519-98-2, 纯度≥96.6%)、氨基比林、安替比林标准品适量(精确至0.1 mg)于棕色容量瓶中, 用甲醇(5.2.2)溶解定容, 混匀。于-18 ℃以下避光保存, 有效期为6个月。

5.2.8 混合标准中间溶液(10 μg/mL): 准确移取各标准储备溶液(5.2.7)1 mL于100 mL棕色容量瓶中, 用甲醇(5.2.2)定容, 混匀。于2 ℃~8 ℃避光保存, 有效期为2个月。

5.2.9 混合标准系列溶液: 分别准确移取适量混合标准中间溶液(5.2.8)于棕色容量瓶中, 用甲醇(5.2.2)稀释、定容, 混匀。配制成质量浓度为0 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL的混合标准系列溶液。临用现配。

5.2.10 混合型强阳离子固相萃取小柱: 60 mg/3 mL。

5.2.11 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 分析天平: 精度为0.1 mg和0.01 g。

5.3.3 振荡器: 转速不低于500 r/min。

5.3.4 离心机: 转速不低于9 000 r/min。

5.3.5 涡旋混合器。

5.3.6 固相萃取装置。

5.3.7 氮吹仪。

5.4 样品

按GB/T 20195制备试样, 不少于200 g, 粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛, 充分混匀, 装入棕色磨口瓶, 避光保存, 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), 于50 mL离心管中, 准确加入20 mL甲醇(5.2.2), 涡旋1 min, 振荡提取20 min, 于9 000 r/min离心5 min, 准确移取0.5 mL上清液于10 mL离心管中, 加入2.5 mL 0.1%甲酸溶液(5.2.6), 涡旋混匀, 备用。

5.5.2 净化

依次用3 mL甲醇(5.2.2)和3 mL水活化固相萃取小柱(5.2.10), 取备用液(5.5.1)全部过柱, 用3 mL水淋洗, 抽干小柱, 用3 mL 5%氨水甲醇溶液(5.2.5)洗脱, 收集洗脱液于50 ℃下用氮气吹干, 准确加入2.5 mL甲醇(5.2.2), 涡旋溶解, 过膜(5.2.11), 待测。净化过程需全程避光操作。

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柱, 柱长100 mm, 内径2.1 mm, 粒径1.7 μm, 或性能相当者;
- b) 流动相: A相为0.1%甲酸溶液(5.2.6), B相为乙腈(5.2.3), 梯度洗脱程序见表2;
- c) 柱温: 35 ℃;
- d) 流速: 0.3 mL/min;

e) 进样量: 2 μ L。

表2 梯度洗脱程序

时间	A相	B相
0.00	90	10
2.50	90	10
5.60	10	90
6.50	10	90
6.60	90	10
9.00	90	10

5.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式 (ESI+);
- b) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- c) 脱溶剂气: 800 L/Hr;
- d) 反吹气: 50 L/Hr;
- e) 雾化器温度: 500 $^{\circ}$ C;
- f) 电离电压: 2.5 kV;
- g) 电离电压: 2.5 kV;
- h) 多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 3。

表3 各目标物多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量参考值

被测物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
对乙酰氨基酚	152.0	93.0	15	20
		110.0 ^a	15	12
4-甲氨基安替比林	218.0	97.0	10	20
		56.0 ^a	10	22
氨基比林	232.0	113.0	10	15
		187.0 ^a	10	12
安替比林	189.0	104.0	15	12
		131.0 ^a	15	12

^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, 分别取混合标准系列溶液 (5.2.9) 和试样溶液 (5.5.2) 上机测定。混合标准系列溶液中待测物的特征离子色谱图见附录B。

5.5.3.4 定性

在相同试验条件下, 试样溶液与混合标准系列溶液 (质量浓度相当) 中待测物的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 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

浓度接近的混合标准系列溶液中对应的定性离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表4规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表4 定性测定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

5.5.3.5 定量

以混合标准系列溶液中待测物的质量浓度为横坐标, 定量离子对峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 其相关系数应不低于0.99。用单点或多点进行定量, 试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围, 应将试样溶液用甲醇稀释后, 重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

5.6 试验数据处理

试样中待测物含量以质量分数计, 数值以微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 表示。多点校准按式(3)计算; 单点校准按式(4)计算:

式中 i

——由标准曲线得到的试样溶液中各目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 ——试样提取液体积, 单位为毫升 (mL) ;

V_2 ——净化后最终定容体积, 单位为毫升 (ml);

f ——超出线性范围后，试样溶液稀释倍数。

V_2 ——用于净化的上清液体积, 单位为毫升 (ml);

m ——试样质量 单位为克 (g)

1000 换算系数

理由。

4 试样溶液中待测物的色谱峰面积。

V 试样提取液体积 单位为毫升 (mL)

Y₁ 试样提取液体积, 单位为毫升 (ml);
Y₂ 淬化后冒泡空密体积, 单位为毫升 (ml)

标准溶液中待测物的质量浓度，单位为微克/毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

ρ_{si} ——标准溶液中待测物的质量浓度, 单位mg/L;
 ρ_s ——超出线性范围后, 试样溶液质量浓度, 单位mg/L。

——超出线性范围后，试样
——标准溶液色谱图

A_{si} ——标准溶液色谱峰面积；
 A_i ——用于进样的待测溶液色谱峰面积。

V_2 ——用于净化的上清液体积, 单

m ——试样质量

1000 ——换算系数。

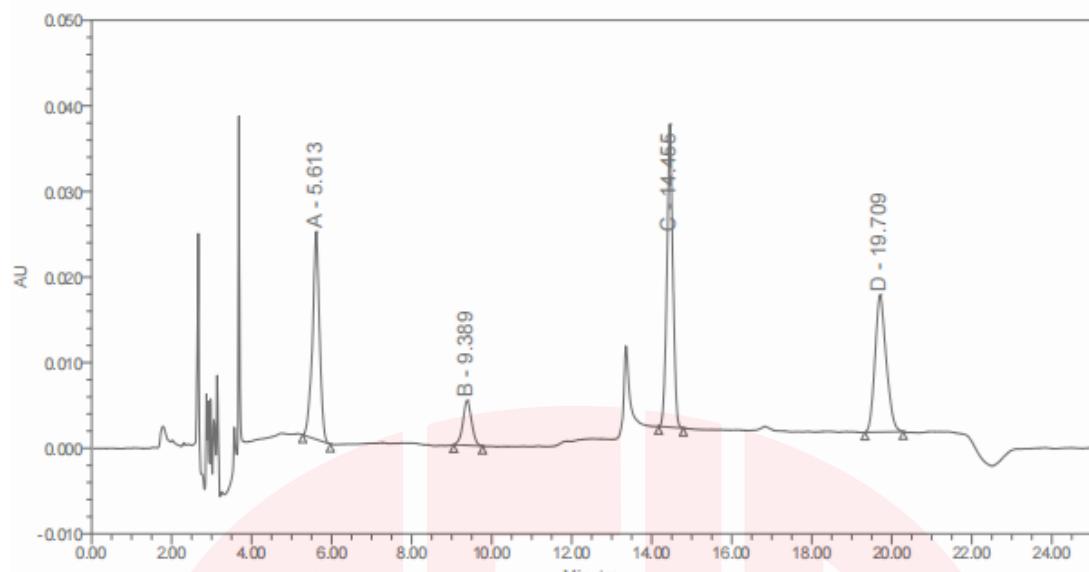
第六章

在有危险条件下，两波群心测定结果与单簇或两簇值的绝对值都不大于该簇或两簇值的20%。

附录 A
(资料性)

对乙酰氨基酚、安乃近、氨基比林、安替比林混合标准溶液的高效液相色谱图

对乙酰氨基酚、安乃近、氨基比林、安替比林混合标准溶液的高效液相色谱图见图A.1。



标引序号说明：

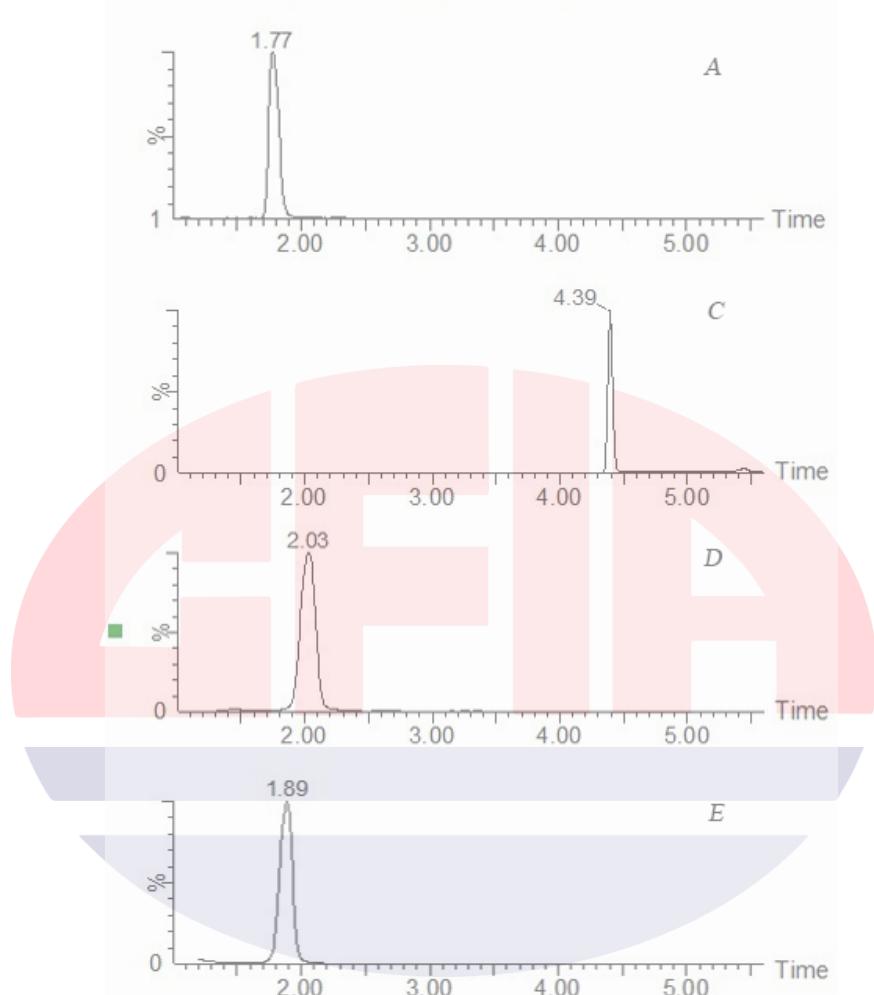
- A——对乙酰氨基酚；
- B——安乃近；
- C——安替比林；
- D——氨基比林。

图A.1 对乙酰氨基酚、安乃近、安替比林、氨基比林混合标准溶液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）的高效液相色谱图

附录 B
(规范性)

对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林、氨基比林、安替比林混合标准溶液 (10 ng/mL) 的特征离子色谱图

对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林、氨基比林、安替比林混合标准溶液的特征离子色谱图见图B.1。



标引序号说明：

- A——对乙酰氨基酚定量监测离子 (152.0>110.0)；
- C——安替比林监测离子 (189.0>131.0)；
- D——氨基比林监测离子 (232.0>187.0)；
- E——4-甲氨基安替比林监测离子 (218.0>56.0)。

图A. 2 对乙酰氨基酚、4-甲氨基安替比林、氨基比林、安替比林混合标准溶液 (10 ng/mL) 的特征离子色谱图

T/CFIAS 6017—2025