

《饲料中二硝托胺的测定》编制说明

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准制定任务来源于宁波市农产品质量检测中心于2019年7月30日向农业农村部农产品质量安全监管司购买的服务事项《饲料中二硝托胺的测定 高效液相色谱法(农业部783号公告-5-2006)》等2项农业行业标准制定和修订,其中该标准为修订项目,优化液相色谱法增加液相色谱串联质谱法,因此修订后的标准名称确定为《饲料中二硝托胺的测定 液相色谱-串联质谱法和液相色谱法》(后根据论证会专家意见修改为《饲料中二硝托胺的测定》)。制标单位在参考国内外有关二硝托胺及目前饲料中药物分析方法趋势的基础上结合前期研究基础以及在我国生产中的实际情况起草本标准。

1.2 制定背景

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,因此有必要建立饲料中相关药物分析方法标准为饲料安全保驾护航。

二硝托胺(dinitolmide)是1960年由法国Dow公司开发的家禽优良抗球虫药。我国于1989年批准生产使用,因二硝托胺具有高效、低毒、性能稳定、抗药性小等特点而得到普遍应用,农业农村部246号公告中规定了二硝托胺预混剂质量标准与说明书范本,其中规定该预混剂规格为25%,防治鸡球虫病混饲用时每1000 kg饲料添加500 g,即125 mg/kg,同时有文献报道当饲料中添加量超过250 mg/kg时,若连续饲喂15日以上可抑制雏鸡增重。但在使用过程中,用量过大或在产蛋期及停药期继续使用的现象时有发生,造成在畜产品中的药物残留,对人体健康造成潜在危害。我国国家标准GB31650-2019规定了二硝托胺的最大残留限量以亲体和代谢产物(3-氨基-5-硝基邻甲苯酰胺,3-ANOT)总量计,鸡肉、鸡肝、鸡肾和鸡脂肪中分别为3000、6000、6000和2000 µg/kg,火鸡肉和肝中均为3000 µg/kg。而目前针对饲料中二硝托胺的分析方法标准农业部783号公告-5-2006标准年限较长,缺少确证方法,因此急需对该标准进行修订,优化液相色谱法定量方法,补充“液相色谱-串联质谱法”作为确认方法。

对于饲料和动物性食品中二硝托胺及其代谢产物的含量分析,国外研究相对较早,

分析方法主要为薄层色谱法和高效液相色谱法，但多数方法分析对象仅为亲体或仅为代谢产物。国内有关饲料和动物组织中二硝托胺的分析报道较少，动物组织中二硝托胺的分析方法仅见 SN/T 2453-2010，分析对象仅为二硝托胺，目前为止未见有代谢产物的分析方法报道，而饲料中二硝托胺的报道也较少，前处理基本均和农业部 783 号公告-5-2006 类似，采用甲醇加热提取，中性氧化铝净化。到目前为止，还未见有饲料中二硝托胺液相色谱串联质谱法的分析报道，因此鉴于目前的饲料和畜产品质量安全形势，十分有必要尽快对农业部 783 号公告-5-2006 标准进行修订。

1.3 工作过程

本标准主要工作过程如下：

2019 年 10-11 月，标准编制工作小组检索了有关饲料和食品中二硝托胺检测方法的国内外文献，发现目前二硝托胺分析方法较少，分析对象主要集中在动物性食品，少量为饲料；根据当前饲料中药物分析的检测技术现状、饲料中二硝托胺使用浓度和液相色谱串联质谱法和液相色谱法的匹配，制定了该标准检测方法试验草案，拟订工作计划和工作进度。

2019 年 12 月-2020 年 5 月，按照拟定的试验草案进行了饲料中二硝托胺的前处理方法和仪器方法的研究，并确定了最终的前处理条件和仪器条件。并进行了线性、检测限和定量限、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。

2020 年 6-7 月编制工作小组根据试验情况完成了该方法标准的征求意见稿和编制说明。征求意见稿的方法名称为《饲料中二硝托胺的测定 液相色谱-串联质谱法和液相色谱法》。

2020 年 9 月编制工作小组将形成的征求意见稿，以电子邮件或微信发送的方式发送到各单位专家进行了征求意见。

2020 年 10 月编制工作小组对征求到的意见共 27 份进行了整理，共 23 条意见，其中 18 条采纳，5 条不采纳。

2020 年 12 月-2021 年 4 月，由上海市兽药饲料检测所、河南省兽药饲料监察所和农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）三家单位对该标准进行了复核验证，验证结果良好。

2021 年 9 月 22 日，召开专家论证会，专家组就标准文本和编制说明进行了讨论，提出修改标准名称等意见（见表 1）。

2021年9月-12月，编制工作小组根据专家意见进行了逐一修改（见表1），补充了相关试验，并对标准文本和编制说明进行了修改。

表1 专家论证会意见及修改后结果所在章节

| 序号 | 专家意见 | 修改后所在章节 |
|----|--|------------------------|
| 1 | 建议标准名称修改为“饲料中二硝托胺的测定”。 | 见标准文本及编制说明首页。 |
| 2 | 补充液相色谱串联质谱法方法检出限和定量限的相关试验数据，以此确定并优化检出限和定量限。 | 见 3.1.3.2 节 |
| 3 | 补充普通高效液相色谱法及其方法学试验相关数据。 | 见2.2.2.2节和3.1.2节 |
| 4 | 补充提取后直接稀释法与 SPE 柱净化法比较试验数据。 | 见 2.2.1.3 节 |
| 5 | 补充抗球虫药物盐酸氯苯胍、氨丙啉、地克珠利及其他类药物的干扰试验。 | 见 2.2.2.1 节和 2.2.2.2 节 |
| 6 | 补充液相色谱串联质谱法提取前加内标、提取后加内标和不加内标对检测结果影响的数据。 | 见 2.2.4 节 |
| 7 | 提供用拟定方法和原标准方法对实际阳性样品的检测结果及其比较。 | 见 3.1.4 节 |
| 8 | 根据完善后的方法对验证报告进行补充。 | 见各单位验证报告 |
| 9 | 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。 | 见标准文本及编制说明 |

2021年12月-2022年2月，由河南省兽药饲料监察所、农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）和农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（北京）三家单位对该标准进行了复核验证，验证结果良好。

2022年6月22日，召开专家预审会，专家组就标准文本和编制说明进行了讨论，并提出修改意见，标准通过预审。

2022年6月-7月，标准编制小组根据专家意见补充了相关试验，并对标准文本和编制说明进行了修改。再次发送专家审核后形成公开征求意见稿。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据、修订前后技术内容对比

2.1 标准编制原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检测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。

在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，标准的编写规则及

表述按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则的要求》、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》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 主要内容及其确定依据

2.2.1 样品前处理方法的确定

2.2.1.1 样品称样量的确定

采用农业部 783 号公告-5-2006 标准方法对不同质量的阳性样品（猪配合饲料，编号 FJ20008）进行检测，称样量分别为 5 g 和 20 g，各做 5 个重复。此外，待本标准确定提取净化及仪器条件后，采用其中拟定的 HPLC 法以上述相同方式对不同称样量的阳性样品也进行了检测。提取溶剂体积均依据称样量等比例增减。

结果（表 2）表明，以原标准方法检测时 RSD 最大为 1.5%，不同称样量间结果差异较小；而以拟定 HPLC 法检测时 RSD 最大为 1.0%，不同称样量间结果差异也较小。可见，不同称样量对测定结果的影响较小。

最终，确定浓缩饲料、复合预混合饲料称样量为 2 g，配合饲料及其它饲料称样量为 5 g。

表 2 原标准方法与拟定方法下不同称样量对测定结果的影响

| 饲料种类 | 检测方法 | 称样量 | 测定结果（mg/kg） | | | | | | RSD% |
|-------|-------|------|-------------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 平均值 | |
| 猪配合饲料 | 原标准方法 | 5 g | 61.8 | 62.5 | 63.0 | 61.5 | 62.8 | 62.3 | 1.5 |
| | | 20 g | 62.2 | 62.6 | 63.6 | 62.8 | 62.1 | 62.7 | 1.2 |
| | 拟定方法 | 5 g | 62.5 | 62.7 | 61.9 | 62.3 | 63.3 | 62.5 | 1.0 |
| | | 20 g | 61.6 | 62.2 | 61.4 | 62.4 | 62.6 | 62.0 | 0.9 |

2.2.1.2 样品提取条件的确定

甲醇、乙腈和丙酮等均可用于对二硝托胺的提取，目前农业部 783 号公告-5-2006 标准中采用甲醇 50℃水浴加热提取，且加热过程中需不时手动振摇，且受限于水浴锅空间，不便于大批量样品的检测。因此为解决不用加热下提取本标准尝试在常温下利用乙腈、氨水乙腈、乙酸乙腈及氨水甲醇对不同饲料（鸡配合饲料、鸡浓缩饲料及鸡复合预混合饲料）

在不同浓度[250 mg/kg、25 mg/kg 和 1.0 mg/kg]添加下的回收率进行了研究，并与原标准提取条件进行对比。其中鸡配合饲料称样量 5 g，提取溶液用量每次为 20 mL；其余饲料称样量 2 g，提取溶液用量每次为 10 mL，均进行 2 次提取（每次振荡提取 15 min），合并提取液进行液相色谱分析，同时进行空白样品试验，结果详见表 3。

表 3 不同提取溶剂对提取效率的影响

| 添加浓度 | 溶液种类 | 鸡配合饲料% | 鸡浓缩饲料% | 鸡复合预混合饲料% |
|------------|----------|--------|--------|-----------|
| 1.0 mg/kg | 乙腈 | 74.4 | 97.1 | 96.2 |
| | 0.5%氨水乙腈 | 82.2 | 96.5 | 95.8 |
| | 1.0%乙酸乙腈 | 71.2 | 83.8 | 82.2 |
| | 0.5%氨水甲醇 | 85.8 | 97.6 | 95.5 |
| | 甲醇，50℃ | 93.6 | 96.7 | 93.2 |
| 25.0 mg/kg | 乙腈 | 92.4 | 97.2 | 96.1 |
| | 0.5%氨水乙腈 | 93.7 | 95.2 | 94.2 |
| | 1.0%乙酸乙腈 | 83.8 | 82.1 | 84.9 |
| | 0.5%氨水甲醇 | 94.2 | 95.8 | 95.0 |
| | 甲醇，50℃ | 95.6 | 96.4 | 92.8 |
| 250 mg/kg | 乙腈 | 95.8 | 92.5 | 93.9 |
| | 0.5%氨水乙腈 | 96.9 | 93.6 | 94.6 |
| | 1.0%乙酸乙腈 | 85.3 | 85.7 | 84.2 |
| | 0.5%氨水甲醇 | 96.2 | 94.1 | 94.5 |
| | 甲醇，50℃ | 97.2 | 94.9 | 93.3 |

从表中数据可知，5 种提取溶液提取效果比较，1%乙酸乙腈的提取效果相对较差，乙腈、0.5%氨水乙腈、0.5%氨水甲醇以及甲醇在 50℃ 下的提取效果相对较好；乙腈、0.5%氨水乙腈、0.5%氨水甲醇以及甲醇在 50℃ 下对鸡浓缩饲料、鸡复合预混合饲料和鸡配合饲料其余添加浓度的提取效果差异不显著，但对于鸡配合饲料在 1.0 mg/kg 时，甲醇在 50℃ 下提取最好、其次为 0.5%氨水甲醇，乙腈的提取效果较差。

为进一步验证不同提取方法提取效果的可靠性，还分别采用了三种不同的提取方法对阳性样品（猪配合饲料，编号 FJ20008）进行了测试，结果表明（表 4），0.5%氨水甲醇和 0.5%氨水乙腈的提取效率较甲醇 50℃ 水浴提取低，而 0.5%氨水甲醇高于 0.5%氨水乙腈。考虑到振荡提取较水浴提取更便捷，故拟对 0.5%氨水甲醇振荡提取方法做进一步优化，对比研究了不同提取时间对提取效率的影响。结果表明（表 5），当两次提取时间分

别为 40 min 和 20 min 时, FJ20008 阳性样品用 0.5%氨水甲醇和甲醇 50℃水浴提取结果基本一致。

添加回收试验中, 配合饲料(精料补充料)、浓缩饲料、复合预混合饲料最高添加浓度分别为 250、1000、5000 mg/kg, 此时单个样品需加入纯固体标准物质的量为 1.25、2、10 mg, 仅 5 重复 3 批次试验中总用量即接近 600 mg, 用量大、成本高。因此为降低成本, 上述三个浓度均采用 25%二硝托胺预混剂进行添加, 此时需先对其含量进行测定。但由于其有效成分含量很高, 可能存在无法被完全提取而导致定量不准、进而影响添加回收试验结果的情况, 因此同步对其进行了相关提取效率研究。结果表明(表 4), 0.5%氨水甲醇和 0.5%氨水乙腈对 25%二硝托胺预混剂的提取效率较甲醇 50℃水浴提取高, 说明在氨水和不断振荡的条件下二硝托胺更容易被释放、提取, 此时延长提取时间对其影响不大(表 5)。

考虑到 0.5%氨水甲醇提取过程不需要不时手动振摇, 不受限于水浴锅空间, 易于大批量样品的检测, 且两次提取对阳性样品的提取效率与原标准提取方法差别不大, 因此, 最终选择 0.5%氨水甲醇振荡提取的方法对原标准进行修订。最终确定方法中浓缩饲料和复合预混合饲料称样量为 2 g, 提取溶液用量每次为 10 mL, 重复提取两次, 其余饲料称样量为 5 g, 提取溶液用量每次为 20 mL, 同样提取两次, 两次重复提取时间分别为 40 min 和 20 min。

表 4 不同提取方法对阳性饲料样品的提取结果

| 饲料种类 | 提取溶液 | 结果 (mg/kg) | | |
|------------|----------|------------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 平均值 |
| 猪配合饲料 | 甲醇 | 63.1 | 62.8 | 63.0 |
| | 0.5%氨水乙腈 | 50.2 | 51.1 | 50.6 |
| | 0.5%氨水甲醇 | 58.3 | 58.8 | 58.6 |
| 25%二硝托胺预混剂 | 甲醇 | 22.8% | 22.7% | 22.8% |
| | 0.5%氨水乙腈 | 24.9% | 25.0% | 24.9% |
| | 0.5%氨水甲醇 | 25.0% | 25.1% | 25.0% |

表 5 不同提取时间对阳性饲料样品的提取结果

| 饲料种类 | 提取溶液 | 不同提取时间的结果 (平均值, $n=2$, mg/kg) | | |
|------------|----------|--------------------------------|---------------|---------------|
| | | 15 min+15 min | 30 min+20 min | 40 min+20 min |
| 猪配合饲料 | 0.5%氨水甲醇 | 58.6 | 62.1 | 62.9 |
| 25%二硝托胺预混剂 | 0.5%氨水甲醇 | 25.0% | 24.9% | 25.0% |

2.2.1.3 样品净化条件的确定

农业部 783 号公告-5-2006 标准中采用中性氧化铝柱进行净化，且该柱需要进行甲醇湿法填充，比较繁琐和费时。因此在重新确定提取条件下，本标准采用商品 Agilent 中性氧化铝柱进行了净化效果和回收试验，并与直接稀释法、HLB 小柱净化法进行了比较，其中中性氧化铝柱规格为 1 g，6 mL，HLB 小柱规格 500 mg，6 mL。

具体净化方法如下：

直接稀释法：吸取 0.2 mL 提取液和 0.8 mL 0.1% 甲酸溶液混合，过滤膜后进样分析。

中性氧化铝小柱净化方法：取 5 mL 提取液过已经 5 mL 甲醇活化的中性氧化铝小柱，等提取液全部过柱后用 4 mL 甲醇洗脱，收集全部洗脱液后定容至 10.00 mL，混匀，吸取 0.4 mL 净化液和 0.6 mL 0.1% 甲酸溶液混合，过滤膜后进样分析。

HLB 小柱净化方法：同中性氧化铝小柱净化方法。

进样梯度条件如表 6，加标提取液（加标浓度为 1.0 mg/L）经不同净化方式处理得到的液相色谱图如图 1 所示（标准溶液二硝托胺出峰时间约 4 min）。

从图中可知，中性氧化铝柱和 HLB 小柱对鸡配合饲料、鸡浓缩饲料及鸡复合预混合饲料均有一定的净化效果，其中对鸡配合饲料和鸡浓缩饲料净化效果较为明显。综合来看，3 种处理方式中净化效果最好的为中性氧化铝小柱净化，其次为 HLB 小柱净化（鸡配合饲料和鸡浓缩饲料目标峰附近存在其它杂质峰）。鸡配合饲料、鸡浓缩饲料及鸡复合预混合饲料在 3 种处理方式下净化回收率最高的为直接稀释法（101%、100%和 99.7%），其次为中性氧化铝小柱净化（99.6%、99.8%和 99.6%），最低为 HLB 小柱净化（98.5%、97.8%和 98.2%）。总体而言，从净化效果和回收率情况看，中性氧化铝小柱优于 HLB 小柱。

表 6 流动相梯度洗脱条件

| 时间（min） | 0.1% 甲酸溶液（%） | 乙腈（%） |
|---------|--------------|-------|
| 0 | 80 | 20 |
| 0.5 | 80 | 20 |
| 4.0 | 65 | 35 |
| 5.5 | 30 | 70 |
| 6.0 | 30 | 70 |
| 6.1 | 80 | 20 |
| 8.0 | 80 | 20 |

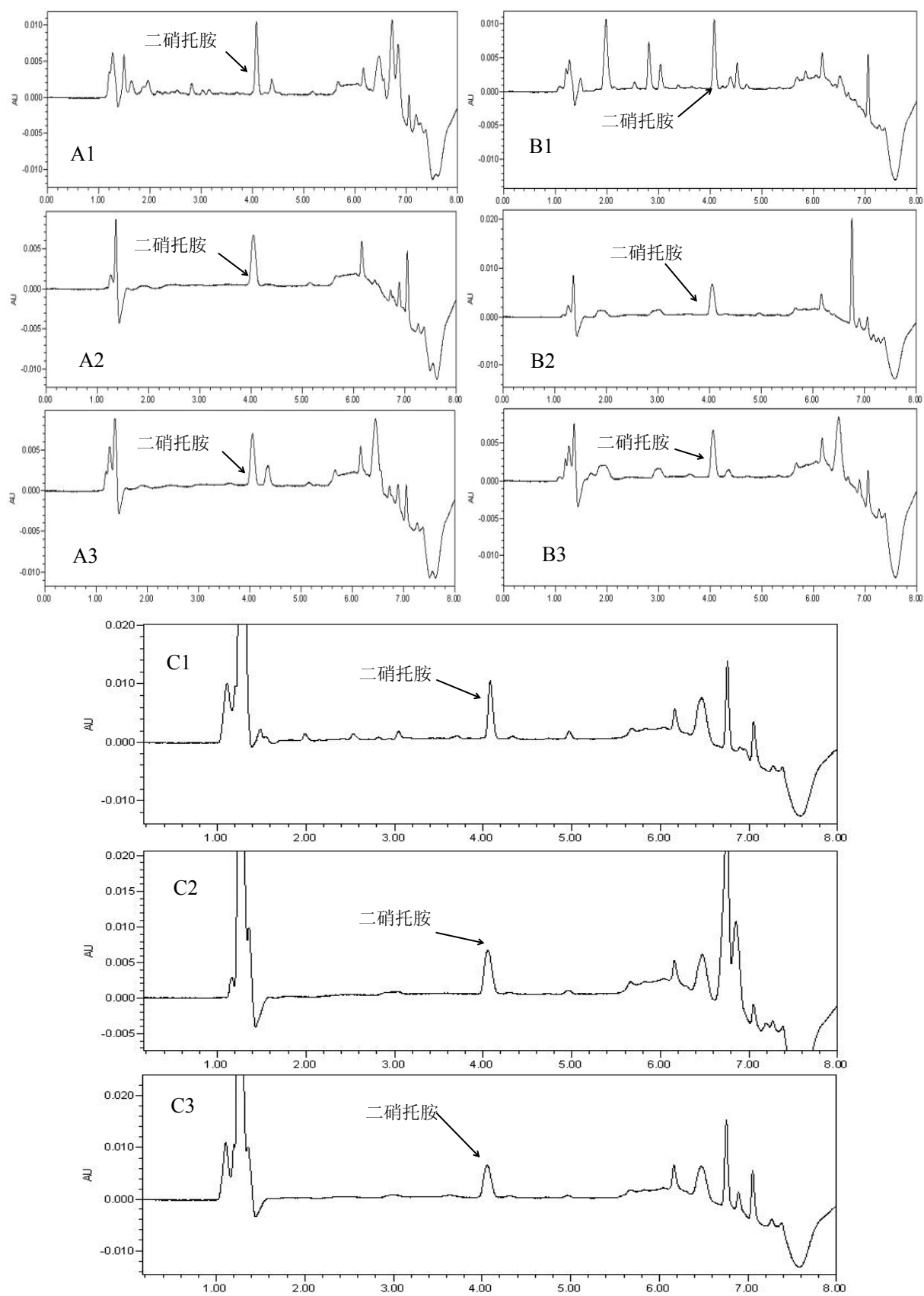
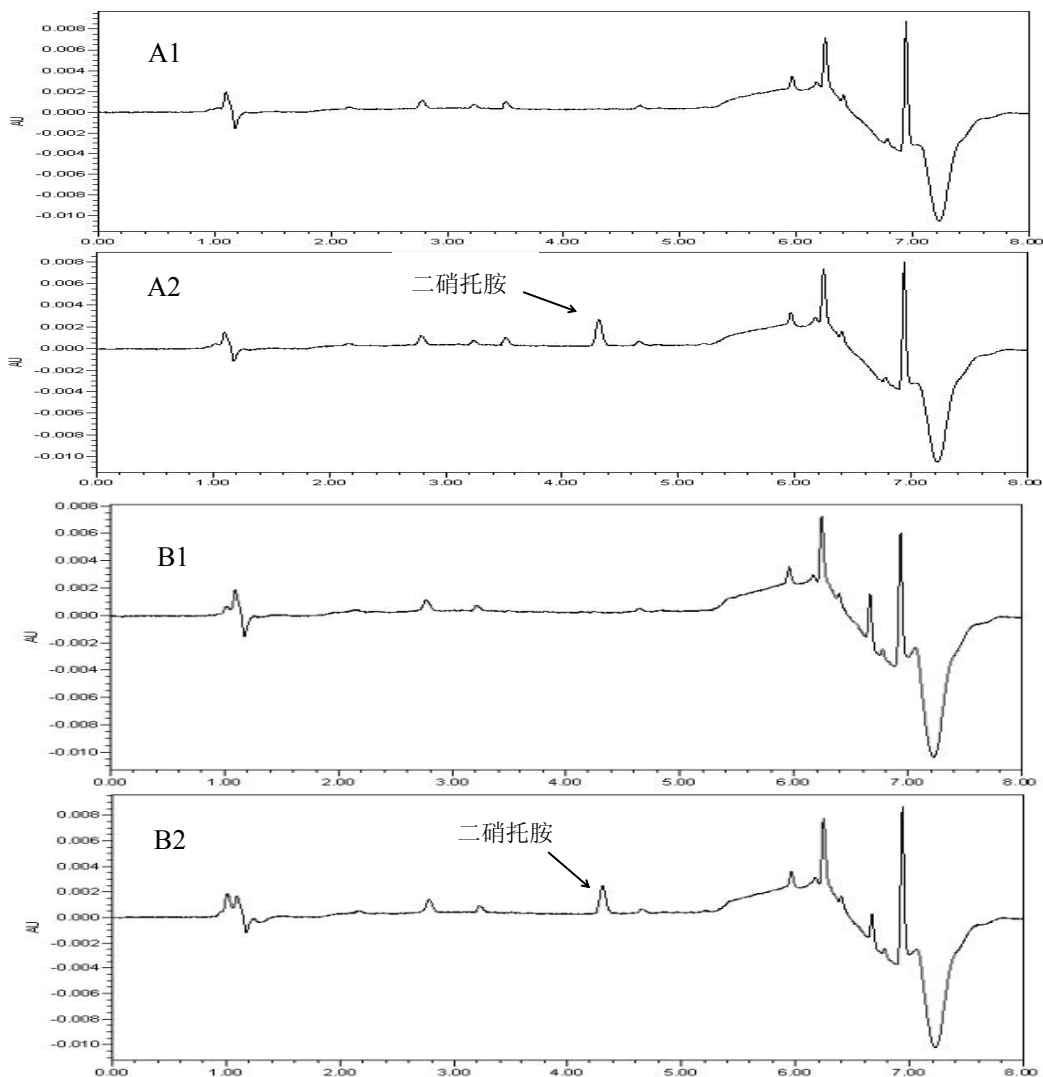


图 1 鸡配合饲料(A)、浓缩饲料(B)、预混合饲料(C)不同净化方式的液相色谱图 (1. 直接稀释法; 2. 中性氧化铝小柱净化; 3. HLB 小柱净化)

但是，当进样溶液为纯有机溶剂或有机溶剂比例高于流动相初始比例时，在超高效液相色谱仪（UPLC）上进样峰形相对较差。而若采取直接吸取 200 μL 净化上清液稀释进样（与流动相初始比例一致）的方法，此时配合饲料（牛精料补充料）和浓缩饲料、预混合饲料的稀释倍数分别为 80 倍和 100 倍（为原标准方法对应饲料的 6.4 倍和 2 倍），灵敏度无法满足要求。因此，对过中性氧化铝柱后净化液采用吹干后复溶的方法进行实验，具体为：过柱后取 1.0 mL 净化液氮吹至干，用乙腈：0.1%甲酸溶液（2：8,v/v）复溶后再进行分析。而在高效液相色谱仪（HPLC）上检测时（流动相为乙腈：0.1%甲酸溶液（80:20,v/v）等度洗脱），净化上清液直接进样峰形较好，但进样体积为 10 μL 时，灵敏度无法满足要求，故进样体积调整为 20 μL 。调整后的空白样品色谱图和 1.0 mg/kg 添加色谱图见图 2 和图 3。可见，1.0 mg/kg 添加下二硝托胺出峰较好。总体而言，虽然直接稀释法较方便，但考虑到方法延续性及可能存在的样品差异性，最终选择中性氧化铝小柱净化。



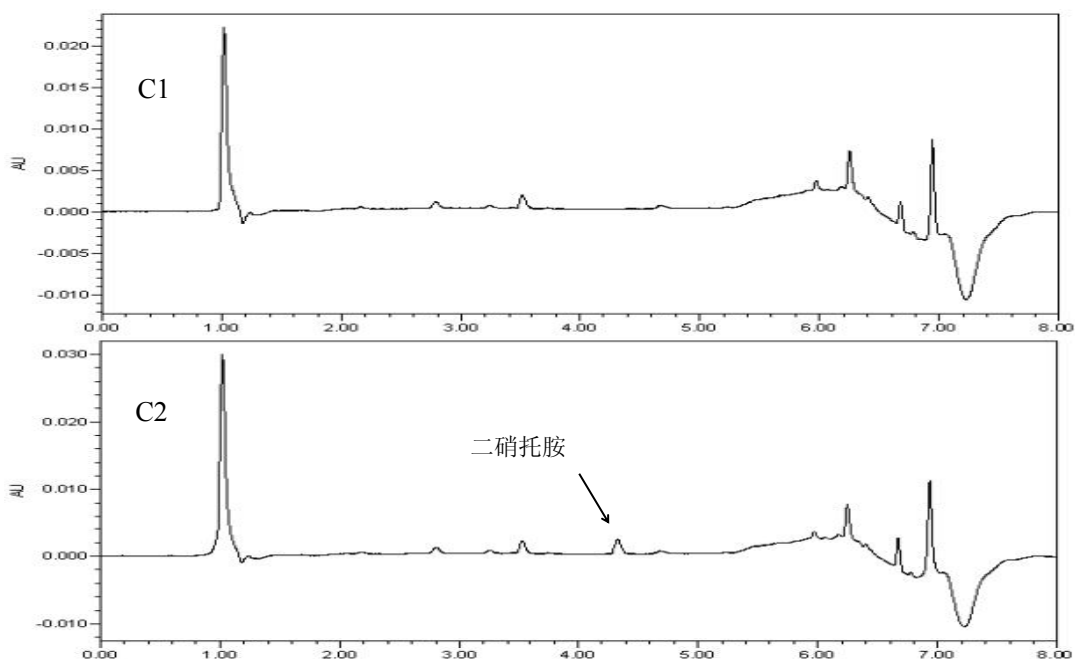


图2 鸡配合饲料(A)、浓缩饲料(B)、预混合饲料(C)氮吹复溶的超高效液相色谱图 (1. 空白样品; 2. 添加样品 1.0 mg/kg)

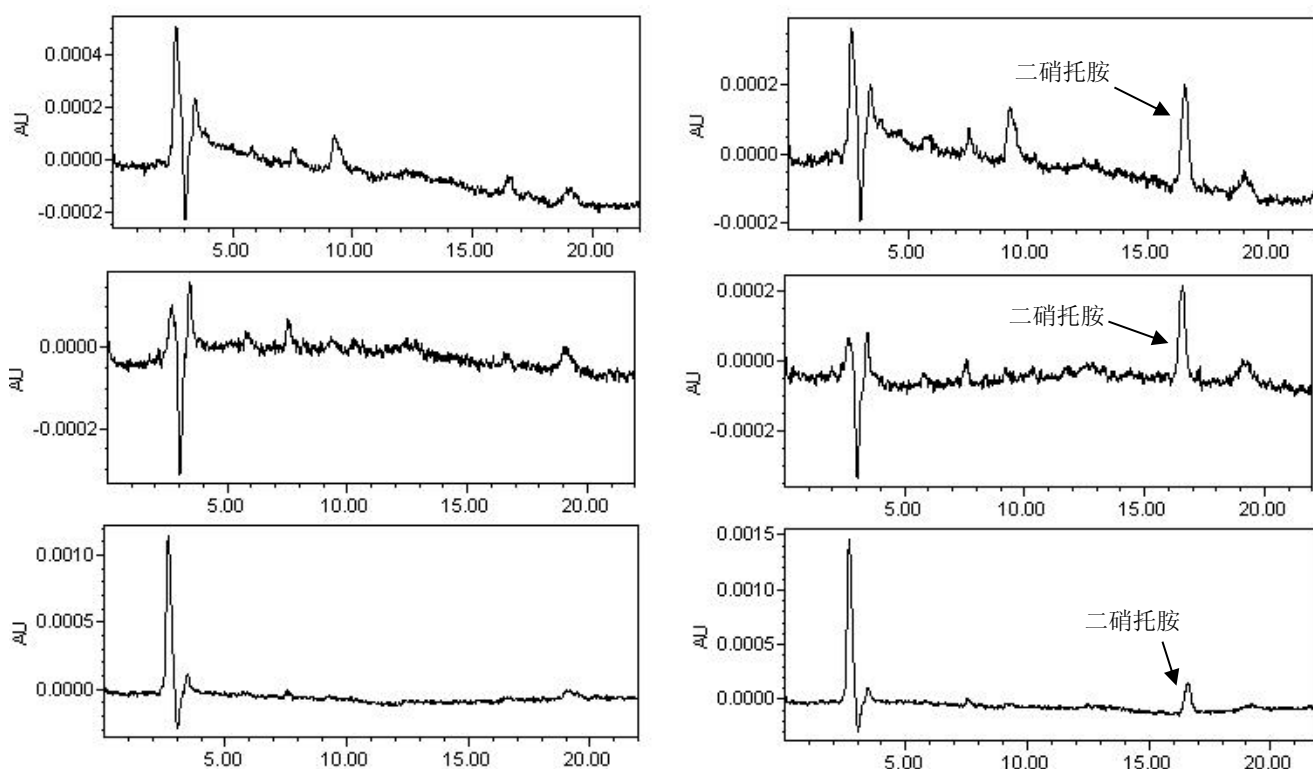


图3 鸡配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料（自上而下）高效液相色谱图（左：空白样品；右：添加样品 1.0 mg/kg）

考虑到浓缩饲料和添加剂预混合饲料实际样品中药物浓度可能相对更高，减少了净化用提取液的用量，同时为兼顾仪器灵敏度，净化过程稀释倍数保持不变。具体为：取

2.5 mL 提取液过已经 5 mL 甲醇活化的中性氧化铝小柱，等提取液全部过柱后用 2 mL 甲醇洗脱，收集全部洗脱液后定容至 5.00 mL。混匀后取 1.0 mL 氮吹至干，用 1.0 mL 乙腈：0.1%甲酸溶液（2：8,v/v）复溶后进行 UPLC 分析。结果表明，不同饲料中净化回收率均大于 95%，且净化效果良好（图 4）。

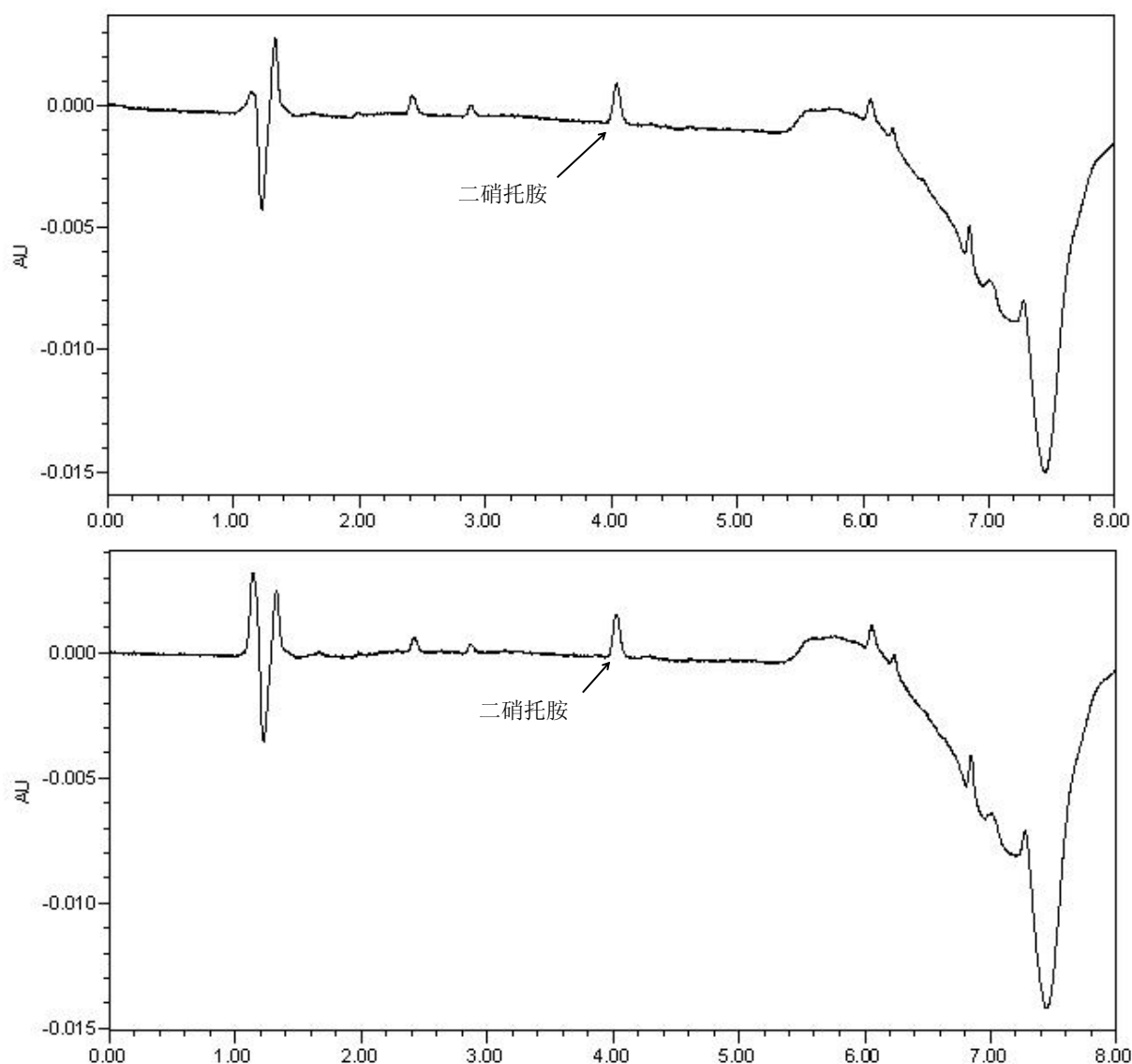


图 4 鸡浓缩饲料(上)和预混合饲料(下) 2.5mL 上样量的超高效液相色谱图

2.2.2 液相色谱法中液相色谱条件的确定

2.2.2.1 超高效液相色谱法

对二硝托胺在 210-800nm 进行了光谱分析，详见图 5。从图中可见二硝托胺在 245.9 nm 有 1 个吸收峰，考虑到与标准的一致性，对二硝托胺的检测波长设定为 245 nm。

试验选取 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm)、Agilent Eclipse Plus C₁₈(2.1×100 mm, 1.8 μm)、Waters XBridge C₁₈(2.1×150 mm, 3.5 μm)3 种 C₁₈ 色谱柱利用

农业部 783 号公告-5-2006 中的流动相比例进行分析，二硝托胺出峰较快，易受干扰，而经过优化的梯度条件（见表 6）分析，二硝托胺的保留时间调至 4-6 min 之间，不易受干扰（图 6），3 种色谱柱上二硝托胺出峰均较好，本试验选择了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（2.1×100 mm，1.7 μm）进行后续实验，流动相组成和梯度条件详见表 6，进样体积为 10 μL。

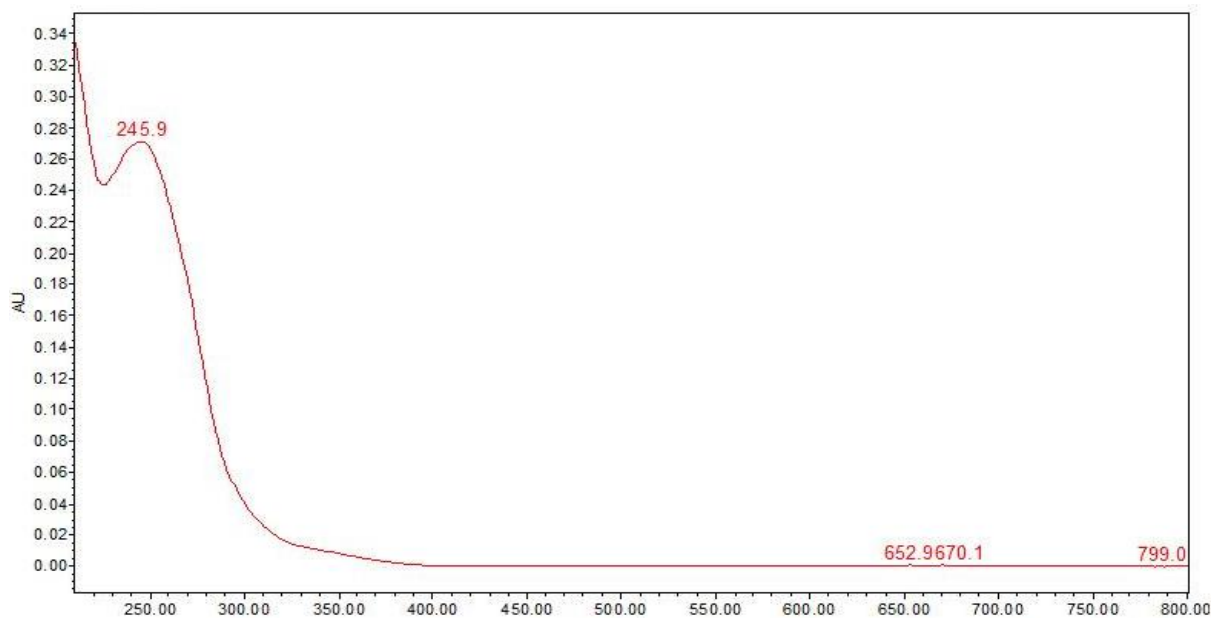


图 5 二硝托胺光谱图

此外，对该液相色谱分析条件的抗干扰情况进行了研究。选取了目前常用的 13 种抗球虫药物盐酸氯苯胍、氨丙啉、地克珠利、甲基盐霉素、拉沙洛菌素、马杜霉素、海南霉素、盐霉素、莫能菌素、赛杜霉素、磺胺喹噁啉、氯羟吡啶和常山酮以及 37 种其他药物（磺胺嘧啶、磺胺噻唑等 17 种磺胺类、氧氟沙星、恩诺沙星、诺氟沙星等 8 种沙星类和甲硝唑、氟苯尼考、氯霉素等）进行干扰试验。分别配制不含和含有二硝托胺的混合溶液，各组分浓度均为 1.0 mg/L，进样检测。结果表明，在该液相色谱条件下氨丙啉出峰最早，盐酸氯苯胍、地克珠利未出峰，二硝托胺和所有药物均有较好的色谱分离，色谱图详见图 7。

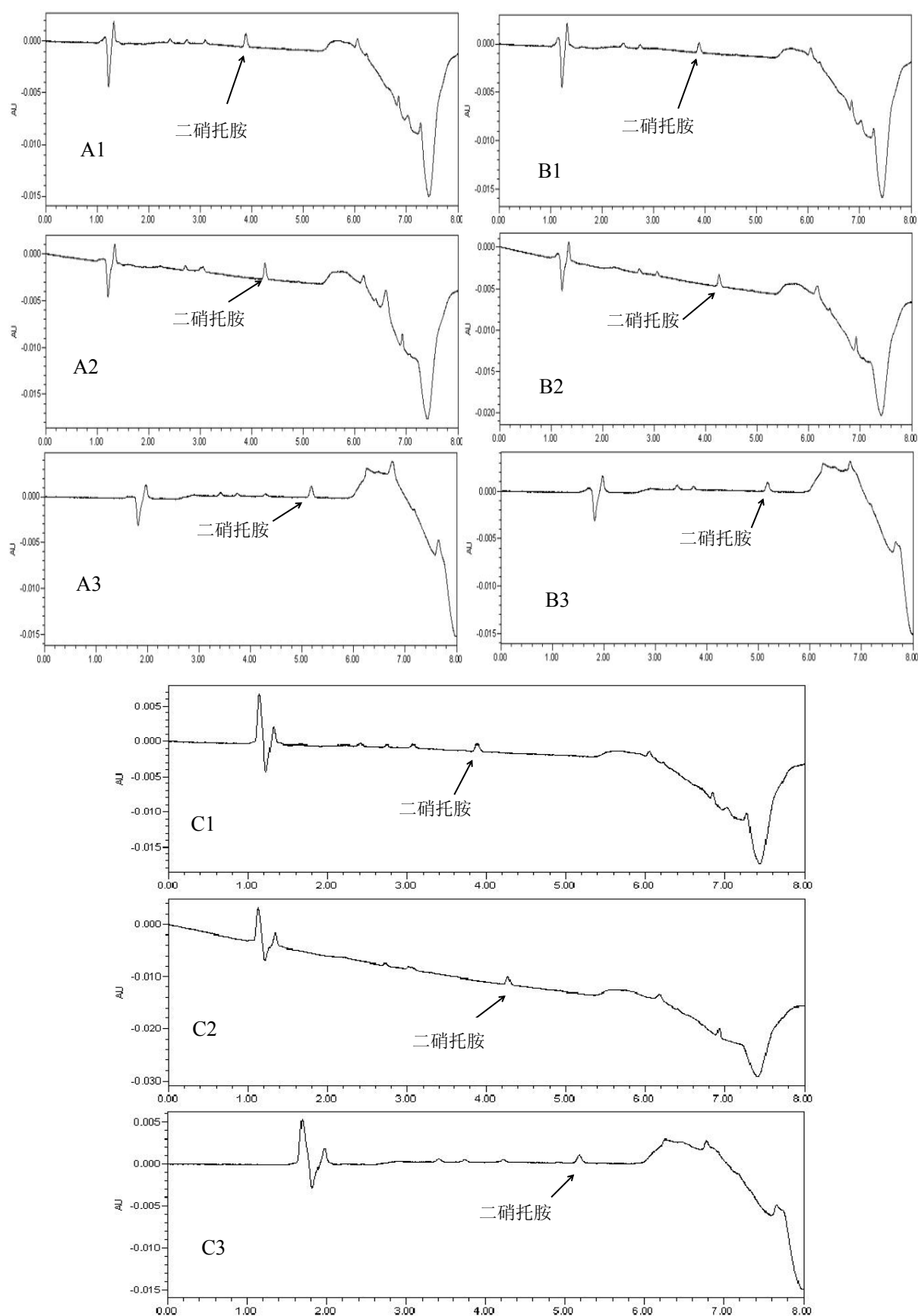


图6 猪配合饲料(A)、浓缩饲料(B)、预混合饲料(C)不同色谱柱分离的超高效液相色谱图(1.C₁₈-1.7 μm; 2. C₁₈-1.8 μm; 3. C₁₈-3.5 μm)

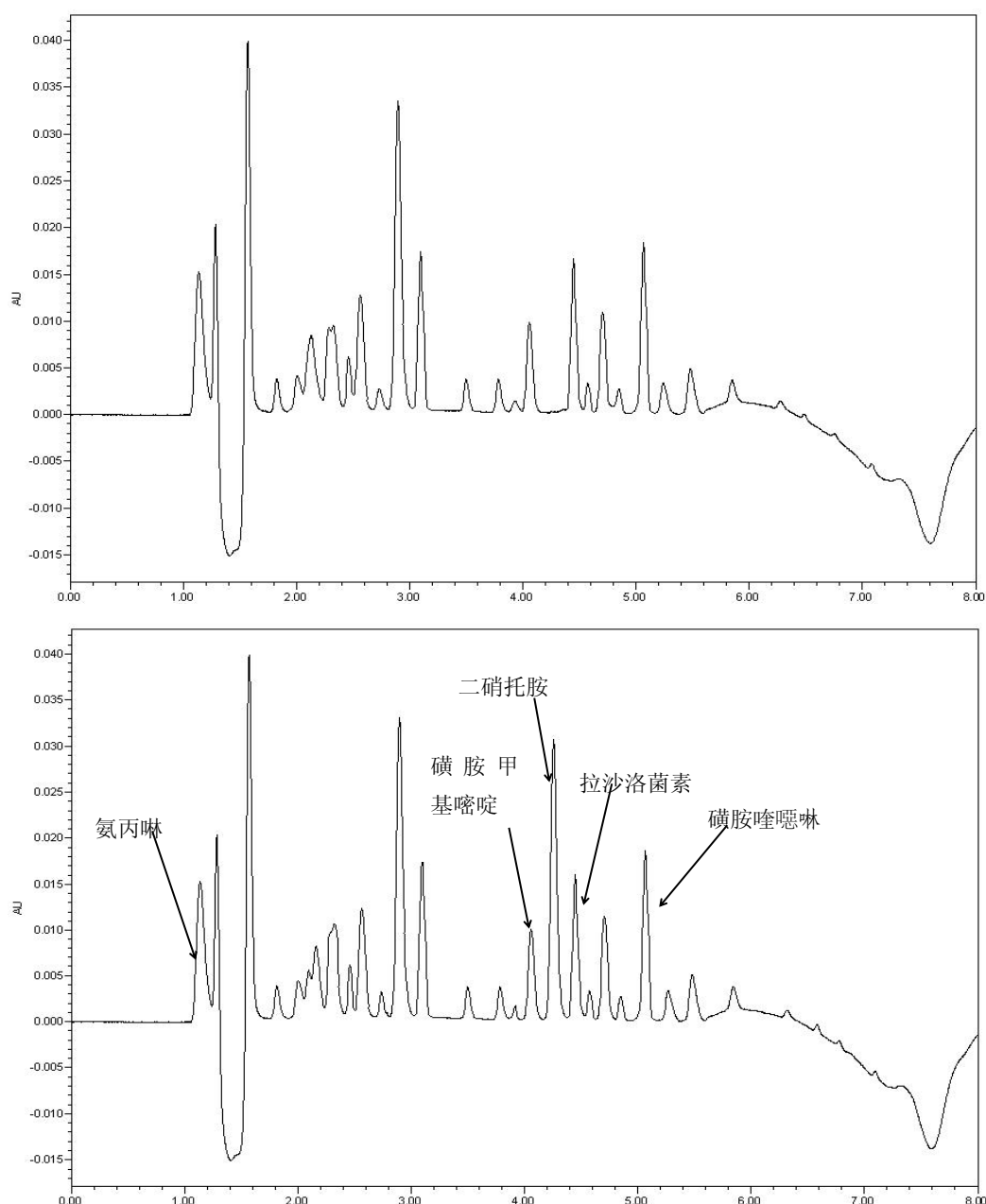


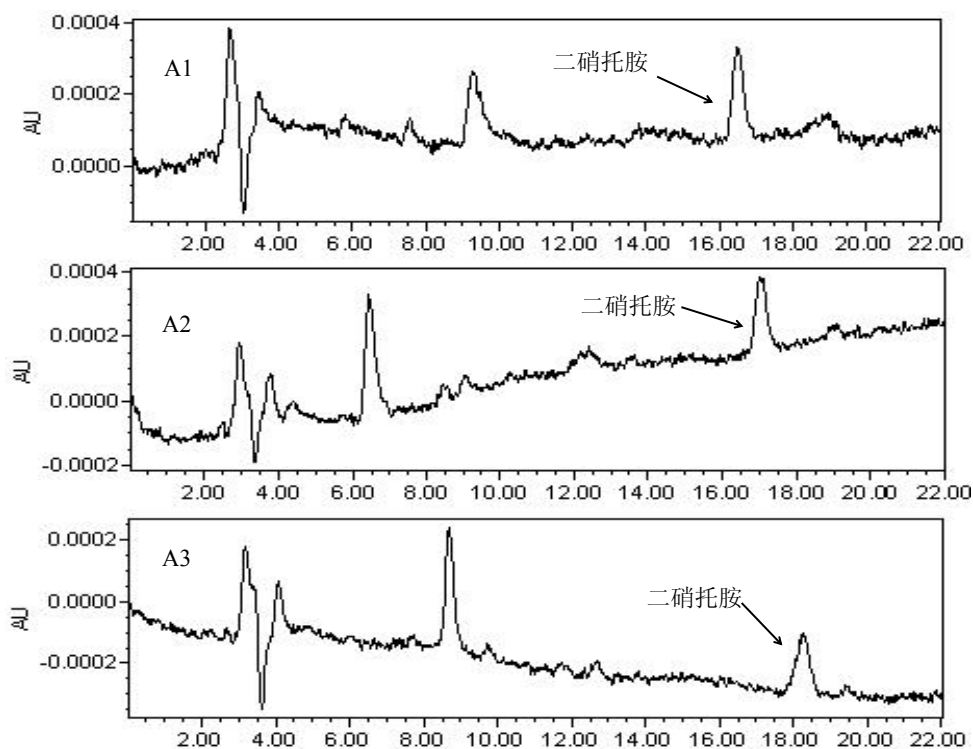
图 7 液相色谱分析干扰试验色谱图（上图：不含二硝托胺；下图：含二硝托胺）

2.2.2.2 高效液相色谱法

所采用的高效液相色谱为 Waters2695 液相色谱仪，检测波长同样为 245 nm，利用常规 C₁₈ 色谱柱（Kromasil 100-5C₁₈，4.6×250 mm，5 μm），采用乙腈：0.1%甲酸溶液（80:20,v/v）等度洗脱，此时二硝托胺保留时间为 16.5 min 左右，各饲料样品（1.0 mg/kg 添加样品）中均无杂质峰干扰。另选择了 Welch Ultimate XB-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm)、Welch Ultimate AQ-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm)2 种不同的 C₁₈ 色谱柱在相同色谱条件下进样检测，结果表明（图 8），各饲料基质中二硝托胺在不同色谱柱上无杂质干扰、峰形均较好。

本试验选择常规的 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱 (4.6×250 mm, 5.0 μm) 进行后续试验, 流动相为乙腈: 0.1%甲酸溶液 (80:20,v/v) 等度洗脱, 进样体积为 20 μL。

此外, 对该液相色谱分析条件的抗干扰情况进行了研究。选取了目前常用的 13 种抗球虫药物盐酸氯苯胍、氨丙啉、地克珠利、甲基盐霉素、拉沙洛菌素、马杜霉素、海南霉素、盐霉素、莫能菌素、赛杜霉素、磺胺喹噁啉、氯羟吡啶和常山酮以及 37 种其他药物 (磺胺嘧啶、磺胺噻唑等 17 种磺胺类、氧氟沙星、恩诺沙星、诺氟沙星等 8 种沙星类和甲硝唑、氟苯尼考、氯霉素等) 进行干扰试验。分别配制不含和含有二硝托胺的混合溶液 (各组分浓度均为 1.0 mg/L), 进样检测。结果表明, 在该液相色谱条件下氨丙啉出峰最早, 盐酸氯苯胍、地克珠利未出峰, 二硝托胺和所有药物均有较好的色谱分离, 色谱图详见图 9。



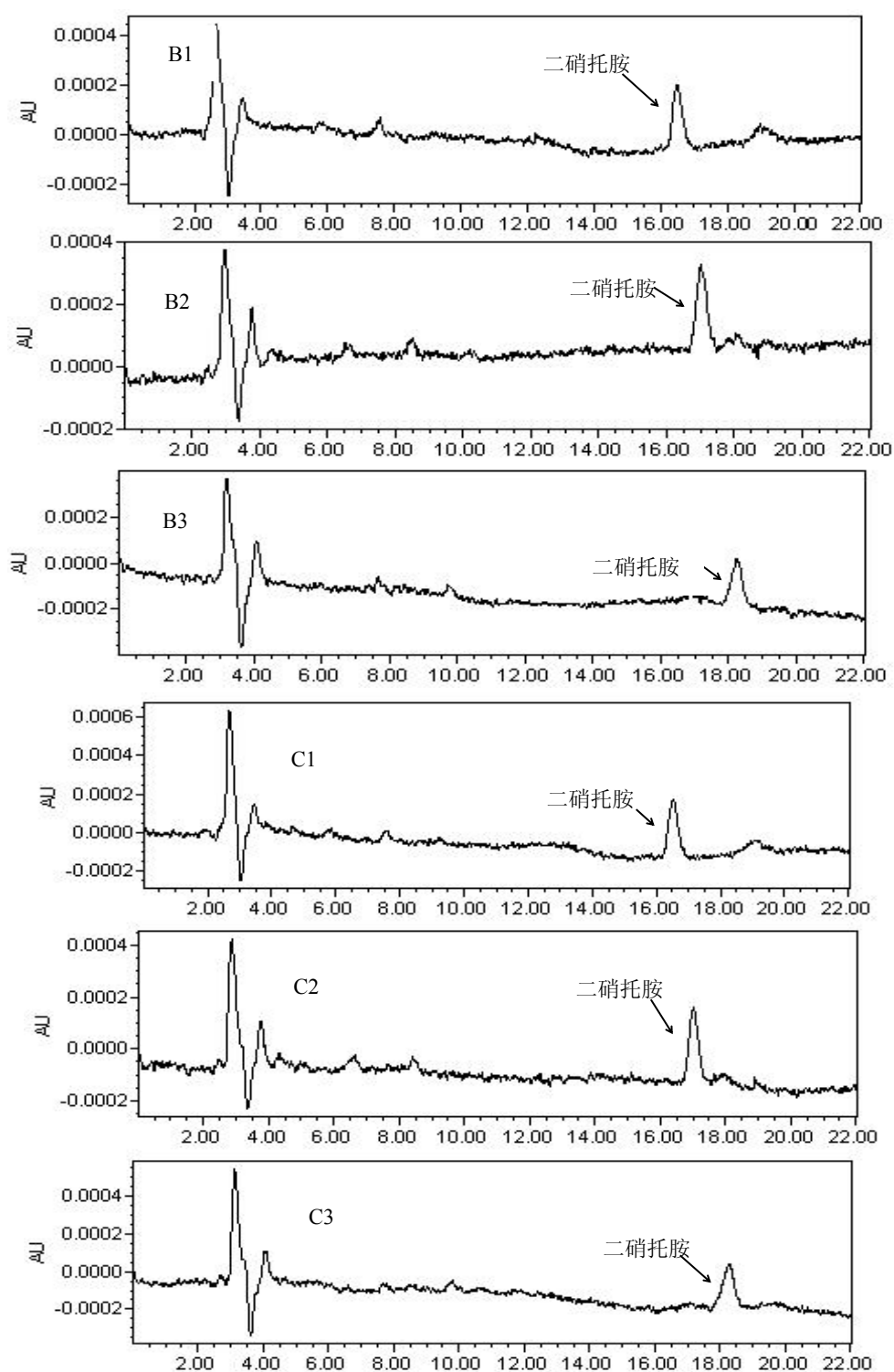


图 8 猪配合饲料(A)、浓缩饲料(B)、预混合饲料(C)不同色谱柱分离的高效液相色谱图 (1.Kromasil 100-5C₁₈; 2. Welch Ultimate XB-C₁₈; 3. Welch Ultimate AQ-C₁₈)

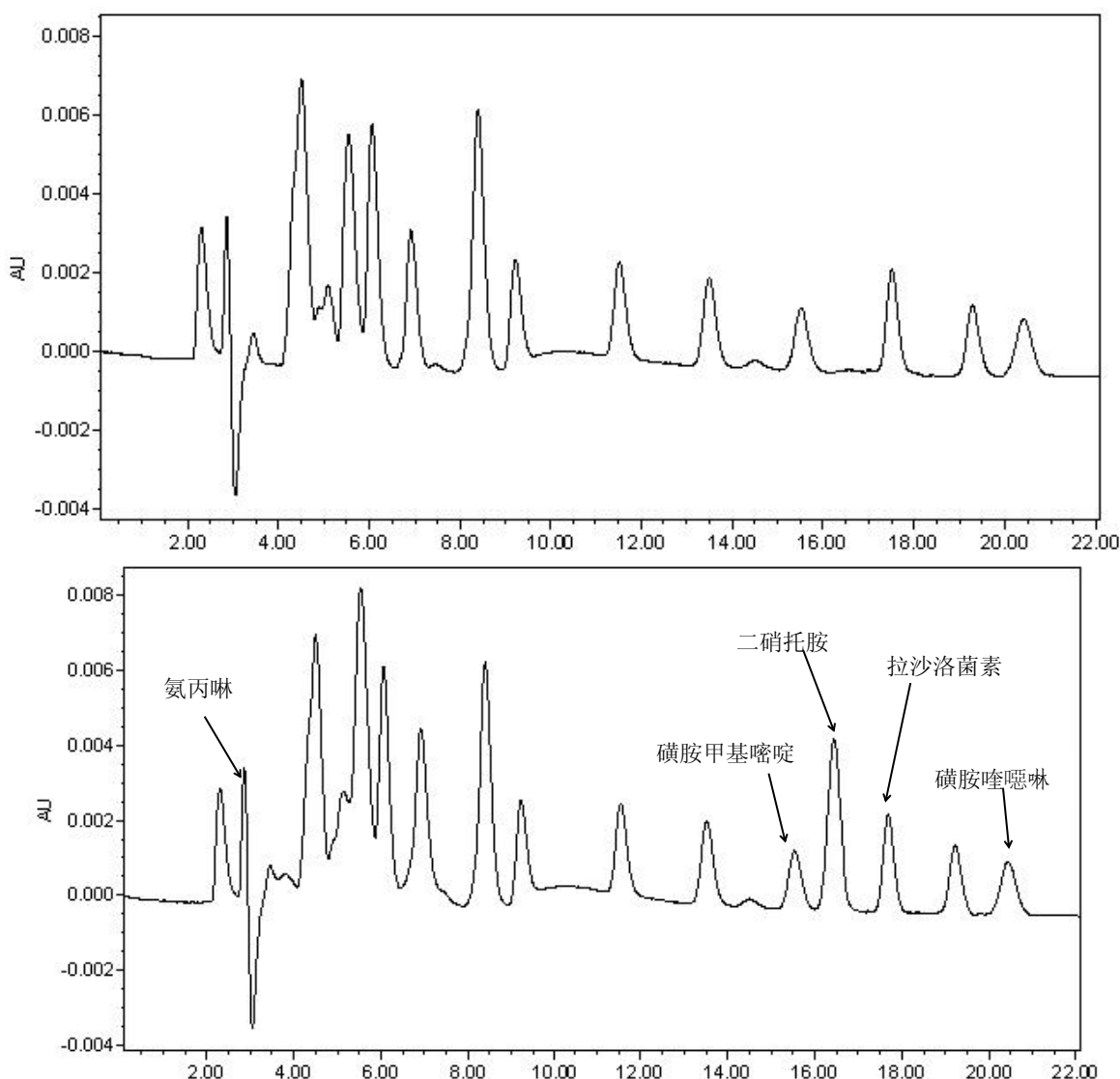


图9 高效液相色谱分析干扰试验色谱图（上图：不含二硝托胺；下图：含二硝托胺）

2.2.3 液相色谱串联质谱法仪器条件的确定

二硝托胺的化学结构式详见图10。实验采用“T”三通方式，对二硝托胺的质谱条件进行优化(图11)。在ESI正离子模式下，二硝托胺(1.0 mg/L)在三种流动相条件(20 mM 乙酸胺/乙腈，0.1%甲酸溶液/乙腈和水/乙腈，体积比均为8:2)下响应均较低，无法获得满意结果。而在ESI负离子模式下，二硝托胺在上述三种流动相条件下响应均较好，以20 mM乙酸胺/乙腈为流动相的响应值约为其它两种流动相条件下响应值的2倍，但考虑到液质法与液谱法样品可以共用，选择0.1%甲酸溶液/乙腈作为流动相。ESI-模式下，224.1>76.9、224.1>150.9、224.1>181.1三组离子对碎片特征明显，224.1>150.9响应略低于224.1>76.9，224.1>181.1响应最高，约是224.1>76.9的3~4倍，但其对应同位素内标子离子229.1>185.1目标峰后基线有一定升高。综合比较灵敏度及杂质干扰（图12）等情

况后，最终确定了如下MRM条件。其它经过优化的条件为：毛细管电压：2.5 KV；离子源温度：150℃；脱溶剂气温度：500℃；锥孔气流速：50 L/h；脱溶剂气流速：1000 L/h。其它条件详见表7。

表 7 二硝托胺及其内标的多反应监测（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) |
|----------------------|--------------------------|----------|-----------|
| 二硝托胺 | 224.1>76.9 | 22 | 22 |
| | 224.1>181.1 ^a | 22 | 10 |
| 二硝托胺-D5 | 229.1>185.1 | 22 | 10 |
| ^a 为定量离子对。 | | | |



图 10 二硝托胺的化学结构式

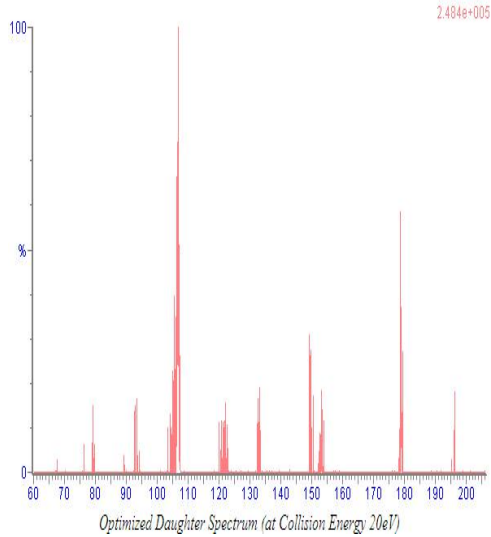


图 11 二硝托胺离子扫描图

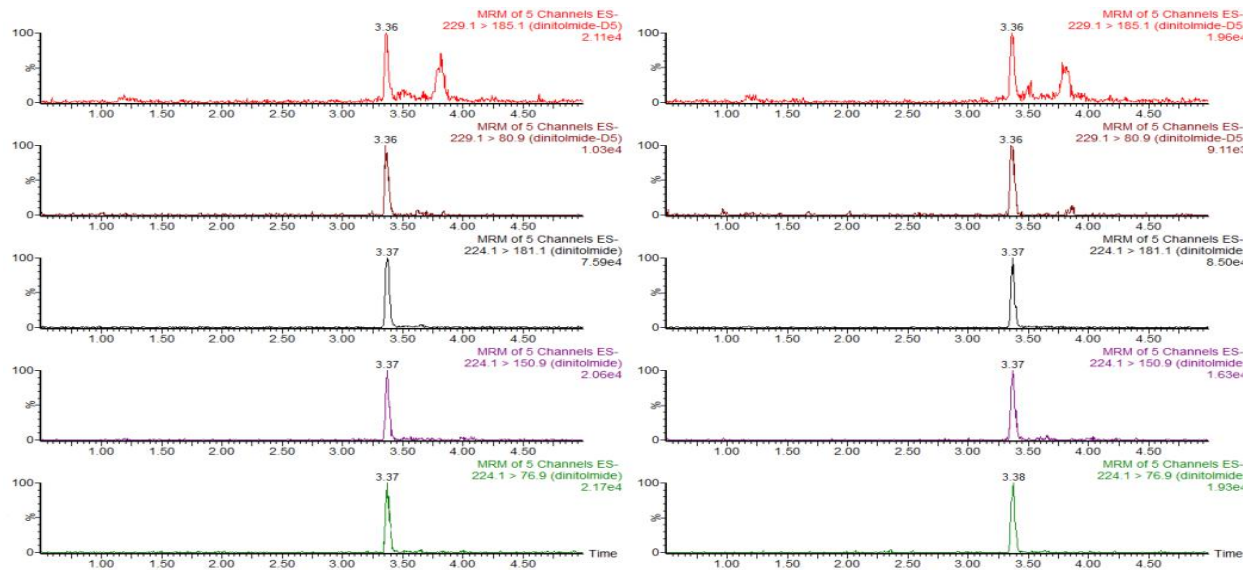


图 12 鸡预混合饲料和鸡浓缩饲料基质标准溶液二硝托胺离子 MRM 色谱图

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态电离，因此流动相的组成和配比不但影响目标化合物的色谱行为，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。实际上进行 LC-MS/MS 方法研究的时候，原打算梯度条件和液相方法（表 6）一致，但发现二硝托胺的响应较低，于是调整了梯度条件，让有机相（乙腈）比例提高的速度加快，从而提高了二硝托胺的离子化效率。优化后的梯度洗脱条件详见表 8。其他条件如下：进样量：10 μ L；柱温：35℃。

表 8 液相色谱串联质谱法梯度洗脱程序

| 时间（min） | 流速（mL/min） | A（%） | B（%） |
|---------|------------|------|------|
| 0 | 0.2 | 80 | 20 |
| 0.5 | 0.2 | 80 | 20 |
| 3.0 | 0.2 | 20 | 80 |
| 3.5 | 0.2 | 20 | 80 |
| 3.6 | 0.2 | 80 | 20 |
| 5.0 | 0.2 | 80 | 20 |

2.2.4 定量方法的确定

对于液相色谱法，定量采用外标法定量；而对于液相色谱串联质谱法，分别比较了提取前加入内标、提取后加入内标和不加内标（基质匹配外标法）三种条件下的定量情况。分别以三种不同的方法对不同饲料（鸡配合饲料、鸡浓缩饲料及鸡复合预混合饲料）中不同浓度（125 mg/kg、25 mg/kg和1.0 mg/kg）下的添加回收率进行定量。具体为：

提取前加入内标：样品中加入同位素内标后（浓缩饲料和预混合饲料加入40 μ L浓度为25 mg/L同位素内标溶液，配合饲料加入100 μ L浓度为25 mg/L同位素内标溶液），以上述确定的提取净化条件处理。配制含内标浓度为0.025 mg/L的溶剂标准系列工作溶液（0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L、0.20 mg/L和0.50 mg/L）测定后进行定量。

提取后加入内标：样品不加入同位素内标，以上述确定的提取净化条件处理后加入含内标浓度0.025 mg/L的甲酸-乙腈溶液复溶。同提取前加入内标进行标准溶液配制进样分析后定量。

不加内标（基质匹配外标法）：样品不加入同位素内标，以上述确定的提取净化条件处理。配制浓度分别为0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L、0.20 mg/L和0.50 mg/L的不同饲料的系列基质标准溶液进行定量。

外标法定量：配制浓度分别为0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L、0.20 mg/L和0.50 mg/L的标准溶液进行定量。

通过结果（表9）可知，同位素内标法定量时回收率为98.9%~101.0%，提取后加入内标时回收率为91.5%~95.0%，基质匹配外标法定量时回收率为90.8%~95.5%。可见，经提取前加内标校正后，回收率更接近100%，且最高用量下内标费用经计算每个样品为0.3元左右（25 mg内标费用2780元），但在进行高浓度添加试验和后续的阳性样品检测中发现，当样品含量稍高时（浓缩饲料和添加剂预混合饲料高于5.0 mg/kg，其他饲料高于4.0 mg/kg），即需要同步处理含有内标的空白样品基质溶液进行校准，导致实验非常繁琐，且考虑到经试验后所有种类饲料的基质效应不强（见表10），外标法定量回收率均较好能满足要求。因此，综合考虑方法可靠性、方便性以及成本等因素后决定液相色谱串联质谱法采用外标法定量。

表 9 不同定量方法的回收率

| 添加浓度 | 定量方法 | 鸡配合饲料% | 鸡浓缩饲料% | 鸡复合预混合饲料% |
|-----------|---------|--------|--------|-----------|
| 1.0 mg/kg | 提取前加内标 | 98.9 | 99.5 | 100.5 |
| | 提取后加内标 | 91.5 | 92.1 | 94.5 |
| | 基质匹配外标法 | 90.8 | 92.8 | 94.7 |
| | 外标法 | 87.5 | 91.9 | 99.3 |
| 25 mg/kg | 提取前加内标 | 99.6 | 101.0 | 99.3 |
| | 提取后加内标 | 92.2 | 93.5 | 93.1 |
| | 基质匹配外标法 | 91.6 | 94.3 | 92.6 |
| | 外标法 | 88.0 | 93.4 | 97.2 |
| 125 mg/kg | 提取前加内标 | 99.8 | 99.8 | 100.1 |
| | 提取后加内标 | 95.0 | 93.1 | 93.5 |
| | 基质匹配外标法 | 95.5 | 92.2 | 93.7 |
| | 外标法 | 92.0 | 91.3 | 98.4 |

表 10 不同种类饲料的基质效应

| 饲料种类 | 标准曲线方程 | 相关系数 r^2 | 基质效应 |
|--------|-------------------------|------------|------|
| 纯溶剂 | $y=2074137.35x+7546.71$ | 0.9993 | / |
| 鸡配合饲料 | $y=2001168.22x+5220.16$ | 0.9993 | 0.96 |
| 鸡浓缩饲料 | $y=2063589.63x+5938.93$ | 0.9991 | 0.99 |
| 鸡预混合饲料 | $y=2175028.59x+7702.85$ | 0.9993 | 1.05 |
| 猪配合饲料 | $y=2005326.75x+3706.56$ | 0.9996 | 0.97 |
| 猪浓缩饲料 | $y=2052328.38x+4895.07$ | 0.9995 | 0.99 |
| 猪预混合饲料 | $y=2108465.43x+6658.29$ | 0.9995 | 1.02 |
| 鱼配合饲料 | $y=2003644.13x+2973.99$ | 0.9992 | 0.97 |
| 鱼预混合饲料 | $y=2038467.08x+8159.33$ | 0.9998 | 0.98 |
| 牛精料补充料 | $y=2025850.50x+5643.78$ | 0.9997 | 0.98 |
| 兔配合饲料 | $y=2025614.35x-1251.21$ | 0.9999 | 1.02 |
| 兔浓缩饲料 | $y=1958311.50x+978.36$ | 0.9992 | 0.98 |
| 兔预混合饲料 | $y=1976614.58x+2039.65$ | 0.9990 | 0.99 |

注：其中兔饲料对应纯溶剂标准曲线方程为： $y=1989502.02x+671.82(r^2=0.9999)$ 。

2.2.5 标准溶液稳定性试验

对二硝托胺的标准储备液和标准中间液进行了稳定性考察，结果详见图 13，同位素内标标准储备液和标准中间液有效期参照二硝托胺的标准储备液和标准中间液制定。同时根据欧盟 Commission recommendation 1999/333/EC 的规定（欧盟规定测定结果与 0 d 结果相比比例为 95-105%具有稳定性）来进行判定是否稳定。

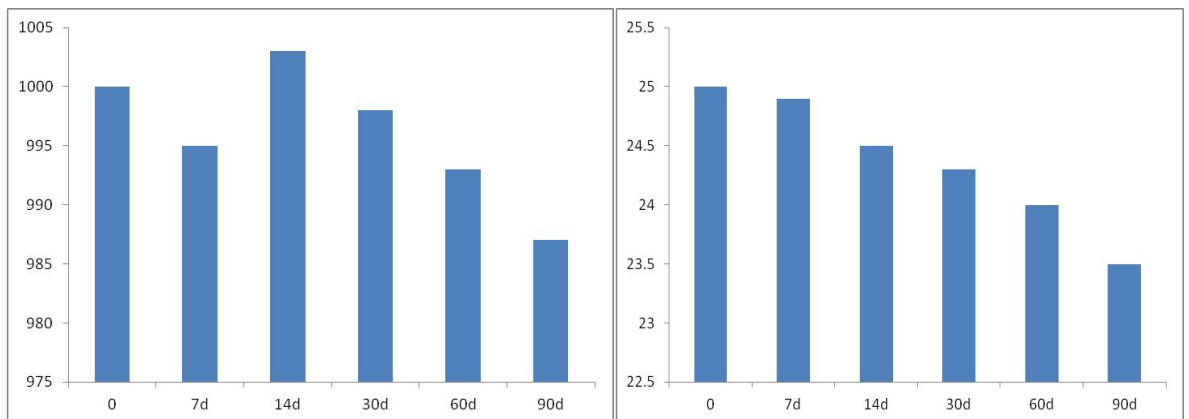


图 13 二硝托胺标准储备液（左）和标准中间液（右）浓度随时间变化图

从图13可见，二硝托胺标准储备液在90 d的时间内，浓度随时间变化范围均在95-105%范围内；标准中间液在90 d的时间内，浓度随时间变化范围均在95-105%范围内60 d的时间内，浓度随时间变化范围在95-105%范围内，但在90 d时超出了该范围；实验考虑到实验数据、经济成本，将标准储备液和中间液的有效期限分别确定为3个月和1个月。

2.3 修订前后技术内容的对比

通过前处理条件和仪器条件优化后，得到的方法标准与原农业部783号公告-5-2006方法标准变化较大，主要变化详见表11。

表 11 本方法与原标准方法对照表

| 序号 | 农业部783号公告-5-2006 | 本方法 |
|----|---------------------------|-------------------------------|
| 1 | 无液相色谱串联质谱法 | 增加液相色谱串联质谱法 |
| 2 | 液谱法无检测限 | 增加检测限0.30 mg/kg |
| 3 | 适用范围（配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料） | 适用范围（配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和精料补充料） |
| 4 | 称样量（配合饲料20g，浓缩饲料和预混合饲料5g） | 称样量（配合饲料5g，浓缩饲料和预混合饲料2g） |
| 5 | 提取溶剂为甲醇 | 提取溶剂为0.5%氨水甲醇 |
| 6 | 提取方式为50℃水浴提取 | 提取方式为常温振荡提取 |
| 7 | 定容方式为净化液直接定容 | 超高效液相色谱和液相色谱串联质谱定容方式为净化液氮吹后定容 |
| 8 | 流动相为乙腈和水 | 流动相为乙腈和0.1%甲酸溶液 |
| 9 | 流动相等度洗脱 | 高效液相色谱法等度洗脱，其它为梯度洗脱 |
| 10 | 液谱法流动相等度洗脱比例为30+70 | 高效液相色谱法流动相等度洗脱比例为20+80 |
| 11 | 进样体积为10 μL | 高效液相色谱法为20 μL，其它为10 μL |

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效益

3.1 试验验证的分析

3.1.1 液相色谱法（超高效液相色谱法）

3.1.1.1线性实验

准确移取适量标准中间溶液（25.0 mg/L），用适量 0.1%甲酸溶液和乙腈稀释配制浓度分别为 0.015 mg/L、0.050 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、2.0 mg/L 和 5.0 mg/L 标准系列工作溶液，进行色谱分析，以二硝托胺的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，所得标准曲线方程为 $y=153266x+236.2$ ，相关系数(r^2)为 0.9999，说明二硝托胺在 0.015-5.0 mg/L 浓度范围内线性良好，能用于二硝托胺液相色谱定量分析。

3.1.1.2检测限和定量限的确定

液相色谱分析以保留时间定性，试样溶液中二硝托胺保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中二硝托胺的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内，而本方法标准在试验过程中试样溶液中二硝托胺保留时间应与标准系列溶液中二硝托胺相对偏差均小于 0.5%。

方法的检测限和定量限的信噪比应高于 $S/N=3:1$ 和 $10:1$ ，经计算所有添加 1.0 mg/kg 的样品的 S/N （表 12）在 26-39 之间，因此确定方法的定量限为 1.0 mg/kg，与农业部 783 号公告-5-2006 的定量限保持一致，考虑到样品和仪器差异检测限确定为 0.3 mg/kg。

表 12 饲料中添加 1 mg/kg 二硝托胺超高效液相色谱分析信噪比

| 饲料种类 | 信噪比 |
|--------|-----|
| 猪配合饲料 | 39 |
| 猪浓缩饲料 | 28 |
| 猪预混合饲料 | 29 |
| 鸡配合饲料 | 35 |
| 鸡浓缩饲料 | 27 |
| 鸡预混合饲料 | 30 |
| 鱼配合饲料 | 33 |
| 鱼预混合饲料 | 28 |
| 牛精料补充料 | 32 |
| 兔配合饲料 | 38 |
| 兔浓缩饲料 | 28 |

| | |
|--------|----|
| 兔预混合饲料 | 26 |
|--------|----|

3.1.1.3 方法的回收率和重现性

3.1.1.3.1 空白样品的筛选和定义

在确定了样品的前处理和仪器方法后，先进行了猪、鸡、兔和鱼配合饲料和预混合饲料、猪、鸡和兔的浓缩饲料、以及牛精料补充料空白样品的筛选，其中12种饲料空白样品数量分别为9、7、2、4、6、8、2、7、10、8、1和5个，其中有2个猪配合饲料检出二硝托胺（已用液相色谱串联质谱法确证为二硝托胺），其中1个样品浓度介于液相色谱法检测限和定量限之间，通过液相色谱测定结果为0.82 mg/kg，而通过液相色谱串联质谱测定为0.83 mg/kg，另外1个样品液相色谱和液相色谱串联质谱测定结果分别为62.6 mg/kg和62.5 mg/kg。

3.1.1.3.2 添加回收率实验结果

添加回收实验每批次内同一浓度做5次平行实验，进行3次重复，其中配合饲料（精料补充料）添加浓度为1.0 mg/kg、25 mg/kg、125 mg/kg和250 mg/kg，浓缩饲料添加浓度为1.0 mg/kg、25 mg/kg、125 mg/kg和1000 mg/kg，复合预混合饲料添加浓度为1.0 mg/kg、25 mg/kg、125 mg/kg和5000 mg/kg。其中低于250 mg/kg的样品用标准溶液添加，等于和高于250 mg/kg的样品用25%二硝托胺预混剂添加（二硝托胺预混剂含量经确定的提取条件测定，见表5，结果为25.0%，以此为准进行添加。250、1000、5000 mg/kg添加档分别添加 5.00 ± 0.05 、 8.00 ± 0.08 、 40.00 ± 0.2 mg预混剂后，涡旋混匀10 min，静置15 min后进行试验），回收实验中，当样品的上机液浓度超过回收率线性范围时，需根据测定浓度，用定容溶液（乙腈：0.1%甲酸溶液=80:20,v/v）进行稀释后重新测定，直至上机液浓度在标准曲线的线性范围内。

从回收率结果（表13~24）看出，12种饲料在1.0~5000 mg/kg添加浓度范围内，回收率在80.3%~99.8%之间，批内平均回收率在83.9%~96.7%之间，批间平均回收率在85.8%~95.3%之间，批内RSD在1.2%~8.1%之间，批间RSD在1.9%~6.4%之间。由此可见回收率和精密度均在药物残留分析规定要求内，说明本方法能满足饲料中二硝托胺测定的需要。超高效液相色谱法添加回收实验图谱详见附图1-4。

表13 超高效液相色谱法猪配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 88.2 | 89.3 | 94.8 | 91.0 | 92.6 | 91.2 | 2.9 | 91.3 | 2.9 |
| | 94.0 | 92.0 | 90.9 | 88.6 | 93.7 | 91.8 | 2.4 | | |
| | 91.1 | 88.4 | 86.3 | 93.1 | 95.1 | 90.8 | 3.9 | | |
| 25 | 96.8 | 92.3 | 93.3 | 97.1 | 92.9 | 94.5 | 2.4 | 93.7 | 2.1 |
| | 96.1 | 93.4 | 90.5 | 94.3 | 91.1 | 93.1 | 2.5 | | |
| | 92.2 | 93.5 | 95.9 | 94.2 | 92.5 | 93.7 | 1.6 | | |
| 125 | 93.7 | 95.1 | 92.3 | 89.1 | 91.2 | 92.3 | 2.5 | 93.2 | 3.1 |
| | 96.2 | 90.4 | 95.5 | 91.8 | 93.4 | 93.5 | 2.6 | | |
| | 91.5 | 95.6 | 88.3 | 97.6 | 96.8 | 94.0 | 4.2 | | |
| 250 | 96.8 | 93.7 | 92.0 | 95.4 | 90.8 | 93.7 | 2.6 | 94.3 | 2.7 |
| | 95.9 | 97.2 | 93.2 | 91.5 | 93.9 | 94.3 | 2.4 | | |
| | 91.5 | 93.4 | 96.4 | 99.7 | 92.5 | 94.7 | 3.5 | | |

表14 超高效液相色谱法猪浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 89.3 | 91.9 | 92.1 | 88.5 | 94.5 | 91.3 | 2.6 | 91.5 | 3.2 |
| | 85.1 | 90.3 | 96.1 | 92.9 | 92.9 | 91.5 | 4.5 | | |
| | 91.2 | 89.0 | 91.0 | 96.4 | 91.8 | 91.9 | 3.0 | | |
| 25 | 91.5 | 89.3 | 88.4 | 93.7 | 94.2 | 91.4 | 2.8 | 92.6 | 2.7 |
| | 95.1 | 93.7 | 91.6 | 92.0 | 96.1 | 93.7 | 2.1 | | |
| | 94.8 | 89.0 | 93.0 | 90.2 | 95.8 | 92.6 | 3.1 | | |
| 125 | 91.1 | 96.9 | 93.0 | 95.2 | 97.4 | 94.7 | 2.8 | 93.7 | 2.5 |
| | 92.8 | 91.7 | 95.0 | 90.7 | 93.0 | 92.6 | 1.7 | | |
| | 91.4 | 95.1 | 97.1 | 90.9 | 93.7 | 93.6 | 2.8 | | |
| 1000 | 90.9 | 91.8 | 93.2 | 96.2 | 94.3 | 93.3 | 2.2 | 92.3 | 3.5 |
| | 85.2 | 92.2 | 87.9 | 93.4 | 95.7 | 90.9 | 4.7 | | |
| | 95.0 | 96.6 | 89.1 | 89.5 | 93.0 | 92.6 | 3.6 | | |

表15 超高效液相色谱法猪复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 91.0 | 92.6 | 92.0 | 85.8 | 90.5 | 90.4 | 3.0 | 91.2 | 2.7 |
| | 91.1 | 92.5 | 93.8 | 88.0 | 92.8 | 91.6 | 2.5 | | |
| | 89.3 | 90.5 | 94.9 | 89.1 | 93.7 | 91.5 | 2.9 | | |
| 25 | 91.9 | 93.3 | 86.4 | 93.7 | 96.2 | 92.3 | 3.9 | 91.3 | 3.1 |
| | 91.9 | 93.8 | 90.3 | 92.1 | 91.7 | 92.0 | 1.4 | | |
| | 87.7 | 91.3 | 85.9 | 91.8 | 90.8 | 89.5 | 2.9 | | |
| 125 | 91.8 | 95.8 | 91.4 | 94.1 | 93.9 | 93.4 | 1.9 | 92.7 | 2.2 |
| | 94.3 | 92.0 | 90.2 | 90.3 | 92.8 | 91.9 | 1.9 | | |
| | 90.3 | 92.9 | 89.9 | 95.9 | 94.9 | 92.8 | 2.9 | | |
| 5000 | 93.5 | 92.1 | 87.6 | 90.5 | 94.6 | 91.7 | 3.0 | 91.7 | 3.5 |
| | 90.0 | 88.4 | 87.5 | 88.8 | 96.0 | 90.1 | 3.8 | | |
| | 95.0 | 89.7 | 96.7 | 90.1 | 95.5 | 93.4 | 3.5 | | |

表16 超高效液相色谱法鸡配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 89.9 | 92.5 | 88.2 | 91.9 | 90.1 | 90.5 | 1.9 | 90.6 | 1.9 |
| | 91.3 | 89.6 | 90.5 | 91.8 | 92.8 | 91.2 | 1.3 | | |
| | 92.4 | 91.2 | 89.4 | 90.3 | 86.6 | 90.0 | 2.4 | | |
| 25 | 93.2 | 91.7 | 94.3 | 95.8 | 88.6 | 92.7 | 3.0 | 94.8 | 2.8 |
| | 98.1 | 94.1 | 93.4 | 97.8 | 96.1 | 95.9 | 2.2 | | |
| | 93.7 | 99.1 | 94.1 | 96.2 | 95.7 | 95.8 | 2.2 | | |
| 125 | 85.9 | 91.6 | 93.6 | 92.1 | 90.2 | 90.7 | 3.2 | 92.4 | 3.3 |
| | 92.5 | 97.7 | 92.9 | 93.9 | 95.2 | 94.4 | 2.2 | | |
| | 92.5 | 95.6 | 86.9 | 94.6 | 91.5 | 92.2 | 3.7 | | |
| 250 | 98.3 | 94.3 | 95.4 | 98.9 | 90.9 | 95.6 | 3.4 | 95.3 | 2.9 |
| | 90.9 | 97.8 | 92.0 | 95.1 | 93.6 | 93.9 | 2.9 | | |
| | 97.0 | 96.6 | 96.5 | 98.9 | 93.4 | 96.5 | 2.0 | | |

表17 超高效液相色谱法鸡浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 89.4 | 95.3 | 93.8 | 90.4 | 85.6 | 90.9 | 4.2 | 91.5 | 3.1 |
| | 92.2 | 91.7 | 91.0 | 93.2 | 88.7 | 91.4 | 1.8 | | |
| | 96.5 | 87.6 | 92.0 | 93.2 | 91.6 | 92.2 | 3.5 | | |
| 25 | 93.0 | 92.1 | 93.9 | 95.2 | 97.0 | 94.2 | 2.0 | 94.8 | 2.8 |
| | 94.2 | 99.6 | 98.4 | 95.2 | 96.1 | 96.7 | 2.3 | | |
| | 90.8 | 92.2 | 98.4 | 92.5 | 94.0 | 93.6 | 3.1 | | |
| 125 | 95.2 | 96.9 | 89.7 | 94.1 | 91.3 | 93.4 | 3.1 | 93.9 | 3.5 |
| | 93.7 | 90.8 | 91.7 | 99.7 | 97.5 | 94.7 | 4.0 | | |
| | 91.0 | 91.1 | 98.4 | 90.2 | 96.6 | 93.5 | 4.0 | | |
| 1000 | 88.1 | 91.5 | 95.1 | 86.2 | 93.7 | 90.9 | 4.1 | 91.3 | 3.1 |
| | 91.6 | 92.4 | 94.5 | 90.8 | 88.0 | 91.5 | 2.6 | | |
| | 93.2 | 87.7 | 92.3 | 95.2 | 89.4 | 91.6 | 3.3 | | |

表18 超高效液相色谱法鸡复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 97.9 | 89.0 | 96.1 | 88.3 | 92.3 | 92.7 | 4.6 | 92.3 | 3.6 |
| | 94.1 | 89.6 | 96.2 | 90.9 | 91.9 | 92.5 | 2.8 | | |
| | 93.7 | 92.4 | 91.6 | 85.3 | 94.7 | 91.5 | 4.0 | | |
| 25 | 95.0 | 96.4 | 92.4 | 92.1 | 93.0 | 93.8 | 2.0 | 93.4 | 2.3 |
| | 96.0 | 91.6 | 96.9 | 92.2 | 93.7 | 94.1 | 2.5 | | |
| | 91.2 | 90.2 | 93.0 | 95.9 | 91.1 | 92.3 | 2.5 | | |
| 125 | 94.8 | 98.2 | 99.8 | 90.7 | 93.6 | 95.4 | 3.8 | 94.5 | 3.6 |
| | 94.4 | 88.8 | 95.1 | 96.1 | 93.2 | 93.5 | 3.0 | | |
| | 98.4 | 91.9 | 92.5 | 99.5 | 90.5 | 94.6 | 4.3 | | |
| 5000 | 89.9 | 86.4 | 87.8 | 83.8 | 87.9 | 87.2 | 2.6 | 90.5 | 3.7 |
| | 95.3 | 88.1 | 91.3 | 90.8 | 93.9 | 91.9 | 3.1 | | |
| | 91.1 | 93.1 | 89.5 | 95.3 | 93.2 | 92.4 | 2.4 | | |

表19 超高效液相色谱法兔配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 85.2 | 81.7 | 81.9 | 88.9 | 81.8 | 83.9 | 3.8 | 87.8 | 5.9 |
| | 95.3 | 83.3 | 91.7 | 85.8 | 85.3 | 88.3 | 5.7 | | |
| | 84.7 | 89.9 | 94.7 | 97.0 | 90.4 | 91.3 | 5.2 | | |
| 25 | 82.8 | 85.1 | 90.9 | 86.6 | 86.0 | 86.3 | 3.4 | 86.1 | 4.1 |
| | 88.2 | 89.3 | 85.2 | 87.8 | 88.1 | 87.7 | 1.7 | | |
| | 81.6 | 82.8 | 93.2 | 81.3 | 82.8 | 84.3 | 5.9 | | |
| 125 | 85.2 | 96.1 | 86.4 | 98.9 | 82.4 | 89.8 | 8.1 | 90.5 | 6.4 |
| | 89.5 | 93.5 | 89.8 | 94.1 | 83.7 | 90.1 | 4.6 | | |
| | 97.8 | 96.3 | 94.2 | 88.6 | 81.2 | 91.6 | 7.4 | | |
| 250 | 91.0 | 94.5 | 88.8 | 88.8 | 92.1 | 91.0 | 2.6 | 91.4 | 5.4 |
| | 82.5 | 94.1 | 80.4 | 93.2 | 95.9 | 89.2 | 8.1 | | |
| | 96.2 | 94.1 | 97.1 | 87.5 | 95.0 | 94.0 | 4.0 | | |

表20 超高效液相色谱法兔浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 91.8 | 86.0 | 89.1 | 91.4 | 82.1 | 88.1 | 4.6 | 88.3 | 5.5 |
| | 92.5 | 91.2 | 84.1 | 81.4 | 92.3 | 88.3 | 5.9 | | |
| | 97.5 | 83.9 | 83.0 | 92.9 | 85.5 | 88.6 | 7.2 | | |
| 25 | 90.0 | 95.7 | 89.5 | 89.3 | 97.7 | 92.4 | 4.3 | 91.9 | 5.7 |
| | 94.1 | 86.2 | 94.2 | 80.3 | 97.1 | 90.4 | 7.7 | | |
| | 95.0 | 89.7 | 85.1 | 97.9 | 96.0 | 92.7 | 5.7 | | |
| 125 | 98.0 | 81.6 | 95.5 | 85.0 | 94.7 | 91.0 | 7.9 | 90.7 | 6.0 |
| | 97.5 | 89.4 | 88.3 | 81.7 | 93.6 | 90.1 | 6.6 | | |
| | 97.0 | 85.5 | 91.0 | 92.4 | 89.9 | 91.2 | 4.6 | | |
| 1000 | 88.0 | 87.1 | 80.5 | 83.8 | 82.5 | 84.4 | 3.7 | 85.8 | 5.4 |
| | 87.3 | 83.3 | 82.1 | 81.4 | 94.5 | 85.7 | 6.3 | | |
| | 96.9 | 83.1 | 84.0 | 85.6 | 86.9 | 87.3 | 6.4 | | |

表21 超高效液相色谱法兔复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 91.0 | 91.1 | 83.5 | 84.4 | 84.0 | 86.8 | 4.5 | 87.1 | 5.5 |
| | 91.4 | 95.7 | 95.0 | 82.5 | 87.2 | 90.4 | 6.1 | | |
| | 82.8 | 82.4 | 89.0 | 81.7 | 84.3 | 84.0 | 3.5 | | |
| 25 | 90.8 | 89.7 | 85.2 | 95.6 | 87.9 | 89.8 | 4.3 | 89.0 | 5.5 |
| | 91.0 | 80.3 | 90.1 | 95.3 | 90.4 | 89.4 | 6.2 | | |
| | 84.4 | 91.9 | 95.0 | 86.2 | 80.6 | 87.6 | 6.6 | | |
| 125 | 85.2 | 95.8 | 90.8 | 90.3 | 81.6 | 88.7 | 6.2 | 87.8 | 6.4 |
| | 97.4 | 85.8 | 87.3 | 80.6 | 85.7 | 87.4 | 7.0 | | |
| | 80.9 | 84.1 | 90.0 | 97.2 | 83.9 | 87.2 | 7.4 | | |
| 5000 | 95.2 | 84.3 | 91.0 | 93.4 | 82.0 | 89.2 | 6.5 | 91.5 | 5.6 |
| | 96.4 | 84.3 | 94.6 | 97.2 | 87.4 | 92.0 | 6.3 | | |
| | 97.8 | 93.8 | 94.1 | 93.1 | 87.3 | 93.2 | 4.1 | | |

表22 超高效液相色谱法鱼配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 88.0 | 90.0 | 90.9 | 86.4 | 91.9 | 89.4 | 2.5 | 90.5 | 2.6 |
| | 88.8 | 95.5 | 89.4 | 92.5 | 93.0 | 91.8 | 3.0 | | |
| | 89.2 | 90.4 | 92.1 | 91.9 | 87.7 | 90.3 | 2.1 | | |
| 25 | 96.5 | 95.5 | 94.9 | 87.8 | 90.7 | 93.1 | 4.0 | 93.3 | 3.7 |
| | 96.9 | 94.8 | 91.1 | 93.7 | 98.1 | 94.9 | 2.9 | | |
| | 86.6 | 92.1 | 95.2 | 89.8 | 95.6 | 91.9 | 4.1 | | |
| 125 | 91.2 | 90.2 | 93.0 | 94.9 | 95.6 | 93.0 | 2.5 | 93.7 | 2.5 |
| | 93.3 | 90.4 | 96.4 | 92.8 | 97.8 | 94.1 | 3.1 | | |
| | 92.4 | 93.8 | 91.7 | 97.0 | 95.5 | 94.1 | 2.3 | | |
| 250 | 91.7 | 94.3 | 95.4 | 96.4 | 92.3 | 94.0 | 2.1 | 92.2 | 2.2 |
| | 92.0 | 90.1 | 88.7 | 90.9 | 91.6 | 90.7 | 1.4 | | |
| | 90.7 | 93.8 | 92.6 | 91.1 | 91.9 | 92.0 | 1.3 | | |

表23 超高效液相色谱法鱼复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 95.6 | 93.8 | 90.3 | 90.5 | 94.9 | 93.0 | 2.7 | 92.0 | 2.8 |
| | 87.6 | 93.6 | 92.5 | 93.3 | 91.3 | 91.7 | 2.7 | | |
| | 90.7 | 92.9 | 95.6 | 89.6 | 88.0 | 91.4 | 3.2 | | |
| 25 | 94.1 | 92.4 | 99.3 | 95.7 | 91.2 | 94.5 | 3.3 | 95.1 | 2.8 |
| | 94.7 | 93.5 | 98.7 | 99.4 | 97.4 | 96.7 | 2.6 | | |
| | 93.5 | 95.1 | 93.6 | 96.3 | 91.5 | 94.0 | 1.9 | | |
| 125 | 94.8 | 97.3 | 95.3 | 93.8 | 90.8 | 94.4 | 2.5 | 94.2 | 2.8 |
| | 91.8 | 95.6 | 92.8 | 90.5 | 99.2 | 94.0 | 3.7 | | |
| | 95.0 | 98.1 | 91.3 | 93.6 | 92.9 | 94.2 | 2.7 | | |
| 5000 | 94.2 | 92.5 | 91.8 | 89.4 | 92.2 | 92.0 | 1.9 | 91.3 | 2.7 |
| | 90.5 | 93.0 | 89.6 | 86.8 | 92.7 | 90.5 | 2.8 | | |
| | 93.2 | 87.3 | 89.0 | 95.5 | 91.7 | 91.3 | 3.6 | | |

表24 超高效液相色谱法牛精料补充料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 85.1 | 84.6 | 89.4 | 90.9 | 91.5 | 88.3 | 3.7 | 90.1 | 4.6 |
| | 90.8 | 88.4 | 84.3 | 86.2 | 86.1 | 87.2 | 2.9 | | |
| | 94.9 | 93.0 | 95.6 | 96.0 | 94.4 | 94.8 | 1.2 | | |
| 25 | 97.3 | 92.9 | 96.9 | 98.8 | 91.9 | 95.6 | 3.1 | 95.2 | 3.0 |
| | 91.4 | 97.7 | 94.4 | 96.6 | 99.7 | 96.0 | 3.3 | | |
| | 94.9 | 92.2 | 91.9 | 98.0 | 93.0 | 94.0 | 2.7 | | |
| 125 | 92.8 | 97.5 | 96.7 | 90.3 | 93.6 | 94.2 | 3.1 | 93.5 | 2.5 |
| | 93.0 | 97.5 | 91.6 | 93.6 | 92.4 | 93.6 | 2.4 | | |
| | 94.1 | 92.9 | 95.3 | 91.1 | 90.5 | 92.8 | 2.2 | | |
| 250 | 88.4 | 85.9 | 91.6 | 89.5 | 89.0 | 88.9 | 2.3 | 92.0 | 3.8 |
| | 97.3 | 92.0 | 93.3 | 96.7 | 95.8 | 95.0 | 2.4 | | |
| | 87.2 | 91.7 | 95.4 | 92.3 | 93.8 | 92.1 | 3.3 | | |

3.1.2液相色谱法（高效液相色谱法）

3.1.2.1线性实验

准确移取适量标准中间溶液（25.0 mg/L），用适量 0.1%甲酸溶液和乙腈稀释配制浓度分别为 0.015 mg/L、0.050 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、2.0 mg/L 和 5.0 mg/L 标准系列工作溶液，进行液相色谱分析，以二硝托胺的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，所得标准曲线方程为 $y=96202x-236.1$ ，相关系数(r^2)为 0.9998，说明二硝托胺在 0.015-5.0 mg/L 浓度范围内线性良好，能用于二硝托胺液相色谱定量分析。

3.1.2.2检测限和定量限的确定

液相色谱分析以保留时间定性，试样溶液中二硝托胺保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中二硝托胺的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内，而本方法标准在试验过程中试样溶液中二硝托胺保留时间应与标准系列溶液中二硝托胺相对偏差均小于 0.5%。

方法的检测限和定量限的信噪比应高于 $S/N=3:1$ 和 $10:1$ ，经计算所有添加 1.0 mg/kg 的样品的 S/N （表 25）在 15-21 之间，因此确定方法的定量限为 1.0 mg/kg，也与农业部 783 号公告-5-2006 的定量限保持一致，检测限考虑到样品和仪器差异确定为 0.3 mg/kg。

表 25 饲料中添加 1 mg/kg 二硝托胺高效液相色谱分析信噪比

| 饲料种类 | 1 mg/kg 添加信噪比 |
|--------|---------------|
| 猪配合饲料 | 21 |
| 猪浓缩饲料 | 15 |
| 猪预混合饲料 | 16 |
| 鸡配合饲料 | 19 |
| 鸡浓缩饲料 | 16 |
| 鸡预混合饲料 | 16 |
| 鱼配合饲料 | 19 |
| 鱼预混合饲料 | 15 |
| 牛精料补充料 | 20 |
| 兔配合饲料 | 19 |

| | |
|--------|----|
| 兔浓缩饲料 | 15 |
| 兔预混合饲料 | 15 |

3.1.2.3 方法的回收率和重现性

3.1.2.3.1 空白样品的筛选和定义

所有空白样品同超高效液相色谱法空白样品，除2个样品检测出二硝托胺外，其余样品在二硝托胺出峰处均无干扰（详见附图5-8）。

3.1.2.3.2 添加回收率实验结果

添加回收实验每批次内同一浓度做5次平行实验，进行3次重复，各饲料添加浓度同超高效液相色谱法。回收实验中，当样品的上机液浓度超过回收率线性范围时，用定容溶液（乙腈：0.1%甲酸溶液=80:20,v/v）进行稀释后重新测定。

从回收率结果（表26-37）看出，12种饲料在1.0~5000 mg/kg添加浓度范围内，回收率在77.0%~99.8%之间，批内平均回收率在83.5%~96.1%之间，批间平均回收率在86.7%~95.3%之间，批内RSD在1.2%~8.9%之间，批间RSD在2.2%~7.5%之间。由此可见回收率和精密度均在药物残留分析规定要求内，说明本方法能满足饲料中二硝托胺测定的需要。高效液相色谱法添加回收实验图谱详见附图5-8。

表26 高效液相色谱法猪配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均回收率 (%) | 批内变异系数 (n=5, %) | 批间平均回收率 (%) | 批间变异系数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 92.8 | 88.9 | 94.0 | 90.3 | 93.1 | 91.8 | 2.3 | 90.3 | 2.9 |
| | 93.0 | 90.0 | 85.7 | 86.8 | 88.9 | 88.9 | 3.2 | | |
| | 86.3 | 89.8 | 91.8 | 93.0 | 89.5 | 90.1 | 2.8 | | |
| 25 | 94.0 | 95.0 | 91.6 | 92.9 | 98.3 | 94.4 | 2.7 | 94.8 | 2.7 |
| | 96.5 | 98.0 | 93.8 | 96.7 | 90.0 | 95.0 | 3.4 | | |
| | 98.3 | 96.8 | 94.0 | 92.5 | 93.1 | 94.9 | 2.6 | | |
| 125 | 94.5 | 96.0 | 89.1 | 92.6 | 97.7 | 94.0 | 3.5 | 93.4 | 3.2 |
| | 91.6 | 90.4 | 95.7 | 92.0 | 93.1 | 92.6 | 2.2 | | |
| | 94.5 | 99.8 | 90.2 | 91.3 | 92.9 | 93.7 | 4.0 | | |
| 250 | 88.9 | 96.2 | 89.2 | 94.4 | 87.3 | 91.2 | 4.2 | 90.8 | 3.9 |
| | 94.6 | 89.9 | 92.6 | 91.1 | 87.4 | 91.1 | 3.0 | | |
| | 87.7 | 96.3 | 89.3 | 84.8 | 93.0 | 90.2 | 5.0 | | |

表27 高效液相色谱法猪浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 88.6 | 90.4 | 92.8 | 88.3 | 93.7 | 90.8 | 2.7 | 91.5 | 2.5 |
| | 94.7 | 91.3 | 92.2 | 90.5 | 90.0 | 91.7 | 2.0 | | |
| | 90.5 | 88.6 | 91.6 | 94.3 | 95.7 | 92.1 | 3.1 | | |
| 25 | 95.8 | 94.2 | 92.9 | 91.7 | 98.0 | 94.5 | 2.6 | 93.7 | 2.4 |
| | 90.4 | 96.2 | 91.3 | 93.0 | 93.8 | 92.9 | 2.4 | | |
| | 95.5 | 90.1 | 94.9 | 93.0 | 94.4 | 93.6 | 2.3 | | |
| 125 | 93.0 | 95.6 | 89.9 | 86.2 | 91.1 | 91.2 | 3.9 | 92.2 | 2.9 |
| | 95.7 | 90.3 | 91.9 | 93.4 | 90.8 | 92.4 | 2.4 | | |
| | 90.8 | 95.3 | 96.0 | 90.7 | 92.7 | 93.1 | 2.7 | | |
| 1000 | 93.9 | 92.4 | 95.6 | 89.9 | 93.4 | 93.0 | 2.3 | 92.4 | 2.4 |
| | 90.3 | 93.9 | 94.1 | 88.1 | 91.2 | 91.5 | 2.8 | | |
| | 90.8 | 94.7 | 95.0 | 90.8 | 91.8 | 92.6 | 2.2 | | |

表28 高效液相色谱法猪复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 92.0 | 87.4 | 93.2 | 85.0 | 90.0 | 89.5 | 3.7 | 90.3 | 3.3 |
| | 92.6 | 88.5 | 90.5 | 93.5 | 88.4 | 90.7 | 2.6 | | |
| | 93.4 | 89.2 | 85.5 | 94.8 | 90.6 | 90.7 | 4.0 | | |
| 25 | 89.8 | 93.0 | 86.4 | 91.0 | 97.5 | 91.5 | 4.5 | 91.7 | 3.1 |
| | 90.4 | 91.0 | 92.0 | 94.0 | 91.4 | 91.8 | 1.5 | | |
| | 93.3 | 88.5 | 91.7 | 89.0 | 96.0 | 91.7 | 3.4 | | |
| 125 | 90.4 | 95.6 | 99.4 | 93.5 | 94.6 | 94.7 | 3.5 | 94.0 | 3.4 |
| | 95.3 | 93.6 | 99.7 | 91.0 | 89.7 | 93.9 | 4.2 | | |
| | 92.0 | 90.5 | 97.2 | 96.0 | 91.4 | 93.4 | 3.2 | | |
| 5000 | 92.6 | 90.4 | 90.5 | 89.9 | 93.0 | 91.3 | 1.5 | 92.0 | 2.9 |
| | 95.6 | 91.4 | 90.4 | 92.7 | 86.9 | 91.4 | 3.5 | | |
| | 93.4 | 91.2 | 89.7 | 94.0 | 97.8 | 93.2 | 3.3 | | |

表29 高效液相色谱法鸡配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 92.9 | 93.8 | 89.3 | 90.2 | 91.7 | 91.6 | 2.0 | 91.5 | 2.4 |
| | 88.5 | 90.4 | 90.7 | 95.1 | 88.1 | 90.6 | 3.1 | | |
| | 90.6 | 90.7 | 94.9 | 92.1 | 93.2 | 92.3 | 2.0 | | |
| 25 | 96.5 | 90.5 | 98.8 | 93.4 | 97.3 | 95.3 | 3.5 | 95.3 | 2.6 |
| | 95.4 | 98.9 | 97.5 | 92.2 | 96.2 | 96.0 | 2.6 | | |
| | 93.7 | 97.2 | 93.3 | 95.0 | 94.3 | 94.7 | 1.6 | | |
| 125 | 94.0 | 94.3 | 99.5 | 95.2 | 89.5 | 94.5 | 3.8 | 94.2 | 3.1 |
| | 91.1 | 98.3 | 94.8 | 97.9 | 93.4 | 95.1 | 3.2 | | |
| | 93.7 | 90.3 | 96.8 | 93.3 | 91.5 | 93.1 | 2.7 | | |
| 250 | 93.2 | 92.8 | 88.8 | 89.2 | 95.2 | 91.8 | 3.0 | 93.0 | 2.9 |
| | 95.2 | 98.2 | 91.9 | 89.4 | 94.8 | 93.9 | 3.6 | | |
| | 90.5 | 93.2 | 91.8 | 95.4 | 95.1 | 93.2 | 2.3 | | |

表30 高效液相色谱法鸡浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 93.9 | 90.0 | 91.7 | 96.9 | 92.9 | 93.1 | 2.8 | 92.5 | 3.1 |
| | 91.4 | 95.8 | 89.2 | 92.9 | 86.4 | 91.1 | 3.9 | | |
| | 91.3 | 95.8 | 90.5 | 93.2 | 95.7 | 93.3 | 2.6 | | |
| 25 | 90.2 | 99.2 | 94.7 | 97.5 | 95.3 | 95.4 | 3.6 | 95.1 | 2.6 |
| | 92.4 | 97.7 | 93.8 | 98.5 | 95.5 | 95.6 | 2.7 | | |
| | 95.0 | 92.8 | 93.2 | 94.9 | 95.9 | 94.4 | 1.4 | | |
| 125 | 91.9 | 93.2 | 94.6 | 96.1 | 95.1 | 94.2 | 1.8 | 94.5 | 2.4 |
| | 92.7 | 95.1 | 91.5 | 96.9 | 89.9 | 93.2 | 3.0 | | |
| | 98.2 | 95.6 | 95.1 | 94.2 | 97.3 | 96.1 | 1.7 | | |
| 1000 | 96.6 | 92.0 | 95.4 | 87.0 | 85.1 | 91.2 | 5.5 | 91.4 | 3.9 |
| | 93.0 | 87.0 | 89.9 | 94.4 | 93.3 | 91.5 | 3.3 | | |
| | 93.8 | 86.0 | 93.8 | 90.9 | 92.7 | 91.4 | 3.6 | | |

表31 高效液相色谱法鸡复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 93.5 | 90.9 | 94.1 | 91.2 | 89.0 | 91.7 | 2.3 | 91.4 | 2.9 |
| | 88.2 | 93.6 | 94.2 | 89.5 | 86.5 | 90.4 | 3.7 | | |
| | 93.1 | 95.1 | 93.3 | 89.4 | 88.7 | 91.9 | 3.0 | | |
| 25 | 89.5 | 96.8 | 92.3 | 95.0 | 94.1 | 93.5 | 3.0 | 93.5 | 2.3 |
| | 93.0 | 92.3 | 96.2 | 90.0 | 95.8 | 93.5 | 2.8 | | |
| | 94.4 | 93.9 | 91.0 | 93.0 | 94.5 | 93.4 | 1.5 | | |
| 125 | 89.8 | 91.3 | 91.6 | 94.6 | 95.8 | 92.6 | 2.7 | 93.6 | 3.2 |
| | 92.4 | 97.0 | 89.8 | 95.5 | 93.1 | 93.6 | 3.0 | | |
| | 89.1 | 98.9 | 94.7 | 96.9 | 92.9 | 94.5 | 4.0 | | |
| 5000 | 93.6 | 91.0 | 88.0 | 88.7 | 90.7 | 90.4 | 2.4 | 90.8 | 2.8 |
| | 93.9 | 89.9 | 92.3 | 85.6 | 89.1 | 90.2 | 3.5 | | |
| | 93.9 | 88.5 | 90.4 | 93.9 | 92.4 | 91.8 | 2.6 | | |

表32 高效液相色谱法兔配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 81.4 | 87.9 | 93.5 | 97.9 | 89.6 | 90.1 | 6.9 | 90.4 | 5.6 |
| | 82.0 | 86.8 | 88.6 | 97.6 | 91.4 | 89.3 | 6.5 | | |
| | 96.6 | 90.5 | 94.3 | 87.6 | 90.5 | 91.9 | 3.9 | | |
| 25 | 77.0 | 91.3 | 97.5 | 93.8 | 95.3 | 91.0 | 8.9 | 87.9 | 7.5 |
| | 82.3 | 87.7 | 93.2 | 87.8 | 94.4 | 89.1 | 5.5 | | |
| | 90.8 | 82.9 | 81.1 | 84.9 | 77.8 | 83.5 | 5.8 | | |
| 125 | 89.1 | 89.1 | 92.9 | 82.1 | 89.6 | 88.6 | 4.5 | 86.7 | 5.2 |
| | 82.0 | 83.3 | 82.7 | 85.6 | 95.6 | 85.8 | 6.5 | | |
| | 82.6 | 85.0 | 85.0 | 83.0 | 93.2 | 85.8 | 5.0 | | |
| 250 | 87.1 | 96.4 | 95.4 | 83.7 | 84.5 | 89.4 | 6.8 | 89.7 | 6.3 |
| | 91.8 | 86.3 | 81.4 | 95.1 | 83.2 | 87.6 | 6.6 | | |
| | 87.7 | 93.7 | 97.7 | 95.7 | 85.6 | 92.1 | 5.7 | | |

表33 高效液相色谱法兔浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 96.8 | 97.6 | 80.0 | 83.1 | 87.7 | 89.0 | 8.9 | 90.0 | 6.6 |
| | 94.3 | 91.8 | 82.5 | 94.4 | 96.6 | 91.9 | 6.0 | | |
| | 83.6 | 85.6 | 95.4 | 91.6 | 88.7 | 89.0 | 5.3 | | |
| 25 | 82.7 | 95.5 | 95.3 | 84.7 | 86.6 | 89.0 | 6.8 | 89.2 | 6.4 |
| | 83.9 | 83.6 | 95.6 | 91.6 | 82.4 | 87.4 | 6.7 | | |
| | 96.1 | 91.1 | 82.2 | 96.5 | 90.8 | 91.3 | 6.3 | | |
| 125 | 88.4 | 84.9 | 88.7 | 89.4 | 97.5 | 89.8 | 5.2 | 87.9 | 6.9 |
| | 85.0 | 83.4 | 93.9 | 97.6 | 80.8 | 88.1 | 8.2 | | |
| | 85.3 | 82.8 | 82.1 | 81.4 | 97.7 | 85.9 | 7.9 | | |
| 1000 | 99.4 | 91.6 | 90.3 | 96.6 | 95.0 | 94.6 | 3.9 | 91.5 | 6.0 |
| | 93.9 | 96.0 | 95.1 | 86.7 | 84.7 | 91.3 | 5.7 | | |
| | 81.7 | 97.7 | 91.4 | 83.0 | 90.0 | 88.8 | 7.4 | | |

表34 高效液相色谱法鸡复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|-------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 94.4 | 82.4 | 88.8 | 92.1 | 90.3 | 89.6 | 5.1 | 90.0 | 5.3 |
| | 94.2 | 91.2 | 88.5 | 86.7 | 83.3 | 88.8 | 4.7 | | |
| | 96.8 | 93.9 | 87.1 | 83.2 | 96.9 | 91.6 | 6.7 | | |
| 25 | 91.6 | 85.5 | 85.2 | 86.1 | 81.1 | 85.9 | 4.4 | 87.0 | 6.1 |
| | 77.9 | 84.1 | 87.1 | 95.4 | 90.3 | 87.0 | 7.6 | | |
| | 82.2 | 91.4 | 82.9 | 86.8 | 97.3 | 88.1 | 7.2 | | |
| 125 | 82.3 | 94.6 | 90.8 | 83.8 | 85.7 | 87.4 | 5.9 | 89.8 | 5.9 |
| | 95.5 | 83.8 | 84.7 | 95.4 | 95.7 | 91.0 | 6.8 | | |
| | 96.5 | 92.5 | 87.9 | 93.6 | 84.5 | 91.0 | 5.2 | | |
| 5000 | 93.4 | 91.0 | 98.9 | 86.6 | 87.2 | 91.4 | 5.5 | 92.0 | 5.8 |
| | 91.3 | 95.2 | 88.9 | 87.2 | 103.5 | 93.2 | 7.0 | | |
| | 97.1 | 86.2 | 86.6 | 97.5 | 89.6 | 91.4 | 6.1 | | |

表35 高效液相色谱法鱼配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 92.2 | 87.8 | 89.5 | 91.3 | 96.0 | 91.4 | 3.4 | 91.3 | 2.7 |
| | 93.3 | 92.2 | 95.4 | 89.7 | 88.9 | 91.9 | 2.9 | | |
| | 90.1 | 93.6 | 88.2 | 89.7 | 91.0 | 90.5 | 2.2 | | |
| 25 | 91.4 | 90.9 | 90.8 | 90.3 | 95.3 | 91.7 | 2.2 | 93.9 | 2.8 |
| | 98.4 | 95.6 | 92.4 | 97.5 | 96.6 | 96.1 | 2.4 | | |
| | 93.2 | 96.0 | 91.5 | 92.7 | 95.2 | 93.7 | 2.0 | | |
| 125 | 93.1 | 92.8 | 89.7 | 95.7 | 98.2 | 93.9 | 3.4 | 94.0 | 2.6 |
| | 95.1 | 97.0 | 91.4 | 92.5 | 94.6 | 94.1 | 2.3 | | |
| | 91.6 | 94.0 | 93.0 | 93.5 | 98.2 | 94.1 | 2.6 | | |
| 250 | 94.5 | 93.6 | 95.1 | 91.5 | 92.9 | 93.5 | 1.5 | 91.7 | 3.1 |
| | 88.5 | 89.3 | 90.7 | 85.7 | 94.5 | 89.7 | 3.6 | | |
| | 90.0 | 92.1 | 91.7 | 89.9 | 96.0 | 91.9 | 2.7 | | |

表36 高效液相色谱法鱼复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 ($n=5$, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 85.1 | 95.1 | 89.7 | 88.4 | 91.6 | 90.0 | 4.1 | 90.9 | 3.0 |
| | 92.0 | 93.1 | 92.0 | 91.7 | 87.5 | 91.3 | 2.4 | | |
| | 93.0 | 90.9 | 89.1 | 89.8 | 94.6 | 91.5 | 2.5 | | |
| 25 | 95.3 | 96.5 | 90.6 | 93.3 | 92.9 | 93.7 | 2.4 | 93.5 | 2.2 |
| | 94.4 | 94.2 | 91.7 | 97.1 | 95.0 | 94.5 | 2.0 | | |
| | 94.2 | 90.1 | 91.7 | 93.9 | 92.0 | 92.4 | 1.8 | | |
| 125 | 94.2 | 91.8 | 90.7 | 93.8 | 96.0 | 93.3 | 2.2 | 93.2 | 2.9 |
| | 90.7 | 95.4 | 91.2 | 92.1 | 94.8 | 92.8 | 2.3 | | |
| | 90.4 | 97.0 | 91.0 | 90.3 | 99.0 | 93.5 | 4.4 | | |
| 5000 | 96.0 | 92.5 | 91.4 | 92.0 | 87.7 | 91.9 | 3.2 | 91.5 | 3.3 |
| | 92.9 | 89.3 | 95.0 | 93.7 | 88.5 | 91.9 | 3.1 | | |
| | 87.5 | 95.6 | 90.7 | 92.8 | 87.0 | 90.7 | 4.0 | | |

表37 高效液相色谱法牛精料补充料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均 回收率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 1.0 | 93.2 | 92.3 | 88.2 | 90.7 | 89.3 | 90.7 | 2.3 | 92.0 | 2.3 |
| | 92.9 | 90.3 | 94.0 | 92.2 | 95.7 | 93.0 | 2.2 | | |
| | 90.1 | 92.9 | 94.9 | 92.4 | 91.1 | 92.3 | 2.0 | | |
| 25 | 89.8 | 91.9 | 91.1 | 90.8 | 95.0 | 91.7 | 2.2 | 92.5 | 2.3 |
| | 88.9 | 90.9 | 93.7 | 95.8 | 93.0 | 92.5 | 2.9 | | |
| | 93.3 | 91.0 | 94.1 | 92.5 | 95.4 | 93.3 | 1.8 | | |
| 125 | 97.7 | 91.2 | 95.5 | 93.7 | 89.0 | 93.4 | 3.7 | 93.8 | 3.1 |
| | 96.3 | 89.4 | 97.9 | 93.2 | 92.2 | 93.8 | 3.6 | | |
| | 92.8 | 95.0 | 98.1 | 93.5 | 91.5 | 94.2 | 2.7 | | |
| 250 | 94.7 | 90.3 | 91.7 | 93.6 | 92.3 | 92.5 | 1.8 | 91.9 | 2.3 |
| | 90.1 | 90.2 | 91.5 | 90.0 | 92.5 | 90.9 | 1.2 | | |
| | 96.1 | 87.6 | 92.2 | 93.1 | 93.2 | 92.4 | 3.3 | | |

3.1.3液相色谱串联质谱法

3.1.3.1线性实验

准确移取适量标准中间溶液 (25 mg/L)，用乙腈稀释先配制浓度分别为0.010mg/L、0.025 mg/L、0.10 mg/L、0.25 mg/L、1.0 mg/L和2.5 mg/L标准系列溶液，然后分别准确移取各标准系列溶液0.20 mL，用0.1%甲酸溶液定容至1 mL，配制浓度分别为0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L、0.20 mg/L和0.50 mg/L标准系列工作溶液，进行液相色谱串联质谱分析。

以二硝托胺标准溶液浓度为横坐标，二硝托胺定量离子对色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，所得标准曲线方程为 $y=2074137.35x+7546.71$ ，相关系数 (r^2) 为0.9993，说明二硝托胺在0.002~0.50 mg/L浓度范围内线性良好，能用于二硝托胺液相色谱串联质谱定量分析。

3.1.3.2检测限和定量限的确定

根据欧盟 2002/657/EC 标准，用 MS/MS 对样品的确证应满足三个条件。首先用 LC-MS 方法所测定的所有待测样品的保留时间小于或等于外标标准样品的保留时间的 $\pm 2.5\%$ ；与基质匹配标准溶液相比，样品中待测组分的两个定性离子的相对丰度比在

许可的范围内。

根据各饲料基质标准溶液的信噪比（表 38），同时考虑到不同仪器灵敏度的差异，初步确定二硝托胺在各饲料中的定量限为 0.050 mg/kg，并进行了定量限浓度的添加试验，分别于两台响应不同的液质联用仪上进行检测。

结果表明（表 38），在响应较低的一台仪器（waters Xevo TQ-S micro）上，猪、鸡预混合饲料（图 14）和鱼配合饲料样品的定性离子对的信噪比为 21~30，其它饲料的 >50，定量离子对的信噪比均高于定性离子对的信噪比，而在响应较高的另一台仪器（waters Xevo TQ-S）上，定量限添加浓度下所有添加样品中的定性离子对信噪比均 >100，定量离子对的信噪比均高于定性离子对的信噪比。最后，综合考虑下确定饲料中二硝托胺药物的定量限为 0.050 mg/kg，检测限为 0.010 mg/kg。经计算 12 种饲料中二硝托胺在 0.050 mg/kg 添加浓度下二硝托胺的相对离子丰度比最大偏差为 12%，满足最大偏差小于 20%的要求。

表 38 不同饲料 0.002 mg/L 基质标准溶液和 0.050 mg/kg 添加样品定性离子对的信噪比

| 饲料种类 | 0.002 mg/L 基质标准溶液信噪比 | | 0.050 mg/kg 添加信噪比 | |
|--------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | waters Xevo TQ-S micro | waters Xevo TQ-S | waters Xevo TQ-S micro | waters Xevo TQ-S |
| 猪配合饲料 | 31 | 147 | 64 | 281 |
| 猪浓缩饲料 | 33 | 143 | 64 | 271 |
| 猪预混合饲料 | 14 | 68 | 30 | 125 |
| 鸡配合饲料 | 22 | 102 | 51 | 216 |
| 鸡浓缩饲料 | 25 | 98 | 51 | 201 |
| 鸡预混合饲料 | 16 | 51 | 23 | 102 |
| 鱼配合饲料 | 12 | 47 | 21 | 100 |
| 鱼预混合饲料 | 23 | 96 | 53 | 179 |
| 牛精料补充料 | 26 | 102 | 56 | 196 |
| 兔配合饲料 | 49 | 129 | 86 | 224 |
| 兔浓缩饲料 | 36 | 100 | 69 | 209 |
| 兔预混合饲料 | 39 | 97 | 78 | 210 |

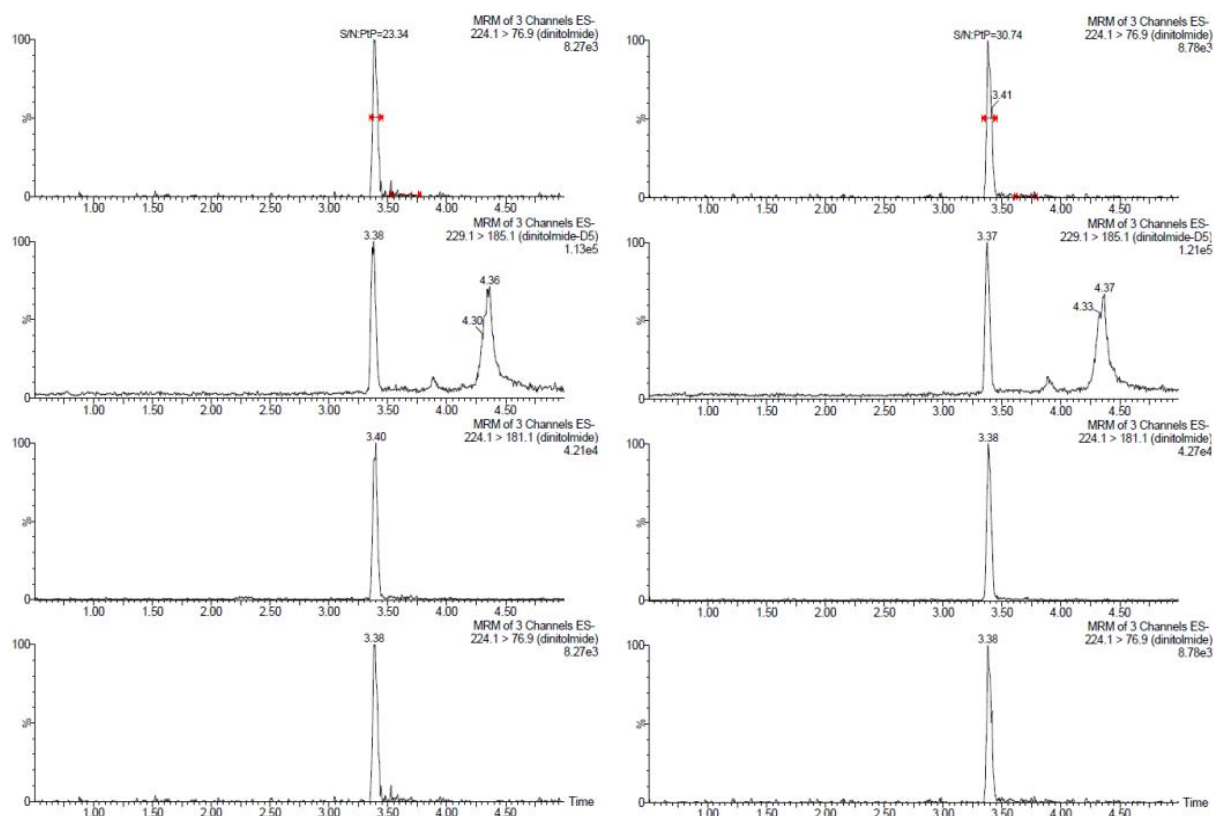


图14 猪、鸡预混合饲料基质定性离子对信噪比（仪器waters Xevo TQ-S micro）

3.1.3.3 方法的回收率和重现性

3.1.3.3.1 空白样品的筛选和定义

所有空白样品同液相色谱法空白样品，除2个样品检测出二硝托胺外，其余样品在二硝托胺出峰处均无明显干扰（详见附图8-20）。

3.1.3.3.2 基质效应

同线性实验中的方法配制溶剂标准溶液和各空白饲料基质标准溶液，浓度均为 0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.020 mg/L、0.050 mg/L、0.20 mg/L 和 0.50 mg/L，进行液相色谱串联质谱分析，利用外标法绘制标准曲线，其中溶剂标准曲线为 $y=207413.7x+7546.71$ ，而各基质标准曲线的斜率与溶液标准曲线的斜率之比在 0.96~1.05 之间（表 10），差异较小。差异较小的原因是因为二硝托胺采用的负离子模式，且经过固相萃取柱净化，基质效应影响相对较小。

3.1.3.3.3 添加回收率实验结果

添加回收实验每批次内同一浓度做5次平行实验，进行3次重复，其中配合饲料（精料补充料）添加浓度为0.050 mg/kg、25 mg/kg、125 mg/kg和250 mg/kg，浓缩饲料添加浓度为0.050 mg/kg，25 mg/kg、125 mg/kg和1000 mg/kg，复合预混合饲料添加浓度为

0.050 mg/kg, 25 mg/kg、125 mg/kg和5000 mg/kg。其中低于250 mg/kg的样品用标准溶液添加, 等于和高于250 mg/kg的样品用25%二硝托胺预混剂添加(二硝托胺预混剂含量经确定的提取条件测定, 见表5, 结果为25.0%, 以此为准进行添加。250、1000、5000 mg/kg添加档分别添加 5.00 ± 0.05 、 8.00 ± 0.08 、 40.00 ± 0.2 mg预混剂后, 涡旋混匀10 min, 静置15 min后进行试验)。对于上机溶液浓度超过线性范围的样品, 用定容溶液(乙腈: 0.1%甲酸溶液=80:20,v/v)进行稀释后重新测定。

从回收率结果(表39~50)看出, 12种饲料在0.050~5000 mg/kg添加浓度范围内, 回收率在80.5%~99.9%之间, 批内平均回收率在84.1%~97.4%, 批间平均回收率在84.8%~97.0%之间, 批内RSD在0.6%~7.7%之间, 批间RSD在1.5%~7.1%之间。由此可见回收率和精密度均在药物残留分析规定要求内, 说明本方法能满足饲料中二硝托胺测定的需要。添加回收实验图谱详见附图8-20。

表39 液相色谱串联质谱法猪配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平均回收率 (%) | 批内变异系数 ($n=5$, %) | 批间平均回收率 (%) | 批间变异系数 ($n=3$, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 91.9 | 93.2 | 91.6 | 90.3 | 94.1 | 92.2 | 1.6 | 92.2 | 2.1 |
| | 95.2 | 91.6 | 94.6 | 91.0 | 93.3 | 93.1 | 2.0 | | |
| | 91.1 | 88.2 | 89.8 | 93.3 | 93.8 | 91.2 | 2.6 | | |
| 25 | 93.7 | 92.2 | 92.4 | 85.8 | 90.3 | 90.9 | 3.4 | 91.9 | 3.7 |
| | 87.2 | 92.3 | 88.8 | 90.5 | 91.5 | 90.1 | 2.3 | | |
| | 90.3 | 98.2 | 93.1 | 93.1 | 98.5 | 94.6 | 3.8 | | |
| 125 | 98.8 | 92.3 | 93.1 | 96.1 | 91.6 | 94.4 | 3.2 | 92.5 | 3.7 |
| | 92.3 | 92.0 | 87.2 | 91.1 | 86.6 | 89.8 | 3.0 | | |
| | 90.4 | 91.3 | 98.7 | 92.0 | 94.1 | 93.3 | 3.6 | | |
| 250 | 89.0 | 88.2 | 91.4 | 92.3 | 98.8 | 91.9 | 4.6 | 92.5 | 2.9 |
| | 96.0 | 93.7 | 91.0 | 93.3 | 89.6 | 92.7 | 2.7 | | |
| | 93.3 | 92.3 | 93.5 | 91.3 | 94.5 | 93.0 | 1.3 | | |

表40 液相色谱串联质谱法猪浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 88.7 | 88.5 | 91.7 | 92.7 | 90.2 | 90.4 | 2.0 | 90.7 | 2.6 |
| | 91.5 | 89.2 | 90.6 | 91.1 | 93.8 | 91.2 | 1.8 | | |
| | 89.6 | 94.7 | 88.9 | 86.1 | 93.3 | 90.5 | 3.8 | | |
| 25 | 93.5 | 89.2 | 91.1 | 86.7 | 91.6 | 90.4 | 2.9 | 91.4 | 3.7 |
| | 91.0 | 98.6 | 92.9 | 91.8 | 89.9 | 92.8 | 3.7 | | |
| | 96.8 | 91.1 | 85.5 | 88.5 | 93.2 | 91.0 | 4.8 | | |
| 125 | 97.1 | 91.2 | 98.5 | 89.2 | 94.0 | 94.0 | 4.1 | 93.3 | 3.5 |
| | 91.7 | 89.1 | 92.2 | 90.8 | 91.7 | 91.1 | 1.3 | | |
| | 89.9 | 92.6 | 95.8 | 98.0 | 97.7 | 94.8 | 3.7 | | |
| 1000 | 91.0 | 99.8 | 98.7 | 94.4 | 95.3 | 95.8 | 3.7 | 94.3 | 3.4 |
| | 91.4 | 95.7 | 92.4 | 93.5 | 92.8 | 93.2 | 1.7 | | |
| | 97.8 | 90.2 | 89.1 | 96.5 | 95.9 | 93.9 | 4.2 | | |

表41 液相色谱串联质谱法猪复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 91.4 | 93.0 | 90.9 | 91.1 | 96.3 | 92.5 | 2.4 | 92.4 | 3.4 |
| | 98.1 | 92.9 | 98.0 | 90.7 | 94.0 | 94.7 | 3.4 | | |
| | 86.6 | 91.2 | 92.1 | 88.9 | 90.4 | 89.8 | 2.4 | | |
| 25 | 93.3 | 95.5 | 91.4 | 89.0 | 90.9 | 92.0 | 2.7 | 91.6 | 3.0 |
| | 91.0 | 93.0 | 89.5 | 91.0 | 92.5 | 91.4 | 1.5 | | |
| | 87.8 | 90.2 | 98.8 | 89.3 | 90.8 | 91.4 | 4.7 | | |
| 125 | 90.4 | 92.1 | 96.4 | 91.8 | 98.6 | 93.9 | 3.7 | 92.8 | 2.7 |
| | 90.7 | 92.6 | 93.7 | 90.5 | 90.7 | 91.6 | 1.6 | | |
| | 95.6 | 93.4 | 91.9 | 90.2 | 93.1 | 92.8 | 2.1 | | |
| 5000 | 97.8 | 99.3 | 94.1 | 99.9 | 96.1 | 97.4 | 2.4 | 97.0 | 2.1 |
| | 94.1 | 98.5 | 96.2 | 99.1 | 98.7 | 97.3 | 2.2 | | |
| | 97.9 | 94.7 | 95.9 | 94.1 | 98.6 | 96.2 | 2.0 | | |

表42 液相色谱串联质谱法鸡配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 86.2 | 90.0 | 91.6 | 90.4 | 92.8 | 90.2 | 2.8 | 91.5 | 2.9 |
| | 90.4 | 91.6 | 89.2 | 92.2 | 93.3 | 91.3 | 1.7 | | |
| | 92.0 | 98.3 | 93.5 | 90.4 | 90.6 | 93.0 | 3.5 | | |
| 25 | 93.1 | 90.1 | 98.0 | 92.5 | 95.9 | 93.9 | 3.3 | 92.0 | 3.5 |
| | 89.3 | 86.4 | 93.5 | 90.4 | 96.2 | 91.2 | 4.2 | | |
| | 87.5 | 90.5 | 93.7 | 93.0 | 90.1 | 91.0 | 2.7 | | |
| 125 | 91.2 | 98.1 | 90.2 | 89.9 | 90.9 | 92.1 | 3.7 | 94.0 | 3.7 |
| | 96.1 | 90.5 | 93.4 | 95.2 | 98.6 | 94.8 | 3.2 | | |
| | 94.4 | 90.2 | 99.5 | 98.7 | 93.0 | 95.2 | 4.1 | | |
| 250 | 95.3 | 96.1 | 98.0 | 94.1 | 96.4 | 96.0 | 1.5 | 96.0 | 1.7 |
| | 96.5 | 92.8 | 96.1 | 95.6 | 93.6 | 94.9 | 1.7 | | |
| | 96.3 | 98.6 | 96.3 | 96.6 | 98.2 | 97.2 | 1.1 | | |

表43 液相色谱串联质谱法鸡浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 86.9 | 98.0 | 92.2 | 94.6 | 89.2 | 92.2 | 4.7 | 91.5 | 3.7 |
| | 92.7 | 83.7 | 90.9 | 90.6 | 92.5 | 90.1 | 4.1 | | |
| | 90.8 | 95.6 | 91.0 | 92.9 | 90.5 | 92.2 | 2.3 | | |
| 25 | 98.2 | 98.6 | 89.6 | 94.0 | 95.7 | 95.2 | 3.8 | 92.8 | 3.5 |
| | 94.5 | 92.7 | 90.2 | 87.0 | 91.0 | 91.1 | 3.1 | | |
| | 94.1 | 94.0 | 90.9 | 92.2 | 89.8 | 92.2 | 2.1 | | |
| 125 | 91.8 | 94.6 | 99.2 | 98.2 | 95.3 | 95.8 | 3.1 | 94.5 | 2.9 |
| | 95.1 | 93.1 | 90.9 | 91.2 | 96.8 | 93.4 | 2.7 | | |
| | 98.5 | 93.6 | 95.1 | 92.4 | 91.5 | 94.2 | 2.9 | | |
| 1000 | 90.8 | 93.9 | 96.4 | 93.6 | 92.6 | 93.5 | 2.2 | 93.6 | 2.7 |
| | 92.1 | 96.3 | 98.9 | 94.2 | 96.1 | 95.5 | 2.7 | | |
| | 91.5 | 90.5 | 94.0 | 93.3 | 90.1 | 91.9 | 1.9 | | |

表44 液相色谱串联质谱法鸡复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 88.3 | 88.8 | 90.8 | 90.2 | 90.5 | 89.7 | 1.2 | 90.9 | 2.6 |
| | 91.2 | 90.6 | 88.6 | 94.3 | 90.3 | 91.0 | 2.3 | | |
| | 88.7 | 90.1 | 92.1 | 97.6 | 90.8 | 91.9 | 3.7 | | |
| 25 | 98.3 | 93.9 | 91.3 | 98.4 | 98.2 | 96.0 | 3.4 | 94.6 | 3.2 |
| | 96.2 | 98.2 | 91.0 | 98.6 | 92.4 | 95.3 | 3.6 | | |
| | 93.6 | 93.0 | 91.5 | 92.4 | 91.5 | 92.4 | 1.0 | | |
| 125 | 90.8 | 94.3 | 92.3 | 91.7 | 90.3 | 91.9 | 1.7 | 92.5 | 2.7 |
| | 93.5 | 95.6 | 94.9 | 90.5 | 92.6 | 93.4 | 2.2 | | |
| | 90.2 | 92.4 | 90.9 | 98.2 | 89.0 | 92.1 | 3.9 | | |
| 5000 | 93.8 | 95.5 | 95.2 | 94.1 | 96.2 | 95.0 | 1.0 | 95.3 | 2.6 |
| | 98.7 | 97.9 | 92.5 | 91.7 | 93.3 | 94.8 | 3.4 | | |
| | 98.2 | 97.9 | 98.6 | 93.7 | 92.2 | 96.1 | 3.1 | | |

表45 液相色谱串联质谱法兔配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 85.6 | 95.7 | 80.8 | 81.9 | 82.1 | 85.2 | 7.2 | 88.4 | 6.6 |
| | 85.2 | 93.1 | 86.4 | 83.6 | 96.3 | 88.9 | 6.2 | | |
| | 89.0 | 97.4 | 86.4 | 86.1 | 96.8 | 91.1 | 6.1 | | |
| 25 | 91.5 | 86.6 | 88.3 | 84.0 | 81.3 | 86.3 | 4.5 | 85.5 | 5.1 |
| | 86.6 | 89.2 | 80.1 | 94.1 | 80.3 | 86.1 | 7.0 | | |
| | 81.0 | 87.9 | 81.4 | 82.4 | 87.9 | 84.1 | 4.1 | | |
| 125 | 87.9 | 83.7 | 95.5 | 83.2 | 81.2 | 86.3 | 6.6 | 86.3 | 6.7 |
| | 85.4 | 82.0 | 80.6 | 96.9 | 85.0 | 86.0 | 7.5 | | |
| | 82.0 | 81.3 | 88.2 | 83.6 | 97.3 | 86.5 | 7.7 | | |
| 250 | 91.7 | 97.8 | 92.9 | 86.7 | 92.7 | 92.4 | 4.3 | 90.5 | 6.4 |
| | 96.7 | 81.2 | 81.2 | 84.0 | 88.5 | 86.3 | 7.6 | | |
| | 86.8 | 96.9 | 97.1 | 88.0 | 96.0 | 93.0 | 5.5 | | |

表46 液相色谱串联质谱法兔浓缩饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 82.3 | 83.6 | 81.8 | 88.0 | 87.2 | 84.6 | 3.4 | 86.6 | 5.4 |
| | 96.1 | 95.1 | 86.6 | 92.2 | 86.3 | 91.3 | 5.1 | | |
| | 81.0 | 85.2 | 83.8 | 82.8 | 87.5 | 84.1 | 2.9 | | |
| 25 | 91.3 | 80.8 | 89.3 | 94.2 | 92.2 | 89.6 | 5.8 | 90.9 | 6.2 |
| | 89.2 | 82.1 | 81.5 | 94.4 | 91.4 | 87.7 | 6.5 | | |
| | 97.7 | 90.6 | 94.5 | 96.9 | 97.6 | 95.5 | 3.2 | | |
| 125 | 82.9 | 84.1 | 82.6 | 88.7 | 97.8 | 87.2 | 7.3 | 89.5 | 7.1 |
| | 82.1 | 96.5 | 84.0 | 96.2 | 89.6 | 89.7 | 7.5 | | |
| | 83.6 | 94.2 | 85.1 | 96.7 | 97.8 | 91.5 | 7.3 | | |
| 1000 | 96.4 | 95.1 | 87.4 | 95.6 | 92.7 | 93.4 | 3.9 | 93.2 | 3.6 |
| | 93.4 | 96.9 | 93.6 | 86.5 | 96.4 | 93.4 | 4.4 | | |
| | 91.8 | 90.1 | 91.6 | 93.2 | 97.5 | 92.8 | 3.0 | | |

表47 液相色谱串联质谱法兔复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 83.7 | 88.4 | 81.2 | 87.9 | 80.7 | 84.4 | 4.3 | 84.8 | 3.8 |
| | 82.3 | 86.3 | 85.9 | 83.6 | 82.8 | 84.2 | 2.2 | | |
| | 82.8 | 85.5 | 93.2 | 84.0 | 83.7 | 85.8 | 4.9 | | |
| 25 | 97.6 | 94.7 | 93.7 | 90.4 | 82.2 | 91.7 | 6.4 | 90.7 | 6.0 |
| | 89.2 | 84.1 | 97.4 | 90.2 | 87.9 | 89.8 | 5.4 | | |
| | 92.4 | 80.5 | 96.1 | 96.2 | 88.5 | 90.7 | 7.2 | | |
| 125 | 95.4 | 87.6 | 93.9 | 90.3 | 97.6 | 93.0 | 4.3 | 92.1 | 4.3 |
| | 97.2 | 88.4 | 92.5 | 97.1 | 93.4 | 93.7 | 3.9 | | |
| | 84.6 | 90.6 | 94.1 | 91.5 | 87.3 | 89.6 | 4.1 | | |
| 5000 | 93.4 | 81.3 | 91.0 | 81.7 | 94.2 | 88.3 | 7.2 | 88.0 | 6.2 |
| | 97.3 | 89.8 | 94.5 | 85.1 | 83.2 | 90.0 | 6.7 | | |
| | 81.3 | 81.6 | 90.5 | 88.0 | 87.7 | 85.8 | 4.8 | | |

表48 液相色谱中串联质谱法鱼配合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 90.4 | 92.5 | 90.9 | 88.6 | 93.9 | 91.3 | 2.2 | 91.2 | 2.2 |
| | 91.1 | 88.2 | 94.5 | 91.9 | 92.0 | 91.5 | 2.5 | | |
| | 90.9 | 94.2 | 88.4 | 91.1 | 90.0 | 90.9 | 2.3 | | |
| 25 | 97.6 | 96.4 | 94.7 | 93.0 | 98.7 | 96.1 | 2.4 | 93.4 | 2.9 |
| | 91.0 | 90.3 | 94.0 | 92.5 | 89.1 | 91.4 | 2.1 | | |
| | 94.5 | 93.3 | 92.8 | 90.2 | 92.2 | 92.6 | 1.7 | | |
| 125 | 98.9 | 92.5 | 98.2 | 90.0 | 93.0 | 94.5 | 4.1 | 94.1 | 2.8 |
| | 92.7 | 93.5 | 95.5 | 94.3 | 92.3 | 93.7 | 1.4 | | |
| | 92.0 | 95.6 | 93.7 | 98.1 | 91.5 | 94.2 | 2.9 | | |
| 250 | 96.6 | 98.7 | 95.7 | 93.0 | 92.8 | 95.4 | 2.6 | 96.0 | 3.2 |
| | 98.8 | 91.5 | 99.4 | 91.8 | 98.8 | 96.1 | 4.2 | | |
| | 98.0 | 98.1 | 92.2 | 94.2 | 99.7 | 96.4 | 3.2 | | |

表49 液相色谱串联质谱法鱼复合预混合饲料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 90.4 | 91.7 | 90.6 | 90.4 | 87.0 | 90.0 | 1.8 | 92.1 | 3.4 |
| | 92.8 | 91.4 | 91.0 | 90.1 | 93.2 | 91.7 | 1.3 | | |
| | 90.9 | 89.6 | 97.8 | 96.7 | 97.9 | 94.6 | 3.8 | | |
| 25 | 95.2 | 93.1 | 90.5 | 91.6 | 92.4 | 92.6 | 1.9 | 92.5 | 1.9 |
| | 92.3 | 92.8 | 94.5 | 95.3 | 90.1 | 93.0 | 2.2 | | |
| | 90.0 | 91.3 | 94.6 | 92.3 | 92.2 | 92.1 | 1.8 | | |
| 125 | 95.6 | 92.8 | 92.6 | 93.2 | 98.1 | 94.5 | 2.5 | 94.6 | 1.9 |
| | 97.9 | 96.8 | 95.5 | 94.5 | 94.6 | 95.9 | 1.5 | | |
| | 94.1 | 93.8 | 92.8 | 93.3 | 94.1 | 93.6 | 0.6 | | |
| 5000 | 93.0 | 94.1 | 90.7 | 91.0 | 98.3 | 93.4 | 3.3 | 94.0 | 2.9 |
| | 98.3 | 93.0 | 95.6 | 94.9 | 95.5 | 95.5 | 2.0 | | |
| | 90.8 | 91.1 | 97.5 | 91.7 | 94.9 | 93.2 | 3.1 | | |

表50 液相色谱串联质谱法牛精料补充料中二硝托胺添加回收率测定结果

| 添加浓度 (mg/kg) | 回收率 (%) | | | | | 批内平 均回收 率 (%) | 批内变异系 数 (n=5, %) | 批间平 均回收 率 (%) | 批间变异系 数 (n=3, %) |
|-----------------|---------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| 0.050 | 88.8 | 88.9 | 94.1 | 91.0 | 90.5 | 90.7 | 2.4 | 91.0 | 1.5 |
| | 91.8 | 91.0 | 90.2 | 90.0 | 91.3 | 90.9 | 0.8 | | |
| | 92.2 | 91.7 | 91.8 | 91.0 | 90.1 | 91.4 | 0.9 | | |
| 25 | 91.6 | 90.7 | 89.3 | 93.3 | 91.2 | 91.2 | 1.6 | 92.5 | 2.3 |
| | 93.1 | 93.3 | 92.8 | 91.3 | 91.0 | 92.3 | 1.2 | | |
| | 97.3 | 90.8 | 91.0 | 94.3 | 95.8 | 93.8 | 3.1 | | |
| 125 | 95.2 | 95.1 | 93.2 | 92.5 | 91.0 | 93.4 | 1.9 | 95.3 | 2.6 |
| | 98.7 | 95.8 | 98.9 | 96.7 | 96.1 | 97.2 | 1.5 | | |
| | 97.7 | 97.1 | 91.3 | 94.4 | 95.7 | 95.2 | 2.7 | | |
| 250 | 94.9 | 98.1 | 97.5 | 93.8 | 95.9 | 96.0 | 1.9 | 95.2 | 2.3 |
| | 96.0 | 96.1 | 95.9 | 94.2 | 93.3 | 95.1 | 1.3 | | |
| | 95.9 | 98.3 | 95.8 | 92.4 | 90.1 | 94.5 | 3.4 | | |

3.1.4 实际样品的检测

采用农业部 783 号公告-5-2006 标准方法和本拟定方法分别对部分饲料阳性样品和 25%二硝托胺预混剂进行检测（其中 47 号和 78 号样品量较少，故只进行部分检测），结果表明（表 42），除 25%二硝托胺预混剂外，原标准方法与拟定方法对阳性样品中二硝托胺含量的测定基本一致，表明拟定方法可靠。

表 42 原标准方法与拟定方法下对含二硝托胺实际样品的测定结果

| 饲料种类 | 检测方法 | 测定结果 (mg/kg) | | |
|-------------|--------------|--------------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 平均值 |
| 25%二硝托胺预混剂 | 原标准方法 | 22.7% | 22.6% | 22.7% |
| | 拟定方法（HPLC法） | 24.8% | 24.6% | 24.7% |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 25.0% | 24.8% | 24.9% |
| 鸡配合饲料(编号47) | 原标准方法 | 61.5 | / | 61.5 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 60.1 | / | 60.1 |
| 鸡浓缩饲料(编号78) | 原标准方法 | 0.83 | 0.85 | 0.84 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 0.81 | 0.82 | 0.82 |

| | | | | |
|-----------------------|--------------|------|------|------|
| 猪配合饲料（编号 FJ20008） | 原标准方法 | 62.2 | 62.6 | 62.4 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 62.5 | 62.7 | 62.6 |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 62.4 | 62.6 | 62.5 |
| 猪配合饲料（编号 FJ20018） | 原标准方法 | 0.80 | 0.79 | 0.80 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 0.82 | 0.81 | 0.82 |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 0.82 | 0.84 | 0.83 |
| 鸡配合饲料（编号 FJ212044） | 原标准方法 | 98.2 | 98.5 | 98.4 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 98.4 | 98.3 | 98.4 |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 98.6 | 98.1 | 98.4 |
| 鸡配合饲料（编号 FJ212045） | 原标准方法 | 104 | 103 | 104 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 103 | 103 | 103 |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 104 | 105 | 104 |
| 鸡配合饲料（编号 FJ211218） | 原标准方法 | 74.4 | 74.9 | 74.6 |
| | 拟定方法（HPLC法） | 75.0 | 74.6 | 74.8 |
| | 拟定方法（LC-MS法） | 74.5 | 74.6 | 74.6 |

3.2 综述报告

《饲料中二硝托胺的测定》建立了配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中二硝托胺的液相色谱串联质谱测定方法和液相色谱测定方法，试样经氨化甲醇提取，中性氧化铝固相萃取净化，液相色谱-串联质谱仪/液相色谱仪检测，外标法定量。

方法开发过程中对提取条件、净化条件、液质/液相仪器条件、定量方法等分别进行了研究，并进行了添加回收验证和实际阳性样品检测结果的对比验证。结果主要内容如下：

提取条件主要对比研究了乙腈、氨水乙腈、乙酸乙腈及氨水甲醇对不同饲料中不同添加浓度下的提取效率，以及提取时间、提取次数等对提取效率的影响。结果显示，采用0.5%氨水甲醇振荡提取2次，提取时间分别为40 min和20 min时，提取效率较高，对实际猪配合饲料阳性样品的检测结果与原标准农业部783号公告-5-2006的检测结果基本一致，表明该提取条件符合要求。

净化条件的研究中比较了直接稀释法、HLB小柱净化法和中性氧化铝柱净化法，中性氧化铝柱和HLB小柱对鸡配合饲料、鸡浓缩饲料及鸡复合预混合饲料均有一定的净化

效果，其中对鸡配合饲料和鸡浓缩饲料净化效果较为明显，且中性氧化铝柱优于 HLB 柱。但整体而言 3 种净化方法下目标峰处均无明显干扰且净化回收率均较高。而考虑到方法延续性和样品差异性，确定采用中性氧化铝柱净化法。

分别对液相色谱条件和质谱条件进行了研究，最终确定液相法检测波长为 245 nm，流动相为 0.1%甲酸溶液和乙腈，分别采用等度淋洗（高效液相色谱）和梯度洗脱（超高效液相色谱）；液质法中因考虑到灵敏度等因素采用了不同的梯度洗脱条件进行色谱分离，采用多重反应监测方式进行检测。

对于定量方法，液相法采用了常规的外标法进行定量，而液质法则对比了外标法、基质匹配外标法和内标法（分别于提取前、后加入内标）3 种定量方法。结果显示，不同定量方法下的回收率均在要求范围内，其中内标法由于采用内标进行了校正故回收率最高。但考虑到试验操作的简便性和基质效应不明显的情况，最终确定了外标法作为定量方法。

除此之外，在标准主要内容确定过程中，对不同样品称样量对检测结果的影响和标准溶液储藏稳定性等也进行了研究。结果表明不同称样量对检测结果影响较小，故确定了浓缩饲料、复合预混合饲料称样量为 2 g，配合饲料及其它饲料称样量为 5 g。通过稳定性试验确定了标准储备液和中间液的有效期限分别为 3 个月和 1 个月。

标准主要内容确定后，首先通过添加回收试验对本方法的可靠性进行了验证。结果显示，液相法中，二硝托胺在 0.015~5.0 mg/L 浓度范围内线性良好，12 种饲料在 1.0~5000 mg/kg 添加浓度范围内，回收率和精密度均符合分析要求，其中超高效液相色谱检测时回收率在 80.3%~99.8%之间，批内、批间最大 RSD 分别为 8.1%和 6.4%；高效液相色谱检测时回收率在 77.0%~99.8%之间，批内、批间最大 RSD 分别为 8.9%和 7.5%。液相法的定量限为 1.0 mg/kg，检测限为 0.3 mg/kg。液质法中，二硝托胺在 0.002~0.50 mg/L 浓度范围内线性良好，12 种饲料在 0.050~5000 mg/kg 添加浓度范围内，回收率在 80.5%~99.9%之间，批内、批间最大 RSD 分别为 7.7%和 7.1%，说明回收率和精密度均符合分析要求。液质法定量限和检测限分别为 0.050 mg/kg 和 0.010 mg/kg。综合上述结果可见，本方法可靠，能满足饲料中二硝托胺测定的需要。

进一步，为确保方法在实际样品检测过程中的可靠性，选取了部分饲料阳性样品和 25%二硝托胺预混剂进行了分析验证，并与原标准农业部 783 号公告-5-2006 检测结果进行了对比。本方法对 25%二硝托胺预混剂的检测结果更接近标定值 25%，对其它阳性样品的检测结果则于原标准基本一致，表明本方法可靠。

总之,《饲料中二硝托胺的测定》方法简便、可靠,适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中二硝托胺的测定。

3.3 技术经济论证

无。

3.4 预期经济效果

相对于原标准农业部 783 号公告-5-2006,本方法优化了液相色谱法,简化了前处理过程,而其中超高效液相色谱检测大大缩短了整体分析时间,提高了分析效率,节约了时间成本。此外,本方法补充了“液相色谱-串联质谱法”作为确认方法,灵敏度更高,提高了二硝托胺检测的准确性。本方法对饲料安全和畜产品质量安全提供了有力的技术支撑。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

无。

五、采标情况,以及是否合规引用或采用国际国外标准

本方法标准在制定过程中,未采用国际标准。

六、与有关法律、法规的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等,严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接,遵循了政策性和协调同一性的原则。

目前我国已建立了食品和饲料中的二硝托胺分析方法有:农业部 783 号公告-5-2006《饲料中二硝托胺的测定 高效液相色谱法》和 SN/T 2453-2010《进出口动物源性食品中二硝托胺残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》,因制定的饲料中二硝托胺的测定方法标准没有确证方法,且前处理相对复杂,因此难以满足生产上需要,因此急需修订该标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

在方法研究和征求意见稿形成过程中,暂无重大分歧。

八、涉及专利的有关说明

未涉及专利。

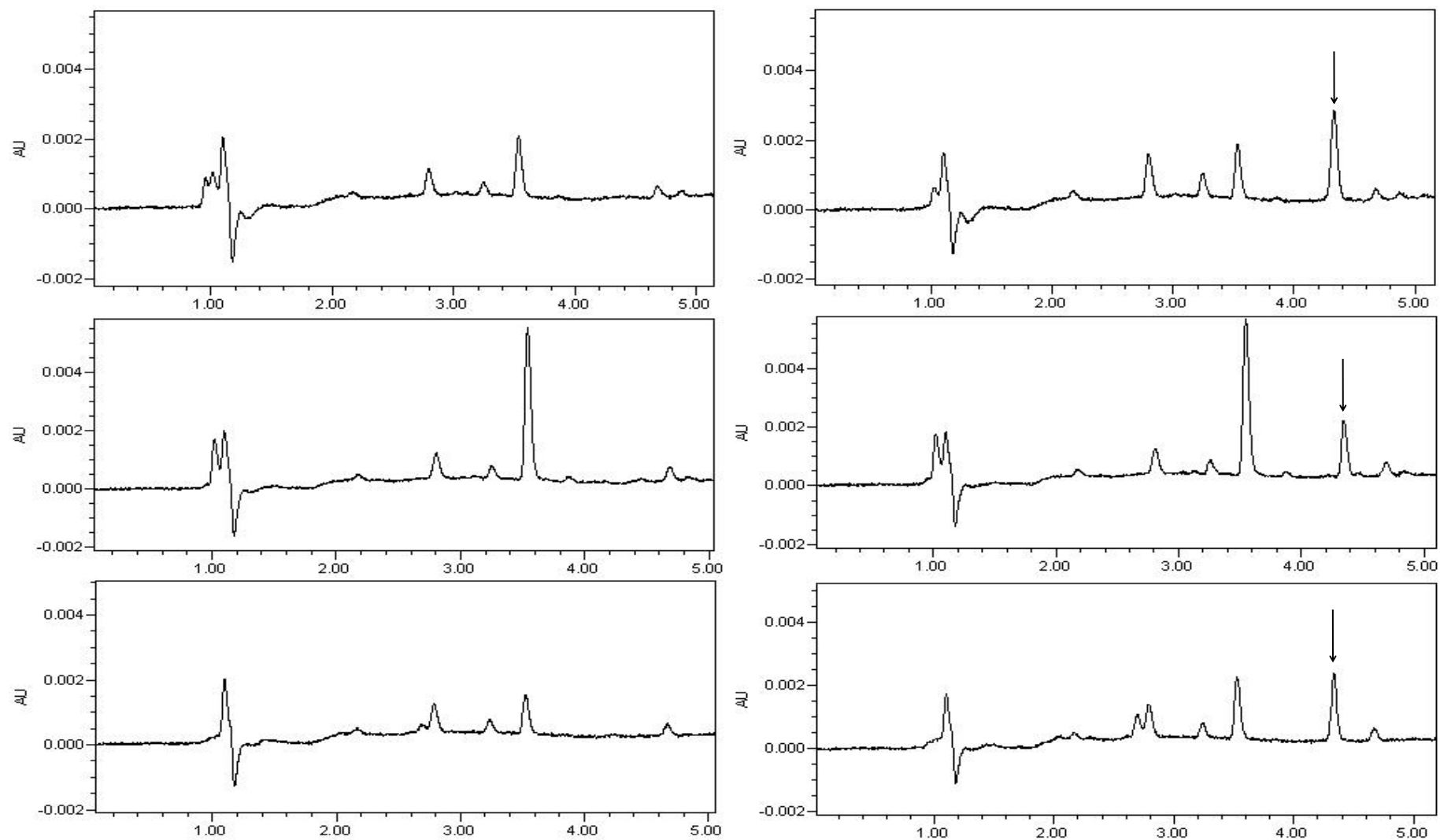
九、贯彻国家标准的要求和措施建议

待本标准颁布和实施后,建议相关部门开展该标准的技术培训工作。

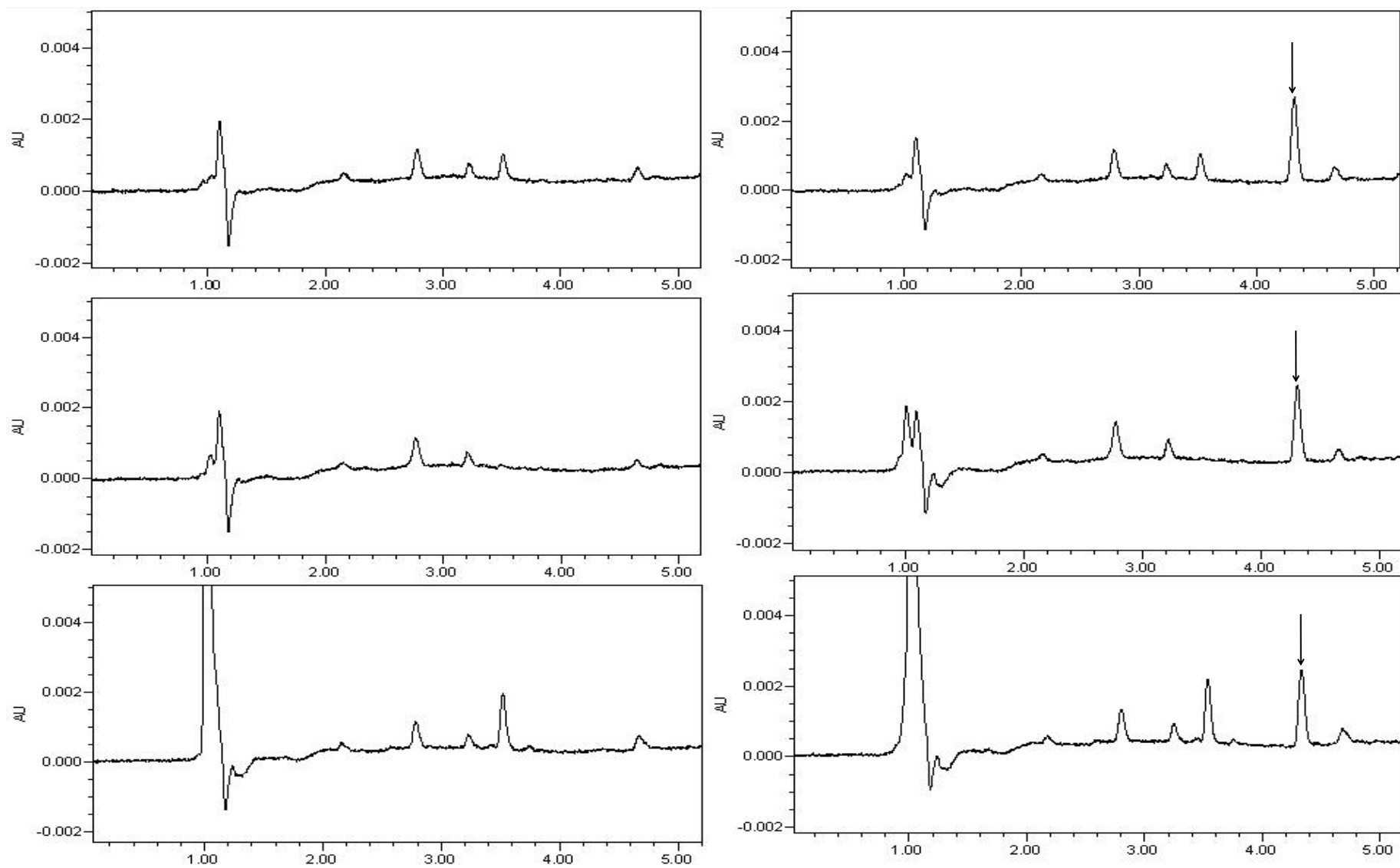
十、其他应当说明的事项

无。

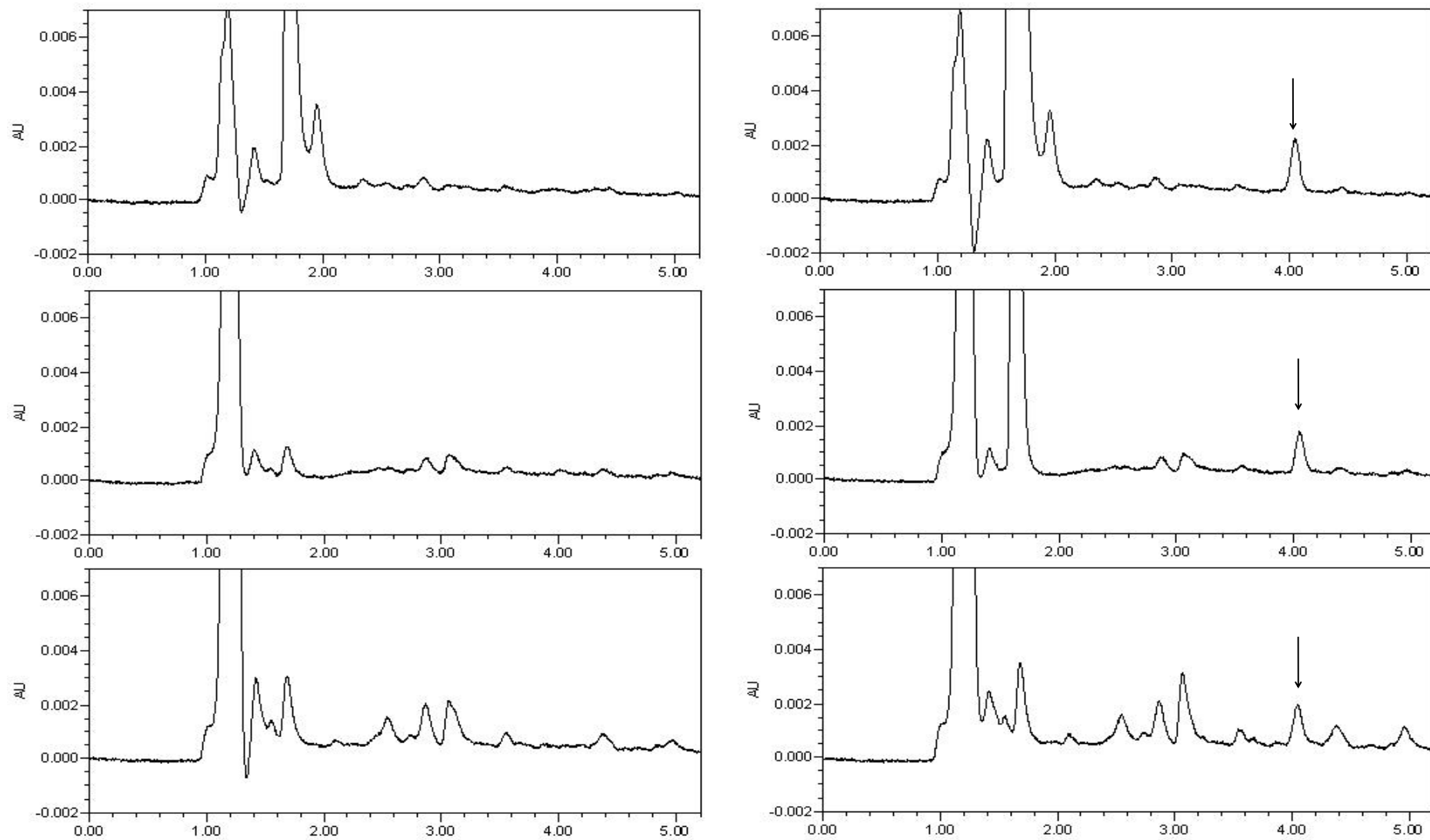
附图



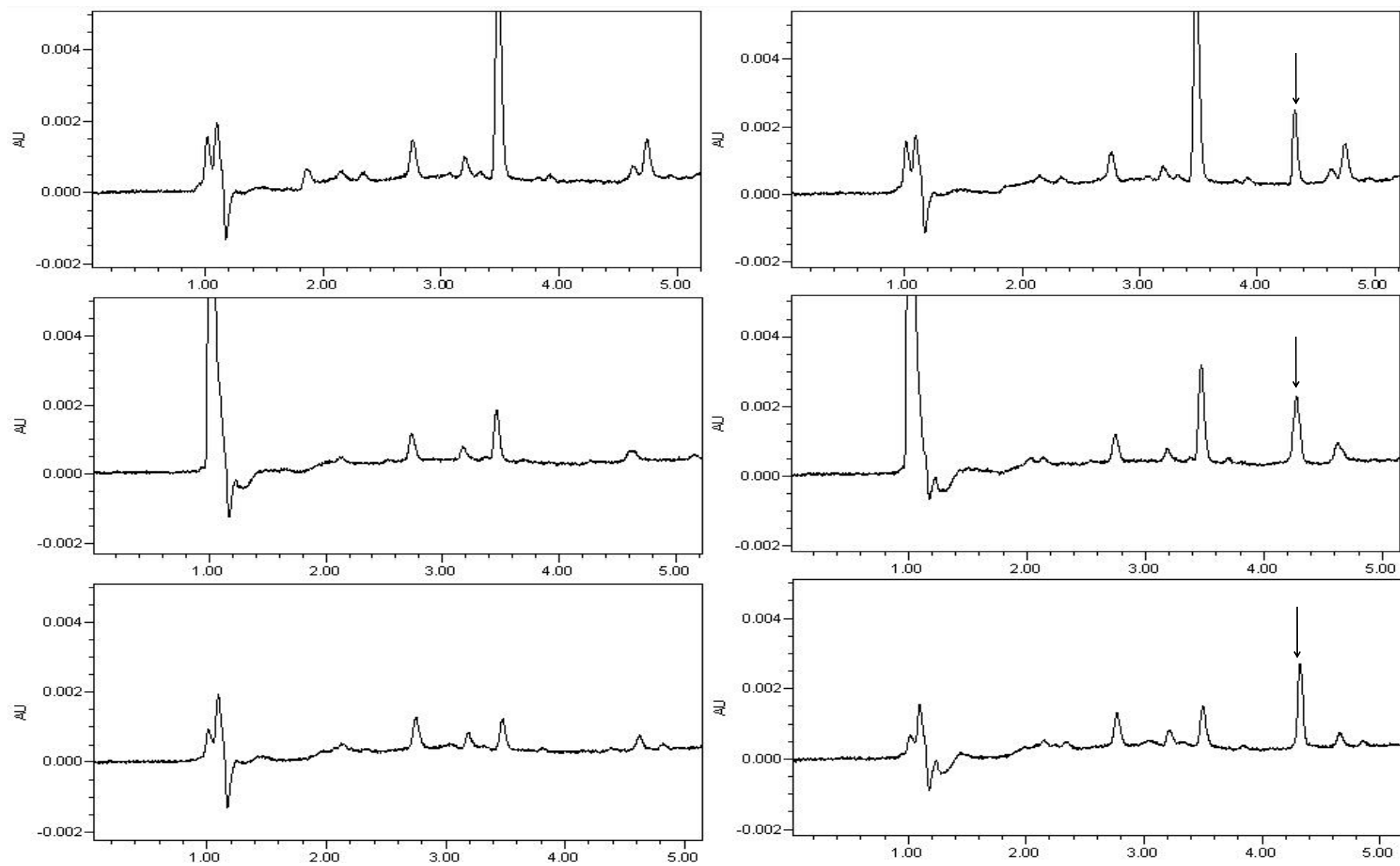
附图1 猪配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg, 右）超高效液相色谱图



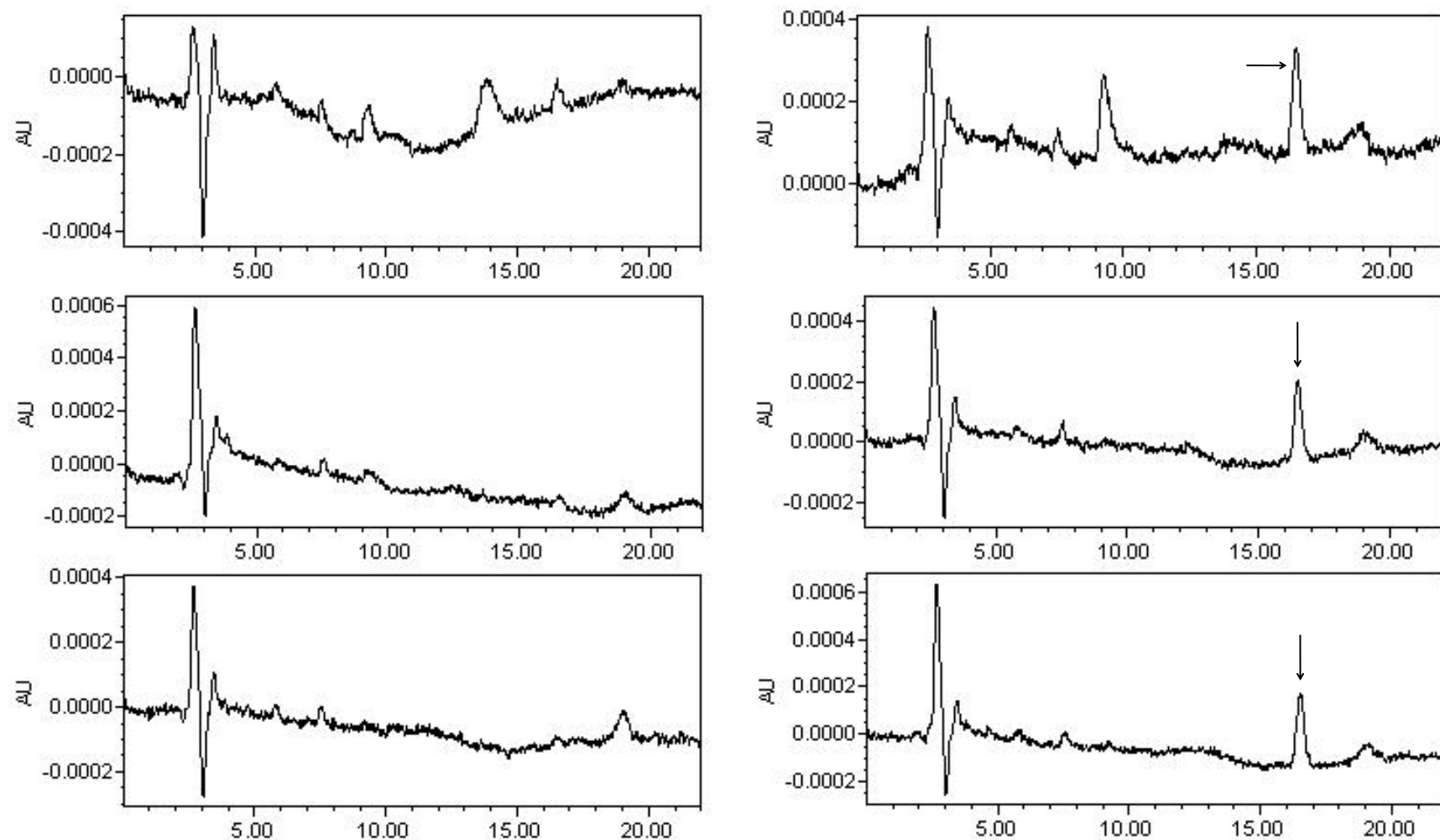
附图2 鸡配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg, 右）超高效液相色谱图



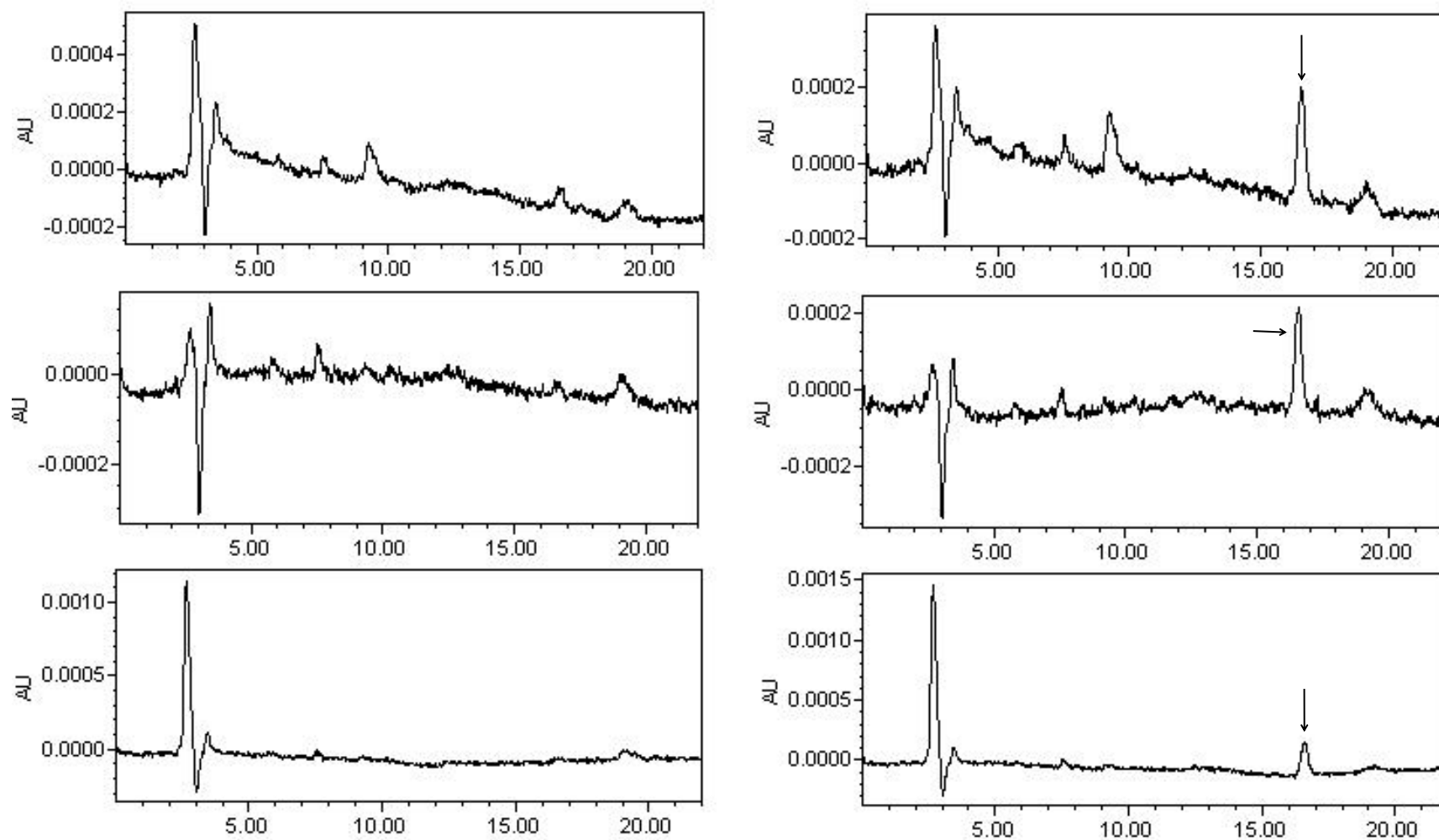
附图3 兔配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg, 右）超高效液相色谱图



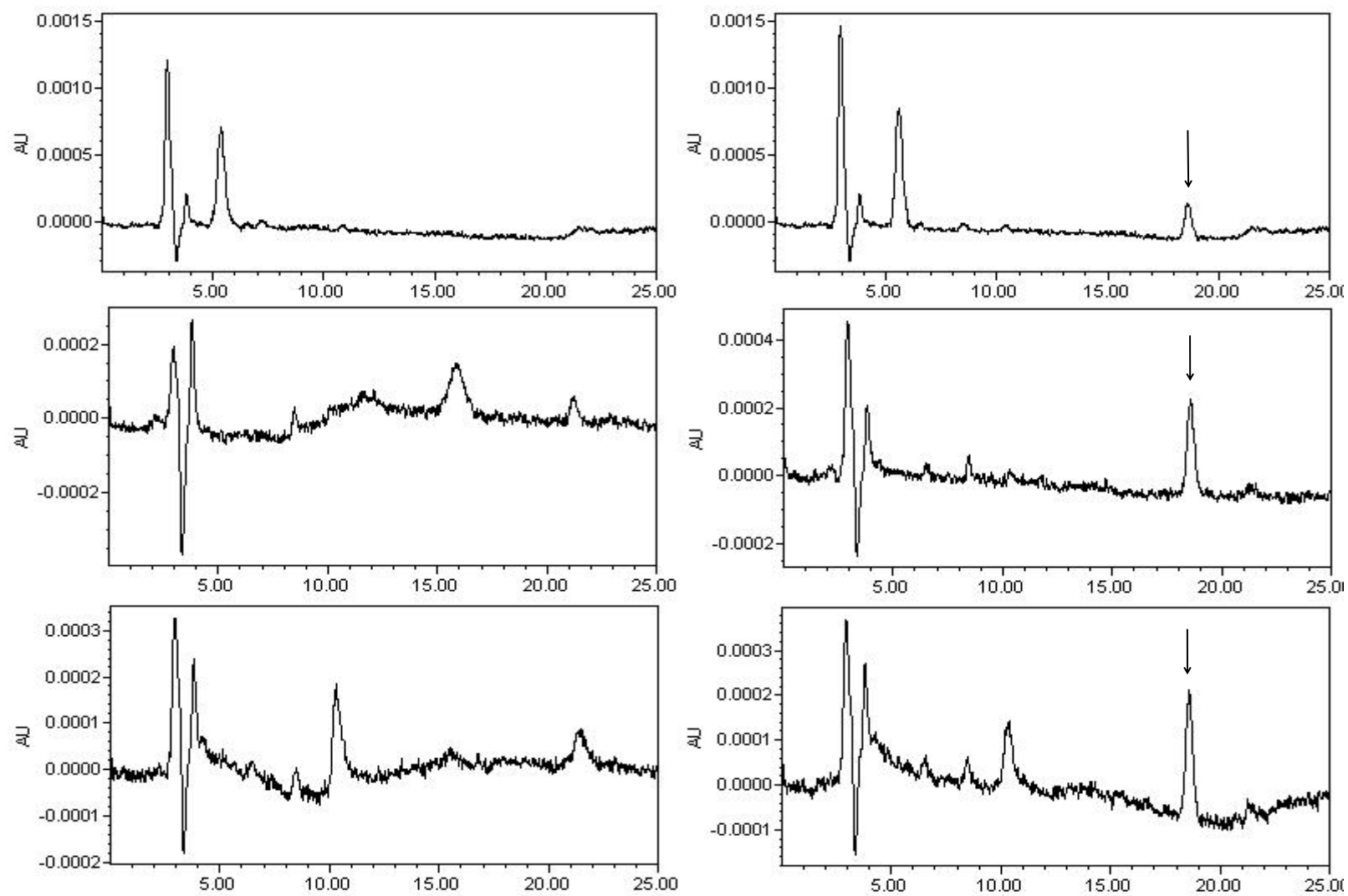
附图4 鱼配合、预混合饲料、牛精料补充料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg, 右）超高效液相色谱图



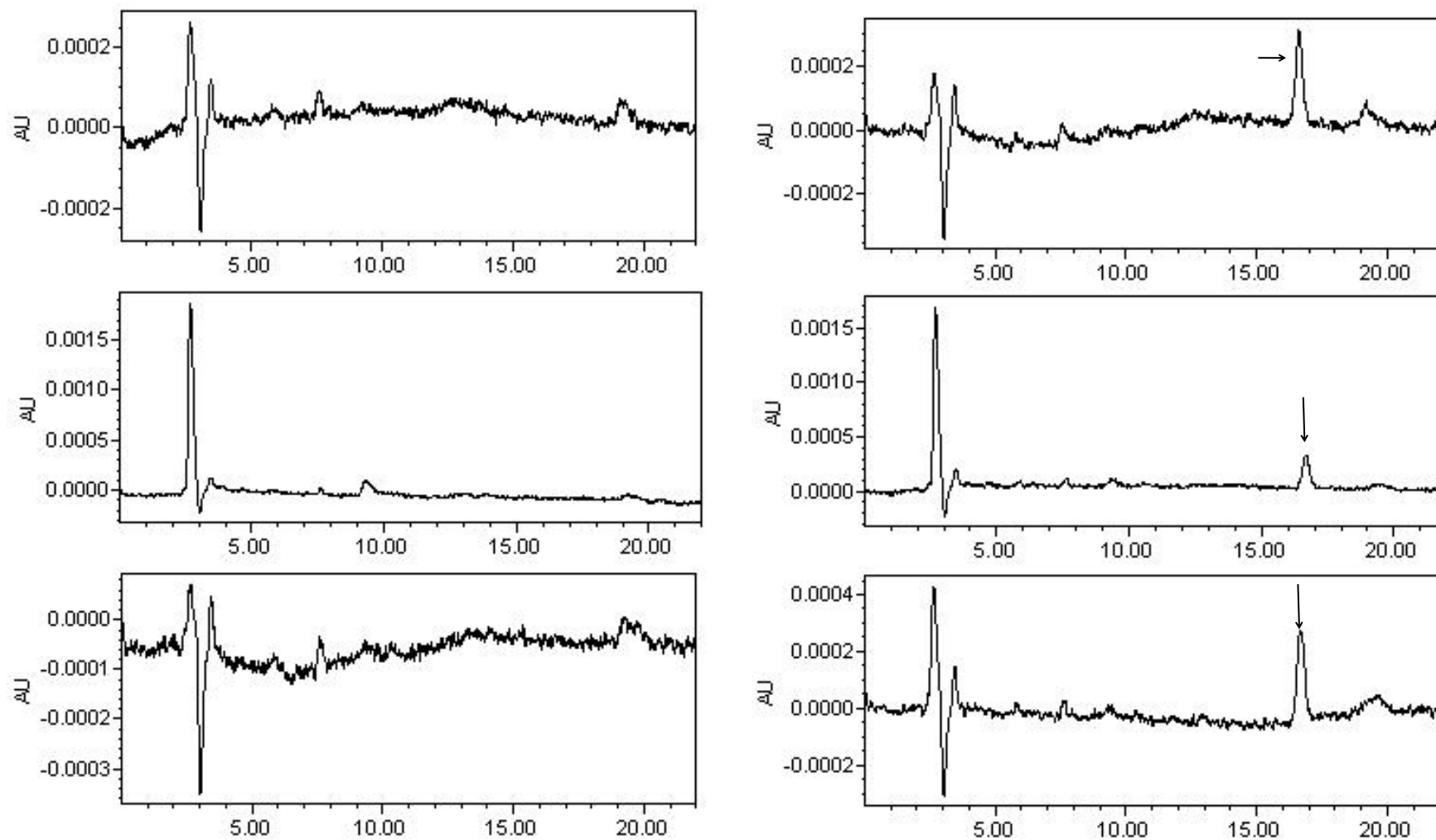
附图5 猪配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg，右）高效液相色谱图



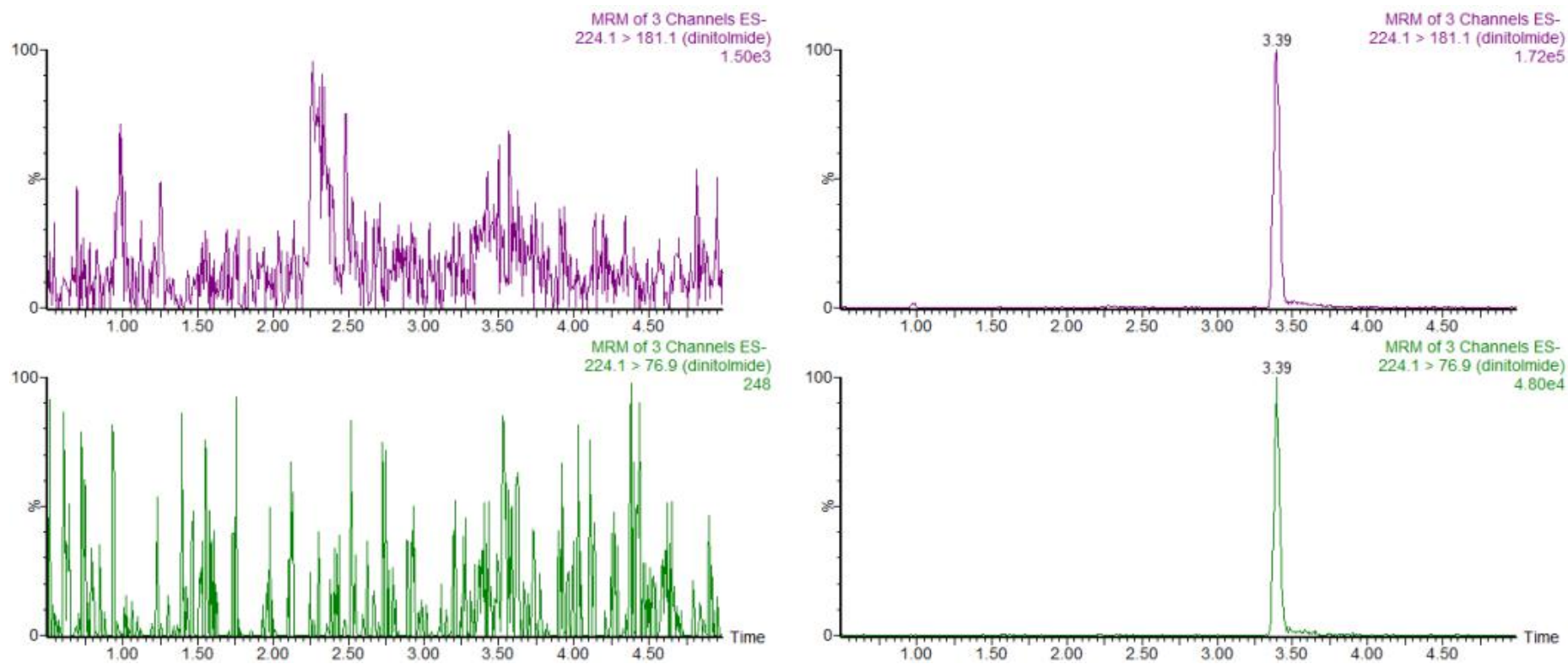
附图6 鸡配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg，右）高效液相色谱图



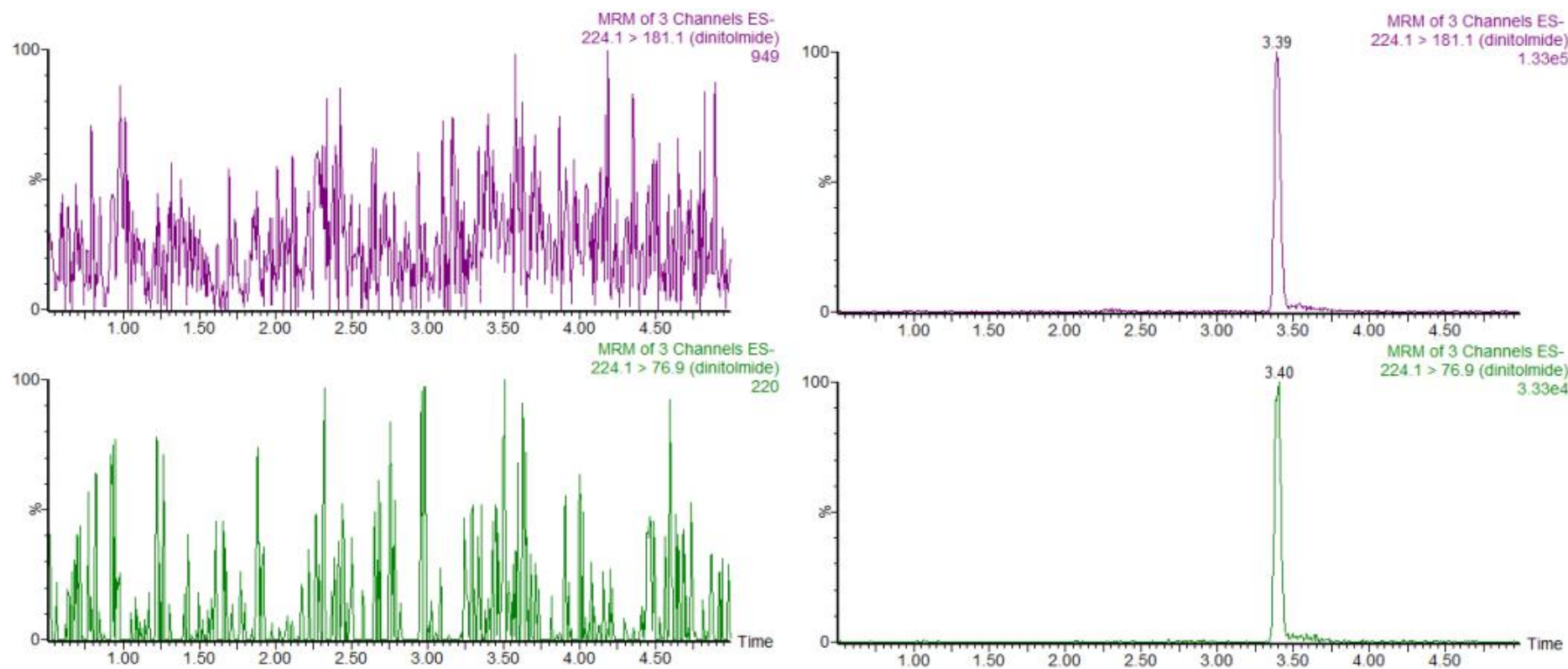
附图7 兔配合、浓缩、预混合饲料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg，右）高效液相色谱图



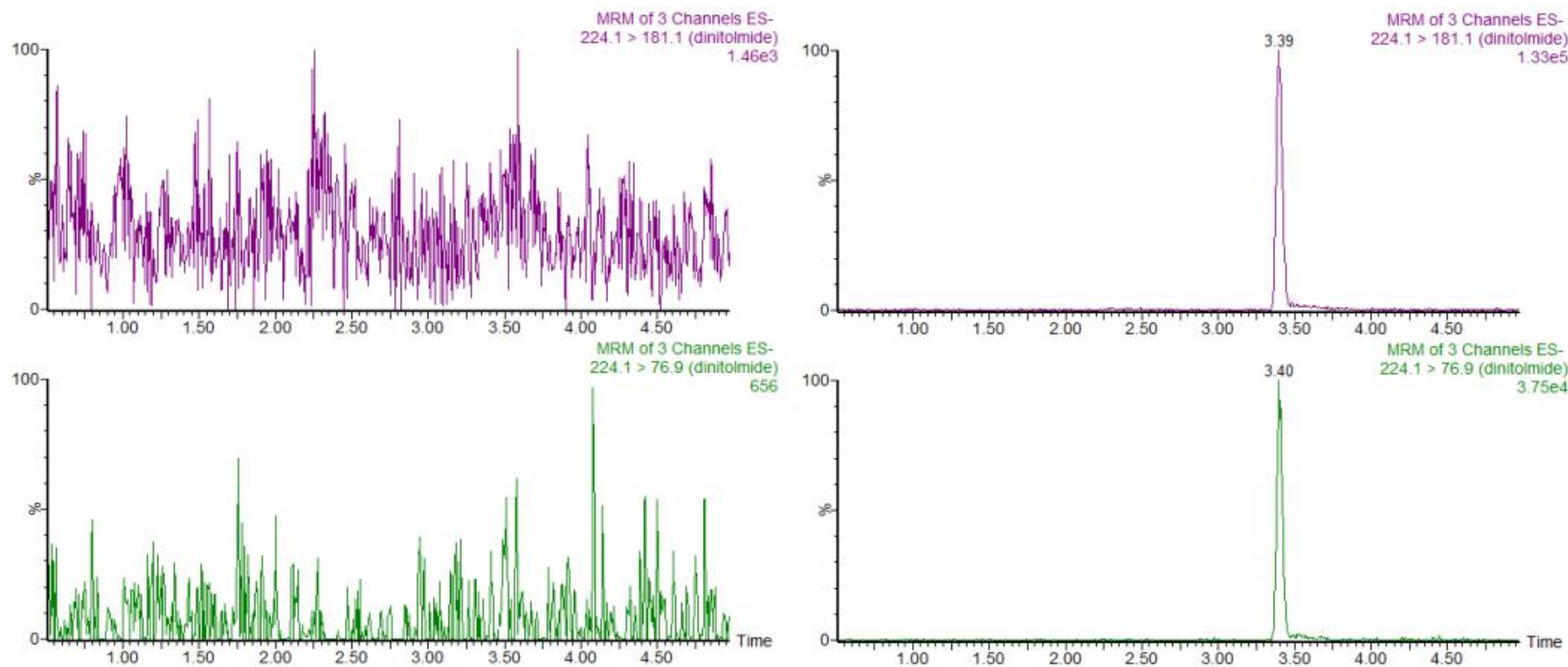
附图8 鱼配合、预混合饲料、牛精料补充料（自上而下）空白样品(左)和添加样品（1.0 mg/kg, 右）高效液相色谱图



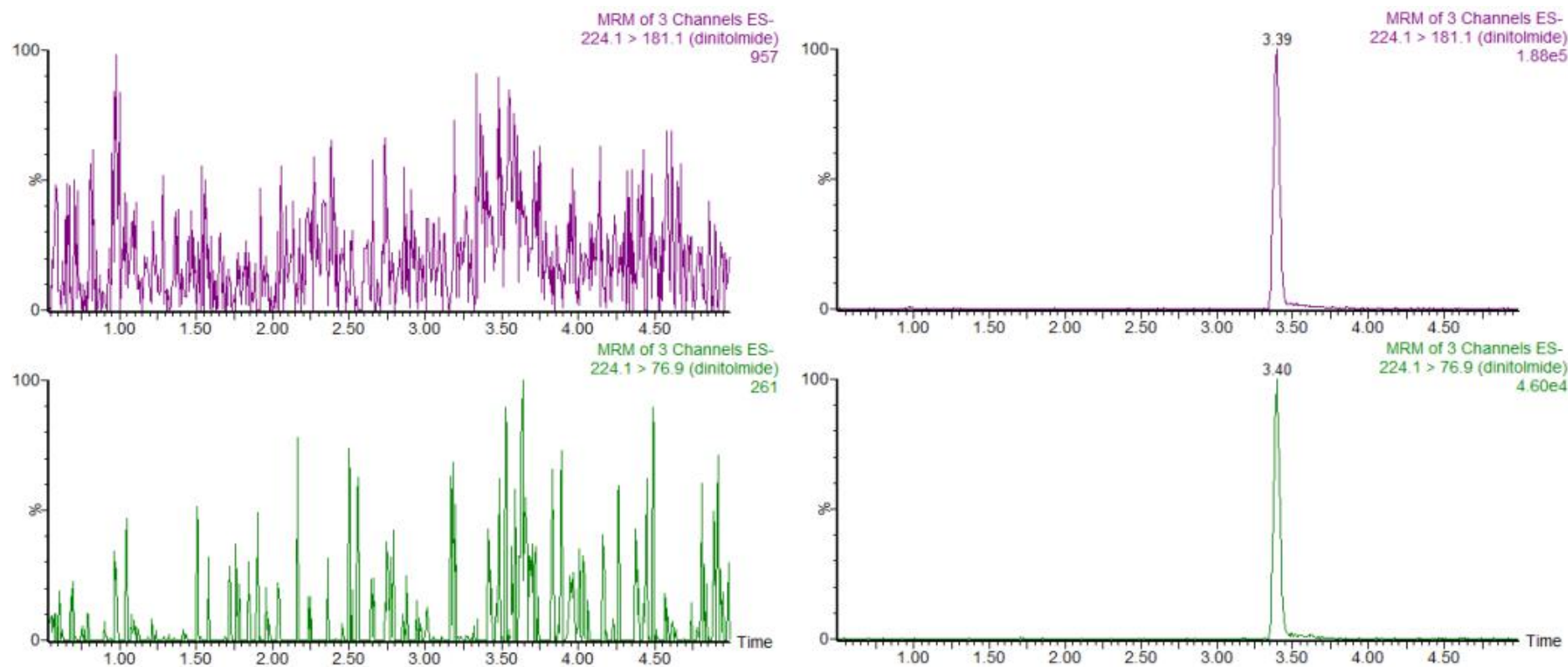
附图9 猪配合饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



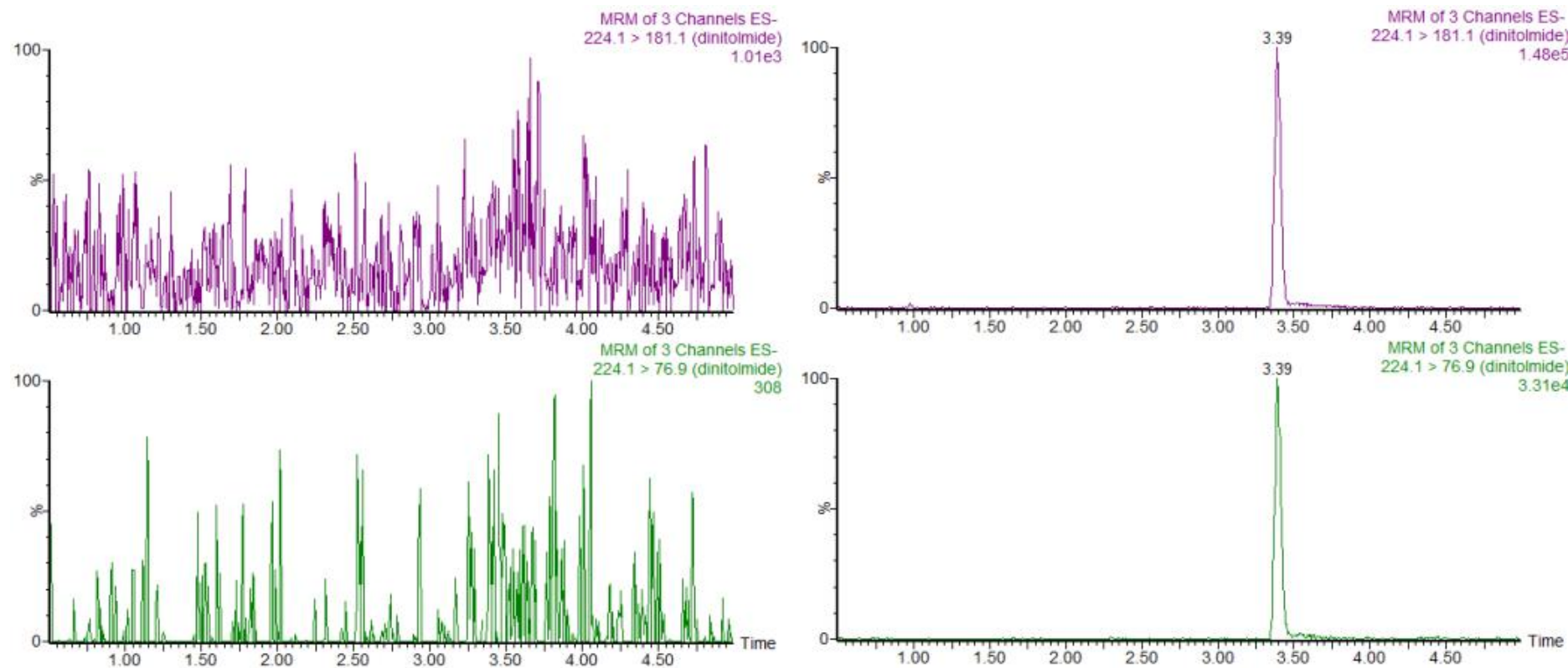
附图10 猪浓缩饲料空白样品(左)和添加样品（0.050 mg/kg，右）MRM色谱图



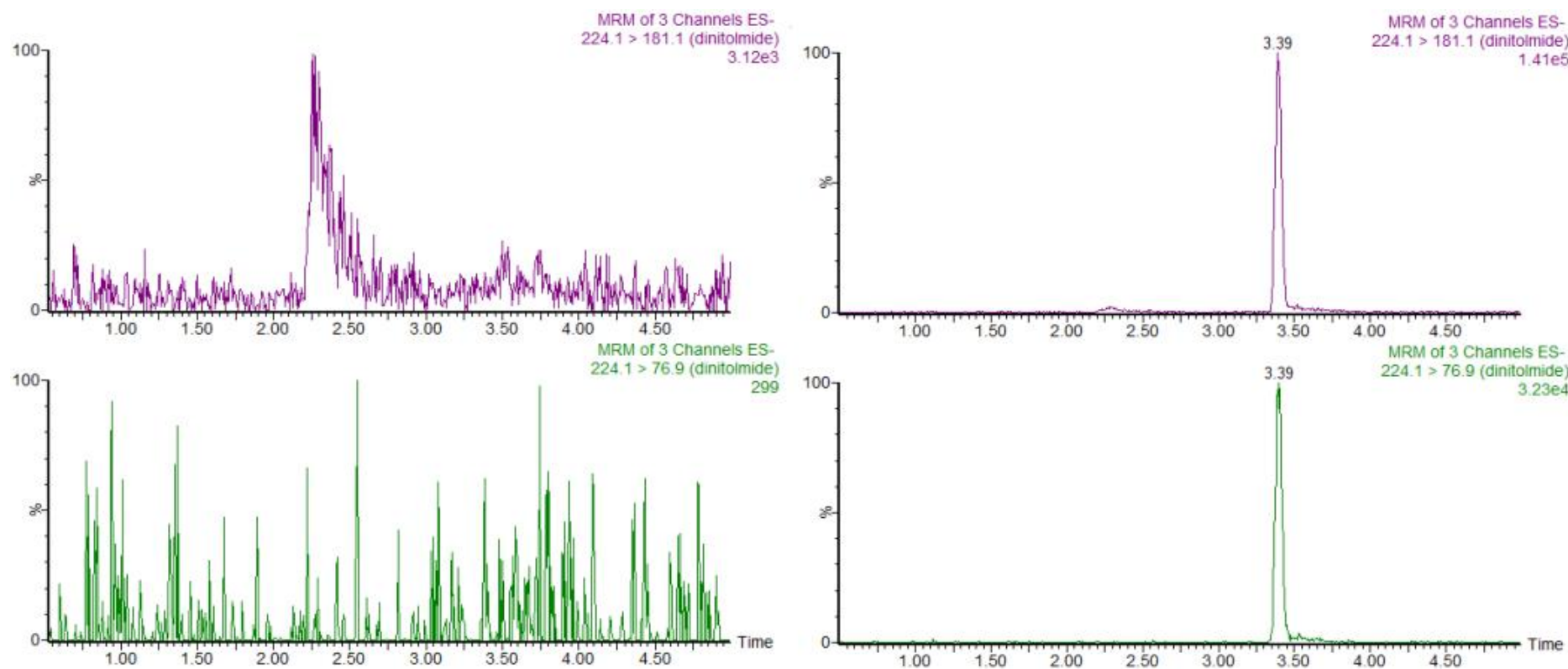
附图11 猪复合预混合饲料空白样品(左)和添加样品（0.050 mg/kg，右）MRM色谱图



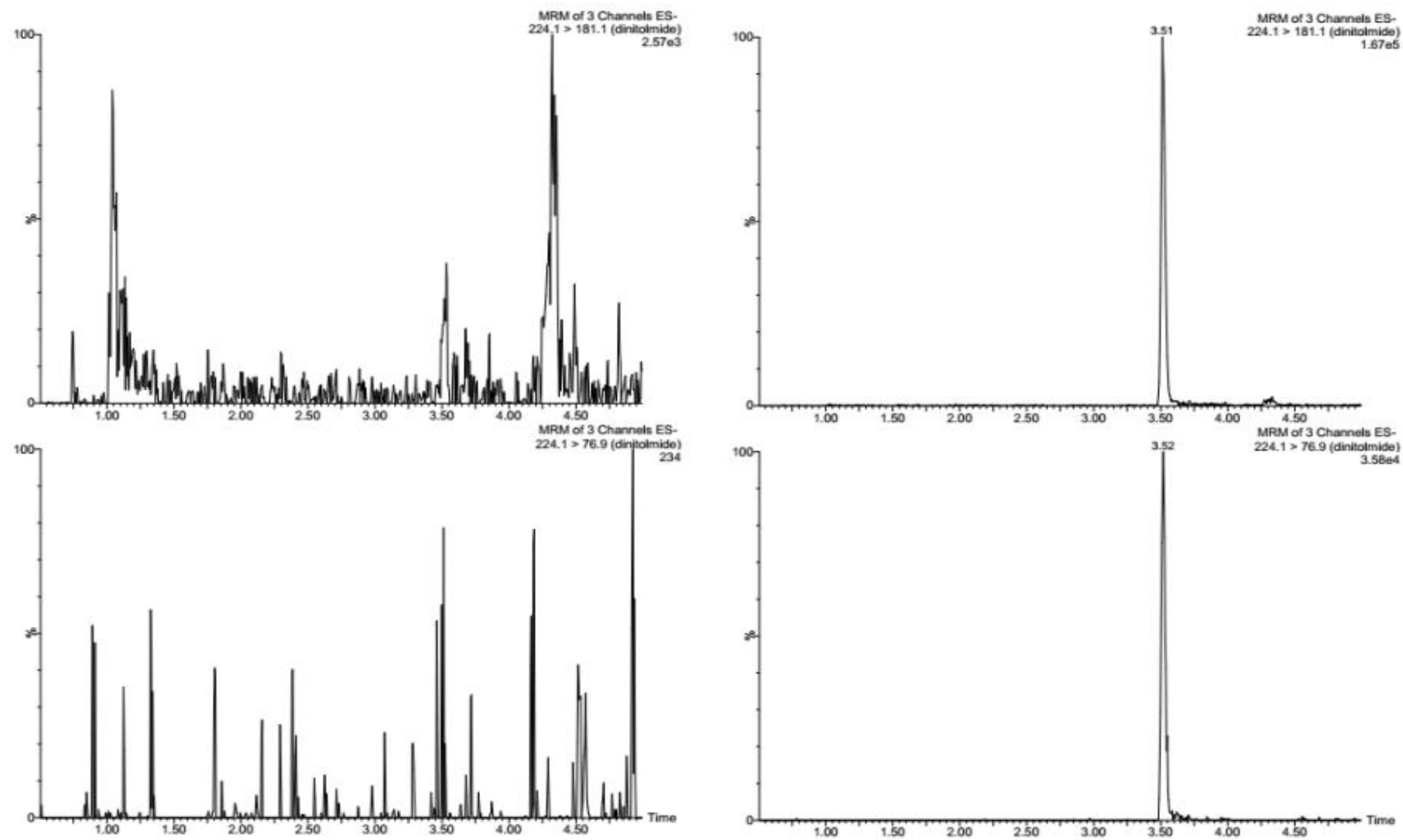
附图12 鸡配合饲料空白样品(左)和添加样品(0.050 mg/kg, 右)MRM色谱图



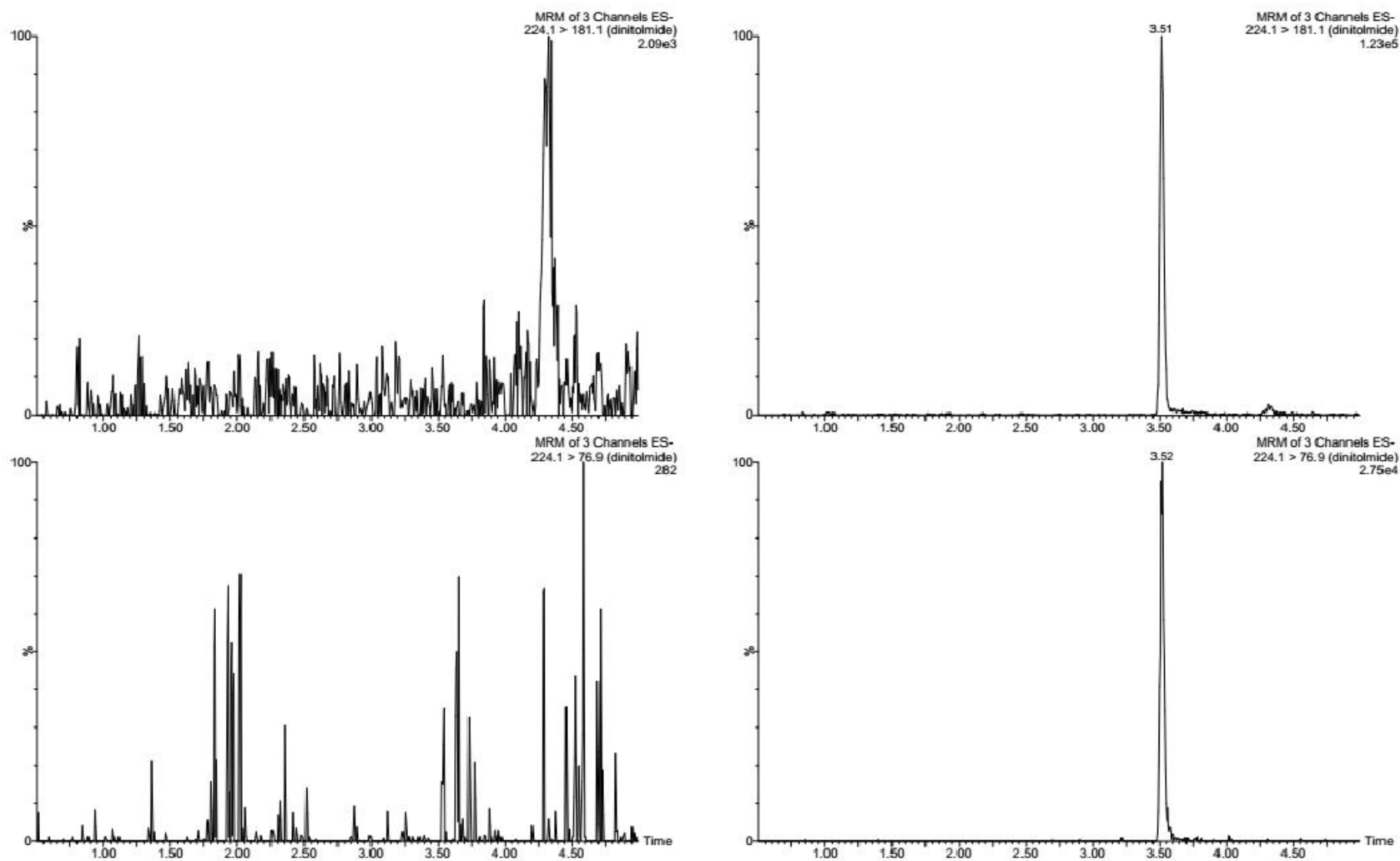
附图13 鸡浓缩饲料空白样品(左)和添加样品(0.050 mg/kg, 右)MRM色谱图



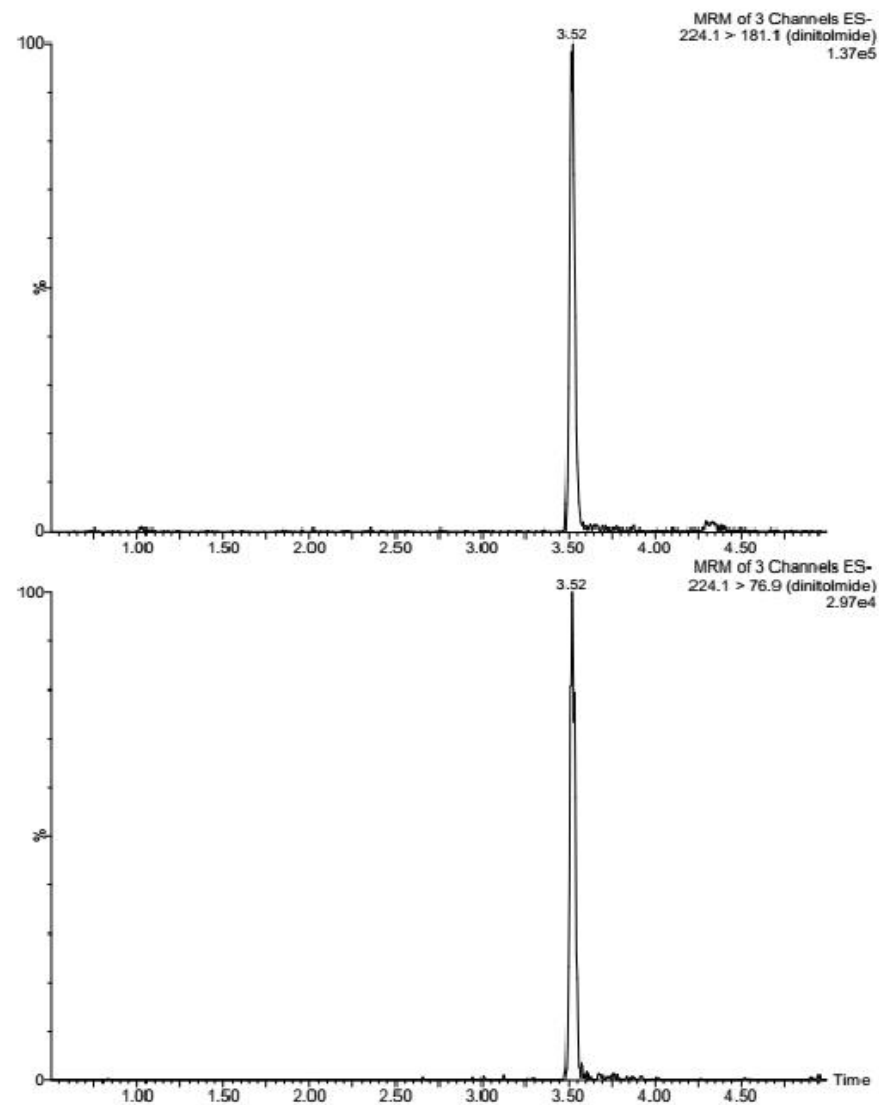
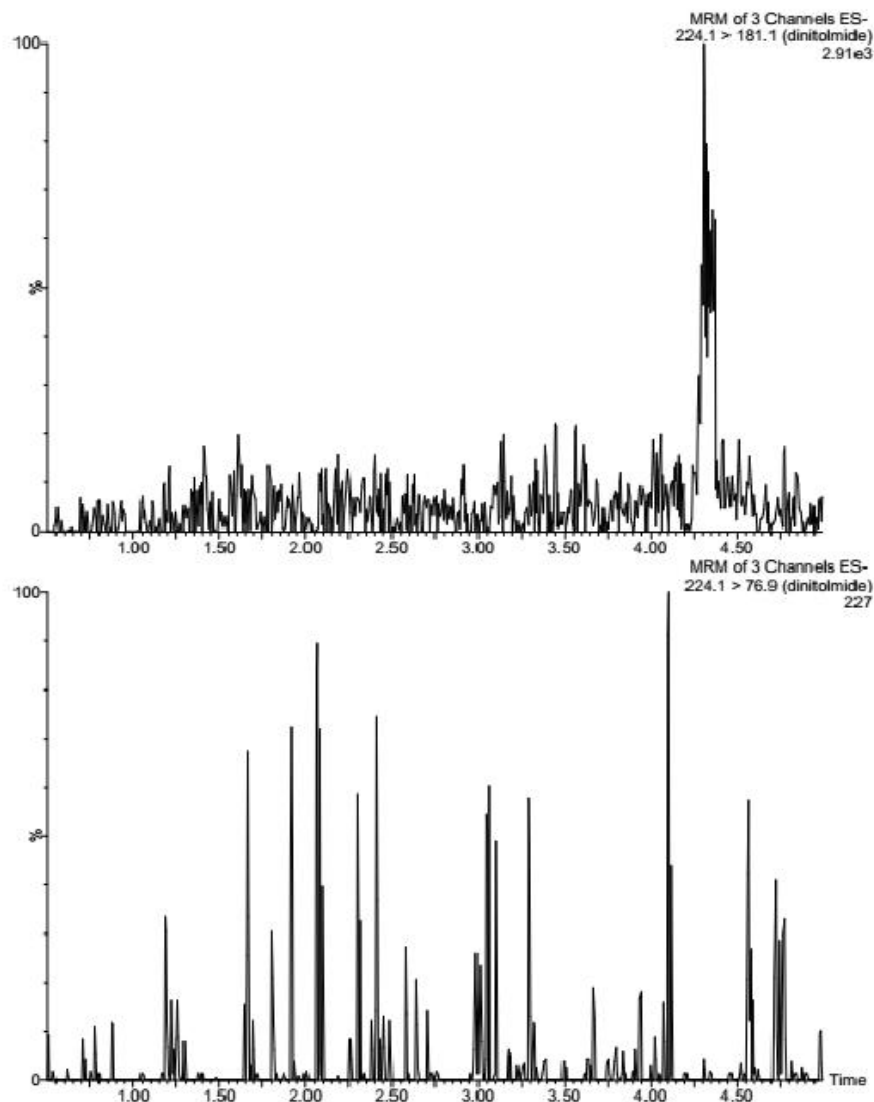
附图14 鸡复合预混合饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



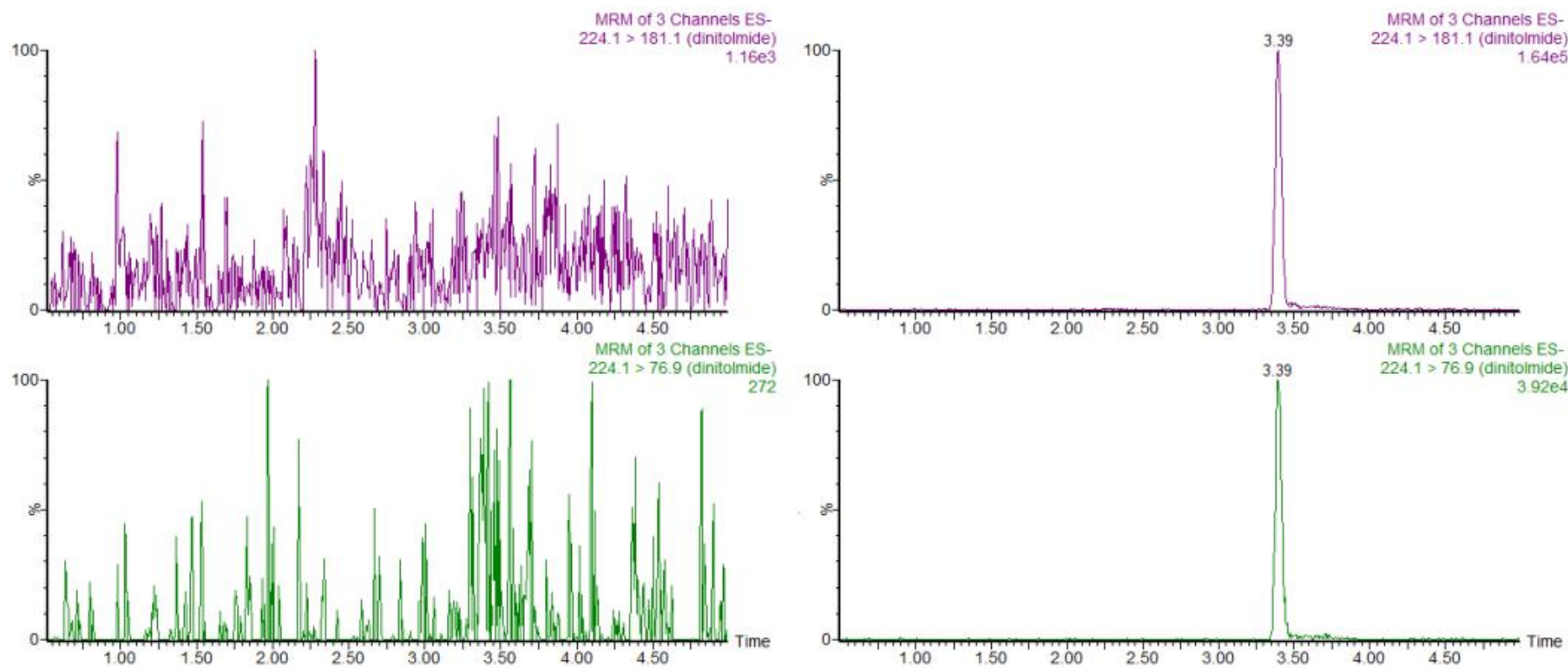
附图15 兔配合饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



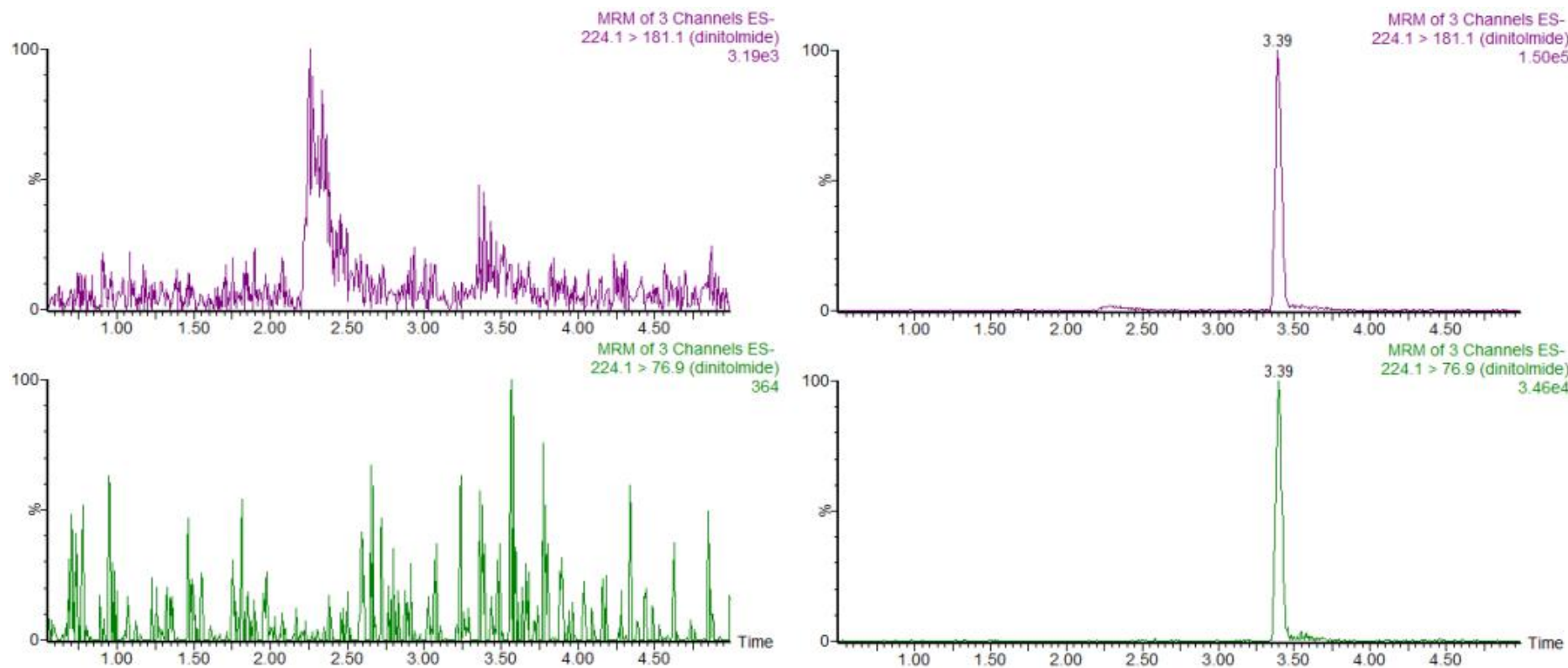
附图16 兔浓缩饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



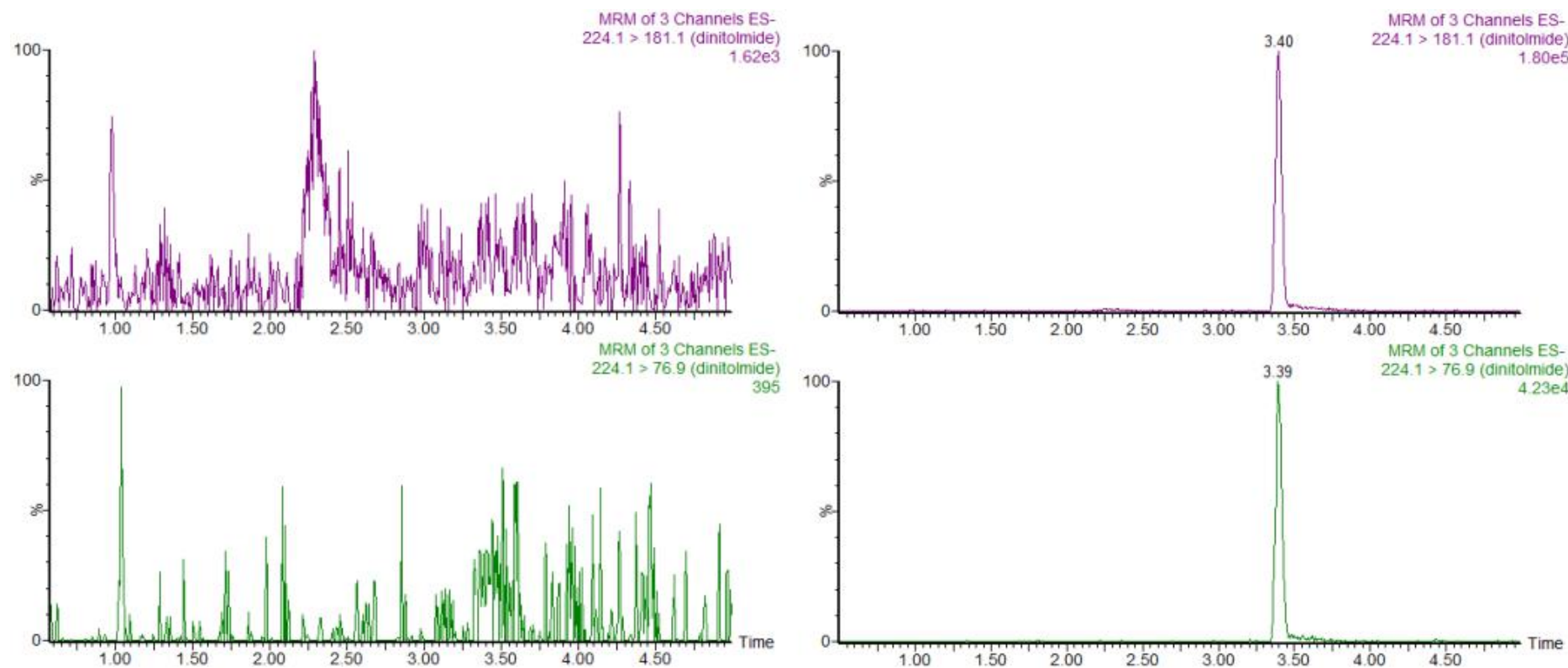
附图17 兔复合预混合饲料空白样品(左)和添加样品（0.050 mg/kg，右）MRM色谱图



附图18 鱼配合饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



附图19 鱼复合预混合饲料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图



附图20 牛精料补充料空白样品(左)和添加样品 (0.050 mg/kg, 右) MRM色谱图