

农业行业标准
《饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

（公开征求意见稿）

中国农业大学动物医学院

2022 年 10 月

饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联质谱法

编制说明

（公开征求意见稿）

一、标准修订工作简况

1. 任务来源

本标准方法资金来源于中华人民共和国农业部提出并下达的饲料中药物添加剂检测方法制修订农业行业标准项目，项目编号为 2018090。完成单位为中国农业大学、辽宁省检验检测认证中心和农业农村部农产品质量安全监督检验检疫测试中心（大连）。在完成标准的全部研究工作后我们起草了标准正文和编制说明初稿进行广泛的征求意见，同时联系了三家具有资质的实验室进行了方法验证。方法验证单位是中国农业科学院农产品加工所、农业农村部饲料校验与安全监督检验检疫测试中心（北京）、国家饲料质量监督检验中心（北京）。在征求意见和复核试验的基础上形成了预审稿。2022 年 7 月 15 日通过了标准预审查工作，根据与会专家的意见进行补充和修改，形成了本公开征求意见稿。且预审会上专家组提出，在我国农业农业部组织完成的《GB 31650-2019 兽药最大残留限量》国家标准中，“硫酸粘杆菌素”已统一名称为“黏菌素”，因此将标准名称修改为“饲料中硫酸黏菌素的测定 液相色谱-串联质谱法”。

2. 制定背景

硫酸黏菌素(Colistin Sulate)又名硫酸粘杆菌素、多粘菌素 E。其本身为一种成分较复杂的混合物，主要成分为多粘菌素 A(又称 polymyxin E1) 和多粘菌素 B(又称 polymyxin E2)，其物理常数见表 1。两者总量超过多粘菌素 E 含量的 85%^[1-2]，在硫酸黏菌素原药中，A 成份多数能达 67%左右，B 成份多数能达 32%左右，多年来它们的总量常作为硫酸黏菌素的代表。此外，多粘菌素 E 较多见的还有 3 种组分，它们的主要结构与多粘菌素 E₁或多粘菌素 E₂相似，不同之处仅是这三种组分是由 L-缬氨酸或 L-异亮氨酸取代了多粘菌素 E₁或 E₂的 L-亮氨酸。这 3 种次要成份常常作为硫酸黏菌素的杂质进行分析，不同生产厂家以及同一厂家不同批次产品中五种成分的含量略有不同，以我国山东某厂某年原药生产中某批次检测结果为例（见表 2），3 种杂质总含量在 4.6%以下。

表 1 硫酸黏菌素 E 的物理常数

硫酸黏菌素	分子式	分子量	比旋度	熔点（分解）℃
E ₁	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃ ·2.5H ₂ SO ₄	1414	[α] _D ^{12.2}	205—210
E ₂	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃ ·2.5H ₂ SO ₄	1400	[α] _D ^{13.0}	206—212

表 2 硫酸黏菌素的常见成份表

硫酸黏菌素	含量
E ₁ + E ₂	93. 6%
E ₁ -1	0. 4%
E ₁ -7MOA	4. 0%
E ₃	0. 2%

因此，我国政府相关部门文件明确规定了硫酸黏菌素的主要成份为 A 和 B。美国药典和日本药典亦有相同规定。我国国家标准《GB 31650-2019 兽药最大残留限量》中规定，黏菌素（Colistin）在兽药中分类为多肽类抗生素，其残留标志物为黏菌素 A 与黏菌素 B 之和，并规定它在动物源食品中的残留限量为 50-300 $\mu\text{g/kg}$ 。因此，在饲料中该药物的含量分析还是动物组织中该药物残留分析中需检测黏菌素 A 和黏菌素 B 之和。

硫酸黏菌素具有口服吸收小、促生长效应和不易产生耐药性的特点，属于低残留抗生素，但其内服吸收很少，不适用于作全身治疗。我国饲料相关产品有硫酸黏菌素预混剂和硫酸黏菌素预混剂（发酵）两种，其用法与用量相同。均为主要用于治疗敏感革兰氏阴性菌引起的牛、猪、鸡肠道感染，以黏菌素计进行混饲，每 1000 kg 饲料，牛、猪、鸡 75~100 g，连用 3~5 d。蛋鸡产蛋期禁用。超剂量使用可能引起肾功能损伤。本品内服吸收极少，不宜用作全身感染性疾病的治疗。2016 年 7 月，我国农业部公告第 2428 号对硫酸黏菌素预混剂和硫酸黏菌素预混剂（发酵）的质量标准进行了修订，确定删除硫酸黏菌素预混剂的促生长用途，自 2016 年 11 月 1 日起执行。农业部原发布的同品种质量标准同时废止（农业部公告第 1594 号同品种质量标准除外）；并删除农业部公告第 168 号附录 1 产品目录中的“硫酸黏菌素预混剂”。这些兽药管理措施意味着硫酸黏菌素预混剂的销量将会大幅减少。在政策的引导下，今后饲料中该药物的添加改为禁止，饲料中该种药物的添加将会越来越少。但修订相关检测方法，对于从生产源头上监控该药物的非法使用仍具有现实意义。

硫酸黏菌素具有较强的毒副作用。其主要毒副作用为肾毒性、神经毒性和神经肌肉阻滞，主要损害肾上皮细胞，导致肾功能障碍。因此，欧盟率先制定了硫酸黏菌素在动物可食用组织中的最高残留限量标准：牛/羊奶中为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，牛/羊/猪/鸡/兔肌肉、脂肪、肝脏中为 150 $\mu\text{g/kg}$ ，肾脏中为 200 $\mu\text{g/kg}$ ，鸡蛋中为 300 $\mu\text{g/kg}$ 。我国农业部公告第 235 号中规定的最高残留限量与欧盟相一致。日本肯定列表制度中规定动物组织中硫酸黏菌素的最高残留限量为 200 $\mu\text{g/kg}$ 。

随着硫酸黏菌素在国内外畜牧养殖业中的广泛应用，它在动物性食品中的残留问题也日益突出。而我国目前仅三个行业标准检测方法，即农业部 2086 号公告-6-2014 《饲料中硫酸黏菌素的测定 液

相色谱-串联质谱法》、《SN/T 2223-2008 进出口动物源性食品中硫酸黏菌素残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》和《SN 0668-1997 出口肉及肉制品中黏菌素残留量检验方法 杯碟法》。第一个标准涉及的饲料种类有限，不能满足目前对饲料中该药物检测的要求；第二个标准仅规定了猪肉、猪肝和猪肾中硫酸黏菌素的测定方法。第三个标准采取的杯碟法不能准确定性定量。因此，研究改进原饲料中硫酸黏菌素检测方法，制定出一套适合我国国情、灵敏度高、简便、准确的检测手段，对饲料中硫酸黏菌素含量进行监控，对于生产实践具有重要意义，而且会带来重大的社会效益。

国外对硫酸黏菌素残留研究较早，自 80 年代以来建立了多种检测方法，包括微生物法、酶联免疫测定法（ELISA）、高效液相色谱法（HPLC）、薄层色谱法（TLC）、液相色谱-质谱联用法（LC-MS）等。微生物法等操作简便，样品用量小，前处理简单，但不能够准确定性定量分析。HPLC 法能进行准确的定量分析，自 80 年代以来在硫酸黏菌素的残留分析中多有报道，但由于 HPLC 法的检测限较高，最低的也仅为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，而且硫酸黏菌素的组分较多，含较多微量组分，目前尚未完全分离清楚，其应用上有较大的局限性。近年来开发了液相色谱-质谱联用方法，可用于该兽药的直接定性和定量分析。Decolin 等（1997）用 HPLC 方法测定牛组织及牛奶中硫酸黏菌素的残留。采用 10%（W/V）三氯乙酸作蛋白沉淀剂进行预处理后，在 C_{18} 色谱柱上分离，用荧光检测器检测。粘杆菌素 A、B 结构用 HPLC 法结合质谱法进行分析。Della 等（2005）用 LC-MS/MS 法同时检测牛奶和动物肝脏组织中杆菌肽和硫酸黏菌素，对两种多肽类的主要成分进行鉴定和定量分析，测得硫酸黏菌素 E1 的定量限为 50 $\mu\text{g/kg}$ ；所有基质中平均日内和日间回收率分别是 89.2-110%和 90.4-112%。原标准方法饲料中的硫酸黏菌素经三氯乙酸溶液提取，同时用乙酸铅沉淀蛋白，再经 HLB 固相萃取柱净化，浓缩后采用液相色谱-串联质谱法检测，外标法定量，对少数种类的饲料品种回收率和变异系数均符合痕量分析的要求。

我们在参考了这些文献报道的基础上，研究建立了饲料中硫酸黏菌素的液相色谱—串联质谱检测方法。

3. 主要工作过程

本标准主要起草单位为中国农业大学、辽宁省检验检测认证中心、农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心（大连）。方法研制的主要工作过程如下：

2018 年 9 月 成立标准编制小组，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。

2018 年 9 月 查询和收集了国内外相关标准和文献资料，制定了初步的实验方案。

2018 年 10 月-2019 年 7 月 方法建立和条件优化及检测方法技术参数的确定。

2019 年 7 月-2019 年 8 月 形成方法的标准曲线、灵敏度、准确度和精密度检验数据。

2019 年 8 月-12 月 进行标准征求意见。

2019 年 12 月 完成农业农村部蜂产品质量监督检验测试中心的标准复核实验。

2020 年 1 月-2020 年 5 月 完成农业农村部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)的标准复核实验。

2020 年 3 月-2021 年 1 月 完成农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心(北京)的标准复核实验。

2022 年 6 月 30 日 根据专家们返回的意见进行修改, 形成标准预审稿。

二、标准编制原则、主要技术内容及确定依据

1. 标准编制原则

1.1 执行标准

本标准的结构、技术要素及表述方法是按照 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》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分: 试验方法标准》规定的要求进行编写。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。

1.2 先进性

对本标准中有关内容的确定, 主要借鉴参考本领域国内先进研究技术, 以提高本标准中检测技术的准确性和可重复性。

1.3 可操作性

在标准制定过程中, 始终把经济实用和可操作性作为重要的依据, 广泛征求生产单位和使用单位的意见, 使本标准便于实施。

1.4 通用性

本标准制定过程中收集不同种类的产品进行检测并归纳总结出适用范围和方法检出限。

2. 主要技术内容确定依据

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

本标准使用各项液相色谱-串联质谱仪进行检测方法开发。使用仪器型号为普及率较高的美国 Waters 公司的超高效液相色谱-串联四极杆质谱仪、Agilent 公司的超高效液相色谱-串联质谱仪。

本标准方法学考察包括检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。其中 LOD 拟设定信噪比为 3 时的样品添加浓度, LOQ 拟设定为信噪比为 10 时且回收率结果和相对标准偏差符合要求的样品添加浓度。本标准设低、中、高 3 个添加浓度进行回收率测定, 浓度分别为 2 倍方法定量限、5~20 倍定量限浓度和 50 倍~200 倍定量限浓度。定量限以上添加浓度的回收率范围应该在 80%~120%之间, 结果的变异系数应在 20%以内。标准曲线则使用经空白饲料样品溶液稀释标准贮备溶液得到的系列标准工

作溶液，设置 5 个点以上进行测定。

3. 本方法与原标准方法的主要技术区别

本标准方法的研制在原标准方法的基础上优化改进而成，与原农业部 1486 号公告-5-2010 相比，除编辑性修改外，主要技术变化见表 2。

表 2 本标准方法与原标准方法的区别

		原标准方法	新方法
样品前处理	饲料种类	不包括精料补充料	包括精料补充料
	提取溶剂	4%三氯乙酸溶液	5%草酸溶液
	是否有正己烷脱脂步骤	无	有
	离心步骤	5000 r/min	8000 r/min
仪器检测	柱温	未规定	40 °C
	流动相组成	0.1%甲酸水溶液—含 0.1%甲酸的乙腈溶液	0.2%甲酸水溶液—含 0.2%甲酸的甲醇溶液
	洗脱方法	起始为 2%的含 0.1%甲酸的乙腈溶液	起始为 5%的含 0.2%甲酸的甲醇溶液
	柱温	常温	40 °C
标准曲线	浓度范围	10 ng/mL-5000 ng/mL	20 ng/mL-5000 ng/mL

4. 测试条件的确定

(1) 质谱检测条件

质谱检测条件在原标准的基础上略作修改获得。硫酸黏菌素是由环状多肽和脂肪酸结合而成的碱性多肽分子，在质谱的正离子模式下，容易质子化生成多电荷的分子离子。在 300~1200 Da 的质量范围内，对硫酸黏菌素的分子离子进行多次全扫描，结果发现四个强度较大的准分子离子峰，分别是 $[M+2H]^{2+}$ 峰 m/z 585.8 和 m/z 578.8， $[M+3H]^{3+}$ 峰 m/z 390.9 和 m/z 386.2，但 $[M+3H]^{3+}$ 峰强度比 $[M+2H]^{2+}$ 更大一些。以此两个离子为母离子进行子离子扫描发现， m/z 384.9 与 m/z 379.1 为硫酸黏菌素 E1 (m/z 390.9) 两个主要的碎片离子， m/z 380.3 与 m/z 374.5 为硫酸黏菌素 E2 (m/z 386.2) 的两个主要的碎片离子。经分析，它们分别是母离子碎裂失去一个 H_2O 和两个 H_2O 后形成的 $[M-H_2O+3H]^{3+}$ 和 $[M-2H_2O+3H]^{3+}$ 碎片离子。

以上研究结果中两个成份的母离子和子离子与原标准方法一致，因此各母离子与子离子仍采用原方法。但将原特征离子由小数点后一位数改成了二位数（表 3）。经过条件优化，修改了原方法中的个别质谱参数（表 4）。

表 3 硫酸黏菌素的特征离子对、锥孔电压和碰撞能量

分析物	现特征离子对(m/z)	原特征离子对(m/z)
硫酸黏菌素 A	390.74>379.08	390.8>384.9
	390.74>384.82	390.8>379.1
硫酸黏菌素 B	386.29>380.41	386.2>380.2
	386.29>374.30	386.2>374.4

表 4 硫酸黏菌素的质谱条件改变情况

	原方法	现方法
去溶剂温度	350 °C	340 °C
锥孔气流速	50 L/hr	27 L/hr

本研究先采用 Athena UHPLC C18 柱（50 mm ×4.6 mm，1.8 μ m），后又采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱（50 mm ×2.1 mm，1.7 μ m）进行色谱分离，在相同流动相条件下，两种成份的分离情况差异不大。流动相开始采用原方法的含 0.1%的甲酸乙腈溶液（A）和 0.1%的甲酸水溶液（B）。结果发现在调整不同比例的 A 相和 B 相进行梯度洗脱时，水相和有机相的比例对硫酸黏菌素的峰形影响非常大，后来调整两相中甲酸的浓度，由原来的 0.1%提高到 0.2%后，该现象得到较好的改善。而因此将流动相组成改为 0.2%的甲酸水溶液（A 相）和含 0.2%甲醇的甲醇溶液（B 相）。后又经过多种比例的洗脱程序反复试验，确定了以下梯度洗脱程序。与各个初步设计的流动相程序相比，采用此程序对样品中的硫酸黏菌素进行梯度洗脱时，峰形最佳，且可以使药物和杂质有效分离。

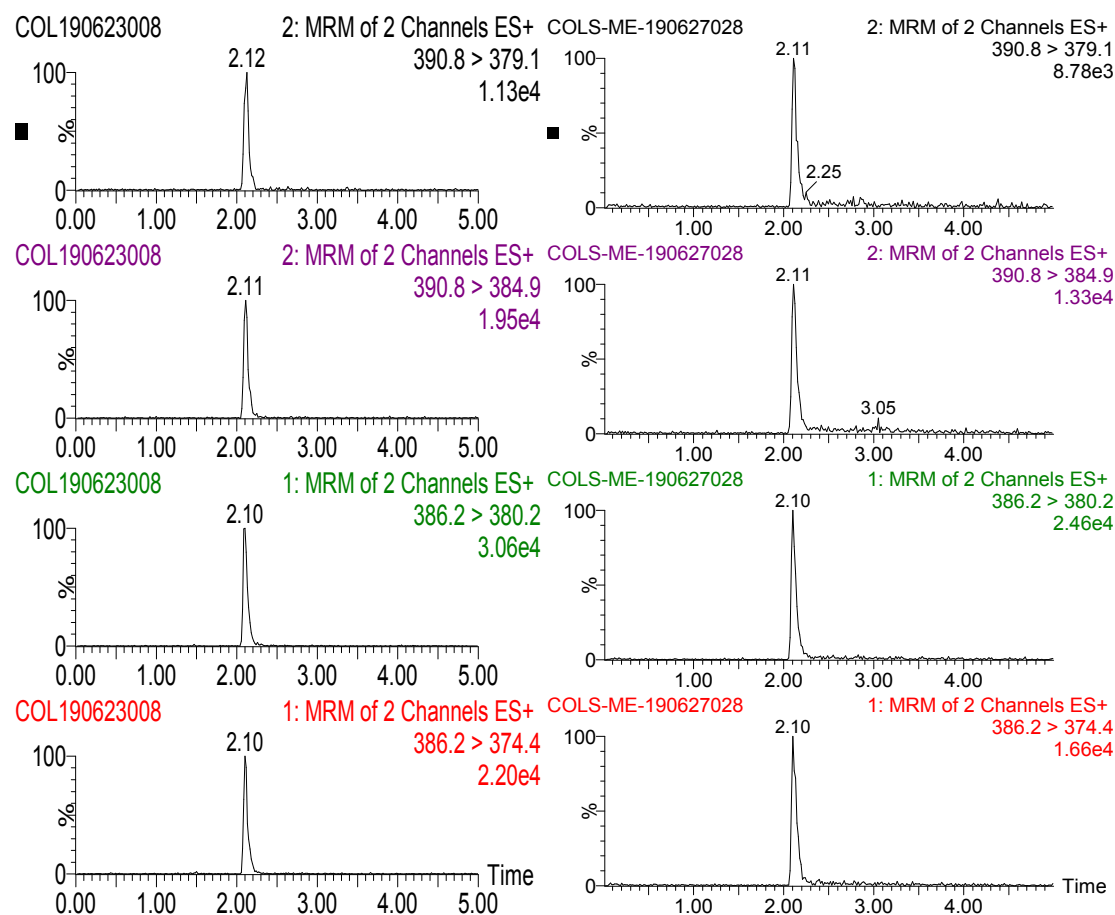


图 1 100 ng/mL 硫酸黏菌素标准溶液选择离子色谱图

(Athena UHPLC C18 柱和 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱)

表 5 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)	流速 (mL/min)
0.0	95	5	0.30
2.0	95	5	0.30
3.0	10	90	0.30
4.0	10	90	0.30
4.5	95	5	0.30
5.0	95	5	0.30

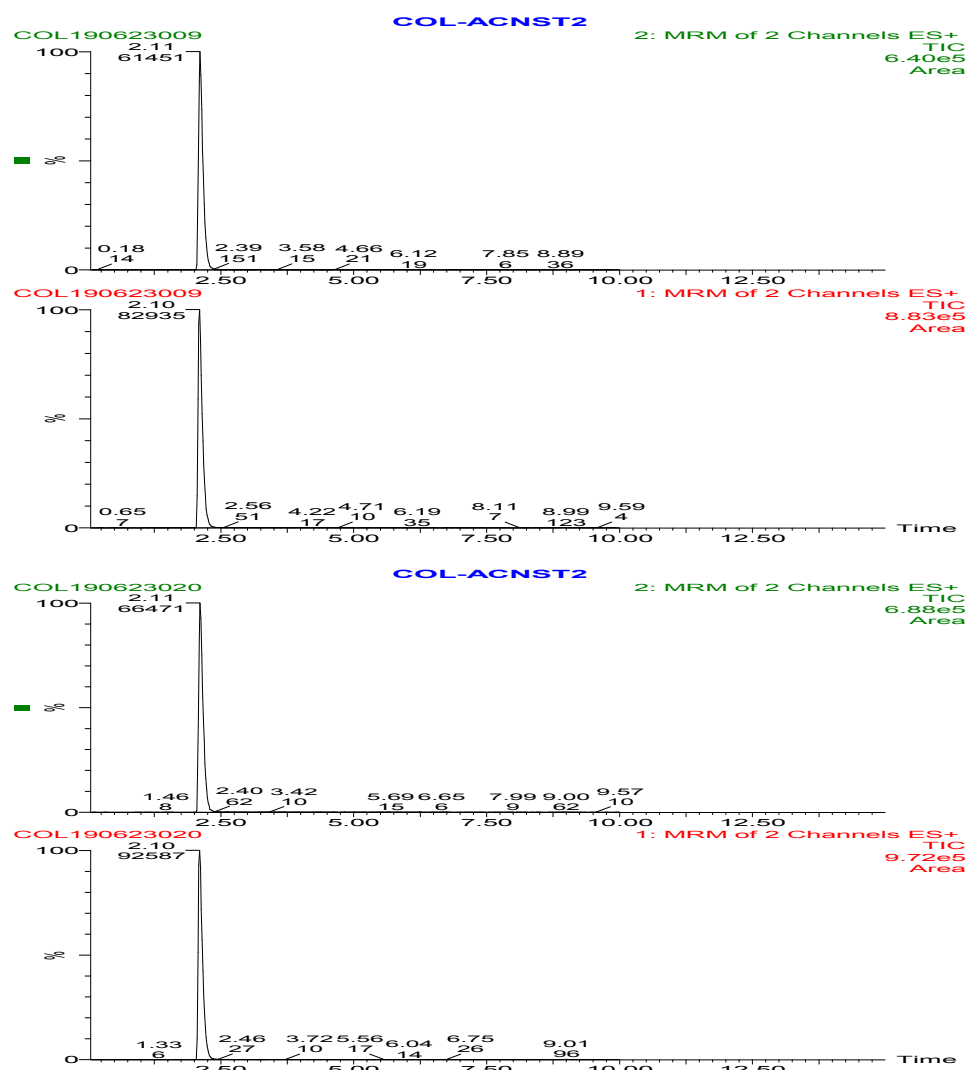


图 2 100 ng/mL 硫酸黏菌素标准溶液总离子流色谱图

(Athena UHPLC C18 柱和 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱)

(2) 样品溶解液的选择

样品溶解液的选择通过对不同溶剂中标准溶液的稳定性研究确定。采用以上建立的仪器检测条件，分别用含 0.5%甲酸的乙腈、80%乙腈、5%乙腈、0.1%甲酸-甲醇 (8+2, v/v)、0.2%甲酸-乙腈 (8+2, v/v)、乙腈共 6 种溶液稀释 100ppm 硫酸黏菌素标准溶液，配制成 6 种不同溶剂的 100ppb 硫酸黏菌素标准溶液进样分析，结果如表 6 和表 7 所示，初次配制的标准溶液进样分析时，含有机相最低和纯有机相的标准溶液响应值最高，其次为 20%有机相的含酸溶液，再次为 80%乙腈和含 0.5%甲酸乙腈。随着时间的延长，各溶液都有不同程度的降解发生，其中 80%有机相的含酸溶液配制的标准溶液降解最快，其次为含有机相最低和纯有机相的标准溶液，再次为两种 20%有机相的含酸溶液。综合考虑了标准溶液响应值和降解情况，最后选择采用 0.2%甲酸-甲醇 (8+2, v/v) 溶解标准溶液和进样分析的样品。由实验数据看来，即使是用 0.2%甲酸-甲醇 (8+2, v/v) 溶解样品，第二天时虽然 E1

的检测无影响，但 E2 仍会降解 9.49%。实际样品的检测中该现象可能更严重，因此实际准备的样品最好在一天内测完为宜。这里需要说明的是，表 7 中 0.1%甲酸-甲醇（8+2, v/v）和 0.2%甲酸-乙腈（8+2, v/v）配制的标准溶液第二天出现降解率为负，即第二天反而浓度偏高，反而分别增高了 7.19% 和 1.64%，该结果的产生是两天时间的测定误差造成的，但也从另一个方面说明了溶液中目标药物的稳定性。

此外对用 0.1%甲酸-甲醇（8+2, v/v）配制的标准溶液长期稳定性实验结果表明，第五天以后标准溶液响应值变化很小，-4℃下保存 3 个月对药物浓度影响很小。

表 6 不同时间测定的 100ppb 标准溶液峰面积

溶解液	峰面积					
	第 1 天		第 2 天		第 5 天	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
5%乙腈溶解	1319	650	482	291	347	205
乙腈溶解	1199	650	492	314	411	252
含 0.5%甲酸的乙腈	303	120	87	84	38	31
80%乙腈	376	238	165	157	34	25
0.1%甲酸-甲醇（8+2, v/v）	737	509	790	433	443	257
0.2%甲酸-乙腈（8+2, v/v）	732	495	744	448	506	340

表 7 100ppb 标准溶液随时间变化的稳定性分析

溶解液	降解率（%）					
	第 1 天		第 2 天		第 5 天	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
5%乙腈溶解	0	0	63.46	55.23	73.69	68.46
乙腈溶解	0	0	58.97	51.69	65.72	61.23
含 0.5%甲酸的乙腈	0	0	71.29	30.00	87.46	74.17
80%乙腈	0	0	56.12	34.03	90.96	89.5
0.1%甲酸-甲醇（8+2, v/v）	0	0	-7.19	14.93	39.89	49.51
0.2%甲酸-乙腈（8+2, v/v）	0	0	-1.64	9.49	30.87	31.33

好的溶剂溶解空白样品基质并配制成基质添加标准溶液，对这些标准溶液进行稳定性分析，结

果见表 8，由表可知，2 天内检测对样品溶液的响应值影响在 5%以内，3 天内影响值在 10%以内。

表 8 500ppb 基质添加标准溶液的稳定性分析

基质类型	降解率 (%)					
	第 1 天		第 2 天		第 3 天	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
配合饲料	100	100	95.11	95.28	90.27	91.34
浓缩饲料	100	100	96.98	94.76	91.99	90.60
预混合饲料	100	100	99.72	98.55	97.76	95.38
精料补充料	100	100	98.64	97.48	95.25	94.72

(3) 样品提取和净化

国内外有关动物组织中硫酸黏菌素残留检测报道中多采用酸性提取液提取药物。如 Eric 等用 4 倍体积的 1 M 盐酸提取，再用 6 M 盐酸去蛋白后检测牛组织中硫酸黏菌素 E1、B 的残留；Decolin 等用 10%(W/V)三氯乙酸提取牛组织(肌肉、肾脏、肝脏、脂肪)及牛奶中的硫酸黏菌素；Della 等用三氯乙酸提取、甲酸脱蛋白检测牛奶中杆菌肽和硫酸黏菌素的残留。陈邵峰等采用磷酸盐缓冲液 (pH6.0)、龚丽景等用磷酸盐缓冲液和 5%硫酸提取动物组织中的硫酸黏菌素。原标准方法采用 4% 三氯乙酸溶液和 4%乙酸铅溶液 (1: 1) 超声提取，在此研究基础上，辽宁省兽药饲料监察所采用 5%草酸超声提取，我们对购自市场的 21 种饲料样品进行了提取研究，最终采用该溶液提取饲料中的药物，各种饲料均达到了良好的提取效果。

样品净化上，我们对 C18 小柱、HLB 小柱、SCX 小柱都进行了初步筛选，发现 HLB 小柱的回收率最佳，因此确定采用 HLB 小柱进行净化处理。采用 100 ng/mL 标准溶液对 waters 公司和安普公司购置的 60mg 的 HLB 小柱和 500mg 的 HLB 小柱同时进行小柱的回收率试验，每个处理设 3 个重复，进行了比较分析，发现 500mg HLB 比 60mg HLB 回收率要高，而且回收率更稳定，因此最终采用 500mg HLB 进行样品净化。

表 9 小柱回收率实验结果

序号	名称	峰面积			平均峰面积	变异系数	回收率
		1	2	3			
1.	100 ng/mL 标准溶液	1812	1932	2092	1945.33	7.22	-
2.	Waters 60mg HLB	1201	1490	1355	1348.66	10.72	69.33

3.	Waters 500mg HLB	1516	1693	1765	1658	7.728	85.23
4.	ANW Poly sery 60mg HLB	1102	1432	1095	1209.66	15.91	62.18
5.	ANW Poly sery 500mg HLB	1666	1738	1792	1732	3.65	89.03

(4) 基质效应研究

基质是样品中除分析物以外的组分，由于基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰，并影响分析结果的准确性，这些影响和干扰被称为基质效应。液相色谱-串联质谱分析中，基质效应对样品的离子化影响较大，去除基质效应最常用的方法是采用基质添加标准曲线法对样品响应值进行校准。即将标准样品添加于样品基质溶液中，配制成目标分析物的标准溶液，进样分析后进行单点校正或建立标准曲线。基质效应的大小计算公式如下：基质效应 Matrix Effect (%)=B/A×100，其中 A 为在纯溶剂中化合物的响应值，B 为样品基质中添加的相同含量农药响应值。

本实验通过测定 200 µg/L 标准品溶液和不同饲料品种的基质匹配标准溶液，对它们的色谱峰面积进行比较分析来确定各种饲料基质对目标响应值的影响，结果如表 10 所示。不同饲料样品对硫酸黏菌素检测的质谱基质效应不同，且这些基质效应基本都表现出基质抑制现象，因此采用基质加标标准曲线进行检测结果的定量计算。

表 10 基质效应测定结果

样品	E1 基质效应	E2 基质效应
预混合饲料	0.3382	0.7479
配合饲料	0.2277	0.9146
浓缩饲料	0.4441	1.1544
精料补充料	0.5056	1.4308

(4) 基质效应研究

取空白样品，按经过研究确定得到的提取和净化方法处理得到空白基质溶液，分别采取以下两种方法制备基质添加标准溶液。一种为分别取标准中间溶液 II 适量，于 40 °C 下氮气吹至近干，以空白基质溶液进行稀释至 1 mL，配制成 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、5000 ng/mL 基质匹配标准系列溶液；另一种为取空白基质溶液 1 mL，于 40 °C 下氮气吹干后，用事先以 20%乙腈稀释配制好的 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、5000 ng/mL 系列标准溶液溶解残渣。两种处理方法获得的基质添加标准溶液均经过滤后进样分析，结果表明，二者没有显著差异。

5. 检测方法技术参数的复核

(1) 标准曲线的制备

配制浓度为 20、50、100、200、500、1000 和 5000 ng/mL 的系列硫酸黏菌素标准工作液，按方法中的条件用 UPLC-MS/MS 检测。以药物浓度为横坐标，硫酸黏菌素 E1 和硫酸黏菌素 E2 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果见图 3，获得硫酸黏菌素 E2 的标准曲线方程为 $y = 85.161x + 815.79$ ， $R^2 = 0.9983$ ，硫酸黏菌素 E1 的标准曲线方程为 $y = 59.565x + 542.65$ ， $R^2 = 0.9988$ 。

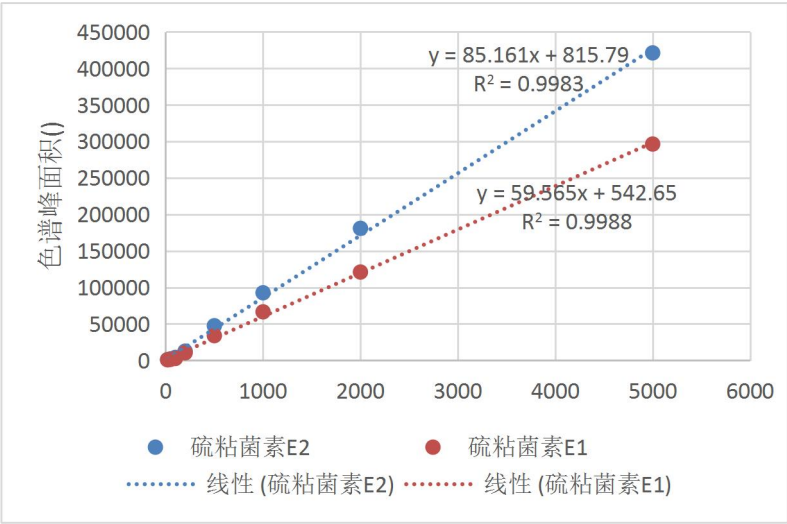


图 3 硫酸黏菌素标准曲线图

(2) 方法的灵敏度

方法的检测限(LOD)和定量限(LOQ)是痕量分析方法的主要技术指标。称取 10 个空白饲料样品，按标准的前处理方法进行提取与净化，同时设 20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 三个标准工作液作对照，对空白样品和标准工作液进行测定。分别计算 2 种药物成份色谱保留时间处的信噪比，以空白样品 3 倍信噪比计算检测限，以 10 倍信噪比计算定量限。结果表明，在对配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料的检测过程中，硫酸黏菌素的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$ ；定量限均为 30 $\mu\text{g/kg}$ 。

取空白配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料，分别添加适量的标准溶液，使饲料中药物浓度为 30 $\mu\text{g/kg}$ ，涡动，混匀，静置 15 min 以后按样品提取和净化过程进行处理，进 LC/MS/MS 测定。每个处理 5 个平行。结果表明：三种不同类别的饲料平均回收率在 80.17~85.01 %之间（见表 11），符合化合物痕量分析的准确度要求。变异系数在 9.75~13.92%之间，符合化合物痕量分析的精密密度要求。因此通过实际添加的方法确认 30 $\mu\text{g/kg}$ 为方法的定量限。

表 11 硫酸黏菌素 30 $\mu\text{g/kg}$ （LOQ 值）空白添加实验结果(n=5)

饲料	药物名称	平均回收率(%)	变异系数（%）
配合饲料	E1	84.67	12.45

	E2	82.74	13.92
浓缩饲料	E1	83.55	11.88
	E2	80.90	10.30
预混合饲料	E1	85.01	9.75
	E2	80.17	10.99
精料补充料	E1	81.45	8.78
	E2	80.23	10.24

(3) 检测方法的准确度和精密度

分别选取配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。配合饲料、浓缩饲料中硫酸黏菌素的添加浓度为 0.1-10mg/kg，预混合饲料和牛精料中的添加浓度为 0.1-50mg/kg，按上述方法进行前处理和检测。每个浓度设 5 个平行，连续做 3 天，计算添加回收率、日内变异系数和日间变异系数，结果如表 12-13 所示，在三个浓度添加水平下，各饲料中硫酸黏菌素的平均回收率范围为 80~120 %；日内变异系数范围小于 20%，日间变异系数范围小于 20%，方法回收率高，精密度好。空白饲料样品、添加回收饲料样品和基质添加标准品的特征色谱图见图 4-7，由图可知，在药物保留时间处，E1 成份和 E2 成份均无杂峰干扰。

表 12 饲料中硫酸黏菌素 E1 添加回收率及变异系数

样品	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率(%)	日内变异系数 (%)	日间变异系数 (%)
鸡配合饲料	0.1	81.38	7.95	9.97
	1.00	84.51	13.52	13.80
	10.00	84.64	9.97	10.11
鸡浓缩饲料	0.1	80.05	7.80	8.72
	1.00	82.62	9.12	10.55
	10.00	81.17	11.45	12.70
鸡预混合饲料	0.1	80.45	7.86	9.91
	1.00	83.23	4.84	6.31
	50.00	82.73	9.68	10.60
猪配合饲料	0.1	80.12	6.90	7.58
	1.00	83.65	9.78	10.70
	10.00	82.33	10.16	11.47
猪浓缩饲料	0.1	80.57	9.90	10.54
	1.00	81.63	7.27	9.08
	10.00	82.96	12.65	11.92
猪预混饲料	0.1	83.32	9.90	10.18

精料补充料	1.00	81.79	8.89	10.75
	50.00	82.67	11.78	11.92
	0.1	81.77	7.18	8.84
精料补充料	1.00	82.58	10.04	11.67
	50.00	82.76	9.27	10.00

表 13 饲料中硫酸黏菌素 E2 添加回收率及变异系数

样品	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率(%)	日内变异系数 (%)	日间变异系数 (%)
鸡配合饲料	0.1	80.59	7.88	9.32
	1.00	81.26	5.95	6.84
	10.00	82.90	7.87	8.66
鸡浓缩饲料	0.1	84.41	7.77	9.18
	1.00	82.93	9.62	10.38
	10.00	80.99	8.39	7.99
鸡预混合饲料	0.1	84.82	12.88	13.75
	1.00	81.29	9.90	11.15
	50.00	83.70	7.84	8.07
猪配合饲料	0.1	80.52	7.05	8.92
	1.00	82.33	10.18	11.43
	10.00	81.76	11.52	10.96
猪浓缩饲料	0.1	80.09	9.99	10.25
	1.00	81.17	7.86	8.87
	10.00	84.74	5.59	7.32
猪预混饲料	0.1	80.66	10.07	11.53
	1.00	81.91	11.35	12.90
	50.00	83.75	10.28	11.18
精料补充料	0.1	80.22	9.90	10.72
	1.00	82.97	10.15	11.65
	50.00	83.45	11.64	12.93
羊精料补充料	0.1	75.46	7.64	7.90
	1.00	80.08	8.66	6.47
	50.00	81.74	8.85	4.55

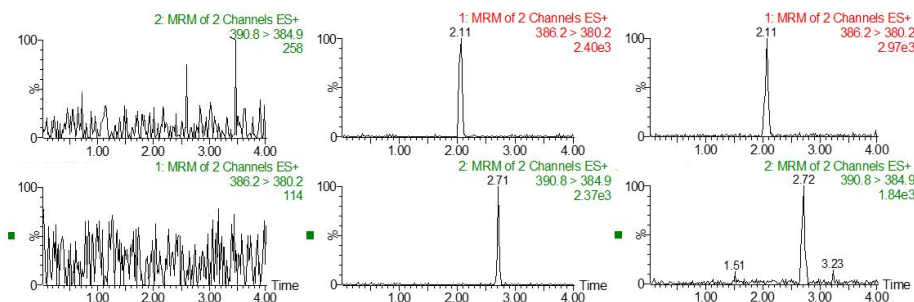


图 4 预混合饲料中硫酸粘杆菌 MRM 检测选择离子流色谱图
(左：空白样品；中：添加回收样品；右：200 ng/mL 基质添加标准溶液)

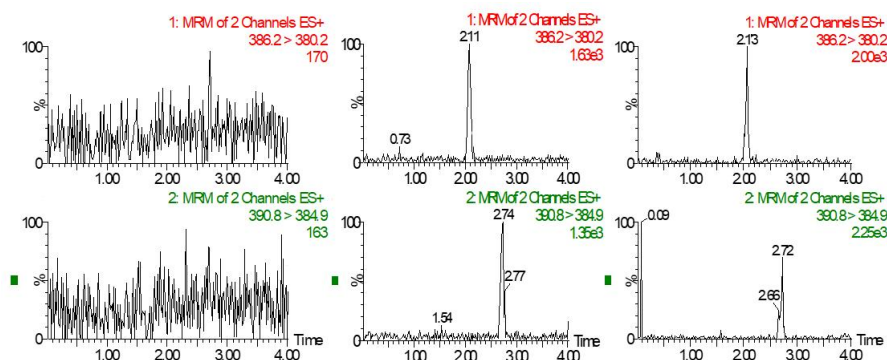


图 5 配合饲料中硫酸粘杆菌 MRM 检测选择离子流色谱图
(左：空白样品；中：添加回收样品；右：200 ng/mL 基质添加标准溶液)

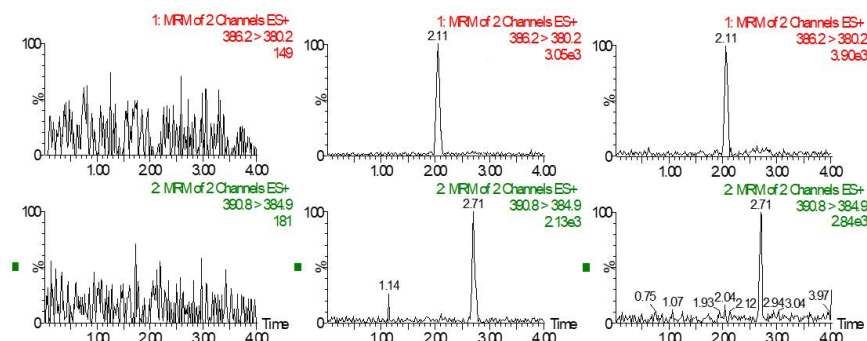


图 6 浓缩饲料中硫酸粘杆菌 MRM 检测总离子流色谱图
(左：空白样品；中：添加回收样品；右：200 ng/mL 基质添加标准溶液)

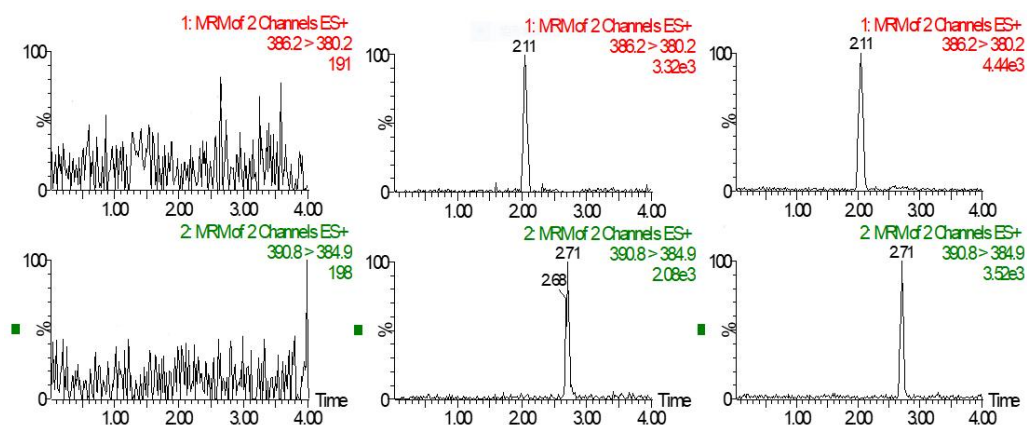


图 7 精料补充试料中硫酸粘杆菌 MRM 检测总离子流色谱图
(左：空白样品；中：添加回收样品；右：200 ng/mL 基质添加标准溶液)

5. 高浓度水平的药物添加回收试验

分别选取配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和精料补充料进行 0.1 g/kg 高浓度水平的空白添加实验，进一步验证该方法的准确度和精密度。按上述方法进行前处理，分取和检测。每个浓度设 3 个平行，计算添加回收率和变异系数，结果如表 14 所示，四种饲料中硫酸黏菌素的回收率和变异系数均达到检测方法的要求。

表 14 饲料中硫酸黏菌素 0.1 g/kg 添加水平的回收率及变异系数

样品	回收率(%)			平均回收率 (%)	日内变异系数 (%)
	1	2	3		
配合饲料	89.21	95.04	100.8	95.00	6.08
浓缩饲料	112.25	103.76	93.67	103.23	9.01
预混合饲料	90.19	110.35	94.9	98.48	10.71
精料补充料	84.11	90.15	85.79	86.68	3.60

6. 实际样品的测定

采用本方法对某公司提供的含有硫酸黏菌素阳性饲料样品进行检测，每个样品 2 个平行，结果见下表，共测得 4 份样品中硫酸黏菌素的浓度分别为 231.88、1434.02、2297.49 和 736.91 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 14 阳性饲料样品中硫酸黏菌素的测定

饲料	药物名称	检测值 ($\mu\text{g/kg}$)	相对偏差 (%)	硫粘菌素总量
配合饲料	E1	158.88	5.97	231.88
	E2	73.00	4.33	
浓缩饲料	E1	982.46	9.18	1434.02
	E2	451.76	8.74	

预混合饲料	E1	1508.09	4.35	2297.49
	E2	789.4	6.78	
精料补充料	E1	500.12	2.06	736.91
	E2	236.79	3.47	

采用原标准方法对以上含有硫酸黏菌素阳性饲料样品进行检测，每个样品 2 个平行，结果见下表，共测得 4 份样品中硫酸黏菌素的浓度分别为 51.22、356.04、524.50 和 110.88 $\mu\text{g/kg}$ 。由此结果可知，原标准方法的检测值偏低，新修订的方法对实际样品的检测值远优于原标准方法值。

表 15 原标准方法对阳性饲料样品中硫酸黏菌素的测定

饲料	药物名称	检测值 ($\mu\text{g/kg}$)	相对偏差 (%)	硫粘菌素总量
配合饲料	E1	51.22	7.05	51.22
	E2	-	-	
浓缩饲料	E1	255.20	10.53	356.04
	E2	100.84	7.75	
预混合饲料	E1	356.72	9.12	524.50
	E2	167.78	6.83	
精料补充料	E1	110.88	10.27	110.88
	E2	-	-	

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益

1 试验验证的分析

本研究完成后，先后委托农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心(北京)、农业农村部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)和农业农村部蜂产品质量监督检验测试中心（北京）进行了标准复核实验，对建立的《饲料中硫酸黏菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》进行了线性范围、检测限和定量限、添加回收率及添加回收结果的相对标准偏差进行了分析，结果表明，采取本实验方法的前处理条件和参考仪器条件，三家单位的复核结果均表现良好。

三家复核单位报告中，农业农村部饲料校验与安全监督检验测试中心（北京）的验证报告中标准曲线范围为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 基质匹配标准系列溶液，与标准方法的 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、5000 ng/mL 基质匹配标准系列溶液不一致，经与该单位相关实验人员交流核对，他们在检测过程中发现仪器能做到 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度，且考虑到 5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度较高，在他们的日常检测中习惯使用最高点为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，因此对原标准系列浓液增加了一个低浓度，去掉了一个高浓度。特此说明。

2 综述报告

研究建立了饲料中硫酸黏菌素添加剂的检测方法。采用草酸溶液提取，HLB 固相萃取柱净化，浓缩后用超高效液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。该方法的准确度、精密度和灵敏度均符合饲料中药物添加剂的检测要求。

3 技术经济论证

本研究前处理过程采用对环境友好的非有机溶液 5%草酸溶液提取样品，样品前处理的成本低廉，对环境友好，且方法简单。净化处理所使用的 HLB 性质稳定，还可以回收后重复使用，也节省了成本。与原方法相比，本方法操作简单，应用更简便。

4 预期经济效果

本方法完成后能够为饲料中该类药物的检测提供有效的技术手段，将从源头控制、市场监管、事后溯源等多个方面保障饲料的质量安全。

本方法还能进一步规范企业生产行为，加强饲料市场监管。企业在生产过程中可以使用本标准制定的方法进行产品自检及饲料原料的入库检测。市场监管部门可借助本标准中的检测方法增加监管手段，完善监管体系。

本方法还为执法提供有力依据，严控农产品投入品品质。有效的标准检测方法将为不合格产品的溯源提供有力的技术手段，为执法行动提供有效的技术保障。

四、采用国际标准

本标准制定过程中，未采用国际标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与有关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

七、涉及专利的有关说明

本标准不对涉及专利进行判别，若本单位制定相关专利，将在专利中明确表明该专利为本标准应用提供开放使用。

八、作为强制性标准或推荐性标准的建议

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

九、贯彻标准的要求和措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本。这是保证新标准贯彻实施的基础。

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

(3) 实施的过渡期宜定为 6 个月。

十、其它应说明的事项

本标准修订方法颁布生效后，原标准方法应废止，启用新修订的标准方法。

十一、参考文献

1. 中华人民共和国农业农村部公告第 235 号公告修订版(动物性食品中兽药最高残留限量)，2018.
2. 中华人民共和国农业农村部. 农业农村部公告第 2625 号《饲料添加剂安全使用规范》，2018.
3. 《GB 31650-2019 国家食品安全标准 兽药最大残留限量》2019 年 10 月中华人民共和国农业农村部、国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局三部门联合发布.
4. 张美玉,谢彦军,曹永慧.硫酸黏菌素及其制剂的检测方法验证及优化[J].中国新技术新产品,2022(04):74-76.
5. 晨曦.硫酸黏菌素将禁用[J].农业知识,2016(27):24.
6. 饲料[J].中国饲料,2016(15):1-2.
7. 关于硫酸黏菌素预混剂标准的最新修订稿[J].四川畜牧兽医,2016,43(07):34-35.
8. 吕惠序.多肽类抗生素在养猪生产中的正确使用[J].养猪,2014(02):127-128.
9. Tong Liu, Chuanbin Zhang, Feng Zhang, Bo Nie, Fei Yuan, Hailan Huang, Hongna Li. Sensitive Determination of Four Polypeptide Antibiotic Residues in Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Chromatographia. 2019, 82(10): 1479–1487.
10. Yuki Hanai, Kazuhiro Matsuo, Takayoshi Kosugi, Ayumu Kusano, Hayato Ohashi, Itsuki Kimura, Shinobu Hirayama, Yuta Nanjo, Yoshikazu Ishii, Takahiro Sato, Taito Miyazaki, Kenji

- Nishizawa & Takashi Yoshio. Rapid, simple, and clinically applicable high-performance liquid chromatography method for clinical determination of plasma colistin concentrations. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 2018; 22(4): 1297.
11. Naser Tavakoli, Jaleh Varshosaz, Farid Dorkoosh, Mohammad R. Zargarzadeh. Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 325–329.
 12. Corina Pfeifer, Georg Fassauer, Hagen Gerecke, Thomas Jira, Yvonne Remanec, Roberto Frontini, Jonathan Byrne, Robert Reinhardt. Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC. *Journal of Chromatography B*. 990 (2015) 7–14.
 13. Miao Zhao, Yu-Ran Cao, Bei-Ning Guo, Xiao-Jie Wu, Jian Li and Jing Zhang. LC-MS/MS determination of colistin in Mueller–Hinton broth for in vitro pharmacodynamic studies. *The Journal of Antibiotics* (2014) 67, 825–829.
 14. Evangelos Gikas, Fotini N. Bazoti, Marina Katsimardou, Dimitrios Anagnostopoulos, Konstantinos Papanikolaou, Ilias Inglezos, Athanasios Skoutelis, Georgios L. Daikos, Anthony Tsarbopoulos. Determination of colistin A and colistin B in human plasma by UPLC–ESI high resolution tandem MS: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 83 (2013) 228–236.
 15. Trifan, V. ; Crivineanu, M. ; Oancea, A. ; Lupescu, C. ; Nicorescu, V. The determination of colistin residues from pork meat and organs using microbiological and HPLC analysis. *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași* 2010 ; 53 (12) :1207-1210.
 16. Decolin D, Leroy P, et al. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues[J]. *J Chromatogr Sci*, 1997; 35: 557–564.
 17. Orwa JA, Van AV Gerven, Roets E, et al. Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of colistin sulphate[J]. *Chromatographia*, 2000; 51: 433–436.
 18. Nicolas D, Archimbault P. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. *Journal of chromatographic science* 1997; 35: 12.
 19. Della W S, Clare H, Yiu W, *et al.* Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in

- food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 535: 23–31.
20. Eric C W CH, Della W S. Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistinB in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006; 385: 181-188.
 21. Van Hattum, J.J.C, Trelow P. C, et al. Efficacy of amoxicillin/colistin in gastro-intestinal *E. coli* infections complicated with *Streptococcus suis* in weaned piglets. In *Proceedings of the Eighth International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (Eavpt) 67*, Jerusalem. 2000.
 22. 周艳, 方静, 李英伦. 粘杆菌素研究及其应用[J]. *中国饲料*, 2006, 16: 15-17.
 23. 马红伟, 吴涛, 肖飞. 阿莫西林和硫酸黏菌素对猪鸡大肠杆菌和沙门氏菌的体外联合抗菌作用[J]. *中国兽药杂志*, 2009, 43(5): 30-32.
 24. 何家康, 汤树生, 李兰, 张朝明, 赵晖, 万仁玲, 肖希龙. 阿莫西林硫酸粘菌素复方注射用混悬剂的研制[J]. *中国兽医杂志* 2010, 46 (2): 90-92.
 25. 龚丽景. 猪组织中硫酸黏菌素残留检测方法和消除规律研究: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2007.
 26. 陈绍峰. 硫酸黏菌素体外抗生素后效应及其在肉鸡体内的残留研究: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2003.
 27. Brian D. Gilbert. Scientist expert committee: (MDANT05) Monograph development-antibiotics USP29. Colistins sulfate. Page 589. *Pharmacopeialforum*. 28 (4): 1093
 28. Brian D. Gilbert. Scientist expert committee: (MDANT05) Monograph development-antibiotics USP30-NF25. Colistins sulfate. Page 1830. *Pharmacopeialforum*. 28 (4): 1093.
 29. JP1264-72-8. [Http://www.sinoapi.com/pharmacopoeia/jp15/JP1264-72-8](http://www.sinoapi.com/pharmacopoeia/jp15/JP1264-72-8).
 30. 罗云, 鄢丹, 任永申, 张少锋, 冯雪, 李寒冰, 唐慧英, 肖小河. 基于生物热活性检测的黏菌素效价测定方法研究. *药学报 Acta Pharmaceutica Sinica*. 2009, 44 (10): 1136–1139.