

中华人民共和国农业行业标准
《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联
质谱法》
编制说明
(公开征求意见稿)

上海市质量监督检验技术研究院
上海市兽药饲料检测所

《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法》标准编制组

二〇二三年六月

项目名称：《饲料中黄霉素 A 的测定液相色谱-串联质谱法》

农业行业标准项目计划编号：HYB-20273

承担单位：上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所

编制组主要成员：虞成华、严凤、卞华、吴剑平、葛宇、黄土新、陆志
芸、张婧、郑国建、王博

目录

一、工作概况	4
(一) 标准制定背景及任务来源	4
1. 标准制定背景	4
2. 任务来源	6
(二) 主要工作过程	6
1. 成立标准编制小组	6
2. 查询国内外相关标准和文献资料	6
3. 确定标准制定技术路线，制定原则	7
4. 进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性	7
5. 编写标准征求意见稿	7
6. 定向征求意见	8
7. 组织方法验证	8
8. 组织制定标准的预审，形成公开征求意见稿	8
8.1 组织预审查会	8
8.2 根据预审查会议的审查意见，完善标准文本及编制说明，形成公开征求意见稿	9
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	11
(一) 标准编制原则	11
2.1.1 规范性	11
2.1.2 适用性	11
2.1.3 客观性	11
2.1.4 协调性	11
2.1.5 易用性	12
(二) 主要技术内容确定的依据	12
2.2.1 与国内外相关标准的对比情况	12
2.2.2 方法主要试验技术制定与验证	13

三、试验验证的分析	35
3.1 定量方法的选择	35
3.2 基质效应	36
3.3 标准溶液稳定性的考察	37
3.3.1 标准储备溶液的稳定性试验	37
3.3.2 标准中间溶液的稳定性试验	38
3.4 线性范围	38
3.5 检出限和定量限	39
3.6 方法准确度及精密度考察	43
3.7 基质加标标准溶液的稳定性	46
3.8 样品溶液的稳定性	47
3.9 试验技术的最终确认	48
3.10 验证单位试验结果	49
3.11 结论	50
四、采用国际标准	51
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	51
六、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系	51
七、重大分歧意见的处理经过和依据	51
八、涉及专利的有关说明	51
九、贯彻标准的要求，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	52
十、其他应予说明的事项	52
参考文献	52
附件	53
附件 1 验证报告	54

附件 2 定向征求意见处理汇总表	82
附件 3 预审专家签字表	104
附件 4 农业行业标准《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）审查意见	105

《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法》

农业行业标准制定的编制说明

一、工作概况

（一）标准制定背景及任务来源

1. 标准制定背景

黄霉素为磷酸化多糖类抗生素，其抗菌作用机制是通过干扰细菌细胞壁结构物质肽聚糖的生物合成从而抑制细菌繁殖，其能提高饲料中能量和蛋白质的消化，从而提高营养物质的吸收，能有效地持续肠道菌群的平衡和稳定瘤胃的 pH 值。但黄霉素类药物对人的骨骼发育有影响，长期食用会产生造血功能障碍。2005 年欧盟农业部长会议决定，黄霉素等四种抗生素自 2006 年起禁止使用。其他许多国家也相继出台了禁用规定。我国农业农村部根据《兽药管理条例》《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，为维护我国动物源性食品安全和公共卫生安全，也相继出台了《中华人民共和国农业农村部公告 第 194 号》《中华人民共和国农业农村部公告 第 246 号》，上述公告决定：“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，兽药生产企业停止生产、进口兽药代理商停止进口相应兽药产品，同时注销相应的兽药产品批准文号和进口兽药注册证书”、“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”、“自 2020 年 1 月 1 日起，废止仅有促生长用途的药物饲料添加剂等品种质量标准，注销相关兽药产品批准文号和进口兽药注册证书”。其中“黄霉素预混剂”“黄霉素预混剂(发酵)”注销了兽药产品批准文号和进口兽药注册证书，停止生产、进口、经营、使用。

饲料是人类的间接食品，饲料质量的好坏以及是否安全，直接影响畜禽的正常发育、健康成长，生态环境的可持续发展和人类健康。当前饲料安全及畜产品安全问题已经引起全社会的关注。而饲料中违规以及超剂量添加药物是饲料安全的隐患之一，目前我国检验检疫部门已将黄霉素列为饲料和动物源性食品残留监控计划，因此有必要制定饲料中黄霉素的检测方法，为饲料中黄霉素检测及监管提供技术支持。

目前国内多使用高效液相色谱法对预混剂中黄霉素的不同组分进行鉴别研究，其中杨秀玉等利用高效液相色谱检查不同厂家（重庆大新药业有限公司、浙江升华拜克生物股份有限公司、浙江钱江生物技术有限公司、西安亨通光华制药有限公司、中牧实业股份有限公司，共 28 批次黄霉素原药）黄霉素中黄霉素 A 的相对量，最终测得黄霉素 A 的相对量在 55.4%-80.9%之间。也有文献报道使用离子对试剂分析鉴别黄霉素。虽然上述方法可以简单快速的鉴别黄霉素的不同成分，但是这些方法仅仅依靠不同组分极性的差异来进行区分，检测结果并不准确。液相色谱-串联质谱以灵敏度高、特异性强、检测时效等优势可以为饲料中黄霉素的检测提供更多的优势。

目前我国尚没有饲料中黄霉素的测定的相关标准。因此，需建立饲料中黄霉素的检测方法。通过制定《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》标准，

可以科学地界定该物质是否在饲料中违规使用,对保障动物源性食品安全具有重要意义。

2.任务来源

根据全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料工业国家标准、行业标准制定文件,上海市质量监督检验技术研究院和上海市兽药饲料检测所承担了《饲料中黄霉素的测定液相色谱-串联质谱法》农业行业标准制定工作(项目编号为HYB-20273),该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

(二) 主要工作过程

1.成立标准编制小组

2020年8月,上海市质量监督检验技术研究院接到农业行业标准《饲料中黄霉素A的测定液相色谱-串联质谱法》制定任务后,对该标准的具体工作进行了认真研究,确定了总体工作方案,并成立了以上海市质量监督检验技术研究院和上海市兽药饲料检测所为首的标准制定工作组。

2. 查询国内外相关标准和文献资料

2020年8月~11月,本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料,确立了标准制定的指导思想,形成了开题报告和标准草案,并制定了初步的实验方案。

3. 确定标准制定技术路线，制定原则

2020 年 11 月，上海市质量监督检验技术研究院召开了标准开题论证会，会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

4. 进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性

2020 年 12 月~2021 年 3 月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，在参照国际和国外先进标准的基础上，结合目前的实际情况，初步确定了标准的制定和相应的试验方法，形成了标准草案。

2021 年 4 月~2021 年 10 月，工作组对标准草案进行了多次讨论研究，2021 年 5 月 8 日邀请中国检验检疫科学研究院、国家食品安全风险评估中心、北京疾病预防控制中心、上海疾病预防控制中心、益海嘉里粮油研发中心、上海市食品安全研究所、上海市农科院质标所等多位专家，针对标准研制过程中遇到的主要问题，听取与会专家意见并进行研讨。课题组后续根据专家的意见对标准中采用的试验方法进行了研究与方法验证工作，积累了研究数据。

5. 编写标准征求意见稿

2021 年 11 月~2021 年 12 月，对方法研究过程中出现的问题和困难，标准工作组进行了认真研究分析，并得以解决，完善了方法的准确性和可靠性，在此基础上完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。

6.定向征求意见

2021 年 12 月~2022 年 1 月，征求发函了 28 个相关质检单位和企业，其中回函单位和企业 26 个，未回函 2 个；提出意见单位 26 个，无意见单位 0 个。共提出意见 92 条，采纳 83 条，部分采纳或不采纳 9 条。根据征求的相关质检单位和企业的意见基础上，对标准内容进行了补充完善，在此基础上，编写完成了《饲料中黄霉素 A 的测定液相色谱-串联质谱法》标准文本及编制说明的征求意见稿。

7.组织方法验证

2022 年 1 月~2022 年 2 月，方法经上海海关动植物食品中心、上海市疾病预防控制中心和上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所验证。验证结果表明，该标准方法设计合理，实用有效。液相色谱-串联质谱法的检出限、定量限、标准曲线范围、准确度与精确度均能满足添加剂预混合饲料、配合饲料和浓缩饲料中黄霉素 A 的测定要求。

8. 组织制定标准的预审，形成公开征求意见稿

8.1 组织预审查会

2023 年 4 月 20 日，上海市兽药饲料检测所组织专家对上海市兽药饲料检测所、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所起草的农业行业标准《饲料中黄霉素A的测定液相色谱-串联质谱法》（预审稿）进行了认真审查。

由 8 位专家组成的专家组在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：1.建议标准名称修改为“饲料中黄霉素A的测定 液相色谱-串联质谱法”，并在编制说明中补充相关说明。2. 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，详细列出批内、批间回收率和精密度试验数据。3.按照GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.4-2015的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

8.2 根据预审查会议的审查意见，完善标准文本及编制说明，形成公开征求意见稿

预审查意见处理情况：

意见1：1.建议标准名称修改为“饲料中黄霉素A的测定 液相色谱-串联质谱法”，并在编制说明中补充相关说明。

处理：采纳

试验首先用高效液相色谱分离出5种主要黄霉素成分。得出黄霉素A占有关键作用；其次用超高分辨质谱仪精确测定黄霉素A的含量；最后要高分辨四极杆飞行时间质谱仪来确定黄霉素A在分离洗脱过程中，没有收到其他物质的影响。

ALTA SCIENTIFIC.于2022年2月在工业上分离出黄霉素A的单标，试验最终通过黄霉素A的基质匹配曲线进行方法学验证。并用黄霉素A去校准黄霉素标样，结果符合面积归一化法得出的结论，因此将标准名称确定为“饲料中黄霉素

A的测定 液相色谱-串联质谱法”。

意见2：编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，详细列出批内、批间回收率和精密度试验数据。

处理：采纳

编制说明已按《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，并在编制说明中已经列出批内结果的7组原始数据，和批间结果的4周平均值原始数据。

意见3：按照GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.4-2015的要求规范标准文本及编制说明。

处理：采纳

已按 GB/T1.1-2020、GB/T20001.4-2015 的要求及预审意见处理汇总表，对文件进行了相应的结构调整和编辑性改动，规范了文件，并对编制说明进行了完善，如在背景中列出了不同企业测定的不同批次中黄霉素原料中黄霉素A的相对含量等。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

（一）标准编制原则

2.1.1 规范性

技术要素内容通过充分调研，科学评估、客观评价，以科学技术和实验数据为依据；依据依据 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定起草编制。

2.1.2 适用性

根据我国《饲料添加剂品种目录》（农业部公告 2013 年第 2045 号发布，2014 年 2134 号、2017 年 2634 号、2018 年第 53 号修订）收载饲料添加剂产品的现状，提出高效液相色谱-串联质谱试验的合理通用方法。

2.1.3 客观性

广泛征求意见，合理采纳各相关方意见与建议。

2.1.4 协调性

制定的标准与现行有效的标准之间能相互协调，避免重复和不必要的差异。

2.1.5 易用性

标准编制工作组对相关的国内外标准、技术资料进行分析、研究，参考了国内外黄霉素相关高效液相色谱-串联质谱限量试验的研究方法，同时结合国内检测机构及饲料添加剂生产企业的质量控制及检验水平的实际情况制定了该标准。与此同时标准的内容便于检测机构和生产企业使用，并且易于被其他标准引用或剪裁使用。

（二）主要技术内容确定的依据

本标准的主要技术内容（包括技术要求和试验方法）说明如下：

2.2.1 与国内外相关标准的对比情况

关于黄霉素相关检测方法的标准有 DB 32/T 1279-2008 《饲料和饲料添加剂中黄霉素 A 的测定高效液相色谱法》^[1]和 DB34/T1358-2011 《饲料中黄霉素的测定—高效液相色谱法》^[2]，虽然上述液相方法可以简单快速的鉴别黄霉素的不同成分，但是这些方法仅仅依靠不同组分极性的差异来进行区分，容易出现假阳性的结果。同时，高效液相色谱因其灵敏度的限制，无法测定基质中低含量的黄霉素^[3]。液相色谱-串联质谱法以灵敏度高、特异性强、检测时效等优势可以为饲料中黄霉素的检测提供更多的优势^[4]。西班牙 Sandra Pérez^[5]专家团队和墨西哥 M.W. Moeller 专家团队均已尝试使用液相色谱-串联质谱法测定动物源性肉制品中黄霉素的含量，主要包括肌肉和肝脏基质。但饲料基质相对于肉制品来说更为复杂，饲料基质有多大 200 种以上，不同的饲料品种（组成成分，

颗粒大小)都对最终黄霉素的回收率和稳定性有很大的影响。目前国内还没有饲料中黄霉素含量检测的液相色谱串联质谱的标准。本标准结合地方标准和已收集到的国内外关于黄霉素的检测文献,利用液相色谱-串联质谱法对黄霉素进行定量分析。

2.2.2 方法主要试验技术制定与验证

本标准所用试剂和水,在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

试样的制备均按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取约 200 g,按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.42 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

2.2.3 高效液相色谱法分离黄霉素主成分

黄霉素是以黄霉素 A ($C_{69}H_{108}N_5O_{34}P$)、黄霉素 A₁₂ ($C_{68}H_{106}N_5O_{34}P$)、黄霉素 C₁ ($C_{62}H_{96}N_5O_{28}P$)、黄霉素 C₃ ($C_{63}H_{98}N_5O_{28}P$)、黄霉素 C₄ ($C_{63}H_{98}N_5O_{29}P$) 等为主的混合物。值得一提的是,黄霉素药物均以混合物的形式添加至饲料基质中。本实验首先通过高效液相色谱技术来确定黄霉素混合物中起到最关键性作用的活性成分。

2.2.3.1 仪器条件的确定

(1) 色谱柱的选择

黄霉素类物质为强极性弱酸性化合物,在反相柱上不易保留,并且 5 类活

性成分之间的化学性质相近，与色谱柱填料之间相互作用力的差异可能也不大。

为确保其在液相系统中得到充分分离，在方法研究过程中，本试验考察了 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 5μm, 250 x 4.6mm、Diamonsil 5μm C₁₈(2), 250 x 4.6mm、Diamonsil Plus 5μm, 250 x 4.6 mm、DIKMA Platisil 5μm ODS, 250 x 4.6 mm、DIKMA Spursil 5μm C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 种主要针对强极性化合物的预选分离柱。如图 1 所示，普通改良的 C₁₈ 色谱柱无法很好分离出黄霉素 C₁、黄霉素 C₃, 黄霉素 C₄, 此 3 类物质会包裹在黄霉素 A 的主峰中，并且黄霉素 A₁₂ 和黄霉素 A 也没有充分分离。结果表明，黄霉素能在更适合酸性盐流动相体系下的铂金柱 DIKMA Platisil 5μm ODS, 250 x 4.6 mm 才能得到较好的分离，提供更好的峰型、响应和分离效果，可能因为铂金柱中去活化的酸性游离硅羟基固定相对 5 种活性组分在四氢吡喃基团上不同的 R₁, R₂, R₃ 基团有着不同的分子间作用力, 从而产生了不同的洗脱分离结果(表 1)。因此，本实验室研究选择其进行下一步试验分析。实验室可根据具体情况择优选取分离效果类似的色谱柱。

表1黄霉素活性成分的结构信息

组分/基团	M	R ₁	R ₂	R ₃
黄霉素 A	1581.6	CH ₃	OH	D-葡萄糖基
黄霉素 A ₁₂	1567.6	OH	H	D-葡萄糖基
黄霉素 C ₁	1389.6	OH	H	H
黄霉素 C ₃	1403.6	CH ₃	OH	H
黄霉素 C ₄	1419.6	CH ₃	OH	OH

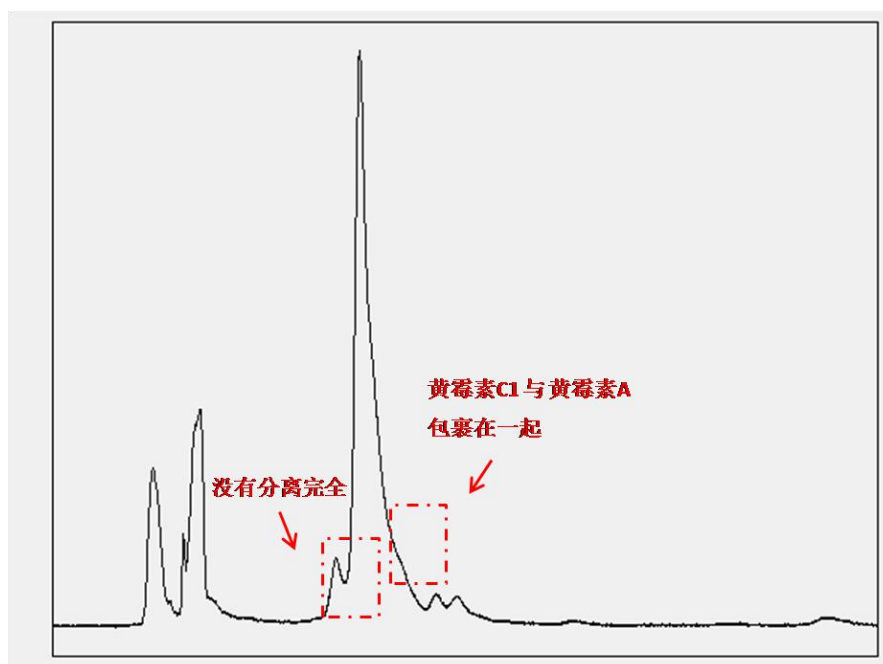


图1 (A). Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱

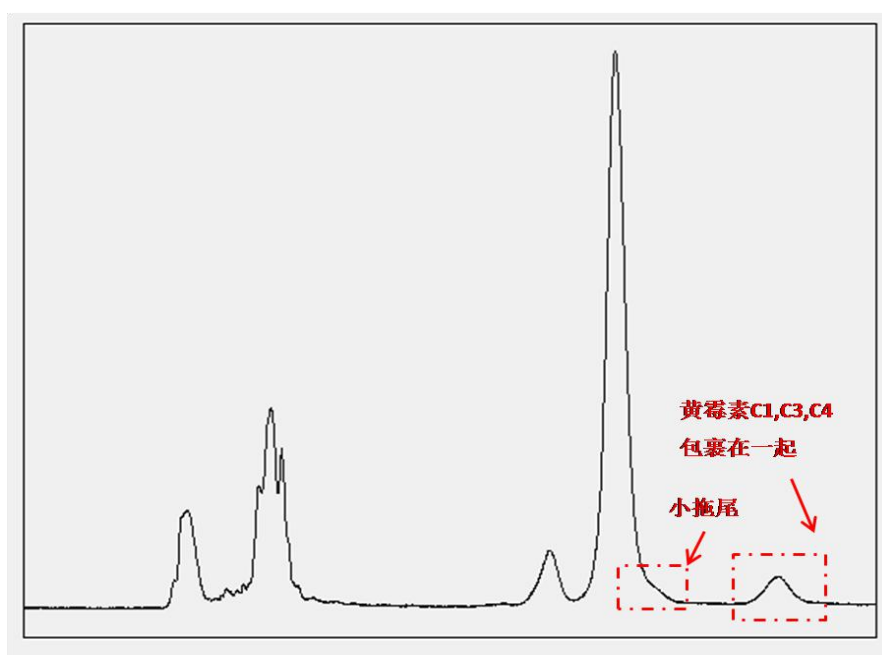


图1 (B). DIKMA Spursil 5 μ m C18色谱柱

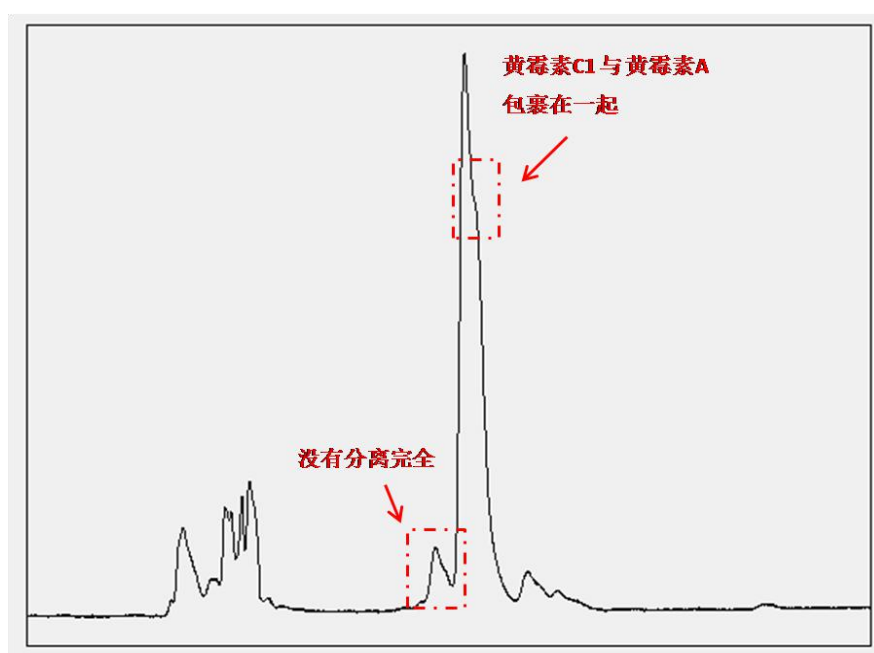


图1 (C). Diamonsil 5 μ m C18(2)色谱柱

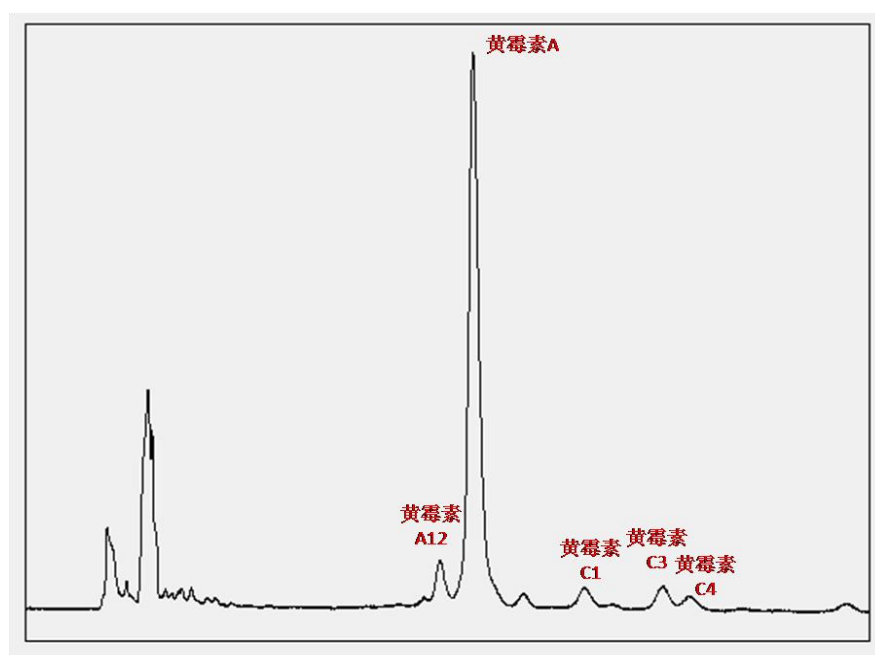


图2. DIKMA Platisil 5 μ m ODS色谱柱

(2) 流动相的确定

高效液相色谱中流动相的配比会是影响目标化合物分离的主要因素。本试验参考安徽省地方标准 DB32/T 1279-2008 和 DB34/T 1279-2008 标准, 试验选择 20mmol/L 甲酸铵和乙酸铵分别作为预选水相, 乙腈和甲醇作为预选有机相, 将流动相以 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 40:60 的比例分别研究黄霉素的检测灵敏度及出峰情况。实验表明, 甲酸铵和乙酸铵均属于弱酸弱碱盐, 阴离子和阳离子均水解, 水溶液显中性, 无法分离得到目标物, 需要将溶液 pH 值用甲酸调整到 5.0, 此时能得到较明显的目标峰。甲酸铵和乙酸铵没有明显区别, 但有相关文献报道, 在 pH 为 3.5-5.5 时, 相同浓度的乙酸铵-酸溶液比甲酸铵-酸溶液缓冲能力强, 而甲酸铵-甲酸溶液在 pH3-3.5 缓冲能力更好, 因此本试验选择乙酸铵为水相。当有机相溶液采用甲醇时, 目标物在相同洗脱程序下出峰时间略晚, 并伴有拖尾的情况, 容易与后面杂质峰包裹在一起, 造成定量的误差。同时, 考虑到乙腈与水相互溶时柱压小于甲醇与水互溶时的柱压, 可以有效延长色谱柱的耐用性, 因此本试验选择乙腈为有机相。

另外, 当有机相的比例大于 48% 时, 黄霉素 C₁、黄霉素 C₃, 黄霉素 C₄ 的出峰时间明显前移, 与主峰黄霉素 A 包裹在一起; 当有机相的比例小于 43% 时, 黄霉素 A₁₂ 会延后, 同样会与黄霉素 A 包裹在一起。流动相比比例在 45% 左右, 能得到最稳定的分离效果。5 个化合物在 6 次平行性试验得出的出峰时间的偏差在 2.5% 以内。

本试验研究出 pH 为 5.0 的乙酸铵为水相, 乙腈为有机相, 流动相比比例为 55:45 的体系, 表现出优良的洗脱分离效率。液相色谱参考条件如下:

色谱柱: DiKMAPlatisil 5 μ m ODS, 250 x 4.6 mm, 或性能相当者;

柱温：35℃；

进样量：20μL；

流动相：乙酸铵:乙腈= 55:45；

检测器：检测波长 258 nm。

(3) 黄霉素标准品各组分含量的测定

黄霉素混合物中的 5 种主要活性成分可根据以上色谱条件分离后的结果，利用面积归一化法测定各自占比。通过图 3 可知,其中黄霉素 A 的占比大于 85%，起到关键性作用，与标准品证书中的信息和外国文献的结果基本吻合。

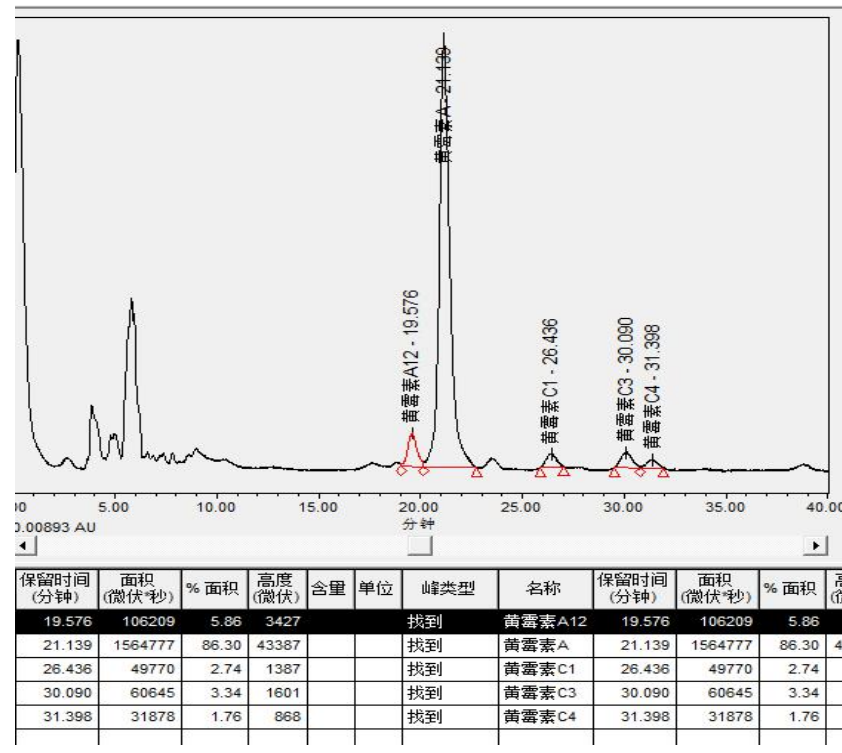


图3. 黄霉素各成分的占比

表2. 黄霉素A在黄霉素混合物中的占比（n=6）

标准品公司	黄霉素 A（%）	黄霉素 A ₁ （%）	黄霉素 C ₁ （%）	黄霉素 C ₃ （%）	黄霉素 C ₄ （%）
-------	----------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Toronto Research Chemicals Inc , Canada	86.6±0.68	5.42±1.06	2.68±0.81	3.43±1.01	1.76±0.76
Alta Scientific Co., Ltd, China	87.2±0.25	4.79±0.52	2.77±0.58	3.92±0.26	1.34±0.23
Sigma-Aldrich, U.S.A	86.1±0.43	5.06±0.37	2.81±0.27	3.48±0.32	2.35±0.76
Dr. Ehrenstorfer GmbH, German	85.8±0.16	5.27±0.61	2.27±0.29	3.71±0.87	2.83±0.30

由表 2 可知，利用上述高效液相色谱条件分离得到的黄霉素各组分，经面积归一化法得出黄霉素 A 的占比为 86.4%，相对标准差为 1.8%。实验数据十分稳定，不同公司标准品中，黄霉素 A 所占黄霉素混合物的比例都在 86% 以上。而其他组成的含量占比有着一定的波动，不过总体在可控范围内，也没有对黄霉素 A 造成相应的影响。因此，实验结果可以说明黄霉素 A 物质在黄霉素混合物中起到最主导作用，可以用黄霉素 A 的结果来表达黄霉素物质在样品中的含量。此结果已转化为研究论文《基于面积归一化法对饲料中黄霉素总残留量的研究》被饲料领域最权威核心杂志的《中国粮油学报》收录。

2.2.4 高效液相色谱-串联质谱定量黄霉素 A 含量

2.2.4.1 试剂或材料：

水：一级水；

甲醇：色谱纯；

乙腈：色谱纯；

甲酸：色谱纯；

仪器设备：分析天平：精度为 0.1 mg 和 0.01 mg；高效液相色谱仪-串联四级杆质谱；高速冷冻离心机；多管漩涡振荡器。

2.2.4.2 标准工作液的制备

(1) 标准储备液的制备 (1 mg/mL)

称取黄霉素标准品(CAS:11015-37-5, $\geq 96.2\%$)10 mg(精确至 0.01 mg)于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解定容。于-20℃下保存, 有效期为 6 个月。

(2) 标准中间溶液的制备 (10 $\mu\text{g/mL}$)

准确移取黄霉素标准储备溶液 (2.2.3.1) 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。配成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 于-18℃保存, 有效期为 1 个月。

2.2.4.3 仪器条件

液相色谱-串联质谱联用方法的灵敏性高, 定性准确, 决定选用液相色谱-串联质谱法作为定量分析的方法。

(1) 质谱条件的优化

黄霉素标准品 (纯度 $\geq 96.2\%$) 是以黄霉素 A ($\text{C}_{69}\text{H}_{108}\text{N}_5\text{O}_{34}\text{P}$)、黄霉素 A₁₂ ($\text{C}_{68}\text{H}_{106}\text{N}_5\text{O}_{34}\text{P}$)、黄霉素 C₁ ($\text{C}_{62}\text{H}_{96}\text{N}_5\text{O}_{28}\text{P}$)、黄霉素 C₃ ($\text{C}_{63}\text{H}_{98}\text{N}_5\text{O}_{28}\text{P}$)、黄霉素 C₄ ($\text{C}_{63}\text{H}_{98}\text{N}_5\text{O}_{29}\text{P}$) 为主的混合物。考虑到 5 种物质的分子量均在 1000 以上, 将配制的质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的黄霉素标准溶液通过注射泵注入质谱仪中进行一级质谱全扫描 (分子量扫描范围: 50-2000), 黄霉素在电离过程中产生 2 个明显的母离子, 分别为[M-H]⁻-m/z 1580.7 和[M-H]⁻-m/z 789.9, 其中[M-H]⁻-m/z 789.9 的响应远高于[M-H]⁻-m/z 1580.7(图 4 上)。因此在质谱优化过程中以 789.9 作为黄霉素的母离子, 根据文献可知[M-H]⁻-m/z 789.9 为黄霉素 A 的母离子, 并且利用高效液相色谱技术已经得出, 黄霉素物质中, 黄霉素 A 组分的占比在 86%以上, 为最主要的活性

成分。因此可以利用液相色谱串联质谱主要测定黄霉素 A 的含量。

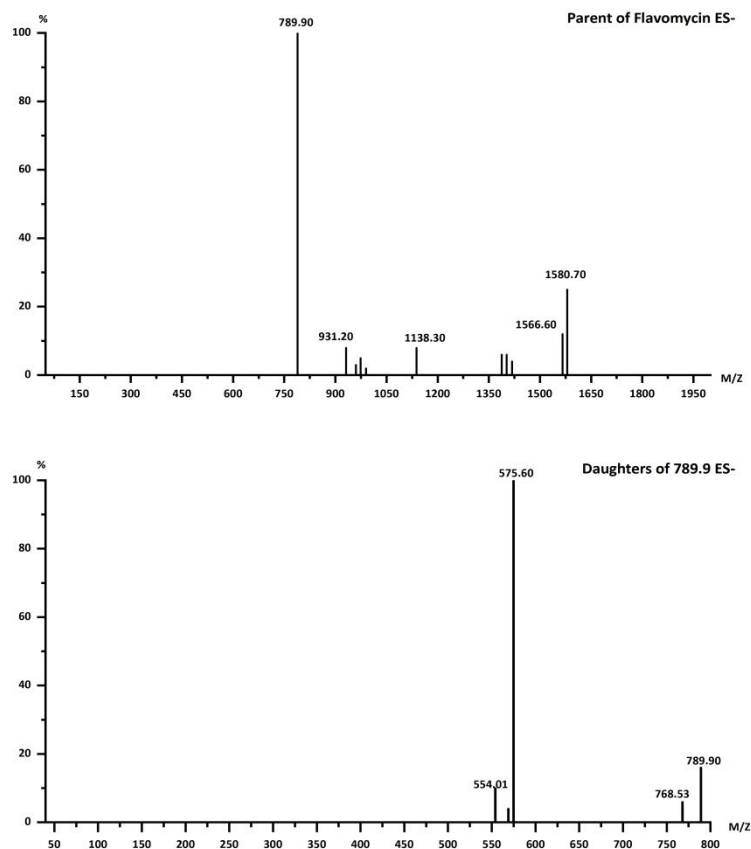


图 4. 母离子[M-H]-m/z 789.9 全分子量扫描

同样地，将母离子[M-H]-m/z 789.9 进行二级质谱全扫描（分子量扫描范围：50-800），有且仅有[M-H]-m/z 789.9/553.9 和[M-H]-m/z 789.9/575.9 两对显著子离子，且 2 个通道几乎都没有杂质干扰(图 4 下)。黄霉素 A 在 [M-H]-m/z 789.9 /575.9 通道处的响应最高，因此，实验选择[M-H]-m/z 789.9 /575.9 和[M-H]-m/z 789.9/553.9 作为黄霉素的定性离子对，其中 [M-H]-m/z 789.9 / 575.9 作为黄霉素 A 的定量离子对。

比较其提取离子色谱图的响应和峰型，依次优化鞘气流速、辅助气、吹扫气、离子传输温度和雾化器温度，然后优化电离电压，在定性分析软件中，选择最优

电压参数。当碰撞能达到 25eV 时，789.9/575.9 的响应达到峰值 1.41e8（如图 5）；当碰撞能达到 30eV 时，789.9/553.9 的响应达到峰值 1.95e7（如图 6）。从而确定黄霉素最终的质谱条件，见表 3。

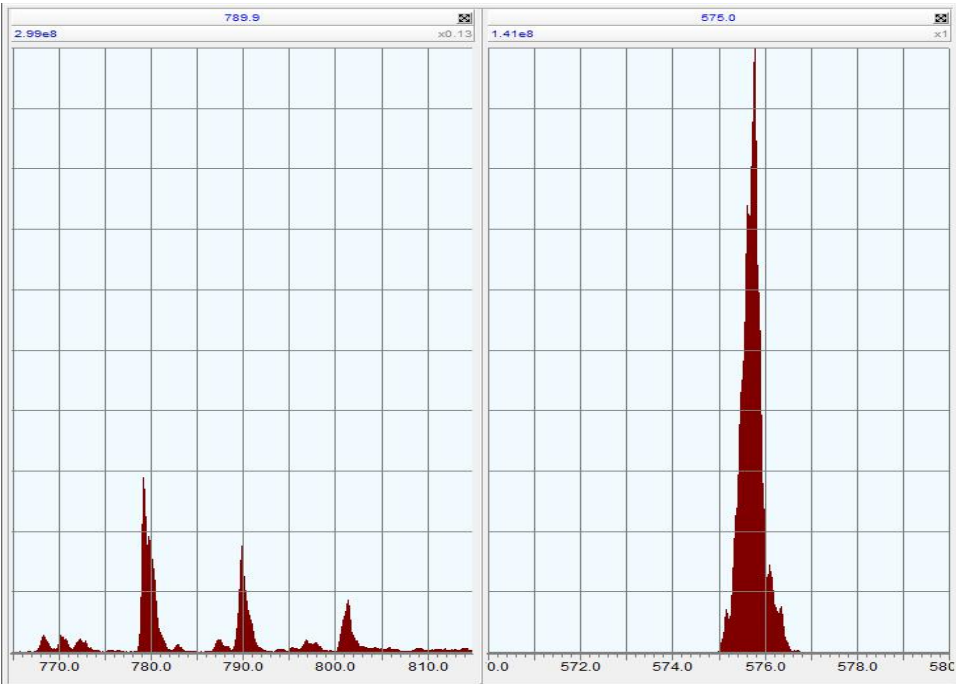


图 5. 优化[M-H]⁻-m/z [789.9/575.9]- CE 值

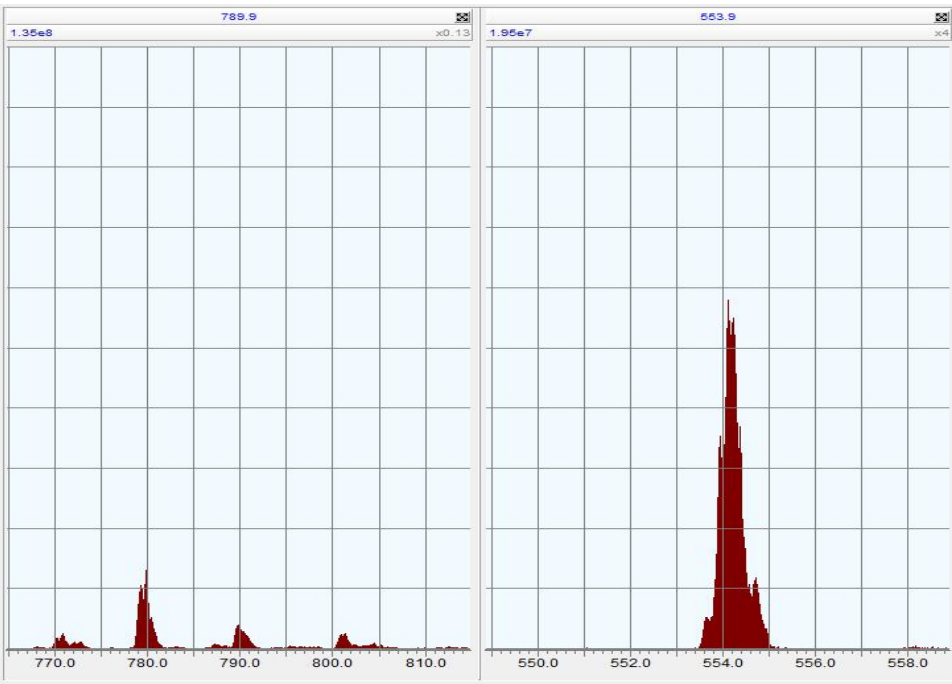


图 6. 优化[M-H]-m/z [789.9/553.9]- CE 值

最终确定质谱仪器的方法参数如下：

电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

脱溶剂气流速：1000 L/h；反吹气流速：150 L/h；

雾化器温度：550 °C；电离电压：3.0 kV；源温度：150 °C。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 3。

表 3.采集离子对信息

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
黄霉素	789.9>553.9	25	30
	789.9>575.9*	25	25

注：质谱条件仅供参考，当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

根据液相色谱-质谱法技术特点以及欧盟 2002/657/EC 文件中对兽药残留测定法中有关液相色谱－质谱法定性判断的标准，最终确定定性离子丰度比的相对偏差的范围，见表 4：

表 4.定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	> 50	> 20 ~ 50	> 10 ~ 20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

最后，为了验证黄霉素 A 的色谱分离具有唯一性，不受其他组分的影响。本实验还利用 LC-Q-TOF-MS 高分辨四极杆飞行时间质谱仪研究了 5 种成分的分离结果。最终发现，黄霉素 A 在 9.087min 出峰，此时没有其他黄霉素组分的干扰峰出现（图 7）。

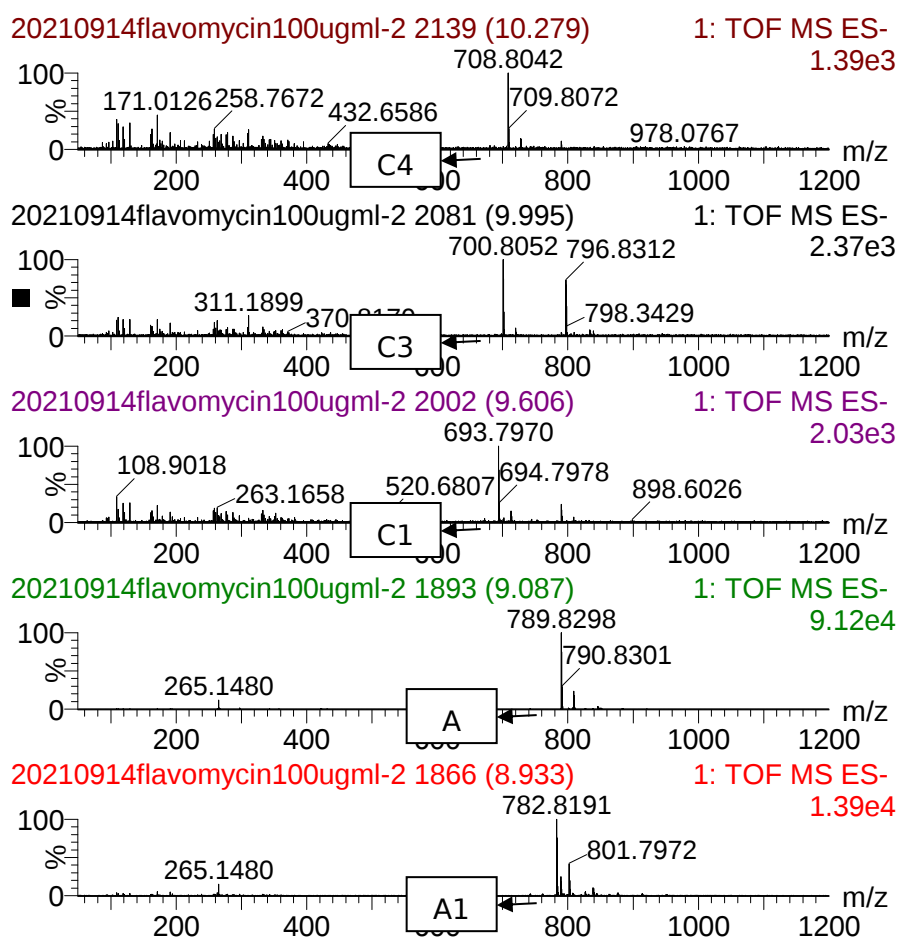


图 7. 黄霉素在 LC-Q-TOF-MS 高分辨四极杆飞行时间质谱仪
中母离子的全扫色谱结果

图中由下而上依次为 8.933min 处黄霉素 A₁₂ [M-2H]²⁻ m/z 1567.6/782.8 的母离子全扫图；9.087min 处黄霉素 A [M-2H]²⁻ m/z

1581.6/789.9 的母离子全扫图；9.606min 处黄霉素 C₁ [M-2H]²⁻ m/z 1389.6/693.9 的母离子全扫图；9.995min 处黄霉素 C₃ [M-2H]²⁻ m/z 1403.6/700.9 的母离子全扫图；10.279min 处黄霉素 C₄ [M-2H]²⁻ m/z 1419.6/708.9 的母离子全扫图。

值得注意的是，虽然 LC-Q-TOF-MS 高分辨四极杆飞行时间质谱仪能较好地分离 5 种活性成分，但定量的稳定性却不是很理想，相对标准偏差在 11.7% 以上。因此，本方法最终确定使用复合式色谱体系确定基质中黄霉素的残留量，包括高效液相色谱的有效分离，液相色谱串联质谱的精确定量和高分辨四极杆飞行时间质谱的唯一性验证。

根据质谱条件的优化结果，结合高效液相色谱得出的分离结果。本试验认为黄霉素 A 化合物在黄霉素中具有主导性作用，利用黄霉素 A 来表示黄霉素在样品基质中的含量是可行的。因此，在后续的验证过程中，其统计数据均用来表示黄霉素的残留含量。

(2) 色谱柱的选择

黄霉素极性较强，根据其结构性性质，以及饲料复杂的基质情况，在方法研究过程中，试验比较了 Waters ACQUITY BEH C₁₈(100mm×2.1mm, 1.7 μm)、Thermo C₁₈(100mm×2.1mm, 2.6 μm)、Waters Atlantis T₃(100mm×2.1mm, 3μm)、Agilent SB-C₁₈(100mm×2.1mm, 1.8 μm) 4 类色谱柱对目标物分离度和灵敏度的不同影响。结果表明，Thermo C₁₈ 色谱柱导致黄霉素容易受到杂质干扰，峰型不理想（如图8）；Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱导致黄霉素出峰时间太早，并且伴有基质前拖效应（如图9）；Agilent

SB-C₁₈色谱柱导致黄霉素响应较低，伴有明显的拖尾效应（如图10），Waters Atlantis T₃色谱柱峰型较好，响应高，出峰时间也更适合，色谱柱峰型更对称（如图11）。Waters Atlantis T₃是改良的C₁₈色谱柱，使用高纯度硅胶及双键键合技术，并对填料的孔径大小、端基封口以及 C₁₈的键合密度进行优化，从而使 Atlantis 色谱柱具有对黄霉素保留能力强，在水流动相中性能稳定，对低 pH 条件下的色谱十分有利，能保证黄霉素具有良好的稳定性，适合本试验的检测需求。

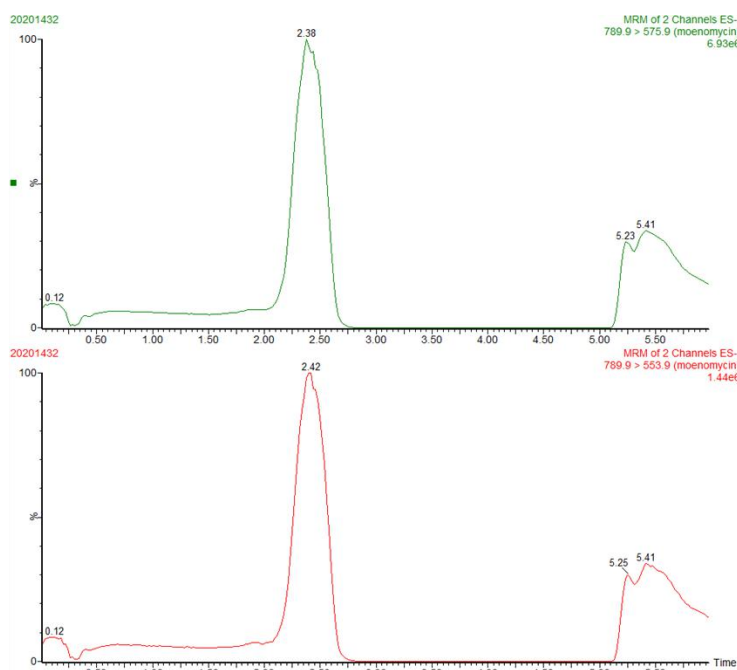


图 8. Thermo C18 色谱柱

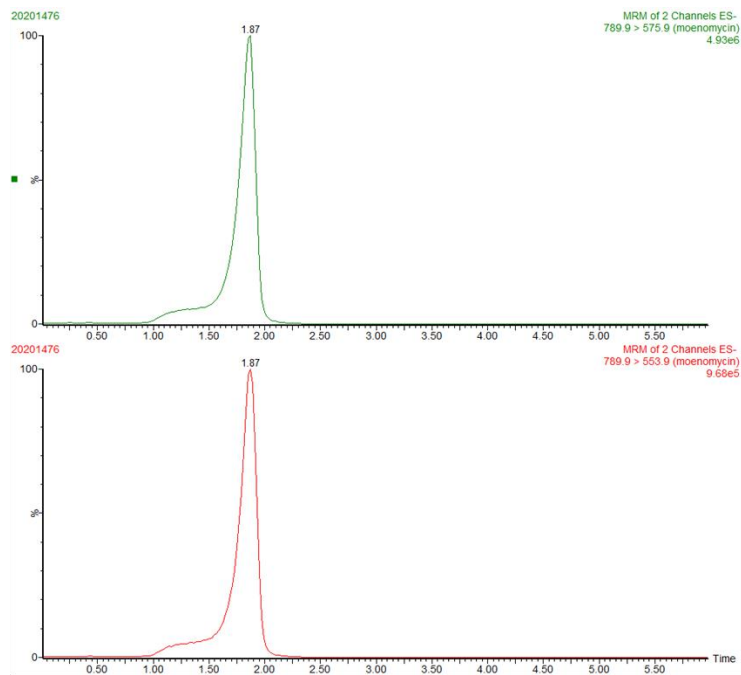


图 9. Waters ACQUITY BEH C18 色谱柱

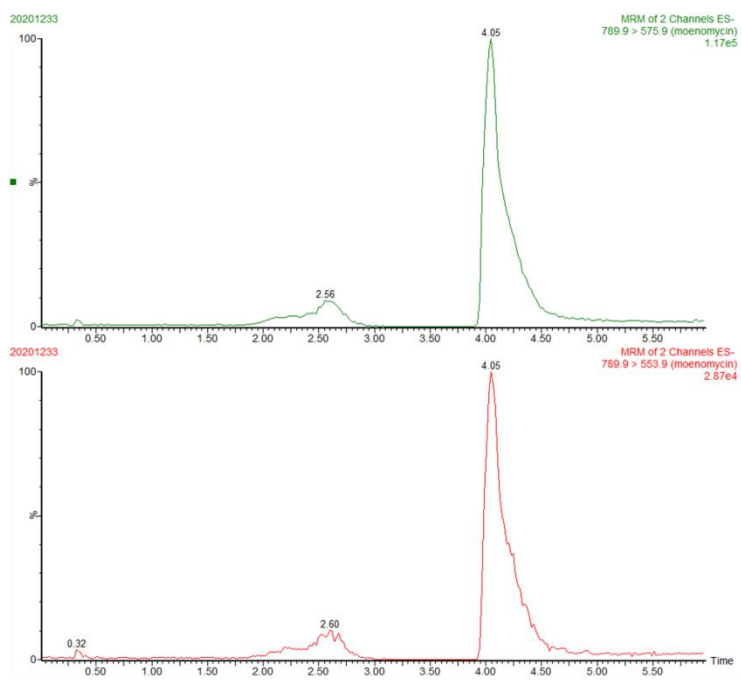


图 10. Agilent SB-C18 色谱柱

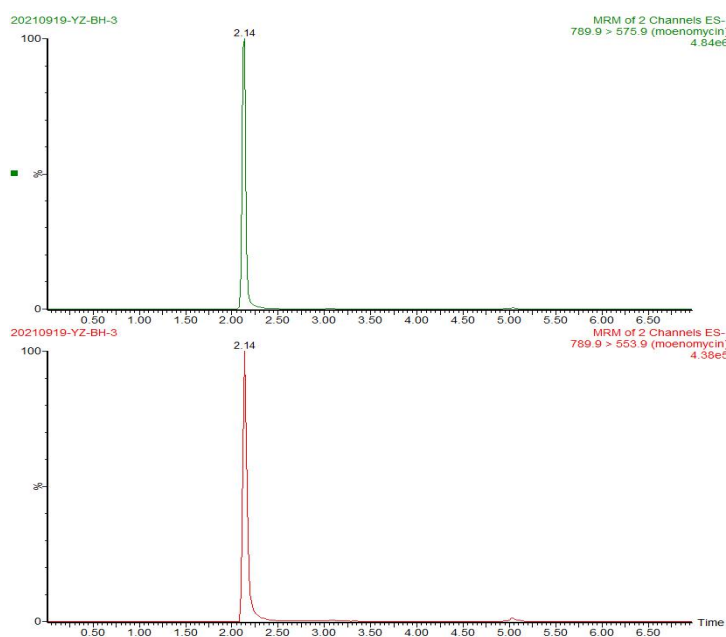


图 11. Waters Atlantis T3 色谱柱

(3) 流动相的选择

本试验的流动相分别选取乙腈、甲醇作为备选有机相，负模式下以超纯水、20mmol/L 乙酸铵和 0.1%氨水为备选水相。将流动相两两配比，结果表明甲醇和乙腈作为有机相，都能较好的分离出黄霉素，但乙腈相对于甲醇，系统整体的柱压下降了 13%，目标峰的保留时间也更为稳定。另外，在负离子模式下，碱性条件的流动相有利于提高离子的响应，但本实验发现，在高 pH 值的流动相体系下，黄霉素 A 的响应没有显著提升，从图 12 和图 13 可知，高 pH 值的碱性

流动相反而降低了黄霉素 A 的响应值，主要与黄霉素呈弱酸性有关，碱性条件抑制其电离。相反，试验再次尝试了 pH5.0 的 20mmol/L 乙酸铵作为水相，其使得黄霉素 A 的离子峰形更加尖锐，响应也更高（图 14）。另外，因为黄霉素极性较强，饲料样品基质较复杂，因此试验选择梯度程序洗脱，并且起始的有机相比比例要控制在 10%左右，有机相比比例太小，黄霉素 A 洗脱不完全（如图 15），有机相比比例太高，出峰太早，伴有溶剂效应。洗脱程序见下表 5：

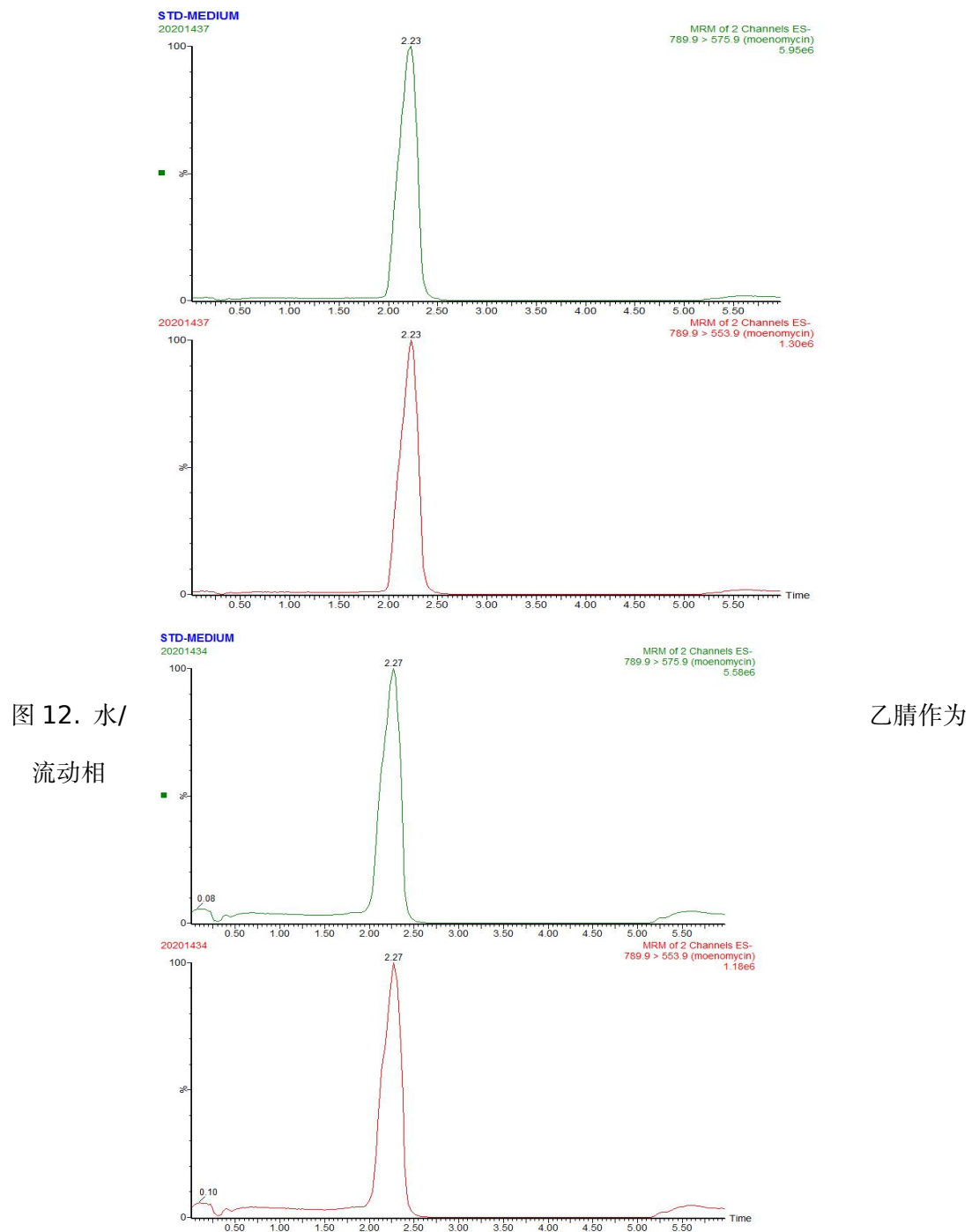


图 13. 0.1%氨水/乙腈作为流动相

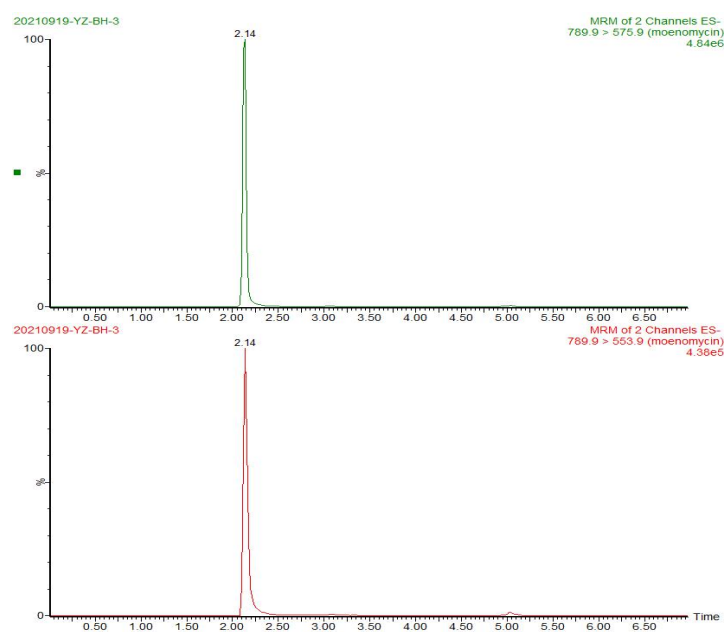


图 14. 20mmol/L 乙酸铵/乙腈作为流动相

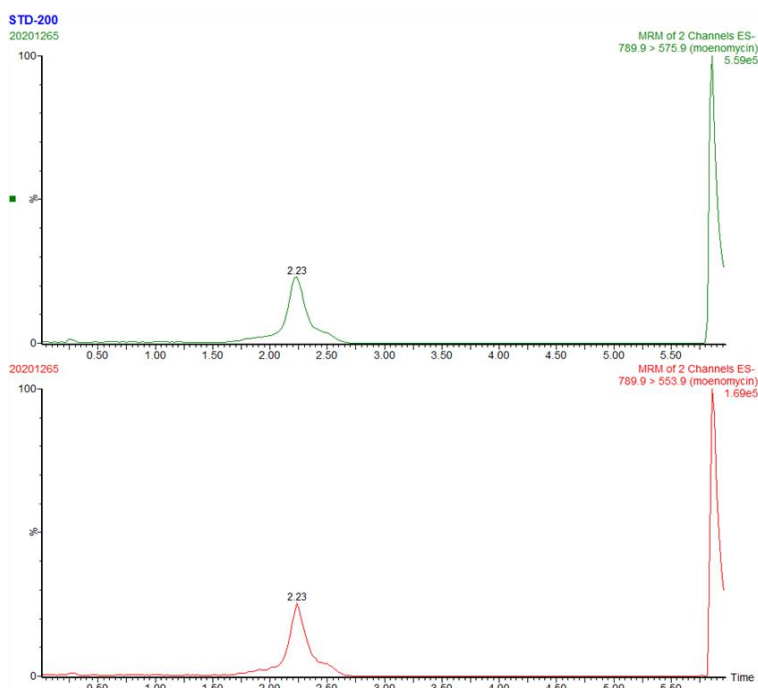


图 15. 黄霉素 A 洗脱不完全

表 5.液相梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
1.10	5	95
4.00	5	95
4.10	90	10
7.00	90	10

液相条件的确定

色谱柱：Waters Atlantis T₃ 柱，100 mm × 2.1 mm，3 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：10 μL；

流动相：A：20 mmol/L 乙酸铵溶液，B：乙腈，

流速：0.4mL/min。

2.2.4.4 提取条件

（1）提取剂的确定

通过对黄霉素 A 分子结构的研究，试验选用甲醇、乙腈和甲醇水对畜、禽 2 类饲料基质（添加剂预混合饲料、配合饲料、浓缩饲料）进行探究来确定最佳的提取溶剂（表 6）。结果表明，当提取剂为甲醇，2 类基质（3 种饲料）的提取效率均较高，接近 80%，而另外 2 种提取效率低。结果主要与黄霉素极性很强，并只溶于水和低分子醇类，不溶于其他有机溶剂的化学性质相关。因此，实验选择甲醇作为提取剂，并考查了 10%氨化甲醇、10%乙酸铵甲醇和 0.1%甲酸甲醇对于回收率的影响，如表 7 所示，结果表明，0.1%甲酸甲醇能进一步提升黄霉素的回收率，甲酸具有协助甲醇沉淀蛋白类杂质的作用，进一步降低了基质效应，提升了黄霉素 A 的回收率。另外，考虑到黄霉素 A 在电离过程中会失去电子，所以本试验用 10%氨化甲醇作为提取液，不过回收率有一定的下降，经查阅文献可知，氨化甲醇作为提取液可能更适用于肉制品基质中黄霉素 A 的提取，对于基质更为复杂的饲料基质来说，氨水提取时，会造成饲料黏糊成颗粒团，降低提取回收率的同时，影响结果的稳定性。同时，本试验参考国外文献尝试用 10%乙酸铵甲醇作为提取液，但回收率没有显著提高。综合考虑，本试验选择 0.1%甲酸甲醇作为提取剂，其回收率在 $(80.9 \pm 1.02) \%$ 。

表 6.不同提取剂对不同饲料中黄霉素 A 提取回收率的影响 (n=6,4LOQ)

提取剂	甲醇	乙腈	甲醇-水
(畜) 添加剂预混合饲料	77.9 ± 0.52	10.9 ± 2.63	56.3 ± 2.43
(畜) 浓缩饲料	80.4 ± 0.27	18.6 ± 1.89	66.7 ± 1.55
(畜) 配合饲料	77.5 ± 0.63	13.2 ± 2.01	61.5 ± 0.87
(禽) 添加剂预混合饲料	70.3 ± 0.92	13.2 ± 2.73	54.3 ± 1.96
(禽) 浓缩饲料	80.1 ± 0.86	16.2 ± 2.67	63.2 ± 1.44
(禽) 配合饲料	76.8 ± 0.65	16.8 ± 3.28	59.6 ± 2.01
平均回收率	78.8 ± 0.68	14.8 ± 2.68	60.3 ± 2.25

表 7.不同甲醇提取剂对不种饲料中黄霉素 A 提取回收率的影响 (n=6,4LOQ)

提取剂	0.1%甲酸甲醇	10%氨化甲醇	10%乙酸铵甲醇
(畜用) 添加剂预混合饲料	78.6 ± 0.21	53.9 ± 1.63	78.2 ± 0.85
(畜用) 浓缩饲料	86.2 ± 0.32	68.6 ± 1.25	76.9 ± 2.35
(畜用) 配合饲料	81.3 ± 0.64	56.8 ± 1.24	77.9 ± 3.24
(禽用) 添加剂预混合饲料	75.2 ± 0.51	59.4 ± 1.32	74.3 ± 0.45
(禽用) 浓缩饲料	81.6 ± 0.54	70.5 ± 1.32	80.4 ± 0.47
(禽用) 配合饲料	78.7 ± 0.33	67.8 ± 2.54	77.6 ± 1.36
平均回收率 (%)	80.9 ± 1.02	62.8 ± 1.34	77.9 ± 0.92

(2) 净化条件的确定

基质经过 0.1%甲酸甲醇提取后，回收率已经可以达到 80.9%。为进一步提升黄霉素 A 的回收率，试验吸取 2 mL 上清液，选择 C₁₈、Oasis HLB, Oasis PRiME HLB 和氨基 Amino-NH₂ 固相萃取小柱进行净化条件考察（饲料中，抗生素的添加含量通常较高，无需浓缩）。实验发现，只有 Oasis PRiME HLB 对

于回收率有一定的提升作用（表 8）。

表 8. 不同净化条件对饲料中黄霉素 A 的提取效率（n=6,4LOQ）

净化方式	C ₁₈	Oasis HLB	Oasis PRiME HLB	Amino-NH ₂
（畜用）添加剂预混合饲料	74.4 ± 0.21	78.9 ± 0.32	80.9 ± 0.64	43.9 ± 0.36
（畜用）浓缩饲料	75.0 ± 0.52	81.6 ± 0.43	88.1 ± 0.32	57.9 ± 0.54
（畜用）配合饲料	73.6 ± 0.36	77.9 ± 0.59	81.7 ± 0.35	60.8 ± 0.39
（禽用）添加剂预混合饲料	70.6 ± 0.31	77.5 ± 0.98	79.2 ± 0.60	52.6 ± 0.75
（禽用）浓缩饲料	73.5 ± 0.84	80.2 ± 0.54	83.8 ± 0.41	66.4 ± 0.89
（禽用）配合饲料	74.2 ± 0.69	76.9 ± 0.87	81.9 ± 0.28	58.7 ± 0.66
平均回收率（%）	73.6 ± 0.87	78.8 ± 0.69	82.6 ± 0.34	56.7 ± 0.57

利用普通 C₁₈ 和 HLB 净化提取液，得到的黄霉素 A 回收率有一定的下降，无法充分地去去除杂质，且在洗脱过程中，因为饲料基质的复杂性，导致 SPE 柱经常堵塞，对实验结果的稳定性有一定的影响；Oasis PRiME HLB 能有效地将杂质保留在填料中，其通过筛板、填料以及制作工艺上的特殊设计，使样品经提取后直接过柱，不会造成目标物在洗脱过程中的损失，2 类基质的 3 种饲料的总体回收率上升了 2%，特别地，能将添加剂预混合饲料的回收率提升至将近 80%。同时，整个进化过程较为稳定，样品更加洁净，基质效应更小，相对标准偏差也更低；Amino-NH₂ 适合于极性化合物，弱阴离子交换萃取，但对于黄霉素 A 的保留结果也不理想，并且同样有较强的基质效应。因此，本试验选用 Oasis PRiME HLB 作为样品净化柱。

（3）提取前处理方法的确定

结合优化后的提取剂和净化条件，最终确定的前处理方法如下：称取试样

1-5 g (准确至 0.01 mg), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入 25 mL 0.1%甲酸甲醇, 涡旋振荡提取 5 min, 超声 5 分钟, 离心, 取上清液置于 50 mL 离心管中, 重复提取一次, 混匀 2 次上清液, 用 0.1%甲酸甲醇定容至 50.0 mL, 吸取 2 mL 上清液过 Oasis PRiME HLB 净化柱, 直接收集过滤液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 供液相色谱-串联质谱仪检测。

三、试验验证的分析、综述报告, 技术经济论证, 预期经济效益

需要说明的是, 验证部分中的线性相关系数, 线性方程, 回收率, 相对标准偏差均直接表示黄霉素含量的结果。

3.1 定量方法的选择

定量方法通常分为内标法和外标法, 其特点如下:

外标法: 又称标准曲线法, 依照测量黄霉素标准品所绘制的曲线来计量被测样品中黄霉素含量的方法。外标法适用于痕量组分的分析。外标法的优点: 简单, 适和大量样品分析。缺点: 每次色谱条件很难相同, 容易出现误差。这个方法的精确度, 在很大程度上取决于操作条件的控制。外标要求仪器重复性很严格, 适于大量的分析样品, 因为仪器随着使用会有所变化, 因此需要定期进行曲线校正。

内标法: 对于内标物的选择有一定的原则, 内标法一般用于基质添加。所以尽量选用外标法, 简单易行。内标法不要求样品里的所有组分都出峰, 只要内标物和所关注的组分出峰并分离好就可以了。

样品分析的操作条件, 必须严格控制于绘制校正曲线时的条件。当峰高对操作条件的敏感性以及对拖尾峰、柱子超负荷和检测器有大的响应时, 给出非线性的校正曲线, 此时峰面积计算常常可以得到更好的结果。不过, 对重叠峰, 难以准确的测量峰面积, 必须提高分离度才能达到预期的效果。

根据上述条件的优化(提取溶剂、净化条件)情况发现, 饲料基质中黄霉素

绝对回收率能够满足检测要求，同时，目前也没有相关天然/人工合成的黄霉素内标，因此本试验选择外标法定量。

3.2 基质效应

化学分析中，基质指的是样品中被分析物以外的组分，基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰。质谱检测是基于化合物离子化并通过特定的核质比来检测和定量，因此任何干扰待测物离子化的物质都可能影响检测方法的灵敏度和选择性。

基质效应是指在样品测试过程中，由待测物以外的其他物质的存在，直接或间接影响待测物响应的现象。基质效应主要是由质谱检测器的离子化过程产生的，在电喷雾时，基质内的组分与目标化合物共同流出喷雾针，对电荷产生竞争，它们将产生的雾滴牢牢吸在一起，改变了带电雾滴的表面张力，影响目标物的雾化、挥发、分裂、化学反应以及带电过程，致使进入质谱的离子减少或增加，从而影响定量分析的可靠性和准确性。基质效应可通过公式 $ME(\%) = \frac{\text{基质溶液中分析物峰面积}}{\text{纯溶剂中分析物峰面积}} \times 100\%$ ，来评价。ME 在 85%-115%之间一般认为不存在基质效应；当 ME 低于 85%时，则认为基质对目标化合物的响应产生抑制作用；当 ME 高于 115%时，则认为基质对目标化合物的响应存在增强作用。

由于饲料基质较为复杂，目标化合物经过净化后仍然会有基质效应存在，需对其影响进行评估。在此步骤中分别研究了不同空白基质中添加 100 $\mu\text{g/kg}$ (4LOQ, n=4) 黄霉素标样的检测结果。畜添加剂预混合饲料（牛）的平均基质效应 ME 为 78.6%、畜浓缩饲料（牛）的平均基质效应 ME 为 86.4%、畜精料配合饲料（牛）的平均基质效应 ME 为 73.2%、禽添加剂预混合饲料（鸡）的平均基质效应 ME 为 80.6%、禽浓缩饲料（鸡）的平均基质效应 ME 为 76.8%、禽精料配合饲料（鸡）的平均基质效应 ME 为 75.1%。

结果显示基质对目标物质检测有一定抑制作用，除了畜浓缩饲料，其余 ME 值均低于 80%。为了降低基质效应对质谱灵敏度和重复性产生的影响，提升检测结果的准确性，实验需要采用基质匹配标准曲线来确定各项方法学参数。

表 9. 不种饲料的基质效应结果 (n=6,4LOQ)

基质	(畜-牛) 预混合饲料	(畜-牛) 浓缩饲料	(畜-牛) 精料配合料	(禽-鸡) 预混合饲料	(禽-鸡) 浓缩饲料	(禽-鸡) 精料配合料
基质效应 ME (%)	78.6 ± 2.3	86.4 ± 1.7	73.2 ± 3.2	80.6 ± 2.0	76.8 ± 2.6	75.1 ± 4.3

3.3 标准溶液稳定性的考察

在黄霉素溶液浓度足够高的情况下，考虑到高效液相色谱的稳定性和精确性都相对于液相色谱-串联质谱更合适，标准储备溶液和标准中间溶液稳定性的考察由高效液相色谱系统进行测定。

3.3.1 标准储备溶液的稳定性试验

根据以上确定的色谱条件，取配制好的黄霉素标准储备溶液 (1 mg/mL)，分别在刚配制完、3 个月、6 个月时取出。每次试验时，分别精确吸取黄霉素标准储备溶液适量，逐级稀释配置成 10 µg/mL 的标准溶液，由高效液相色谱测定，平行测定 6 次，峰面积的相对标准偏差 (RSD) 均小于 10%。试验结果表明，标准储备溶液在-18℃下保存 6 个月是稳定的，见表 10。

表 10. 标准储备溶液稳定性试验结果

时间 (月)	0	3	6	RSD(%)
平均峰面积	4223557	4092259	4071866	1.99

3.3.2 标准中间溶液的稳定性试验

取配制好的标准中间溶液（10 µg/mL），分别在刚配制完、1周、3周时取出，考察其稳定性。每次试验时，分别精确吸取黄霉素标准储备溶液适量，由高效液相色谱测定，平行测定6次，峰面积的相对标准偏差（RSD）均小于10%。试验结果表明，标准中间溶液在-18℃下保存3个月是稳定的，见表11。

表 11.标准中间溶液稳定性试验结果（n=6）

时间（周）	0	1	3	RSD(%)
平均峰面积	4122289	3785555	4026670	4.36

3.4 线性范围

取空白样品，按前处理得到空白基质溶液，取标准中间溶液适量，用空白基质溶液稀释，配制质量浓度分别为10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL和1000 ng/mL的基质匹配标准系列溶液。

在线性范围10.0-1000.0 ng/mL范围内，（畜用）添加剂预混合饲料的 r^2 为0.9943、（畜用）浓缩饲料的 r^2 为0.9996、（畜用）配合饲料的 r^2 为0.9925、（禽）添加剂预混合饲料的 r^2 为0.9992、（禽用）浓缩饲料的 r^2 为0.9967、（禽用）配合饲料的 r^2 为0.9950。其中，（禽用）浓缩饲料中黄霉素的计算线性方程、线性范围及相关系数的结果见表12和图16。

表 12（禽用）浓缩饲料中黄霉素的线性方程、线性范围、相关系数

化合物	线性方程	线性范围/（ng/mL）	r^2
黄霉素	$Y = 422.895X + 197.781$	10.0-1000.0	0.9996

Compound name: HMS
Correlation coefficient: $r = 0.999849$, $r^2 = 0.999698$
Calibration curve: $422.895 * x + 197.781$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: $1/x$, Axis trans: None

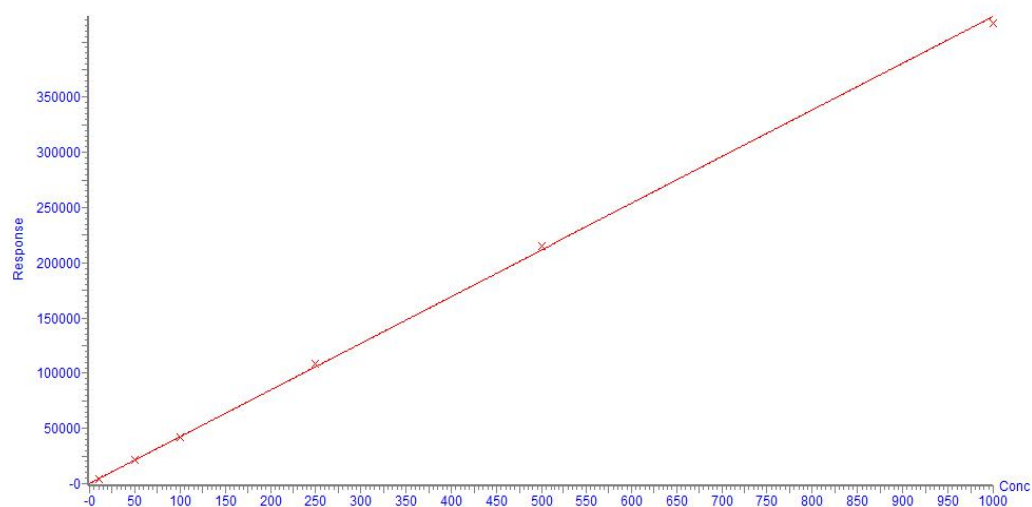


图 16 黄霉基质匹配工作曲线

3.5 检出限和定量限

饲料基质复杂，因此，本试验选择畜用（牛）、禽用（鸡）2 类基质（添加剂预混合饲料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料）各 4 种饲料作为考察对象。在上述空白饲料中添加一定浓度的黄霉素对照品，按照本标准进行试验。依据信号与噪声比例，即 $s/n \geq 3$ 的浓度为检出限， $s/n \geq 10$ 的浓度为定量限的原则，确定了本方法的检出限为 0.1mg/kg，定量限为 0.25mg/kg。结果见图 17-图 22。

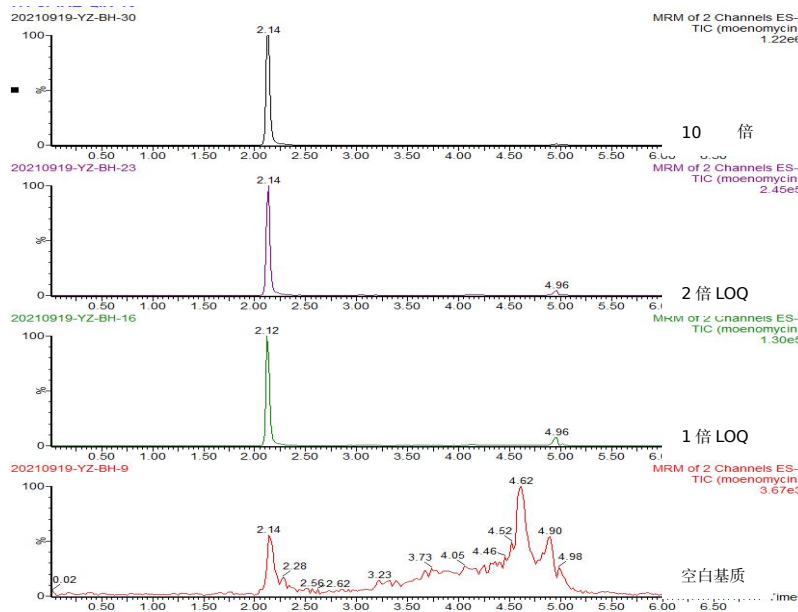


图 17（畜-牛）添加剂预混合饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

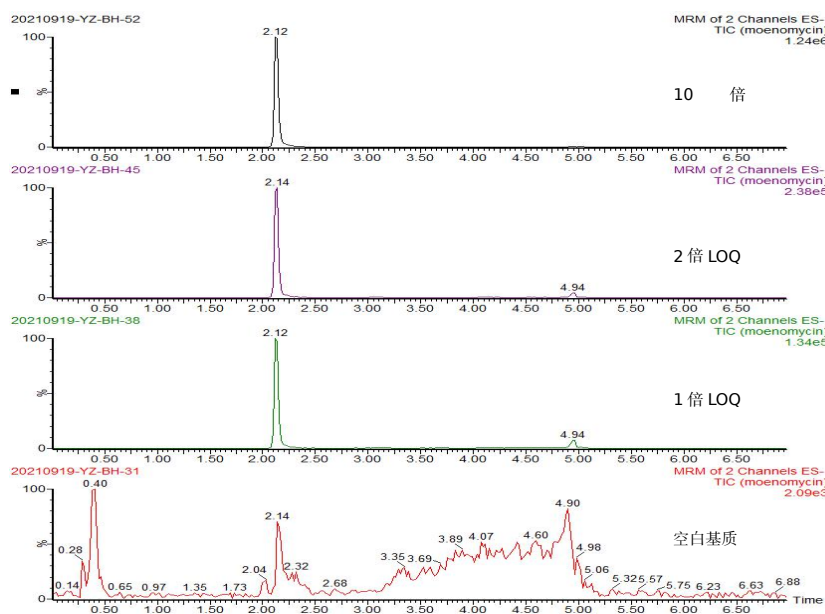


图 18 (畜-牛) 浓缩饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

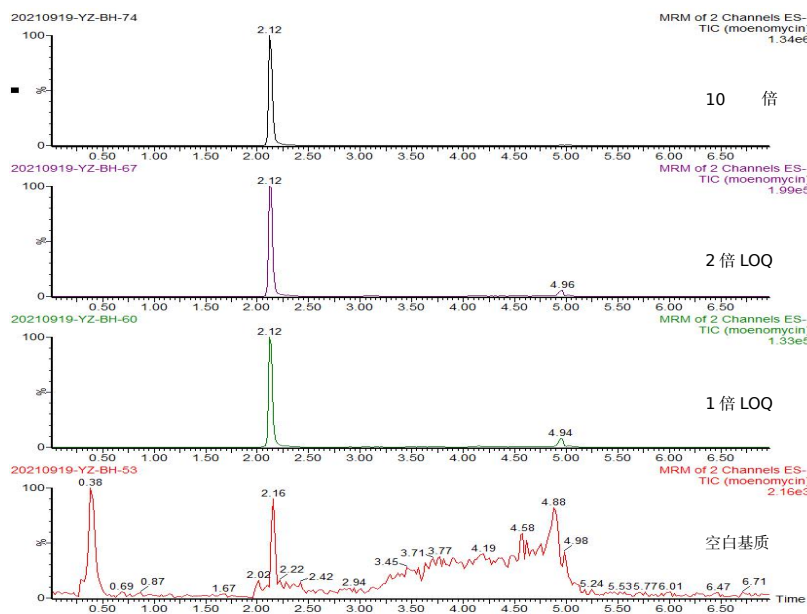


图 19 (畜-牛) 配合饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

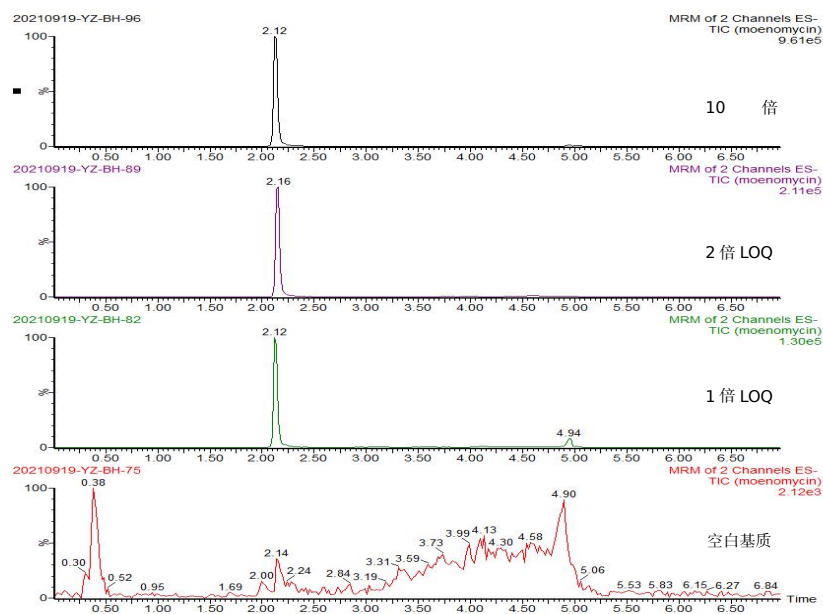


图 20 (禽-鸡) 添加剂预混合饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

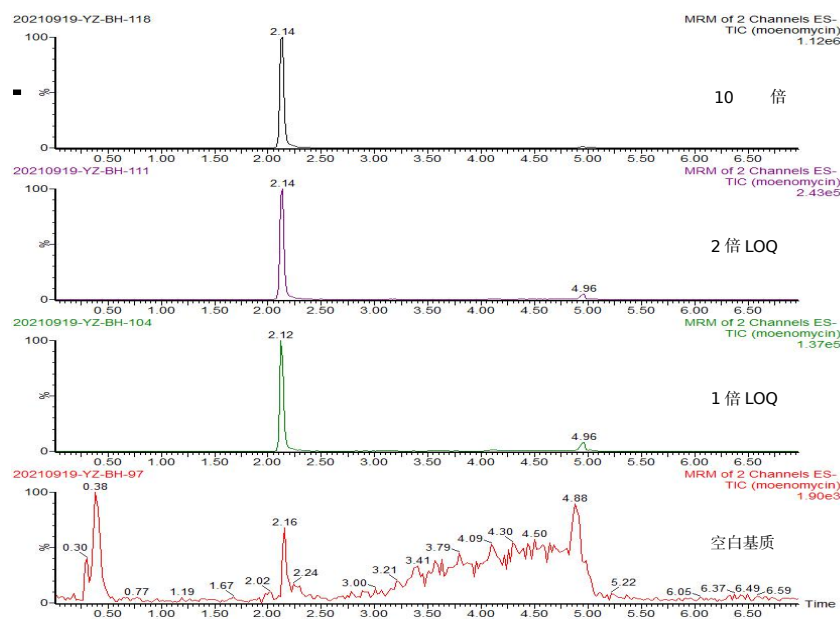


图 21（禽用）浓缩饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

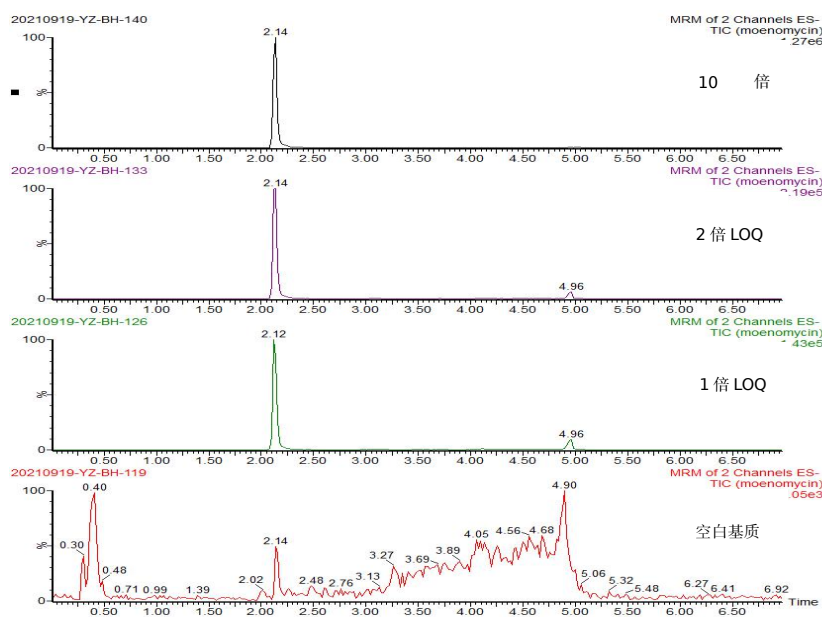


图 22（禽用）配合饲料色谱图

I. 空白基质, II. 1 倍定量限加标, III. 2 倍定量限加标, IV. 10 倍定量限加标

3.6 方法准确度及精密度考察

选取各空白饲料样品进行加标回收率及精密度实验，样品分别添加低、中、高 3 个浓度的标准溶液，每个浓度平行测定 7 次，计算平均回收率及相对标准偏差(RSD)，测定结果见表 13-表 20。黄霉素批内回收率在 70.23%—88.80% 之间，RSD 在 1.02%—2.93% 之间，批间回收率在 70.09%—88.60% 之间，RSD 在 0.96%—3.38% 之间。方法的回收率及精密度均符合 GB/T 23182-2008《饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》要求。

表 13 牛预混合饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回收率/%	RSD/%
批内	0.25	71.06	72.15	73.28	74.01	71.48	70.28	72.58	72.12	1.29
	0.50	78.21	77.17	77.86	78.08	80.25	80.31	78.6	78.64	1.20
	2.50	78.22	79.56	81.25	80.71	79.2	77.69	78.29	79.27	1.33
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	72.12	68.84	69.01	70.37				70.09	1.52
	0.50	78.64	77.26	77.06	79.56				78.13	1.18
	2.50	79.27	81.48	79.62	81.63				80.50	1.23

表 14 牛浓缩饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

牛浓缩饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回收率/%	RSD/%
批内	0.25	80.28	78.22	78.27	79.65	78.21	78.1	81.61	79.19	1.37
	0.50	84.22	79.08	81.96	83.61	79.68	83.79	84.01	82.34	2.16
	2.50	88.89	89.01	91.06	89.63	88.67	88.24	86.11	88.80	1.50
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	79.19	81.25	77.97	78.06				79.12	1.53
	0.50	82.39	81.98	79.39	82.89				81.66	1.56
	2.50	88.8	88.32	89.84	87.43				88.60	1.00

表 15 牛配合饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

牛配合 饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	67.91	71.83	68.29	72.54	71.76	70.41	68.98	70.25	1.87
	0.50	72.22	72.93	71.87	74.25	73.11	73.68	70.72	72.68	1.18
	2.50	82.55	79.38	82.72	82.31	82.69	83.22	85.19	82.58	1.71
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	70.25	71.63	73.38	69.82				71.27	1.60
	0.50	72.61	66.22	72.52	67.39				69.69	3.36
	2.50	82.58	78.78	79.13	81.06				80.39	1.77

表 16 牛精料补充料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

牛精料 补充料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	72.39	72.41	69.65	71.12	75.7	69.49	74.71	72.21	2.37
	0.50	74.08	75.33	72.87	75.29	78.19	79.08	72.76	75.37	2.46
	2.50	75.34	76.76	71.37	76.21	75.34	73.07	77.54	75.09	2.16
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	72.21	75.87	77.85	73.84				74.94	2.45
	0.50	75.37	78.34	79.49	75.59				77.20	2.04
	2.50	75.09	79.86	75.13	79.07				77.29	2.54

表 17 鸡预混合饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

鸡精料 补充料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	70.27	73.68	70.97	73.08	72.61	68.98	69.29	71.27	1.88
	0.50	70.28	71.51	73.78	68.85	72.21	70.98	73.07	71.53	1.68
	2.50	78.29	76.65	79.98	75.67	74.16	76.82	72.71	76.33	2.44
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	71.27	67.89	72.33	69.26				70.19	1.99
	0.50	71.53	74.82	76.33	73.73				74.10	2.02

	2.50	76.33	81.08	81.17	78.63				79.30	2.30
--	------	-------	-------	-------	-------	--	--	--	-------	------

表 18 鸡浓缩饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

鸡浓酸 饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	67.29	71.07	68.61	71.43	71.04	70.14	72.03	70.23	1.70
	0.50	72.98	74.73	69.76	74.76	70.66	71.09	72.56	72.36	1.96
	2.50	77.89	83.78	78.9	81.17	79.87	82.11	78.23	80.28	2.17
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	70.23	74.54	70.79	73.55				72.28	2.09
	0.50	72.36	76.05	75.66	73.19				74.32	1.82
	2.50	80.28	83.97	85.89	83.25				83.35	2.33

表 19 鸡配合饲料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

鸡配合 饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	72.01	71.88	69.82	67.27	72.19	74.69	70.88	71.25	2.30
	0.50	75.41	75.57	73.87	71.65	76.91	69.65	76.73	74.26	2.72
	2.50	79.01	78.21	75.33	78.56	76.24	81.71	79.21	78.32	2.09
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	71.25	74.61	75.27	71.17				73.08	2.17
	0.50	74.26	75.12	77.36	72.05				74.70	2.20
	2.50	78.32	83.61	80.83	81.43				81.05	2.18

表 20 鸡精料补充料基质的加标回收率和相对标准偏差 ($n_{\text{批内}}=7$, $n_{\text{批间}}=4$)

鸡精料 补充料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	数据 7	平均值回 收率/%	RSD/%
批内	0.25	75.8	76.25	73.19	70.98	78.19	72.99	72.19	74.23	2.57
	0.50	81.87	80.91	84.38	83.76	78.26	80.62	78.78	81.23	2.31
	2.50	77.21	74.23	75.49	80.78	80.23	76.08	79.17	77.60	2.51
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周					
	0.25	74.23	75.44	71.46	70.77				72.98	2.22

	0.50	81.23	78.79	82.01	77.37				79.85	2.15
	2.50	77.60	80.38	79.24	75.83				78.26	1.98

3.7 基质加标标准溶液的稳定性

将制备好的 100 ng/mL 黄霉素单点基质匹配标准溶液在 12 小时内连续进样，结果显示黄霉素稳定性较好，峰面积的相对标准偏差（RSD）均小于 10%。结果详见表 21-表 26。

表 21 牛添加剂预混合饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	40234	41514	40258	41986	40028	40804	2.04

表 22 牛浓缩饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	42254	42135	43254	44254	42554	42890	2.16

表 23 牛配合饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	41558	40234	40521	39864	39256	40286	2.11

表 24 鸡添加剂预混合饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)

黄霉素	38956	36882	40572	38969	40271	39130	3.72
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

表 25 鸡浓缩饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	41125	43736	42552	42317	42028	42351	2.22

表 26 鸡配合饲料基质匹配标准溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	44214	42580	42097	42303	44417	43122	2.56

3.8 样品溶液的稳定性

将制备好的加标样品溶液（2 倍定量限加标水平样品），在 12 小时内连续进样测定，结果显示试液基质中黄霉素的稳定性较好，峰面积的相对标准偏差（RSD）均小于 10%。结果详见表 27 ~ 表 32。

表 27 牛添加剂预混合饲料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	20023	21265	20250	22514	19962	20802	5.24

表 28 牛浓缩饲料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	22108	21254	22365	21043	20996	21553	2.96

表 29 牛配合饲料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	19865	19952	20357	18254	19936	19672	4.14

表 30 鸡预混料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	20344	18767	19255	19973	20200	19707	3.41

表 31 鸡浓缩料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	21125	19688	20313	19868	20551	20309	2.81

表 32 鸡配合精料试样溶液稳定性结果表

化合物	峰面积						
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	平均	RSD(%)
黄霉素	19638	18052	19668	18336	18219	18782	4.26

3.9 试验技术的最终确认

Alta Scientific Co., Ltd, China 对黄霉素提纯工艺进行了不断的优化和改进, 并于 2022 年 2 月生产出了黄霉素 A 标准品(CAS: 76095-39-1, purity $\geq$ 97.2%)。因此, 试验配制了黄霉素 A(100ng/mL)的标准溶液单点校准定量同浓度的黄霉素混合物标准品(CAS: 11015-37-5, purity $\geq$ 96.2%)。基于面积归

一化法得出的结果，黄霉素混标中黄霉素 A 的理论浓度应为 86.4ng/mL，实际测得黄霉素混标中黄霉素 A 的平均浓度为 84.8 ng/mL，RSD 为 1.32%，实际检测结果较为理想(见表 33)。同时，试验还配制了黄霉素 A(100ng/mL)的基质匹配标准溶液单点校准定量 2LOQ 的（备用）浓缩饲料的回收率，实际测得回收率为 83.78 %，原来黄霉素混标定量 2LOQ 的（备用）浓缩饲料回收率为 82.34%，RSD 为 1.23 %。实际检测结果较为理想(见表 34)，2 项对比试验结果的误差符合《GB/T23182-2008》相关标准的要求。再次确认了该高效液相色谱-串联质谱可以用来精确测定饲料基质中黄霉素的含量。

表 33 黄霉素 A 标准品(100ng/mL)定量黄霉素混标的浓度（n=6）

被测目标物	理论浓度(ng/mL)	实际测得浓度 (ng/mL)	RSD(%)
黄霉素混标	86.4	84.8	1.32

注：黄霉素混标(CAS: 11015-37-5，母标配制时间为 86 天)；黄霉素 A(CAS: 76095-39-1，母标配制现配现用)。
配置储备液时已经折算了各自的纯度。

表 34 两种黄霉素标准溶液校准 2LOQ 加标回收率比较（n=6）

被测目标物	黄霉素混标	黄霉素 A 标准溶液	RSD(%)
回收率 (%)	82.34	83.78	1.23

注：黄霉素混标(CAS: 11015-37-5，母标配制时间为 86 天)；黄霉素 A(CAS: 76095-39-1，母标配制现配现用)。
配置储备液时已经折算了各自的纯度。

3.10 验证单位试验结果

我单位委托上海海关动植物食品中心、上海市疾病预防控制中心、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 3 家单位对标准方法的线性与范围、

检出限与定量限、准确度与精密度进行验证确认，验证结果符合相关标准要求，表明方法可行。

3.11 综述报告

经上述方法学验证，由面积归一化法得出黄霉素主要活性成分黄霉素 A 的占比为 86.4%，相对标准表差为 1.8%。实验数据较十分稳定，可以用黄霉素 A 确定黄霉素的残留量。同时，黄霉素 A 在液相色谱-串联质谱法测定下的线性范围为 10-1000 ng/mL，线性相关性良好，不同基质的线性相关系数均大于 0.9900。在不同饲料样品中的最低检出限为 0.1 mg/kg，定量限为 0.25 mg/kg。

因此，最终检测畜用、禽用 2 类基质各 4 种饲料（添加剂预混合饲料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料）中黄霉素批内回收率在 70.23%—88.80%之间，RSD 在 1.02%—2.91%之间，批间回收率在 70.09%—88.60%之间，RSD 在 0.96%—3.38%之间。实验结果符合《GB/T23182-2008》相关标准要求。本方法适用于畜禽添加剂预混合饲料，配合饲料，浓缩饲料和精料补充料中黄霉素的测定。

3.12 技术经济论证

无。

3.13 预期经济效果

本标准制定有助于强化监管饲料中黄霉素的违规使用，直接保证了畜禽产品

的安全，保障了人民的健康。同时，本标准制定还为饲料生产者提供技术服务，保障其生产饲料符合要求，避免因不达标遭受损失，提高生产者的经济效益。

四、采用国际标准

无。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

无。

六、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系

在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。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集调研了国内外相关信息资料，组织主要生产企业技术专家对标准内容的制定，进行了详细研讨，并达成统一制定方案。无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

未涉及专利。

九、贯彻标准的要求，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

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秘书处及时组织标准宣贯、培训。

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] 《DB 32/T 1279-2008 饲料和饲料添加剂中黄霉素 A 的测定——高效液相色谱法》
- [2] 《DB 34/T 1358-2011 饲料中黄霉素的测定——高效液相色谱法》
- [3] 杨秀玉, 吴好庭, 张秀英. 高效液相色谱法检查不同厂家黄霉素中黄霉素 A 的相对量[J]. 中国兽药杂志, 2003,37(12):22-24.
- [4] 许辉, 张鸿伟, 王凤美,等. 液相色谱-串联质谱快速检测禽类组织中黄霉素 A 残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(12):3784-3789.
- [5]李金强, 曹鹏, 尹大路,等. 液相色谱串联质谱测定畜禽肉中黄霉素 A 的残留量[J]. 分析试验室, 2013(01):95-98.
- [6]S Pérez, Mcjury B E , Eichhorn P , et al. Determination of the antimicrobial growth promoter moenomycin-A in chicken litter[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1175(2):234-241.

附件

附件 1 验证报告

附件 2 定向征求意见处理汇总表

附件 3 预审专家签字表

附件 4 农业行业标准《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法》（预
审稿）审查意见

附件 1 验证报告

上海海关动植物食品中心验证报告

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中黄霉素的测定
液相色谱-串联质谱法》

验 证 报 告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院

验证单位：上海海关动植物食品中心



验证时间：2022 年 1 月 20 日至 2022 年 1 月 30 日

验证报告

电离电压：3.0 kV；

源温度：150 °C。

多反应监测（MRM）离子对，锥孔电压及碰撞能量见表2。

表2 黄霉素的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
黄霉素	789.9 > 553.9	25	30
	789.9 > 575.9*	25	25

*为定量离子。

二、验证的内容与结果

1. 标准曲线

将黄霉素标准溶液用甲醇逐级稀释成浓度为1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL 的标准系列溶液，称取与试样基质相应的阴性样品 5.0 g，分别加入标准系列溶液 0.5 mL，按照标准文本中的试样同时进行提取和净化处理，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 3。

表3 黄霉素标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	10	50	100	250	500	1000
峰面积	687	2856	7565	15006	38141	76344
线性相关系数 r^2	0.9998					
线性方程	$Y=76.65X-281.36$					

从表 1 和图 1 中可以看出：在 1ng/mL~1000g/mL 范围内，黄霉素标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 ≥ 0.9990 ，能够满足检测分析的要求。

雾化器温度：550 °C；

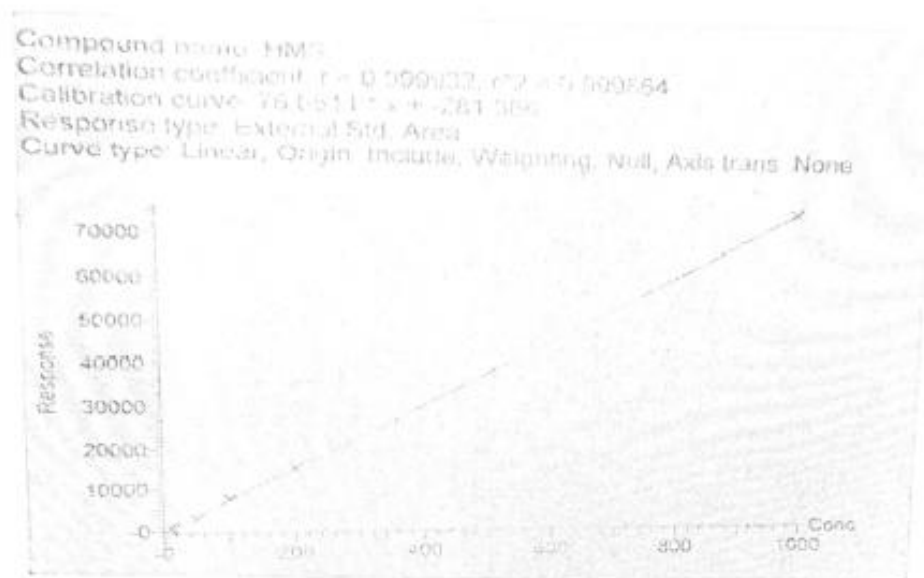


图1 黄霉素标准曲线图

2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 5.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.25mg/kg)，经提取后测定，黄霉素的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将黄霉素的检测限定为 0.1mg/kg，定量限定为 0.25mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 2~图 14。

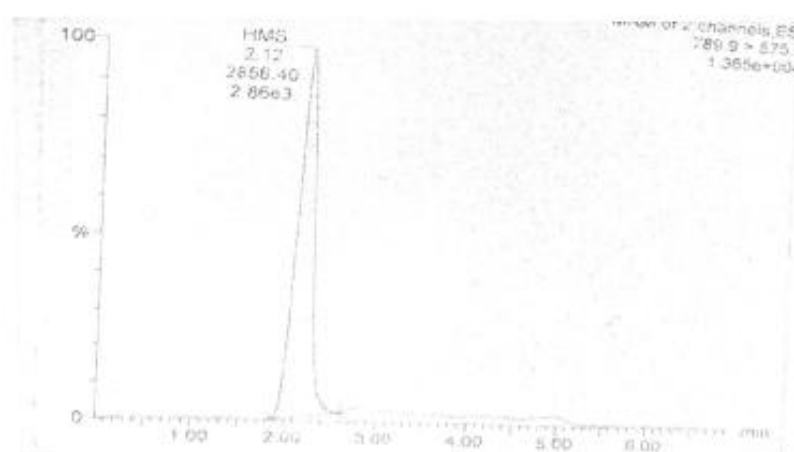


图2 黄霉素标准溶液色谱图（浓度为 50ng/mL）

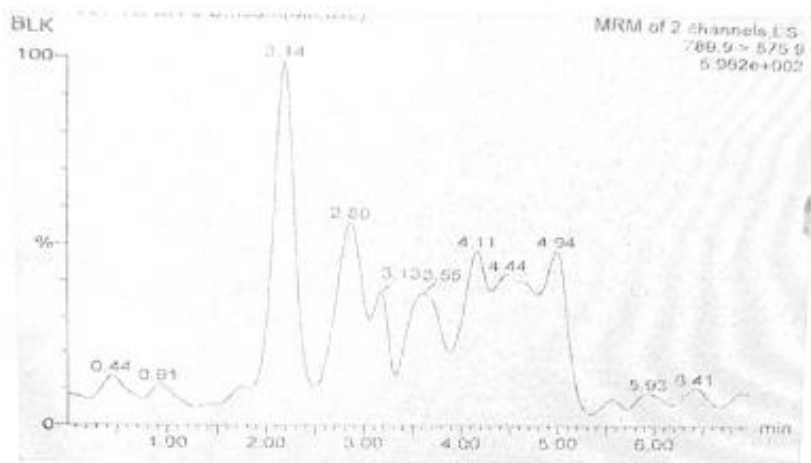


图3 鸡预混饲料空白色谱图

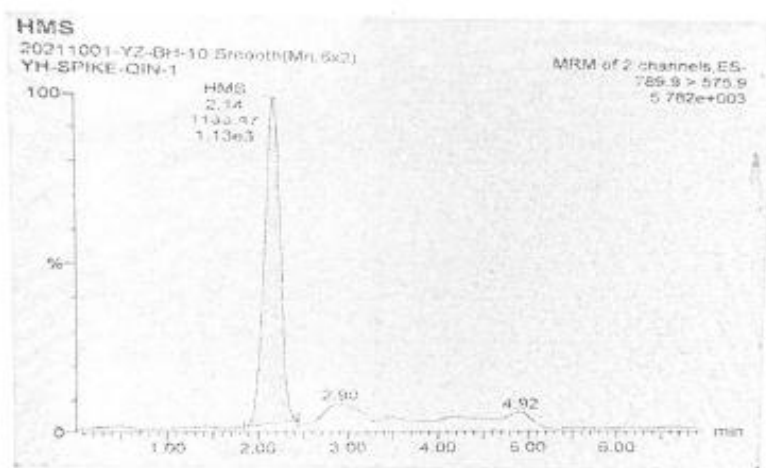


图4 鸡预混饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

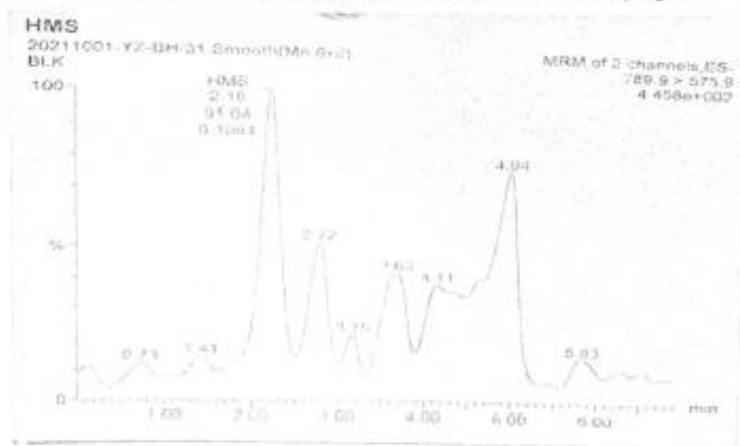


图5 鸡浓缩饲料空白色谱图

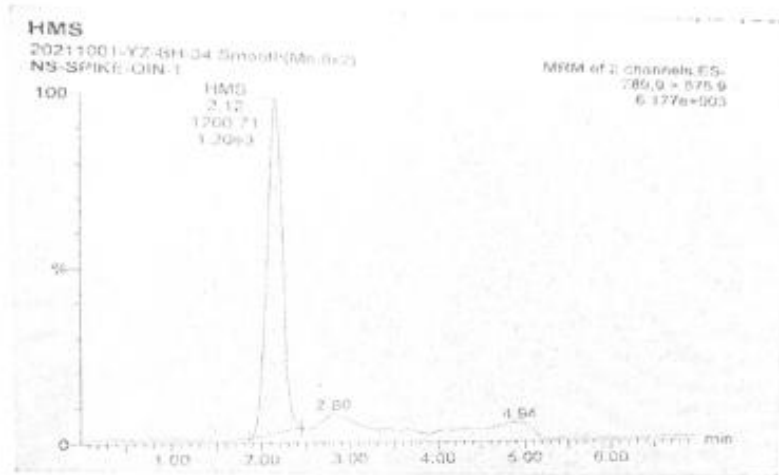


图6 鸡浓缩饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

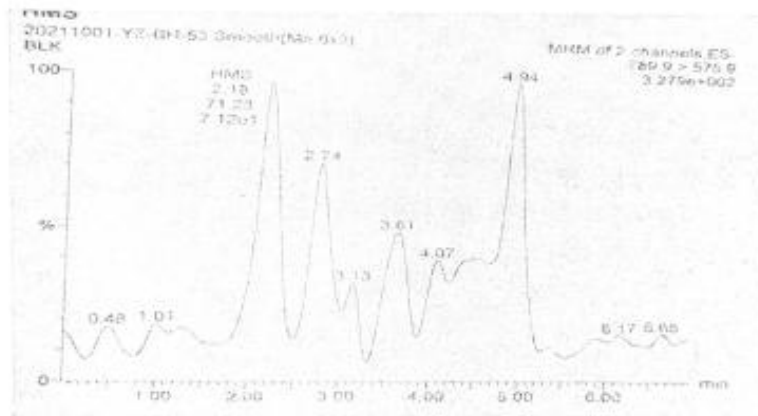


图7 鸡配合饲料空白色谱图

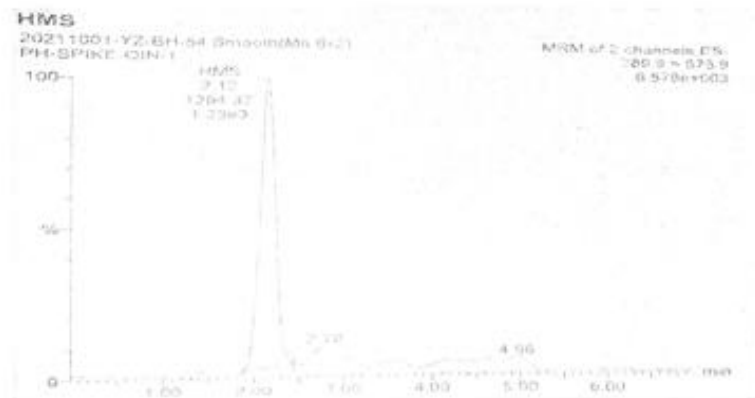


图8 鸡配合饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

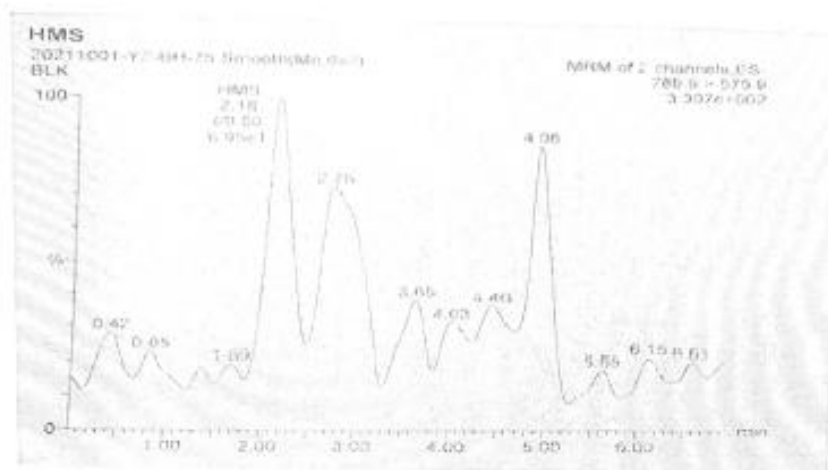


图 9 猪预混饲料空白色谱图

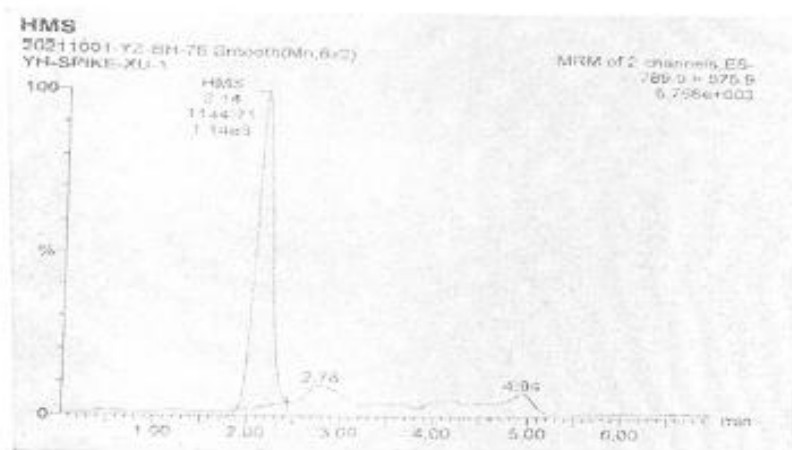


图 10 猪预混饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

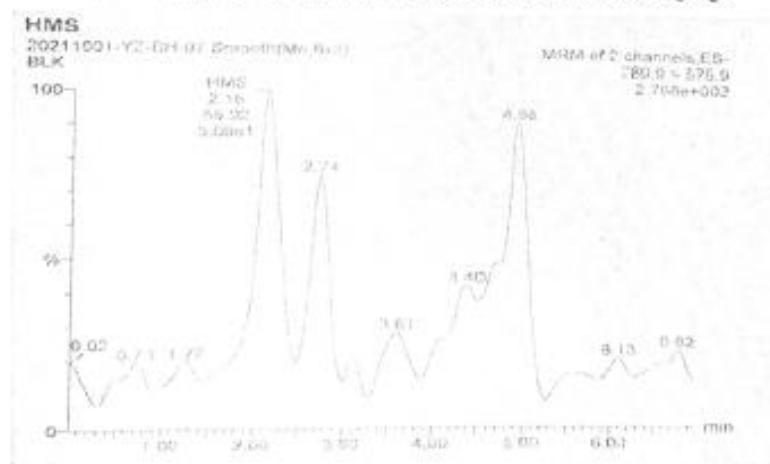


图 11 猪浓缩饲料空白色谱图

3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的黄霉素，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 4-表 5。

表 4 回收率实验结果（n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率（%）						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	0.25	75.0	81.6	78.3	74.8	78.5	74.4	77.1
	0.50	90.0	86.2	88.1	84.7	87.3	82.5	86.5
	2.50	78.1	77.5	74.7	73.3	74.2	76.0	75.7
鸡浓缩饲料	0.25	86.0	79.5	78.0	80.5	82.7	79.7	81.1
	0.50	81.1	79.8	83.2	81.3	84.9	81.6	82.0
	2.50	88.3	90.6	88.2	89.3	85.1	84.4	87.6
鸡配合饲料	0.25	73.8	75.3	70.1	70.6	72.0	71.2	72.2
	0.50	80.0	81.2	79.1	79.4	77.8	78.2	79.3
	2.50	72.1	72.5	74.7	75.7	72.6	74.0	73.6
猪预混饲料	0.25	74.7	76.0	72.0	71.2	74.1	73.3	73.6
	0.50	84.9	87.3	85.3	84.2	86.5	83.3	85.3
	2.50	72.5	76.3	74.6	74.5	72.9	74.5	74.2
猪浓缩饲料	0.25	82.2	79.9	84.0	79.5	79.4	81.3	81.0
	0.50	82.3	83.9	88.8	84.9	87.2	86.1	85.5
	2.50	91.3	92.5	91.3	87.9	89.9	89.4	90.4
猪配合饲料	0.25	75.4	73.9	73.9	71.4	71.3	72.8	73.1
	0.50	77.2	80.9	79.1	80.3	83.3	79.3	80.0
	2.50	82.1	85.0	85.4	84.4	83.7	81.7	83.7

表 5 精密度实验结果（n=6）

样品类型	测定结果（mg/kg）							CV 值 （%）
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	0.188	0.204	0.196	0.187	0.196	0.186	0.193	3.67

	0.450	0.431	0.441	0.423	0.436	0.413	0.432	3.04
	1.95	1.94	1.87	1.83	1.86	1.90	1.89	2.50
鸡浓缩饲料	0.215	0.199	0.195	0.201	0.207	0.199	0.203	3.54
	0.405	0.399	0.416	0.406	0.424	0.408	0.410	2.71
	2.21	2.27	2.20	2.23	2.13	2.11	2.19	2.76
鸡配合饲料	0.185	0.188	0.175	0.176	0.180	0.178	0.180	4.03
	0.400	0.406	0.395	0.397	0.389	0.391	0.396	1.56
	1.80	1.81	1.87	1.89	1.81	1.85	1.84	1.93
猪浓缩饲料	0.187	0.190	0.180	0.178	0.185	0.183	0.184	2.39
	0.425	0.436	0.427	0.421	0.432	0.417	0.426	1.71
	1.81	1.91	1.86	1.86	1.82	1.86	1.86	1.84
猪配合饲料	0.205	0.200	0.210	0.199	0.198	0.203	0.203	2.26
	0.411	0.419	0.444	0.425	0.436	0.430	0.428	2.75
	2.28	2.31	2.28	2.20	2.25	2.24	2.26	1.82
猪配合饲料	0.189	0.185	0.185	0.178	0.178	0.182	0.183	2.20
	0.386	0.405	0.396	0.402	0.417	0.396	0.400	2.56
	2.05	2.12	2.14	2.11	2.09	2.04	2.09	1.82

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

三、验证结论

“上海海关动植物食品中心”对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿，从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察，结果表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法在 10 ng/mL-1000 ng/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中黄霉素的检测方法推广使用。

验证单位：上海海关动植物食品中心

验证人：



中华人民共和国农业行业标准

《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》

验 证 报 告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院

验证单位：上海市疾病预防控制中心

验证时间： 2022 年 1 月 20 日至 2022 年 2 月 13 日

验证报告

受上海市质量监督检验技术研究院委托，我单位根据其提供的《饲料中黄霉素的测定》标准征求意见稿，对标准的技术指标进行了验证。

一、验证的方法及材料

1. 验证的方法

《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》标准征求意见稿及编制说明。

2. 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

3. 仪器设备品牌及型号

高效液相色谱-串联质谱仪 Waters TQ-XS

4. 液相色谱-串联质谱条件

4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：ACQUITY Atlantis T₃柱，100 mm × 2.1 mm，3 μm；

柱温：35℃；

进样量：10 μL；

流动相：A：20mmol/L 乙酸铵（pH 5）， B：乙腈，梯度洗脱程序见表1；

流速：0.4 mL/min。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
1.10	5	95
4.00	5	95
4.10	90	10
8.00	90	10

4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

脱溶剂气流速：1000 L/Hr；

反吹气流速：150 L/H；

雾化器温度：550 ℃；

电离电压：3.0 kV；

源温度：150 ℃。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表2。

表2 黄霉素的多反应监测（MRM）离子对，锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
黄霉素	789.9 > 553.9	25	30
	789.9 > 575.9*	25	25

*为定量离子。

二、验证的内容与结果

1. 标准曲线

将黄霉素标准溶液用甲醇逐级稀释成浓度为1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL的标准系列溶液，称取与试样基质相应的阴性样品5.0 g，分别加入标准系列溶液0.5 mL，按照标准文本中的试样同时进行提取和净化处理，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表3。

表3 黄霉素标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	10	50	100	250	500	1000
峰面积	2783	12980	26322	64814	125902	246926
线性相关系数 r^2	0.9998					
线性方程	$Y=246.899X+1164.82$					

从表1和图1中可以看出：在1ng/mL~1000ng/mL范围内，黄霉素标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 ≥ 0.9990 ，能够满足检测分析的要求。

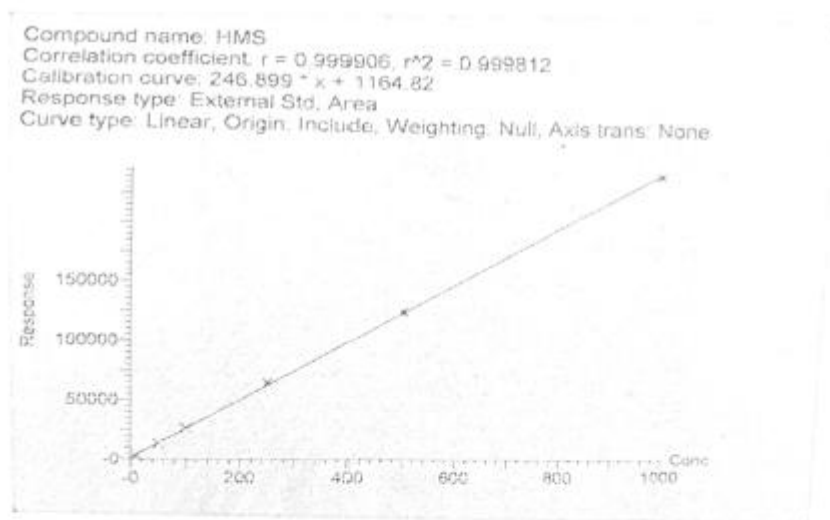


图1 黄霉素标准曲线图

2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 5.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.25mg/kg)，经提取后测定，黄霉素的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将黄霉素的检测限定为 0.1mg/kg，定量限定为 0.25mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 2~图 14。

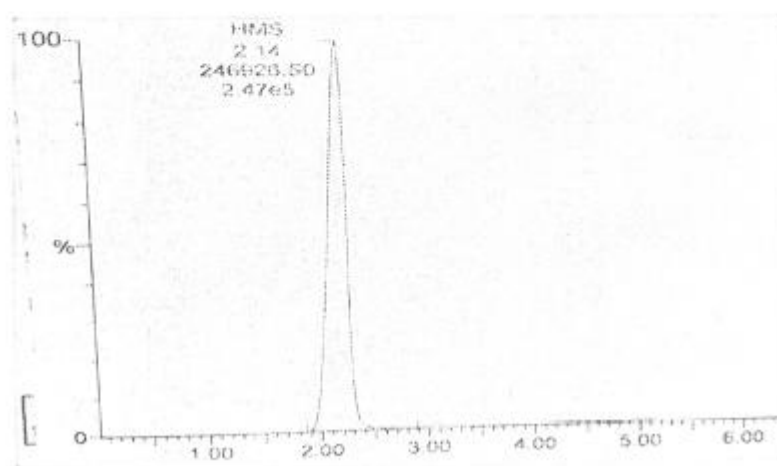


图2 黄霉素标准溶液色谱图（浓度为 50ng/mL）

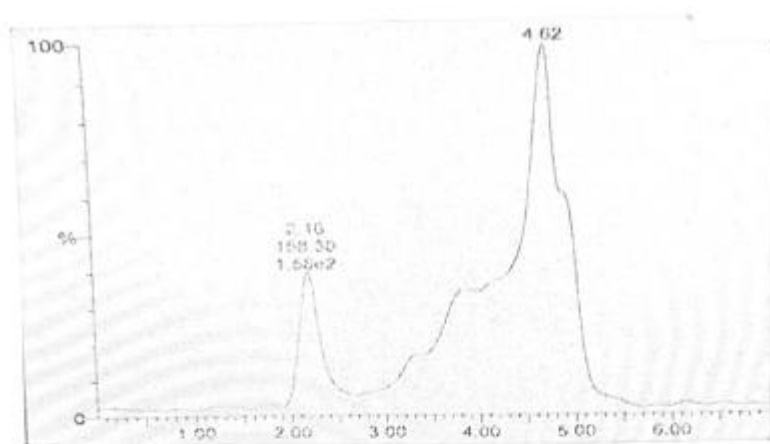


图3 鸡预混饲料空白色谱图

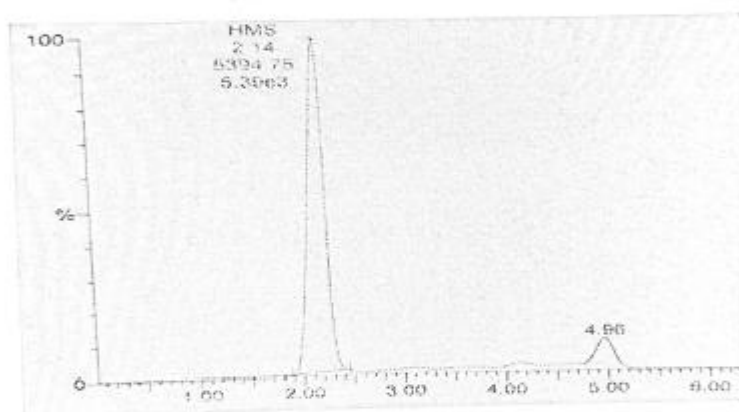


图4 鸡预混饲料添加黄霉素定量限色谱图(0.25mg/kg)

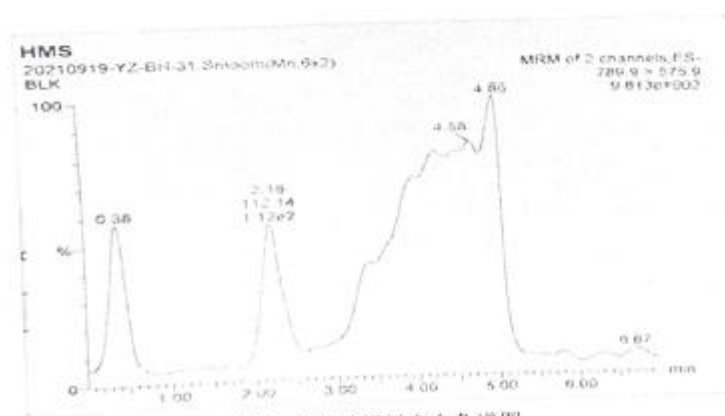


图5 鸡浓缩饲料空白色谱图

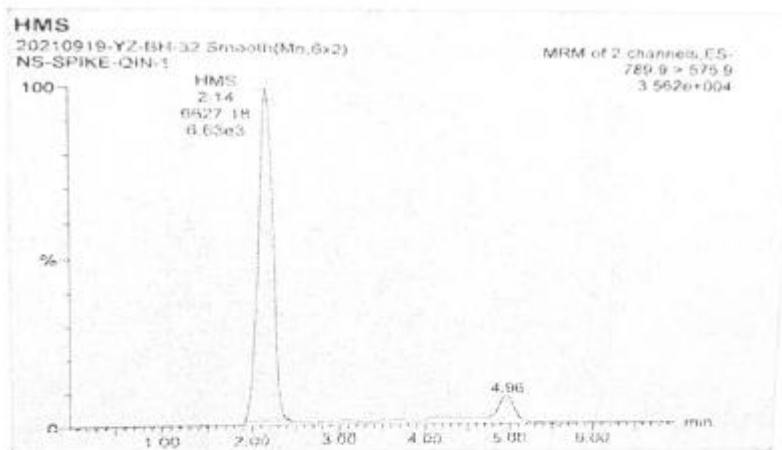


图6 鸡浓缩饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

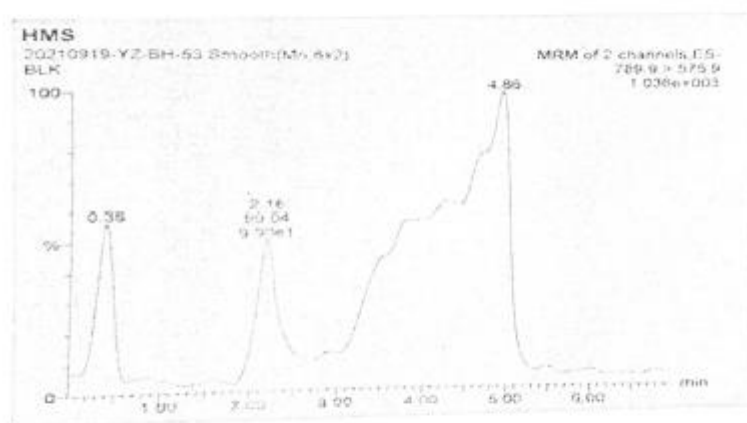


图7 鸡配合饲料空白色谱图

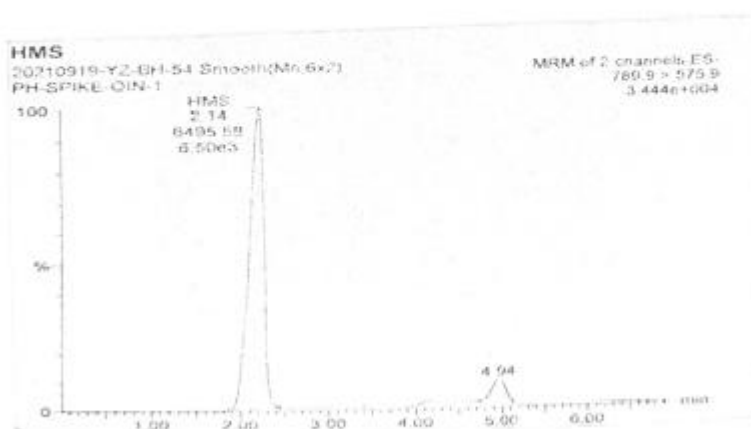


图8 鸡配合饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

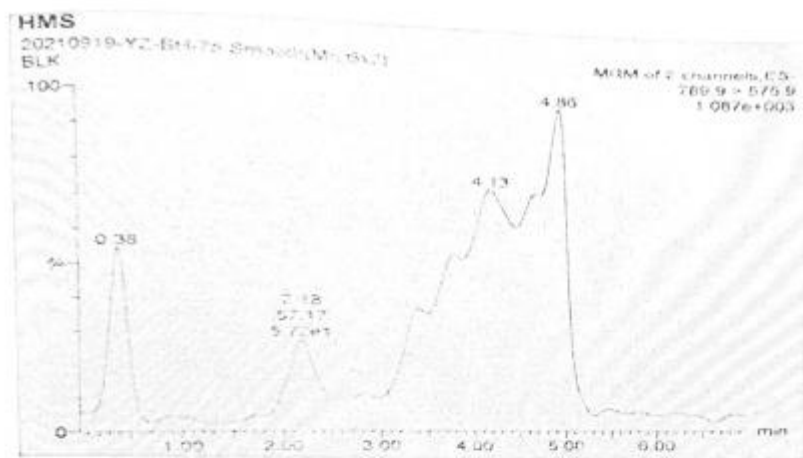


图9 猪预混饲料空白色谱图

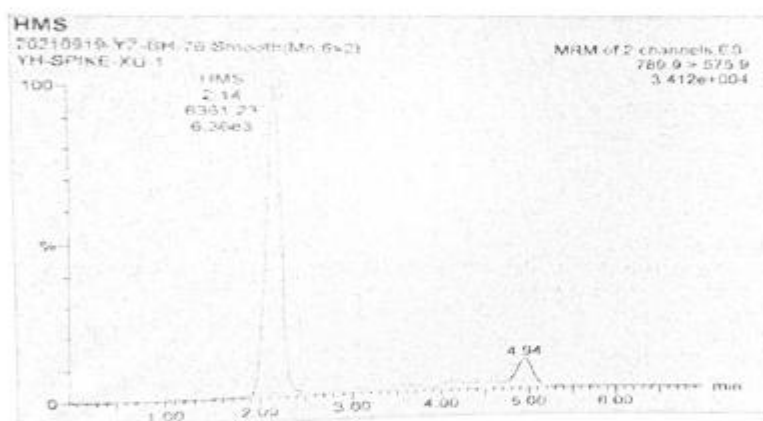


图10 猪预混饲料添加黄霉素定量限色谱图(0.25mg/kg)

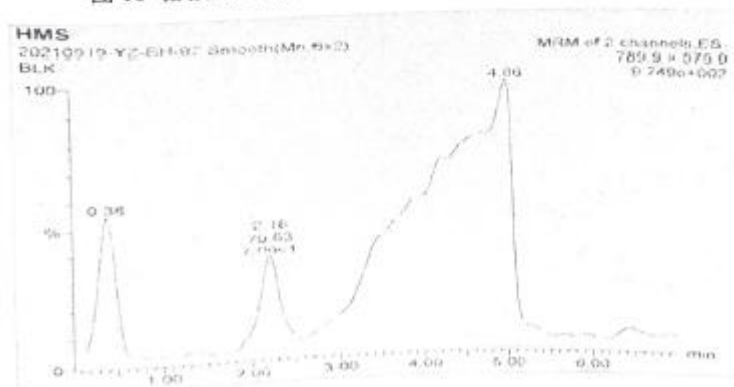


图11 猪浓缩饲料空白色谱图

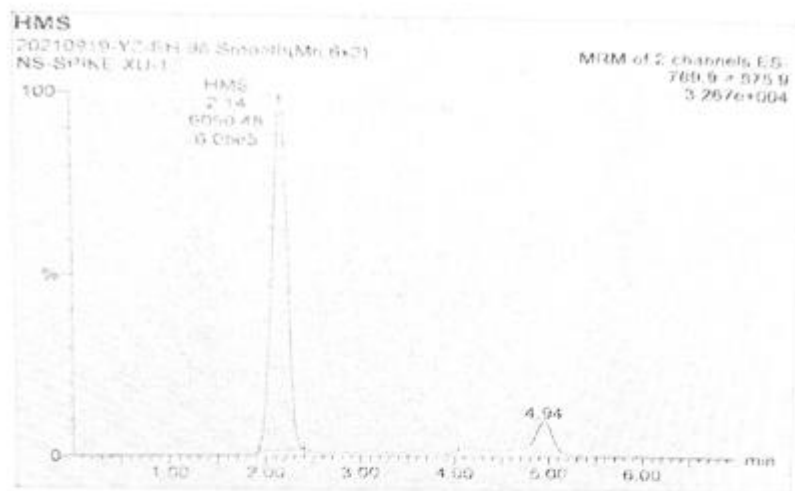


图 12 猪浓缩饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

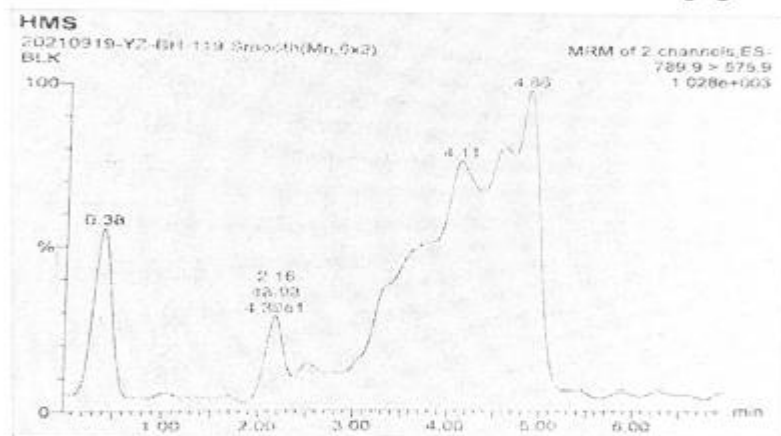


图 13 猪配合饲料空白色谱图



图 14 猪配合饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的黄霉素，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 4-表 5。

表 4 回收率实验结果（n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率（%）						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	0.25	82.0	80.3	78.9	79.8	80.0	80.9	80.3
	0.50	85.2	88.6	87.4	85.2	84.2	83.5	85.7
	2.50	89.7	90.8	92.7	93.2	90.3	92.5	91.5
鸡浓缩饲料	0.25	100.0	97.8	98.5	99.5	96.0	94.2	97.7
	0.50	88.3	87.7	84.1	86.0	84.4	86.5	86.2
	2.50	91.0	90.6	91.8	90.1	87.4	94.5	90.9
鸡配合饲料	0.25	93.4	94.8	94.7	90.9	86.5	82.3	97.3
	0.50	76.2	74.1	74.4	72.5	75.0	73.6	74.3
	2.50	86.0	90.1	90.7	89.5	85.0	87.8	88.2
猪预混饲料	0.25	91.7	85.9	90.8	92.5	88.4	83.5	88.8
	0.50	80.9	79.5	76.9	79.3	81.1	74.1	78.6
	2.50	70.6	76.0	74.9	74.4	75.4	75.0	74.4
猪浓缩饲料	0.25	90.6	85.4	92.1	87.2	89.0	90.8	89.2
	0.50	85.7	87.3	92.0	85.1	87.1	85.3	87.1
	2.50	84.8	87.0	85.0	79.1	83.4	84.1	83.9
猪配合饲料	0.25	87.5	91.4	89.0	87.3	93.4	90.9	89.9
	0.50	76.4	80.5	77.1	80.4	80.8	77.9	78.9
	2.50	84.6	87.0	87.6	83.7	84.2	86.7	85.6

表 5 精密度实验结果（n=6）

样品类型	测定结果（mg/kg）							CV 值（%）
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	0.205	0.201	0.197	0.200	0.200	0.202	0.201	1.31

	0.426	0.443	0.437	0.426	0.421	0.417	0.428	2.26
	2.24	2.27	2.32	2.33	2.26	2.31	2.29	1.58
鸡浓缩饲料	0.250	0.244	0.246	0.249	0.240	0.235	0.244	2.26
	0.441	0.438	0.421	0.430	0.422	0.433	0.431	1.96
	2.28	2.27	2.29	2.25	2.18	2.36	2.27	2.53
鸡配合饲料	0.233	0.237	0.237	0.227	0.216	0.218	0.228	4.03
	0.381	0.371	0.372	0.362	0.375	0.368	0.372	1.70
	2.15	2.25	2.27	2.24	2.12	2.19	2.20	2.63
猪预混饲料	0.229	0.215	0.227	0.231	0.221	0.209	0.222	4.00
	0.404	0.397	0.385	0.397	0.406	0.371	0.393	3.40
	1.77	1.90	1.87	1.86	1.88	1.87	1.86	2.59
猪浓缩饲料	0.227	0.214	0.230	0.218	0.222	0.227	0.223	2.79
	0.428	0.437	0.460	0.426	0.435	0.426	0.435	2.97
	2.12	2.18	2.12	1.98	2.09	2.10	2.10	3.14
猪配合饲料	0.219	0.229	0.223	0.218	0.234	0.227	0.225	2.67
	0.382	0.403	0.386	0.402	0.404	0.390	0.394	2.47
	2.12	2.17	2.19	2.09	2.11	2.17	2.14	1.91

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

三、验证结论

上海市疾病预防控制中心对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿，从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察。结果表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法在 10 ng/mL-1000 ng/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中黄霉素的检测方法推广使用。

验证单位：上海市疾病预防控制中心

验证人：朱明



中华人民共和国农业行业标准

《饲料中黄霉素的测定
液相色谱-串联质谱法》

验证报告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院

验证单位：上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所

验证时间：2022 年 1 月 20 日至 2022 年 1 月 30 日

验证报告

受上海市质量监督检验技术研究院委托，我单位根据其提供的《饲料中黄霉素的测定》标准征求意见稿，对标准的技术指标进行了验证。

一、验证的方法及材料

1. 验证的方法

《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》标准征求意见稿及编制说明。

2. 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

3. 仪器设备品牌

高效液相色谱-串联质谱仪 Waters

4. 液相色谱-串联质谱条件

4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：ACQUITY Atlantis T₃柱，100 mm × 2.1 mm，3 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：10 μL；

流动相：A：20mmol/L 乙酸铵（pH 5），B：乙腈，梯度洗脱程序见表1；

流速：0.4 mL/min。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
1.10	5	95
4.00	5	95
4.10	90	10
8.00	90	10

4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

脱溶剂气流速：1000 L/Hr；

反吹气流速：150 L/H；

雾化器温度：550 ℃；

电离电压：3.0 kV；

源温度：150 °C。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表2。

表2 黄霉素的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对	锥孔电压	碰撞能量
	(m/z)	(V)	(eV)
黄霉素	789.9 > 553.9	25	30
	789.9 > 575.9*	25	25

*为定量离子。

二、验证的内容与结果

1. 标准曲线

将黄霉素标准溶液用甲醇逐级稀释成浓度为1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL的标准系列溶液，称取与试样基质相应的阴性样品5.0 g，分别加入标准系列溶液0.5 mL，按照标准文本中的试样同时进行提取和净化处理，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表3。

表3 黄霉素标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	10	50	100	250	500	1000
峰面积	857	4488	9307	21806	47789	93923
线性相关系数 r^2	0.9995					
线性方程	$Y=94.30X-279.329$					

从表1和图1中可以看出：在10ng/mL~1000g/mL范围内，黄霉素标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 ≥ 0.9990 ，能够满足检测分析的要求。

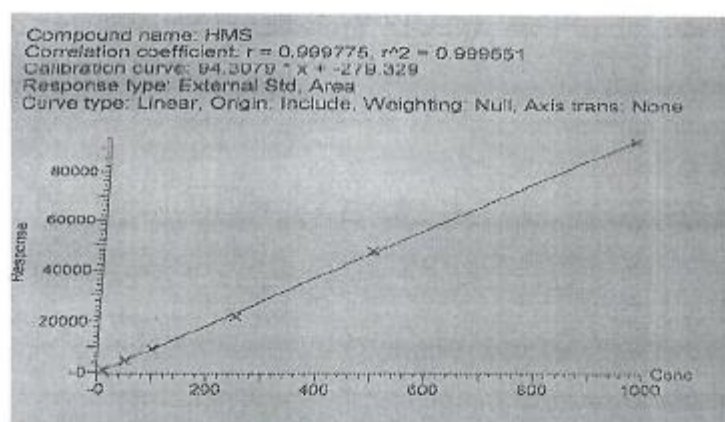


图1 黄霉素 A 标准曲线图

2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本, 添加适量标准工作溶液于 5.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.25mg/kg), 经提取后测定, 黄霉素的信噪比(S/N)均大于 10。因此, 将黄霉素的检测限定为 0.1mg/kg, 定量限定为 0.25mg/kg, 可以满足日常测定的要求。色谱图见图 2~图 14。

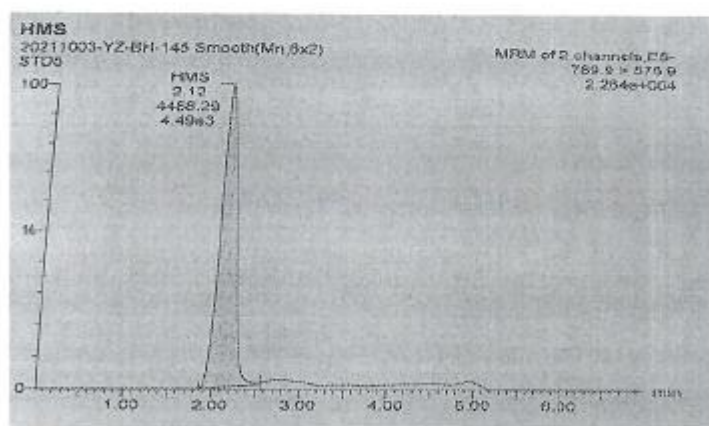


图2 黄霉素标准溶液色谱图(浓度为 50ng/mL)

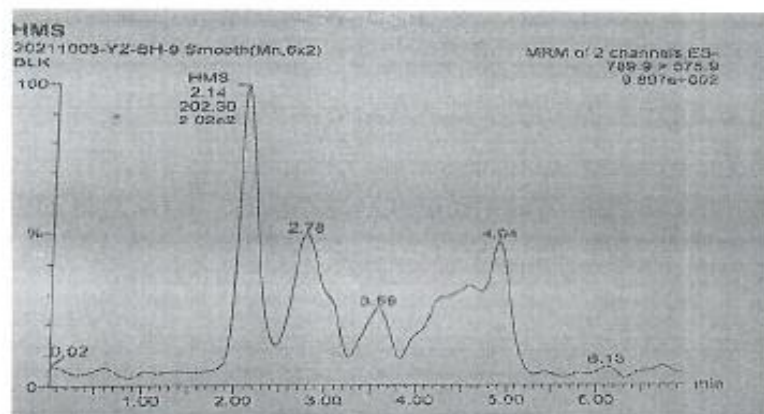


图3 鸡预混饲料空白色谱图

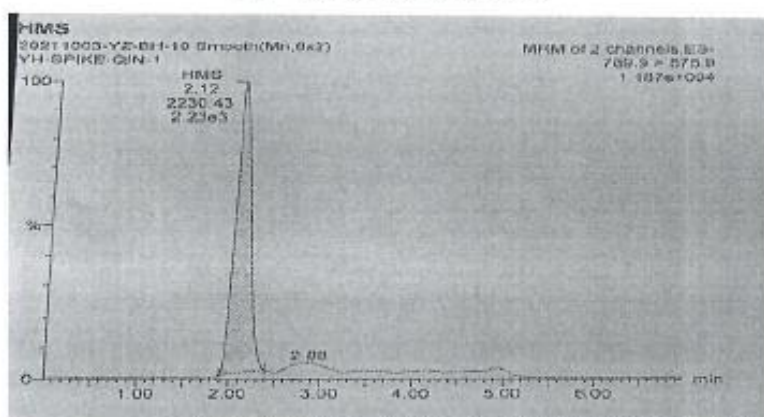


图4 鸡预混饲料添加黄霉素定量限色谱图(0.25mg/kg)

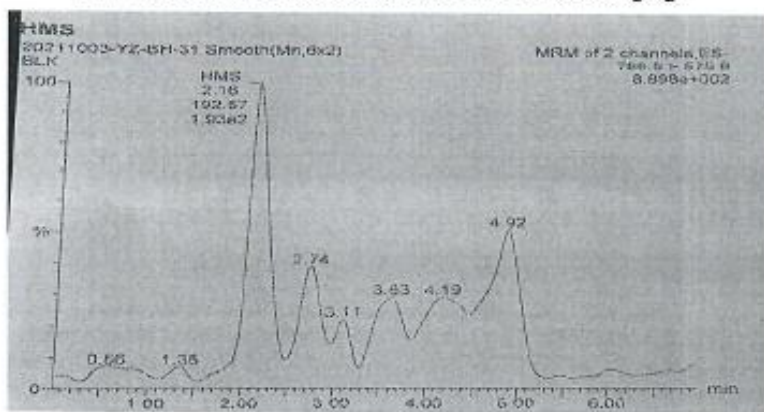


图5 鸡浓缩饲料空白色谱图

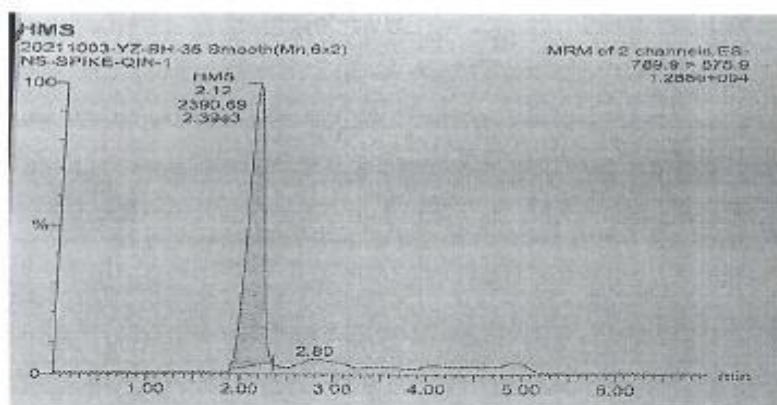


图 6 鸡浓缩饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

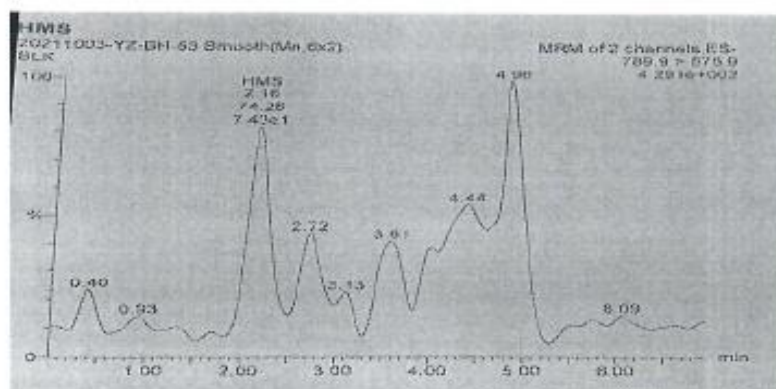


图 7 鸡配合饲料空白色谱图

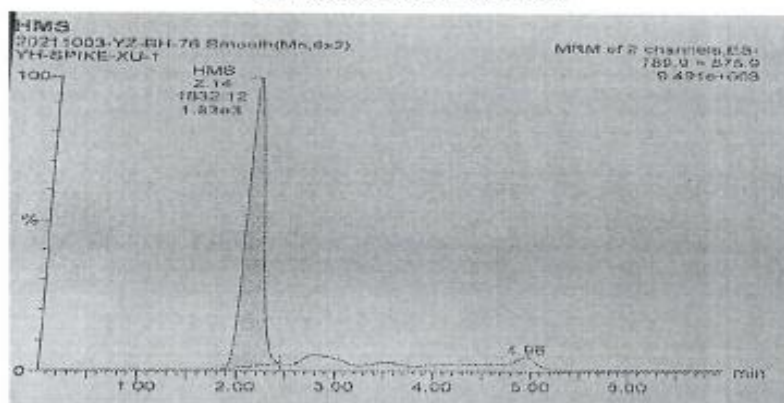


图 8 鸡配合饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

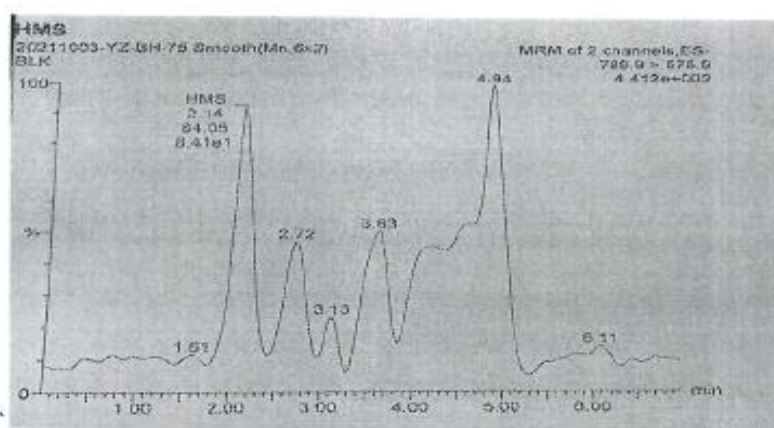


图9 猪预混饲料空白色谱图

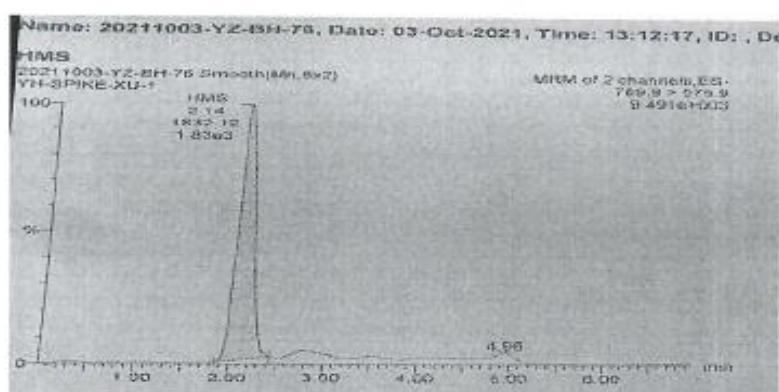


图10 猪预混料添加黄霉素定量限色谱图(0.25mg/kg)

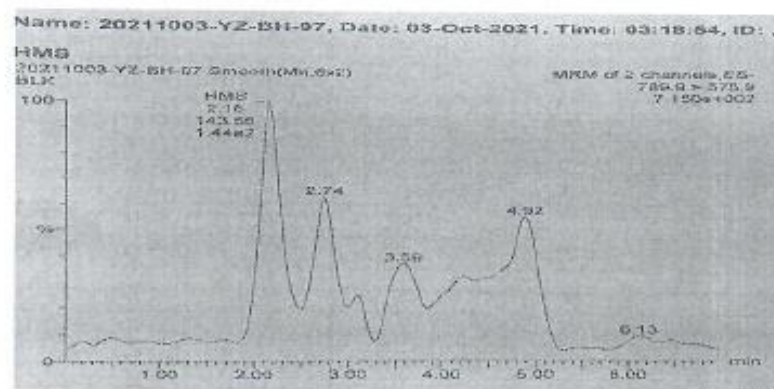


图11 猪浓缩饲料空白色谱图

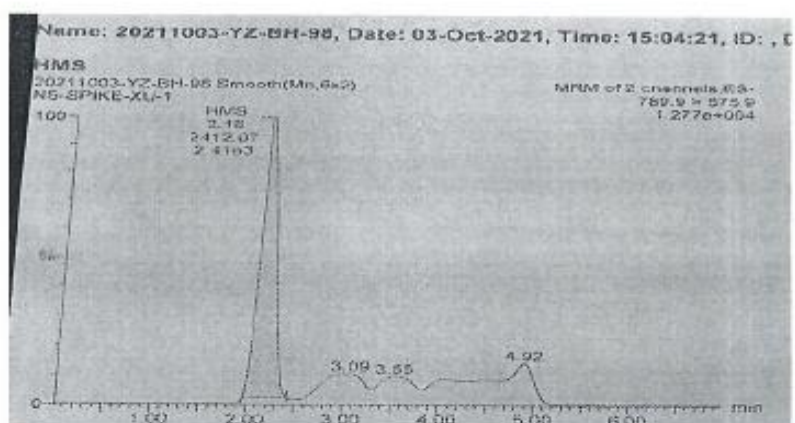


图 12 猪浓缩饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

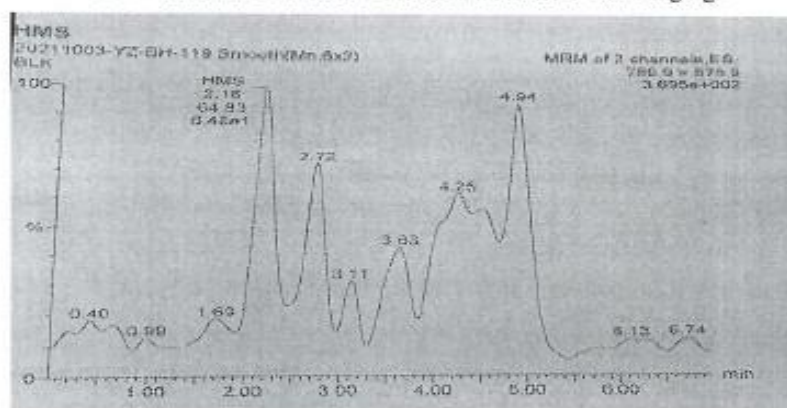


图 13 猪配合饲料空白色谱图

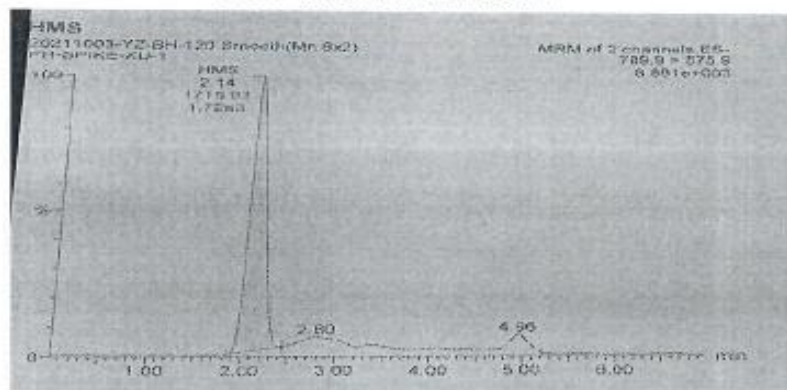


图 14 猪配合饲料添加黄霉素定量限色谱图 (0.25mg/kg)

3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的黄霉素，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 4-表 5。

表 4 回收率实验结果（n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率（%）						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	0.25	92.8	90.0	89.0	87.7	87.6	92.1	89.9
	0.50	92.6	92.8	96.5	89.9	92.3	91.7	92.6
	2.50	75.0	75.6	77.1	74.9	73.5	75.2	75.2
鸡浓缩饲料	0.25	96.9	100.6	93.2	91.5	101.1	99.9	97.2
	0.50	84.8	85.1	82.8	83.4	85.6	86.7	84.7
	2.50	81.9	83.7	85.1	86.2	84.2	83.8	84.1
鸡配合饲料	0.25	90.1	85.7	84.2	92.7	83.6	91.1	87.9
	0.50	77.4	71.4	75.9	77.1	75.1	78.9	76.0
	2.50	92.1	90.2	91.3	92.6	92.7	91.6	91.8
猪预混饲料	0.25	85.9	94.4	87.5	91.5	93.9	95.1	91.4
	0.50	84.5	89.4	85.5	87.6	87.2	87.0	86.9
	2.50	90.6	91.3	88.4	89.4	88.9	88.0	89.4
猪浓缩饲料	0.25	97.8	94.3	90.7	92.7	94.3	98.1	94.7
	0.50	91.4	94.0	94.9	92.8	91.7	94.2	93.2
	2.50	72.3	75.1	75.8	74.3	71.1	71.4	73.3
猪配合饲料	0.25	78.5	76.9	84.5	86.3	84.2	84.1	82.4
	0.50	78.8	78.6	77.7	79.0	80.7	80.0	79.1
	2.50	78.9	81.0	84.6	81.6	79.8	80.0	81.0

表 5 精密度实验结果（n=6）

样品类型	测定结果（mg/kg）							CV 值（%）
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	0.232	0.225	0.222	0.219	0.219	0.230	0.225	2.46

	0.400	0.401	0.417	0.388	0.399	0.396	0.400	2.32
	1.88	1.89	1.93	1.87	1.84	1.88	1.88	1.59
鸡浓缩饲料	0.242	0.252	0.233	0.229	0.253	0.250	0.243	4.18
	0.424	0.425	0.414	0.417	0.428	0.434	0.424	1.68
	2.05	2.09	2.13	2.16	2.11	2.09	2.10	1.74
鸡配合饲料	0.225	0.214	0.210	0.232	0.209	0.228	0.220	4.41
	0.387	0.357	0.379	0.385	0.375	0.395	0.380	3.40
	2.30	2.26	2.28	2.32	2.32	2.29	2.29	1.01
猪预混饲料	0.215	0.236	0.219	0.229	0.235	0.238	0.228	4.20
	0.423	0.447	0.428	0.438	0.436	0.435	0.434	1.95
	2.27	2.28	2.21	2.23	2.22	2.20	2.24	1.44
猪浓缩饲料	0.245	0.236	0.227	0.232	0.236	0.245	0.237	3.05
	0.457	0.470	0.474	0.464	0.458	0.471	0.466	1.54
	1.81	1.88	1.90	1.86	1.78	1.78	1.83	2.75
猪配合饲料	0.196	0.192	0.211	0.216	0.210	0.210	0.206	4.59
	0.394	0.393	0.389	0.395	0.403	0.400	0.396	1.32
	1.97	2.02	2.11	2.04	2.00	2.00	2.02	2.46

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

三、验证结论

“上海市农业科学院”对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿，从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察，结果表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法在 10 ng/mL-1000 ng/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 70%；变异系数小于 5%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中黄霉素的检测方法推广使用。

验证单位：上海市农业科学院农产品质量
标准与检测技术研究所

验证人：



附件 2 定向征求意见处理汇总表

标准项目名称：《饲料中黄霉素 A 的测定液相色谱-质谱法》共 16 页

负责起草单位：上海市质量监督检验技术研究院承办人虞成华、卞华 电话：13671669762、13918523069 2022 年 7 月 3 日填写

《饲料中黄霉素 A 的测定液相色谱串联-质谱法》征求意见汇总处理表

序号	标准章条编号	意见内容	提出单位 (单位及专家)	处理意见及理由 (凡不采纳或部分采纳的意见需说明理由)
1	封面(4条)	建议：征求意见稿修改为定向征求意见稿，文件英文译名字体修改为黑体。理由：GB/T 1.1-2020 附录 F 规定。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
2		建议删除 “Determination of flavomycin in feeds -Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method”中的 method，因为 “spectrometry”已有方法的意思。	常碧影 中国农科院质量标准与检测技术研究所 杨海锋 农产品质量标准与检测技术研究所(上海农科	采纳

			院)	
3		“Flavomycin” 建议改为 “flavomycin”。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心-宁波	采纳
4		方法检测的是黄霉素 A 的含量，建议标准名称改为“饲料中黄霉素 A 的测定液相色谱-串联质谱法”。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
5	前言 (1 条)	建议: 在起草人后另起一行, 增加“本文件首次发布。” 理由: GB/T 1.1-2020 中 8.3 h) 规定。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站 潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
6	1 范围 (6 条)	“预混合饲料” 建议改为 “添加剂预混合饲料”。	柏雪 西南民族大学 赵立军 农业农村部饲料质检中心(成都)	采纳

7		“本文件” 建议改为 “本标准”。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	不采纳 (按照 GB/T 1.1-2020 标准编写)
8		“本文件适用于预混合饲料、配合饲料和浓缩饲料中黄霉素含量的测定。”是否还应包含饲料原料、宠物食品基质	吴仕辉 广东海大集团股份有限公司 张红梅 通标标准技术服务(上海)有限公司	采纳
9		考虑到饲料禁抗及在改进方法前提下应该能提高灵敏度, 建议提高方法灵敏度。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心-宁波	不采纳(饲料中的抗生素浓度普遍较高, 经过市场调研, 通常黄霉素的添加量约为 5 mg/kg, 或者 30mg/d。方法检出限和定量限均能满足阳性样品

				的正常添加量。
10		建议：删除“液相色谱-串联质谱法”。理由：本文件仅一种方法，可以省略。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站 张凤枰 四川威尔检测技术股份有限公司	采纳
11		建议将“本文件液相色谱-串联质谱法的检出限为 0.10mg/kg，定量限为 0.25 mg/kg。”移到 10.1 部分	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究 所 向平 司法鉴定科学研究院	采纳
12	2 (2 条)	建议：“该日期对应的版本适用于本文件；”修改为“仅该日期对应的版本适用于本文件；”理由：GB/T 1.1-2020 中 8.6.2	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
13		GB/T 6682 应增加发布年份 2008。理由：正文明确指出是引用该标准的一级水要求，属涉及标准具体条文内容，应采用注日期引用。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究 所	不采纳 (按照 GB/T 1.1-2020 标准编写)

14	4 (3条)	增加“基质匹配标准曲线校准”。	彭丽 河南省兽药饲料监察所 宋荣 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
15		原理建议修改为：试样中的黄霉素经 0.1%甲酸甲醇溶液涡旋提取和固相萃取净化后，用特定反相色谱柱进行分离，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配校准，外标法定量。	常碧影 中国农科院质量标准与检测技术研究所	采纳
16		原理中建议简单写出固相萃取的机理。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心-宁波	采纳
17	5	悬置段建议按 GB1.1-2020 中关于段的章节规范编写。	耿士伟 江苏省畜产品质量检验检测中心	采纳
18	5.1.2~5.1.4	建议删去化合物的分子式。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	不采纳（按照 GB/T 1.1-2020 标准编写）

19	5.2.1	乙酸铵后加“溶液”2字。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究 所	采纳
20		表述重复，删去一个“pH”。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
21	5.2.2	甲酸甲醇后加“溶液”2字。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究 所	采纳
22		建议说明黄霉素 A $\geq$ 80%。并考虑该纯度是否设置太低。	曾勇 湖北省兽药监察所 赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
23		黄霉素标准品为混标，写明黄霉素 A 的含量。	宋荣 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究 所	采 纳 （ ALTA SCIENTIFIC. 于 2022 年 2 月在 工业上分离出黄 霉素 A 的单标，

	5.2.3			试验最终通过黄霉素 A 的基质匹配曲线进行方法学验证。并用黄霉素 A 去校准黄霉素标样，结果符合面积归一化法得出的结论)
24		标准品溶液的保存温度“-18℃以下”各单位更好实现。	张晓 山东晟华检测技术有限公司	采纳
25		考虑到标准品的纯度，建议“称取黄霉素标准品 10 mg”改为“称取一定量的黄霉素标准品”。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	不采纳 不便于实验操作
26		标准储备溶液和标准中间溶液的配制选择了棕色容量瓶，编制说明中无透明容量瓶和棕色容量瓶的比较，无数据支撑	柏雪 西南民族大学	采纳
27		确认标准中间溶液（100 µg/mL）还是工作溶液	向平 司法鉴定科学研究院	确认（根据验证结果，最终确定

				将 10 µg/mL 定为标准中间液，有效期为 1 个月。配置基质标准曲线时，再进行需稀释)
28	5.3.1	建议给出萃取柱规格要求。	耿士伟 江苏省畜产品质量检验检测中心	采纳
29		固相萃取柱与标准编制说明中“Oasis PRiME HLB”不一致，且应说明固相萃取柱规格，如多少 mg、多少 ml 等；	曾勇 湖北省兽药监察所 赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都） 彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
30		SPE 小柱：Oasis PRiME HLB 非一般 C18 或 HLB 小柱，其有更好的脱脂和去除杂质的能力，为保证标准	常碧影 中国农科院质量标准与检测技术研究所	采纳

		执行，需列出其商品名。并按规定给出角标和说明。		
31		若鉴于标准文本书写的要求，不可体现“高纯度硅胶结合双键键合 C18 固相萃取小柱”的品牌，则建议在备注里作说明，以保证方法的推广性。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
32	5.3.2	建议补充滤膜“有机系”的具体型号。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	不采纳 (常规有机滤膜均能满足要求)
33	6	仪器和设备，应改为“仪器设备”。	李祥明 山东省畜产品质量安全中心	采纳
34	6.1	建议：“ESI-”修改为“ESI-”	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
35	6.6	建议修改为：离心机：转速不低于 10000 r/min。 与 8.1 一致。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
36		样品制备，应为“样品”。	李祥明 山东省畜产品质量安全中心	采纳
37		补充基质匹配加标样品要求。	张凤枰	采纳

			四川威尔检测技术股份有限公司 彭丽 河南省兽药饲料监察所	
38	7	“充分混匀，装入磨口瓶中”，目前饲料行业以样品袋封装为主，如无特殊验证实验结果提示的必要性，建议表述为“密闭容器”即可，以免加重企业负担。	吴仕辉 广东海大集团股份有限公司	采纳
39		建议：分析筛增加孔径规格和分析筛目数规格要求；“粉碎使其粒径小于 0.42mm”考虑到实际操作人员的能力水平检验修改为“使其过 40 目筛”。	张晓 山东晟华检测技术有限公司 耿士伟 江苏省畜产品质量检验测试中心	采纳
40	8	建议改为：8 试验步骤。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
41		增加：平行做两份试验。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
42		分别称取试样 5 g (准确至 0.01 mg)”，确认是否有必要准确至 0.01 mg；是否将“mg”改成“g”。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究	采纳

	8.1		所 杨海锋 农产品质量标准与检测技术研究所（上海农科院）	
43		分别称取试样 5 g (准确至 0.01 mg)，标准适用预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料，建议修改“称取试样 1—5g (准确至 0.01 mg)”。	谭美英 湖南省兽药饲料监察所	部分采纳（实验优化与验证过程中，均按照 5g 研究，饲料基质较为复杂，称样量在合理范围内放大，在满足方法的检出限、定量限和线性的前提下，较为合适）
44		“重复上述步骤”建议修改为“重复提取一次”。		采纳
45		“吸取约 2 mL 的提取液至固相萃取小柱中”，应该为“准确量取 2.00 ml 的提取液至固相萃取小柱中”。	吴仕辉 广东海大集团股份有限公司	采纳

46		在配合饲料样品前处理是不建议用超声处理尤其是较长时间的超声处理,随着温度的上升容易导致样液成胶不利于离心,不知道是否对比过。	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
47		试样提取用的容量瓶是否应为棕色容量瓶。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
48	8.2	基质加标标准工作曲线没有体现最终浓度值,不够直观,建议各点的最终浓度值,方便标准使用者。	张红梅 通标标准技术服务(上海)有限公司	采纳
49		建议统一标准系列溶液各浓度点的有效位数。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
50		建议“阴性样品 5.0 g”修改为“空白样品 5.0 g”,	岳秀英 四川省兽药监察所	采纳
51		“基质加标”改为“基质匹配”;考虑到编制说明中 提取净化绝对回收率尚可,建议基质匹配标准工作液 采用空白样品处理后再稀释配制。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验检测中 心-宁波	采纳
52	8.3.1	编制说明显示常规 C18 柱不能满足检测需要,选择了 Atlantis T3 柱,建议写明 Atlantis T3 柱的填料。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
53		如编制说明中所述一般 C18 柱色谱柱不能将黄霉素	常碧影	

		的几个异构体分开，从而影响其定量为此，必须给出适当的色谱柱，特定 C18，如 Waters Atlantis T3) 柱，并按规定，给出商品名、角标及说明。	中国农科院质量标准与检测技术研究所	采纳
54		建议：在编制说明中特别指出了色谱柱是高纯度硅胶及双键键合 C18 技术，其他都不可以，标准文本中却没有指出。	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
55		“流动相：A：20mmol/L 乙酸铵， B：乙腈，梯度洗脱程序见表 1”，用 20mmol/L 乙酸铵浓度是否过高，是否必要，一般设备厂家推荐 5 mmol/L，不超过 10 mmol/L，太高会给设备维护造成负担。	吴仕辉 广东海大集团股份有限公司	不采纳 (20mmol/L 的分离效果最佳，一般在实验结束后，会有清洗管道程序，已咨询过仪器应用工程师，只要每次试验后进行管道清洗，不会对仪器造成负担)

56	表 3	“>”建议修改为“≥”。	向平 司法鉴定科学研究院	采纳
57		改为封闭表格。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
58	8.3.4	建议修改：根据表 2 选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列工作溶液（或混合标准系列溶液/基质匹配标准系列溶液）中对应的定性离子的相对离子丰度。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站 吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
59	8.3.5	建议增加：单点校准定量时，试样溶液中待测物的响应面积与标准溶液相应面积相差不超过 30%。		
60		试样溶液如超出了基质匹配标准曲线的线性范围，不能简单用甲醇稀释样品溶液。	常碧影 中国农科院质量标准与检测技术研究所	采纳
61	.	建议补充单点校准公式： $w = \frac{A_s \cdot C_s \cdot V_1 \cdot V_2}{A_s \cdot V_1 \cdot m \cdot 1000}$	柏雪 西南民族大学 李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

			吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	
62		计算公式中缺少稀释系数。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
63		计算公式中，应删除换算系数 X，把横线延伸；在分子上用 X。	李祥明 山东省畜产品质量安全中心	采纳
64		被测物应用 “ω”表示。		
65		“C——试样中黄霉素 A 的浓度”与标准文本中“黄霉素”的的写法不一致，建议统一。	陈玉艳 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
66		“保留三位有效数字” 建议改成： 当检测结果大等于 1.0mg/kg 时，保留 3 位有效数字； 当检测结果小于 1.0mg/kg 时，保留到小数点后 2 位。 理由：本方法检出限为 0.10 mg/kg 小数点第 3 位及以后的数值没有意义。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳

67	10	请核实“精密度”表述是否正确？	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	核实（通常使用精密度，也有 NY 标准使用重复性）
68		建议补充批间精密度要求。	吴仕辉 广东海大集团股份有限公司	采纳
69		建议“精密度”改成“检测方法的灵敏度、准确度、精密度”。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
70	附录 A	增加：（资料性附录）	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所 田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
71		补充引导语“黄霉素标准溶液的选择离子色谱图见图 A”。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所 常碧影	采纳

			中国农科院质量标准与检测技术研究所	
72		文末添加终止线	李芳 成都蜀星饲料有限公司 杨海锋 农产品质量标准与检测技术研究所（上海农科院）	采纳
73	编制说明 (一)	制定背景应补充 246 公告相关要求。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
74		说明原来在畜禽料中的添加量。		采纳
75		建议在背景中补充“禁抗”前，黄霉素在饲料中的使用浓度。	田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
76		明确本文件测定的是黄霉素 A：请考虑是否在标准正文中明确，测定的只是黄霉素 A？	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	部分采纳（编制说明中已阐述： 1.本文首先用高效液相色谱分离出 5 种主要黄霉
77		标准题目是否合适？黄霉素是以黄霉素 A、黄霉素 A12、黄霉素 C1、黄霉素 C3、黄霉素 C4 等为主的混		
			李宏 陕西省畜牧技术推广总站	

		合物。本实验通过高效液相色谱技术来确定黄霉素混合物中的主要活性成分为黄霉素 A。编制说明阐述的方法是测定黄霉素 A，与标准题目不一致，请考虑。		素成分。得出黄霉素 A 占有关键作用。
78		定量公式是否准确？如果定量结果以黄霉素是以黄霉素 A、黄霉素 A12、黄霉素 C1、黄霉素 C3、黄霉素 C4 的和来表示黄霉素，请修改公式。		2.本方法其次用超高分辨质谱仪确定黄霉素 A 正在质谱分析过程中，没有收到其他活性成分的影响。 3.最后要高效液相色谱-串联质谱仪测定黄霉素 A 来代表黄霉素在基质中含量) 4.标准任务中的题目为“饲料中

				的黄霉素测定”
79		待测化合物的稳定？黄霉素是以黄霉素 A、黄霉素 A12、黄霉素 C1、黄霉素 C3、黄霉素 C4 的混合物，如果标准品和产品中有着 5 种化合物，在自然情况下，是否发生降解或转化，导致定量结果不准确？要补充。		部分采纳（通过实验证明，黄霉素本身十分稳定。经相关文献查阅黄霉素不会发生降解和转化，本试验也做了黄霉素标准溶液的稳定性测试）
80	编制说明 (三)	建议将参考文献标注在文中具体位置。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
81	编制说明 2.1.1.1	色谱柱选择，表述不清。	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳

82		色谱柱的排他性:色谱柱分离只有 DIKMA Platisil 5μm ODS 色谱柱才能将 5 种化合物分开, 其他性能的或性能相当者是否可以用, 这样标准关于色谱柱不会被认为具有排他性。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
83	编制说明 2.2.4.2	“色谱柱: Waters Atlantis T3 柱”与“标准文本中 8.3.1 色谱柱: C18 柱”的表述不一致, 建议统一。	陈玉艳 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
84	编制说明 2.2.5	建议: 由本段内容可知, 此处介绍的是净化柱的选择, 但是缺少未净化的数据比较。	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
85		建议在“提取剂条件”和“净化条件”中给出试验时的加标回收浓度。	赵立军 农业农村部饲料质检中心(成都)	采纳
86		饲料中待测物的添加量通常较高, 建议提高加标浓度, 以保证高浓度阳性样品测定结果的准确性。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	不采纳(黄霉素为禁用物质, 按照 GB/T23182 - 2008 的要求, 添加量被 1 倍, 2 倍, 和 10 倍。同时, 任务委托书

				确定目标物的测定低限，优化实验方法时，用4-5LOQ较为合理)
87	编制说明 2.3.1	本部分内容重点不突出，本方法选择的理由是无内标标准品还是不需要内标法，理由不清晰。	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
88	编制说明 2.3.2	请补充方法适用范围中所有产品基质干扰的大小数据，来充分说明本标准使用基质匹配标准曲线的定性和定量的依据。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳（编制说明中补充了表8数据，说明了饲料基质对黄霉素有一定的抑制作用，需要用基质匹配标准曲线）
89	编制说明 2.3.3	标准溶液稳定性测试，上机测试浓度较高，建议此处表述清楚是用“液相色谱仪”还是“液质联用仪”。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
90	编制说明	线性试验建议改“绝对量”为“浓度”；2.2.5中回	吴银良	采纳

	2.3.4	收基本在 70 ~ 80%范围,而该方法定量是采用同样步骤处理的加标样品定量,数据难以解释。	农业农村部农产品质量安全监督检验检测中心-宁波	
91	编制说明 2.4	结论处“本方法适用于畜禽预混合饲料、浓缩饲料及精料补充料中黄霉素的测定”与标准正文适用范围不一致,请进一步核实。	田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院 陈玉艳 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
92		请选择市场上的高含量和低含量实际样品来验证方法的可行性。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

说明:

- 1.发函单位 28 个,回函单位 26 个,未回函单位 2 个;提出意见单位 26 个,无意见单位 0 个。
- 2.共提出意见 92 条;采纳 83 条,部分采纳或不采纳 9 条。

附件 3：预审专家签字表

农业行业标准《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》

预审专家签字表

2023 年 4 月 20 日

序号	姓 名	职务/职称	所在单位	联系方式	签 字
1	李俊玲	研究员	山东省畜产品质量安全中心	13805313306	李俊玲
2	杨秀玉	研究员	中国兽医药品监察所	13241400912	杨秀玉
3	程林丽	副教授	中国农业大学	13520870966	程林丽
4	李 宏	研究员	陕西省畜牧技术推广总站	13572219615	李宏
5	吴银良	正高级工程师	农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心（宁波）	13175177967	吴银良
6	张凤枰	教授级高工	四川威尔检测技术股份有限公司	18908078695	张凤枰
7	耿士伟	研究员	江苏省畜产品质量检验检测中心	13951886106	耿士伟
8	张育润	高工	国家标准技术审评中心	18610999798	张育润

附件 4 农业行业标准《饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）审查意见

农业行业标准《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿） 审查意见

2023 年 4 月 20 日，上海市兽药饲料检测所组织专家对上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所起草的农业行业标准《饲料中黄霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）进行了认真审查。专家组由李俊玲、杨秀玉、程林丽、李宏、吴银良、张凤枰、耿士伟、张育润组成。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：

1. 建议标准名称修改为“饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法”，并在编制说明中补充相关说明。
2. 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，详细列出批内、批间回收率和精密度试验数据。
3. 按照 GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.4-2015 的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

组长：李俊玲

2023 年 4 月 20 日

预审意见处理汇总表（模版）

标准名称：饲料中黄霉素的测定液相色谱-串联质谱法共页

标准项目承担单位：上海市质量监督检验技术研究院、上海市动物疫病预防控制中心

2023 年 4 月 20 日填写

序号	文件章节编号	意见内容	提出单位	处理意见及理由	备注
1	标准名称	更改为“饲料中黄霉素 A 的测定 液相色谱-串联质谱法”，并在编制说明中补充相关说明。	专家组	采纳	
2	5.10	更改为“亲水亲脂性固相小柱，3mL/60mg，或其他性能相当者。”	专家组	采纳	
3	8.3.1	1) 更改为“a) 色谱柱：Atlantis T ₃ 柱,100 mm× 2.1 mm, 粒径 3.0 μm，或性能类似的色谱柱”	专家组	采纳	

		2) b) 流动相更改为 e)项			
4	9	进一步规范公式	专家组	采纳	
5	附录 A	定量离子色谱图中增加保留时间	专家组	采纳	
6	编制说明	1) 建议在编制说明里列出黄霉素混合物中各种黄霉素的 比例。 2) 补充不同厂家的黄霉素原料药产品中各种黄霉素的 比例。 3) 明确饲料产品的名称。 4) 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进 行修改完善，详细列出批内、批间回收率和精密度试验数	专家组	采纳	

		据。 5) 标准制定背景中先说明黄霉素已被禁用，再描述黄霉素之前的使用历史。 6) 比较不同品牌的 SPE 柱。			
7	标准文本及 编制说明	按照 GB/T 1.1、GB/T 20001.4 的要求规范。	专家组	采纳	