

# 国家标准修订项目

## 《饲料中大观霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明  
(送审稿)

浙江大学  
2022年10月

# 目 录

一、工作简况	1
1.1 任务来源	1
1.2 修订背景	1
1.3 主要工作过程	2
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	3
2.1 标准编制原则	3
2.2 主要修订内容	3
2.3 主要技术内容及其确定依据	4
2.3.1 仪器试验条件研究	4
2.3.1.1 色谱柱的选择	4
2.3.1.2 进样溶液的选择	6
2.3.1.3 流动相的组成	6
2.3.1.4 质谱试验条件	9
2.3.2 标准溶液稳定性研究	10
2.3.3 样品前处理条件研究	11
2.3.3.1 提取液的确定	11
2.3.3.2 提取液 pH 值的优化和确定	16
2.3.3.3 提取液体积的优化和确定	17
2.3.3.4 提取时间的优化和确定	18
2.3.4 净化条件的优化和确定	19
2.3.5 试验步骤	21
2.3.5.1 饲料样品试样的制备	21
2.3.5.2 定性和定量分析	21
2.3.5.3 结果计算	22
2.3.6 方法学考察	23
2.3.6.1 基质的影响	23
2.3.6.2 线性方程和线性范围	25
2.3.6.3 方法的灵敏度	25
2.3.6.4 方法的准确度和精密度	27
2.4 实际样品（非添加样）的测定	31
2.5 修订前后技术内容的对比	32
三、实验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效果	32
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	32
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	32
六、与有关法律、法规的关系	32
七、重大分歧意见的处理经过和依据	33
八、涉及专利的有关说明	33
九、贯彻国家标准的要求，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	33
十、其他应当说明的事项	33

# 《饲料中大观霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》

## 编制说明

### 一、工作简况

#### 1.1 任务来源

本标准项目服务目录代码为 125C0701，项目名称为《饲料中大观霉素的测定 液相色谱—串联质谱法》，项目承担单位为浙江大学和浙江万方生物科技有限公司。本标准由农业农村部农产品质量安全监管司委托，全国饲料工业标准化技术委员会归口。

#### 1.2 修订背景

大观霉素曾被广泛用于治疗家禽、猪的细菌性感染，或作为生长促进剂<sup>[1]</sup>。其中，硫酸大观霉素与盐酸林可霉素的预混剂（每 1000 g 中含林可霉素 22 g 和大观霉素 22 g）被用于预防猪赤痢、沙门氏病菌、大肠菌肠炎及支原体肺炎（农业农村部第 168 号公告）。考虑到饲用抗生素的不合理及违法使用带来的抗生素在食物中残留、细菌耐药性以及环境污染等系列问题，我国农业农村部根据《兽药管理条例》和《饲料和饲料添加剂管理条例》有关规定，按照《遏制细菌耐药国家行动计划（2016—2020 年）》和《全国遏制动物源细菌耐药行动计划（2017—2020 年）》部署，发布农业农村部公告第 194 号，停止生产、进口、经营、使用药物饲料添加剂。公告第 194 号规定，自 2020 年 1 月 1 日起，退出除中药外的所有促生长类药物饲料添加剂品种，因此饲用抗生素检测技术的建立与标准的制定在政府部门对行业的监管方面尤为重要。从源头掌握动物食品安全状况也越来越需要灵敏、快速、可靠的分析方法作为饲料和食品检验的保障<sup>[1]</sup>。

大观霉素（化学结构见图 1），属于氨基糖苷类化合物，结构上由氨基糖与氨基环醇组成。因大观霉素具有热稳定性和非挥发性，使用 GC 或 GC-MS 分析需要较长时间的衍生化反应<sup>[3]</sup>；其结构上没有发色光团和荧光光团，使用液相色谱分析通常需要柱前或柱后衍生，然后用紫外或荧光检测<sup>[4]</sup>。上述方法均会因衍生效率或衍生物的稳定性低而导致方法的精密度较差<sup>[5-7]</sup>。脉冲安培计<sup>[8]</sup>、蒸发光散射<sup>[9]</sup>和化学发光检测<sup>[10]</sup>无需任何衍生，可以直接检测氨基糖苷类化合物，但不能进行确证，同时灵敏度也不够<sup>[11]</sup>。

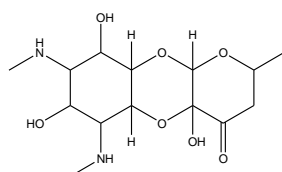


图 1. 大观霉素的化学结构（ChemDraw Ultra 作图）

液相色谱—质谱联用（LC-MS/MS）因其高选择性和准确性而在饲料质量控制中占有突出地位<sup>[12, 13]</sup>，然而氨基糖苷类化合物极性大的特性又限制了其在常规反相色谱—质谱联用上的应用<sup>[1]</sup>。离子对液相色谱法采用添加离子对试剂的方法延长了极性目标物在反相色谱柱上的保留，但是离子对试剂的使用会严重抑制质谱仪的电喷雾离子化效果，大幅降低仪器灵敏度<sup>[14]</sup>。作为离子对液相色谱法的替代，亲水相互作用液相色谱法（HILIC）在分析过程中对极性目标物具有较强的保留，并且 HILIC 流动相中高比例的有机相在电喷雾电离（ESI）过程中快速反应蒸发，相对于离子对液相色谱，HILIC 与 ESI 联用可以获得更高的灵敏度<sup>[15]</sup>。已有多篇文献报道采用 HILIC 分离大观霉素等氨基糖苷类化合物<sup>[14, 16]</sup>。

来自样品中的基质效应往往限制了 LC-MS/MS 方法的重现性和准确度<sup>[17]</sup>。在去除样品基质的前处理方法中，固相萃取（SPE）相对于在流动相加入改进剂<sup>[18]</sup>，稀释<sup>[19]</sup>，稳定同位素标记的内标物<sup>[20, 21]</sup>等方面普遍被认为更易于实现<sup>[11]</sup>。各种性能的离子型 SPE 小柱和亲水亲脂型（HLB）SPE 小柱常常用于去除样品中的基质<sup>[22, 23]</sup>。氨基糖苷类化合物的净化涉及离子交换机制，通常采用阳离子交换小柱，其填料的性质对加载的提取液 pH 值有较为严格的要求，因此采用 SPE 小柱净化提取液时，往往需要调节上样溶液的 pH 值，而使得氨基糖苷类化合物在 SPE 小柱上保留<sup>[24]</sup>。

总之，基质中氨基糖苷类化合物的分析，需要克服提取、净化、分离和检测等方面的困难<sup>[24]</sup>。现行标准《饲料中大观霉素的测定》（农业部 2086 号公告-7-2014）<sup>[25]</sup>，对于大观霉素的检测提供了两种方法：高效液相色谱—蒸发光散射检测法和液相色谱—质谱联用法。考虑到对大观霉素违法添加的监管和确证需要，本研究提出以下修订方案：采用液相色谱—质谱联用法作为检测方法，删除原标准高效液相色谱—蒸发光散射检测法，修改现行标准中作为确证法的液相色谱—质谱联用法对大观霉素的提取和净化程序以及仪器分析条件等。具体操作步骤为：采用 2%TCA（含 EDTA-2Na）作为提取液，调节提取液的 pH 值后，采用混合型阳离子交换（MCX）SPE 小柱对大观霉素进行净化和富集，再采用 HILIC 进行分离，质谱检测，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

### 1.3 主要工作过程

标准第一起草单位浙江大学根据标准的修订需要，成立了标准工作小组，进行标准的研制及起草工作，具体工作过程如下：

**2021 年 1-3 月：**标准编制工作小组检索了有关氨基糖苷类化合物检测方法的国内外文献，以及饲料中大观霉素检测技术现状，并向标准原起草单位进行了咨询，确保标准的实用性和普适性。随后制定了饲料中大观霉素检测方法试验草案，拟订工作计划和工作进度。

**2021年4-12月：**按照拟定的试验草案对饲料中大观霉素的提取和净化条件以及液相色谱—质谱联用仪的仪器参数进行研究，比较原标准以及在学术期刊上公开发表的学术论文所涉及的提取、样品净化、检测方法以及含量计算等技术要点，对方法的试验条件、主要技术指标等进行进一步优化，最终确定了前处理程序和仪器分析条件。并进行了线性、检出限和定量限、添加回收率等相关试验以确定方法最终是否具有可操作性和科学性。期间开展了对市场上畜、禽的配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料以及精料补充料中大观霉素的检测。

**2022年1-5月：**工作小组在标准编制过程中学习 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》以及 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》等编写规则。在2022年4月底完成标准草案和编制说明的撰写，并委托3家实验室验证复核。

与此同时，经工作小组讨论，广泛征求行业专家意见和建议，确定专家后发函征求意见。对专家意见进行整理并形成汇总意见，最终形成了《饲料中大观霉素的测定 液相色谱—串联质谱法》标准征求意见稿。认真分析专家反馈的意见和建议，并在此基础上对标准征求意见稿和编制说明进行修改、补充，形成标准预审稿《饲料中大观霉素的测定 液相色谱—串联质谱法》。

**2022年7-10月：**申请组织召开标准预审会。经过标准预审会，形成预审稿的审查意见和专家意见汇总表，根据专家意见补充实验，并对编制说明和标准预审稿进行修改，形成标准送审稿。

**2022年10-12月：**申请组织召开标准审查会，根据专家的修改意见，形成报批稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

## 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

本标准的编写制定过程以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检出限和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验。

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，标准的编写及表述按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》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 主要修订内容

**删除高效液相色谱法：**原标准中高效液相色谱法测定大观霉素适用范围是配合饲料，定量限为 5.0 mg/kg，对于复杂饲料基质中痕量大观霉素不能完全确证。更重要的一点是，蒸发光散射检测器在实验室的不普及。因此，删除了原标准（农业部 2086 号公告—7—2014）中规定

的高效液相色谱法，并将修订后的标准名称改为：饲料中大观霉素的测定 液相色谱—串联质谱法。

**修改高效液相色谱—串联质谱法（确证法）：**高效液相色谱—串联质谱法原理修改为：试样中大观霉素用三氯乙酸溶液提取，乙二胺四乙酸二钠溶液络合金属离子，经混合型阳离子交换固相萃取小柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

**修改测定步骤：**随着对原标准方法原理的修改，本文件对其涉及的提取、净化和测定等步骤也作了相应的修改。

## 2.3 主要技术内容及其确定依据

本研究拟采用液相色谱—质谱联用法作为检测方法，方法确定过程总体分为提取、样品净化和样品检测三个部分，并对具体实验条件进行优化和确定。

所涉及到的主要试验材料为：盐酸大观霉素（纯度：99.9%）购自坛墨质检科技股份有限公司。色谱级甲醇、乙腈、甲酸铵和甲酸购自美国 Sigma-Aldrich 公司。Oasis MCX 固相萃取柱（60 mg，3 mL）、Oasis MCX 固相萃取柱（150 mg，6 mL）、Oasis MCX 固相萃取柱（500 mg，6 mL）和 Oasis WCX 固相萃取柱（60 mg，3 mL）购自美国 Waters 公司，ASPEC SCX（60 mg，3 mL）购自美国 Gilson 公司，Bond Elut Plexa PCX（60 mg，3 mL）购自美国 Agilent 公司，DB WCX 固相萃取柱（60 mg，3 mL）购自上海迪柏生物科技有限公司。分析纯三氯乙酸、氨水、草酸和 EDTA-2Na 均购自国药集团化学试剂有限公司。

Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>（2.1×50 mm，1.7 μm）色谱柱、Cortecs UPLC HILIC（2.1×100 mm，1.6 μm）色谱柱、Acquity UPLC BEH HILIC（2.1×50 mm，1.7 μm）色谱柱和 Acquity UPLC BEH HILIC（2.1×100 mm，1.7 μm）色谱柱均购自美国 Waters 公司，SiELC Obelise R（2.1×100 mm，3 μm）色谱柱购自美国 SiELC 公司。

所用仪器设备为：超高效液相色谱—质谱联用仪（Acquity UPLC TQ MS，美国 Waters 公司）、超声波清洗器（KQ-500E，昆山市超声仪器有限公司）、超纯水仪（Milli-Q，德国 EMD Millipore 公司）、电子分析天平（ME204E，瑞士 Mettler Toledo 公司）、离心机（ST 40R，美国 Thermo 公司）和氮吹仪（N-EVAP 112，美国 Organomation 公司）。

### 2.3.1 仪器试验条件研究

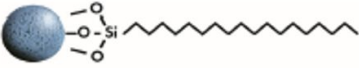



#### 2.3.1.1 色谱柱的选择

考虑到大观霉素的强极性和弱碱性的化学特性，本研究选取了 HILIC 色谱柱。HILIC 属含水的正相色谱法，按照键合相的性质将 HILIC 固定相分为五大类：硅胶、化学键合相、离子交换和两性离子固定相、亲水大分子键合相、表面离子液体键合相。其中，化学键合相类固定相比较多，包括氨基、二羟基、氰基、酰胺和其他键合相，它们往往通过对硅胶或者聚合物表面

进行化学修饰而制备得到。

选取 5 款不同的色谱柱 (BEH C<sub>18</sub>, SiELC Obelise R, Cortecs HILIC, BEH HILIC) 进行比较。其中 BEH C<sub>18</sub> 是反相液相色谱 (RPLC) 常用反相色谱柱, 而 SiELC Obelise R, Cortecs HILIC, BEH HILIC 均属于亲水作用色谱 (HILIC) 柱, 不同色谱柱固定相见表 1。

表 1 不同色谱柱固定相及价格比较

色谱柱类型	颗粒/配基	示意图	价格 (元)
BEH C <sub>18</sub>	键合 C <sub>18</sub> 烷基		5500
SiELC Obelise R	键合两性离子		7200
Cortecs HILIC	未键合实心颗粒硅胶		6500
BEH HILIC	未键合亚乙基桥杂化颗粒		5500

采用 BEH C<sub>18</sub> 色谱柱时, 以 0.1% 甲酸甲醇—水体系为流动相, 以 0.1% 甲酸溶液溶解大观霉素, 进样浓度为 0.5 μg/mL, 流速设置为 0.4 mL/min, 梯度洗脱。

采用 SiELC Obelise R、Cortecs HILIC 和 BEH HILIC 等几种亲水作用色谱柱时, 以甲酸—甲酸铵—水—乙腈体系为流动相, 以 50% 10 mM 甲酸铵-甲酸溶液和 50% 10 mM 甲酸铵-甲酸-乙腈溶液 (乙腈:水, 9:1) 稀释大观霉素, 使进样浓度为 0.5 μg/mL, 流速设置为 0.5 mL/min, 梯度洗脱。

实验发现大观霉素在 C<sub>18</sub> 色谱柱上的保留时间很短, 小于 0.5 min (见图 2 a), 这与其极性大, 在常规反相色谱柱上保留性能不佳有关; 而 SiELC Obelise R、Cortecs HILIC、BEH HILIC (100 mm) 3 款亲水作用色谱柱有效的延长大观霉素的保留时间 (见图 2b-2d)。同时, 实验发现 3 款亲水作用色谱柱能获得相当的质谱响应值和较好的峰形。此外, 除 SiELC Obelise R 色谱柱需要至少 1 个小时的平衡时间外, Cortecs HILIC 和 BEH HILIC (100 mm) 两种色谱柱均可以 30 min 以内达到平衡。

BEH HILIC 固定相为裸硅胶 (没有其他键合的基团), 因此不存在键合相的流失, 所以非常适用于应用于 HILIC—MS 分析。另外, 从经济和色谱柱的通用性角度考虑, 最终选择了 BEH HILIC (50 mm) 色谱柱, 与国家标准 (农业部 2086 号公告-7-2014) 所使用的色谱柱一致<sup>[25]</sup>。

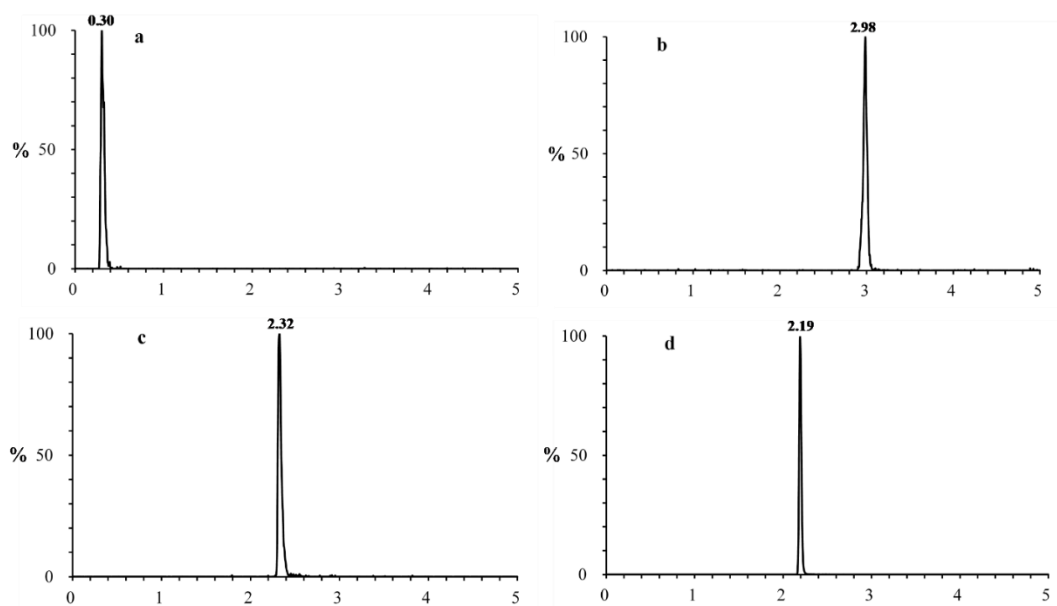


图 2. 大观霉素多级反应监测 (MRM) 色谱图 (a: BEH C<sub>18</sub>; b: SIELC Obelisc R; c: Cortecs HILIC; d: BEH HILIC (100 mm))

### 2.3.1.2 进样溶液的选择

以水和流动相分别作为进样溶液稀释大观霉素标准品, 再进行液质联用分析, 结果发现, 以水为进样溶液, 大观霉素出现前伸峰, 并且峰形很差 (见图 3a), 究其原因是样品中含水量过多, 大观霉素在固定相上的分配减弱, 保留降低。当进样溶液为 50% 10 mM 甲酸铵-甲酸溶液和 50% 10 mM 甲酸铵-甲酸-乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1) 时, 峰形明显改善 (见图 3b), 可见进样溶液中高比例的乙腈增强了大观霉素在固定相上的分配, 从而提高了柱效, 改善了峰形<sup>[24]</sup>。因此, 在后续试样进样中, 以 50% 10 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4%甲酸) 和 50%10 mM 甲酸铵-乙腈-水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸) 作为复溶液。

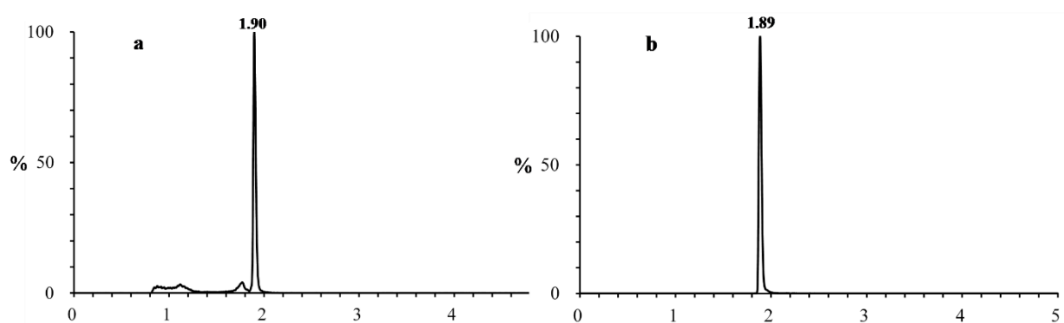


图 3. 大观霉素 MRM 色谱图 (a:水作溶剂; b:流动相作溶剂)

### 2.3.1.3 流动相的组成

确定采用 HILIC 色谱柱后, 参考了国家标准<sup>[25]</sup>色谱条件, 以 0.3%甲酸水-乙腈体系分离大观霉素, 发现大观霉素存在拖尾现象 (见图 4a), 这一点也从上述国家标准提供的 MRM



色谱图得到了印证。

文献报道<sup>[26]</sup>在流动相中使用甲酸铵或乙酸铵有助于改善氨基糖苷类物质在 HILIC 分离过程中的峰形和离子化效率。因此，为解决上述色谱峰拖尾的问题，本研究在优化参考文献<sup>[14]</sup>分析氨基糖苷类化合物所使用的甲酸—挥发性铵盐—水—乙腈的流动相体系基础上，采用了甲酸—甲酸铵—水—乙腈流动相体系，即在水和乙腈/水溶液（V/V，9:1）中分别加入 0.4%甲酸。在试验过程中发现，随着流动相中有机相比例增加，大观霉素保留时间变大，因此，梯度洗脱起始阶段使用高比例有机相，以延长大观霉素在色谱柱上的保留，后期逐渐提高水相比例，以促进大观霉素出峰。此外，本研究在流动相中分别添加 5 mM、10 mM、20 mM 甲酸铵考察甲酸铵含量对峰形、质谱强度以及稳定性的影响。色谱图见图 4b-4e，结果发现高浓度甲酸铵（20 mM）会使大观霉素产生较强的离子抑制现象，大观霉素的灵敏度相对较低，随着甲酸铵浓度降低，灵敏度逐渐升高，而当甲酸铵浓度低至 5 mM 时，会使大观霉素峰面积重复性差。因此，最终确定 10 mM 甲酸铵溶液（含 0.4%甲酸）和 10 mM 甲酸铵乙腈水溶液（乙腈:水，90:10，含 0.4%甲酸）作为流动相。

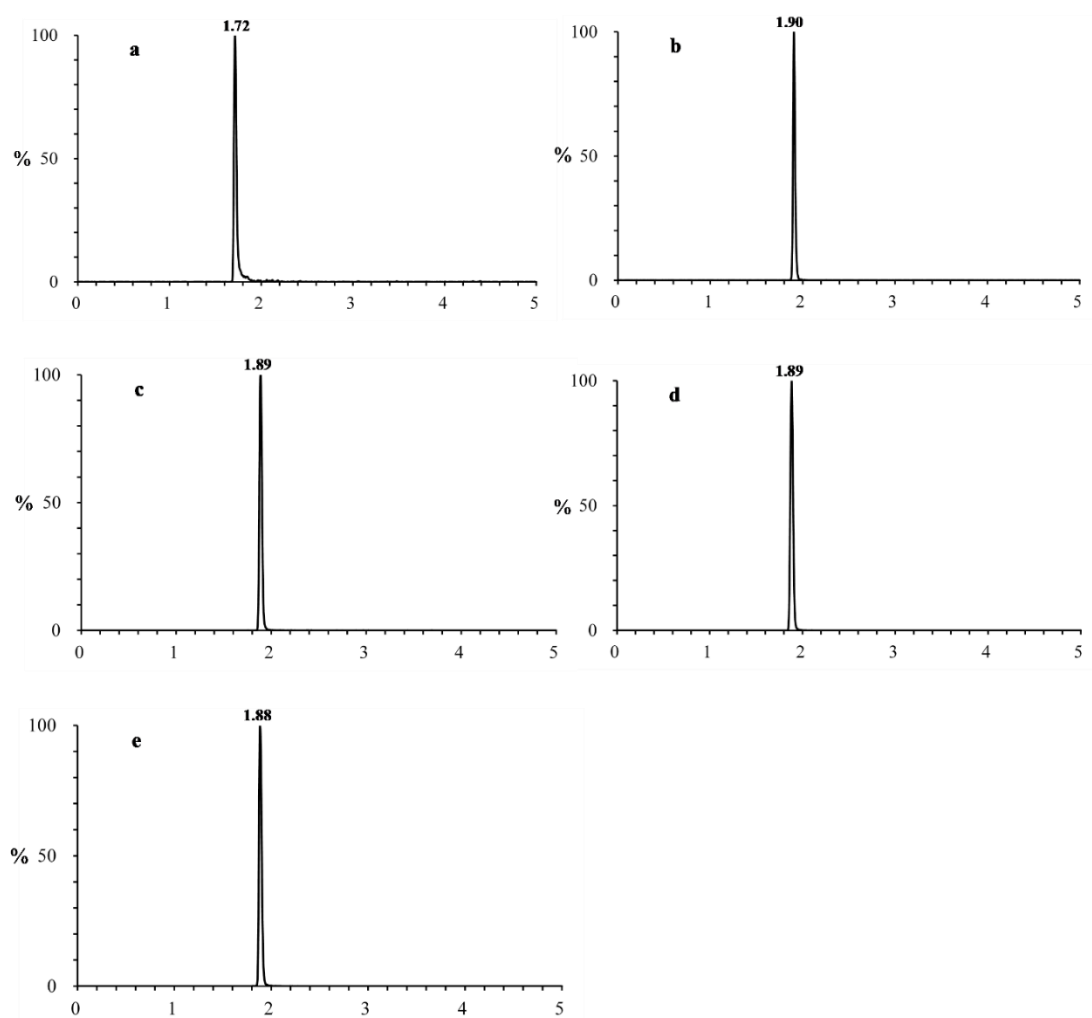


图 4. 大观霉素在不同流动相体系中 MRM 色谱图 (a: 0.3%甲酸水—乙腈; b: 20 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4%甲酸)—20 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸); c: 20 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4%甲酸)—10 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸); d: 10 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4%甲酸)—10 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸); e: 5 mM 甲酸铵水溶液 (含 0.4%甲酸)—5 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸))

如前所述, HILIC 的保留行为类似于传统的正相液相色谱, 但它使用典型的 RPLC 的流动相。使用 HILIC 时, 一方面, 极性化合物在水溶液中表现出良好的溶解性, 从而克服了正相液相色谱经常遇到的极性化合物溶解性差的问题。另一方面, 在流动相中不需要使用离子对试剂, 而与 MS 系统完全兼容。此外, HILIC 因为流动相中富含有机溶剂, 增强了去溶剂和电离电喷雾电离 (ESI) 源的效率, 从而获得更高的灵敏度<sup>[27]</sup>。

在亲水作用色谱中, 保留机制是液液分配、吸附作用、离子相互色谱作用和亲水保留作用的复杂的多模式组合, 从而使 HILIC 与 RPLC 相比具有独特的选择性和保留特性。而分配保留机制是由于分析物在流动相和固定相表面的吸附水层上的溶解度差异。为使填料表面形成亲水层, 流动相中至少包含 3%的极性溶剂, 亲水层才可吸附到固定相表面。通过降低流动相的总体极性, 促使溶质分离至该亲水层, 从而保留反相色谱无法保留的极性化合物。为达到这个目的, HILIC 在流动相选择上, 通常使用乙腈 (大于流动相组成的 70%) 作为主要溶剂。因其质子惰性 (接受氢键), 乙腈的使用可加强分析物和固定相表面的极性吸附层之间的氢键结合作用, 从而增加保留时间。由于固定相表面上的液层与目标分析物的带电溶质之间存在离子相互作用, 要得到充分的保留时间和良好的重现性, 通常必须使用缓冲流动相, 优先采用甲酸铵或乙酸铵作为缓冲盐, 一是它们可溶于高比例有机相, 二是它们具有挥发性, 且可兼容 MS 检测。

因此, 本研究修改了原标准流动相, 由原来的甲酸—水—乙腈体系调整为甲酸—甲酸铵—水—乙腈体系。

优化梯度洗脱程序, 得到了分离度以及对称因子均较好的峰形。确定色谱条件如下:

色谱柱: HILIC 色谱柱, 柱长 50 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 1.7  $\mu\text{m}$ ;

流动相: A: 10 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4% 甲酸); B: 10 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4% 甲酸);

梯度洗脱, 洗脱程序见表 2;

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 30°C;

进样量: 5  $\mu\text{L}$ 。

表 2 梯度洗脱程序

时间 / min	A / %	B / %
0.0	0	100
1.0	0	100
1.5	50	50
3.0	50	50
3.1	0	100
5.0	0	100

### 2.3.1.4 质谱试验条件

如图 1 所示, 大观霉素结构上存在多个氨基和羟基基团, 具有弱碱性, 其在质谱上有很强的正离子响应, 故选择正离子模式扫描。另外, 大观霉素具有独特的三环结构, 两个糖苷通过缩酮和半缩醛相连, 其分子中的羰基以酮水合形式存在<sup>[28, 29]</sup> (见图 5)。母离子扫描, 大观霉素一级质谱图 (图 6a) 中出现丰度较高的准分子离子峰 $[M+H_2O+H]^+$ , 故选择  $m/z$  351 作为母离子<sup>[30]</sup>。对母离子进行轰击碎裂, 产生系列子离子 (质谱图见图 6b), 选择丰度较强的二级碎片离子  $m/z$  98 作为定量离子,  $m/z$  207 作为定性离子。最后优化 ESI 源的碰撞电压、离子化温度、雾化气等参数, 确定最佳质谱条件<sup>[31]</sup>。

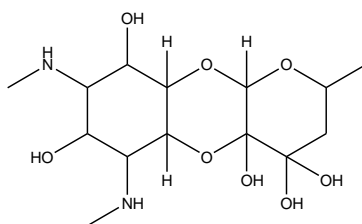


图 5. 大观霉素水合物结构 (ChemDraw Ultra 作图)

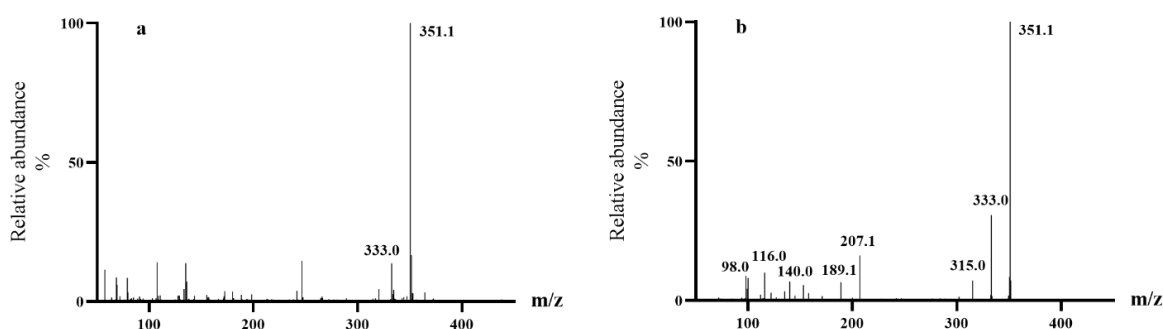


图 6. 大观霉素母离子质谱图 (a) 和子离子质谱图 (b)

确定质谱条件如下:

电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式 (ESI+);

检测方式: 多级反应监测 (MRM);

毛细管电压：0.5 kV；

离子源温度：150℃；

脱溶剂气温度：550℃；

脱溶剂气：氮气 1000 L/Hr；

雾化气、干燥气为高纯氮气，碰撞气为高纯氩气或其他合适气体；监测离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 3。

表 3 大观霉素的定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值

化合物	母离子 (m/z)	子离子对 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
大观霉素	351.2	98.1 <sup>a</sup>	30	34
		207.2		22
<sup>a</sup> 为定量离子对				

### 2.3.2 标准溶液稳定性研究

液相色谱和质谱试验条件确定后，分别对标准储备溶液和标准中间溶液稳定性进行了考察。考虑到玻璃材质会对氨基糖苷类药物造成吸附<sup>[32]</sup>，本研究均使用塑料器皿。

**标准储备溶液稳定性试验：**将大观霉素标准储备溶液 1.0 mg/mL，分装于聚丙烯瓶中，在 2~8℃储存，分别在第 0 个月、I 个月、II 个月、III 个月和 IV 个月从冰箱中取出，充分恢复至室温，先用水稀释至 200.0 μg/mL，再以 50% 10 mM 甲酸铵溶液（含 0.4% 甲酸）和 50% 10 mM 甲酸铵溶液（乙腈-水，9:1，含 0.4% 甲酸）逐步稀释至 10.0 μg/mL，每个月测定其浓度，连续测定 4 个月，每次测定 3 次，考察大观霉素标准储备溶液在 2~8℃保存条件下的稳定性，以相对标准偏差（RSD）不大于 5% 结果有效。由表 4 可知，前 4 个月浓度 RSD 均小于 5%，参考原标准，规定浓度为 1.0 mg/mL 的大观霉素标准储备溶液在 2℃~8℃下保存 3 个月。

表 4 大观霉素标准储备溶液稳定性试验

稀释时间 (月)	检测浓度 (μg/mL)			平均检测浓度 (μg/mL)	月内 RSD (%)
0	9.91	9.82	10.1	9.94	1.4
I	9.96	9.98	9.89	9.94	0.5
II	10.02	9.97	9.58	9.86	2.4
III	10.01	9.98	9.69	9.89	1.8
IV	10.03	9.58	9.62	9.74	2.6
RSD (0&I 月)	0				
RSD (0&II 月)	0.6				
RSD (0&III 月)	0.4				
RSD (0&IV 月)	1.4				

**标准中间溶液稳定性试验:** 将大观霉素标准中间溶液(200.0 µg/mL)分成若干份置于 2~8°C 储存, 在储存的第 0 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天从冰箱取出, 充分恢复至室温, 以 50% 10 mM 甲酸铵溶液 (含 0.4%甲酸) 和 50% 10 mM 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水, 9:1, 含 0.4%甲酸) 逐步稀释至成 10.0 µg/mL, 测定其浓度, 每次测定 3 次, 考察大观霉素标准中间溶液在 2~8°C 保存条件下的稳定性, 以 RSD 不大于 5%结果有效。由表 5 可知, 前两个星期浓度 RSD 均小于 5%, 因此 2 个星期内大观霉素标准中间溶液在 2~8°C 保存条件下稳定。

表 5 大观霉素标准中间溶液稳定性试验

稀释时间 (天)	检测浓度 (µg/mL)			平均检测浓度 (µg/mL)	周内 RSD (%)
0	9.98	9.85	10.13	9.99	1.4
7	9.86	9.87	9.98	9.90	0.7
14	10.03	9.87	9.68	9.86	1.8
21	10.02	9.58	9.69	9.76	2.3
RSD (0&7)					0.6
RSD (0&14)					0.9
RSD (0&21)					1.4

### 2.3.3 样品前处理条件研究

#### 2.3.3.1 提取液的确定

采用国家标准 [25]所用的提取液, 即 80%酸化甲醇 (8 体积甲醇加入 2 体积 5%草酸溶液) 提取饲料中的大观霉素, 并经 3 款强阳离子型 SPE 小柱—SCX、PCX 和 MCX (见表 6) 分别进行净化, 并按其提取步骤进行处理, 最后以上述优化后的色谱和质谱条件进行测定。

表 6 不同品牌阳离子固相萃取小柱

固相萃取柱名称	填料性质	厂家及品牌	规格
SCX	强阳离子型	Gilson ASPEC	60 mg, 3 mL
PCX	强阳离子型	Agilent Bond Elut plexa	60 mg, 3 mL
MCX	混合型强阳离子交换反相吸附	Waters Oasis	60 mg, 3 mL

具体操作如下: 平行做 9 份试验 (3 个处理, 3 个重复)。称取猪配合空白饲料 2.0 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 添加 30 µL 浓度为 2000 µg/mL 的大观霉素, 室温放置过夜。分别加入 20 mL 提取液, 充分涡旋提取, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 残留物用 10 mL 提取液重复提取一次, 合并上清液, 混匀, 做净化备用液。SCX、PCX 和 MCX SPE 小柱依次用甲醇、水各 5 mL 活化。取备用液 6 mL 过柱, 依次用水、甲醇各 5 mL 淋洗, 抽干。用 10% 氨化甲醇 10 mL 洗脱, 洗脱液 40°C 下氮气吹干, 残余物用 6 mL 流动相 (A:B, 50/50) 复溶后过 0.22 µm 有机滤膜后上机测定。

试验结果发现, 猪配合饲料中的大观霉素经 80%酸化甲醇提取, 3 款强阳离子型 SPE 小柱

净化,其回收率在 37.9%~71.5%之间(见图 7),可见强阳离子型 SPE 小柱对大观霉素有保留,综合考虑回收率、色谱峰形等因素,采用 MCX SPE 小柱用于后续试验的净化。

另外,正如原标准大观霉素色谱图(附录 A.2)所示,饲料中的大观霉素经 80%酸化甲醇提取,3 款强阳离子型 SPE 小柱净化后,大观霉素色谱峰均存在较为严重的拖尾现象(见图 8a-8c)。

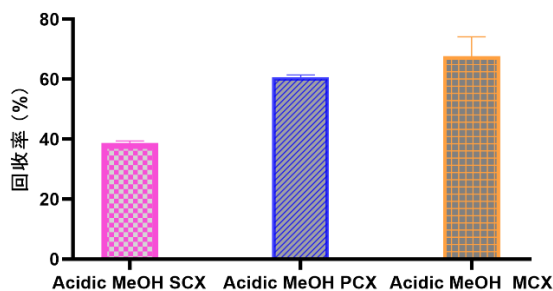


图 7. 酸化甲醇提取液对猪配合饲料中大观霉素提取效率比较

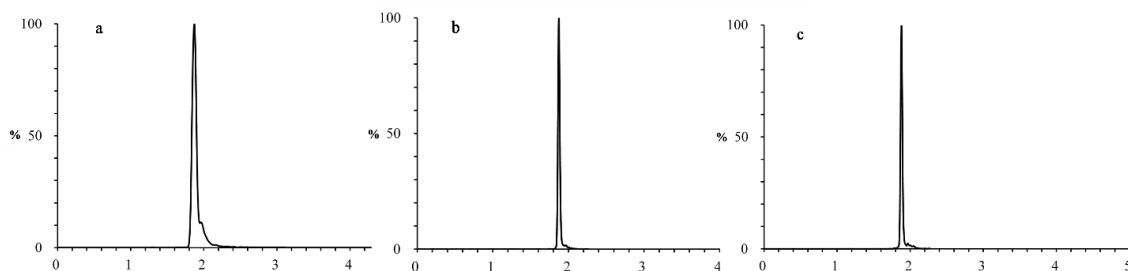


图 8. 酸化甲醇提取液对猪配合饲料中大观霉素峰形的影响 (a: SCX SPE 小柱; b: PCX SPE 小柱; c: MCX SPE 小柱)

为改善大观霉素的色谱峰形,对提取液进行了优化。考虑到 TCA 溶液作为一种蛋白沉淀剂常用于目标化合物的提取,而氨基糖苷类药物又能够在酸性环境下稳定存在<sup>[24]</sup>,因此,在参考文献报道的基础上<sup>[22, 24, 33]</sup>,考察了 TCA 溶液的提取效果。

低浓度的 TCA 溶液不能有效的沉淀蛋白质,并且混浊的提取液往往造成 SPE 小柱的堵塞,太高浓度的 TCA 溶液则引入较高强度的离子而影响 SPE 小柱的净化效果<sup>[24]</sup>,因此, TCA 溶液浓度至关重要。此外,在 TCA 溶液中往往加入 EDTA-2Na<sup>[34, 35]</sup>,对于提取液中加入 EDTA-2Na 的作用机制还不是十分明确<sup>[35]</sup>,有研究认为其作用是络合金属离子,但又有学者认为在低 pH 环境下,EDTA-2Na 络合能力比较有限<sup>[24]</sup>。此外,考虑到后续样品净化,提取液在净化前还需要对其 pH 进行严格的控制<sup>[24]</sup>。因此,本研究对提取液进行优化的同时,也对上样溶液的 pH 值进行了考察。

试验比较了 0.5%、1%、2%、3%、5%、8%以及 10%TCA 的提取效率和对峰形的影响。

分别称取鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、鸡预混料、猪配合饲料、猪预混料和奶牛精料补充料等空白饲料各 14 份试样(平行做两份试验),每份试样 2.5 g(精确到 0.01 g),置于 50 m 离心

管中，添加 250  $\mu\text{L}$  浓度为 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的大观霉素，室温放置过夜。分别加入 25 mL 0.5%、1%、2%、3%、5%、8%以及 10%TCA 的提取液，超声提取 20 min，于 8000 r/min 离心 5 min，取上清液于另一支 50 mL 离心管中。残留物用上述方法重复提取一次，合并上清液，混匀。从每份试样中准确移取 3 mL 提取液各 3 份，至 10 mL 离心管中，用 10 %氨水准确调节 pH 为  $4.7 \pm 0.2$ ，于 8000 r/min 离心 5 min，上清液作为净化备用液。MCX SPE 小柱依次用甲醇和水各 3 mL 活化，备用液全部过柱。依次用水和甲醇各 3 mL 淋洗 MCX 小柱，抽干。用 3 mL 10% 氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$  水浴氮气吹干，残余物用 3 mL 复溶液溶解后，过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜，上机测定。通过比较不同浓度的 TCA 溶液对不同种类饲料提取效率发现，不同浓度的 TCA 溶液提取鸡预混料、猪预混料和奶牛精料补充料等饲料时，回收率均在 20%以下（见图 9）；不同浓度的 TCA 溶液提取鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、猪配合饲料等饲料时，2%TCA 溶液可以获得整体更高和更稳定的回收率（见图 9）。经过 2%TCA 溶液提取的饲料，其中的大观霉素色谱峰形对称（见图 10）。

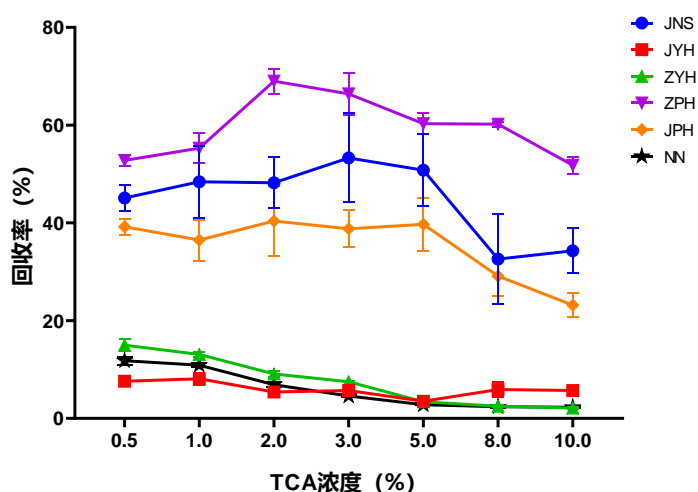


图 9. 不同浓度的 TCA 对不同种类饲料中大观霉素提取效率比较（200.0 mg/kg 添加）（JPH: 鸡配合饲料，JNS: 鸡浓缩饲料，JYH: 鸡预混料，ZPH: 猪配合饲料，ZYH: 猪预混料，NN: 奶牛精料补充料）

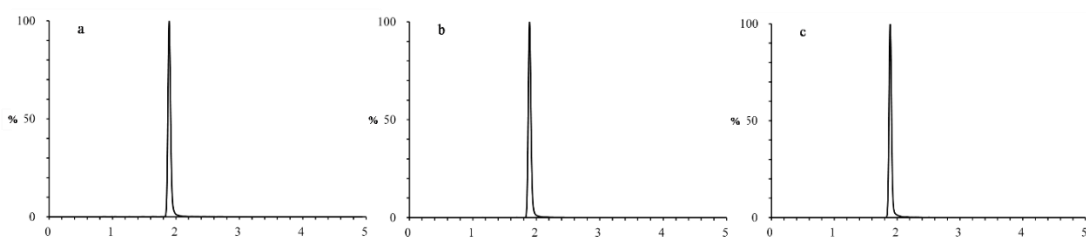


图 10. 2%TCA 溶液对不同种类饲料中大观霉素峰形的影响（200.0 mg/kg 添加）（a: 鸡配合饲料，b: 猪配合饲料，c: 鸡配合饲料）

考虑到 TCA 溶液提取鸡预混料、猪预混料和奶牛精料补充料等饲料回收率均低于 20%，

参考了不同基质中 EDTA-2Na 的添加量（见表 7），向上述鸡预混料、猪预混料和奶牛精料补充料 3 种提取液中添加 EDTA-2Na，并使 EDTA-2Na 终浓度为 0.6%（表 7 中 EDTA-2Na 最高含量为 0.6%），具体操作为：从每份试样中准确移取 3 mL 提取液各 3 份，至 10 mL 离心管中，分别向其中加入 261  $\mu$ L 7.5% EDTA-2Na 混匀，用 10 %氨水准确调节 pH 为  $4.7 \pm 0.2$ ，于 8000 r/min 离心 5 min，上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作，上机测定。试验结果表明：向小于浓度 5% 的 TCA 溶液中添加 0.6% EDTA-2Na 均能使鸡预混料、猪预混料和奶牛精料补充料等饲料中的大观霉素回收率大幅度提高（见图 11）。同时发现，向 2% TCA 溶液中添加 EDTA-2Na 获得的提取液，经净化处理后，其中的大观霉素色谱峰峰形对称（见图 12）。

表 7 从不同基质中提取氨基糖苷类药物 EDTA-2Na 添加方案汇总

基质	EDTA-2Na 含量	杂志名称	作者及发表年份
干酒糟和酒糟 <sup>[36]</sup>	0.05%	Journal of Chromatography A	De Alwis, 2010
屠宰厂废水 <sup>[37]</sup>	0.1%,0.2%,0.4%,0.6%	Journal of Chromatography A	Shao,2009
猪肌肉等 <sup>[24]</sup>	0.14%	Analytica Chimica Acta	Kaufmann,2012
牛奶 <sup>[38]</sup>	0.01%	Analytica Chimica Acta	Wang, 2016
鸡蛋 <sup>[39]</sup>	0.06%	Food Control	Paoletti, 2021
牛奶 <sup>[40]</sup>	0.25%	Journal of Agricultural And Food Chemistry	Wang, 2015
蜂蜜 <sup>[41]</sup>	0.01%	Journal of Chromatography A	Wang, 2018
羽毛 <sup>[42]</sup>	0.20%	Journal of Chromatography B	Gajda, 2019
牛奶和猪肉 <sup>[27]</sup>	0.07%	Journal of AOAC International	Yang, 2017
鸡蛋 <sup>[43]</sup>	0.01%	色谱	魏莉莉, 2021
环境水 <sup>[44]</sup>	0.10%	Talanta	Lopez-Serna, 2010
猪肌肉和肾脏 <sup>[35]</sup>	0.27%	Food Additives & Contaminants: Part A	Ishii,2008
肾脏 <sup>[33]</sup>	0.01%	Journal of Separation Science	Kumar,2012

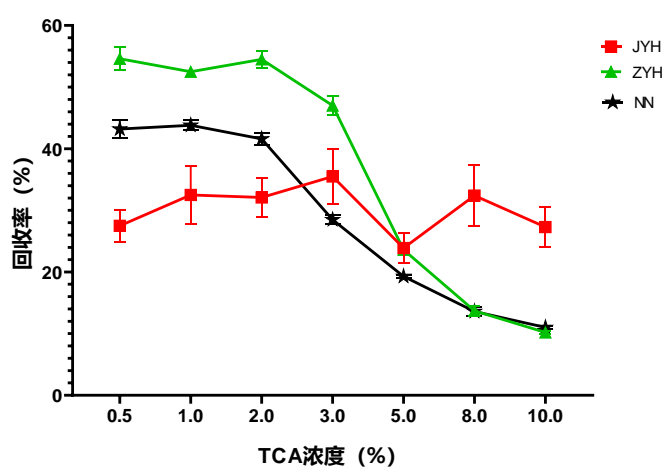


图 11. 不同浓度的 TCA 溶液（含 0.6%EDTA-2Na）对不同种类饲料中大观霉素提取效率比较（200.0 mg/kg 添加）（JYH: 鸡预混料，ZYH: 猪预混料，NN: 奶牛精料补充料）



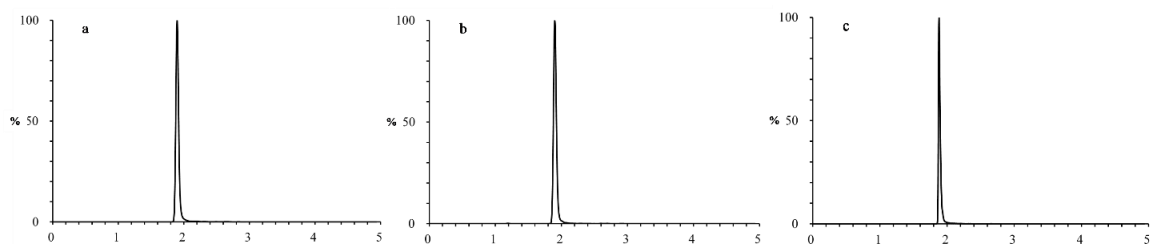


图 12. 2%TCA 溶液（含 0.6%EDTA-2Na）对不同种类饲料中大观霉素峰形的影响（200.0 mg/kg 添加）（JYH: 鸡预混料，ZYH: 猪预混料，NN: 奶牛精料补充料）

在此基础上，考察了向 2%TCA 溶液中加入不同含量的 EDTA-2Na 对饲料中大观霉素提取效率的影响，设计了 2%TCA 溶液提取液中 EDTA-2Na 的添加方案，见表 8。

分别称取鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、鸡预混料、猪配合饲料、猪预混料和奶牛精料补充料等空白饲料各 18 份试样（平行做两份试验），每份试样 2.5 g（精确到 0.01 g），置于 50 mL 离心管中，添加 250  $\mu$ L 浓度为 2000  $\mu$ g/mL 的大观霉素，室温放置过夜。按表 8 添加方案分别加入 21~25 mL 的 2%TCA 的提取液，再分别加入对应体积和浓度的 EDTA-2Na，超声 20 min，于 8000 r/min 离心 5 min，取上清液。残留物用上述方法重复提取一次，合并上清液。从每份试样中准确移取 3 mL 提取液各 3 份，至 10 mL 离心管中，用 10 %氨水准确调节 pH 为 4.7 $\pm$ 0.2，于 8000 r/min 离心 5 min，上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作，上机测定。

表 8 2%TCA 溶液提取饲料中大观霉素 EDTA-2Na 添加方案

加入 2%TCA 体积 (mL)	加入 EDTA-2Na 初始浓度 (%)	加入 EDTA-2Na 体积 (mL)	提取液中 EDTA-2Na 最终浓度 (%)
25	0	0	0
23	0.0625	2	0.005
23	0.125	2	0.01
23	0.625	2	0.05
23	1.25	2	0.1
23	2.5	2	0.2
23	5.0	2	0.4
23	5.0	3	0.6
21	5.0	4	0.8

试验结果表明：添加 EDTA-2Na 可以获得更高且更稳定的回收率，而当 EDTA-2Na 的浓度为 0.4%时，大观霉素回收率普遍较高（见图 13）。因此，最后确定采用含 0.4% EDTA-2Na 的 2%TCA 溶液作为饲料中大观霉素的提取液。

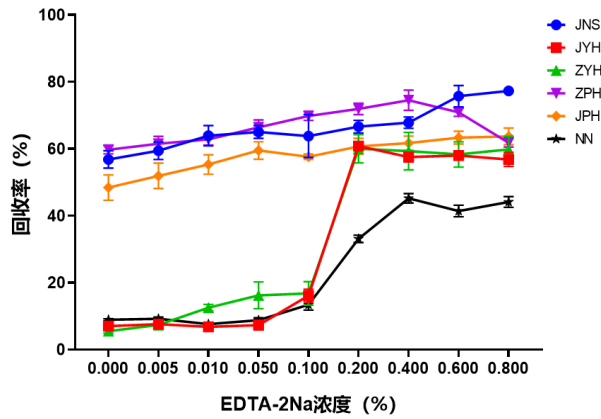


图 13. 不同浓度的 EDTA-2Na 对不同种类饲料中大观霉素提取效率比较 (200.0 mg/kg 添加)

(JPH: 鸡配合饲料, JNS: 鸡浓缩饲料, JYH: 鸡预混料, ZPH: 猪配合饲料, ZYH: 猪预混料, NN: 奶牛精料补充料)

### 2.3.3.2 提取液 pH 值的优化和确定

本研究考察了 10% 氨水调节鸡预混合饲料提取液的 pH 值在 2、3、4、5、6、7、8、9 时的回收率。

平行做 8 份试验。称取鸡预混合空白饲料 2.5 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 添加 200  $\mu$ L 浓度为 250.0  $\mu$ g/mL 的大观霉素, 室温放置过夜。加入 23 mL 2% TCA 溶液再加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 超声 20 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液。残留物用上述方法重复提取一次, 合并上清液。从每份试样中准确移取 3 mL 提取液各 5 份, 至 10 mL 离心管中, 用 10% 氨水准确调节 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9 于 8000 r/min 离心 5 min, 上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作, 上机测定。

试验结果表明: 调节提取液 pH 值 4~5 时, 可以获得更高的回收率 (见图 14), 在此基础上继续采用奶牛精料补充料对 pH 值 4~5 区间的回收率进行进一步试验。

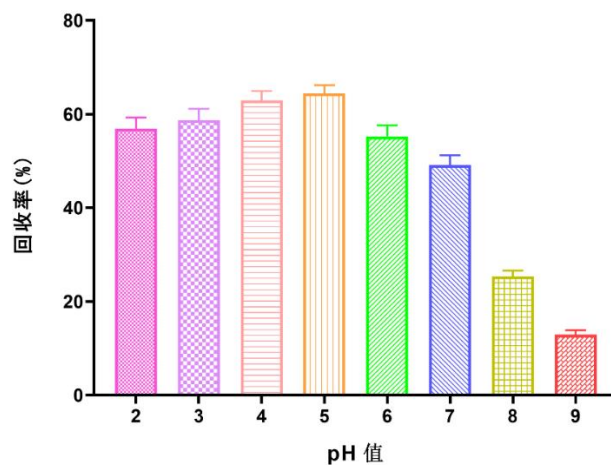


图 14. 提取液的 pH 值对大观霉素回收率的影响 (鸡预混合饲料, 20 mg/kg 添加)

称取奶牛精料补充料空白饲料 2.5 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 添加 200  $\mu$ L 浓度为 250.0  $\mu$ g/mL 的大观霉素, 室温放置过夜。加入 23 mL 2%TCA 溶液再加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 超声 20 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液。残留物用上述方法重复提取一次, 合并上清液。从试样中准确移取 3 mL 提取液 15 份, 至 10 mL 离心管中, 用 10 %氨水准确调节 pH 为 4.1、4.3、4.5、4.7 和 4.9 (3 个重复) 于 8000 r/min 离心 5 min, 上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作, 上机测定。

试验结果表明: pH 值在 4.5 到 4.9 区间可以获得更高且更稳定的回收率 (见图 15), 所以最终将上样溶液 pH 值调节为  $4.7 \pm 0.2$ 。

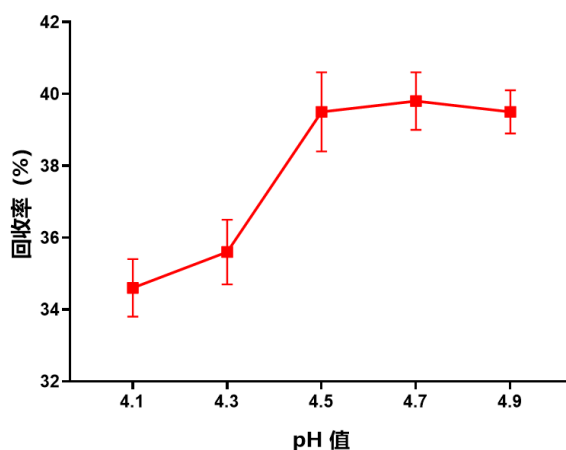


图 15. 提取液的 pH 值对大观霉素回收率的影响 (奶牛精料补充料, 20 mg/kg 添加)

### 2.3.3.3 提取液体积的优化和确定

考察了提取液体积对饲料中大观霉素提取效率的影响。分别称取鸡配合饲料、鸡浓缩饲料和猪预混合空白饲料各 2.5 g (精确到 0.01 g, 每种饲料样品称 5 份), 置于 50 mL 离心管中并编号为 A、B、C、D、E, 每个品种依次添加 80  $\mu$ L (A)、120  $\mu$ L (B)、160  $\mu$ L (C)、200  $\mu$ L (D) 和 240  $\mu$ L (E) 浓度为 250.0  $\mu$ g/mL 的大观霉素, 室温放置过夜。分别取 9.2 mL、13.8 mL、18.4 mL、23 mL 和 27.6 mL 2%TCA 溶液依次按顺序 (从 A 到 E) 加入上述离心管中, 再对应分别加入 0.8 mL、1.2 mL、1.6 mL、2 mL、2.4 mL 5% EDTA-2Na 溶液 (从 A 到 E), 超声 20 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液。残留物用上述方法重复提取一次, 合并上清液。从试样中准确移取 3 mL 提取液各 5 份, 至 10 mL 离心管中, 用 10 %氨水准确调节 pH 为  $4.7 \pm 0.2$ , 于 8000 r/min 离心 5 min, 上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作, 上机测定。

试验结果表明: 随着提取液体积的增加, 鸡配合饲料、鸡浓缩饲料和猪预混料中大观霉素的回收率基本呈现增加趋势 (见图 16), 当到提取液体积为 50 mL 时, 回收率基本持平, 因此选择提取液总体积为 50 mL。

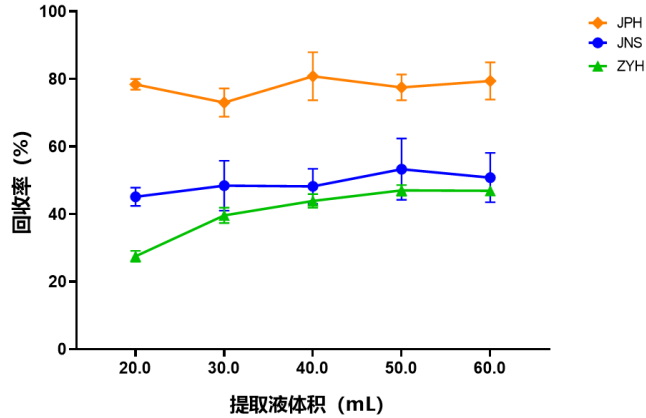


图 16. 提取液体积对饲料中大观霉素回收率的影响

(JPH: 鸡配合饲料, JNS: 鸡浓缩饲料, ZYH: 猪预混料)

### 2.3.3.4 提取时间的优化和确定

考察了不同提取时间对饲料中大观霉素提取效率的影响。分别称取鸡配合饲料、鸡浓缩饲料和猪预混合空白饲料各 2.5 g (精确到 0.01 g, 每种饲料样品称 4 份), 均添加 200  $\mu\text{L}$  浓度为 250.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的大观霉素, 置于 50 mL 离心管中并编号为 A、B、C、D, 室温放置过夜。加入 23 mL 2% TCA 溶液再加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 超声 10 min、15 min、20 min 和 25 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液。残留物用上述方法重复提取一次, 合并上清液。从试样中准确移取 3 mL 提取液各 5 份, 至 10 mL 离心管中, 用 10 % 氨水准确调节 pH 为  $4.7 \pm 0.2$ , 于 8000 r/min 离心 5 min, 上清液作为净化备用液。再按上述净化、浓缩等步骤进行操作, 上机测定。

试验结果表明: 随着提取时间的增加, 鸡配合饲料、鸡浓缩饲料和猪预混料中大观霉素的回收率基本呈现增加趋势 (见图 17), 当提取时间为 20 min 时, 回收率基本持平, 因此选择提取时间为 20 min。

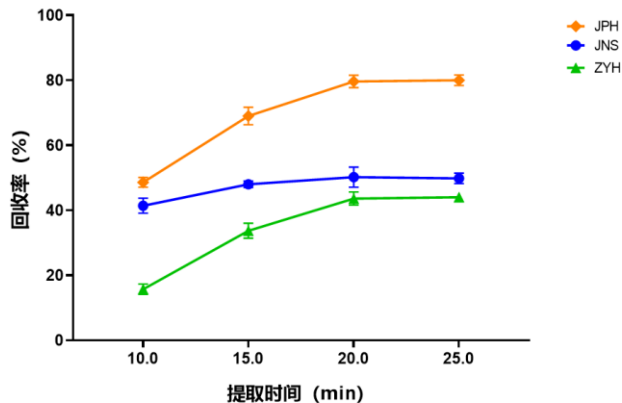


图 17. 不同提取时间对饲料中大观霉素回收率的影响

(JPH: 鸡配合饲料, JNS: 鸡浓缩饲料, ZYH: 猪预混料)

### 2.3.4 净化条件的优化和确定

氨基糖苷类物质具有强极性和弱碱性, 对这些化合物的净化涉及离子交换机制, 常用的反相 SPE 往往不能凑效, 需要使用阳离子交换 SPE 取而代之<sup>[27]</sup>。通常采用弱阳离子交换<sup>[35]</sup>和强阳离子交换 SPE 小柱<sup>[24]</sup>, 同时需要对上样溶液的 pH 进行严格的控制, 一方面需要确保离子交换小柱的去质子化, 另一方面需要使氨基糖苷类化合物质子化而在 SPE 小柱上得以保留<sup>[24]</sup>。

饲料样品提取过程中的基质杂质可能会在色谱柱上吸附, 不能被洗脱, 造成色谱柱柱效降低, 同时造成系统压力升高, 另外无机盐类也会抑制质谱信号。本研究采用 2%TCA 作为提取液只能沉淀部分蛋白质, 还需要进一步净化。在实验中选取了 Oasis MCX (60 mg, 3 mL) 和其他三款阳离子型 SPE 小柱 (见表 9) 净化猪配合饲料提取液。

表 9 不同品牌固相萃取小柱

固相萃取柱名称	填料性质	厂家及品牌	所用规格
PCX	强阳离子型	Agilent Bond Elut plexa	60 mg, 3 mL
DB-WCX	混合型弱阳离子交换反相吸附	上海笛柏生物科技有限公司	60 mg, 3 mL
WCX	混合型弱阳离子交换反相吸附	Waters Oasis	60 mg, 3 mL
MCX	混合型强阳离子交换反相吸附	Waters Oasis	60 mg, 3 mL 150 mg, 6 mL 500 mg, 6 mL

称取猪配合空白饲料 24 份, 每份试样 2.5 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 按表 10 方案添加大观霉素标准溶液, 室温放置过夜。按提取和净化步骤处理, 使得到的基质匹配标准系列溶液中大观霉素浓度分别为 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$  和 10.0  $\mu\text{g/mL}$ 。以基质匹配标准溶液中大观霉素的峰面积为纵坐标, 以大观霉素的浓度为横坐标绘制基质匹配标准工作曲线, 当试样的上机浓度超过线性范围时, 用空白基质稀释后进行重新测定。试验结果表明, 基质匹配标准工作曲线的相关系数均不低于 0.99, 说明上述 4 款阳离子型 SPE 小柱均能够满足试验要求。

表 10 空白猪配合饲料中大观霉素的添加方案

上样溶液中大观霉素理论浓度 ( $\mu\text{g/m}$ )	加入大观霉素标准品的体积 ( $\mu\text{L}$ )	加入大观霉素标准品的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0	--
0.2	200	50
1.0	200	250
2.0	200	500
5.0	200	1250

10.0	200	2500
------	-----	------

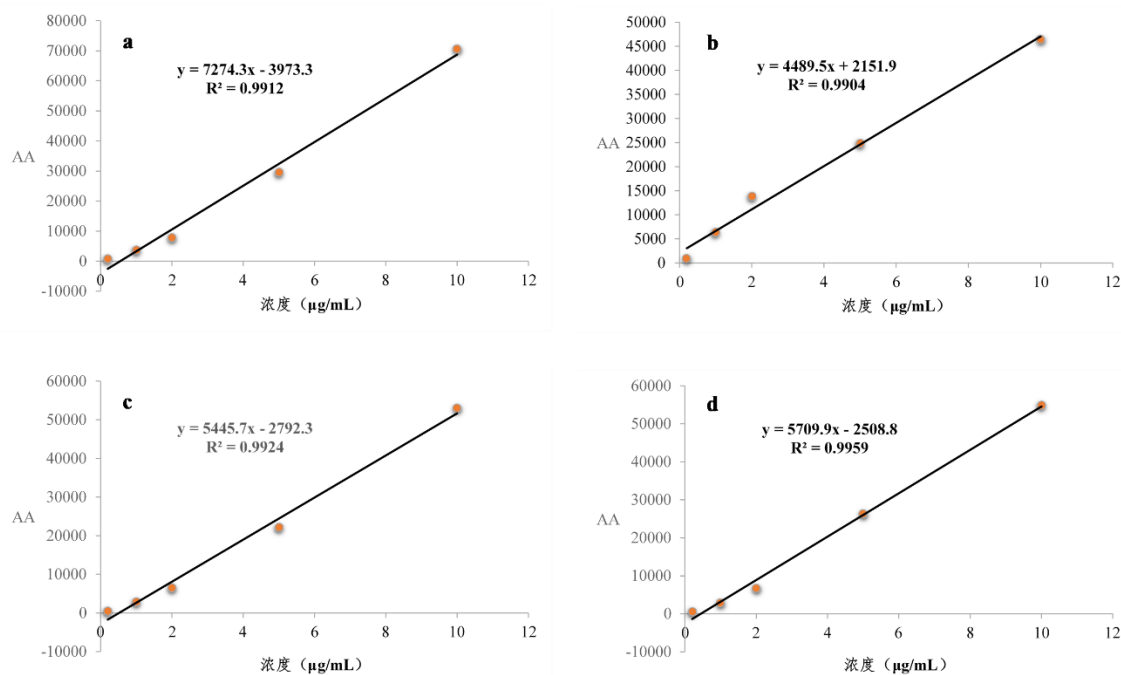


图 16. 基质匹配标准工作曲线 (a: PCX, b: DB-WCX, c: WCX, d: MCX)

在此基础上，考察了不同规格的 MCX SPE 小柱的净化效果，选取了 Oasis MCX (60 mg, 3 mL)、Oasis MCX (150 mg, 6 mL) 和 Oasis MCX (500 mg, 6 mL) 三种不同规格的 SPE 小柱对猪配合饲料提取液进行净化。

称取猪配合空白饲料 2 份，各 2.5 g (精确到 0.01 g)，置于 50 mL 离心管中，其中一份添加 625  $\mu$ L 浓度为 4000  $\mu$ g/mL (饲料中最高添加水平 1000.0 mg/kg) 的大观霉素，室温放置过夜。向两份样品中各加入 23 mL 2%TCA 溶液再加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液，超声 20 min，于 8000 r/min 离心 5 min，取上清液。残留物用上述方法重复提取一次，合并上清液。

从上述上清液中准确移取 3 mL 提取液各 15 份，至 10 mL 离心管中，用 10 %氨水准确调节 pH 为  $4.7 \pm 0.2$ ，于 8000 r/min 离心 5 min，上清液作为净化备用液。三种不同规格 MCX SPE 小柱各 10 个依次用甲醇和水各 3 mL 活化，备用液全部过柱。依次用水和甲醇各 3 mL 淋洗 MCX 小柱，抽干。用 3 mL 10%氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液于 40 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干，残余物用 3 mL 复溶液溶解后，过 0.22  $\mu$ m 有机滤膜，再用空白饲料基质稀释 10 倍后上机测定。

试验结果发现：三种不同规格 MCX SPE 小柱在相同的洗脱体系下均能获得 60%~70% 的回收率 (见图 17)，可见 Oasis MCX 的最小规格即可对最高浓度添加 (1000.0 mg/kg) 的大观霉素进行有效的净化。因此选择 Oasis MCX (60 mg, 3 mL) 用于提取液的净化。

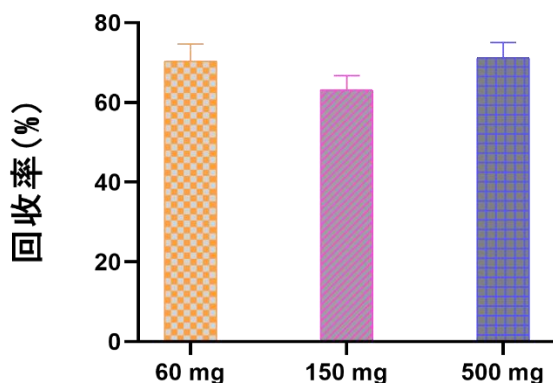


图 17. 不同规格 MCX SPE 小柱对大观霉素回收率的影响 (ZPH: 猪配合饲料; 1000.0 mg/kg 添加)

## 2.3.5 试验步骤

### 2.3.5.1 饲料样品试样的制备

平行做两份试验, 称取试样 2.5 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 23 mL 2%TCA 溶液再加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 超声 20 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液。残留物用上述方法重复提取一次, 合并上清液。

从每份试样中准确移取 3 mL 提取液, 至 10 mL 离心管中, 用 10% 氨水准确调节 pH 为 4.7 ± 0.2, 于 8000 r/min 离心 5 min, 上清液作为净化备用液。MCX SPE 小柱依次用甲醇和水各 3 mL 活化, 备用液全部过柱。依次用水和甲醇各 3 mL 淋洗 MCX 小柱, 抽干。用 3 mL 10% 氨化甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 40°C 水浴氮气吹干, 残余物用 3 mL 流动相复溶液溶解后, 过 0.22 μm 有机滤膜, 上机测定。

### 2.3.5.2 定性和定量分析

选择大观霉素的 1 个母离子和 2 个子离子, 在相同试验条件下, 试样中大观霉素的保留时间与标准系列工作溶液中对对应化合物的保留时间相对偏差在 ± 2.5% 之内, 且试样中大观霉素两个子离子的相对丰度与浓度接近的标准系列工作溶液中对对应离子的相对丰度进行比较, 偏差不得超过表 11 规定的范围, 则可判定为试样中存在大观霉素。

表 11 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
允许的最大偏差/(%)	± 20	± 25	± 30	± 50

在仪器最佳工作条件下, 依次测定大观霉素基质匹配标准工作溶液与试样溶液, 以标准溶液的浓度为横坐标, 以定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线 (相关系数  $R^2$  应大于或等于 0.99), 并对样品进行定量。试样测定溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围之内, 若试样测定溶液中的大观霉素浓度超出线性范围时, 可用空白基质进一步稀释 (n 倍), 重新测定。上述色谱和质谱条件下, 大观霉素的基质匹配标准工作溶液的 MRM 色谱图见图 18。

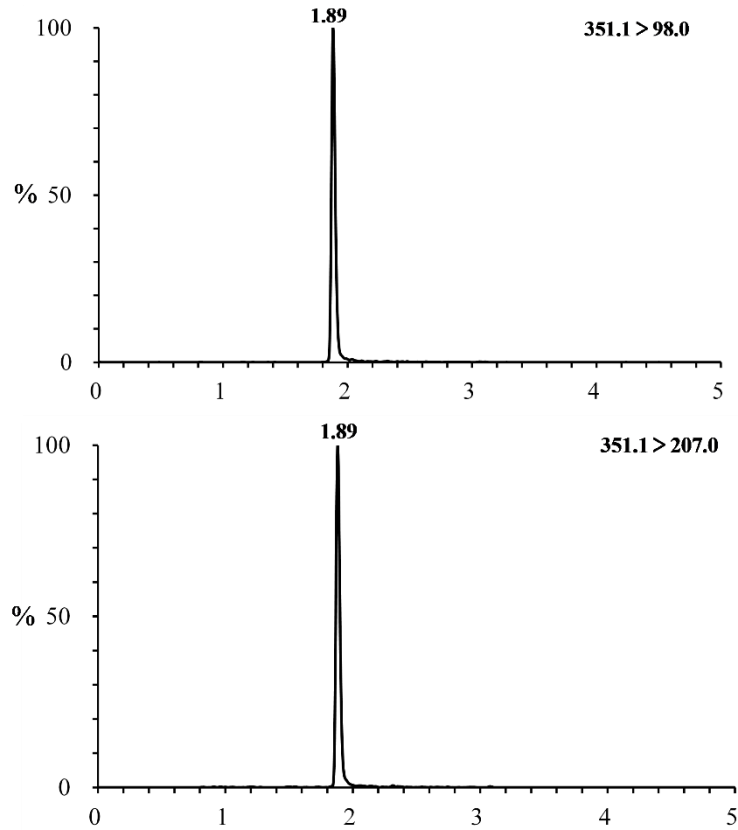


图 18. 大观霉素的标准溶液 MRM 色谱图 (1.0 µg/mL)

### 2.3.5.3 结果计算

试样中大观霉素的含量以质量分数 $\omega$ 表示，单位为毫克每千克 (mg/kg) 表示，单点校准按式 (1) 计算，多点校准按式 (2) 计算：

$$\omega = \frac{A \times C_s \times V \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- A——试样溶液中大观霉素的色谱峰面积；
- $C_s$ ——标准工作液中大观霉素的质量浓度，单位为微克每升 (µg/mL)；
- V——试样提取溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- $V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升 (mL)；
- $n$ ——超出线性范围后，试样溶液的稀释倍数；
- $A_s$ ——标准工作液中大观霉素的色谱峰面积；
- $V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升 (mL)；
- $m$ ——试样的质量，单位为克 (g)。

$$\omega = \frac{\rho \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots \dots \dots (2)$$

式中：



- $\rho$ ——从标准曲线查得的试样溶液大观霉素的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- $V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $n$ ——超出线性范围后，试样溶液的稀释倍数；
- $V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $m$ ——试样的质量，单位为克（ $\text{g}$ ）。

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，计算结果需扣除空白值。

## 2.3.6 方法学考察

### 2.3.6.1 基质的影响

基质效应（ME）是指目标化合物在离子化时受到基质干扰物竞争引起分析信号变化从而导致增强或抑制的效应，空白基质标准工作曲线与溶剂标准工作曲线斜率的比值反映基质效应的强弱。采用公式  $\text{ME}=K_1/K_2$ （其中  $K_1$  和  $K_2$  分别为空白基质标准工作曲线斜率和溶剂标准工作曲线斜率）<sup>[11,12]</sup>，当 ME 为 0.8~1.2 时，说明基质效应不明显<sup>[45]</sup>。超出这个范围则表示基质增强或抑制效应不可忽略<sup>[24]</sup>。

试验比较了溶剂标准工作曲线、空白基质标准工作曲线和基质匹配标准工作曲线，空白基质标准工作曲线斜率与溶剂标准工作曲线的比值反映基质效应的强弱，基质匹配法作为基质校准的替代方法旨在补偿基质效应和回收率损失。基质匹配法选取类型相同，均匀一致、且在大观霉素保留时间处，质谱响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。第一次分析时，制备基质匹配标准溶液首先对残留物量进行初步分析，根据分析结果确定标准物质添加量，使得添加到试验部分的标准物质为已存在于样品中的残留物估计量的 1 到 5 倍之间。

称取各空白饲料 8 份，每份 2.5 g（精确至 0.01g），置于 50 mL 离心管中，再向其中加入一系列标准品（添加方案见表 12），形成添加浓度为 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液，静置过夜。按样品试验步骤进行提取、pH 值调节、SPE 小柱净化、浓缩、复溶，后上机测试，以基质匹配标准工作溶液的浓度为横坐标，以定量离子的峰面积为纵坐标，绘制基质匹配标准工作曲线见图 19。

表 12 基质匹配标准工作溶液中大观霉素的添加方案

提取液中大观霉素的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）	加入大观霉素标准品的体积（ $\text{mL}$ ）	加入大观霉素标准品的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）
0	0	0
0.1	25	200
0.2	50	200

0.5	125	200
1.0	250	200
2.0	50	2000
5.0	125	2000
10.0	250	2000

称取空白饲料 2.5 g (精确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 按样品试验步骤进行提取、pH 值调节、SPE 小柱净化、浓缩、复溶, 以此复溶液作为空白基质稀释 200  $\mu\text{g/mL}$  的大观霉素标准溶液, 得到 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的空白基质标准工作溶液, 上机测试, 以空白基质工作溶液的浓度为横坐标, 以定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制空白基质标准工作曲线见图 19。

同时制备溶剂标准溶液, 一并上机测试。以溶剂标准工作溶液的浓度为横坐标, 以定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制溶剂标准工作曲线见图 19。

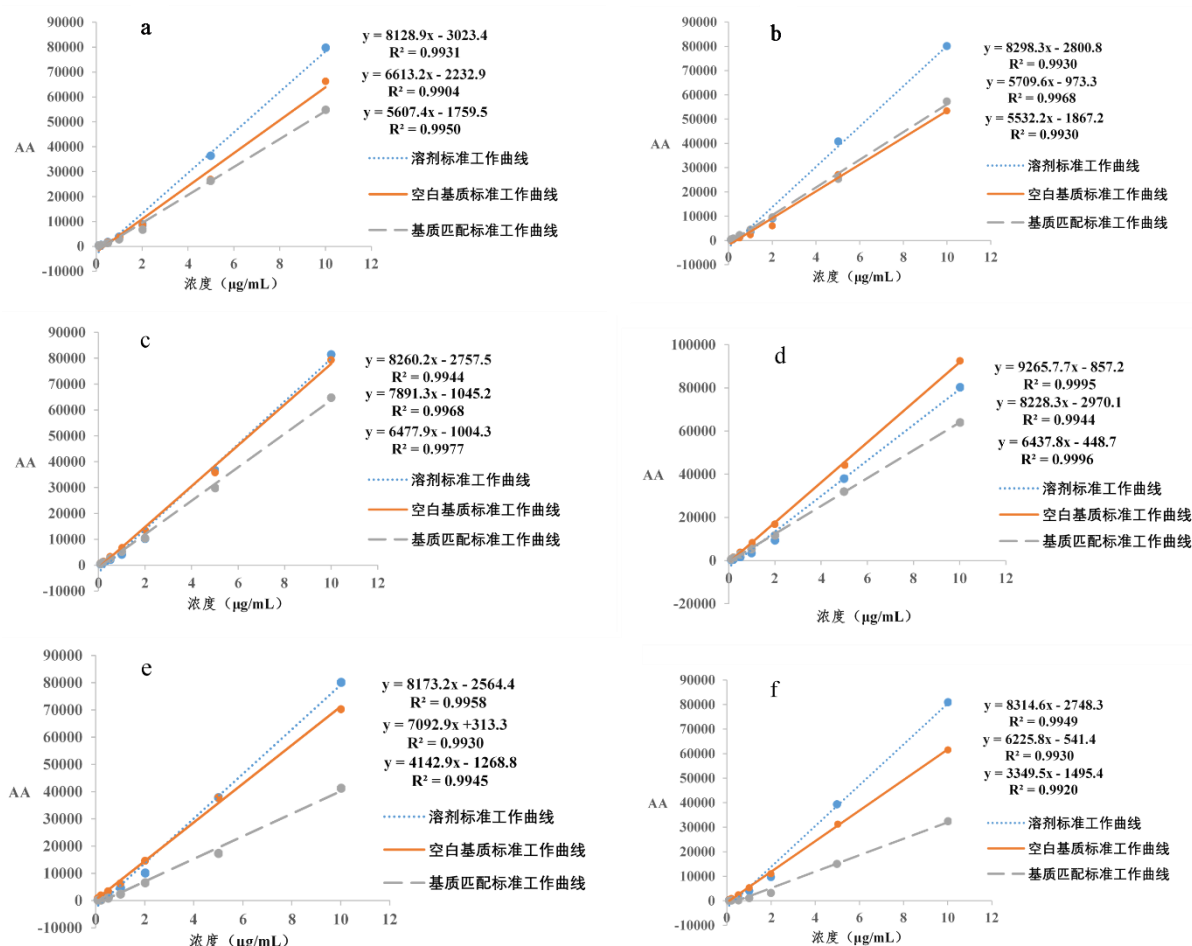


图 19. 大观霉素溶剂标准工作曲线、基质匹配标准工作曲线和基质匹配标准工作曲线 (a:鸡配合饲料; b:鸡预混合饲料; c:鸡浓缩饲料; d:猪配合饲料; e:猪预混合饲料; f:奶牛精料补充料)

基质匹配标准工作曲线方程、相关系数 ( $R^2$ ) 和 ME 列于表 13。结果表明, 一方面不同种

类的饲料基质会对大观霉素产生大小不一的增强或抑制效应。另一方面,除了鸡浓缩饲料中ME为0.67,其余饲料中ME范围为0.81~1.13,除鸡浓缩饲料之外的饲料基质未产生明显的增强或抑制效应。但对空白鸡配合饲料分别添加4个浓度水平(2 mg/kg、20 mg/kg、200 mg/kg、和1000 mg/kg)的大观霉素,经前处理后的复溶液与其相应的溶剂标准溶液(0.1 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL)比较发现,回收率仅在60%~70%之间(见图20),而如表13所示,基质匹配标准工作曲线方程在0.1~10.0 μg/mL浓度范围内,线性关系良好( $R^2$ 均大于0.99)。综上所述,采用基质匹配标准工作曲线对饲料中大观霉素进行定量分析。

表13 不同饲料基质中大观霉素的线性方程与相关系数

饲料样品	线性范围 (μg/mL)	基质匹配标准曲线方程	相关系数 ( $R^2$ )	基质效应 (ME)
鸡配合饲料	0.1~10.0	$y=5607.4x-1759.6$	0.995 0	0.81
鸡浓缩饲料	0.1~10.0	$y=5709.6x-973.3$	0.996 8	0.67
鸡预混合饲料	0.1~10.0	$y=6477.9x-1004.3$	0.997 7	0.96
猪配合饲料	0.1~10.0	$y=6437.8x-448.7$	0.999 6	1.13
猪预混合饲料	0.1~10.0	$y=4142.9x-1268.8$	0.994 5	0.87
奶牛精料补充料	0.1~10.0	$y=3349.5x-1495.4$	0.992 0	1.11

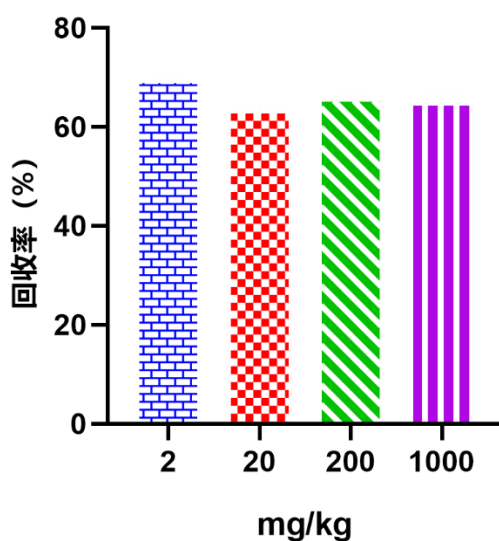


图20. 鸡配合饲料中大观霉素不同水平添加回收率(鸡配合饲料与溶剂标准溶液比较)

### 2.3.6.2 线性方程和线性范围

按表12添加系列大观霉素标准溶液至饲料样品中,得到添加浓度为0 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL的标准溶液,在线性范围0.1~10 μg/mL内,大观霉素的标准工作曲线(见表13), $R^2$ 均大于0.99,具有良好的线性关系,符合定量要求。

### 2.3.6.3 方法的灵敏度

向空白试样中添加大观霉素使之添加浓度为 2.0 mg/kg, 其信噪比 S/N 均大于 10(见图 21), 并且经前处理后其浓度在线性范围内, 该方法的检出限则根据  $S/N=3$ , 确定的检出限可达到 1.0 mg/kg。所以最终确定方法的定量限为 2.0 mg/kg, 检出限为 1.0 mg/kg (见图 22), 满足分析方法性能的要求。

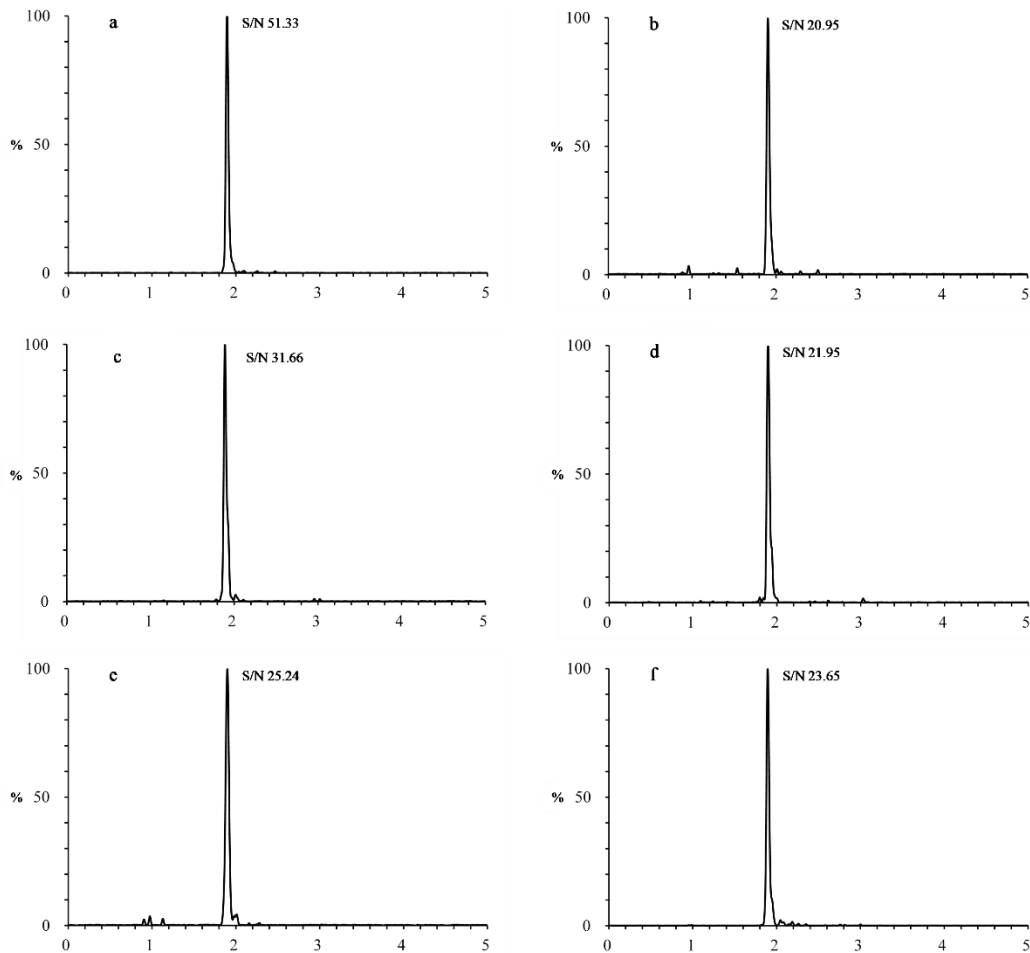


图 21. 不同饲料中阳性添加 (添加浓度 1.0 mg/kg) 色谱图 (a:鸡配合饲料; b:鸡预混合饲料; c:鸡浓缩饲料; d:猪配合饲料; e:猪预混合饲料; f:奶牛精料补充料)

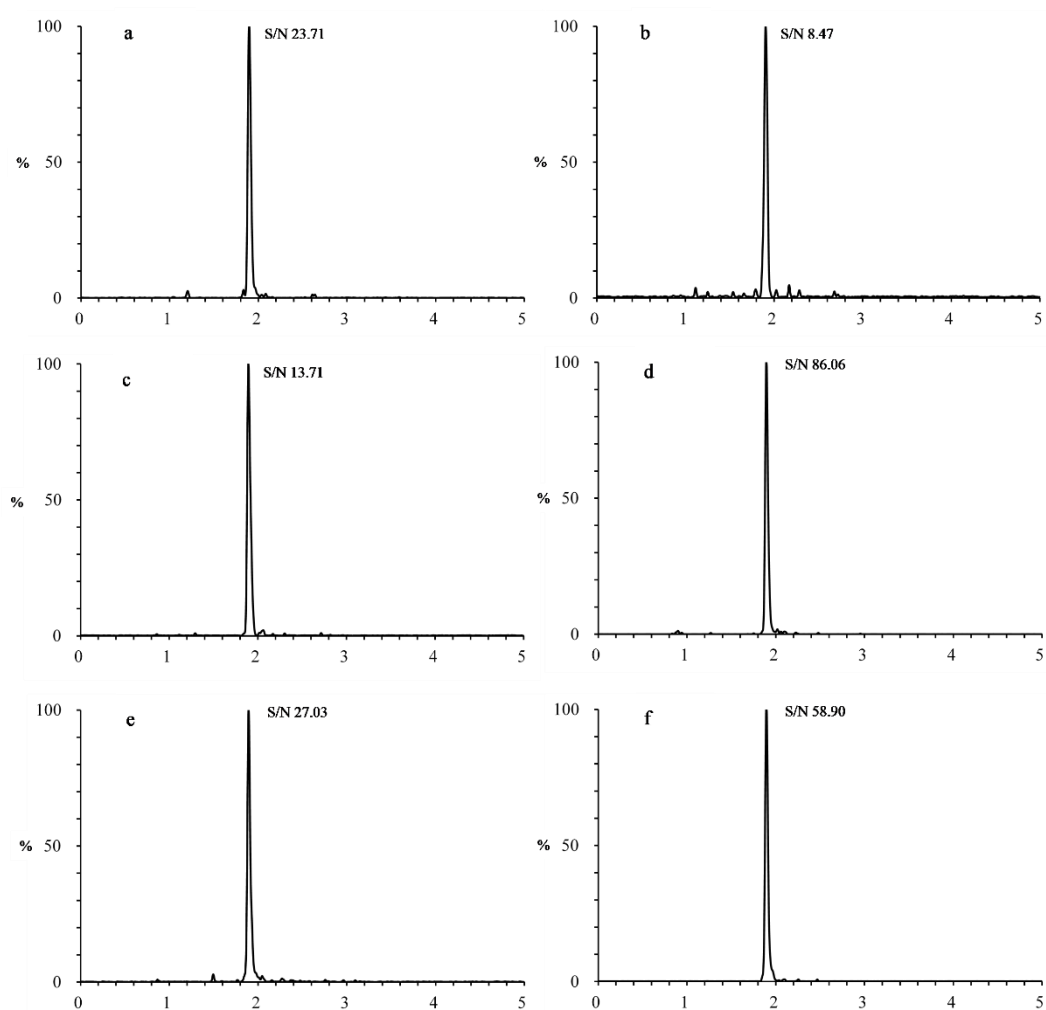


图 22. 不同饲料中阳性添加（添加浓度 2.0 mg/kg）色谱图（a:鸡配合饲料；b:鸡预混合饲料；c:鸡浓缩饲料；d:猪配合饲料；e:猪预混合饲料；f:奶牛精料补充料）

#### 2.3.6.4 方法的准确度和精密度

**空白样品的筛选：**在确定了样品的前处理步骤和仪器方法后，进行了鸡、猪配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料以及奶牛精料补充料空白样品的筛选，均未发现大观霉素，在优化的色谱和质谱条件下也未发现干扰峰（见图 23）。

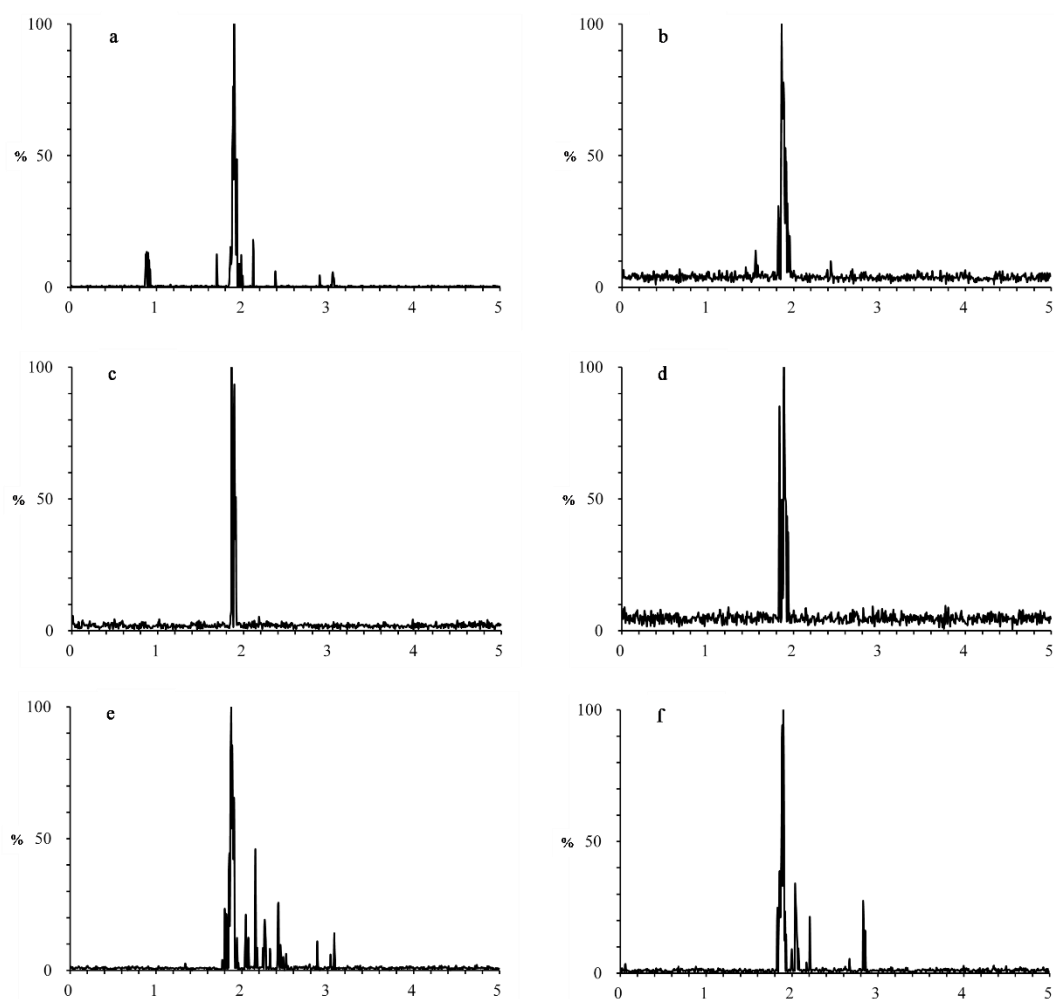


图 23. 空白饲料色谱图

(a:鸡配合饲料; b:鸡预混合饲料; c:鸡浓缩饲料; d:猪配合饲料; e:猪预混合饲料; f:奶牛精料补充料)

**添加浓度的确定:** 中华人民共和国农业农村部公告第 194 号规定自 2020 年 7 月 1 日起, 饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料。标准编制根据临床添加浓度及标准溶液浓度等因素, 确定大观霉素在饲料中的添加浓度为 1.0、2.0、20.0、200.0 和 1000.0 mg/kg, 并针对预混料增设了 2500.0 mg/kg 的添加。添加方案见表 14。

表 14 空白饲料中大观霉素的添加方案

饲料中大观霉素的含量 (mg/kg)	加入大观霉素标准品的体积 (μL)	加入大观霉素标准品的浓度 (μg/mL)
1.0	200	12.5
2.0	200	25
20	200	250
200	200	2500
1000	625	4000

2500	1562.5	4000
------	--------	------

**添加回收率及精密度试验：**选用畜禽配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料分别进行加标回收试验，每种饲料采用不同的添加浓度，每个添加浓度制备 6 个平行样品，重复 3 个批次，结果见表 15-表 20。回收率试验结果表明，在 1.0~2500.0 mg/kg 添加浓度范围内，回收率为 90.3%~103.5%，批内 RSD 在 1.4%~9.6%之间，批间 RSD 在 3.7%~8.2%之间。由此可见回收率较好，批内 RSD 和批间 RSD 均小于 10%，说明本方法能满足饲料中大观霉素含量测定需要。

表 15 鸡配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平均回收率 (%)	批内变异系数 (n=6,%)	批间平均回收率 (%)	批间变异系数 (n=3,%)
2.0	2.1	2.0	2.1	2.0	2.2	2.1	104.2	3.6	97.2	7.5
	1.7	1.9	1.7	1.8	1.8	1.9	90.0	5.0		
	1.9	2.0	1.8	2.0	1.9	2.1	97.5	5.4		
20.0	17.4	17.0	19.8	16.8	18.9	20.1	91.7	7.9	91.2	7.1
	18.2	17.6	19.9	18.5	17.6	17.0	90.7	5.6		
	19.9	18.2	17.8	20.4	16.4	16.9	91.3	8.8		
200.0	162.3	179.7	182.4	204.2	201.1	181.0	92.6	8.3	92.0	7.3
	169.8	202.3	187.5	164.7	191.2	182.4	91.5	7.6		
	181.2	201.1	162.5	191.6	189.4	178.8	92.1	7.2		
1000.0	872.9	906.4	917.5	890.9	942.9	1002.0	92.2	5.0	92.3	5.7
	936.1	826.2	891.1	1003.5	990.6	847.1	91.6	8.0		
	891.2	909.3	917.8	904.3	1001.9	955.3	93.0	4.4		

表 16 鸡预混合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平均回收率 (%)	批内变异系数 (n=6,%)	批间平均回收率 (%)	批间变异系数 (n=3,%)
2.0	1.8	1.8	2.0	1.9	1.9	1.6	91.7	7.5	92.2	7.5
	1.6	1.9	2.1	1.8	1.9	2.0	94.2	9.1		
	1.9	1.8	1.8	1.7	1.7	2.0	90.8	6.4		
20.0	20.0	16.8	16.5	16.8	19.3	20.1	91.3	9.4	96.4	8.1
	17.2	20.2	19.7	19.9	18.3	20.2	96.3	6.4		
	21.6	18.9	20.5	19.0	20.9	21.1	101.7	5.6		
200.0	207.7	195.8	203.0	195.5	181.9	201.6	98.8	4.5	101.6	6.3
	200.9	215.4	184.6	226.9	200.0	206.5	102.9	7.0		
	199.0	201.8	231.3	189.6	212.3	203.0	103.1	6.9		
1000.0	896.8	990.1	832.5	911.7	877.3	1010.0	92.0	7.4	93.9	7.8
	927.8	879.8	854.0	866.2	916.0	1023.5	91.1	6.8		
	884.5	900.3	1028.6	1070.0	1026.0	1009.5	98.6	7.7		

2500	2467.5	2587.5	2395.0	2487.5	2537.5	2472.5	100.1	2.6	99.3	3.1
	2477.5	2395.0	2622.5	2467.5	2570.0	2380.0	99.8	3.8		
	2477.5	2462.5	2382.5	2440.0	2467.5	2620.0	98.9	3.2		

表 17 鸡浓缩饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平均回收率 (%)	批内变异系数 (n=6,%)	批间平均回收率 (%)	批间变异系数 (n=3,%)
2.0	1.8	2.0	1.7	1.8	1.8	1.9	91.7	5.6	91.7	7.7
	1.7	2.0	1.6	2.0	1.8	1.9	91.7	8.9		
	1.8	1.6	2.1	1.7	1.9	1.9	91.7	9.6		
20.0	20.4	16.7	20.2	17.8	20.1	19.8	95.8	8.0	96.0	7.7
	17.6	20.2	17.0	20.8	17.9	19.3	94.0	8.1		
	20.9	17.6	21.0	17.9	20.0	20.4	98.2	7.7		
200.0	201.4	208.9	180.3	205.1	186.1	198.0	98.3	5.7	98.5	4.2
	205.1	190.7	202.2	188.2	200.6	206.2	99.4	3.8		
	188.4	201.1	188.7	199.7	192.9	202.7	97.8	3.3		
1000.0	926.1	1007.4	958.3	808.1	949.0	997.1	94.1	7.6	94.0	7.4
	813.4	913.0	814.0	922.9	1000.0	1002.1	91.1	9.2		
	933.8	982.8	909.1	944.0	1011.7	1035.1	96.9	5.0		

表 18 猪配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平均回收率 (%)	批内变异系数 (n=6,%)	批间平均回收率 (%)	批间变异系数 (n=3,%)
2.0	2.0	2.1	1.8	1.7	1.8	1.8	93.3	8.1	90.0	7.4
	1.8	1.9	1.8	1.8	1.9	1.7	90.8	4.1		
	1.8	1.6	1.8	1.6	1.6	1.9	85.8	7.7		
20.0	18.8	20.7	20.1	21.4	20.8	18.5	100.3	5.8	101.2	4.9
	21.2	18.7	20.2	21.5	21.1	19.5	101.8	5.4		
	21.1	19.2	20.8	20.9	20.7	19.2	101.6	4.3		
200.0	183.2	191.8	193.9	185.1	192.1	201.4	95.6	3.4	95.0	4.2
	193.8	196.2	194.6	184.8	178.7	205.1	96.1	4.8		
	184	181.5	181	185.5	184.3	203	93.3	4.4		
1000.0	932.1	1022.1	862.4	948.3	993.1	1019.3	96.3	6.4	99.9	5.6
	1060.7	1021.5	1036	1028.8	947.6	1010.3	101.7	3.8		
	1036.8	959.1	1076.8	942.6	1056.2	1033.6	101.8	5.3		

表 19 猪预混合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平均回收率 (%)	批内变异系数 (n=6,%)	批间平均回收率 (%)	批间变异系数 (n=3,%)
2.0	1.9	1.8	1.7	1.9	1.9	2	93.3	5.5	92.2	7.5



	1.9	2	1.7	1.9	1.7	2	93.3	7.3		
	1.8	1.5	1.9	1.9	2	1.7	90.0	9.9		
20.0	18.4	21.9	20.5	19.2	19.8	20	99.8	6.0	96.5	6.5
	19.2	20.2	20	18.2	18.8	20.1	97.1	4.2		
	19.3	19.6	18.8	16.5	17	20	92.7	7.8		
200.0	191.4	195.6	190.2	181.3	181.9	200	95.0	3.9	101.1	8.4
	230.2	219.9	218.9	229.9	207.2	200.5	108.9	5.5		
	189.6	185.3	179.9	224.3	214.1	201.1	99.5	8.7		
1000.0	1087.2	1087	1077	942.6	1010.5	1000	103.4	5.7	105.0	7.7
	1151.3	941	1143.8	1180.6	1073.1	999.5	108.2	8.8		
	1030	1112	875.1	1123.6	1056.6	1014.3	103.5	8.7		
2500.0	2395	2490	2467.5	2397.5	2557.5	2620	100.0	3.6	99.7	3.2
	2447.5	2562.5	2495	2407.5	2445	2552.5	100.0	2.5		
	2390	2432.5	2455	2492.5	2617.5	2620	99.3	3.9		

表 20 奶牛精料补补充料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内 平均 回收 率 (%)	批内变异 系数 (n=6,%)	批间 平均 回收 率 (%)	批间变异 系数 (n=3,%)
2.0	1.8	2.0	1.9	1.8	1.9	1.9	94.2	4.0	92.3	6.8
	2.1	1.8	1.8	1.7	1.8	1.9	92.5	7.5		
	1.8	1.7	1.9	2.0	1.7	1.9	89.2	8.3		
20.0	19.0	19.3	18.7	20.8	16.7	19.8	95.3	7.2	93.3	6.5
	19.2	16.9	20.1	17.5	19.2	19.3	93.5	6.5		
	19.9	18.0	17.3	18.2	17.8	20.4	93.0	6.7		
200.0	192.9	190.3	191.1	195.1	192.0	198.0	96.6	1.5	96.7	3.9
	190.1	186.9	195.9	181.7	192.8	206.2	96.1	4.4		
	186.3	204.2	185.0	199.3	178.9	202.7	96.4	5.5		
1000.0	1032.7	947.9	1000.3	911.4	992.3	997.1	98.0	4.4	98.0	5.8
	884.2	1016.6	920.0	1012.0	899.2	1062.1	96.6	7.6		
	1022.2	916.6	1023.1	921.5	1042.7	1035.1	99.4	5.9		

#### 2.4 实际样品（非添加样）的测定

为进一步验证方法的适用性和科学性，应用所建立的测定方法对养殖场的 30 余份饲料样品进行检测，包括配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料，结果发现所检样品中大观霉素均低于检测限，实际样品种类汇总表见表 21。

表 21 实际样品种类汇总表

饲料	数量 (个)	检出值 (mg/kg)
鸡配合饲料	8	ND
鸡浓缩饲料	2	ND
猪配合饲料	10	ND
鸡预混合饲料	6	ND

猪预混合饲料	5	ND
牛精料补充料	5	ND

## 2.5 修订前后技术内容的对比

本标准修订前后技术内容的对比详见表 22。

表 22 标准修订前后技术内容对比

序号	章条编号	修订前	修订后	主要技术差异
1	1 范围	本标准规定了饲料中大观霉素含量测定的高效液相色谱法和高效液相色谱—串联质谱法。	本标准规定了饲料中大观霉素含量测定的高效液相色谱—串联质谱法。	删除了饲料中大观霉素含量测定的高效液相色谱法。
2	4 原理	饲料中大观霉素用酸化甲醇溶液提取，强阳离子柱净化，氨化甲醇洗脱，浓缩后流动相溶解，高效液相色谱法或液相色谱—串联质谱法测定，外标法定量。	饲料中大观霉素用 TCA 水溶液（含 EDTA-2Na）提取，提取液经调节 pH 值后由混合型阳离子固相小柱净化，甲酸铵乙腈水溶液溶解、过膜后，供液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。	用 TCA 水溶液（含 EDTA-2Na）代替酸化甲醇提取饲料中的大观霉素； 增加了对提取液调节 pH 值步骤。
3	5.3 测定步骤	提取液：酸化甲醇溶液；净化：阳离子型固相萃取柱；液相条件：乙腈—甲酸水体系。	提取液：TCA 水溶液（含 EDTA-2Na）；净化：混合型阳离子型固相萃取柱；液相条件：乙腈—甲酸—甲酸铵—水体系；质谱条件：定量离子对：351.2>98.1。	用 TCA 水溶液（含 EDTA-2Na）代替酸化甲醇提取饲料中的大观霉素； 增加了对提取液调节 pH 值步骤。 修改了定量离子对。

## 三、实验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效果

2022 年 7-8 月，标准编制小组委托农业部农产品质量安全监督检验测试中心（宁波）、农业部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）、四川省饲料工作站完成本标准的复核验证工作。三家检测机构对本标准的复核验证结论为：经试验验证，采用《饲料中大观霉素的测定 液相色谱—串联质谱法》（农业农村部公告第 X 号—Y—2022）规定的方法能满足饲料中大观霉素的测定要求，标准工作曲线相关系数均可达 0.99，方法检出限、定量限可达标准制修订单位规定的水平，回收率、精密度符合 GB/T 27404-2008 和 GB/T 27417 的要求，故该方法通过验证，可作为饲料中大观霉素的测定标准方法。详见附件。

大观霉素是饲料质量控制的重要指标。修订饲料中大观霉素的含量测定国家标准方法，对于加强饲料质量安全监管，保障我国畜产品质量安全，确保人民身体健康，推动畜牧产业和畜牧业经济快速健康发展，有十分重要的意义。本标准作为饲料质量安全基础性标准，建议将本标准列为国家推荐性标准颁布、实施。

## 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

国际、国外无同类标准。

## 五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

无采标情况，无引用或采用国际国外标准情况。

## 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

本标准的制定广泛征求意见，包括高校、科研院所、检验机构、生产企业，根据反馈意见对标准的《征求意见稿》进行修改，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、贯彻国家标准的要求，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

无

## 参考文献

### References

- [1] Molognoni L, de Souza N C, de Sa P L, Micke G A, Daguer H. J. Chromatogr. A, 2018, 1569:110-117.
- [2] Molognoni L, Daguer H, de Sa P L, De Dea L J. Talanta, 2018, 178:1053-1066.
- [3] Wang B, Wang Y J, Xie X, Diao Z X, Xie K Z, Zhang G X, Zhang T, Dai G J. FOODS, 2020, 9(5).
- [4] Farouk F, Azzazy H M, Niessen W M. Anal. Chim. Acta, 2015, 890:21-43.
- [5] Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J. J. Chromatogr. A, 2001, 914(1-2):59-66.
- [6] Vinas P, Balsalobre N, Hernandez-Cordoba M. Talanta, 2007, 72(2):808-812.
- [7] Kim B H, Kim Y K, Ok J H. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 752(1):173-177.
- [8] Cai Y, Cai Y, Cheng J, Mou S, Yiqiang L. J. Chromatogr. A, 2005, 1085(1):124-130.
- [9] Sarri A K, Megoulas N C, Koupparis M A. J. Chromatogr. A, 2006, 1122(1-2):275-278.
- [10] Serrano J M, Silva M. J. Chromatogr. A, 2006, 1117(2):176-183.
- [11] Zhu W X, Yang J Z, Wei W, Liu Y F, Zhang S S. J. Chromatogr. A, 2008, 1207(1-2):29-37.
- [12] Tkachenko A, Clark J, Knutson N, Wallace B, Bomba M, Yacopucci M, Rhodes B, Nemser S M, Guag J, Reimschuessel R. Food Chem. Toxicol., 2015, 80:310-318.
- [13] Valesse A C, Molognoni L, de Souza N C, de Sa P L, Costa A, Barreto F, Daguer H. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1053:48-59.
- [14] Chen L, Chen H, Shen M. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 973C:39-44.
- [15] Buszewski B, Noga S. Anal. Bioanal. Chem., 2012, 402(1):231-247.
- [16] Stypulkowska K, Blazewicz A, Brudzikowska A, Grzeskiewicz M W, Sarna K, Fijalek Z. J Pharm Biomed Anal, 2015, 112:8-14.
- [17] Van de Steene J C, Mortier K A, Lambert W E. J. Chromatogr. A, 2006, 1123(1):71-81.

- [18] Benijts T, Dams R, Lambert W, De Leenheer A. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1029(1-2):153-159.
- [19] Ferrer C, Lozano A, Aguera A, Giron A J, Fernandez-Alba A R. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218(42):7634-7639.
- [20] Wu J, Qian X, Yang Z, Zhang L. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217(9):1471-1475.
- [21] Marin J M, Gracia-Lor E, Sancho J V, Lopez F J, Hernandez F. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(9):1410-1420.
- [22] Lou X, Tang Y, Fang C, Kong C, Yu H, Shi Y, Huang D, Guo Y, Xiao D. *Chirality*, 2020, 32(3):324-333.
- [23] Díez C, Guillarme D, Staub S A, Cognard E, Ortellì D, Edder P, Rudaz S. *Anal. Chim. Acta*, 2015, 882:127-139.
- [24] Kaufmann A, Butcher P, Maden K. *Anal. Chim. Acta*, 2012, 711:46-53.
- [25] Determination of spectinomycin in feeds. 农业部2086号公告-7-2014.  
饲料中大观霉素的测定. 农业部2086号公告-7-2014.
- [26] Moreno-Gonzalez D, Hamed A M, Garcia-Campana A M, Gamiz-Gracia L. *Talanta*, 2017, 171:74-80.
- [27] Yang B, Wang L, Luo C, Wang X, Sun C. *J. Aoac Int.*, 2017, 100(6):1869-1878.
- [28] Savoy M C, Woo P M, Ulrich P, Tarres A, Mottier P, Desmarchelier A. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018, 35(4):674-685.
- [29] Bao Ying, Wang Jingkang, Huang Xiangrong, Qi Zhen, Wang Hongbin. *JOURNAL OF EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY(NATURAL SCIENCE)*, 2003, 29(4):336-340.  
鲍颖, 王静康, 黄向荣, 戚振, 王宏斌. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2003, 29(4):336-340.
- [30] Mokh S, El Hawari K, Nassar R, Budzinski H, Al Iskandarani M. *Chromatographia*, 2015, 78(9-10):631-640.
- [31] Díez C, Guillarme D, Staub Spörri A, Cognard E, Ortellì D, Edder P, Rudaz S. *Anal. Chim. Acta*, 2015, 882:127-139.
- [32] Kaufmann A, Maden K. *J. Aoac Int.*, 2005, 88(4):1118-1125.
- [33] Kumar P, Rubies A, Companyo R, Centrich F. *J. Sep. Sci.*, 2012, 35(20):2710-2717.
- [34] Babin Y, Fortier S. *J. Aoac Int.*, 2007, 90(5):1418-1426.
- [35] Ishii R, Horie M, Chan W, Macneil J. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2008, 25(12):1509-1519.
- [36] De Alwis H, Heller D N. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217(18):3076-3084.
- [37] Shao B, Chen D, Zhang J, Wu Y, Sun C. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(47):8312-8318.
- [38] Wang Y, Li S, Zhang F, Lu Y, Yang B, Zhang F, Liang X. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1437:8-14.
- [39] Paoletti F, Sdogati S, Barola C, Giusepponi D, Moretti S, Galarini R. *Food Control*, 2021, 127:108109.
- [40] Wang J, Leung D, Chow W, Chang J, Wong J W. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(41):9175-9187.
- [41] Wang X, Yang S, Li Y, Zhang J, Jin Y, Zhao W, Zhang Y, Huang J, Wang P, Wu C, Zhou J. *J. Chromatogr. A*, 2018, 1542:28-36.
- [42] Gajda A, Nowacka-Kozak E, Gbylik-Sikorska M, Posyniak A. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1104:182-189.
- [43] Lili Wei, Xia Xue, Chuanxiang W. U., Yi Ding, Lanxiang L. U., Jun Wang, Yanming Liu. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(12):1374-1382.  
魏莉莉, 薛霞, 武传香, 丁一, 卢兰香, 王骏, 刘艳明. *色谱*, 2021, 39(12):1374-1382.
- [44] Bester K, Schafer D. *Water Res.*, 2009, 43(10):2639-2646.
- [45] Frenich A G, Romero-Gonzalez R, Gomez-Perez M L, Vidal J L. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218(28):4349-4356.