

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—2021

代替NY/T 724-2003

饲料中拉沙洛西钠的测定  
高效液相色谱法

Determination of lasalocid sodium in feeds —  
High performance liquid chromatography (HPLC)

(公开征求意见稿)

2021-××-××发布

2021-××-××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。

本文件代替 NY/T 724-2003《饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法》，与NY/T 724-2003相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了检出限，增加了定量限（见1，2003年版的1）；
- b) 更改了试样提取（见8.1，2003年版的7.1）；
- c) 更改了色谱参考条件（见8.2, 2003年版的7.2）；
- d) 更改了试验数据处理（见9，2003年版的8.1）。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国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：中国农业大学。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2003年首次发布为NY/T 724-2003；

——本次为第一次修订。



# 饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件规定了饲料中拉沙洛西钠的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中拉沙洛西钠的测定。

本方法拉沙洛西钠的检出限为 0.5 mg/kg，定量限为 1.0 mg/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

试样中的拉沙洛西钠经酸性甲醇溶液提取，用反相液相色谱柱分离、荧光检测器检测，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：色谱纯。

5.4 三氟乙酸：色谱纯。

5.5 乙酸铵：色谱纯。

5.6 盐酸甲醇溶液：向 995 mL 甲醇中加入 5.0 mL HCl，混匀。

5.7 乙酸铵溶液（0.125 mol/L）：称取 9.635 g 乙酸铵，用水溶解并定容至 1 L。

5.8 流动相：乙酸铵溶液（5.7）+乙腈=15+85。

5.9 三氟乙酸溶液：取 1 mL 三氟乙酸与 1000 mL 水混合。

5.10 三氟乙酸-乙腈溶液：三氟乙酸溶液(5.9)+乙腈 = 50+50。

5.11 拉沙洛西钠标准储备溶液 (1000  $\mu\text{g/mL}$ )：称取 20 mg (精确至 0.00001g) 拉沙洛西钠标准品 (CAS 号: 25999-20-6, 纯度不低于 98%)，用甲醇 (5.2) 溶解，并定容至 20 mL，混匀。-18  $^{\circ}\text{C}$  下密闭保存，有效期为一年。

5.12 拉沙洛西钠标准中间溶液 (100  $\mu\text{g/mL}$ )：准确量取 5 mL 的拉沙洛西钠标准储备溶液 (5.11) 于 50 mL 容量瓶用甲醇 (5.2) 稀释至刻度，混匀。-18  $^{\circ}\text{C}$  密闭保存，有效期为 12 个月。

5.13 拉沙洛西钠标准系列溶液：准确移取适量拉沙洛西钠标准中间溶液 (5.12) 于 10 mL 容量瓶中，用盐酸甲醇溶液 (5.6) 稀释成 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$  标准系列溶液，临用现配。

5.14 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜。

## 6 仪器设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器。
- 6.2 天平：感量 0.0001 g、0.00001 g。
- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 离心机：转速不低于 8000 r/min。

## 7 样品

按照 GB/T 20195 制备试样，至少 200 g，粉碎后过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，备用。

## 8 试验步骤

### 8.1 试样提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（添加剂预混合饲料称取 1 g，精确到 0.0001 g）于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 盐酸甲醇溶液（5.6），涡旋混合 1 min，于 8000 r/min 离心 5 min。取上清液约 1 mL 过 0.22 μm 有机滤膜后，待测。

### 8.2 液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

柱温：35 ℃。

流动相（5.8），等度洗脱。

流速：1.0 mL/min。

进样体积：10 μL。

激发波长：314 nm。

发射波长：418 nm。

注：约 800 个进样后，色谱柱和液相色谱管路宜采用 0.1% 三氟乙酸-乙腈溶液（5.10）以 1 mL/min 冲洗 2h，其后执行常规色谱柱清洗程序即可。

### 8.3 测定

#### 8.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

分别将拉沙洛西钠标准系列溶液（5.13）和试样溶液（8.1）上机测定。若其峰面积响应值超出标准系列溶液（5.13）范围，需用盐酸甲醇溶液（5.6）稀释后再进样分析。标准溶液的色谱图参见附录 A。

#### 8.3.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中拉沙洛西钠保留时间应与标准系列溶液中浓度相当者的保留时间一致，其相对偏差在 ±2.5% 之内。

#### 8.3.3 定量

以标准溶液的色谱峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不小于 0.99。用标准系列溶液（5.13）校准、定量。外标法定量时，试样溶液中拉沙洛西钠峰面积响应值应在标准系列溶液的线性范围之内，若超出该范围，需将试样溶液用盐酸甲醇溶液（5.6）稀释后，重新进样测定。单点法定量时，试样溶液中拉沙洛西钠的峰面积应与相应标准溶液的响应相近，差异在 ±30% 之内。

## 9 试验数据处理

试样中拉沙洛西钠的含量以质量分数 $w$ 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示多点校正按公式（1）计算，单点校正按公式（2）计算：

$$\dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho$ ——从标准曲线查得的试样溶液拉沙洛西钠的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

$n$ ——稀释倍数。

$$\dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A$ ——试样溶液中拉沙洛西钠色谱峰面积；

$A_s$ ——标准溶液中拉沙洛西钠的色谱峰面积；

$\rho_s$ ——标准溶液中拉沙洛西钠的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

$n$ ——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。

## 9 精密度

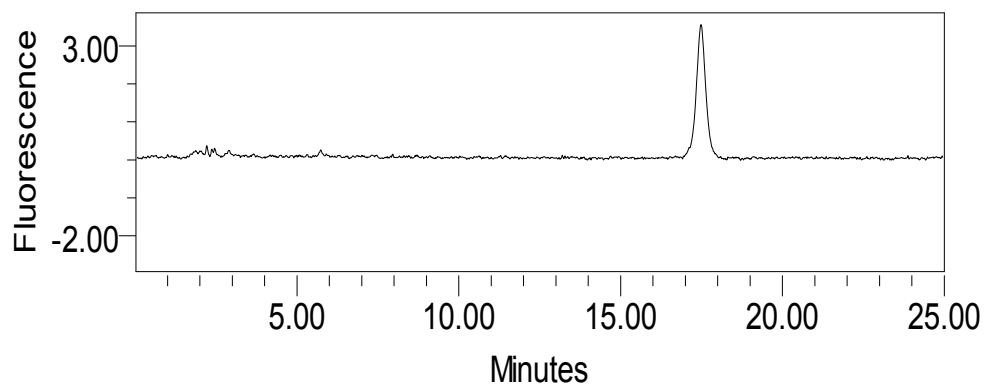
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

## 附录 A

(资料性)

## 拉沙洛西钠标准溶液色谱图

A.1 拉沙洛西钠标准溶液的液相色谱图见图 A.1

图 A.1 拉沙洛西钠标准溶液 (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 色谱图



# 中华人民共和国农业行业标准

## 《饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法》

### 编制说明

（公开征求意见稿）

起草单位：中国农业大学

## 一、标准制定背景及任务来源

拉沙洛西钠 (Lasalocid sodium) 又名拉沙里菌素钠, 它是由拉沙洛链霉菌 *Streptomyces lasaliensis* 产生的次级代谢产物拉沙里菌素的钠盐, 是一种芳香聚醚类离子载体型抗生素饲料添加剂。它主要作为畜禽专用抗生素用于治疗 and 预防肉鸡、绵羊的球虫病, 并能提高和改善牛的饲料利用率, 对动物有促生长和提高饲料报酬的作用, 抗球虫效果很好[1-2]。但是当饲料中拉沙洛西钠的剂量过大时, 会对动物产生毒副作用, 并且可能存在药物残留等问题[1-2]。因此, 使用拉沙洛西钠预混剂时, 必须在饲料中充分混合均匀, 不得饲喂未稀释的饲料。经日常饲料稀释后直接给动物饲喂的含药饲料中药物的添加浓度必须符合要求且按合理的方法进行饲喂。

### 1、拉沙洛西钠的理化性质、药理毒理特点、产品和相关规定

拉沙洛西钠由5个同系物组成, 即拉沙洛菌素钠A、B、C、E和D, 五种组份的结构图见图1。目前的拉沙洛西钠标准品中A的含量为93%-99%; 有些干脆直接标注为拉沙洛西钠A, 含量为99%以上[2-3]。实际生产中使用的拉沙洛西钠活性物质中拉沙洛西钠A达84.7-90.6%, 同系物在2.1%-3.5%之间, 总和达87.3-93.6%[4]。相关饲料中该物质的检测基本都只测拉沙洛西钠A的含量, 且没有任何动物源性样品中该物质的残留分析方法检测拉沙洛西钠A以外的同系物[5-28]。许多饲料品种直接标注成份为拉沙洛西钠A[4, 29-30]。

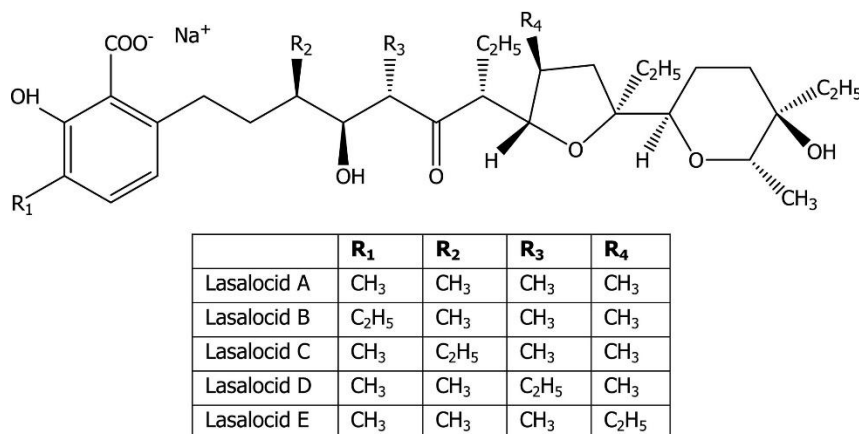


图1 拉沙洛西钠分子结构图

拉沙洛西钠A的结构见图1, 分子式为  $C_{34}H_{58}O_8Na$ , 分子量为 612.77[1-3]。为白色至棕色的粉末, 有特殊臭味, 微溶于水, 可溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等大部分有机溶剂, 熔点 191-192℃。与其它聚醚类抗生素 (如盐霉素、甲基盐霉素和莫能菌素) 相比, 拉沙洛西钠有两个其它同类化合物没有的特征, 一个是它的结构上有一个芳香环, 且能够发射荧光; 另一个是它不仅能和一价阳离子结合, 还能和二价阳离子结合[31]。这两个特征造成了拉沙洛西钠独特的理化性质和分析检测优势。

拉沙洛西钠可作用于革兰氏阳性菌以及多种厌氧菌的防治, 且对禽艾美尔球虫有较强的抑制作用, 但对革兰氏阴性菌无抗菌活性[27,29]。拉沙洛西的金属络合物在球虫的子孢子或第一代裂殖体内, 会破坏细胞膜内钾离子和钠离子的正常转运, 使细胞内二者的水平急剧升高, 破坏平衡渗透压, 大量的水分子进入球虫细胞, 这会引引起球虫细胞的肿胀。最后球虫细胞因排除细胞内多余的  $K^+$  及  $Na^+$  耗尽能量且过度肿胀而亡, 所以拉沙洛西钠的抗球虫活性高峰出现在子孢子至第一代裂殖体之间[31-32]。

除了抗病抗球虫外, 拉沙洛西钠用作反刍动物的饲料添加剂使用时, 能通过调控瘤胃发酵类型表现出促进生长作用, 提高饲料利用率和体重增加[31-32]。但是当饲料中拉沙洛西钠剂量过大时, 会对动物产生毒副作用, 导致机体细胞内  $K^+$  浓度降低、 $Ca^{2+}$  浓度过高, 造成组织细胞尤其是神经细胞的功能障碍, 严重时会引起死亡[31-34]。而拉沙洛西钠在饲料中过量以及动物可食性组织中的累积残留会通过

食物链给人类健康带来威胁[33-36]。

因此,世界多国都对饲料中拉沙洛西钠的使用量进行了规定。如中国农业农村部公告246号(2019)规定,拉沙洛西钠的适用动物为鸡,采用75-125mg/kg混饲的方法用于治疗鸡球虫病,禁用于马属动物,休药期3天;其预混剂的规格为150g/kg和450g/kg两种 [37-38]。加拿大政府批准的拉沙洛西钠产品(2020年6月22日修订)规格为20%拉沙洛西钠预混剂,可用于鸡(肉鸡)、火鸡(生长期)、肉牛(饲养场)、肉牛(牧场)、小牛、羔羊(圈养饲喂) [30]。需要强调的是在我国,拉沙洛西钠只批准用于鸡,马属动物禁用。**因此对饲料样品中该药物的检测需要同时考虑常规用药和非法添加的问题。**

未检索到目前我国的拉沙洛西钠生产厂家,相关销售产品的原材料均来自进口。美国、加拿大和欧洲多国均有拉沙洛西钠的生产公司,相关产品较多。各拉沙洛西钠的饲料生产和销售企业都对各自的产品进行了详细说明和规定。比如瑞士Roche Vitamins Inc.公司的Bovatec®拉沙洛西钠A型药用饲料(33.1%拉沙洛西钠),适用于幼兔,用于治疗Eimeria stiedae引起的幼兔球虫病,配合饲料中的折算使用量为113 g/ton(即125mg/kg),还可用于牛和羊,但不能用于马或马属动物[29]。来自加拿大的Bovatec®和Avatec®两种20%拉沙洛西钠预混剂,用于预防和治疗禽类、牛类和羊的球虫病[30]。美国Alpharma公司注册的Bovatec 150 FP,通用名称为拉沙洛西钠预混剂,仅供动物使用,活性成份含量为33.1%(即150克/磅饲料),可掺入各种饲料载体中使用。该产品与不同饲料混合可配制成1.1%(即5克/磅饲料)的中间浓度预混剂。再用此1.1%拉沙洛西钠预混剂与各种配合饲料混合,配成10-30 mg/kg的含药配合饲料使用,该饲料适用于饲养场的各种牛和绵羊[40]。

## 2、拉沙洛西钠的检测方法

有关饲料和动物组织等生物样品中拉沙洛西钠的检测方法报道集中发表于21世纪初至现在,前十年间多为微生物法和液相色谱法,检测基质以饲料样品居多,检测目标多为单个药物的测定;后十年间液相色谱-质谱联用方法报道最多,检测基质以奶制品、鸡组织样品居多,检测目标多为对多种聚醚类药物分析。

### 2.1 聚醚类药物多残留分析检测

拉沙洛西钠的多残留分析方法以液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS,采用多反应监测模式)和液相色谱-质谱法(LC-MS,采用选择离子监测模式)为主,质谱检测是近年来该类药物的主流手段,这些仪器基本都采用电喷雾电离(ESI),也有少数采用大气压化学电离(APCI),发表文献很多。它们涉及的样品种类集中,主要为饲料样品[2-28, 31, 42];鸡肉、鸡肝、鸡蛋、鸡皮、鸡脂肪样品[43-53];生鲜牛奶和奶粉[54-59];也有少数方法涉及蜂蜜、牛肉、牛肝、牛肾和马肉等[60]。也有少数报道采用液相色谱-荧光检测法测定[15, 10-11, 23]。

#### 2.1.1 饲料样品中LAS多残留分析的液相色谱与质谱联用分析方法

拉沙洛西钠属于聚醚类药物,它们一般作为饲料添加剂使用,各国都对饲料样品中该类抗生素的检测方法需求迫切,因此饲料样品的相关分析方法报道很多。有的报道方法还同时测定了其他类别的抗球虫药物,甚至非抗球虫类药物。这些方法多数以甲醇、乙腈为重要溶剂,直接使用它们或以它们的水溶液、混合水溶液、酸性溶液或碱性溶液来进行样品提取,早期也有用甲醇-丙酮-四氢氟喃混合提取药物的报道。大多数方法直接对提取液过滤后进样,也有采取正己烷简单除脂后测定,还有采用固相萃取小柱净化后分析。

LC-MS/MS方法在饲料中拉沙洛西钠的多残留分析中应用很广,它们采用了二级质谱模式,选择性强,灵敏度高。如Annunziata L等(2017) [26]建立LC-MS/MS方法和HPLC方法对位于意大利中心地区不同饲料厂和动物农场的71种饲料样品进行拉沙洛西钠、塞杜霉素、盐霉素、甲基盐霉素、莫能菌

素和马杜霉素的含量检测。样品经乙腈-甲醇(90+10)提取,过滤后进样分析。贾涛等(2016)[25]采用乙腈提取,碳黑萃取小柱净化,LC-MS/MS检测了鸡饲料中拉沙洛西钠、莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素和马杜霉素的含量。Konrad Pietruk等(2015)[15]建立了饲料中地可唑酯、地克珠利、常山酮、拉沙洛西、马杜霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、尼卡巴嗪、盐酸氯苯胍、盐霉素、塞杜霉素、安普利安、氯吡啶、乙磺酸和妥曲珠利的多残留检测方法。样品经碱性甲醇溶液提取,进一步酸化、离心后LC-MS/MS分析,正负离子多反应监测。Mark Cronly等(2011)[17]建立了动物饲料中11种聚醚类药物(常山酮、氯苯胍、尼卡巴嗪、地克珠利、地可唑酯、塞杜霉素、拉沙洛西钠、莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素和马杜霉素)的LC-MS/MS分析方法。用加入了无水硫酸镁和氯化钠的乙腈水溶液提取饲料中的药物,提取液经冷冻离心后检测。质谱采取正离子和负离子分段扫描。Ursula Vincent等(2008)[20]建立了禽类和牛的配合饲料中六种聚醚类药物(莫能菌素A、盐霉素、甲基盐霉素、拉沙洛西钠、马杜霉素和塞杜霉素)的LC-MS/MS方法。

LC-MS方法在饲料中拉沙洛西钠的多残留分析中也很常见。如PIETRUK等(2015)[25]建立了饲料中15种聚醚类药物(允许使用的有:喹氧喹酯、地克珠利、常山酮、拉沙洛西钠、马杜霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、尼卡巴嗪、氯苯胍、盐霉素和塞杜霉素;禁用的有:安普利安、氯吡啶、乙磺酸和妥曲珠利)的LC-MS分析方法。先采用含1%氨水的甲醇超声水浴提取15 min,然后加入含2%醋酸的甲醇继续震荡提取30 min,离心、过滤后进样分析。测定采用正离子和负离子分段扫描方式。Rokka等(2013)[16]报道了饲料样品中的六种聚醚离子载体抗生素(拉沙洛西钠,莫能菌素,盐霉素,甲基盐霉素、马杜霉素和塞杜霉素)的LC-MS分析方法。采用84%乙腈从饲料样品中提取,提取液经过滤后进样分析。Daljit等(2012)[21]建立了饲料中六种聚醚类药物(拉沙洛西钠、莫能菌素、莱德霉素、马杜霉素、盐霉素和甲基盐霉素)的LC-MS检测方法。采用甲醇-水(9+1)震荡提取药物,提取液经甲醇水(75+25)稀释、过滤后分析。质谱鉴定采取大气压化学电离(APCI)模式。HORMAZABAL等(2005)[9]建立了饲料中拉沙洛西钠、莫能菌素、甲基盐霉素和盐霉素的LC-MS方法。采用甲醇-丙酮-四氢氟喃匀浆提取,正己烷液液分配净化后测定。EBEL等(2004)[18]采用液-固提取后接着用液液分配提取净化,简单去脂后测定,建立了饲料中莫能菌素和拉沙洛西钠的LC-MS方法。HORMAZABAL V等(2002)[19]建立了饲料中盐酸氨丙啉、乙酰氨基苯甲酯、拉沙洛西钠、莫能菌素、甲基盐霉素和盐霉素的LC-MS方法,采用甲醇-丙酮-四氢氟喃混合提取,加水混匀、离心,取上清。下层再用甲醇-水重复提取一次。离心过滤后进样分析。

虽然从以上饲料中含拉沙洛西钠的多残留液质联用分析报道看来,饲料样品中拉沙洛西钠多残留分析方法的前处理大多比较简单,但考虑到饲料样品的多样性,报道的方法适用的饲料品种都有一定的局限性。这可能也是有的方法采用了碱性溶液或酸性溶液提取的原因。

### 2.1.2 多残留分析的液相色谱分析及其它方法

含有拉沙洛西钠的多种药物液相色谱分析方法或其它仪器方法报道较少。如陈明等[60]采取30%甲醇水提取蜂蜜中的莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素和拉沙洛西钠,C18固相萃取柱净化后HPLC-FLD-UV柱后衍生化测定。Olejnik M等(2013)[23]采取甲醇提取后直接进样,建立了饲料中6种聚醚类药物(拉沙洛西、马杜霉素、莫能菌素、甲基盐霉素、盐霉素和塞杜霉素)含量分析的液相色谱-柱后衍生化荧光分析方法。ASUKABE等(1994)[10]报道了饲料中三种聚醚类抗生素盐霉素、莫能菌素和拉沙洛西钠的HPLC-FLD方法,采用乙腈提取、硅胶小柱净化后分析。DUSI等(1999)[40]采用柱前衍生化-液相色谱-紫外检测分析了禽饲料中拉沙洛西钠、莫能菌素、盐霉素和甲基盐霉素的含量。BERTINI等(2003)[28]采用薄层色谱法分析了饲料和鸡肝中的聚醚类抗生素的含量。饲料样品经甲醇提取和正

已烷后；肝样品经甲醇提取后经硅胶固相萃取柱净化后上样检测。

## 2.2 单个药物的分析检测

有关拉沙洛西钠的单个药物仪器分析采用液相色谱-质谱联用的很少，大部份报道为液相色谱分析法。如 Tkacikova 等(2012)+[63]采用 LC-MS/MS 法测定了肉鸡可食用组织（胸肌，大腿肌肉，心脏，肝脏，肾脏等）中拉沙洛西钠的残留量，方法的检出限（LOD）和定量限（LOQ）分别为 0.47 和 1.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Focht<sup>[43]</sup>采用 0.5% HCl 酸化甲醇于 40 $^{\circ}\text{C}$  超声提取样品和 HPLC 检测，分析了配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中拉沙洛西钠的含量。张素霞等（2004）[64]、丁双阳等（2003）[6] 用甲醇提取、硅胶柱净化、以磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇作为流动相，建立了鸡肝组织中拉沙洛西钠残留的 HPLC 方法。Matabudul 等（2001）和（2000）[8,65]采用 HPLC-FLD 和 LC-MS-MS 分别对饲料样品；鸡肉和鸡蛋，猪、牛、羊的肝脏和肾脏组织中的拉沙洛西钠进行检测，定量限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；其中 2001 年采用超临界流体萃取技术进行样品前处理。Tarbin 等（1992）[66] 用乙腈提取、饱和盐酸四氯化碳液液分配萃取、硅胶小柱继续净化后 HPLC 测定，建立了家禽肌肉和蛋中的拉沙洛西钠的 HPLC-FLD 方法。液相分析在具有碱性流动相的聚合物 PLRP-S 或多孔石墨碳质 Hypercarb 柱上进行。Frank 等（1989）[67]采用乙腈提取、正己烷净化样品，HPLC-FLD 法检测了鸡皮中拉沙洛西钠的含量。

由以上报道可知，早期拉沙洛西钠的分析方法多为单个药物分析，多采用 HPLC 方法进行。而随着时代的发展，越来越多的聚醚类药物多残留分析方法，甚至不同种类的药物和聚醚类药物综合分析方法得到不断的开发，使用的仪器也以液相色谱-质谱联用方法为主。这些报道的检测方法各有特点，手段都比较成熟，方法的回收率水平和变异系数范围都符合仪器分析方法要求，方法的灵敏度则根据样品类型、样品是否进一步净化区别较大。一般来说，饲料样品提取采用的溶剂量大，直接稀释后直接进样的检测限较高。这些近 20 年来报道的检测方法各有特点，手段都比较成熟，为修订饲料中拉沙洛西钠的液相色谱检测标准提供了有力的借鉴和参考。

## 3、本标准制订的思考

根据农业农村部 194 号关于全面“禁抗”公告，拉沙洛西钠只能做抗球虫剂应用，因此并不提倡其作为抗病毒和细菌的用途。此外由于我国只批准其用于家禽，并规定了休药期，特别提及马不能用，加之目前欧盟规定了加药饲料使用后对其他饲料造成的交叉污染的限量，因此，在实际生产中该药物中饲料中的含量可能因为超范围使用和交叉污染造成低于日常抗球虫使用的浓度，因此，降低对该药物的检测灵敏度很有必要。

目前我国拉沙洛西钠的单个药物检测标准主要有以下 3 个：农业部公告第 236 号-4 动物性食品中拉沙洛西钠的残留检测方法-高效液相色谱法；NY/T 724-2003 饲料中拉沙洛西钠的测定-高效液相色谱法；SN 0501-1995 出口禽肉中拉沙里菌素残留检测方法。这 3 个标准均采用灵敏度高、稳定性好的荧光检测。但是这些方法都有一个共同问题，建立的年代过久，前处理技术手段不一定能够满足现阶段对相关样品监控的需要。以其中饲料检测方法为例，该检测标准于 12 年前颁布，经过十多年来的发展，饲料的种类大为增加，即使采用老一代的液相色谱仪分析，原有的方法也已不能适应当前所有饲料种类的检测要求。还有一些分析工作者则认为与当前普遍做法相比，原方法存在前处理时样品量过大（配合饲料 10.0 克），玻璃具塞三角瓶目前已使用较少等问题。因此，原 NY/T 724-2003 的饲料检测方法需要进行修订，以期修改后的方法能够更加适应目前对饲料中拉沙洛西钠检测的要求。

目前我国拉沙洛西钠的多残留药物检测标准主要有以下 2 个：《农业部 1862 号公告-4-2012 饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》和《GB/T 22983-2008 牛奶和奶粉中六种聚醚类抗生素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。由参考文献可知，拉沙洛西的确证分析方法多为液相色谱-串联质谱法。因此，本标准研制任务拟以《农业部 1862 号公告-4-2012 饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》为确证方法。

本标准制定任务来源于《农业部关于下达 2016 年农业行业标准制定和修订项目资金的通知》（农财

发[2016]70号),项目编号2016-226,项目名称:饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法。

制标单位组织开展了饲料中拉沙洛西钠检测方法的修订研究工作。在修改采用美国 AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版)《动物饲料和预混剂中拉沙洛西钠的测定 反相液相色谱法》的基础上对原 NY/T 724-2003 饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法进行修订,形成了本标准方法。

## 二、主要工作过程

中国农业大学接到制标任务后,于2016年9月至2018年11月制定了相关方法并进行了标准征求意见、预审和终审过程,终审判定方法的变异系数有的数据在10-15%之间,超过了10%不符合要求,终审未获通过,经补充数据后又于2020年7月初在饲料标准化工业技术委员会组织的标准评审会上再次讨论,专家们一致认为:饲料中拉沙洛西钠的有效添加浓度过高,制标过程中应该充分考虑这一特点。会后制标单位结合专家们的意见,决定结合前期工作基础,直接对《美国AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版) 动物饲料和预混剂中拉沙洛西钠的测定 反相液相色谱法》进行修改采标。

2020年7月14日-15日,翻译了《美国AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版)》,初步制定了实验方案。

2020年7月15~18日,对2017年确定的液相色谱检测条件、原NY/T 724-2003和美国AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版)的液相色谱检测条件再次进行比较分析,出具相关比较数据,阐明本方法分析条件选择的依据。

2020年7月19~30日,对原NY/T 724-2003方法和美国AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版)中的提取溶液和提取条件进行比较分析,确定本方法的样品前处理过程。

2020年8月1~9月15日,对方法性能,包括方法适应性、线性范围、准确度、精确度、定量限、检测限和抗干扰能力等方法性能进行了考察,形成了方法征求意见稿。

2020年9月16日~2021年1月,联系了农业农村部饲料校验与安全监督检验测试中心(北京)、中国农业科学院农产品加工所等3家单位对标准征求意见稿进行了方法验证。

2020年9月15日~2021年2月,对标准征求意见稿广泛征求25家相关单位的30位专家意见,拟对意见进行汇总,根据这些汇总意见对标准文本和编制说明进行修改,形成标准预审稿。

**2021年3月3日 标准预审。**

**2021年3月3日~5日,根据预审专家意见,对标准预审稿进行了数据补充和修改,形成了公开征求意见稿。**

## 三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

### (一) 标准编制主要原则

对本标准中有关内容的确定,主要借鉴参考《美国 AOAC 官方方法 2008.01 的末次修订版本 2013 版 动物饲料和预混剂中拉沙洛西钠的测定 反相液相色谱法》,并对该方法进行了简化,以提高方法的准确性和可重复性。

本标准的适用范围为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料等常用畜禽饲料。

本标准使用液相色谱仪进行检测方法开发。使用仪器型号为普及率较高的美国 Waters 公司的 Waters 2695 高效液相色谱仪,配备 Waters 2475 荧光分析检测器。

对建立的饲料中拉沙洛西钠的液相色谱测定方法进行方法性能考察,包括适应性、线性范围、精密度、准确度(回收率)、定量限、检测限、抗干扰能力等。

适应性通过对标准溶液的稳定性考察、不同色谱柱的分析情况考察获得。抗干扰能力通过与同类药物的检测比较获得。



线性范围通过标准曲线拟合判断。标准曲线则使用标准贮备溶液稀释的系列标准工作溶液，设置 5-7 个点进行测定。

检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 的考察先通过 3 倍信噪比和 10 倍信噪比初步计算出检测限和定量限的可能值，然后通过实际添加回收结果确定 LOQ，以回收率结果和相对标准偏差符合要求的最低样品添加浓度为 LOQ 值。然后按 LOQ 的一半进行计算 LOD。

准确度和精密度采用低、中、高共 3-4 个添加浓度进行测定，分析各添加浓度条件下拉沙洛西钠的添加回收率结果和变异系数。添加浓度的回收率范围应该在 80%~120%之间，结果的变异系数应在 20% 以内。

## (二) 本方法与原标准方法的主要技术区别

在 NY/T 724-2003 和 AOAC OMA 2008.01 方法的基础上，通过对提取条件的验证、对比和优化；以及对仪器检测条件的对比和优化，确立了本研究饲料中拉沙洛西钠的液相色谱检测方法。试料中的拉沙洛西钠经甲醇-盐酸 (995+5, v/v) 提取，用液相色谱-荧光检测法测定，外标法定量。该方法能满足对饲料中拉沙洛西钠含量的检测要求。本方法与原标准方法对比见表 1。

表 1 本方法与原标准方法对照表

修改项	序号	NY/T 724-2003	本方法	AOAC 2008.1
灵敏度	1.	检测限 5 mg/kg	检测限 0.5 mg/kg	检测限 0.5 mg/kg
	2.	无定量限规定	定量限 1 mg/kg	定量限 1 mg/kg
样品前处理过程	3.	甲醇提取	甲醇-盐酸(995+5, v/v) 提取	甲醇-盐酸(995+5, v/v) 提取
	4.	称样量 10 g	称样量 2 g	适当重量 (2-10g)
	5.	提取溶剂 100 mL	提取溶剂 20 mL	100 mL (预混料 200 mL)
	6.	常温振荡 30 min, 提取 3 次	涡动 1 min 提取一次	40 °C 超声 20 min, 机械摇床上振摇 1h。室温过夜。第二天再振摇 10min。
仪器分析条件	1.	流动相为磷酸盐缓冲液+乙腈+甲醇 (25+35+40, v/v)	流动相为乙腈+125mM 醋酸铵 (85+15, v/v)	流动相为乙腈+125mM 醋酸铵 (85+15, v/v, pH4.75)
	2.	激发波长 320 nm 和发射波长 420 nm	激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm	激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm
计算公式	3.	仅简单粗象的定量计算公式	细分为详细具体的单点校正计算和标准曲线计算公式	仅简单粗象的定量计算公式
其它	4.	无	增加了色谱柱再生处理方法	增加了色谱柱再生处理方法

## (三) 方法的建立

## 1. 标准溶液的稳定性依据

标准储备溶液的稳定性和保存条件参考了 <http://www.somds.com> 网站提供的 MSDS 数据文件《拉沙洛西钠——拉沙里菌素钠安全技术说明书》、《农业部 1862 号公告-4-2012 饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》等文件和方法中拉沙洛西钠的稳定性描述和/或相关储存条件并进行了一定条件的实验验证。该 MSDS 技术说明书表明，拉沙洛西钠微溶于水，可溶于大部分有机溶剂，产品稳定，37℃保持 6 个月不变，25℃保持 18 个月不变。该农业部 1862 号公告中用甲醇配制的 1000 µg/mL 单个聚醚类药物（包括拉沙洛西钠）于-18℃下保存，有效期为 1 年。我们对在-18℃下保存的 2018 年 6 月配置的 100 µg/mL 拉沙洛西钠标准中间用甲醇稀释成 4 个 200 ng/mL 标样，临用时经 80% 乙腈稀释 10 倍后上机检测，每次用固体药物新配制标准溶液作为对照，记录保留时间 RT 和峰面积并进行简单分析，结果见表 2。由此可知，一年中用该标准中间液配制的标准溶液测定获得的相对偏差在 5%以内。因此我们将标准储备液的保存条件设为-18℃，保存时间设定为 1 年。

表 2 拉沙洛西钠标准工作液（200 ng/ml，现配现用）的稳定性实验

序号	测定日期	样品标号	RT	峰面积	峰面积平均值	4 次检测的平均相对偏差
1.	2018.09.24	1	17.727	328393	309783	3.55%
2.		2	16.675	341220		
3.		3	17.888	319790		
4.		4	17.898	318860		
5.		新标样	17.901	321677		
6.	2019.03.24	1	17.727	328393	327065	
7.		2	16.675	341220		
8.		3	17.888	319790		
9.		4	17.898	318860		
10.		新标样	17.884	329435		
11.	2019.06.13	1	15.839	323965	344247	
12.		2	15.864	346060		
13.		3	15.979	356500		
14.		4	15.485	350465		
15.		新标样	15.750	367409		
16.	2019.09.24	1	15.073	305697	311570	
17.		2	15.145	316735		
18.		3	15.179	306460		
19.		4	15.185	317390		
20.		新标样	15.176	321798		

## 2. 色谱分离条件的优化

原标准 NY/T 724-2003 采用磷酸盐缓冲液+乙腈+甲醇（25+35+40，v/v，pH7）为流动相，原 AOAC OMA 2008.01 方法采用乙腈+125mM 醋酸铵缓冲液（85+15，v/v，pH4.75）为流动相，由此推断在中性



或弱酸性条件下可能都能达到拉沙洛西钠的检测目的。而醋酸铵溶液是中性溶液，其 pH 为 7 左右，因此，我们拟将流动相条件修改为乙腈+125mM 醋酸铵（85+15，v/v），以期能在保持分离能力的前提下，简化实验方法。

我们对以上三种流动相方法，采用同一组标准溶液，采用激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm 荧光检测进行测定。色谱柱采用 Athena C18-WP, 100A,4.6\*250mm, 5um。该色谱柱其它具体信息为：ANPEL P/N:LAEQ-462572, LOT:72F1201。试验结果见表 3、表 4、图 2 和图 3、图 4。

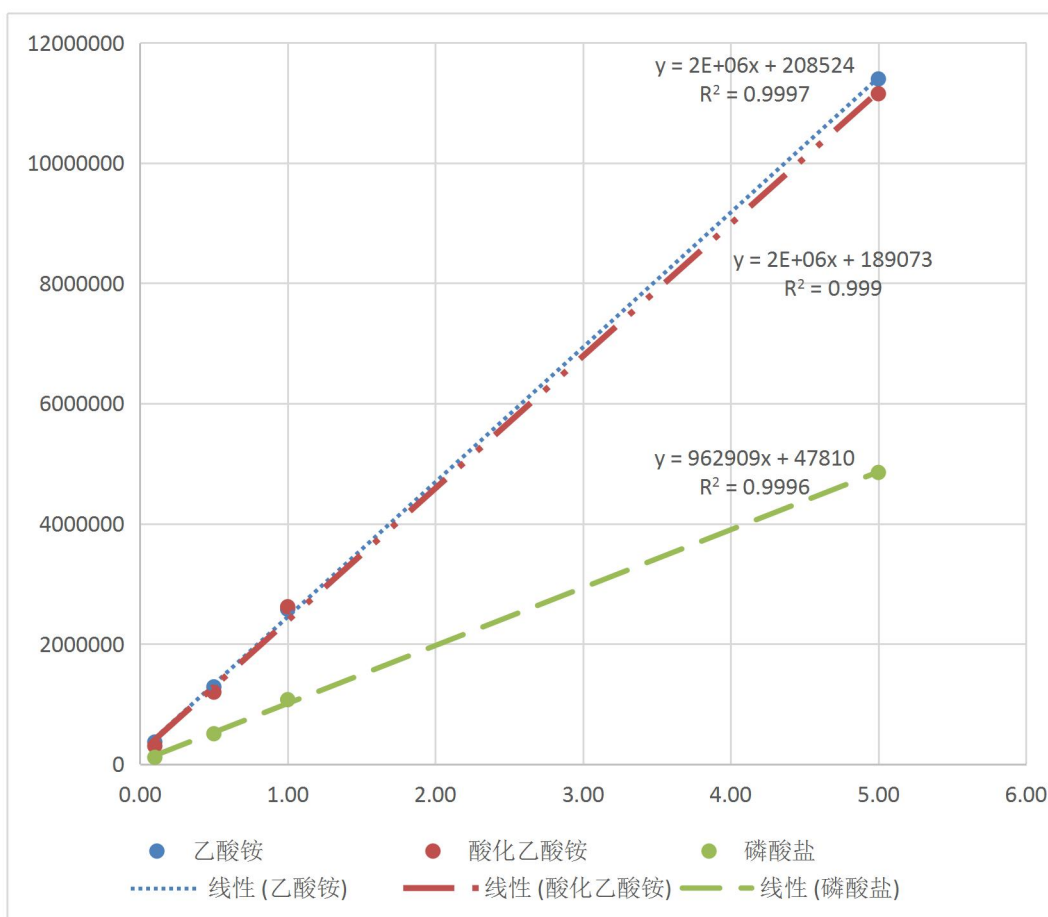
表 3 三种不同流动相对保留时间的影响

		流动相 1	流动相 2	流动相 3
	标准溶液浓度 (mg/L)	乙腈+125mM 醋酸铵 (85+15, v/v)	乙腈+125mM 醋酸铵缓冲液 (85+15, v/v, pH 4.75)	磷酸盐缓冲液+乙腈 + 甲醇 (25+35+40, v/v, pH7)
1.	0.10	16.870	17.875	21.586
2.	0.50	16.893	17.856	21.594
3.	1.00	16.894	17.825	21.595
4.	5.00	16.888	17.801	21.582
5.	10.00	16.873	17.769	21.552
绝对标准偏差		0.01114675	0.03278592	0.00629153
平均值		16.886	17.839	21.589
相对标准偏差 (%)		0.07%	0.18%	0.03%

由以上结果可知，三种流动相条件下，拉沙洛西钠的出峰时间有区别，不加酸条件下出峰时间略快，能够节省一些检测时间。

能够节省一些检测时间。

表 4 三种不同流动相对峰面积的影响



能够节省一些检测时间。

		流动相 1	流动相 2	流动相 3
	标准溶液 浓度 (mg/L)	乙腈+125mM 醋酸铵 (85+15, v/v)	乙腈+125mM 醋酸铵 缓冲液 (85+15, v/v, pH 4.75)	磷酸盐缓冲液+乙腈 + 甲醇 (25+35+40, v/v, pH7)
1.	0.10	368462	303711	113190
2.	0.50	1286435	1198830	506970
3.	1.00	2577397	2618967	1073666
4.	5.00	11397734	11152049	4852611
5.	10.00	185665447	180575997	78889409

图 2 三种不同流动相对峰面积与浓度之间的标准曲线图 (0.1-5mg/L)

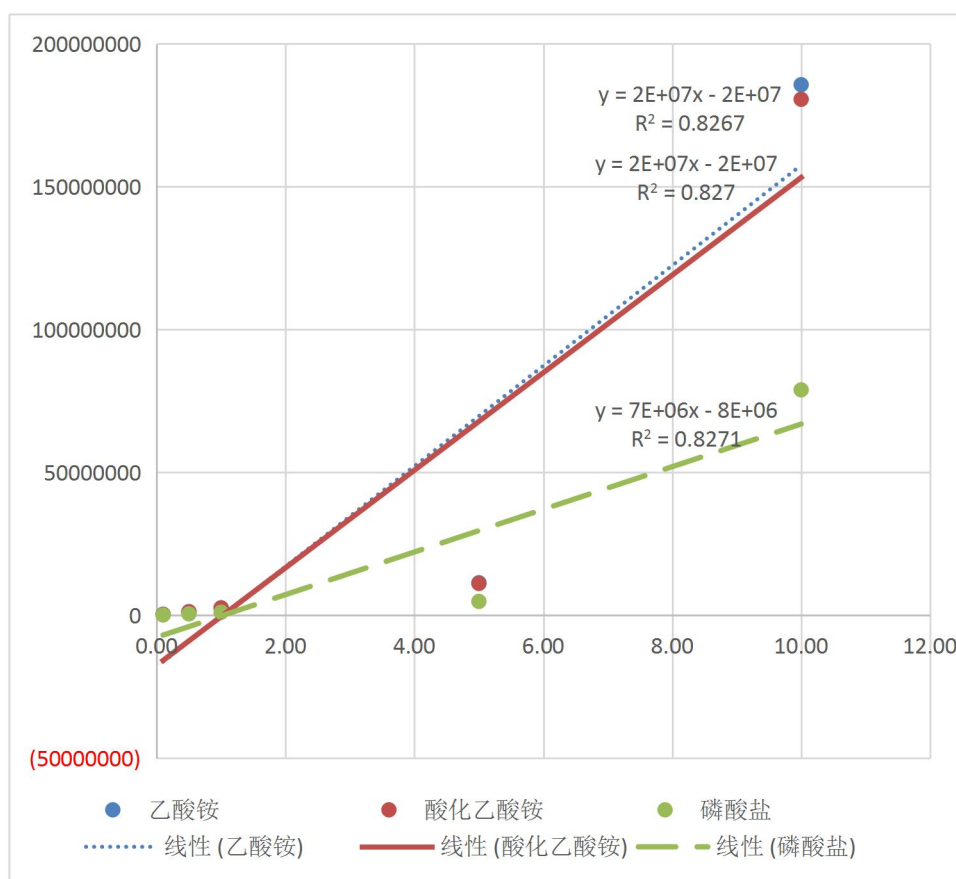


图 3 三种不同流动相对峰面积与浓度之间的标准曲线图 (0.1-10mg/L)

由以上结果可知，在 0.1-5mg/L 浓度范围内，三种流动相条件下浓度与峰面积间的相关系数都在 0.999 以上，酸化醋酸铵缓冲液与醋酸铵溶液为水相的流动相区别很小，细微比较起来，不调节 pH 值的流动相略佳。在 0.1-10mg/L 浓度范围内，三种流动相条件下浓度与峰面积间的相关系数都在 0.82 左右，不符合线性方程的要求，可见标准溶液的浓度上线以 5mg/L 为佳。酸化醋酸铵缓冲液与醋酸铵溶

液为水相的流动相应值远高于磷酸盐缓冲液的流动相，其响应值比其高 2~3 倍以上，后者不如前两者好。

由此可知，虽然三种流动相对拉沙洛西钠的分离均获得了良好的峰形和响应值，但乙腈+125mM 醋酸铵（85+15，v/v）分离拉沙洛西钠的分离效果最佳。此外，从流动相的配制方法来说，乙腈+125mM 醋酸铵（85+15，v/v）的配制方法最简单，不需要调节 pH 值，因此最后确定采用乙腈+125mM 醋酸铵（85+15，v/v）为流动相。

虽然拉沙洛西钠采用酸化甲醇提取后，溶液中拉沙洛西钠主要以酸的形式存在。根据酸碱平衡理论，AOAC 方法中“采用 CH<sub>3</sub>CN-醋酸铵缓冲流动相进行反相液相色谱法”分离后，检测到的是拉沙洛西；而本方法确定的“采用醋酸铵溶液为流动相”时，检测到的是拉沙洛西钠，二者的分离检测的色谱峰物质有区别，但我们都采用相同的标样进行定量。因此，定量分析的结果并无区别。

经过此番优化，确定了以下参考色谱条件，在此条件下采用：

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，长 250 mm，直径 4.6 mm，粒径 5 μm，或相当者。柱温：35 °C。流动相：乙腈 +0.125 mol/L 醋酸铵=85+15，等度洗脱。流速：1.0 mL/min。进样体积：25 μL。激发波长：314 nm。发射波长：418 nm。

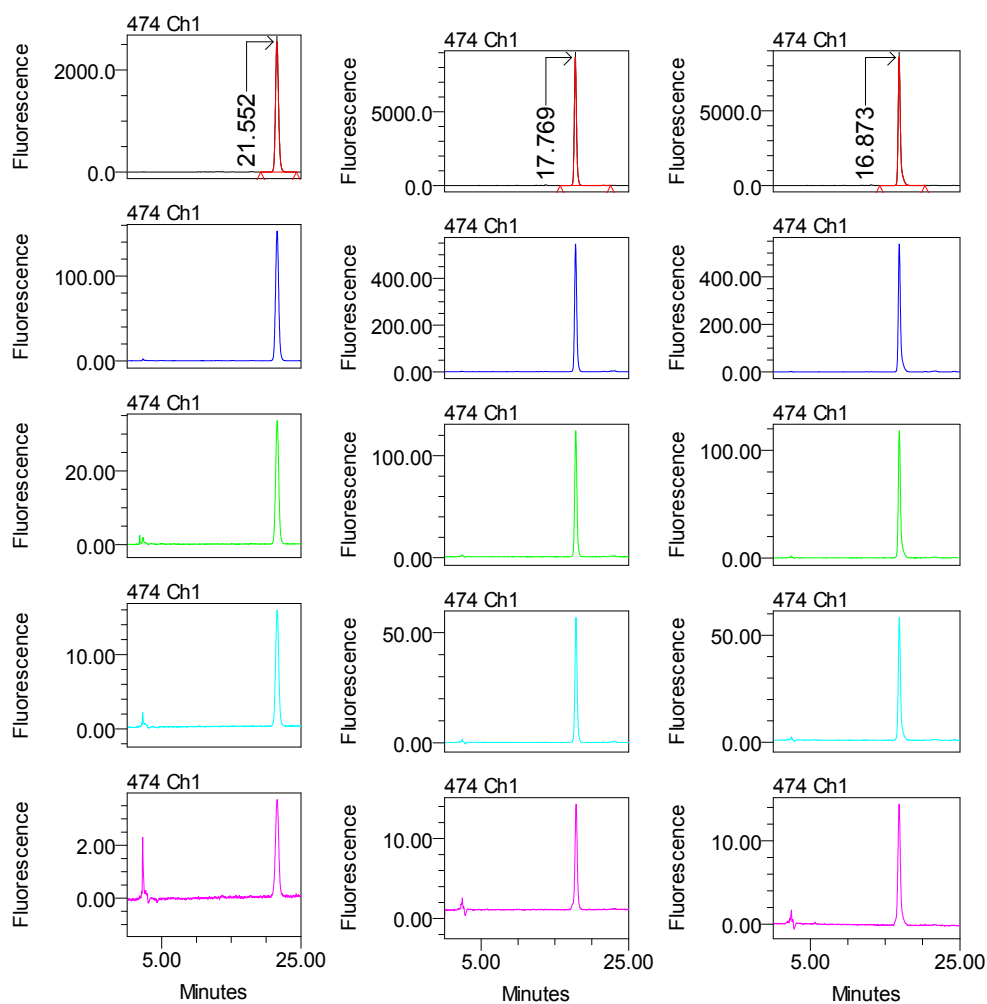


图 4 三种流动相条件下拉沙洛西钠系列标准溶液色谱图  
(从左到右：磷酸盐缓冲液、酸化乙酰胺溶液、乙酰胺溶液)

### 3. 色谱检测波长的比较和优化

采用以上优化获得的流动相乙腈+125mM 醋酸铵 (85+15, v/v) 进行色谱分离, 色谱柱采用 Athena C18-WP, 100A,4.6\*250mm, 5um。该色谱柱其它具体信息为: ANPEL P/N:LAEQ-462572, LOT:72F1201。分别用 NY/T 724-2003 的检测条件激发波长 320nm 和发射波长 420 nm 荧光和 AOAC OMA 2008.01 方法的检测条件激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm 对同一组系列标准工作液进样分析, 记录保留时间和峰高、峰面积值。

两种检测波长条件下的色谱保留时间、峰高和峰面积比较见表 4。由表可知, 更改检测波长后, 拉沙洛西钠的保留时间向前移动了 0.03 分钟。而不同浓度的标准溶液峰面积响应值增加了 10.15-32.73%, 峰高响应值增加了 4.67-14.65%, 而且浓度越低, 响应值的增加率越大。激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm 条件下色谱响应的灵敏度明显更好。

两种检测波长条件下的系列浓度标准溶液响应值见表 5, 标准曲线图见图 5。两个波长下的色谱图见图 6。由这些图和表可知, 相同浓度条件下激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm 条件的灵敏度更高。因此, 我们最终确定采用 AOAC OMA 2008.01 方法的检测波长进行分析。

表 5 不同激发波长和发射波长组合对色谱峰的影响

	NY/T 724-2003			本方法和 AOAC OMA 2008.01				
	激发波长 320 nm 和发射波长 420 nm			激发波长 314 nm 和发射波长 418 nm				
浓度	RT	峰面积	峰高	RT	峰面积	峰高	峰面积增加率 (%)	峰高增加率 (%)
0.1	16.91	251200	11835	16.88	333421	13569	32.73	14.65
0.5	16.91	1005814	49027	16.88	1228616	56052	22.15	14.32
1	16.91	2174480	106152	16.88	2609427	119203	20.00	12.29
5	16.91	10452109	518283	16.88	11513900	542503	10.15	4.67

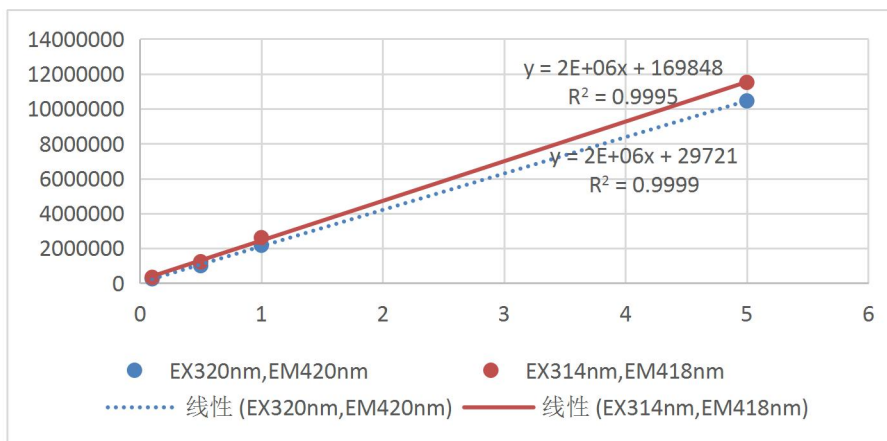
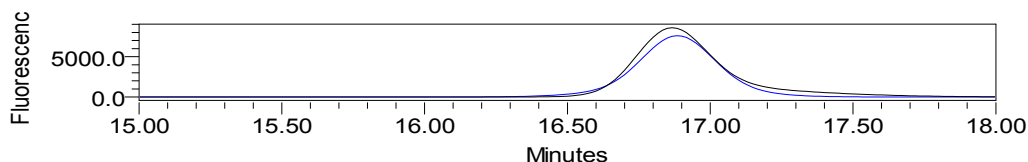
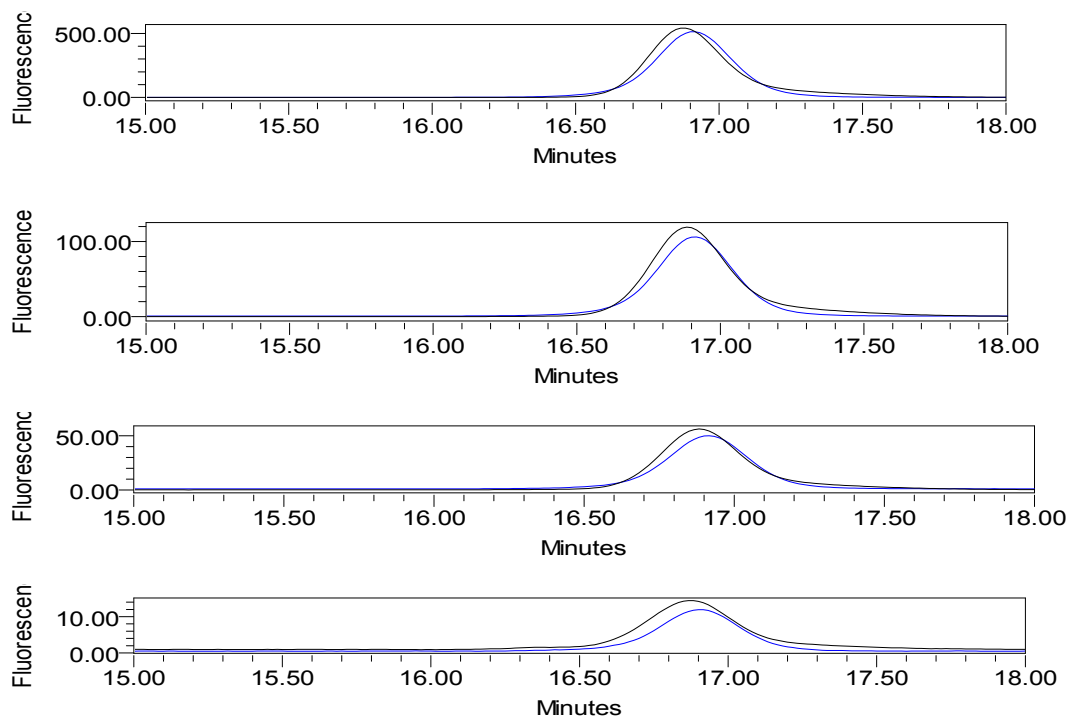


图 5 不同检测波长组合下浓度与峰面积的标准曲线





the upper chromatographies are ex 418nm and ex 420nm comparison.

图 6 两种检测波长下系列标准溶液色谱峰的比较

(同一小图中响应值高的为 418nm 检测波长, 低的为 420nm 检测波长。小图由上至下: 10 $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、0.5  $\mu$ g/mL、0.1  $\mu$ g/mL。说明:10 $\mu$ g/mL 未参与标准曲线计算)

#### 4. 拉沙洛西钠检测化合物个数的确定

拉沙洛西钠由 5 个同系物组成, 即拉沙洛菌素钠 A、B、C、E 和 D, 其中拉沙洛西钠 A 为主要成份, 其它四种同系物含量极少, 因此, 我国原标准 NY/T 724-2003 中只检测了拉沙洛西钠 A。而 AOAC OMA 2008.01 方法则在当时的条件下, 分成两种处理, 低浓度条件时只检测拉沙洛西钠 A, 高浓度条件时计算五种化合物的总量。

目前市场上能购得的拉沙洛西钠标准品有拉沙洛西钠和拉沙洛西钠A两种。为了判断是否有检测其他四种同系物的必要性, 我们对拉沙洛西钠标准品和拉沙洛西钠A标准品、以及硕腾公司出产的20%拉沙洛西钠预混剂进行了分析。结果表明: 供试硕腾公司的预混剂中五种成份中A成份占99.27%; 供试拉沙洛西钠标准品中A成份占98.14%; 供试拉沙洛西钠A标准品中A成份占98.13%。由此可知, 拉沙洛西钠的检测中分析A成份是完全合理的, 其它四种同系物可以当成杂质处理。因此, 虽然各种方法检测的拉沙洛西钠实际测的都是拉沙洛西钠A, 但其它成份总含量太低, 不用考虑, 拉沙洛西钠A可以代表拉沙洛西钠。

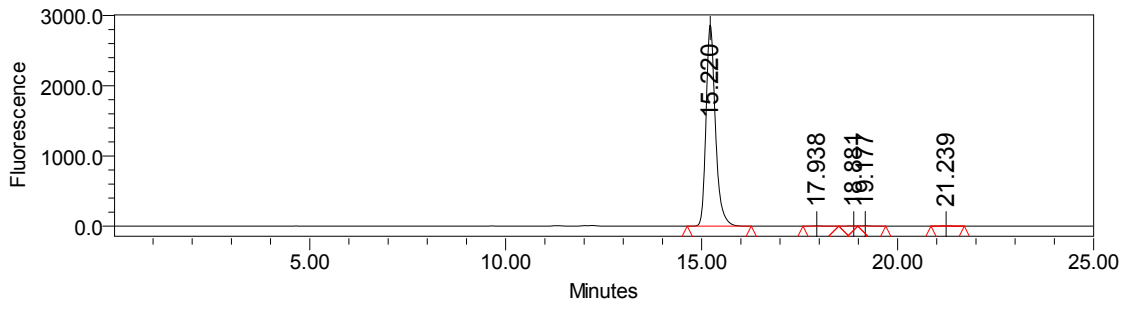
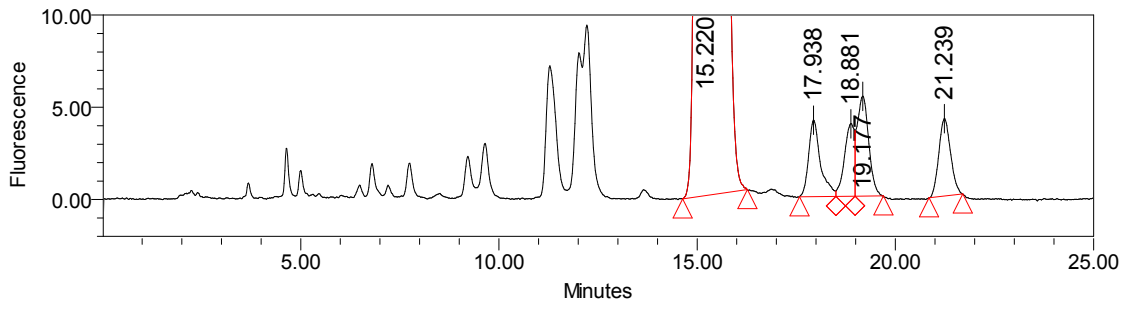


图 7 20%拉沙洛西钠预混剂色谱图

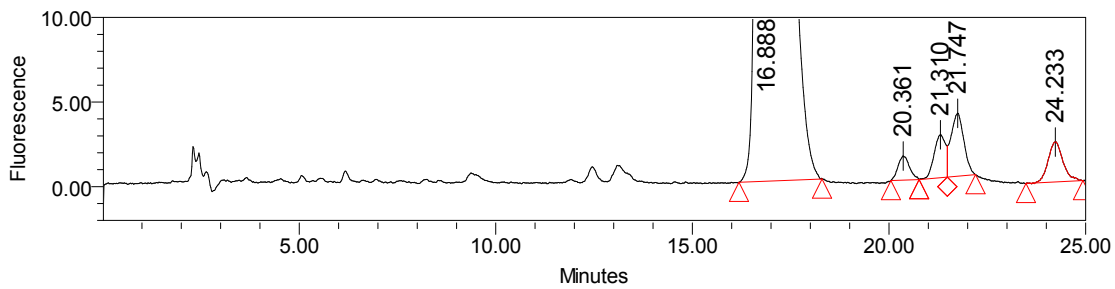
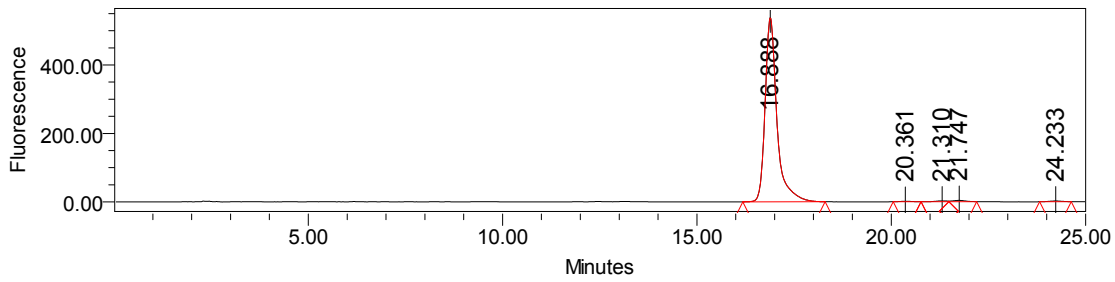
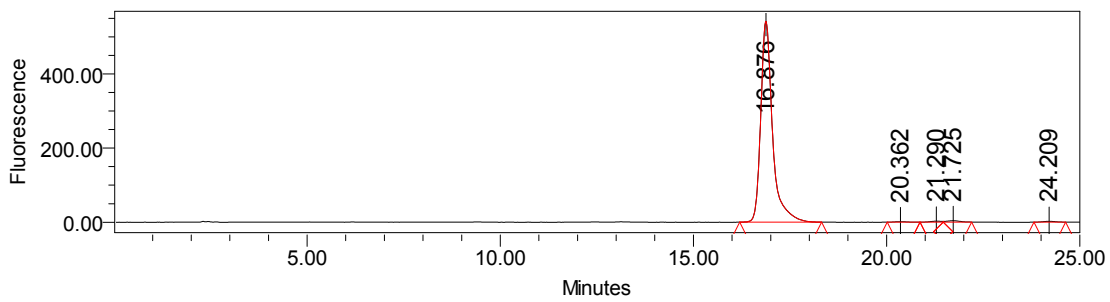


图 8 拉沙洛西钠标准溶液色谱图



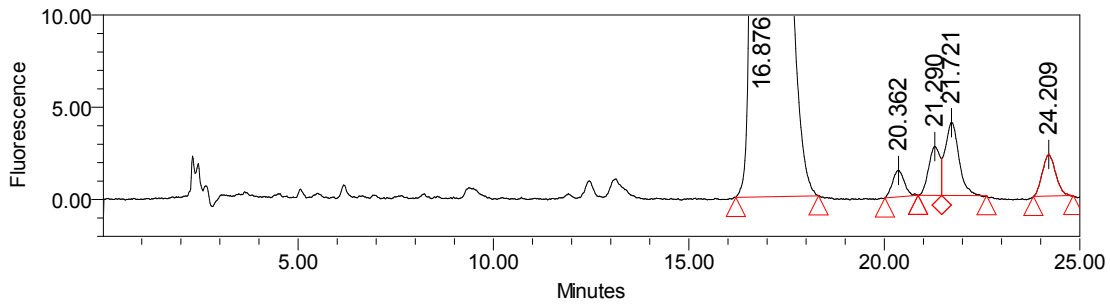


图 9 拉沙洛西钠 A 标准溶液色谱图

表 10 不同产品中拉沙洛西钠的五个组份检测结果

Name	检测日期		Retention Time	Area	% Area
20%拉沙洛西钠预混剂	2020.7.25	1	15.220	47605902	99.27
		2	17.938	86020	0.18
		3	18.881	67276	0.14
		4	19.177	109964	0.23
		5	21.239	86310	0.18
拉沙洛西钠标准品DR.E	2020.9.13	1	16.888	11389179	98.14
		2	20.361	28860	0.25
		3	21.310	51177	0.44
		4	21.747	85387	0.74
		5	24.233	49950	0.43
拉沙洛西钠 A 标准溶液 100ppm,1 mL (DR.E)	2020.9.13	1	16.876	11500209	98.13
		2	20.362	30200	0.26
		3	21.290	50958	0.43
		4	21.725	87007	0.74
		5	24.209	50580	0.43

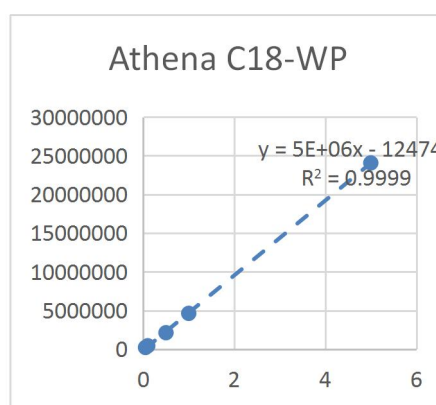
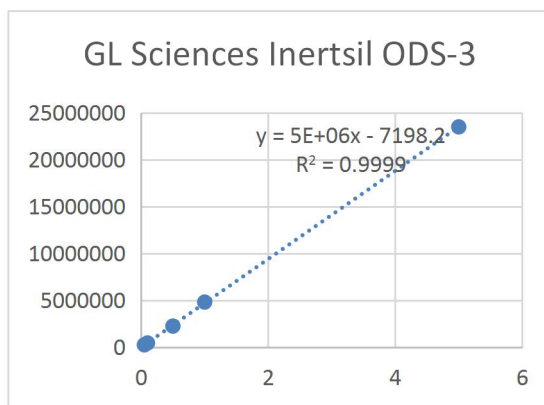
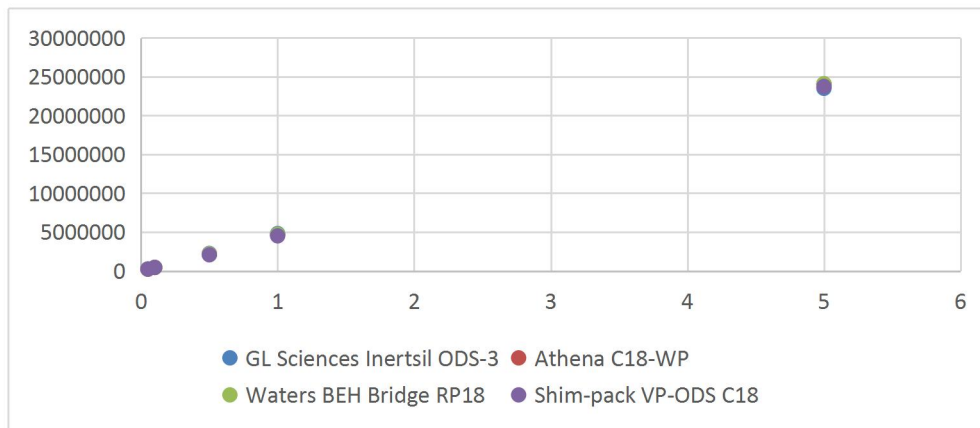
### 5. 色谱柱试验

配制一组标准溶液，采用四种不同来源的液相色谱柱进行检测，记录保留时间、峰面积和峰高。结果如表 6 和图 7 所示，各色谱柱条件下，拉沙洛西钠均能得到良好的分离，峰形较佳。

表 6 不同色谱柱条件下系列标准溶液保留时间和响应值

序号	流动相组成	浓度	RT	AREA
1	GL Sciences Inertsil ODS-3 (250 mm*4.6 μm, 5μm) 标准曲线方程 $y = 5E+06x - 7198.2$ , $R^2 = 0.9999$	0.05	14.05	244600
		0.1	14.02	446720
		0.5	14.01	2245360
		1	13.90	4808641
		5	13.79	23501496
2	Athena	0.05	16.81	228165

	C18-WP( 100A,4.6*250mm, 5um) 标准曲线方程: $y = 5E+06x - 124743$ , $R^2 = 0.9999$	0.1	16.81	449379
		0.5	16.81	2136160
		1	16.82	4634479
		5	16.81	24067982
3	Waters Symmetry RP18 (250 mm*4.6 μm, 5μm) 标准曲线方程: $y = 5E+06x - 96817$ , $R^2 = 0.9999$	0.05	11.12	228951
		0.1	11.01	445163
		0.5	10.90	2186972
		1	10.82	4715834
4	Shim-pack VP-ODS C18 (250 mm*4.6 μm, 5μm) 标准曲线方程: $y = 5E+06x - 145877$ , $R^2 = 0.9998$	0.05	17.82	226145
		0.1	17.81	442960
		0.5	17.82	2071050
		1	17.81	4512585
		5	17.80	23744513





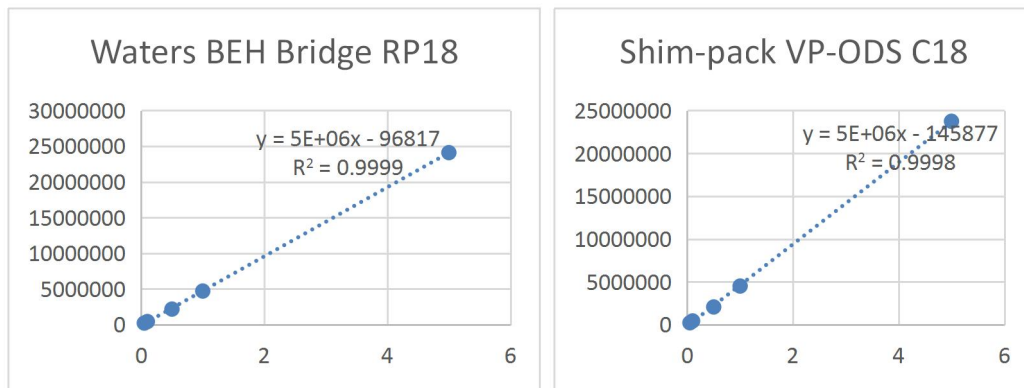


图 10 不同色谱柱分析对拉沙洛西钠标准曲线的影响

## 6 NY/T 724-2003 方法和 AOAC OMA 2008.01 方法提取条件的比较

原标准方法 NY/T 724-2003 采用常温振荡 30 min，提取 3 次进行样品处理，AOAC OMA 2008.01 方法采用 40 °C 超声 20 min 和 40 °C 振荡 60 min，过夜后继续振摇 10 min，提取 1 次进行样品处理。从两个方法看来，前者提取 3 次比较繁琐，后者需要过夜处理延长了样品处理的时间，都不是太理想，同时结合参考了 Waters 公司对 AOAC OMA 2008.01 修改后提取饲料中拉沙洛西钠的方法，该方法采用酸化甲醇直接涡动 1min 提取。

因此，我们将原标准方法 NY/T 724-2003 简化为常温振荡 30min，提取 1 次；将 AOAC OMA 2008.01 方法简化为采用 40 °C 超声 20 min 和 40 °C 振荡 30 min，期间以涡动 10-30s 混匀，提取 1 次进行样品处理。

采用以上两种方法对 3 种饲料样品进行 3 mg/kg 空白添加回收试验，每个处理 4 个空白和 4 个添加样品，采用通过以上确定的检测方法进行测定。结果见表 7，对于牛精料和鸡配合饲料，两个方法的回收率水平均达到方法的准确度和精密度要求。二者区别不大。

表 7 饲料中拉沙洛西钠 3 mg/kg 空白添加试验回收率及变异系数（单位：%）

	处理	NY/T 724-2003	AOAC OMA 2008.01 方法
精料补充料	重复一	85.99	92.22
	重复二	91.94	94.62
	重复三	85.22	90.14
	重复四	90.40	91.03
	平均值	88.39	92.00
	变异系数	3.72	2.11
鸡配合饲料	重复一	93.44	83.13
	重复二	86.95	96.92
	重复三	88.55	82.95
	重复四	91.17	93.14
	平均值	90.03	89.04
	变异系数	3.18	7.97

对以上添加回收试验中的空白样品进行方法检测限的计算,结果如表 8 所示,由表可知,两种提取液对供试饲料的检测限没有影响。但是考虑到拉沙洛西钠为盐,采用酸化甲醇提取可能更有利于将可能与饲料基质结合的拉沙洛西钠游离出来,对饲料品种的普适性会更好,因此我们最后选择酸化甲醇为样品提取液。

表 8 两种不同提取液对检测限的影响

		3S/N 计算方法检测限 (单位: mg/kg)	
处理		甲醇提取	酸化甲醇提取
精料补充料	重复一	0.0800	0.0784
	重复二	0.0794	0.0762
	重复三	0.0773	0.0784
	重复四	0.0785	0.0762
	平均值	0.0788	0.0773
	绝对标准偏差	0.0011	0.0013
鸡配合饲料	重复一	0.0772	0.0791
	重复二	0.0757	0.0771
	重复三	0.0767	0.0791
	重复四	0.0755	0.0771
	平均值	0.0763	0.0781
	绝对标准偏差	0.0008	0.0012

## 6. 提取条件的简化及提取液的确定

### (1) 不同提取液的药物提取效果比较

分别采用 NY/T 724-2003 的甲醇和 AOAC OMA 2008.01 的甲醇-盐酸(995+5)两种提取液,将样品提取的操作步骤改成涡动 1min,分别对添加浓度为 1 mg/kg 和 100mg/kg 的四种饲料样品进行添加回收试验。实验结果如表 9 和图 8-9。由此结果表明,

采取涡动 1min 的提取步骤完全能够满足方法的回收率要求。因此,确定方法的提取步骤为涡动 1min。

采用涡动 1min 的提取方法,甲醇提取液的拉沙洛西钠回收率水平略低,且供试各种饲料样品的相对标准偏差值均高于甲醇-盐酸(995+5,v/v)提取的结果。甲醇-盐酸(995+5,v/v)提取的回收率高、相对标准偏差范围为 0.71-4.01%之间,更符合残留分析方法的准确度和精密度要求。

因此,通过本试验,确定了前处理方法为:采用甲醇-盐酸(995+5,v/v),涡动 1min。

表 9 不同提取溶液对 4 种饲料中拉沙洛西钠的提取效率 (n=4)

提取液	饲料品种	添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					RSD(%)	
			重复一	重复二	重复三	重复四	平均值	绝对偏差	相对偏差
甲醇	小鸡配合	1	84.41	96.77	85.90	98.17	91.31	7.16	7.84
	猪预混料	1	81.04	82.77	84.02	80.22	82.01	1.71	2.08
	牛精料	1	94.56	100.18	106.96	93.88	98.90	6.07	6.14
	猪预混料	100	83.78	87.25	86.45	88.32	86.45	1.94	2.24
	牛精料	100	88.16	88.14	96.07	93.81	91.55	4.03	4.40

	小鸡配合	100	97.02	97.11	98.74	99.93	98.20	1.40	1.42
甲醇 - 甲醇 (995+5,v/v)	小鸡配合	1	99.27	91.97	99.73	97.82	3.92	4.01	7.84
	猪预混料	1	94.75	100.91	101.19	99.40	3.10	3.12	2.08
	牛精料	1	95.29	97.59	97.55	96.40	1.35	1.40	6.14
	猪预混料	100	95.05	94.75	93.85	94.65	0.54	0.58	2.24
	牛精料	100	96.58	100.07	97.13	97.83	1.54	1.58	4.40
	小鸡配合	100	96.95	95.49	96.42	96.13	0.68	0.71	1.42

表9回收率数据表明，2种提取溶液的提取效率有差别，甲醇-盐酸（995+5）的提取液提取回收率更高，酸化有利于样品中拉沙洛西钠的提取，而且共提取物的增加情况不是太明显。

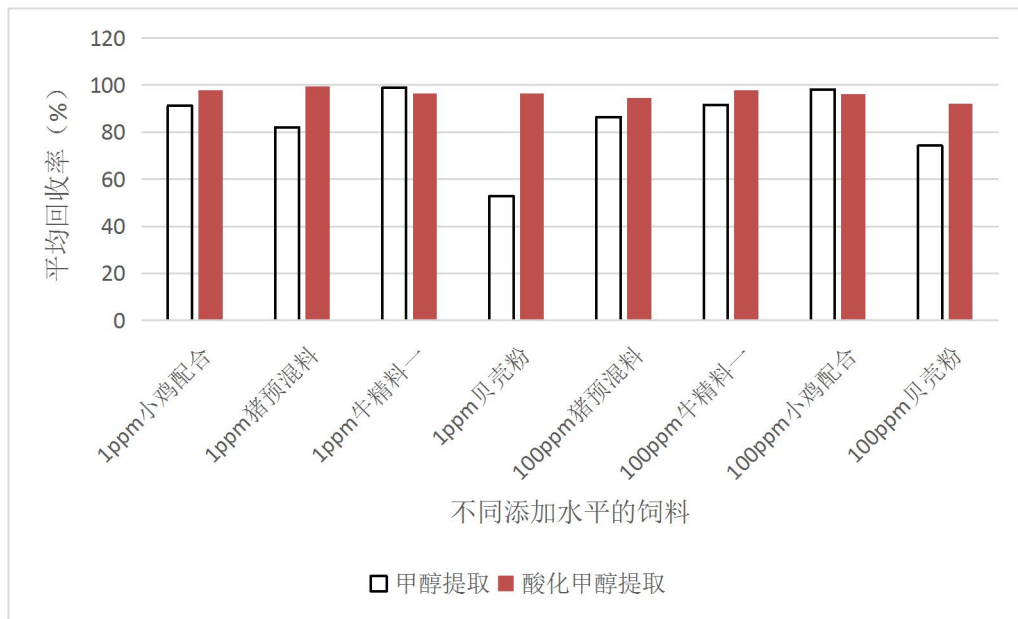


图 11 甲醇提取和酸化甲醇提取的回收率结果比较分析

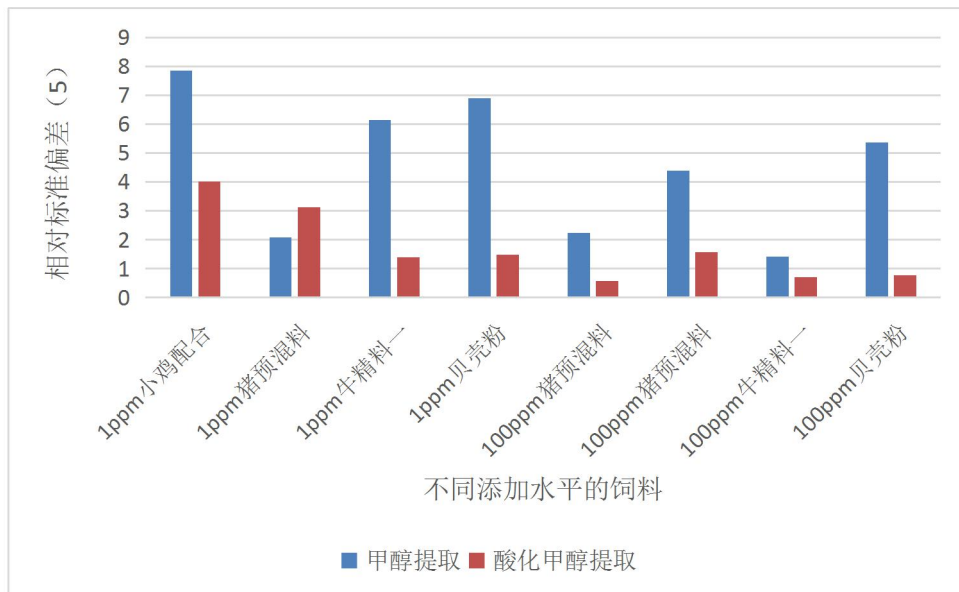


图 12 甲醇提取和酸化甲醇提取的相对标准偏差结果比较分析

### (三) 方法性能考察

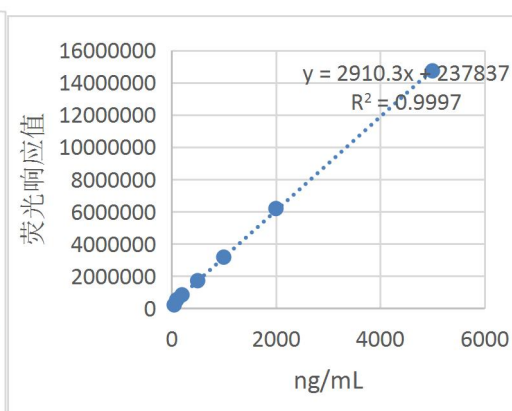
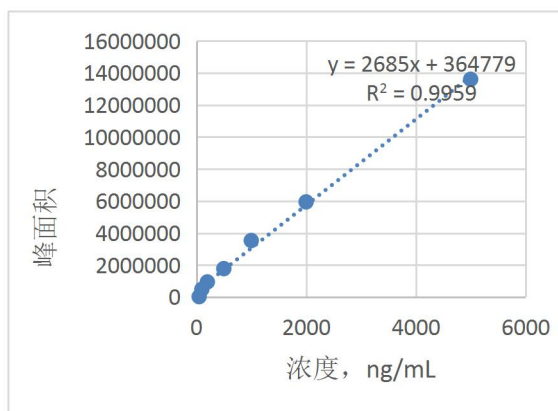
### 1. 标准溶液线性和标液稳定性

拉沙洛西钠标准储备液制备后放入冰箱冷藏保存，标准工作液现用现配。取拉沙洛西钠高浓度标准液，用甲醇-盐酸（995+5，v/v）配制成 50-5000  $\mu\text{g/L}$  的系列浓度标准工作液进样 25  $\mu\text{L}$ ；以及配制成 0.5-50  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度标准工作液进样 2  $\mu\text{L}$  分析。以药物浓度为横坐标，药物峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果如表 11-12 和图 13-14 所示，在相应的浓度范围内，药物峰面积与浓度呈线性相关，相关系数大于 0.99。

从峰面积响应值来说，4 个标准曲线的高浓度值区别不大，特别是相近时间两次配制的标准曲线对应浓度的峰面积相近，但隔了一个月左右的两个低浓度值响应值差别较大，可能跟溶液配制使用的移液枪有关。

表 11 拉沙洛西钠标准工作曲线的制备（50-5000  $\mu\text{g/L}$ ，进样 25  $\mu\text{L}$ ）

		2020.7.15	2020.7.18	2020.8.20	2020.8.22
序号	浓度( $\mu\text{g/L}$ )	峰面积	峰面积	峰面积	峰面积
1	50	22394	219032	433822	414744
2	100	489694	541270	720273	717890
3	200	944177	841990	1130145	1182950
4	500	1774746	1719924	1779242	1887690
5	1000	3531620	3179139	3330505	3349170
6	2000	5944170	6192418	6556980	6068708
7	5000	13608739	14727629	14559784	14249695
相关系数 r		0.9959	0.9997	0.9985	0.9994



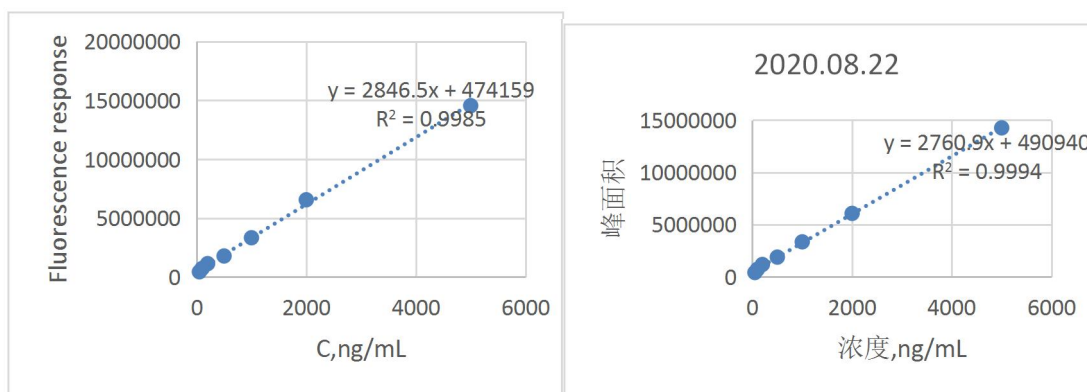


图 13 拉沙洛西钠标准曲线图（50-5000  $\mu\text{g/L}$ ）

表 12 拉沙洛西钠标准工作曲线的制备（0.5-50  $\mu\text{g/mL}$ ，进样 2  $\mu\text{L}$ ）

序号	浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	峰面积
1	0.5	21542
2	1	389029
3	5	1190474
4	10	2879022
5	50	11709573
线性回归方程		$y = 232690x + 143156$
相关系数 r		0.9959

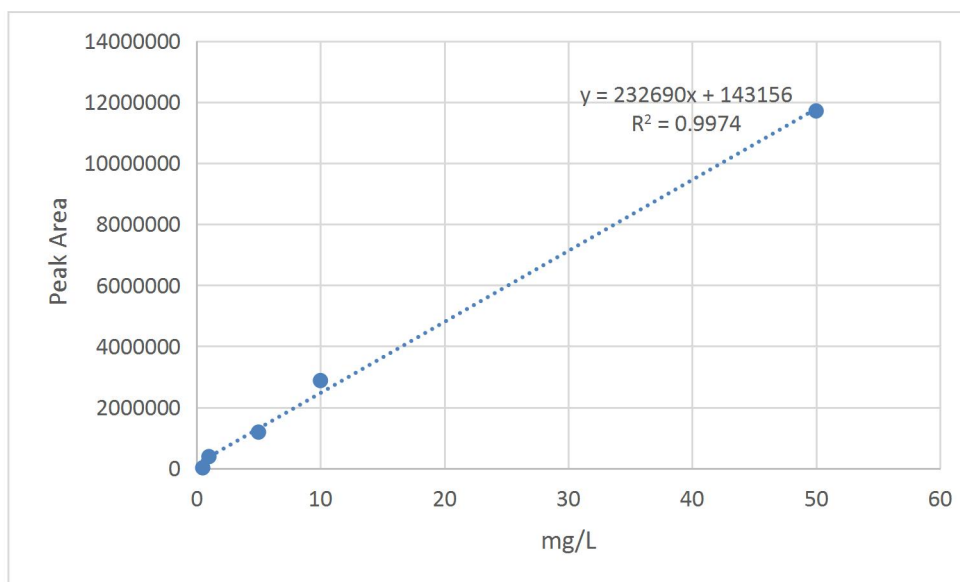


图 14 拉沙洛西钠标准曲线图（0.50-50  $\text{mg/L}$ ）

### 3. 方法回收率和精密度

在鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、精料补充料、猪预混合饲料进行拉沙洛西钠的空白添加回收试验，每种饲料样品根据生产实际情况各设 3 个添加回收水平，即配合饲料设 5,50 和 100 $\text{mg/kg}$ ；浓缩饲料和精料补充料均设 10,100 和 200 $\text{mg/kg}$ ；预混合饲料均设 100,1000 和 10000  $\text{mg/kg}$ ，每个浓度设 4-5 个平行，

按照样品前处理方法处理后进行检测。因此药物使用量太大，高浓度的添加回收试验中采用拉沙洛西钠原料药进行添加。该实验结果表明（见表 13）：四种饲料的各添加水平的平均药物回收率范围为 84.38-100.33%，批内变异系数为 0.86-5.28%，批间变异系数为 2.76-8.76%。

表 13 拉沙洛西钠的添加回收试验结果

	添加水平 mg/kg	重复一	重复二	重复三	重复四	三 次 平 均 值	各次相 对偏差 平均值	三 次 相 对 偏差
鸡配合饲料	5	95.82	96.49	95.85	92.77	89.30	0.95	5.37
		87.9	84.68	86.39	88.26			
		84.19	83.75	89.93	85.57			
	50	93.35	96.38	97.72	98.67	89.42	0.86	6.57
		86.99	81.63	85.87	89.56			
		81.87	84.6	87.98	88.46			
	100	97.02	97.11	98.74	99.93	90.01	1.23	7.26
		86.41	85.68	87.11	90.71			
		82.45	81.99	88.74	84.28			
	75	98.66	95.90	98.49	99.27	95.11	2.19	3.10
		96.74	91.88	95.16	90.22			
		91.76	94.83	95.57	92.84			
125	95.75	96.32	94.18	97.29	94.07	2.23	2.52	
	96.77	90.83	93.62	91.95				
	90.76	91.55	93.82	96.03				
鸡浓缩料	10	100.02	99.73	96.85	95.77	93.45	5.28	8.76
		90.36	90.87	85.25	80.94			
		90.73	87.86	90.85	112.26			
	100	98.26	118.4	99.76	98.07	100.33	4.45	6.28
		93.79	99.43	102				
		98.27	97.76	99.32	98.57			
	200	104.09	92.3	106.27	105.24	93.71	1.53	8.35
		91.28	90.25	85.63	81.58			
		92.08	89.27	90.05	96.49			
猪预混料	100	98.51	94.02	100.52	84.14	89.59	3.80	6.27
		83.78	87.25	86.45	88.32			
		86.12	88.74	87.59				
	1000	95.74	92.38	94.87	96.26	96.80	0.78	2.76
		99.76	98.95	100.82				
		97.36	95.48	93.88	99.34			
	10000	99.03	104.75	112.6		99.15	2.52	7.22
		98.67	106.38	97.75	85.85			
		91.71	98.47	95.56	99.83			
鸡预混料	100	99.12	98.36	97.40	93.65	97.08	1.27	1.41
		97.14	96.48	97.55	98.12			
		95.99	96.74	97.05	97.38			

	1000	99.00	98.69	96.82	97.45	98.02	1.12	1.36
		97.57	100.64	98.35	99.66			
		96.88	97.46	97.92	95.80			
	10000	95.23	91.65	94.37	95.52	91.52	2.04	2.95
		94.65	89.72	88.36	89.04			
		90.26	91.00	89.74	88.65			
牛精料一	10	88.46	89.18	95.74	101.22	89.67	3.21	5.54
		89.49	88.16	89.35	88.74			
		82.47	85.62	87.94				
	100	88.16	88.14	96.07	93.81	90.30	1.47	3.07
		86.09	88.57	90.26	91.16			
		88.35	90.06	92.37	90.56			
	200	87.76	89.15	99.34	97.22	99.62	1.33	7.19
		112.88	106.42	100.93	99.46			
		105.03	99.86	97.73				

#### 4. 定量限和检测限

##### (1) 检测限

对空白饲料样品进行四次样品提取试验，预混合饲料称取 1-2g，其它饲料称取 2g，每次 5 个平行，共计 20 个空白饲料，以 3 倍平均信噪比计算各种饲料样品的检测限，结果如表 14 所示。由表可知，配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料中拉沙洛西钠的检测限范围为 0.168-0.499mg/kg 之间，因此确定方法的检测限为 0.5 mg/kg。

**表 14 拉沙洛西钠检测限实验**

		以 3S/N 计算 LOD ( $\mu\text{g/g}$ )					平均值	相对标准偏差 (%)
		第一批 (n=5)	第二批 (n=5)	第三批 (n=5)	第四批 (n=5)			
1.	小鸡配合	0.241	0.292	0.254	0.237	0.256	9.79	
2.	猪预混料	0.542	0.518	0.508	0.43	0.499	9.70	
3.	鸡浓缩料	0.307	0.358	0.331	0.325	0.330	6.39	
4.	精料补充料 1	0.174	0.169	0.162	0.167	0.168	2.95	
6.	精料补充料 2	0.253	0.305	0.311	0.271	0.285	9.70	

##### (2) 定量限

对五种空白饲料样品进行 1 mg/kg 的空白添加回收试验，每个处理 4-5 个平行，剔除实验过程造成的异常数据，对正常数据进行统计分析，结果见表 15。由表可知，四种饲料样品的添加回收率范围为 82.54-96.97%之间，批内变异系数范围为 3.77-5.48%之间，批间变异系数范围为 3.64-6.85%之间。此结果表明，1 mg/kg 添加浓度能达到方法定量限要求，本方法定量限为 1 mg/kg。四种典型饲料样品，即配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料的定量限添加样品相关色谱图见图 15-图 18。

**表 15 拉沙洛西钠定量限(1mg/kg)实验结果**

		重复一	重复二	重复三	重复四	三次平 均值	各次相 对偏差 平均值	三次相 对偏差
1.	小鸡配合	84.89	97.24	85.54	99.11	87.55	5.46	6.85
		81.27	83.33	86.74	81.19			
		85.42	83.36	89.02	93.45			
2.	猪预混料	75.07	87.49			82.54	5.05	4.06
		80.13	82.16	85.09	83.37			
		83.14	80.96	83.39	84.57			
3.	鸡浓缩料	81.48	85.3	91.44		84.90	3.77	3.64
		83.76	82.9	85.79	89.05			
		85.74	82.05	81.9	84.52			
4.	牛精料一	95.74	106.83	104.46	94.45	96.97	4.47	4.98
		91.35	94.46	98.27	96.94			
		95.54	90.27	95.62	99.67			
5.	鸡预混料	90.12	92.30	89.65	88.74	89.25	2.61	2.97
		87.71	89.38	91.60	92.58			
		89.66	82.75	86.96	89.62			

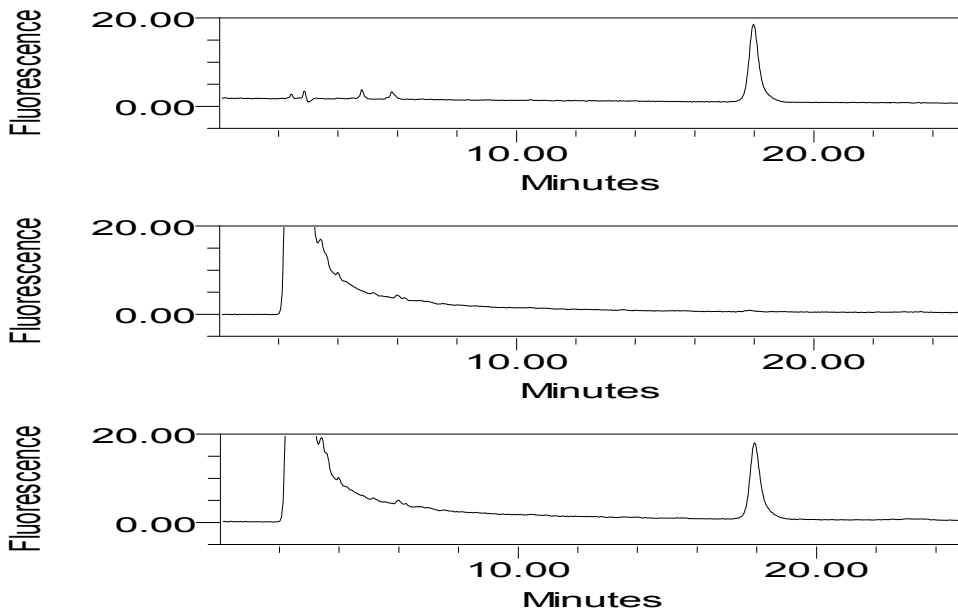
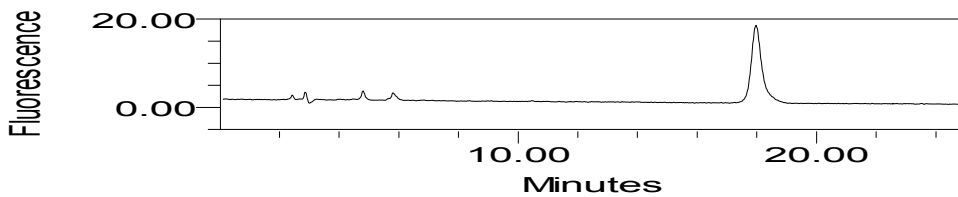


图15 典型精料补充饲料（牛精料，称取2.0g）的1mg/kg空白添加样品色谱图  
 （由上至下：100 ng/ml标准溶液；空白样品；1mg/kg空白添加样品）





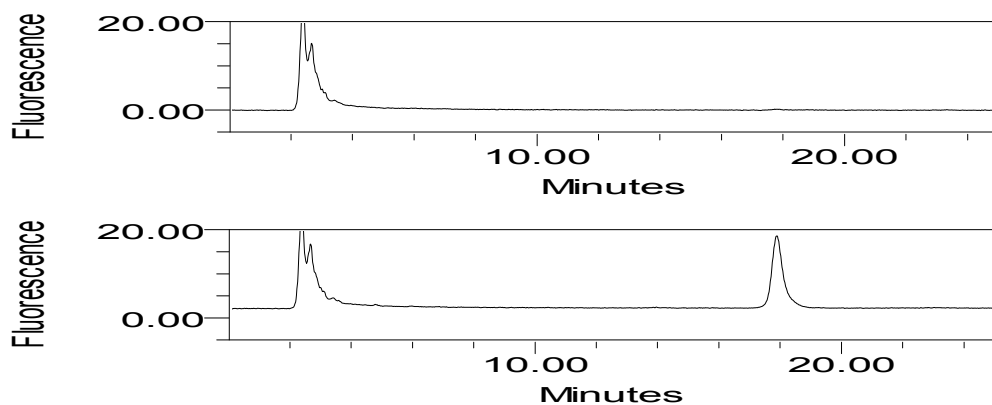


图16 典型浓缩饲料（鸡浓缩饲料，称取2.0g）的1mg/kg空白添加样品色谱图  
（由上至下：100 ng/ml标准溶液；空白样品；1mg/kg空白添加样品）

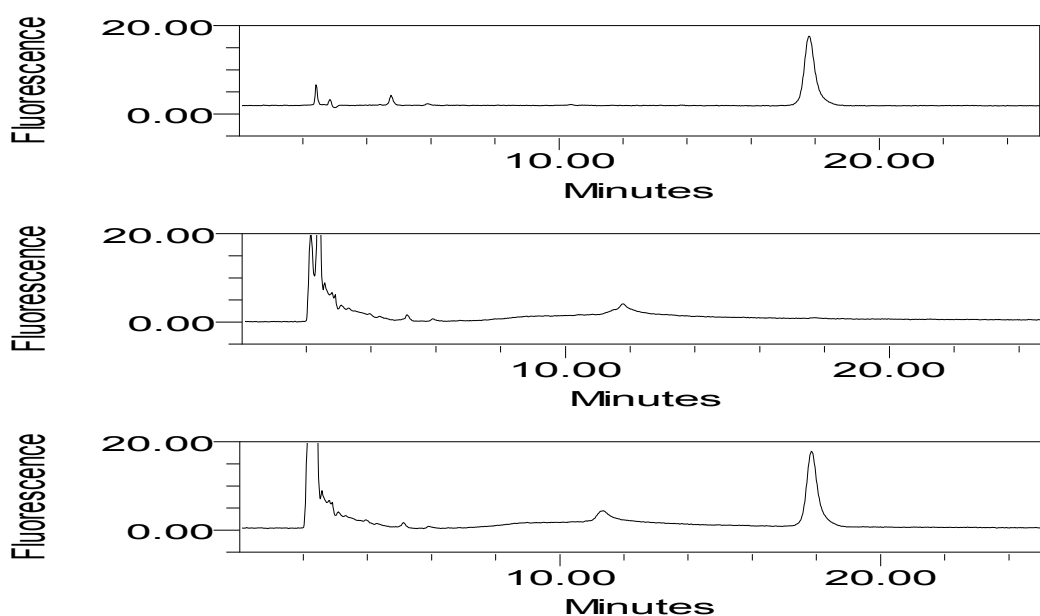
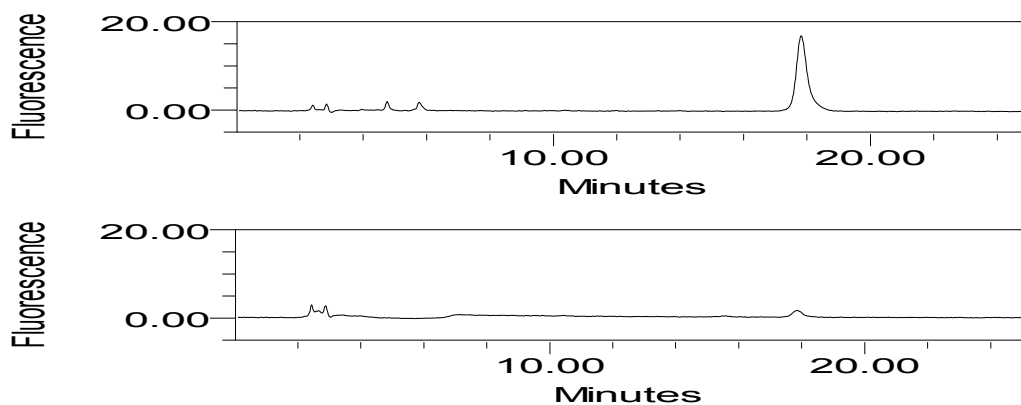


图17 典型配合饲料（鸡配合饲料，称取2.0g）的1mg/kg空白添加样品色谱图  
（由上至下：100 ng/ml标准溶液；空白样品；1mg/kg空白添加样品）



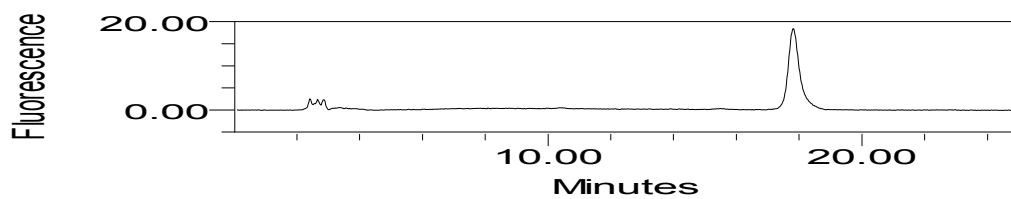


图18 典型预混合饲料（猪预混合饲料，称取2.0g）的1mg/kg空白添加样品色谱图  
（由上至下：100 ng/ml标准溶液；空白样品；1mg/kg空白添加样品）

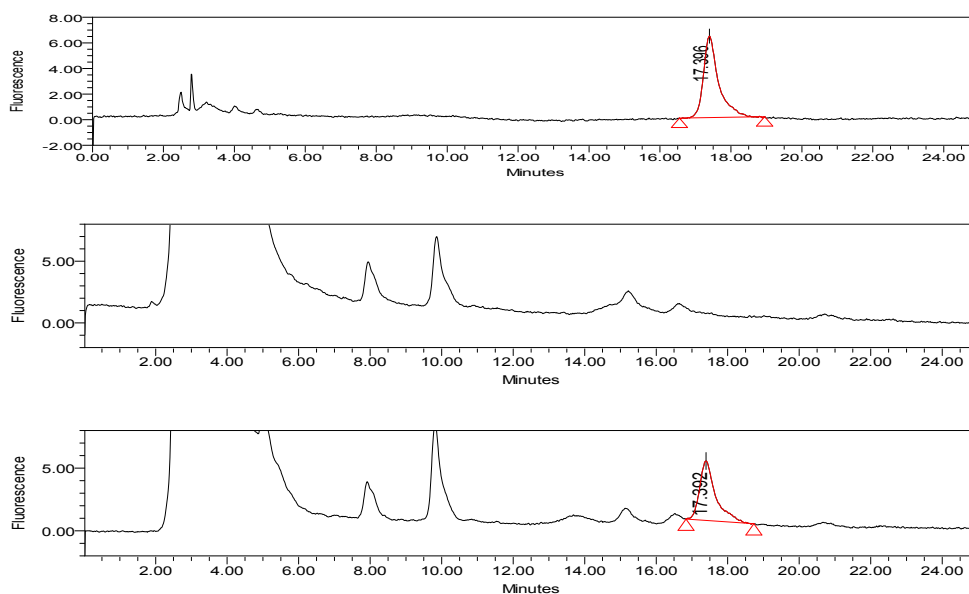


图19 典型预混合饲料（鸡预混合饲料，称取1.0g）的1mg/kg空白添加样品色谱图  
（由上至下：50 ng/ml标准溶液；空白样品；1mg/kg空白添加样品）

## 5. 干扰实验

取 50 ng/mL 拉沙洛西钠和其它抗球虫药物 50 ng/mL 莫能菌素、50 ng/mL 甲基盐霉素标准品溶液进样分析，结果表明这些药物对本药物的分析没有干扰。

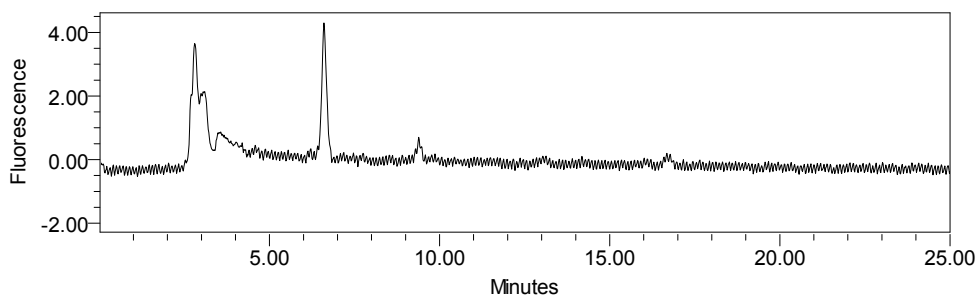


图 20 50 ng/mL 莫能菌素标准溶液色谱图

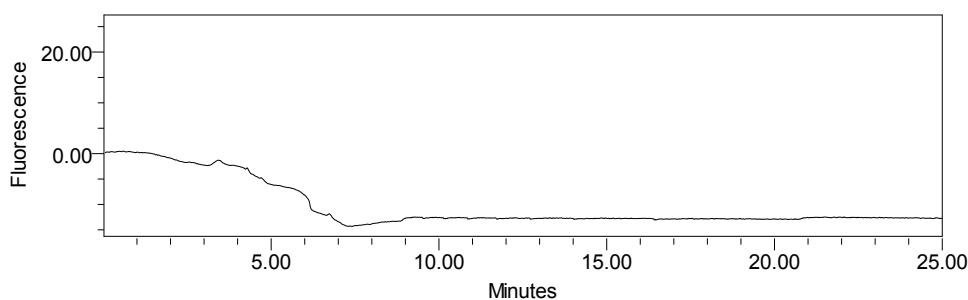


图 21 50 ng/mL 甲基盐霉素标准溶液色谱图

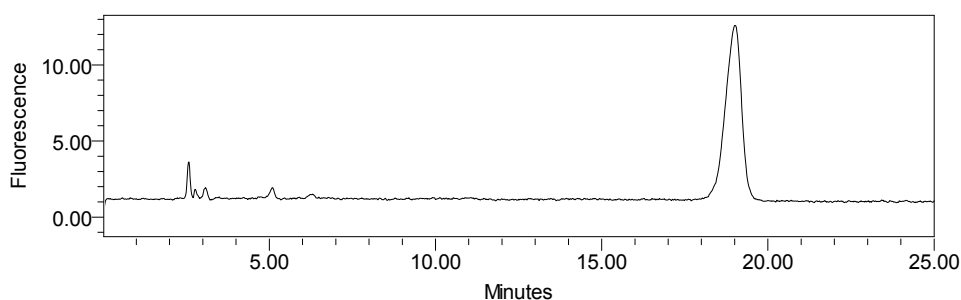


图 22 50 ng/mL 拉沙洛西钠标准溶液色谱图

## 6. 方法确证

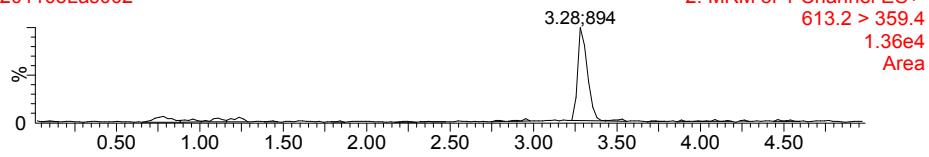
2020 年 11 月至 2021 年 1 月期间，采用本研究建立的方法分别的鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、猪预混合饲料和牛精料补充料 1 mg/kg 的添加回收试验结果进行确证分析，将液样分析样品采用《农业部 1862 号公告-4-2012 饲料中 5 种聚醚类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》的仪器分析条件进行测定。两个方法的添加回收结果见表 16，该结果表明：本研究方法与确证分析方法的回收率结果分别为 71.50-90.01%和 88.42-102.65%之间，变异系数分别为 8.40-8.73%和 4.36-17.09%之间，确证分析的回收率结果略高但变异系数范围略大，二者的差异不显著。四种饲料的质谱确证方法的选择离子图见图 23-26。

表 16 定量限添加样品(1 mg/kg)的确证分析结果

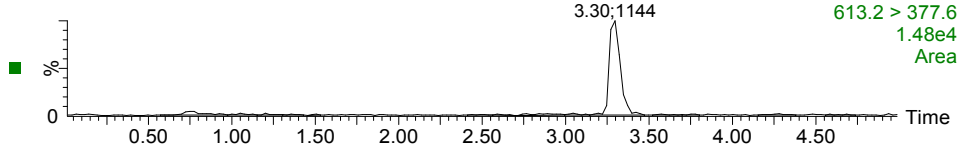
饲料品种	本方法						农业部 1862 号公告-4-2012					
	回收率 (%)					RSD %	回收率 (%)					RSD%
	1	2	3	4	平均值		1	2	3	4	平均值	
鸡配合料	77.70	67.16	75.70	65.44	71.50	8.53	89.93	92.92	84.01	86.80	88.42	4.36
鸡浓缩料	76.18	65.85	77.80	67.25	71.77	8.48	96.60	89.67	99.84	92.68	94.70	4.69
猪预混合料	96.83	83.70	96.31	83.25	90.02	8.40	107.21	123.41	83.67	96.32	102.65	16.41
牛精料	87.42	75.56	83.88	72.51	79.84	8.73	98.90	78.74	119.52	95.15	98.08	17.09

**LASJPH100ppbST2**

20201105Las002

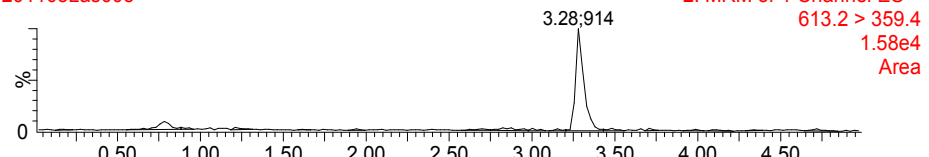


20201105Las002

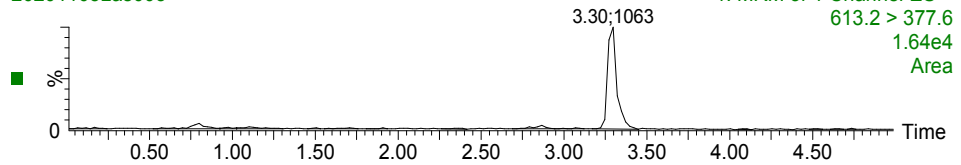


**LASJPH100ppbT1**

20201105Las003

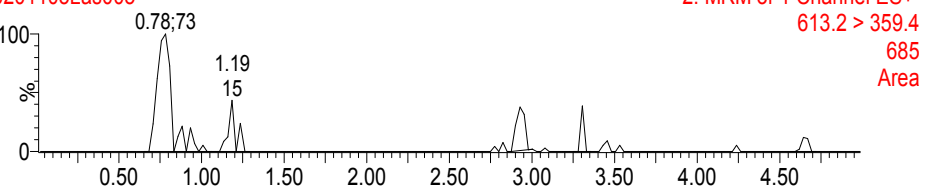


20201105Las003



**LASJPHK1**

20201105Las005



20201105Las005

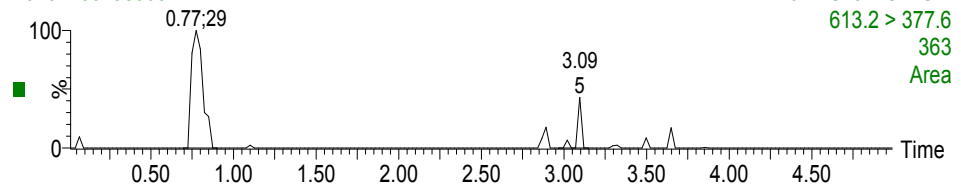
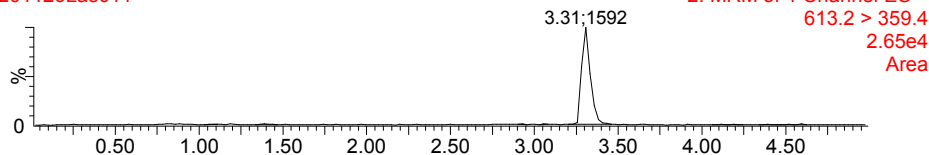


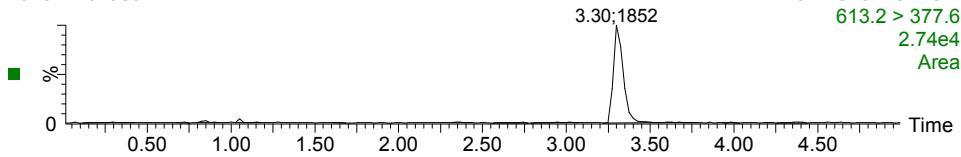
图 23 鸡配合饲料的 1mg/kg 添加样品选择离子色谱图 (1.基质加标样; 2.添加样; 3.空白样)

**LASJNS100ppbST1**

20201126Las011

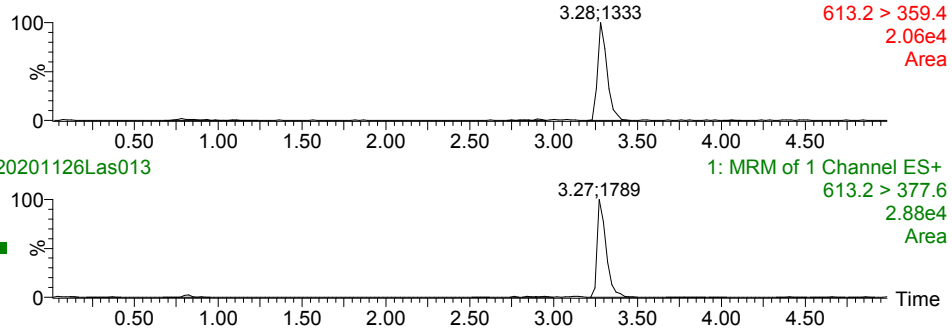


20201126Las011

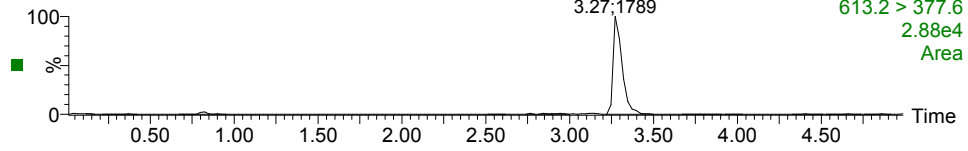


**LASJNS100ppbT1**

20201126Las013

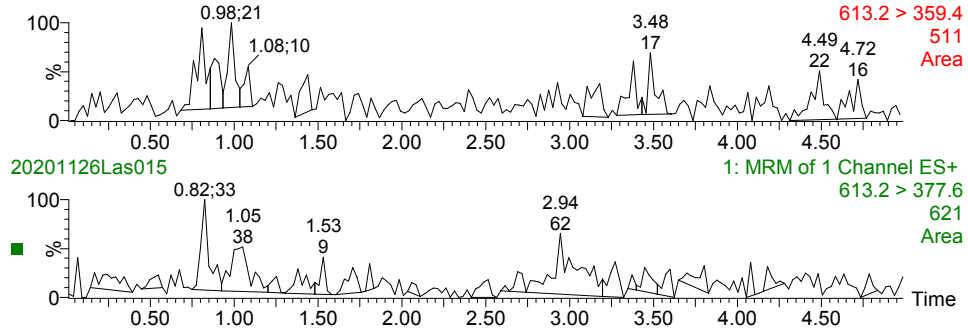


20201126Las013



**LASJNSK1**

20201126Las015



20201126Las015

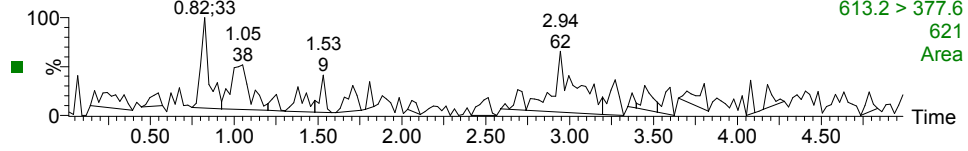
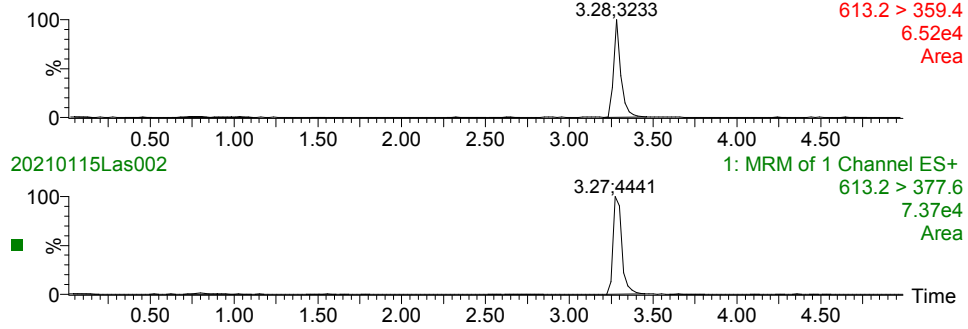


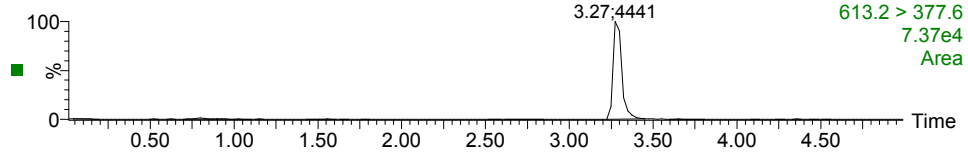
图 24 鸡浓缩饲料的 1mg/kg 添加样品选择离子色谱图 (1.基质加标样; 2.添加样; 3.空白样)

**LASZYH100ppbST1**

20210115Las002

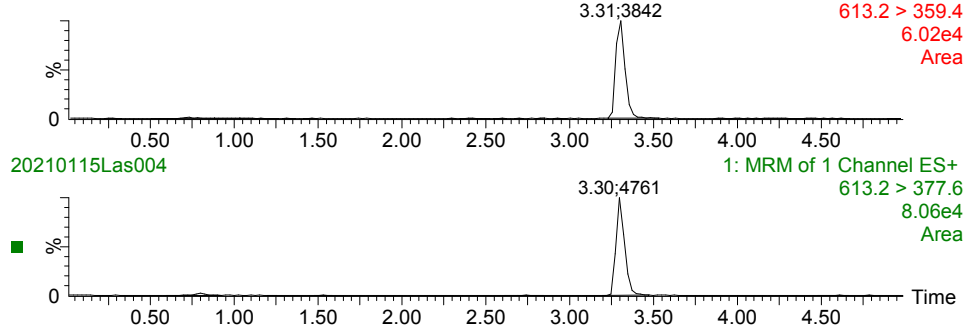


20210115Las002

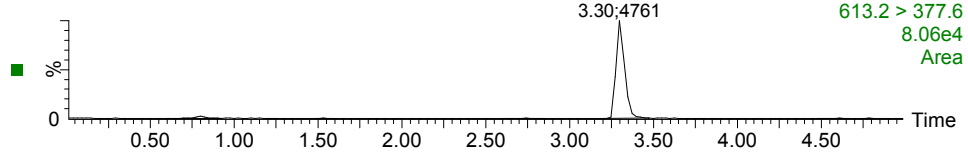


**LASZYH100ppbT1**

20210115Las004



20210115Las004



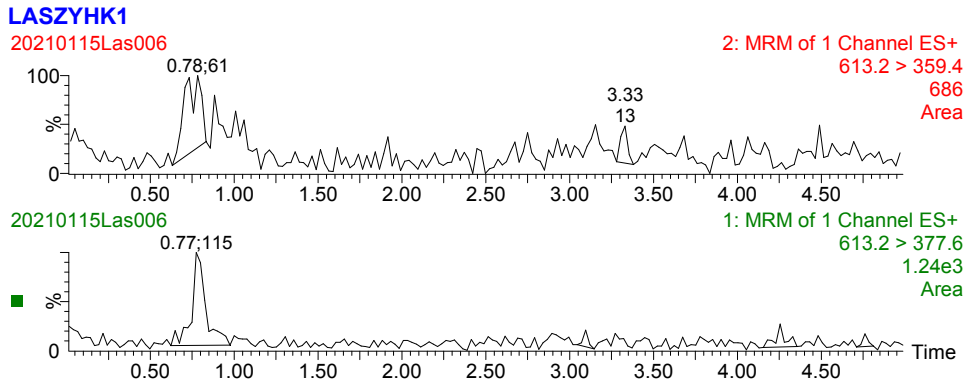


图 25 猪预混合饲料的 1mg/kg 添加样品选择离子色谱图 (1.基质加标样; 2.添加样; 3.空白样)

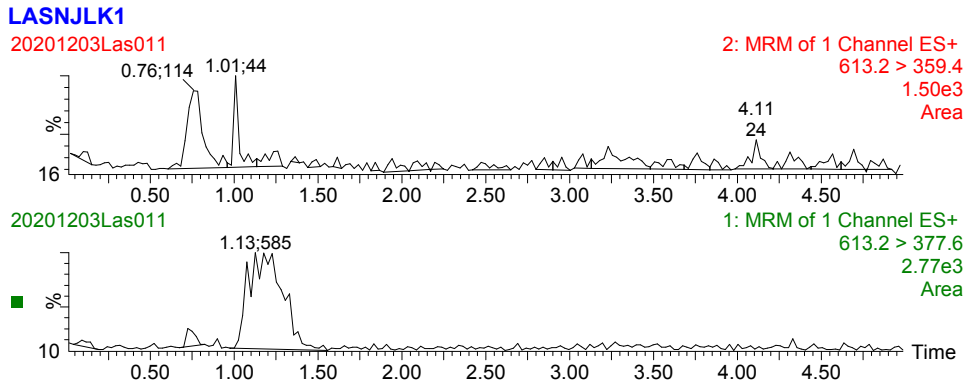
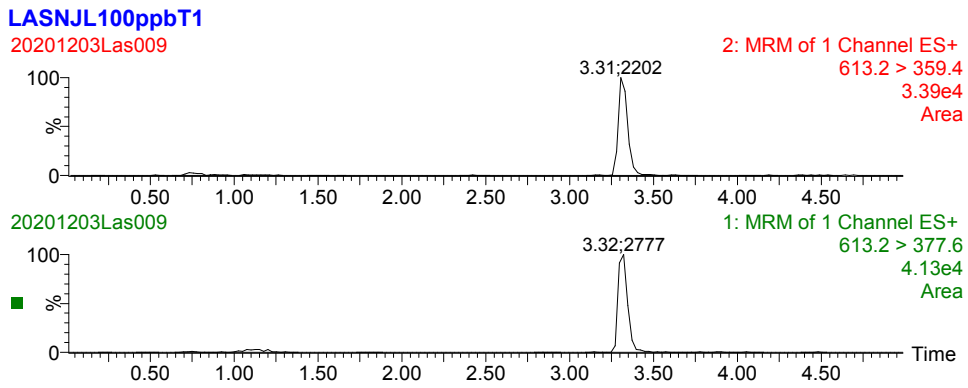
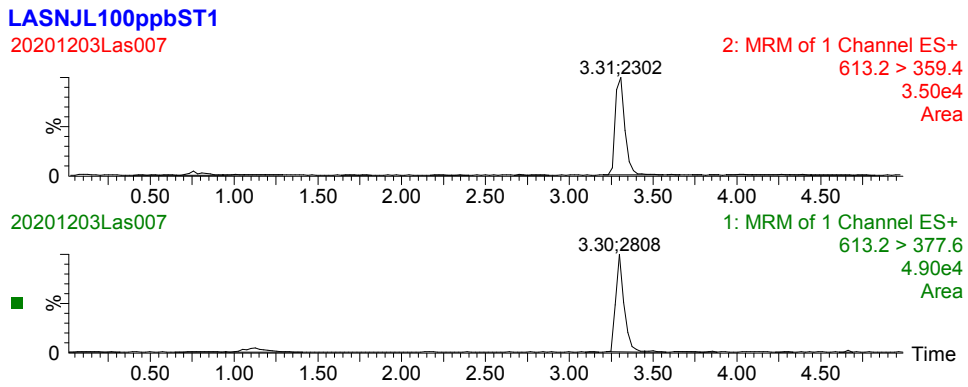


图 26 牛精料补充饲料的 1mg/kg 添加样品选择离子色谱图 (1.基质加标样; 2.添加样; 3.空白样)

## 7. 实际样品的测定

分别采用我们优化后的方法和原 NY/T 724-2003 方法对某公司自制的 6 份不同饲料样品进行拉沙洛西钠的测定，结果见表 17。由此结果可知，新建立的方法对同一样品的检测值均高于原标准方法，方法的准确性更好。

表 17 实际样品中拉沙洛西钠的测定结果

饲料品种	添加量	本方法				NY/T 724-2003			
		药物含量 (mg/g)			RSD %	药物含量 (mg/g)			RSD %
		重复一	重复二	平均值		重复一	重复二	平均值	
猪配合饲料 1	50 mg/g	40.29	38.11	39.20	3.93	34.70	38.95	36.82	8.16
猪配合饲料 2	30 mg/g	28.91	28.87	28.89	0.11	25.01	24.40	24.71	1.75
猪配合饲料 3	30 mg/g	26.79	30.15	28.47	8.33	18.69	23.99	21.34	17.57
鸡配合饲料 4	10 mg/g	9.04	9.07	9.06	0.23	8.41	7.90	8.16	4.42
鸡配合饲料 5	10 mg/g	8.00	7.33	7.66	6.15	7.14	6.06	6.60	11.57
鸡配合饲料 6	10 mg/g	7.15	7.51	7.33	3.43	6.75	6.38	6.57	3.95

#### (四) 验证实验

根据标准复核要求，本标准经农业农村部饲料校验与安全监督检验测试中心（北京）、中国农业科学院农产品加工所等三家单位进行了方法验证。三家单位的验证结果满意，验证报告见附件。

#### (五) 标准定向征求意见

已完成 30 位专家的定向征求意见。

#### (六) 标准预审

待进行。

#### (七) 标准终审

待进行。

### 四、采用国际标准

修改采用美国 AOAC 官方标准方法 2008.01(2013年修订版) 动物饲料和预混剂中拉沙洛西钠的测定 反相液相色谱法。

### 五、与现行法律法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。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。

### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

### 七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

本标准作为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一，因此建议将其作为推荐性标准颁布实施。

#### 八、贯彻标准的要求和措施建议

无。

#### 九、废止现行有关标准的建议

不涉及。

#### 十、其他应予说明的事项

无。

#### 参 考 文 献

- 1 A. Anadón, M. R. Martínez-Larrañaga. Lasalocid sodium. Foods, Materials, Technologies and Risks. Encyclopedia of Food Safety, Editor in chief: Yasmine Motarjemi. Academic Press. 2014.
- 2 AOAC INTERNATIONAL. Chapter 5 2008.01 (5.2.07) Lasalocid Sodium in Animal Feeds and Premixes (Final Action 2013). Official Methods of Analysis (2019) 21ST Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA
- 3 FOCHT, Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed-phase liquid chromatography: collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(3):479-488.
- 4 EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), et al. Safety and efficacy of Avatec® 150G (lasalocid A sodium) for chickens for fattening and chickens reared for laying, and modification of the terms of authorisation for chickens for fattening, chickens reared for laying, turkeys for fattening, minor avian species (pheasants, guinea fowl, quails and partridges) except laying birds. EFSA journal. 2017, 15(8): e04857. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4857
- 5 中华人民共和国农业部. NY/T 724-2003 饲料中拉沙洛西钠的测定 高效液相色谱法。拉沙洛西钠的液相分析方法
- 6 Ding Shuangyang, Shen Jianzhong, Zhang Suxia, Li Xiaowei. Determination of Lasalocid Sodium in Feed by High Performance Liquid Chromatography[J]. China Feed, 2003(08):23-24. 丁双阳, 沈建忠, 张素霞, 李晓薇. 高效液相色谱法测定饲料中拉沙里菌素[J]. 中国饲料, 2003(08):23-24.
- 7 Liquid chromatography with fluorescence detection of lasalocid sodium in feeds and premixes. Osadca M, Araujo M. J Assoc Off Anal Chem. 1978, (5):1074-7
- 8 MATABUDUL, D. K. CROSBY, N. T. LUMLEY, et al, The optimisation of a rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2001, 75(4):465-471.
- 9 HORMAZABAL, V. OSTENSVIK, O. KALDHUSDAL, An improved LC-MS method for the determination of lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005, 28(17):2769-2776. 拉沙洛西钠的液质分析方法
- 10 ASUKABE, H. MURATA, H. HARADA, Improvement of chemical analysis of antibiotics. 21. Simultaneous determination of three polyether antibiotics in feeds using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(1):112-117.
- 11 DUSI, G. GAMBA, Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization[J]. Journal of Chromatography, 1999, 835(1/2):243-246.
- 12 Vincent, Ursula.; Chedin, Mostafa. Proficiency of official control European laboratories in the determination of authorised coccidiostats in poultry feed. 2015 <http://dx.publications.europa.eu/10.2787/955269>  
<http://bookshop.europa.eu/uri?target=EUB:NOTICE:LANA27213:EN:HTML>



- 13 Chedin, Mostafa.; Von Holst, Christoph. Determination of authorised coccidiostats in poultry compound feed. Publication: Luxembourg : Publications Office, 2012
- 14 Moretti, S. Fioroni, L. Giusepponi, D. Pettinacci, L. Saluti, G. Galarini, R. Development and validation of a multiresidue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for 11 coccidiostats in feed. *Journal of AOAC International*; 2013. 96(6):1245-1257.
- 15 Konrad Pietruk, Małgorzata Olejnik, Piotr Jedziniak, Teresa Szprengier-Juszkiewicz. Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 112: 50–59.
- 16 ROKKA, M. JESTOI, M. PELTONEN, Trace level determination of polyether ionophores in feed[J]. *BioMed Research International*, 2013, 3: 151363. DOI: 10.1155/2013/151363
- 17 CRONLY, M.BEHAN, P.FOLEY, et al, Determination of eleven coccidiostats in animal feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry at cross contamination levels[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 700(1/2):26-33.
- 18 EBEL, J. G. WACHS, T. HENION, et al, Rapid forensic selected reaction monitoring liquid chromatography/mass spectrometry determination of ionophore antibiotics found at toxic levels in animal feeds[J]. *Journal of AOAC International*, 2004, 87(1):25-30.
- 19 HORMAZABAL, V. YNDESTAD, M. OSTENSVIK, Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002, 25(17):2655-2663.
- 20 VINCENT, U. CHEDIN, M. YASAR, et al, Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I. Application to targeted feed[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47(4/5):750-757.
- 21 VUDATHALA, D. MURPHY, Rapid method for the simultaneous determination of six ionophores in feed by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 2012, 95(4):1016-1022.
- 22 Delahaut, Ph.; Pierret, G.; Ralet, N., and others. Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27, no. 6 (2010): 801-809
- 23 Olejnik M, Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T. The determination of six ionophore coccidiostats in feed by liquid chromatography with postcolumn derivatisation and spectrophotometric/fluorescence detection. *The scientific world journal*. 2013:763402.
- 24 Pietruk K; Olejnik M; Posyniak A. Coccidiostats in milk: development of a multi-residue method and transfer of salinomycin and lasalocid from contaminated feed[J]. *Food Additives & Contaminants*. 2018, 6: 1-11. 液质
- 25 Jia Tao, Determination of polyether drugs in chicken feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Feed China*. 2016, 2: 47-49. 贾涛. 液相色谱-串联质谱法检测鸡用饲料中聚醚类药物的方法研究. *饲料广角*. 2016, 2: 47-49.
- 26 Annunziata L; Visciano P; Stramenga A; Colagrande MN; Campana G; Scortichini G; Migliorati G; Compagnone D. Determination of regulatory ionophore coccidiostat residues in feedstuffs at carry-over levels by liquid chromatography-mass spectrometry. *PLoS ONE* [Electronic Resource]. 2017, 12(8):e0182831.
- 27 YANG Xiao-kang, ZHANG Hui-yan, GU Jian-hong, YUAN Yan1, BIAN Jian-chun, LIU Zong-ping, LIU Xuezhong, Preparation of Monoclonal Antibody Against Lasalocid and Deveopment of Indirect Competitive ELISA Detection Method[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017,44(10):3049-3056. 杨小康,张绘艳,顾建红,袁燕,卞建春,刘宗平,刘学忠. 拉沙里菌素单克隆抗体的研制及间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2017,44(10):3049-3056.
- 28 Bertini, S.; Feirrerro, S.; Berny, P. A New Improved High Performance Thin Layer Chromatography

- (HPTLC) Method for the Detection of Ionophore Antibiotics in Feeds and Animal Tissues. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26, no. 1 (2003): 147-156.
- 29 ALPHARMA Company. Bovatec®150 FP. Brand of lasalocid, Type A Medicated. <https://www.drugs.com/pro/bovatec-150-fp.html>. 2020.
  - 30 Government of Canada. Index of medicating ingredients approved by livestock species. <https://www.inspection.gc.ca/animal-health/livestock-feeds/medicating-ingredients/mib/livestock-species/eng/1522783196554/1522783196850>. Date modified: 2020-06-22.
  - 31 28 Lasalocid sodium - FAMIC. [www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/a28\\_ls.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/a28_ls.pdf)
  - 32 WHO Technical Report Series (WHO). Eighty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Evaluation of certain veterinary drug residues in food (no. 997). ISBN: 978 92 4 120997 7, 2016.
  - 33 zoetis. Bovatec Lasalocid Sodium Feed Additive Liquid 200g-L. [https://www.zoetis.com.au/\\_locale-assets/sds/bovatec-lasalocid-sodium-feed-additive-liquid-200-g-l-msds.pdf](https://www.zoetis.com.au/_locale-assets/sds/bovatec-lasalocid-sodium-feed-additive-liquid-200-g-l-msds.pdf)
  - 34 ORUC, H. H.; CANGUL, I. T.; CENGIZ, M., and others. Acute lasalocid poisoning in calves associated with off-label use. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2011, 34(2): 187-189. doi: 10.1111/j.1365-2885.2010.01240.x.
  - 35 Dzikamunhenga, Rungano Stan. Safety evaluation of lasalocid use in farm-reared pheasants. Publication: [Ames, Iowa] : [Iowa State University], 2012 <http://lib.dr.iastate.edu/etd/12318/>
  - 36 CALLAWAY T R, EDRINGTON T S, RYCHLIK J L, et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety[J]. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2003, 4(2):43.
  - 37 农业部. 农业部公告第168号 饲料药物添加剂使用规范. 2002.
  - 38 中华人民共和国农业农村部公告 第246号-4 拉沙洛西钠预混剂等5个进口兽药产品质量标准和标签、说明书样稿. 2019.
  - 39 GB31650-2019食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量。
  - 40 FDA PI. Bovatec(Generic Name: lasalocid sodium; Dosage Form: FOR ANIMAL USE ONLY): Dosage and Administration. <https://www.drugs.com/pro/bovatec.html>
  - 41 ZHANG XY, ZHANG Z, YANG ZQ, et al. Solubility and polymorphic forms of antibiotic lasalocid sodium in different organic solvents[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2014, 374:20-14.
  - 42 Campbell H, Nayeri G. Determination of monensin, narasin, and salinomycin in mineral premixes, supplements, and animal feeds by liquid chromatography and post-column derivatization: collaborative study. *J AOAC Int*. 2006;89(5):1229-1242.
  - 43 BERNARDETE FERRAZ SPISSO, ROSANA GOMES FERREIRA, MARARLENE ULBERG PEREIRA, et al., Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 682(1).
  - 44 OLEJNIK, M. SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T. JEDZINIAK, Confirmatory method for determination of coccidiostats in egg [J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2010, 54(3):327-333.
  - 45 WANG Ying-Yu, XIA Xi, LI Xiao-Wei, DING Shuang-Yang, SHEN Jian-Zhong, Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of Coccidiostats in Chicken Skin and Fat[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(03):409-414. 王盈予, 夏曦, 李晓薇, 丁双阳, 沈建忠. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡皮及脂肪组织中抗球虫类药物残留[J]. *分析化学*, 2014, 42(03):409-414.
  - 46 ZHANG Jun, WANG Shuo, ZHENG Wen-jie, XU Hong, LIN An-qing, Determination of 5 Polyether Antibiotics in Animal Derived Food Tissues by LC-MS/MS[J]. *Food Research And Development*, 2013, 34(07):99-104. 张骏, 王硕, 郑文杰, 许泓, 林安清. 动物源食品中聚醚类多残留液质联用检测技术研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(07):99-104.

- 47 Lan Li-dan, Huang Yong-hui, Zhou Peng , Rapid Determination of 6 kinds of Coccidiostats in Animal Muscle[J]. Food and Machinery, 2011, 27(6):139-143.蓝丽丹, 黄永辉, 周鹏. HPLC-MS/MS 快速测定动物肌肉中 6 种聚醚类抗生素.食品与机械.2011, 27(6):139-143.
- 48 LIANG Chunlai,CHENG Linli,SHEN Jianzhong,ZHANG Yujie,ZHANG Suxia , Determination of 5 polyether antibiotics in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2009, 27(06):815-819.梁春来,程林丽,沈建忠,等.液相色谱-电喷雾串联质谱法检测鸡组织中 5 种聚醚类药物残留[J]. 色谱, 2009, 27(06):815-819.
- 49 Xiaoxing Liu, Shuyu Xie, Tengeng Ni, Dongmei Chen, Xu Wang, Yuanhu Pan, Yulian Wang, Lingli Huang, Guyue Cheng, Wei Qu, Zhenli Liu, Yanfei Tao, Zonghui Yuan. Magnetic solid-phase extraction based on carbon nanotubes for the determination of polyether antibiotic and s-triazine drug residues in animal food with LC-MS/MS. Journal of separation science. 2017, 40(11): 2416-2430.
- 50 Barreto F; Ribeiro C; Hoff RB; Costa TD. A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography - quadrupole linear ion trap - tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS): Validation according to European Union 2002/657/EC.Talanta. 2017, 168:43-51.
- 51 Matus JL; Boison JO.A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. Drug Testing & Analysis. 2016, 8(5-6):465-76.
- 52 Ha Jing, Ge Song, Jian-chen Li, Lian-feng Ai. Determination of six polyether antibiotic residues in foods of animal origin by solid phase extraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2016, 1017(1): 187-194. 17.
- 53 M Olejnik , T Szprengierjuszkievicz , P Jedziniak. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chromatography A. 2009,1216(46): 8141-8148.
- 54 Zhao X; Wang B; Xie K; Liu J; Zhang Y; Wang Y; Guo Y; Zhang G; Dai G; Wang J. Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS methods for determining eight coccidiostats in beef. Journal of Chromatography B, 2018, 1087-1088:98-107.
- 55 Hurst JJ; Wallace JS; Aga DS.Method development for the analysis of ionophore antimicrobials in dairy manure to assess removal within a membrane-based treatment system. Chemosphere, 2018: 197:271-279.
- 56 Alves Monteiro, Rosana Gomes Ferreira, BetcpOnia de Souza, Carlos Armi Wanderley da Ncpdbrega. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. Food chemistry. 2016, 196(01) : 130-137.
- 57 Jerez A, Chihuailaf R, Gai M, Noro M, Wittwer F. Detection of lasalocid and monensin in raw milk samples from supplemented dairy cows. [Spanish].Archivos de Medicina Veterinaria; 2014. 46(3):445-449.
- 58 Bo Hai-bo,Chi Li-li, Cao Yan-zhong. Determination of 6 polyether antibiotics residues in milk and milk powder by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J].China Analytical Chemistry, 2009, 42 (12) : 23-26.薄海波, 雒丽丽, 曹彦忠等.超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶和奶粉中 6 种聚醚类抗生素残留量 [J].分析化学, 2009, 42 (12): 23-26.
- 59 Clark SB, Storey JM, Carr JR, Madson M. Analysis of lasalocid residues in grease and fat using liquid chromatography-mass spectrometry. Food Additives and Contaminants A; 2015. 32(8):1243-1248.
- 60 CHENG Ming, GONG Lan, CHEN Wang, ZHOU Chun. A rapid and rapid detection method for polyether antibiotics in honey. 2017, 4: 8-10. 陈明, 龚兰, 陈旺, 邹春. 蜂蜜中聚醚类抗生素系的一次性快速检测方法研究. 蜜蜂杂志, 2017, 4: 8-10.

- 61 Zang GUO-dong, Fu Jing-wen, Yang qing-zhan, Huang Zi-jing, Chen Meng-jun. Determination of 2 kinds of polyether drugs in chicken egg by QuEChERS dSPE EMR-Lipid-LC-MS-MS [J]. *Anhui Agriculture Science*, 2017, 45(32): 75-76,83. 臧国栋, 符靖雯, 杨钦沾, 黄子敬, 陈孟君. QuEChERS dSPE EMR-Lipid-LC-MS-MS 测定鸡蛋中 2 种聚醚类抗球虫药物残留. *安徽农业科学*, 2017, 45(32): 75-76,83.
- 62 Roberta Galarin, Laura Fioroni, Simone Moretti, Laura Pettinacci, Guglielmo Dusi. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. *Analytica Chimica Acta*. 2011,700(1-2): 167-176.
- 63 TKACIKOVA, S. KOZAROVA, I. MACANGA, et al, Determination of lasalocid residues in the tissues of broiler chickens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J], *Food Additives and Contaminants A*, 2012, 29(5):761-769.
- 64 Zhang Suxia, Shen Jianzhong, Ding Shuangyang, Li Xiaowei. Determination of Lazaroxic Acid Residues in Chicken Liver by High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004(01):19-21. 张素霞, 沈建忠, 丁双阳, 李晓薇. 鸡肝组织中拉沙里菌素残留的高效液相色谱检测方法[J]. *中国兽药杂志*, 2004(01):19-21.
- 65 MATABUDUL, D. K. CONWAY, B. LUMLEY, I.D., A rapid method for the determination of lasalocid in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by LC-MS-MS[J]. *Analyst*, 2000,125(12):2196-2200.
- 66 TARBIN, J. A. SHEARER, G., Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of lasalocid in chicken tissues and egg using polymeric and porous graphitic carbon columns[J]. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 1992, 579(1):177-183.
- 67 FRANK, L. R. BARNES, C. J, Liquid chromatographic determination of lasalocid sodium in chicken skin: interlaboratory study[J]. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 1989,72(4):584-586.