

# 中华人民共和国农业行业标准

饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 编制说明

（公开征求意见稿）

江苏省农业科学院

2022 年 5 月

# 目 录

一、工作简况 .....	3
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据 .....	8
2.1 编写规则 .....	8
2.2 编制依据 .....	8
2.3 主要内容及其确定依据 .....	8
2.3.1 仪器试验条件研究 .....	9
2.3.2 标准溶液稳定性研究 .....	14
2.3.3 样品前处理条件的研究 .....	16
2.3.4 不同 HLB 固相萃取柱的净化效果考察 .....	23
2.3.5 固相萃取柱承载量考察 .....	25
2.3.6 方法学考察 .....	26
2.4 实际样品（非添加样）的测定 .....	71
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 .....	77
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况 .....	77
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准 .....	78
六、与有关法律、法规的关系 .....	78
七、重大分歧意见的处理经过和依据 .....	78
八、涉及专利的有关说明 .....	79
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议 .....	79
十、其他应当说明的事项 .....	79
参考文献 .....	80

# 一、工作简况

## 1.1 任务来源

根据全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料行业标准制修订文件，由江苏省农业科学院（农产品质量安全与营养研究所）承担《饲料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素含量的测定 液相色谱-串联质谱法》农业行业标准制定工作，项目编号为 2019-87，该标准由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

## 1.2 制定背景

氨基糖苷类药物（Aminoglycosides, AGs）是由氨基糖分子和苷元通过醚键连接而成，主要分为天然和半合成两类，链霉素（Streptomycin）、双氢链霉素（Dihydrostreptomycin）、卡那霉素（Kanamycin）和安普霉素（Apramycin）均是由链霉菌属培养液中提取获得，属于天然来源的氨基糖苷类抗生素。AGs 易与细菌的菌体蛋白结合，对细菌蛋白质合成起抑制作用，并且破坏细胞膜的完整性，杀灭细菌或抑制其生长<sup>[1]</sup>。AGs 药物具有广谱抗菌性，杀菌活性强、临床疗效好等特点，被广泛应用于兽医临床治疗上。除此之外，AGs 还可作为促生长剂提高饲料报酬率。

《兽药典（2020 年版）》一部收录了链霉素和卡那霉素等氨基糖苷类等药物。卡那霉素为多组分药物，以卡那霉素 A、B 为主要成分，A 的侧链基团为 -OH（分子式  $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ ，分子量 484），B 的侧链基团为 -NH<sub>2</sub>（分子式  $C_{18}H_{37}N_5O_{10}$ ，分子量 483），结构式见图 1，

由于 B 的耳毒性与肾毒性比 A 高 1~1.5 倍，生产中将 B 作为杂质控制，所以市售产品中卡那霉素 A 的含量占 95% 以上，而 B 则控制在 5% 内。因此，监测饲料中卡那霉素违禁添加时，实际测定的有效成分为卡那霉素 A。

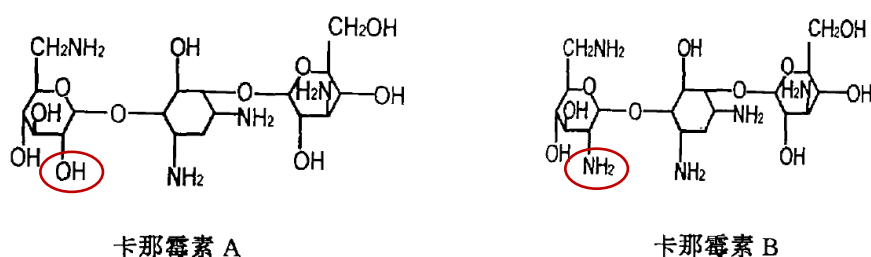
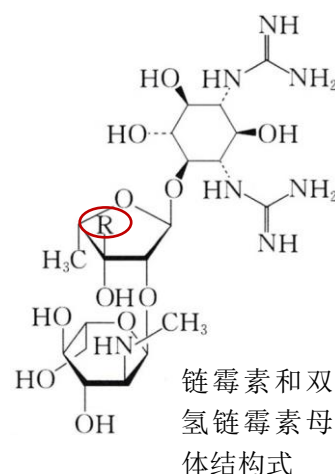


图1. 卡那霉素 A、B 结构式

《兽药质量标准（2017 年版）》中链霉素和双氢链霉素具有相同的母体结构，链霉素的侧链基团为  $-\text{CHO}$ （分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12}$ ，分子量 581），双氢链霉素的侧链基团为  $-\text{CH}_2\text{OH}$ （分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_{12}$ ，分子量 583），本方法标准对链霉素和双氢链霉素均进行了测定。



《兽药质量标准（2017 年版）》中卡那霉素可溶性粉含量为 12%，用于治疗敏感菌所致的肠道感染，以卡那霉素计，混饮每 1L 水 60~120 mg，混饲每 1000 kg 饲料一般添加 60~240 g，连用 3~5 天，休药期 28 天。《兽药典（2020 年版）》和《兽药质量标准（2017 年版）》中链霉素与双氢链霉素为白色或类白色粉末，肌肉注射治疗时，家畜每千克体重 10~15 mg，连用 2~3 天，休药期 18 天。养殖中畜禽混饲给药每 1000 kg 饲料一般添加 100~200 g。

随着全球细菌耐药性问题愈加严重，欧盟和美国分别于 2006 年

和 2014 年禁止抗生素在饲料中使用<sup>[2]</sup>。我国自 2020 年 7 月停止促生长类药物饲料添加剂使用，商品饲料中不再允许添加抗菌类药物（农业农村部第 194 号公告），因此，饲料中添加氨基糖苷类药物属于违禁行为。目前，对饲料中 AGs 残留检测方法主要有微生物法、离子色谱法和高效液相色谱法。美国分析化学家协会发布的《AOAC Official Method 971.49 Streptomycin in Feeds》、《AOAC Official Method 973.81 Spectinomycin in Feeds》和《AOAC Official Method 998.02 Neomycin in Feeds》的三个标准中采用微生物法分别分析了链霉素、大观霉素和新霉素，但该方法易受条件限制，且操作繁琐，灵敏度低，重现性差，仅适用于定性实验<sup>[3]</sup>。Liu<sup>[4]</sup>等、Y. X. Zhou<sup>[5]</sup>等采用高效液相色谱法测定 AGs，由于 AGs 分子结构中缺少紫外和荧光吸收基团<sup>[6]</sup>，采用离子色谱法和高效液相色谱法测定时，待测样品需进行柱前或柱后衍生化，操作繁琐，易造成目标物损失，导致测定结果偏低，应用有局限性。近年来，高效液相色谱-串联质谱法因定量准确、灵敏度高、抗干扰力强且无需衍生化等优点被广泛应用<sup>[7]</sup>。

国内现行有效的饲料中氨基糖苷类药物测定方法标准见表 1，目前尚未建立配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的质谱测定方法标准，本标准属于首次制定，将作为农业行业标准确保饲料产品的安全。

**表1.** 饲料中氨基糖苷类药物测定方法标准

现行方法标准	适用药物	适用饲料	灵敏度
SN/T 5117-2019 进出口食用动物、饲料 链霉素类（链霉素、二氢链霉素）药物残留测定 液相色谱-质谱/质谱法	链霉素、二氢链霉素	玉米粉、小麦粉、高粱粉	测定低限 10 µg/kg

农业部 1486 号公告-3-2010 饲料中安普霉素的测定 高效液相色谱法	安普霉素	配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料	检出限为 3mg/kg 定量限为 10mg/kg
农业农村部公告第 197 号-3-2019 饲料中硫酸新霉素的测定 液相色谱-串联质谱法	硫酸新霉素	配合饲料、精料补充料	检出限为 0.2mg/kg 定量限为 0.4mg/kg
农业部 2086 号公告-7-2014 饲料中大观霉素的测定（高效液相色谱法和高效液相色谱-串联质谱法）	大观霉素	配合饲料-HPLC 配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、精料补充料 -HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS 法： 检测限为 1.0mg/kg 定量限为 2.0mg/kg
DB13/T 1384.3-2011 饲料中链霉素的测定（液相色谱-串联质谱法）	链霉素	饲料	检出限为 20μg/kg
DB34/T1367-2011 饲料中硫酸安普霉素的测定 高效液相色谱法	安普霉素	饲料	检测限为 0.5mg/kg

### 1.3 工作过程

#### 1.3.1 成立标准编制小组

计划任务下达后，我单位成立标准起草小组，对标准起草工作进行分工，明确任务职责，确保项目顺利实施。

#### 1.3.2 查询国内外相关标准和文献资料

查阅了国内外有关标准和参考文献等技术资料，选取具有代表性的参考资料作为标准起草中的主要技术参考文本。

#### 1.3.3 确定标准制定技术路线、原则

本标准依据氨基糖苷类药物的理化性质，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定。

#### 1.3.4 开展方法学研究、实际样品检测

标准编制小组开展了色谱条件的选择和优化、提取条件的优化、方法学考察和实际样品测定。

#### 1.3.5 编写标准征求意见稿

根据收集和查阅的相关资料文献以及实验测定结果，形成标准征求意见稿，编写标准文本内容和编制说明。

#### **1.3.6 开展定向征求意见**

标准编制小组发送给国家饲料质检中心、省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见，在此基础上修改征求意见稿，形成标准预审稿。

#### **1.3.7 组织方法验证**

2021 年 10 月，组织三家有资质的检测单位，对标准中的技术指标等内容进行验证，汇总相关验证数据和确认方法有效性。

#### **1.3.8 组织标准预审**

2022 年 4 月 15 日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对我单位起草的该项标准（预审稿）进行了认真审查。专家组由李俊玲、常碧影、杨秀玉、张育润、程林丽、张凤枰、李宏、吴银良、吴宁鹏、王威利 10 位专家组成。标准编制小组根据预审会专家组的意见和建议，进一步补充有关数据、修改完善标准文本和编制说明，形成标准公开征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

#### **1.3.9 公开征求意见**

202\*年\*\*月\*\*日-\*\*月\*\*日饲料标委会通过中国畜牧兽医信息网向社会公开征求意见，结果为对该标准\*\*\*意见。

#### **1.3.10 组织标准终审**

202\*年\*月\*日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对我单位起草的该项标准（送审稿）进行了认真审查。专家组由\*\*\*、\*位专家组成。标准编制小组根据终审会专家组的意见和建议，进一步补充有关数据、修改完善标准文本和编制说明，形成标准\*\*稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

## **二、标准编制原则、主要内容及其确定依据**

### **2.1 编写规则**

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：标准化文件的结构和起草规则》以及 GB/T 20001.4-2015《标准编制规则 第4部分：试验方法标准》的规定和要求编写。标准制定结合国内外检测技术发展趋势和我国饲料行业发展现状，力求做到技术上先进、经济上合理，确保方法的安全性、准确性、通用性。

### **2.2 编制依据**

（1）遵循国家颁布的相关法律法规；（2）国家或行业有关标准，如《饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》GB/T 23182-2008、《实验室质量控制规范 食品理化检测》GB/T 27404-2008；（3）标准编制小组调研和实测的样品检测数据。

### **2.3 主要内容及其确定依据**

经资料查询，目前氨基糖苷类药物的检测方法有微生物法、离子色谱法、液相色谱法和液相色谱-串联质谱法等<sup>[3-5]</sup>，因为氨基糖苷类禁止在饲料产品中使用，所以在饲料中的测定应考虑准确性和定



量，并要避免离子试剂干扰。为此，选择了目前国际上普遍采用的液相色谱-串联质谱法对其进行检测。方法确定过程总体分为样品提取、样品净化和样品检测三个部分，并对具体实验条件进行优化。

### 2.3.1 仪器试验条件研究

#### 2.3.1.1 色谱柱的确定

氨基糖苷类药物结构上含有羟基、氨基等基团，极性大，如果用C<sub>18</sub>色谱柱为反相色谱柱，则目标药物保留较弱，目前国家标准及文献报道在流动相中加入离子对试剂<sup>[6,9,13,15-16,19-22]</sup>，如七氟丁酸、庚烷磺酸钠等使目标物易于在反向色谱柱上保留，但离子对试剂对质谱负离子模式有抑制作用，且无法从色谱柱上冲洗干净，对仪器后续使用影响较大；或使用高浓度盐增强目标物在色谱柱上的保留，但流动相体系中的盐析出后易增加液相系统堵塞的风险<sup>[8-14]</sup>。

本标准不选用离子对和高盐试剂。实验中比较了色谱柱OSAKA SODA SILICA (2.1×150mm, 5μm)、SiELC Obelisc R (2.1×150mm, 5μm)、Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub> (2.1×100mm, 1.7μm)、Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100mm, 1.8μm)、Waters ACQUITY BEH HILIC (2.1×100mm, 1.7μm)和Waters ACQUITY BEH Amide (2.1×100mm, 1.7μm)对链霉素、双氢链霉素和卡那霉素标准溶液的分离效果（见图2~7）。结果表明Amide色谱柱较其他色谱柱具易保留与分离强极性化合物特点，因此，选择BEH Amide色谱柱作为方法开发的分析柱。

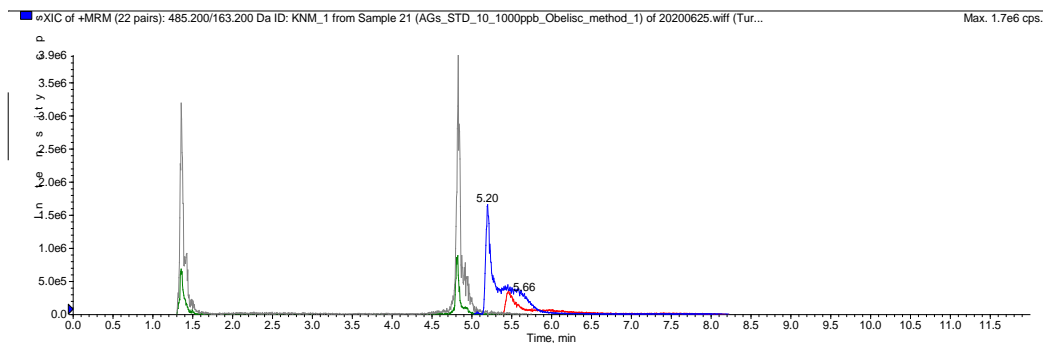


图2. 三种 AGs 药物在 OSAKA SODA SILICA 色谱柱的总离子图

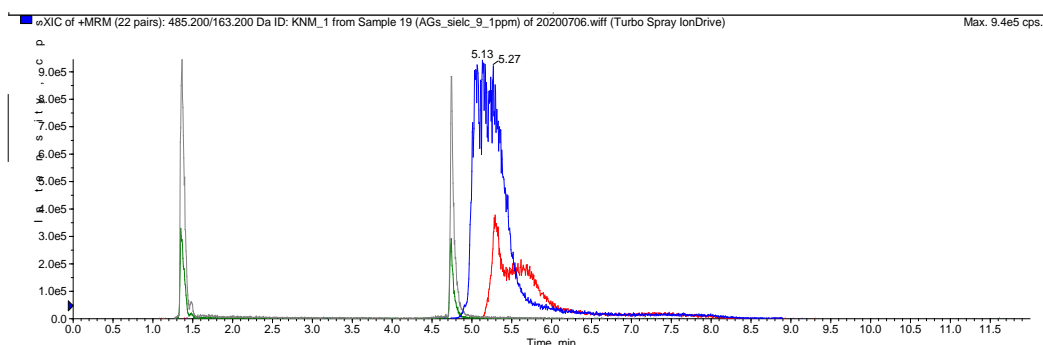


图3. 三种 AGs 药物在 SiELC Obelisc R 色谱柱的总离子图

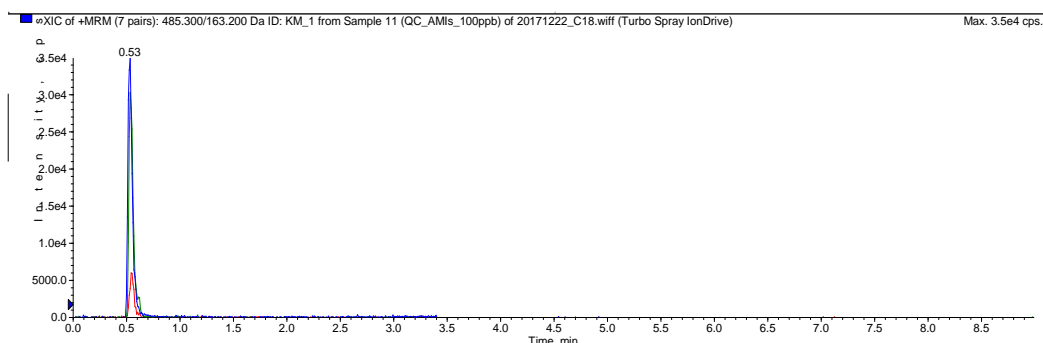


图4. 三种 AGs 药物在 Waters ACQUITY BEH C18 色谱柱的总离子图

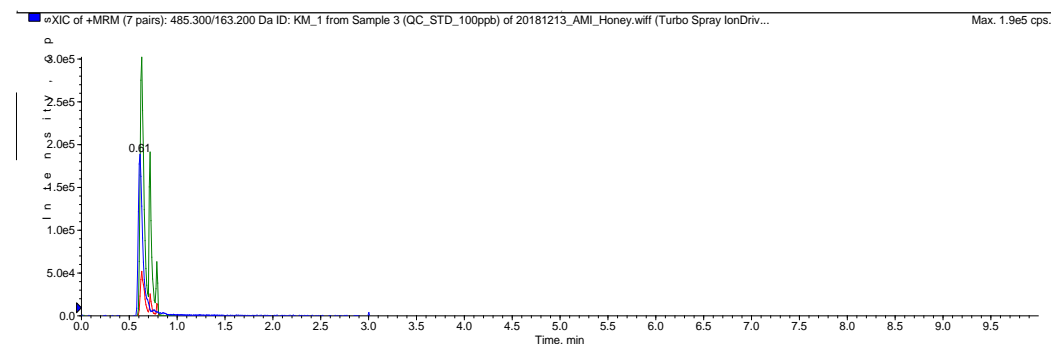


图5. 三种 AGs 药物在 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱的总离子图

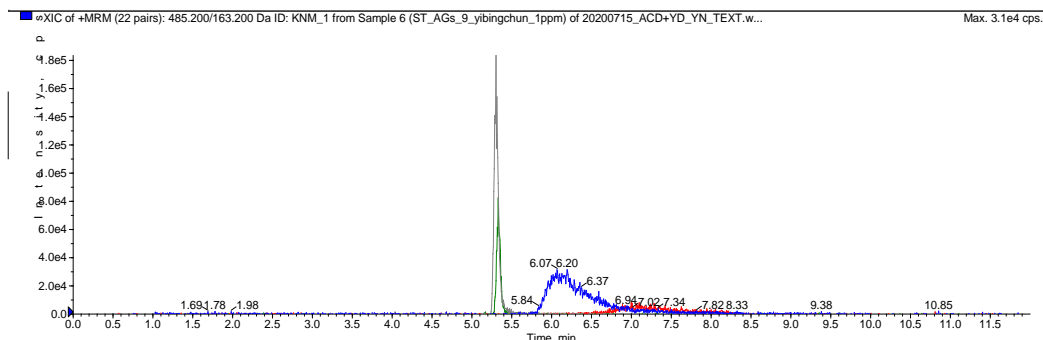


图6. 三种 AGs 药物在 Waters ACQUITY BEH HILIC 色谱柱的总离子图

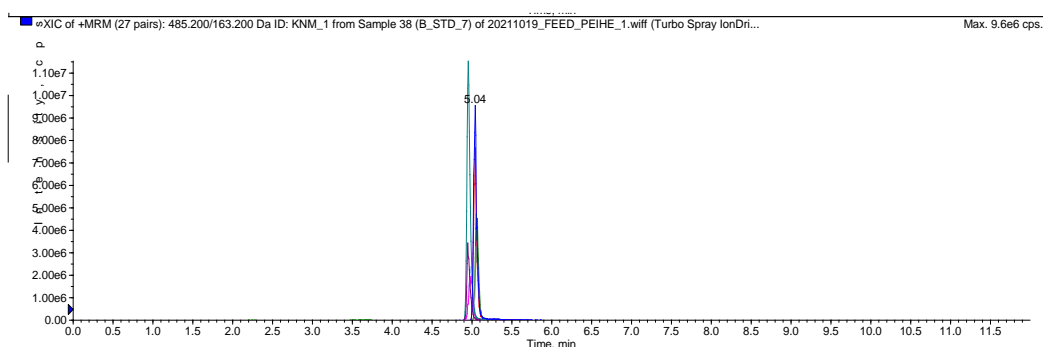


图7. 三种 AGs 药物在 Waters ACQUITY BEH Amide 色谱柱的总离子图

### 2.3.1.2 流动相的确定

实验中比较了甲醇或乙腈（有机相）与乙酸铵缓冲溶液、甲酸溶液、乙酸溶液（水相）等组成对峰型、灵敏度及分辨率的影响（见图 8 ~ 11）。结果表明 1）BEH Amide 色谱柱在酸性环境下，平衡时间短，对强极性分析物易于保留和分离，2）乙腈为非质子性分子较甲醇洗脱目标物能力强，3）在流动相中加入 1% 的甲酸，目标物易于离子化，提高检测灵敏度，加入乙酸铵可增强对目标物吸附洗脱能力及稳定酸性环境，优化峰形，4）上机溶液 pH 值越高越易造成目标物相应降低和峰形拖尾，当 pH 值在 0.8 时可优化目标物分离。本方法选择 1% 甲酸 2 mmol/L 乙酸铵-1% 甲酸 2 mmol/L 乙酸铵乙腈作为流动相。

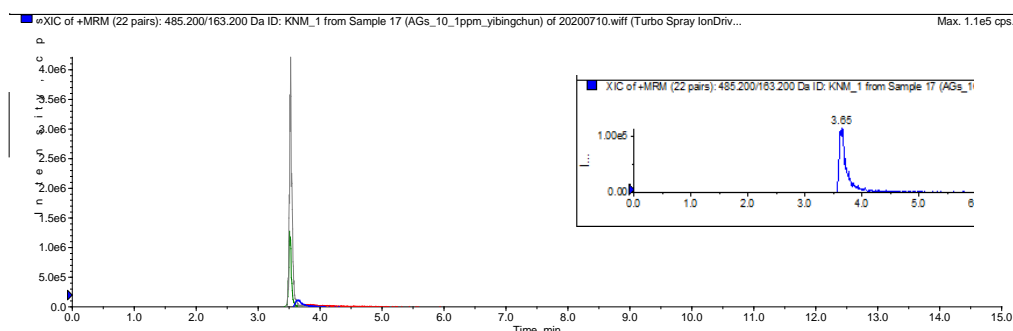


图8. 流动相体系为甲醇和 1%甲酸溶液时目标药物总离子图

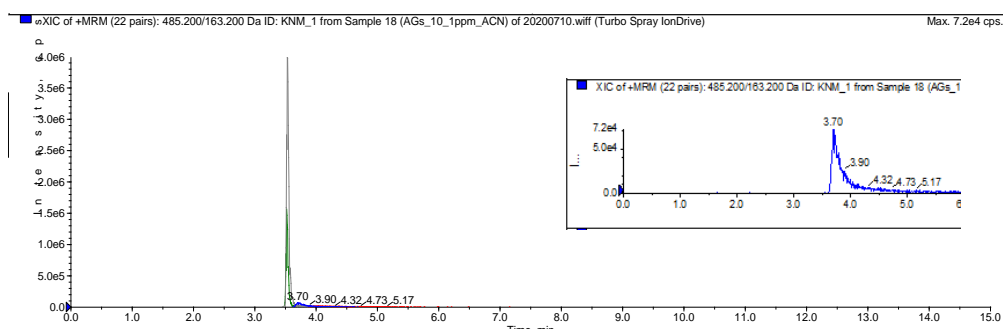


图9. 流动相体系为乙腈和 1%甲酸溶液时目标药物总离子图

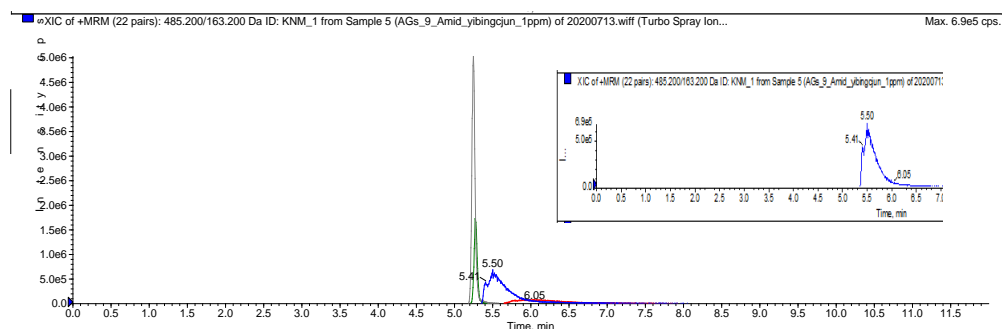


图10. 流动相体系为 1%甲酸-2 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液和 1%甲酸-2 mmol/L 乙酸铵溶液时目标药物总离子图

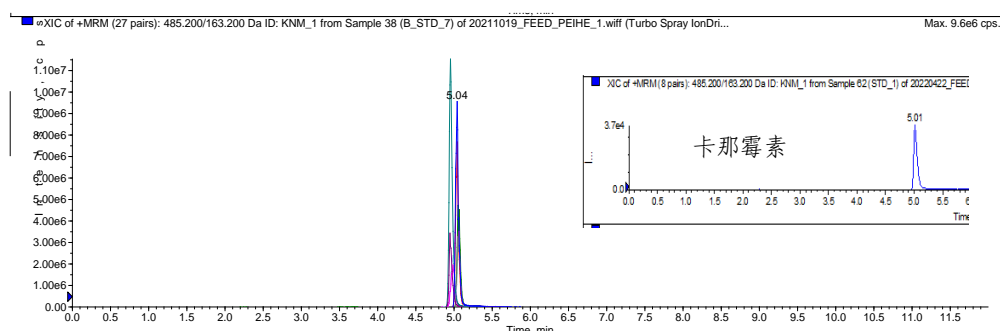


图11. 流动相体系为 1%甲酸-2 mmol/L 乙酸铵乙腈溶液和 1%甲酸-2 mmol/L 乙酸铵溶液时目标药物总离子图

梯度洗脱可实现饲料中杂质与目标分析物的良好分离，通过对不同比例组合流动相分离效果比较，确定了梯度洗脱程序：流动相组成

体系A为1%甲酸-2 mmol/L乙酸铵溶液，流动相B为1%甲酸-2 mmol/L乙酸铵乙腈溶液，洗脱条件见表2。

表2. 梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	1%甲酸-2 mmol/L 乙 酸铵溶液， %	1%甲酸-2 mmol/L 乙 酸铵乙腈溶液， %
0.0	0.3	20	80
2.5	0.3	20	80
3.5	0.3	65	35
5.5	0.3	90	10
6.7	0.3	90	10
7.5	0.3	20	80
12.0	0.3	20	80

### 2.3.1.3 质谱试验条件的确定

现有的动物源性食品和饲料方法标准中<sup>[15-18]</sup>，链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的特征离子信息见表 3。母离子或同一碎片离子存在差异是由于仪器间的性能不同引起的，属于正常偏差范围。本实验将 200 µg/L 三种 AGs 混合标准溶液注入到质谱仪中，在扫描模式下获得各物质的一级和二级质谱图，选择响应值高、干扰小且具有代表性的离子对作为定量离子和定性离子，结果见表 4，本方法离子对的研究结果与发布的标准和文献报道相一致。

优化后的质谱参数为离子源：电喷雾离子源，正离子模式；扫描方式：多反应监测模式（MRM）；离子源电压：5.5 kV；雾化温度：550℃；气帘气：30 psi；碰撞气：8 psi；雾化气：65 psi。

表3. 现行方法标准中氨基糖苷类药物离子对信息

化合物	母离子（ <i>m/z</i> ）	特征子离子（ <i>m/z</i> ）
链霉素	582、582.2、582.3 或 582.4	263、263.3、263.5, 221, 246、246.5, 407.4

双氢链霉素	584、584.2、584.3 或 584.4	263、263.3、263.4, 245.5、246, 392, 409.3
卡那霉素	485、485.1 或 485.3	163、163.2, 324、324.2, 205

**表4.** 三种氨基糖苷类药物的质谱参数

化合物	监测离子对 ( $m/z$ )	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
链霉素	582.4>221.4	270	49
	582.4>263.2 <sup>a</sup>	270	44
双氢链霉素	584.4>246.2	244	57
	584.4>263.1 <sup>a</sup>	244	40
卡那霉素	485.2>324.3	50	24
	485.2>163.2 <sup>a</sup>	50	33
<sup>a</sup> 为定量离子。在 API 6500 plus 仪器参数。			

### 2.3.2 标准溶液稳定性研究

液相色谱和质谱试验条件确定后，对标准溶液稳定性进行了考察。文献报道，玻璃材料对氨基糖苷类药物具有一定的吸附影响，而聚丙烯材料可降低其吸附作用<sup>[8]</sup>，实验中使用了聚丙烯材质的容量瓶、储液瓶和进样内衬管等替代常规的玻璃材料。

标准储备溶液稳定性验证。将标准储备液 1 mg/mL 分成若干份置于聚丙烯瓶 2~8℃储存，分别在储存 0 天、30 天、60 天从冰箱取出，充分回温至室温，用甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液稀释至 500 μg/L 工作液（A）。同时在 0 天、30 天、60 天配制 1 mg/mL 标准储备液，用甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液稀释至 500 μg/L 工作液（B）。用液相色谱质谱联用仪分析。对工作液 A 和 B 连续多次进样分别取平均值，以工作液 B 为标准校准工作液，计算工作液 A 的平均浓度，结果见表 5。以 RSD≤5% 结果有效，标准储备溶液 1 mg/mL 在 2℃~8℃保存，有效期为 1 个月，此保存时间与 SN/T 5117-2019、DB13/T 1384.3-2011 一致。

表5. 标准储备液稳定性试验

稀释时间	工作液 A 平均浓度 (μg/L)		
	双氢链霉素	链霉素	卡那霉素
0 天	500	500	500
30 天	491	490	487
60 天	446	424	417
RSD%(0&30)	1.8	2.0	2.6
RSD%(0&60)	10.8	15.2	16.6

标准中间溶液稳定性验证。将标准中间溶液 10 μg/mL 分成若干份置于聚丙烯瓶 2~8℃储存，分别在储存 0 天、7 天、14 天从冰箱取出，充分回温至室温，用甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液稀释至 500 μg/L 工作液 (C)。同时在 0 天、7 天、14 天配制 10 μg/mL 标准中间溶液，用甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液稀释至 500 μg/L 工作液 (D)。对工作液 C 和 D 连续多次进样分别取平均值，以工作液 D 为标准校准工作液，计算工作液 C 的平均浓度，结果见表 6。以 RSD ≤5% 结果有效，为减少测试误差，标准中间溶液 10 μg/mL 在 2℃ ~ 8℃ 保存，有效期为 7 天。

表6. 标准中间溶液稳定性试验

稀释时间	工作液 C 平均浓度 (μg/L)		
	双氢链霉素	链霉素	卡那霉素
0 天	500	500	500
7 天	490	493	492
14 天	453	444	442
RSD%(0&7)	2.0	1.4	1.6
RSD%(0&14)	9.4	11.2	11.6

### 2.3.3 样品前处理条件的研究

#### 2.3.3.1 提取条件的选择

选择猪预混合饲料称取 2 g，添加链霉素、双氢链霉素和卡那霉素标准溶液使其添加浓度分别为 0.5 mg/kg。根据文献选取了三氯乙酸、EDTA-2Na 和磷酸二氢钾为组分的提取溶液<sup>[6,13]</sup>，比较了 0.5、1、2、4 mmol/L EDTA-2Na，2%、5%、10% 三氯乙酸和 10 mmol/L 磷酸二氢钾构成的不同提取液组合，以及 pH 值分别为 3.5、4.5、6.5、7.5、8.5、9.5 时的提取效果，结果见图 12~14。提取液中的 EDTA-2Na 可螯合金属离子减少对目标药物的影响，而合适的 pH 值影响着螯合物的形成，磷酸二氢钾起到稳定溶液酸碱度的作用，不同浓度的三氯乙酸溶液，可沉降样品中的蛋白质，起到样品净化作用。试验结果表明，当提取液组成为 10% 三氯乙酸-10 mmol/L 磷酸二氢钾-2 mmol/L EDTA-2Na (pH=7.5) 时，样品中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素具有较高的回收率约 80%。

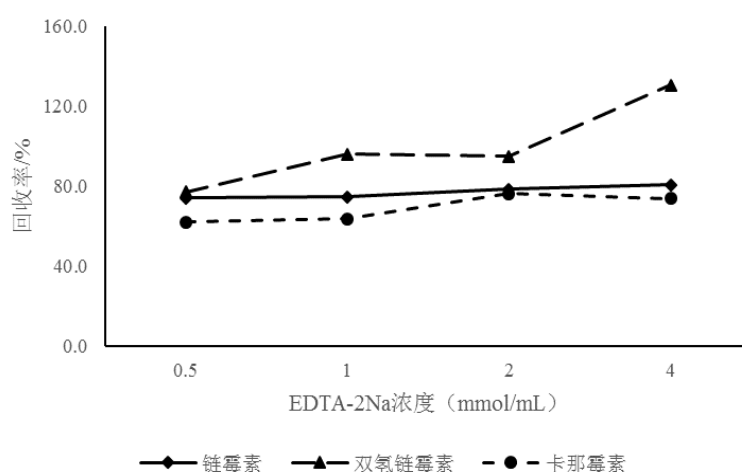


图12. EDTA-2Na 对猪预混合饲料中三种 AGs 药物的回收率影响



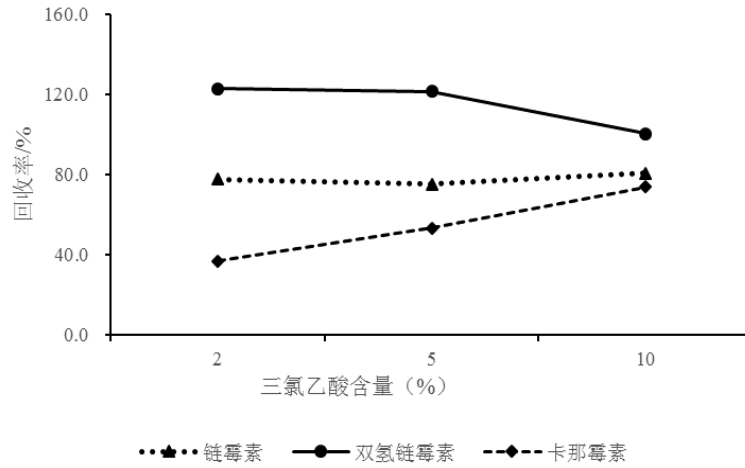


图13. 三氯乙酸对猪预混合饲料中三种 AGs 药物的回收率影响

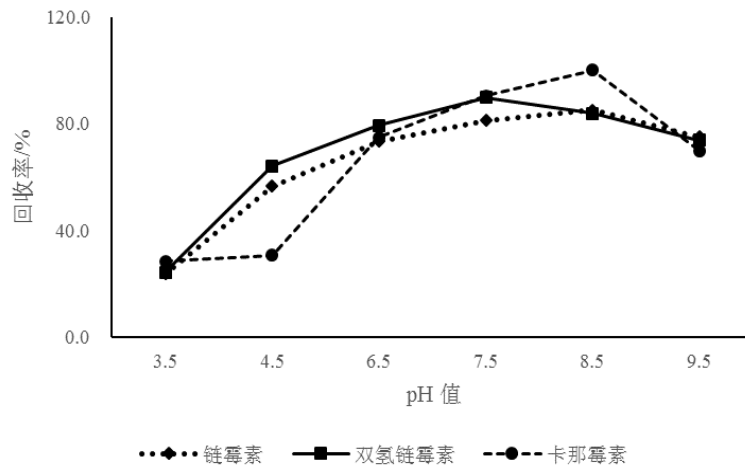


图14. pH 值对猪预混合饲料中三种 AGs 药物的回收率影响

考察了提取时间对猪预混合饲料中三种 AGs 的作用效果，添加浓度同上，结果见图 15。分别超声 5 min、10 min、15 min 和 20 min，提取 15 min 后回收率无明显增加。因此，为提高检测效率，节约操作时间，将样品提取时间定为 15 min。为进一步考察简化试样提取步骤，分别比较了超声 15 min+振荡 5 min 提取方式，以及超声 15 min+期间充分摇动两次的提取方式，两种处理方式对回收率结果影响不显著，因此，选择后者来简化提取步骤。

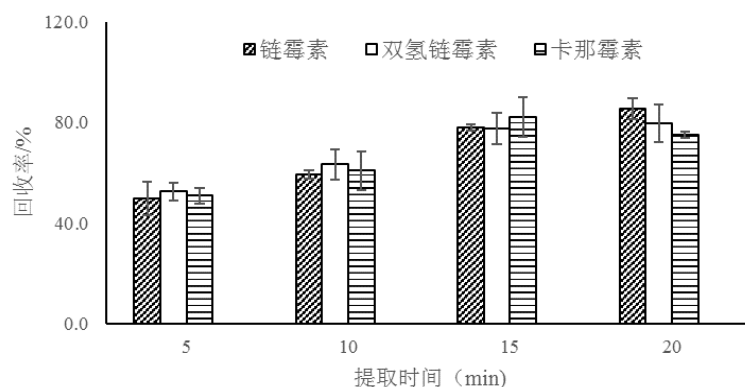


图15. 提取时间对猪预混合饲料中三种 AGs 药物的回收率影响

考察了提取液体积对猪预混合饲料中三种 AGs 的作用效果，添加浓度同上，结果见图 16。分别选择 10 mL、20 mL、30 mL 和 40 mL，当体积为 10 mL 和 20 mL 时，离心后上清液较少，不利于移取，体积为 40 mL 时，回收率达到要求，但造成了提取液的浪费。因此，在满足回收率要求的情况下，选择提取液体积为 30 mL。

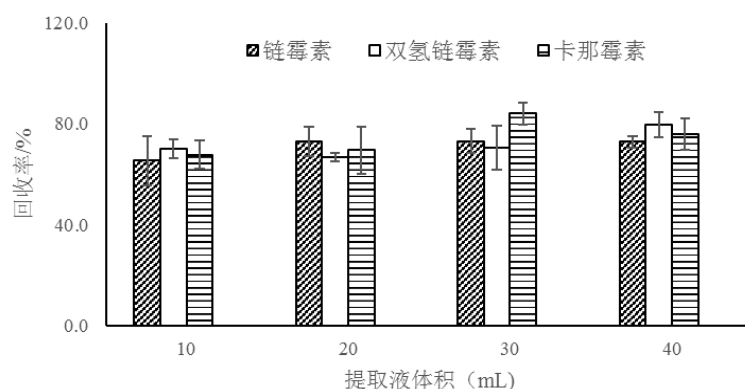


图16. 提取液体积对猪预混合饲料中三种 AGs 药物的回收率影响

进一步考察该提取条件对猪配合饲料、牛精料补充料和猪浓缩饲料中三种 AGs 的作用效果，添加浓度同上，结果见表 7。目标药物在饲料中的回收率和相对标准偏差 (RSD) 均满足方法标准要求，因此，选择此溶液作为提取液。

表7. 提取液对不同饲料中三种 AGs 药物的提取效果

饲料	配合饲料	精料补充料	浓缩饲料
----	------	-------	------

药物	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
链霉素	84.4	2.1	86.8	9.3	78.7	2.9
双氢链霉素	75.5	8.9	81.9	6.7	75.6	3.2
卡那霉素	76.1	1.1	74.5	6.6	83.2	9.5

### 2.3.3.2 净化条件的选择

#### 2.3.3.2.1 固相萃取柱的确定

常用的净化方法为利用固相萃柱对待测物或样品中杂质选择性吸收，达到净化的目的。AGs 属于极性较强的碱性化合物，为增加目标物在固相萃取柱保留，文献报道通常在流动相中加入七氟丁酸、庚烷磺酸钠等离子对试剂<sup>[6,9,13]</sup>；现行标准中农业农村部公告第 197 号-3-2019、GB/T 21323-2007 添加了七氟丁酸离子对试剂<sup>[15,19]</sup>，GB/T 22954-2008、GB/T 22969-2008、GB/T 22945-2008、GB/T 22995-2008 则添加了庚烷磺酸钠离子对试剂<sup>[16,20-22]</sup>。

为避免使用离子对试剂，本实验比较了 Oasis WCX、Oasis MCX 和 Oasis HLB 等固相萃取柱对净化的影响。选取牛精料补充料称取 2 g，提取得到空白基质溶液，添加链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的标准溶液使其浓度分别为 0.5 mg/kg，过 WCX、MCX 和 HLB 柱初步净化测定。结果表明，WCX 和 MCX 对链霉素和双氢链霉素基本无保留，HLB 柱对三种 AGs 保留稳定，回收率在 65% 以上。因此，选择 HLB 柱作为净化 SPE。

#### 2.3.3.2.2 过柱备用液 pH 值的确定

过固相萃取柱的备用溶液中目标物的离子化程度将影响在净化

柱的吸附效率，实验对比了 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.5 的过柱备用液对净化的影响，添加处理方法同 2.3.3.2.1，结果见图 17。当过柱备用液 pH 值为 6.5 时，饲料中三种 AGs 药物在 HLB 柱回收效果最好。

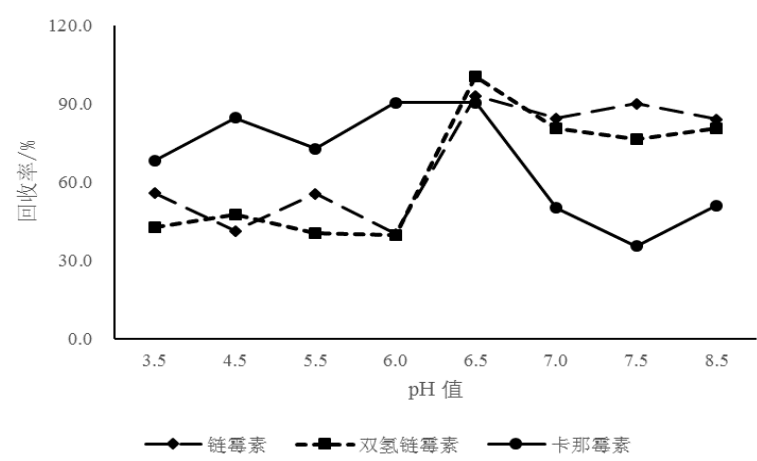


图17. 过柱备用液 pH 值对精料补充料中三种 AGs 药物的回收率影响

根据预审专家组的意见“进一步考察了过柱备用液 pH 6.50±0.10 稳定性的问题”。处理方法同上，饲料提取后调整过柱备用液 pH 至 6.50±0.10，经过 0、2、4、6、8、24、28h 间隔后测定溶液 pH，考察不同时间间隔的过柱备用液 pH 变化，结果见表 8。发现由于提取液中存在缓冲盐体系，过柱备用液 pH 在 28h 均在允许误差范围，批内 RSD 为 0.09%~0.15%，批间 RSD 为 0.2%，pH 值差异不显著。

表8. 过柱备用液 pH 值在不同间隔时间的变化

时间间隔 (h)	温度 ℃	pH			平均值	RSD %	平均值	RSD %
		1	2	3				
0	24.1	6.54	6.54	6.53	6.54	0.09	6.53	0.20
2	23.0	6.55	6.54	6.54	6.54	0.09		
4	23.5	6.53	6.54	6.53	6.53	0.09		
6	24.3	6.52	6.53	6.53	6.53	0.09		

8	24.1	6.51	6.53	6.52	6.52	0.15		
24	24.5	6.51	6.52	6.52	6.52	0.09		
28	24.0	6.51	6.50	6.52	6.51	0.15		

### 2.3.3.2.3 固相萃取柱洗脱条件的确定

氨基糖苷类药物属于强极性化合物，而异丙醇极性较强，在酸性水溶液中加入异丙醇可提高 AGs 在 HLB 柱的洗脱效果。实验中筛选出 5% 异丙醇、甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液 (10:10:80, 体积比) 和甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液 (10:5:85, 体积比) 三种洗脱液。添加处理方法同 2.3.3.2.1, 用三氯乙酸溶液调节过柱备用液 pH 至 6.5 后过 HLB 柱, 分别用上述洗脱溶液洗脱从而观察作用效果, 结果见图 18。甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液 (10:5:85, 体积比) 对三种 AGs 药物的洗脱效果明显高于其他两种溶液。

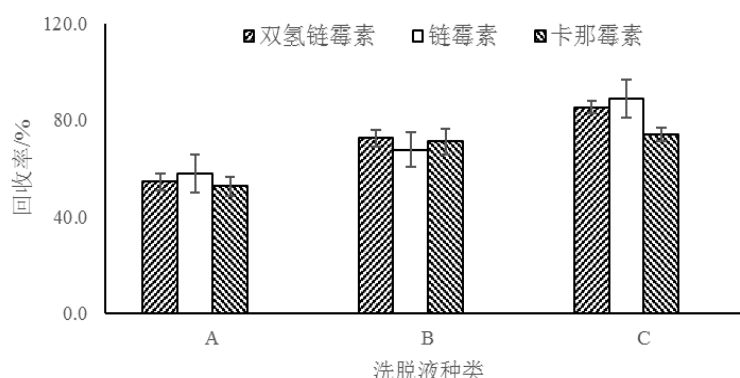


图18. 洗脱液对精料补充料中三种 AGs 药物的回收率影响

注: A 为 5% 异丙醇溶液; B 为甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液 (10:10:80); C 为甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液 (10:5:85)

因洗脱液中水分含量高, 氮气吹干将影响处理效率, 本方法考虑将洗脱后溶液直接上机测定从而简化前处理过程来提高分析效率。实验对比了洗脱液 pH 为 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 对三种 AGs

药物在色谱柱的分离影响，发现卡那霉素的色谱峰和响应值受 pH 影响较大，代表性特征离子谱图见图 19。当洗脱液 pH 值为 0.8 时三种 AGs 药物保持了较好的响应和色谱峰。

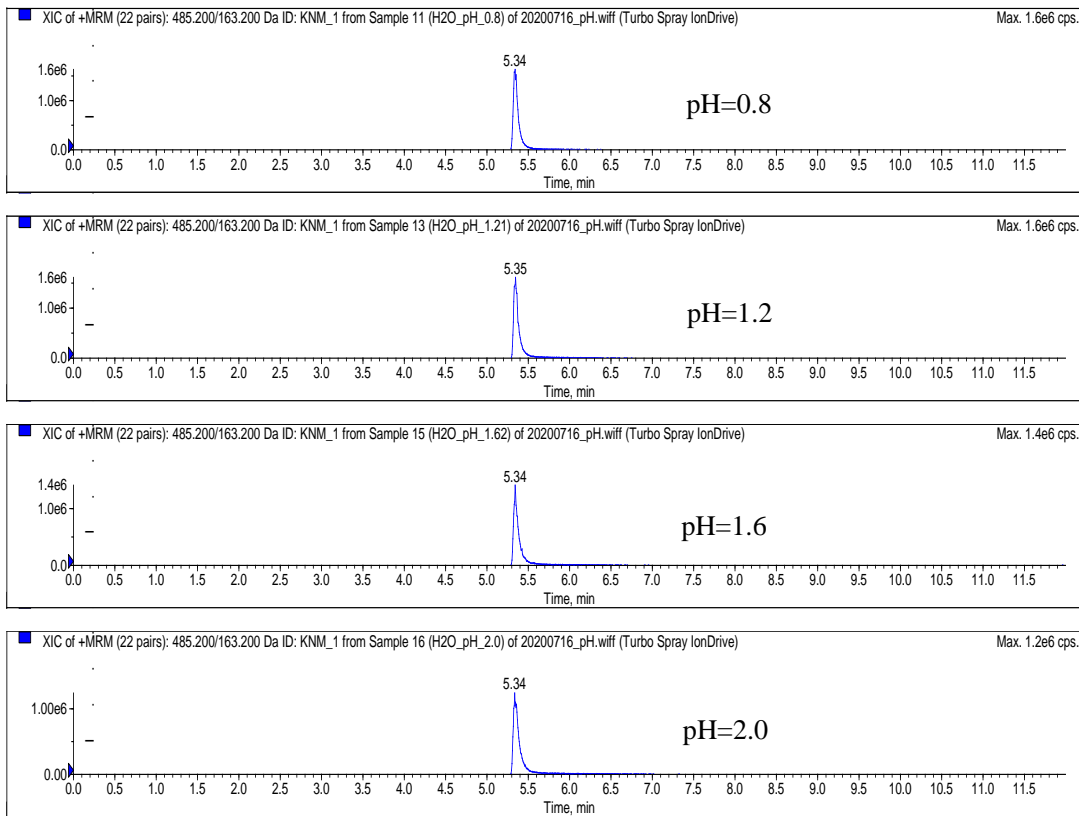


图19. 不同 pH 测定液对卡那霉素分离的影响

根据预审专家组的意见“进一步核实洗脱液 pH 0.80 允许误差范围”，起草小组结合上述洗脱液 pH 范围 0.8~2.0 的实验结果，进一步考察了 pH 为 0.80、0.82、0.84、0.86、0.88、0.90 的影响，结果发现 pH 0.80~0.90 时，目标物的面积响应会稍微降低，但对定量结果影响不显著，因此，将洗脱液 pH 的允许误差范围适当放宽至 0.1。

为进一步考察前处理条件对猪配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中 AGs 药物的提取和净化效果，选择上述空白饲料，链霉素、双氢链霉素和卡那霉素的添加浓度分别为 0.5 mg/kg，提取后调节过柱备

用液 pH 值为 6.5，过 HLB 柱净化，用甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液（10:5:85，pH=0.8）进行洗脱测定，结果见表 9，添加回收结果均满足要求。

**表9.** 猪的配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料回收率试验结果

样品	化合物	回收率（%）					平均回收率%	批内变异系数%
		1	2	3	4	5		
猪配合饲料	双氢链霉素	71.6	85.3	77.2	72.9	87.6	78.9	9.1
	链霉素	89.1	70.4	87.8	83.6	89.7	84.1	9.6
	卡那霉素	88.9	72.9	87.1	83.3	76.0	81.6	8.5
猪浓缩饲料	双氢链霉素	83.7	75.3	79.3	92.7	76.2	81.5	8.7
	链霉素	73.6	86.1	85.4	73.4	88.1	81.3	8.9
	卡那霉素	86.3	94.3	96.3	82.8	90.7	90.1	6.2
猪预混合饲料	双氢链霉素	85.7	79.8	88.2	71.0	83.0	81.5	8.2
	链霉素	72.5	77.6	71.8	90.9	81.3	78.8	9.9
	卡那霉素	74.7	83.9	91.6	84.3	86.4	84.2	7.2

综合以上结果，确定了饲料中三种 AGs 药物的前处理方法：称取试样 2 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 30 mL 提取液（10% 三氯乙酸溶液-10 mmol/L 磷酸二氢钾-2 mmol/L EDTA-2Na，pH=7.50），涡旋 1 min 后超声提取 15 min，期间充分摇动两次，于 10 000 r/min 离心 10 min，准确移取 15 mL 上清液，用三氯乙酸溶液调节 pH 至 6.50，备用。HLB 固相萃取柱依次用甲醇和水各 5 mL 预淋洗，将备用液全部过柱，分别用水 5 mL、10% 甲醇溶液 5 mL 淋洗，负压抽干，准确量取 5 mL 洗脱液（甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵溶液=10:5:85，体积比，pH=0.80）洗脱，负压抽干，收集洗脱液，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

### 2.3.4 不同 HLB 固相萃取柱净化处理的稳定性和重复性

在配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中，一般配合饲料的成份全面、基质复杂，加入一定体积洗脱液，收集的溶

液体积可能会变化，对定量结果产生影响。本实验选择代表性的猪配合饲料，考察不同 HLB 固相萃取柱净化处理的稳定性和重复性。

称取饲料 2 g，三种 AGs 添加浓度分别为 0.5 mg/kg，按前处理方法操作，选取 Strata™-X（500mg 6cc）、Oasis HLB（500mg 6cc）、Copure HLB（500mg 6cc）、Poly-Sery HLB（500mg 6cc）等常用的亲水-亲脂 SPE 柱活化，将备用液过柱后淋洗，负压抽干，分别准确量取 5 mL 洗脱液洗脱，负压抽干，收集并定量过柱后的溶液体积，考察不同 HLB 柱对洗脱前后溶液体积以及对定量结果的影响。

2.3.4.1 洗脱液体积差异考察

不同 HLB 柱对洗脱前后溶液体积差异的影响见表 10。三种 SPE 柱净化后待上机溶液的体积 RSD 为 0.32%，洗脱前后溶液体积损失率 0.33%~1.15%，均小于 5%，表明洗脱液经过三种 HLB 固相萃取柱净化，处理前后溶液体积差异不显著。

表10. 不同厂家 HLB 固相萃取柱对洗脱前后溶液体积的影响

固相萃取柱	过柱后体积/mL				不同 SPE 柱间		过柱损失率 %
	1	2	3	平均值	平均值	RSD%	
Strata™-X	4.95	4.92	4.97	4.95	4.97	0.32	1.08
	4.95	4.99	4.95	4.96			0.78
Oasis HLB	4.97	4.99	4.97	4.98			0.46
	4.98	5.00	4.97	4.98			0.33
Copure HLB	4.92	4.95	4.96	4.94			1.15
	4.98	4.95	4.95	4.96			0.85
Poly-Sery HLB	4.96	4.98	4.97	4.97			0.59
	4.98	5.00	4.97	4.98			0.35

2.3.4.2 洗脱液体积差异对定量结果的影响考察

选取其中一组处理后的溶液上机测定，以基质匹配标准溶液进行结果校正，考察不同厂家 HLB 固相萃取柱对回收率和精密度的影响，



结果见表 11。双氢链霉素在四种 HLB 固相萃取柱的回收率为 85.6 %~91.5 %，链霉素为 86.4 %~93.2 %，卡那霉素为 74.1 %~77.2 %，RSD 范围 1.71 %~3.24 %，RSD 均小于 5 %。

表11. 不同厂家 HLB 固相萃取柱对回收率和精密度的影响

添加药物	固相萃取柱	回收率%				不同 SPE 柱间	
		1	2	3	平均值	平均回收率%	RSD%
双氢链霉素	Strata™-X	82.0	95.5	91.8	89.8	89.1	2.79
	Oasis HLB	92.1	82.0	82.7	85.6		
	Copure HLB	82.1	93.8	98.5	91.5		
	Poly-Sery HLB	87.7	93.3	87.9	89.6		
链霉素	Strata™-X	85.5	89.1	84.7	86.4	90.5	3.15
	Oasis HLB	96.7	82.7	93.9	91.1		
	Copure HLB	94.9	82.7	95.8	91.1		
	Poly-Sery HLB	99.0	83.6	96.9	93.2		
卡那霉素	Strata™-X	80.0	77.0	70.6	75.9	75.6	1.71
	Oasis HLB	72.1	78.9	80.6	77.2		
	Copure HLB	70.2	74.3	77.9	74.1		
	Poly-Sery HLB	79.9	73.4	72.1	75.1		

通过表 9~表 10 四种 HLB 柱净化处理后洗脱液体积和检测结果试验来看，不同 HLB 柱间重复性较好，SPE 柱对双氢链霉素、链霉素、卡那霉素的净化体积差异对定量结果的影响差异不明显，直接用洗脱后的溶液测定目标物，不会对定量结果产生影响。

### 2.3.5 固相萃取柱承载量考察

为防净化步骤中 SPE 柱出现过载现象，考察了 HLB 柱( 500 mg/6 cc ) 对三种药物的承载量。在空白试样添加高浓度的链霉素、双氢链霉素、卡那霉素，按前处理方法处理上机，HLB 柱对饲料中三种 AGs 药物承载量见表 12。结果表明，当饲料中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的含量超过表中所述值时，将超过固相萃取柱的承载能力，此时的样品提取液需经稀释后测定。

表12. 固相萃取柱承载量结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)			
	配合饲料	浓缩饲料	精料补充料	预混合饲料
链霉素	200	500	200	200
双氢链霉素	200	500	200	200
卡那霉素	200	500	200	200

### 2.3.6 方法学考察

#### 2.3.6.1 基质干扰实验

饲料产品种类繁多且本底复杂，含有丰富的蛋白质、纤维素、脂肪、维生素等，ESI 离子源易受到上述物质干扰，产生基质效应，影响目标物准确定量，因此，需评估基质对目标物测定的影响。以基质匹配标准曲线的斜率（ $A$ ）和溶剂标准曲线的斜率（ $B$ ）的比值评估基质效应（Matrix effect,  $ME$ ）， $ME=A/B$ ，若  $ME$  为 0.8~1.2，则表明基质效应不明显。配制成浓度为 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 溶剂标准溶液和各代表性空白饲料基质标准溶液，进行液相色谱串联质谱分析，利用外标法绘制标准曲线，各基质标准曲线的斜率与溶液标准曲线的斜率之比在 1.0~2.4 之间（表 13）。链霉素、双氢链霉素、卡那霉素在四种饲料中均存在一定的基质增强效应，为消除基质效应带来的定量偏差，本研究采用基质混合标准工作液进行定量。

表13. 三种 AGs 药物在饲料中的基质效应

饲料	化合物	基质匹配标准曲线的斜率（ $A$ ）	溶剂标准曲线的斜率（ $B$ ）	基质匹配标准曲线相关系数 $r$	基质效应（ $ME$ ）
猪配合饲料	链霉素	2248.3	1527.7	0.9995	1.5
	双氢链霉素	8075.5	4028.8	0.9997	2.0
	卡那霉素	8600.5	6827.0	0.9995	1.3
猪浓缩饲料	链霉素	1789.4	1527.7	0.9997	1.2
	双氢链霉素	5010.1	4028.8	0.9999	1.2

	卡那霉素	6733.5	6827.0	0.9996	1.0
牛精料 补充料	链霉素	2746.1	1527.7	0.9993	1.8
	双氢链霉素	9782.8	4028.8	0.9994	2.4
	卡那霉素	11399.7	6827.0	0.9982	1.7
猪预混 合饲料	链霉素	1877.2	1527.7	0.9989	1.2
	双氢链霉素	5237.3	4028.8	0.9994	1.3
	卡那霉素	6756.8	6827.0	0.9997	1.0

### 2.3.6.2 基质匹配标准曲线

选取猪鸡配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料，以及维生素预混合饲料、牛精料补充料。准确称取试样 2 g，以标准文中方法配制 10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 、50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、250  $\mu\text{g/L}$ 、500  $\mu\text{g/L}$ 、1 000  $\mu\text{g/L}$  基质匹配标准系列溶液，以待测物峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。结果表明，目标物在不同基质中 10~1 000  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  均 $>0.99$ 。

### 2.3.6.3 方法的灵敏度

在定向征求意见阶段，专家根据“不同基质中检出限和定量限的信噪比值”，建议进一步考察和降低检测限与定量限。选择配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料补充料的空白饲料，各饲料在相应的保留时间处对所测药物无干扰，用空白饲料制备 0.05、0.1、0.2、0.3 mg/kg 添加样品，经前处理后供液相色谱-串联质谱仪检测。

方法检出限（LOD）依据分析物的特征离子信噪比  $S/N>3$ ，确定方法检出限为 0.05 mg/kg，方法定量限（LOQ）依据分析物的特征离子信噪比  $S/N>10$  且要满足准确度要求，确定方法定量限为 0.1 mg/kg。检出限和定量限信噪比代表性色谱图见图 20 和图 21。

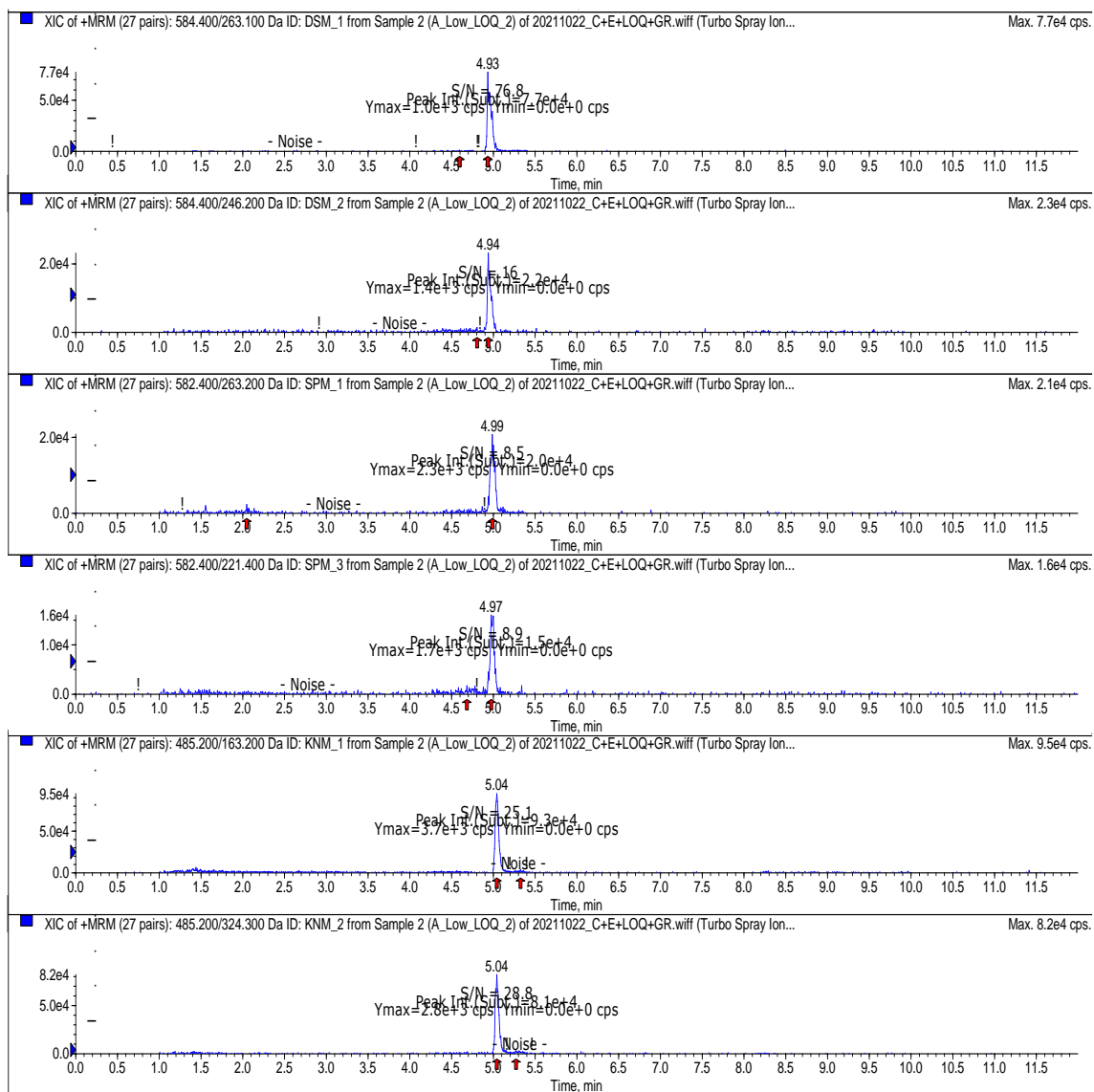


图20. 猪配合饲料检出限（0.05 mg/kg）时特征离子信噪比色谱图

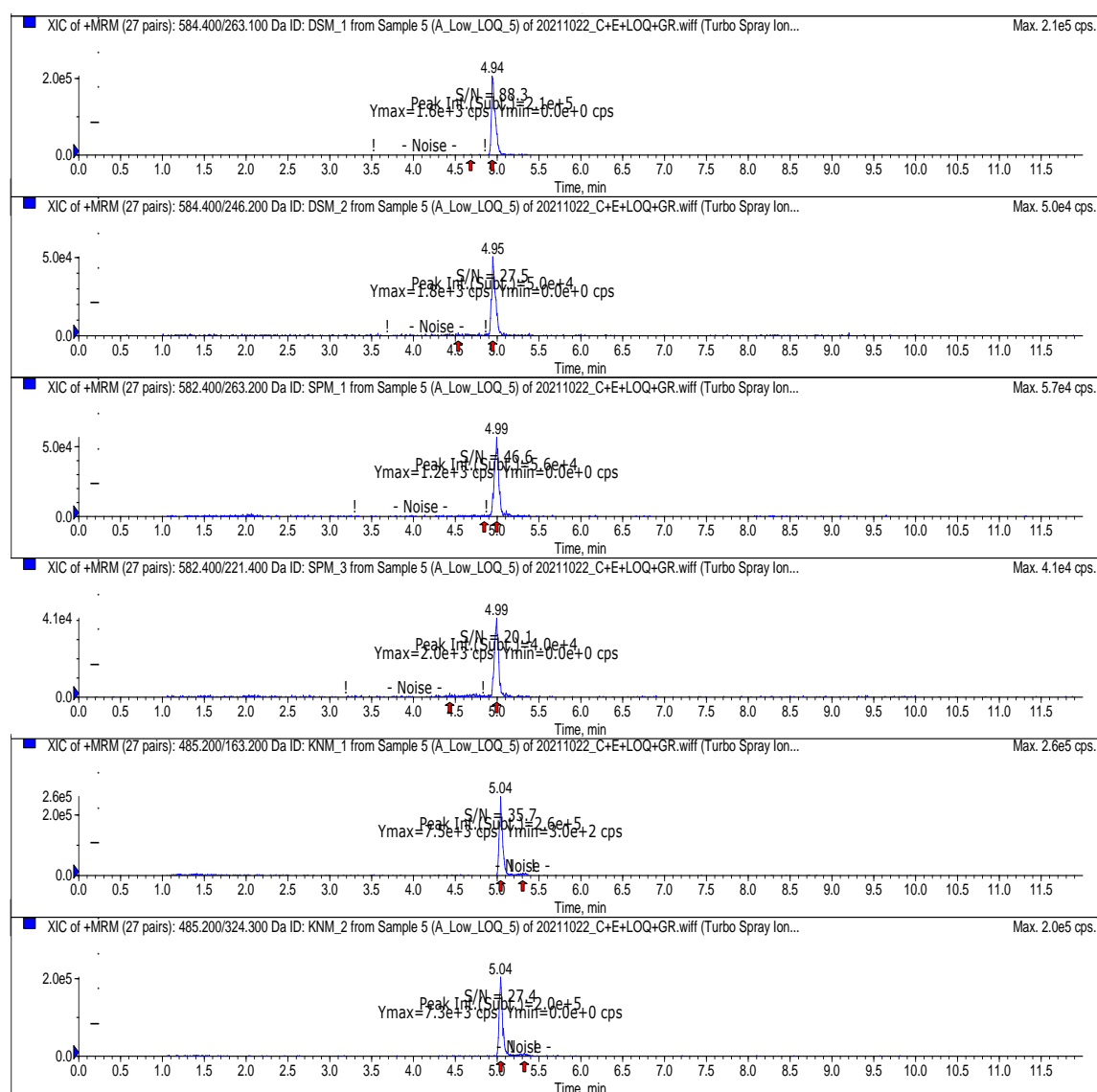


图21. 猪配合饲料定量限（0.1 mg/kg）时特征离子信噪比色谱图

### 2.3.6.4 方法的准确度和精密度

选用畜禽配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料分别进行加标回收试验，每种饲料采用不同的添加浓度，包括了残留浓度、实际使用浓度，每个添加浓度制备 6 个平行样品，重复 3 个批次，结果见表 14~表 22。

**表14.** 不同饲料中三种 AGs 添加浓度

化合物	饲料	添加浓度 mg/kg	方法的灵敏度 mg/kg
双氢链霉素 链霉素 卡那霉素	猪配合饲料	0.1、0.3、1.5、3、 50、100	检出限 0.05 定量限 0.1
	鸡配合饲料		
	猪浓缩饲料	0.1、0.3、1.5、3、 250	
	鸡浓缩饲料		
	牛精料补充料		
	猪预混合饲料	0.1、0.3、1.5、3、 250、2500	
	鸡预混合饲料		
	维生素预混合饲料		

链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 22。猪配合饲料、猪浓缩饲料、鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、猪预混料、鸡预混料和维生素预混料在定量限 0.1 mg/kg，及 3 mg/kg 的特征离子色谱图见图 23~图 46。

待测物响应信号强，杂质干扰少，添加浓度的回收率满足饲料中氨基糖苷类药物测定工作的需要。

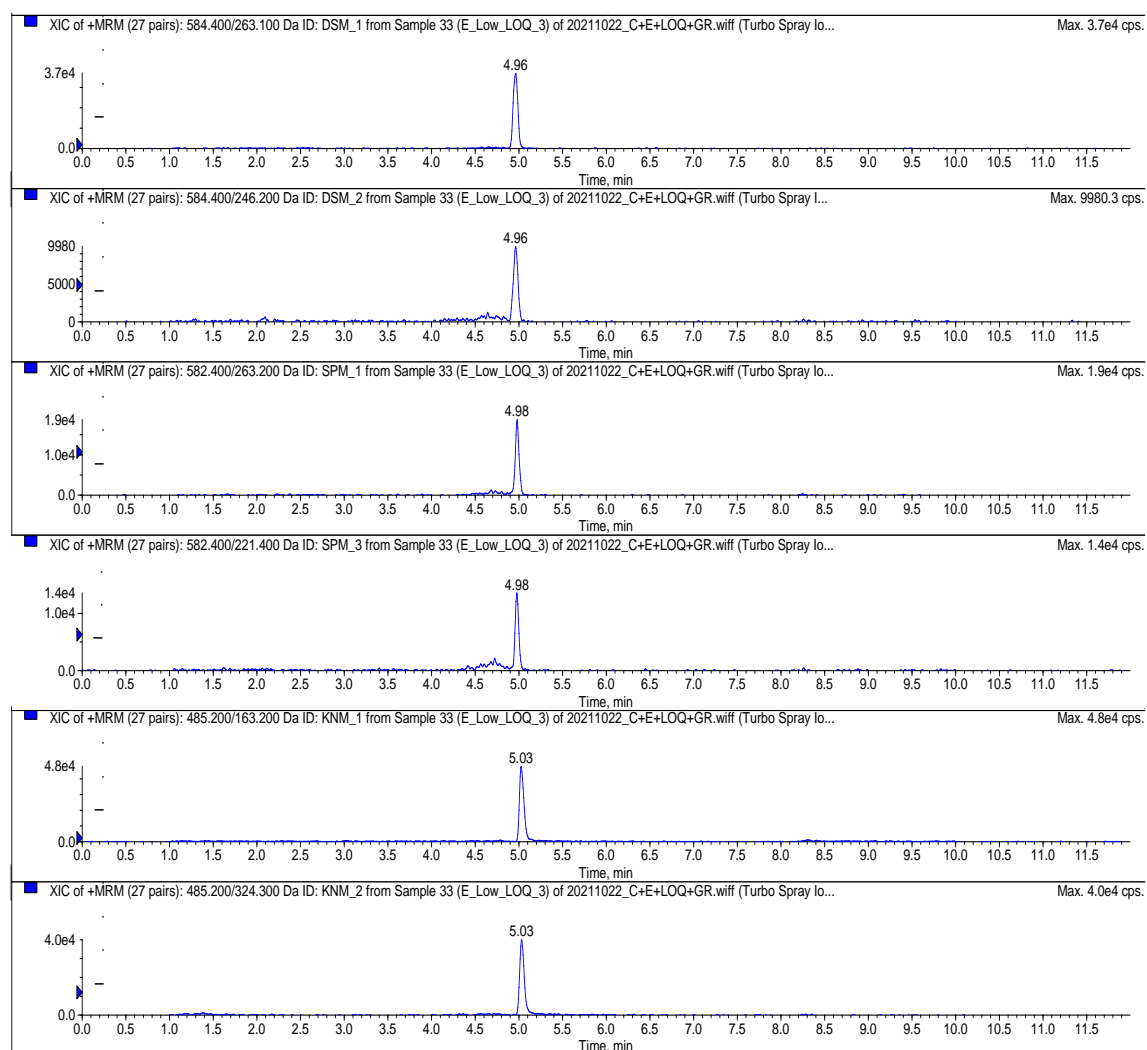


图22. 基质匹配氨基糖苷类药物标准溶液（20  $\mu\text{g/L}$ ）特征离子色谱图

DSM—双氢链霉素；SPM—链霉素；KNM—卡那霉素

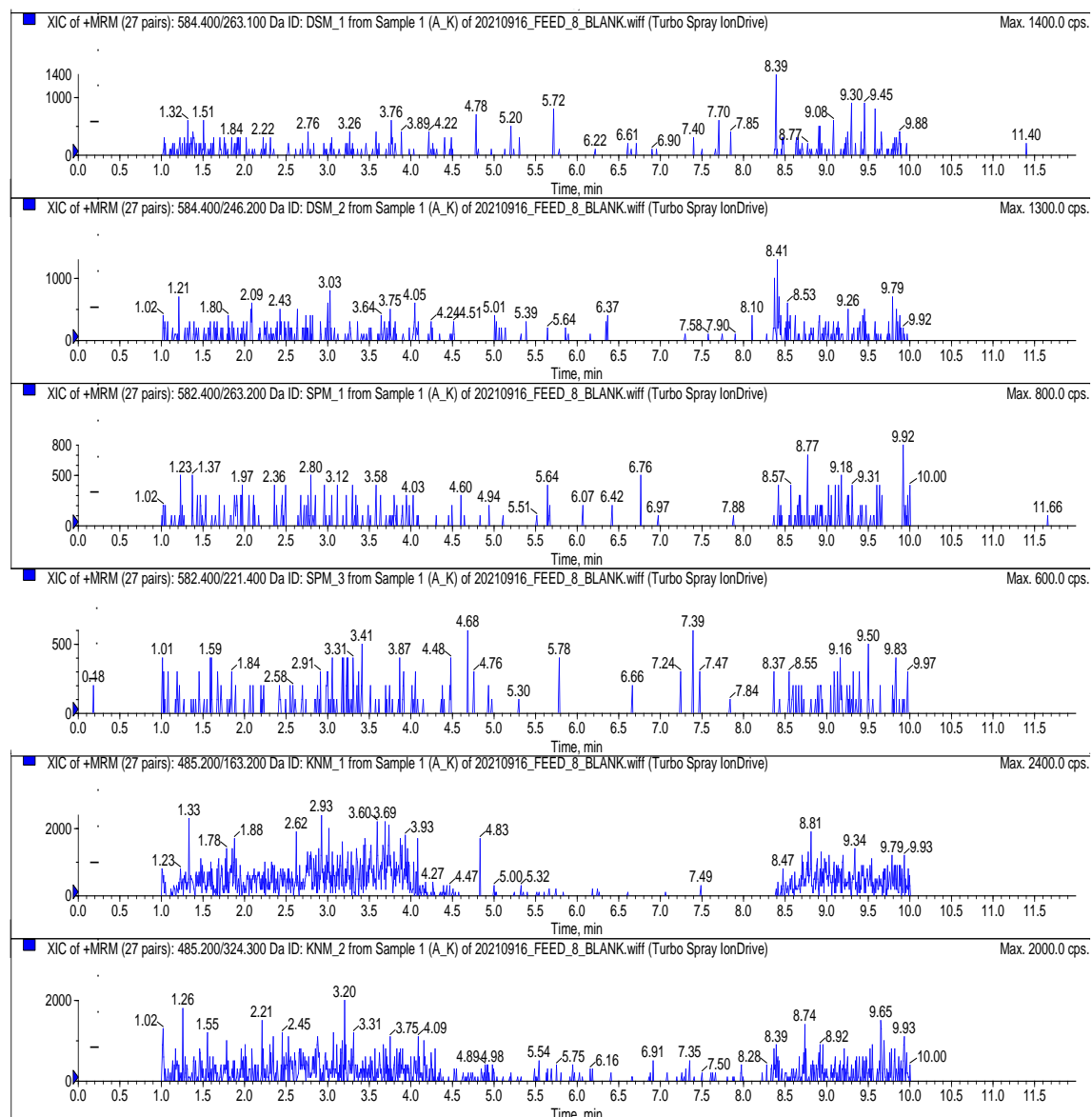


图23. 空白猪配合料特征离子色谱图



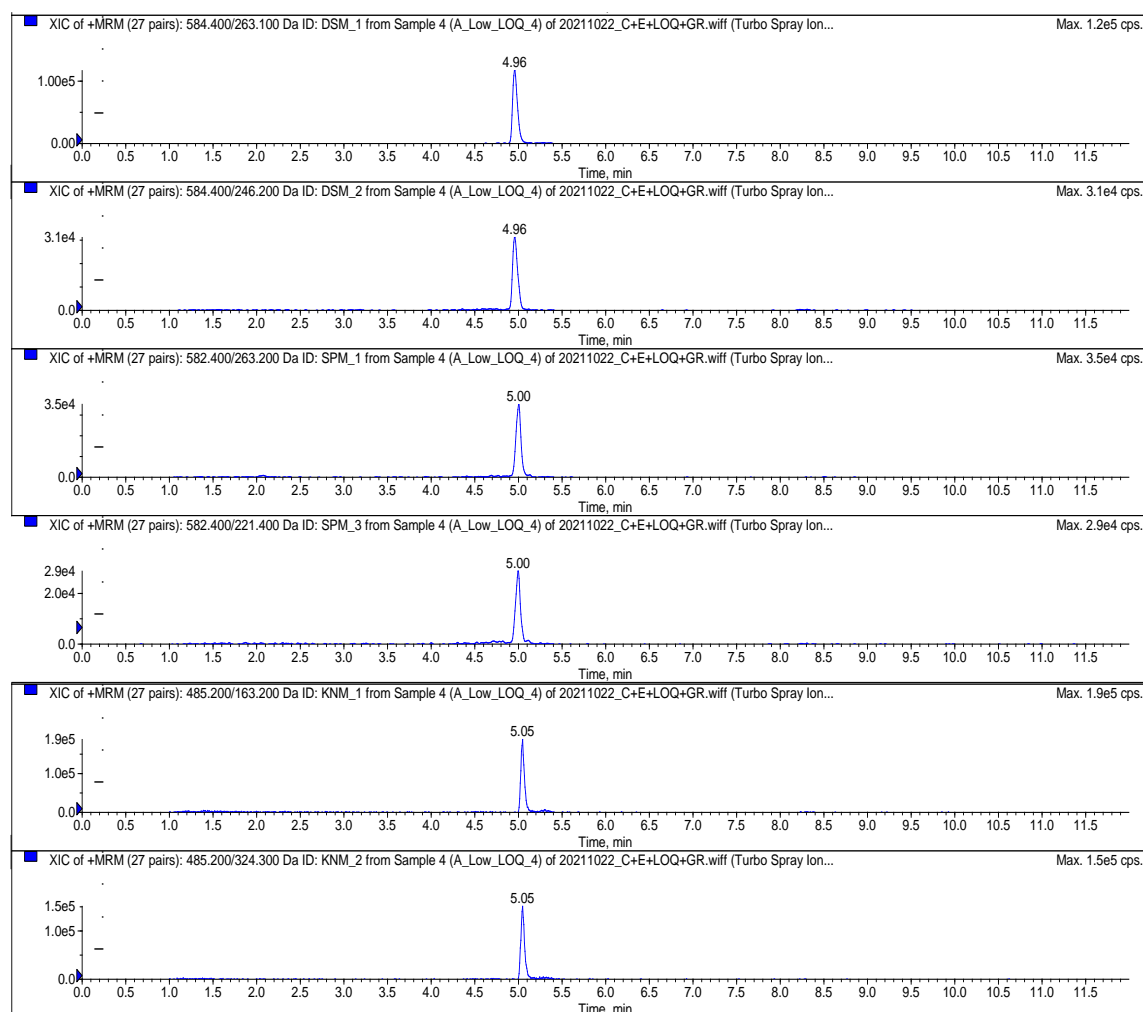


图24. 添加浓度为0.1 mg/kg猪配合料特征离子色谱图

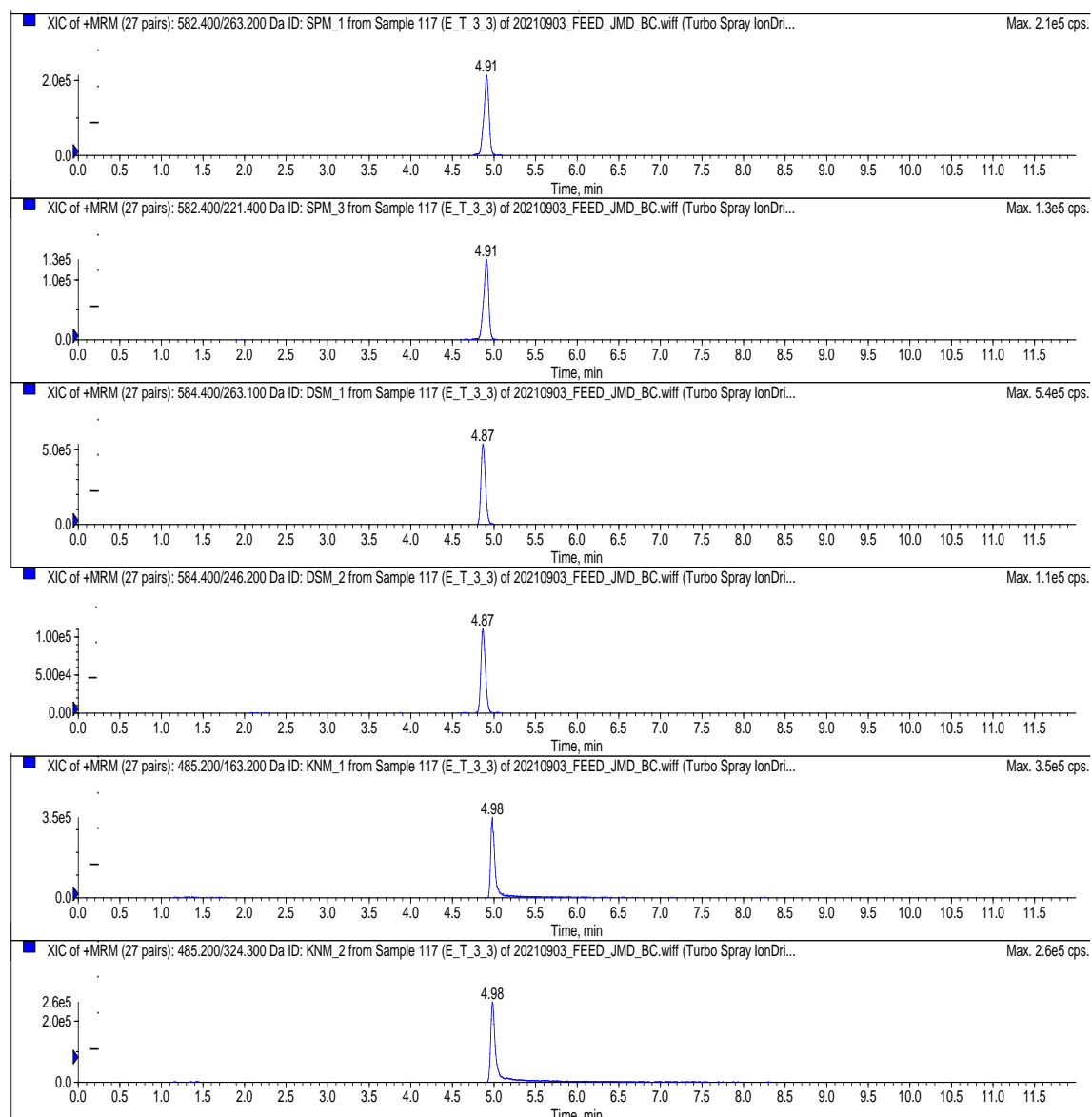


图25. 添加浓度为3 mg/kg猪配合料特征离子色谱图

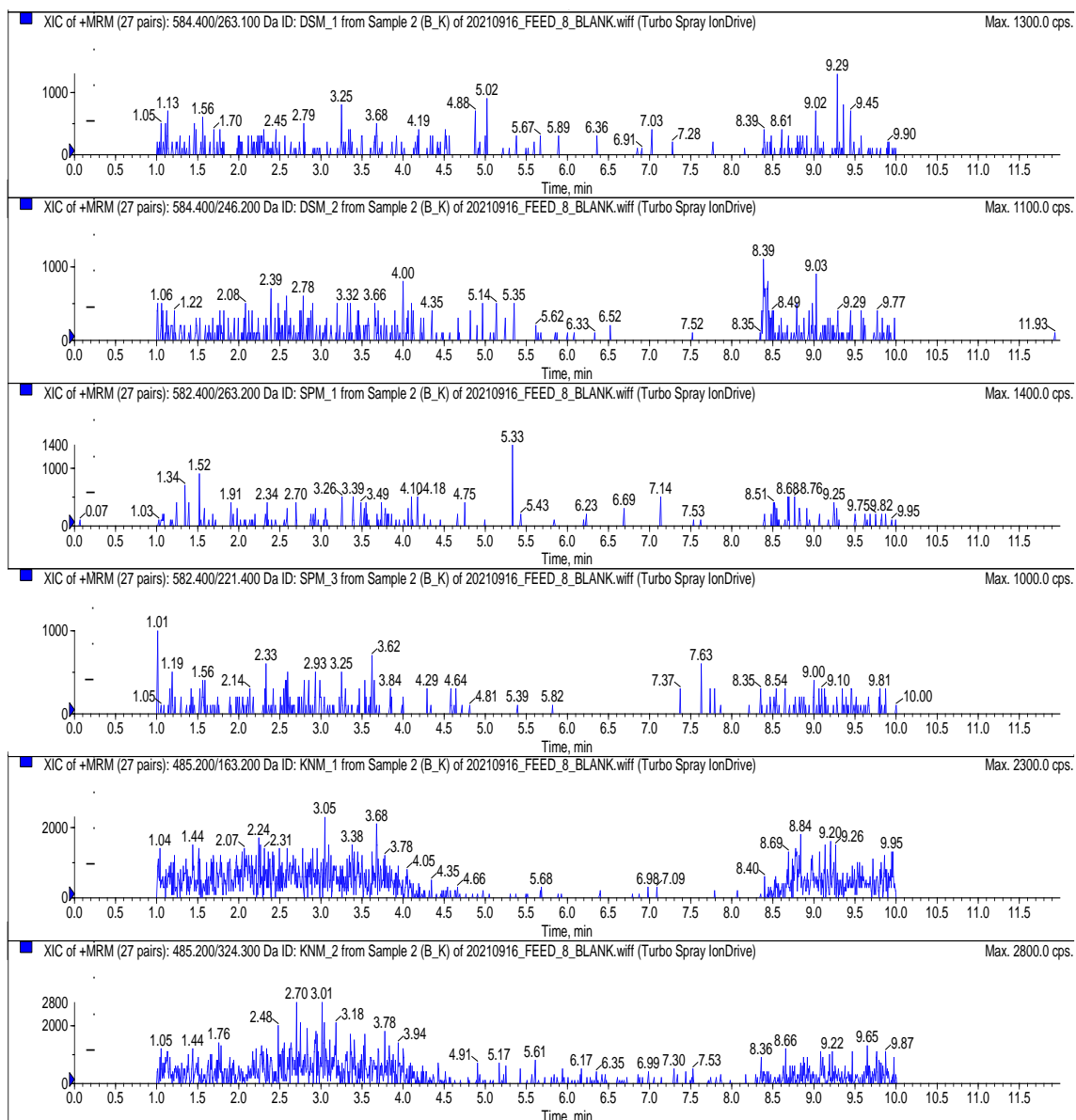


图26. 空白猪浓缩料特征离子色谱图

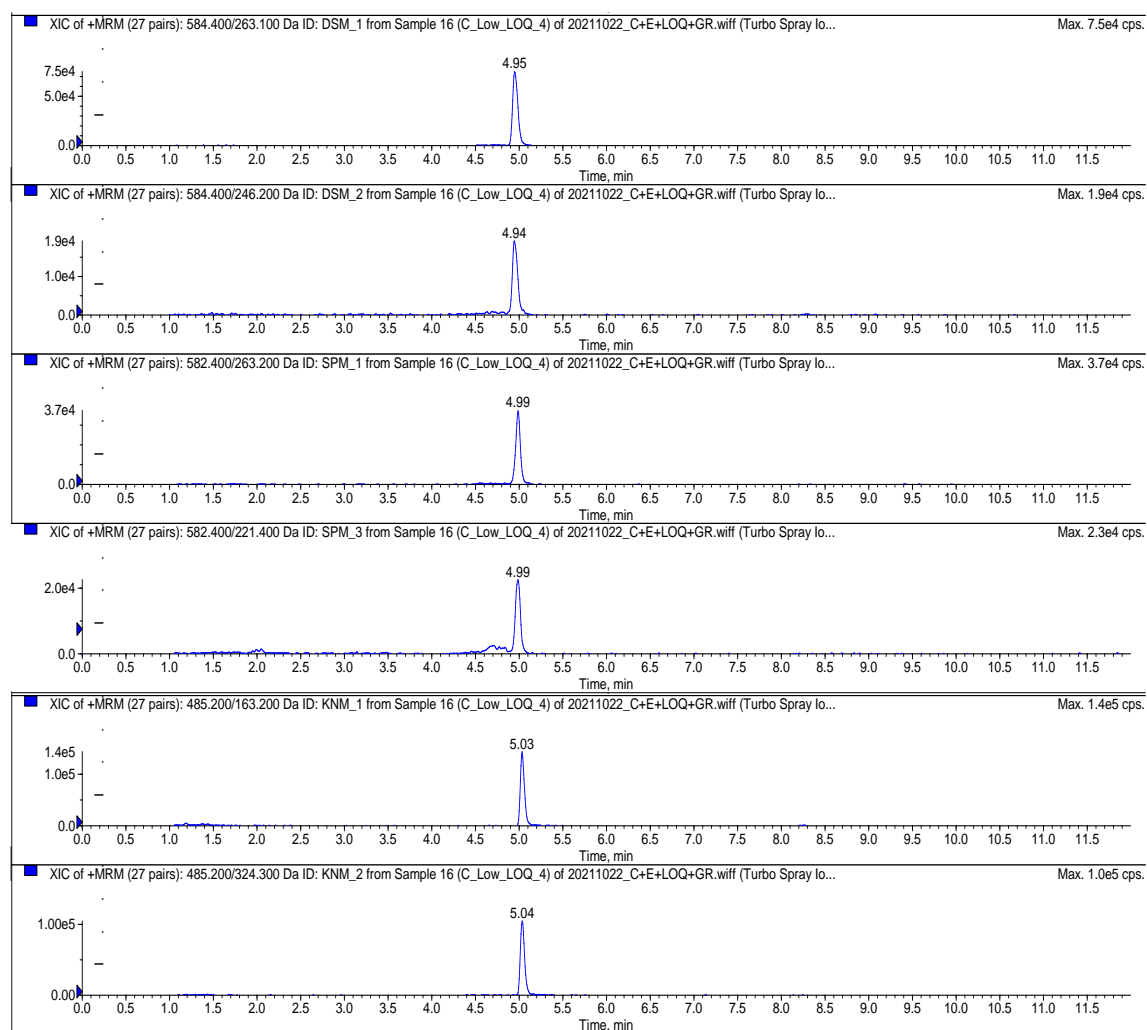


图27. 添加浓度为0.1 mg/kg猪浓缩料特征离子色谱图

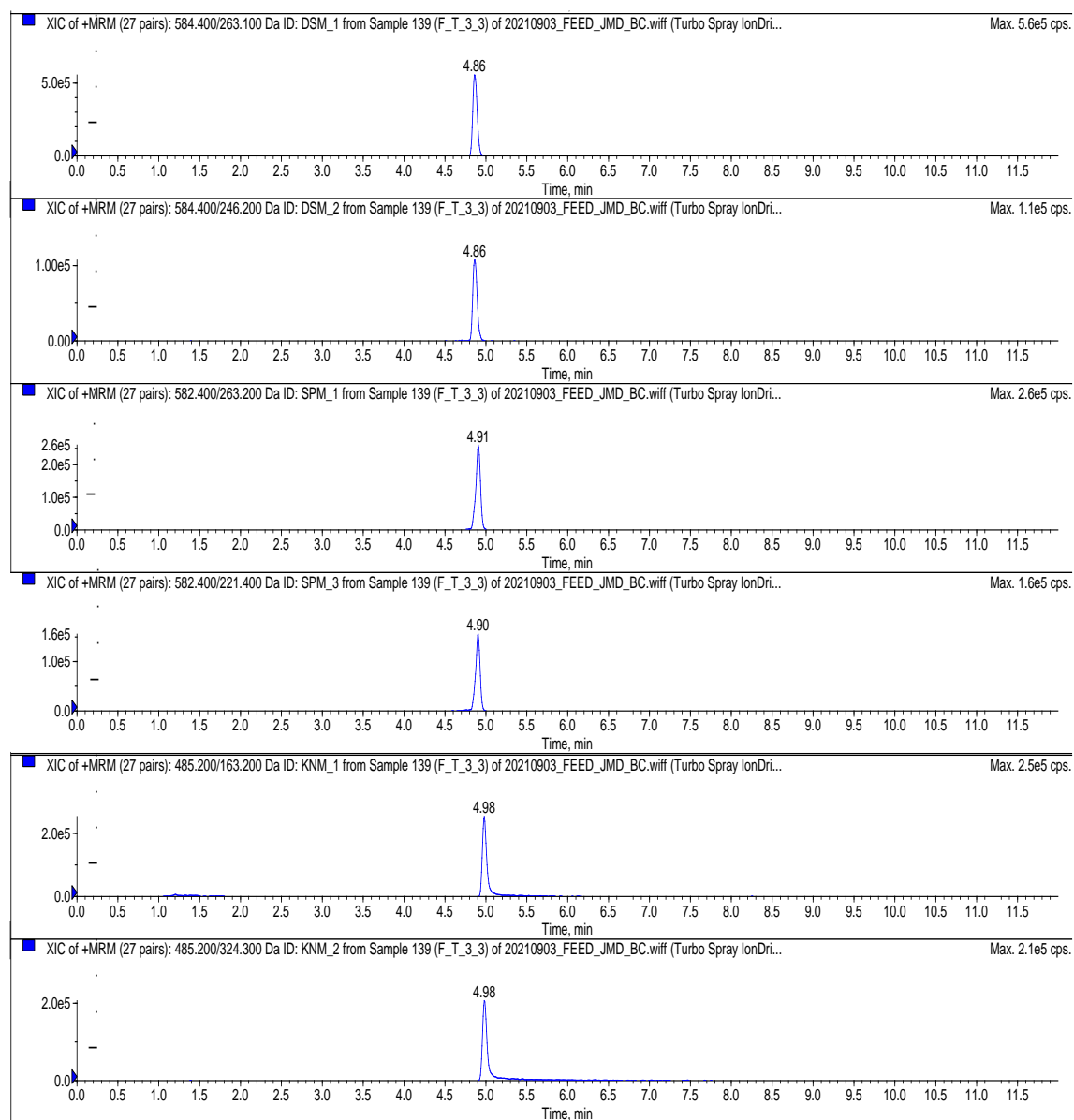


图28. 添加浓度为3 mg/kg猪浓缩料特征离子色谱图

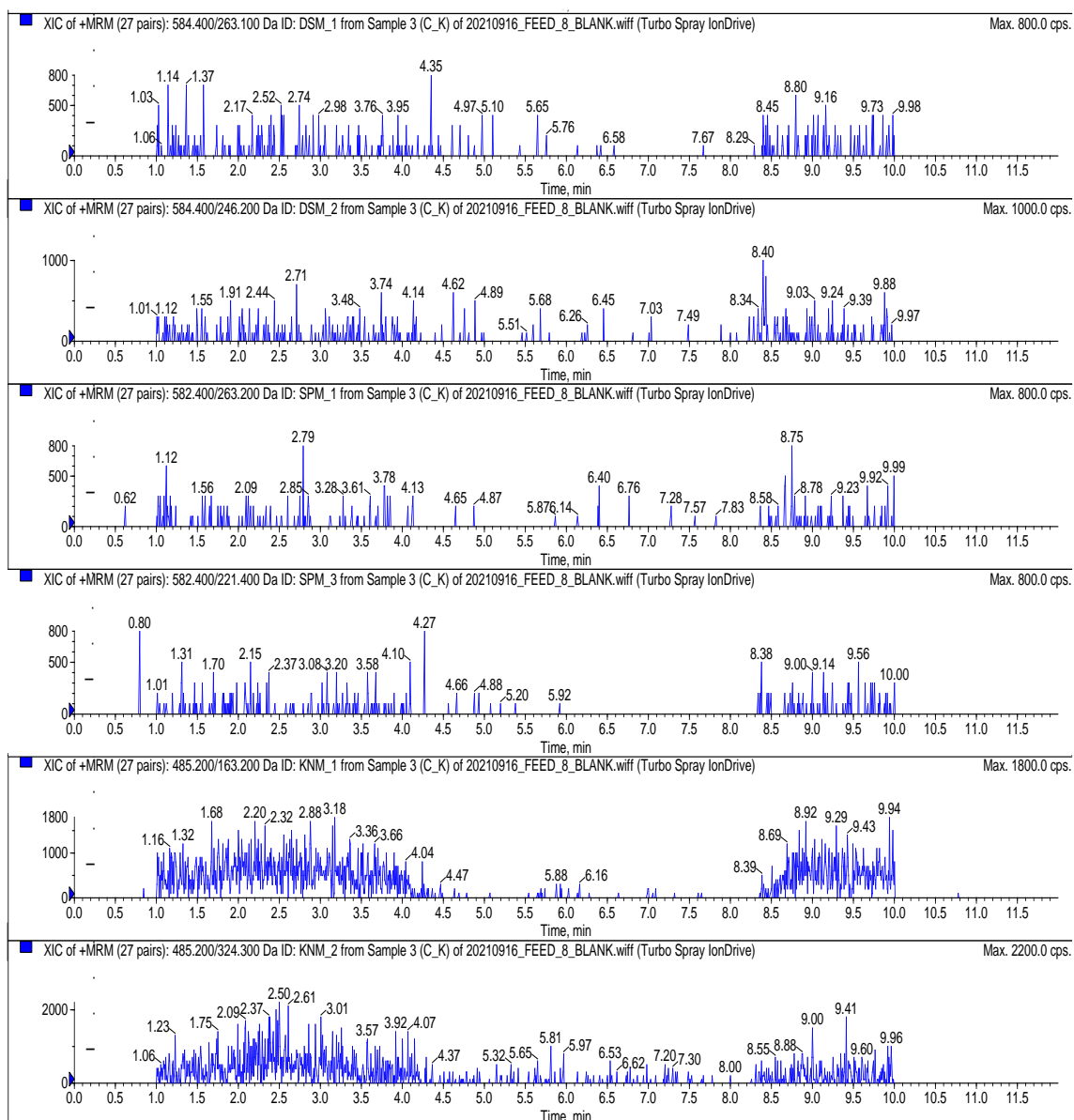


图29. 空白鸡配合料特征离子色谱图

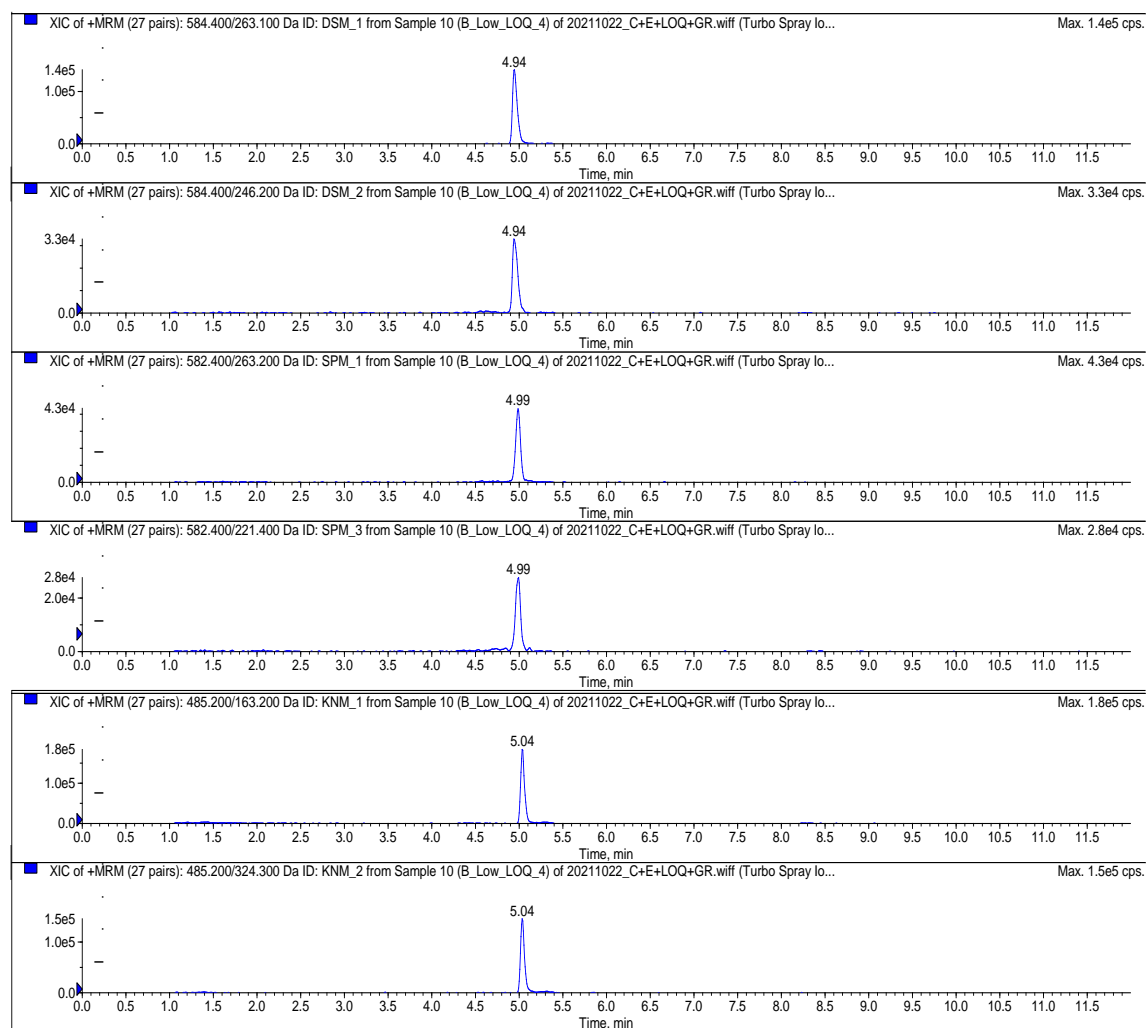


图30. 添加浓度为0.1 mg/kg鸡配合料特征离子色谱图

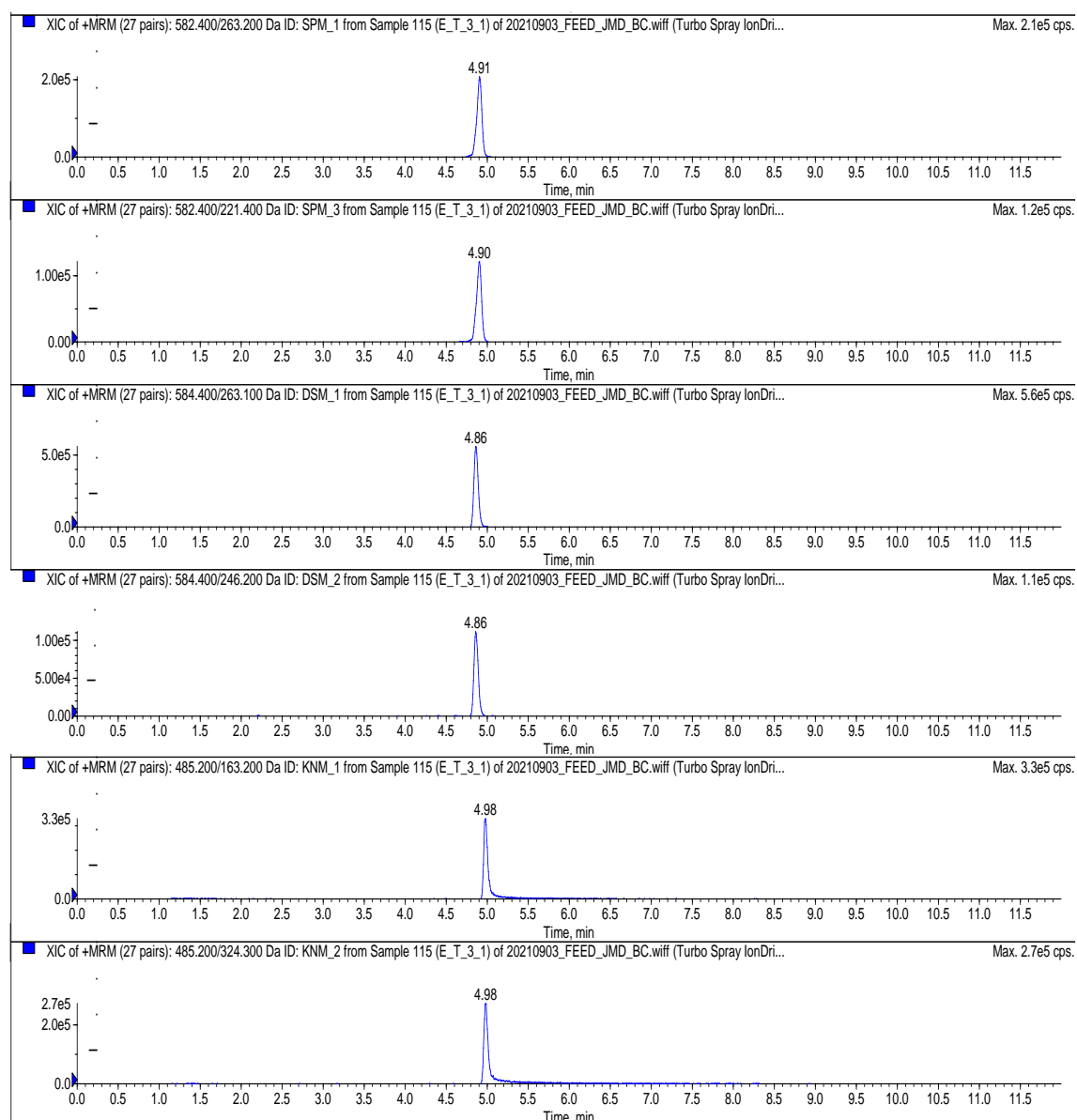


图31. 添加浓度为3 mg/kg鸡配合料特征离子色谱图



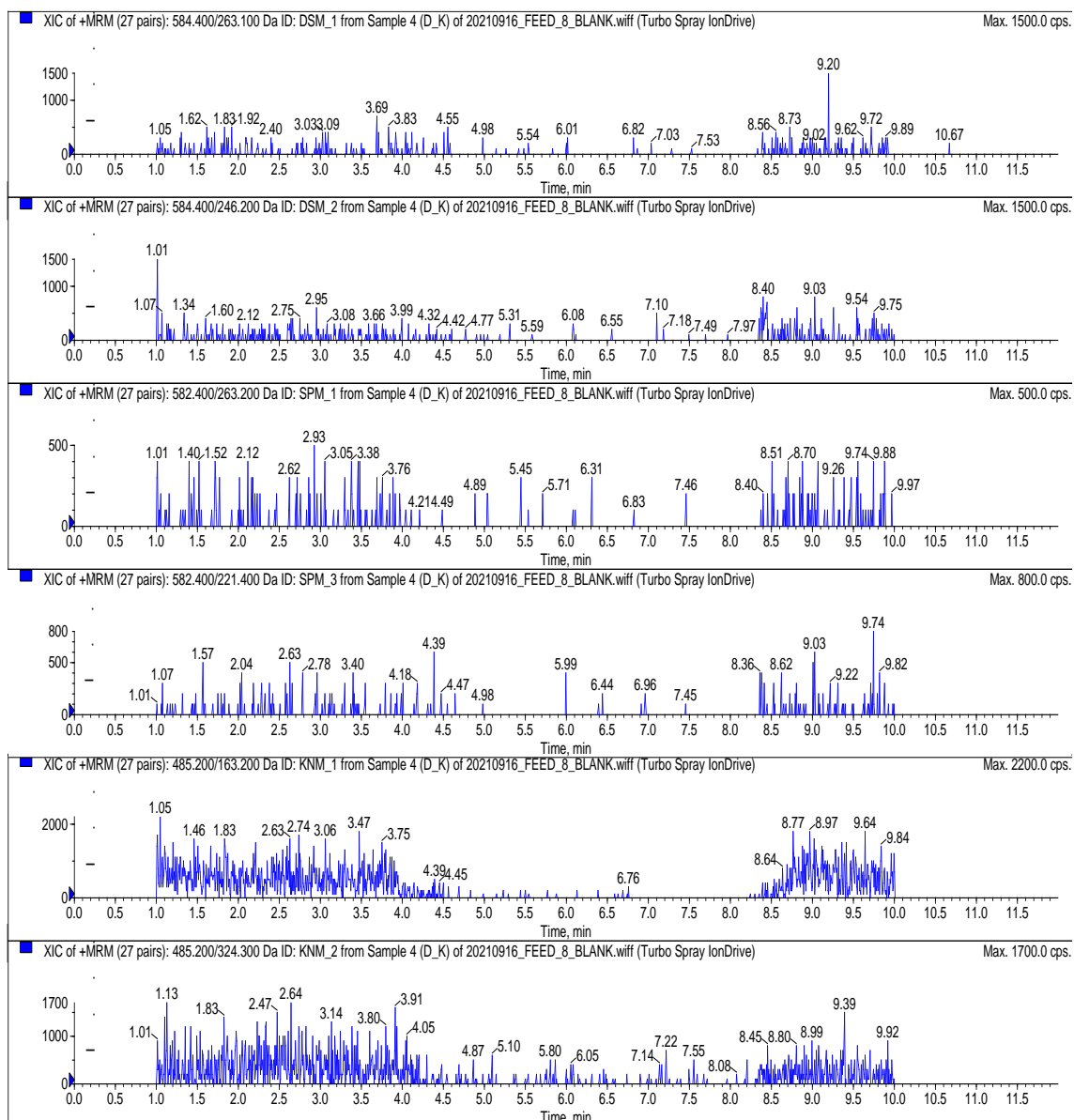


图32. 空白鸡浓缩料特征离子色谱图

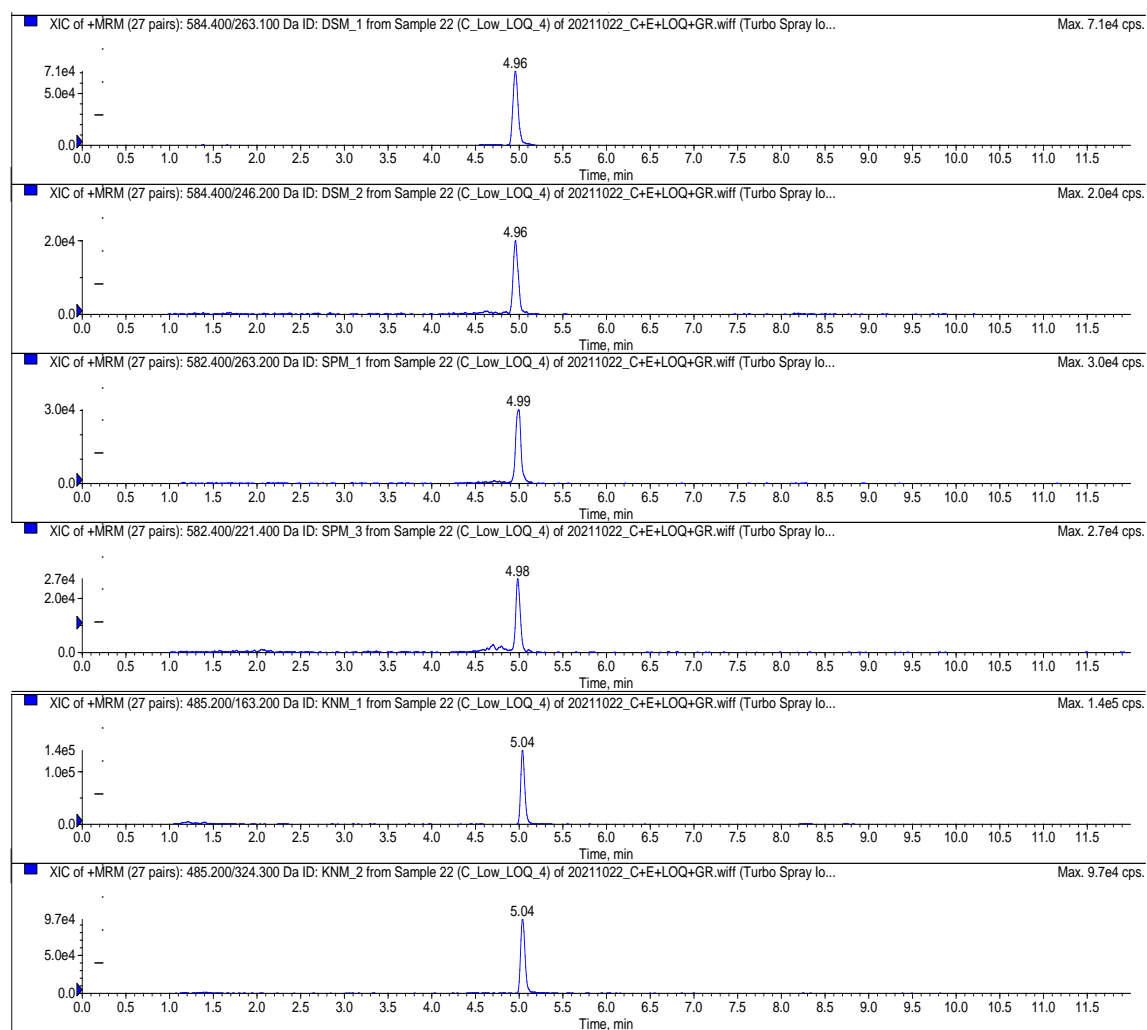


图33. 添加浓度为0.1 mg/kg鸡浓缩料特征离子色谱图

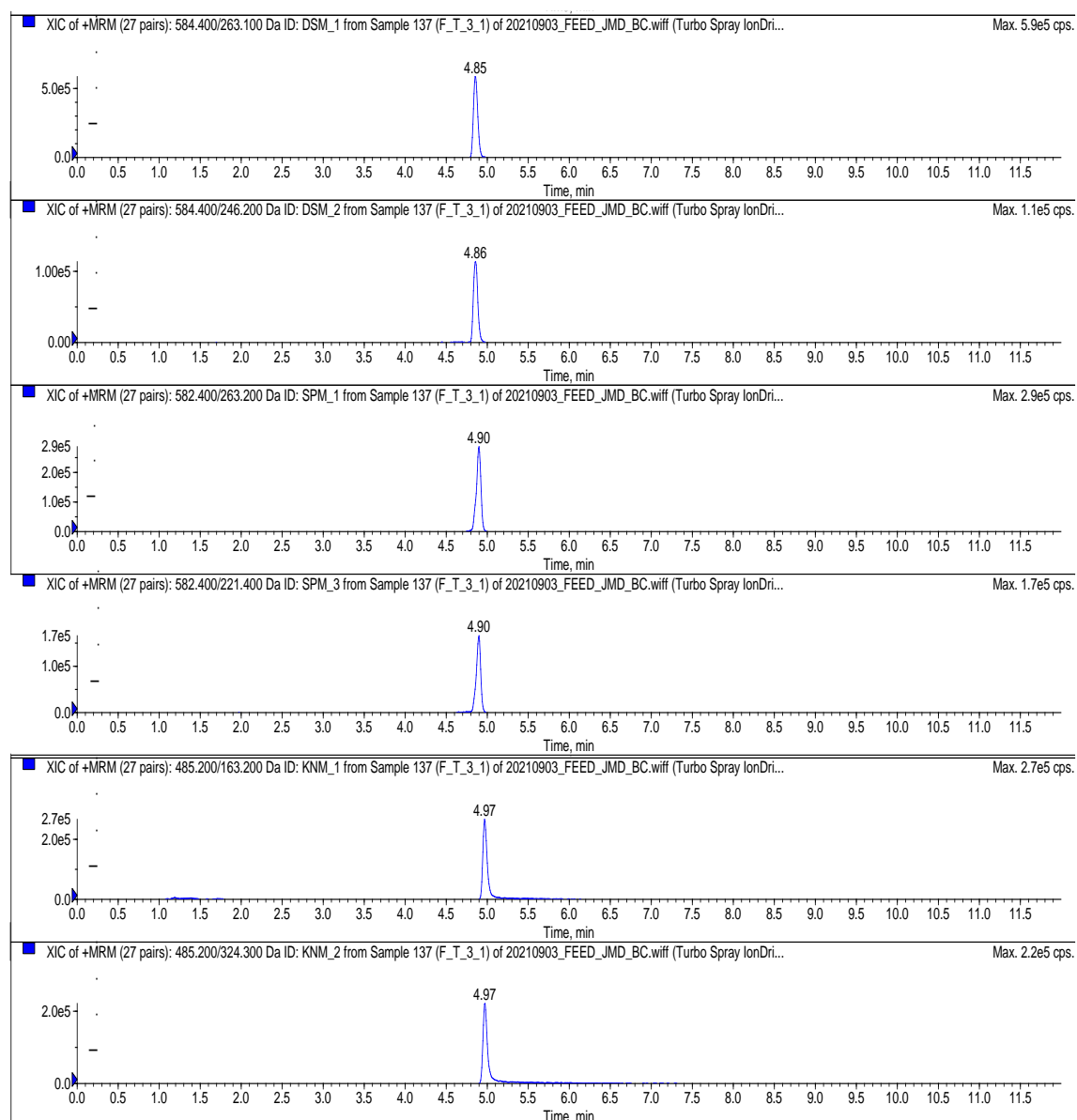


图34. 添加浓度为3 mg/kg鸡浓缩料特征离子色谱图

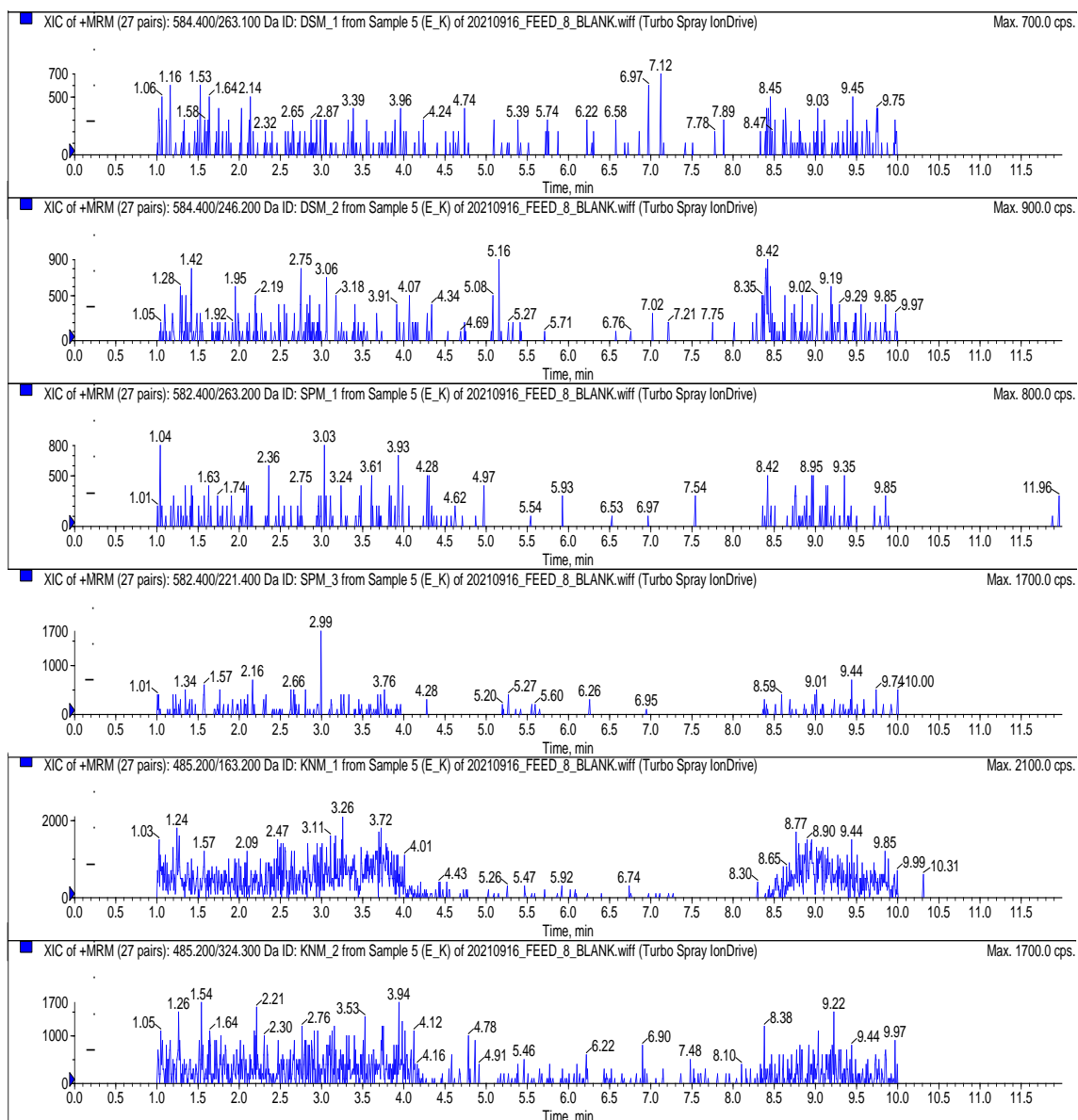


图35. 空白精料补充料特征离子色谱图

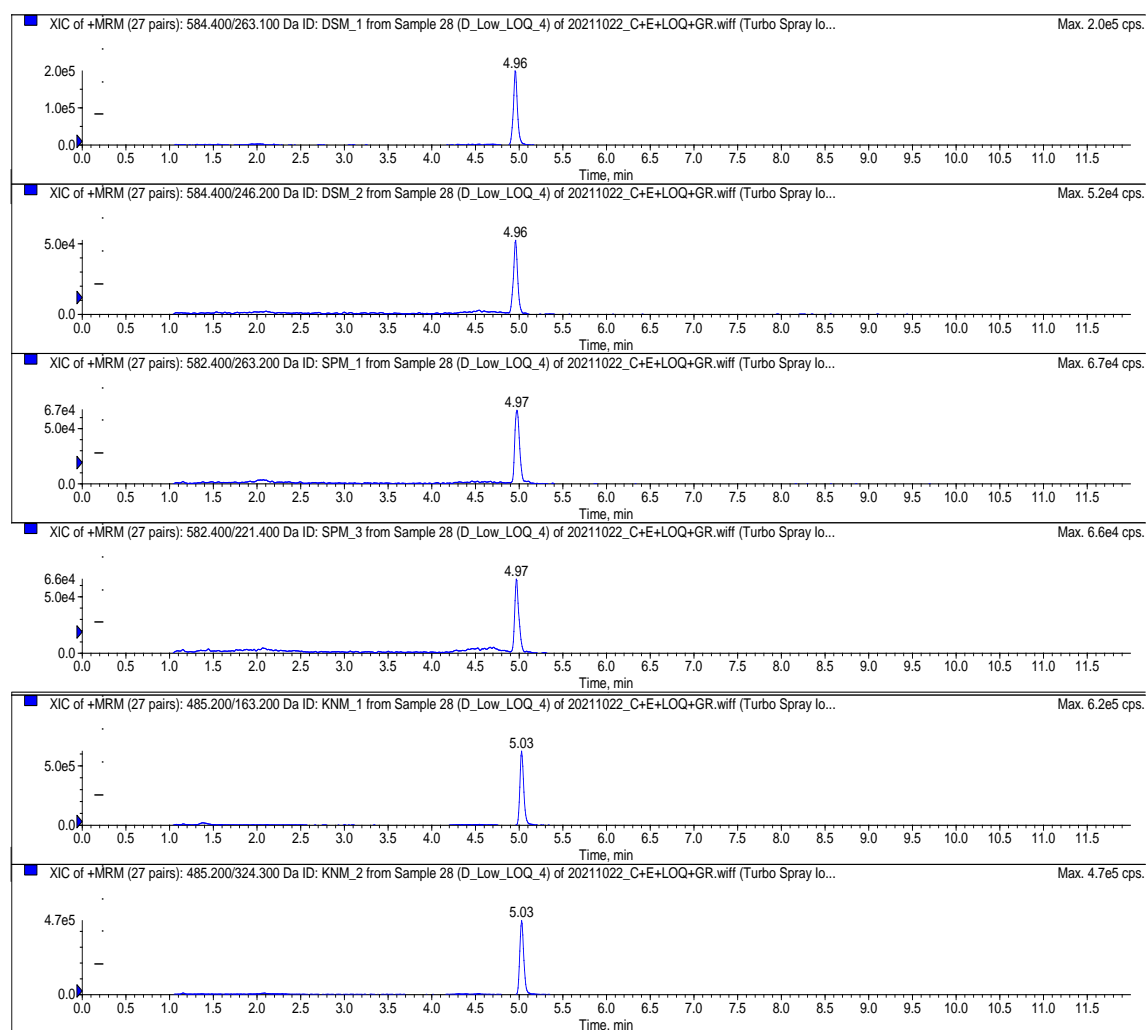


图36. 添加浓度为0.1 mg/kg牛精料补充料特征离子色谱图

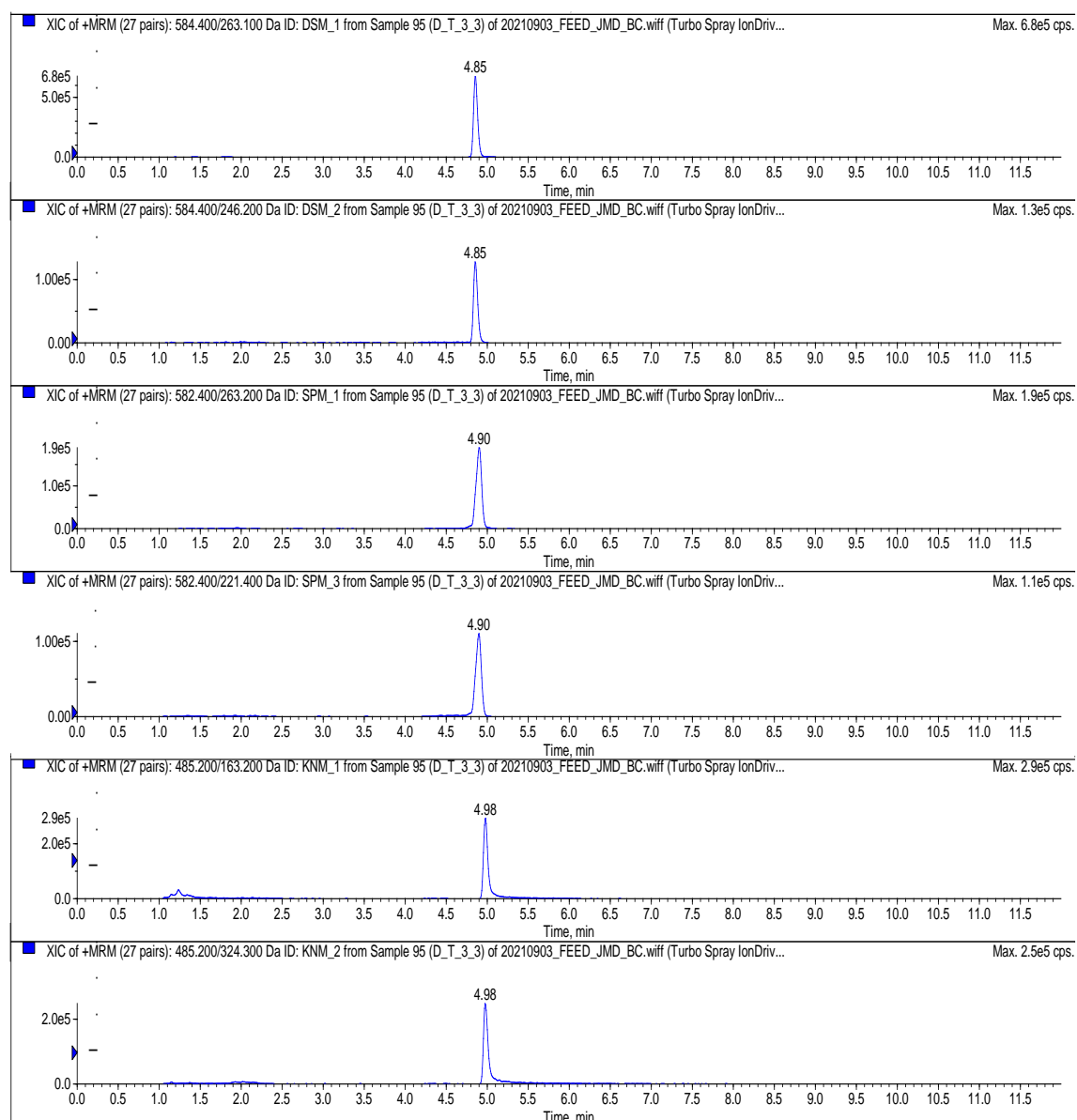


图37. 添加浓度为3 mg/kg牛精料补充料特征离子色谱图

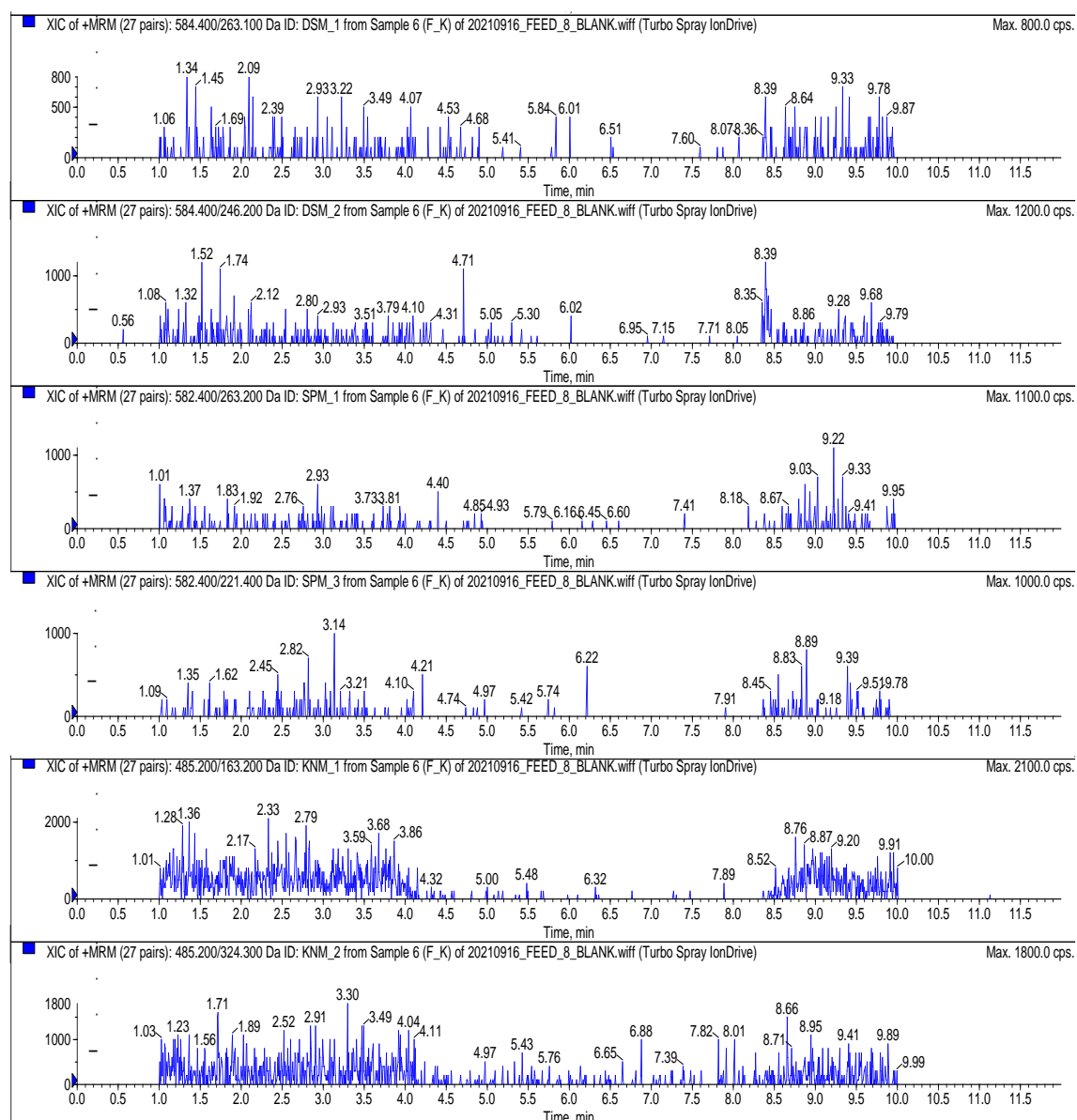


图38. 空白猪预混料特征离子色谱图

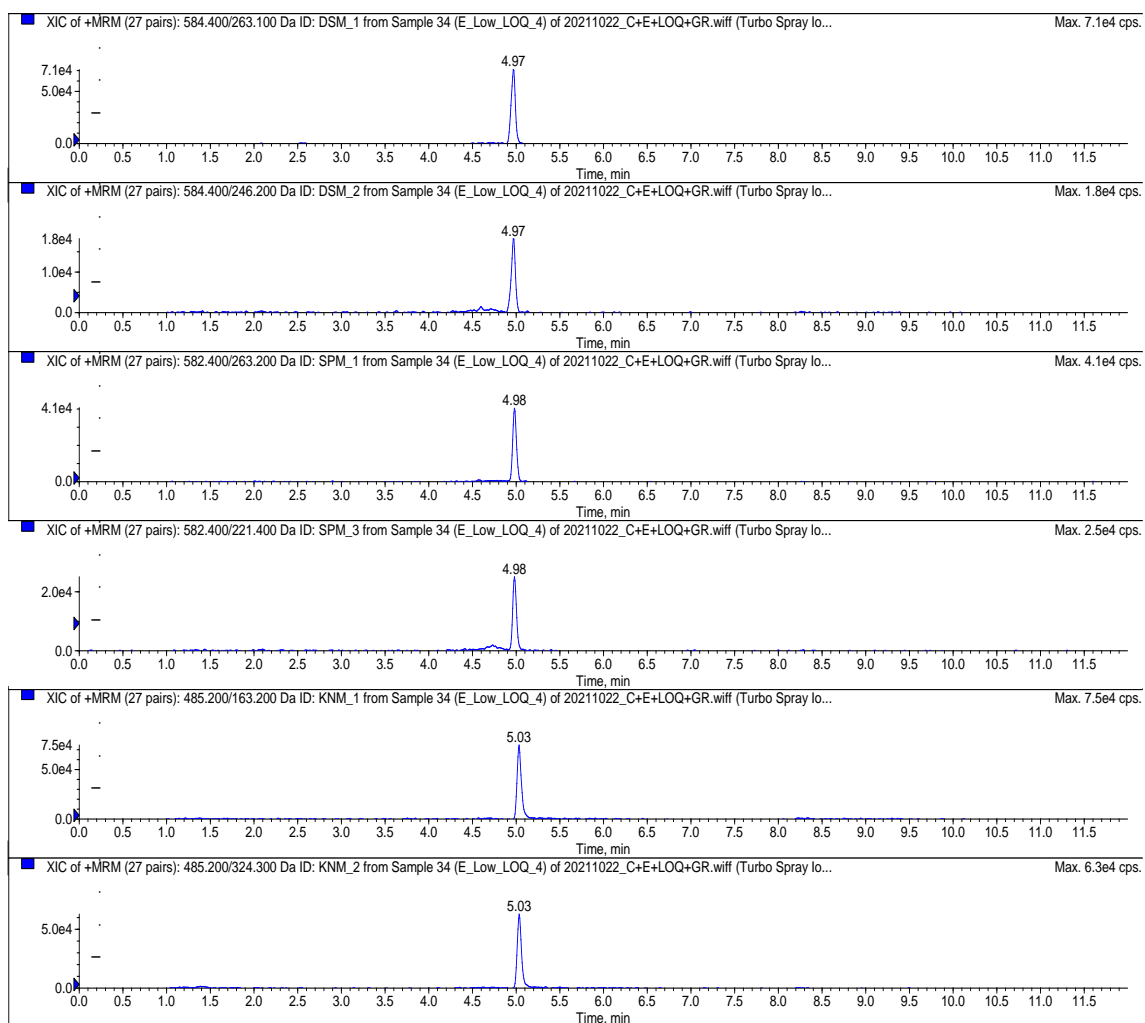


图39. 添加浓度为0.1 mg/kg猪预混料特征离子色谱图



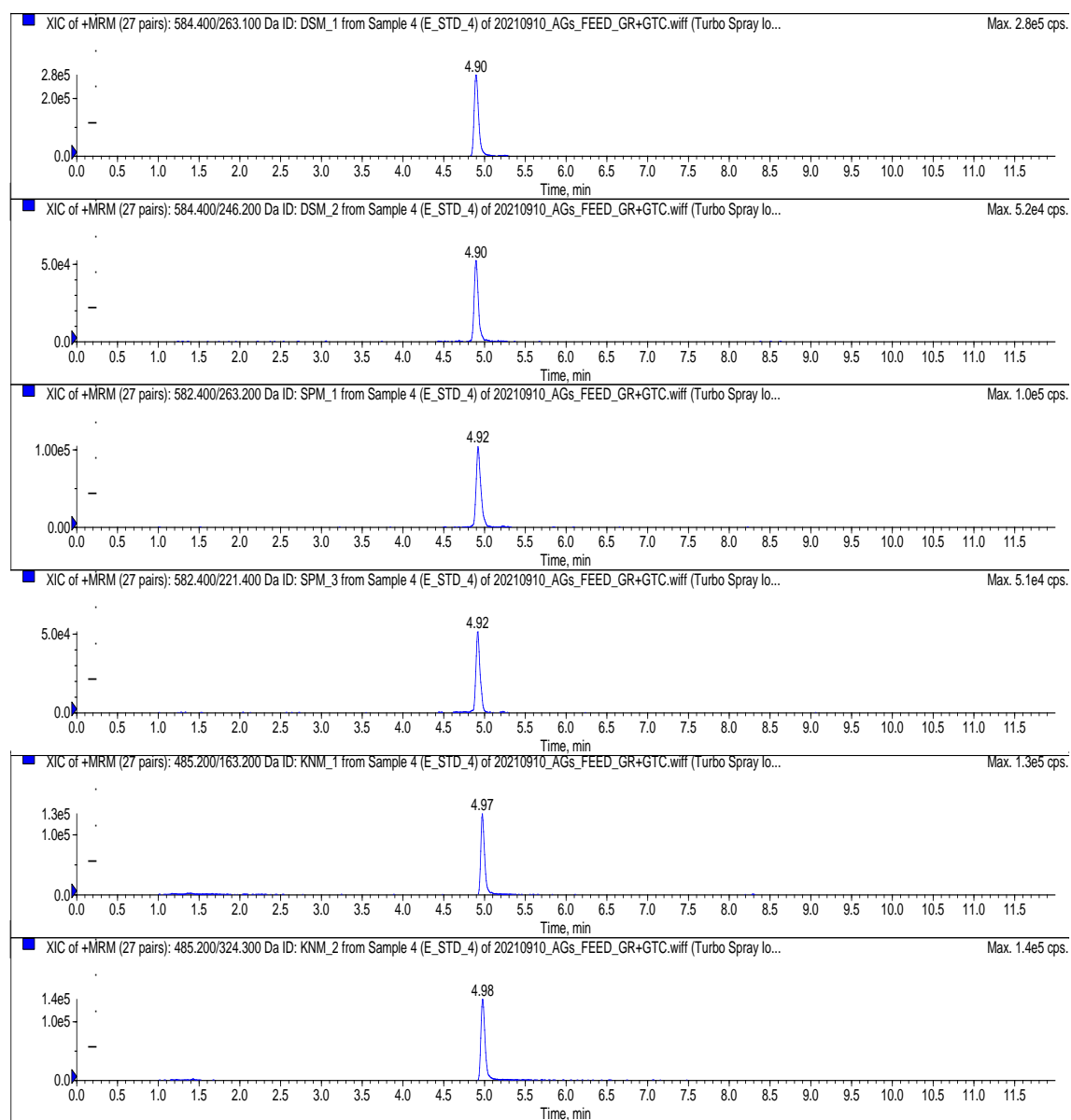


图40. 添加浓度为3 mg/kg猪预混料特征离子色谱图

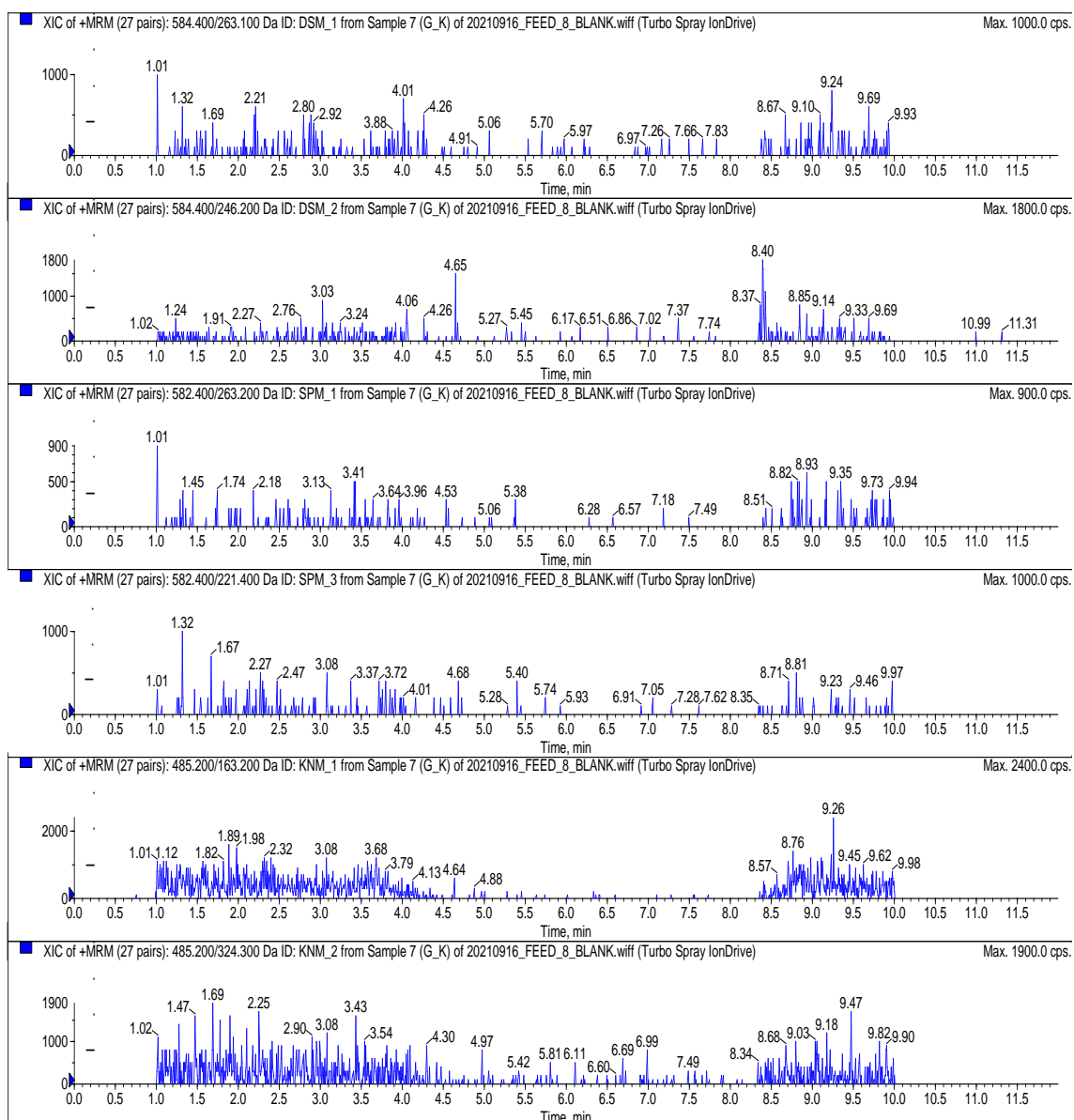


图41. 空白鸡预混料特征离子色谱图

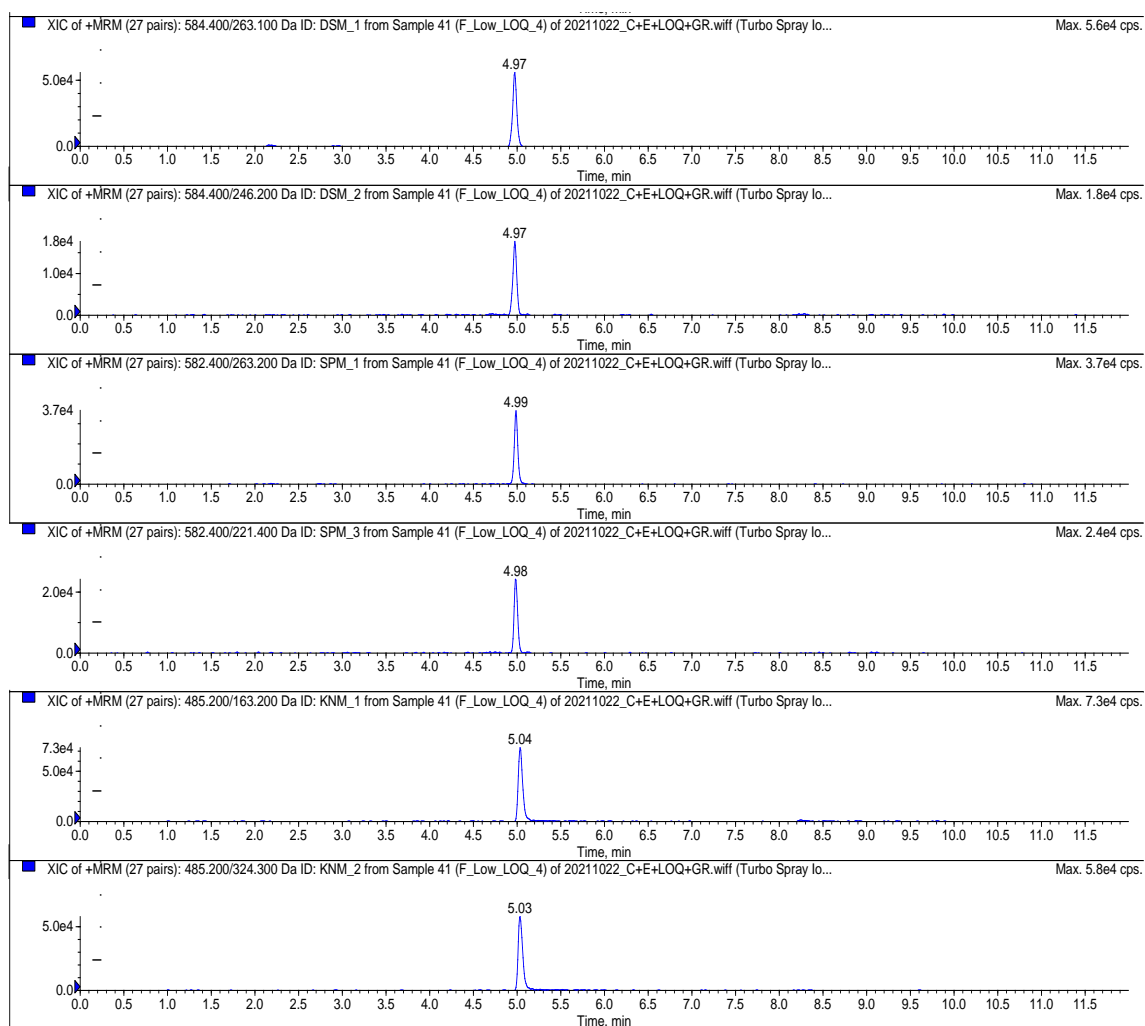


图42. 添加浓度为0.1 mg/kg鸡预混料特征离子色谱图

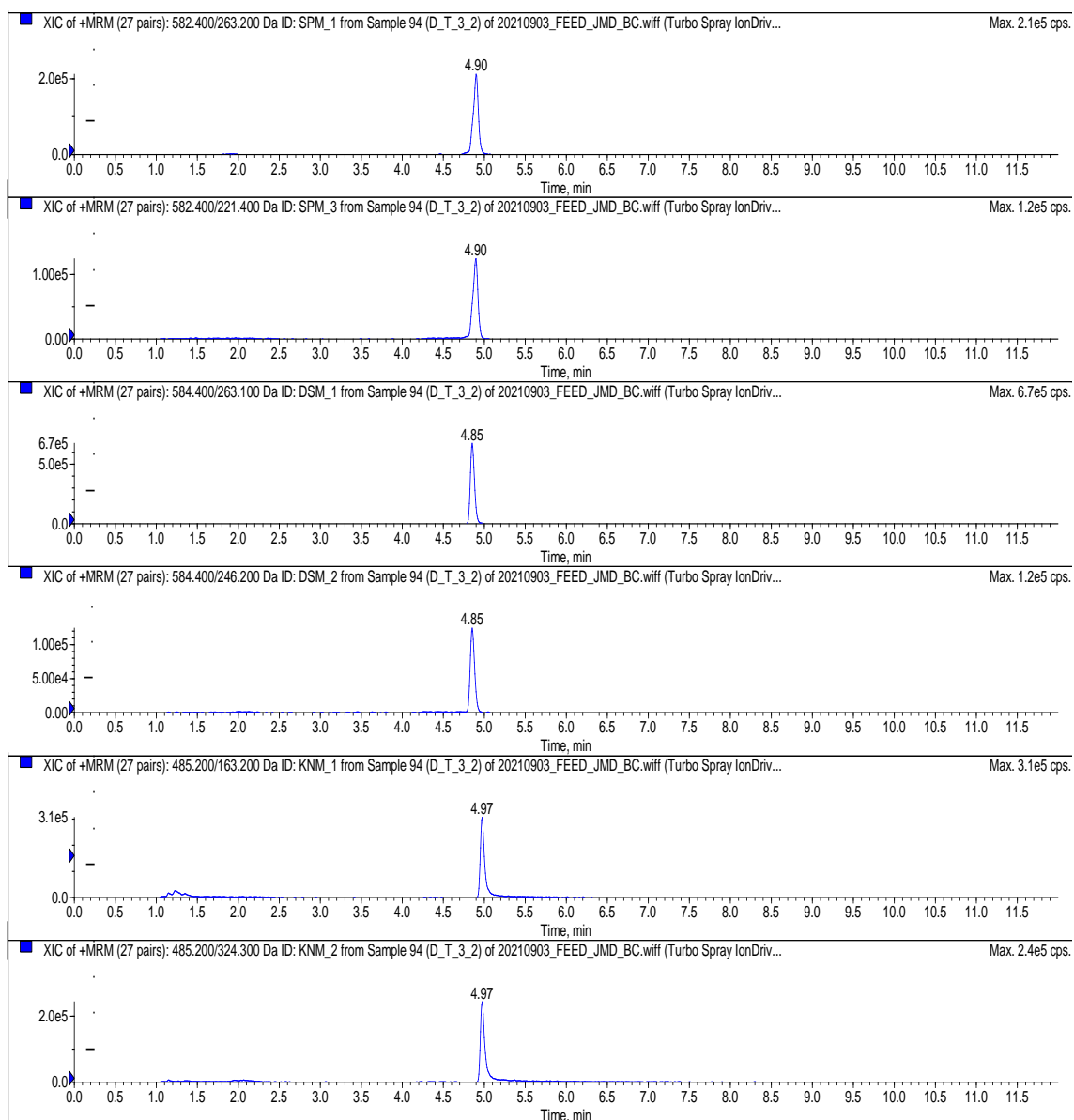


图43. 添加浓度为3 mg/kg鸡预混料特征离子色谱图

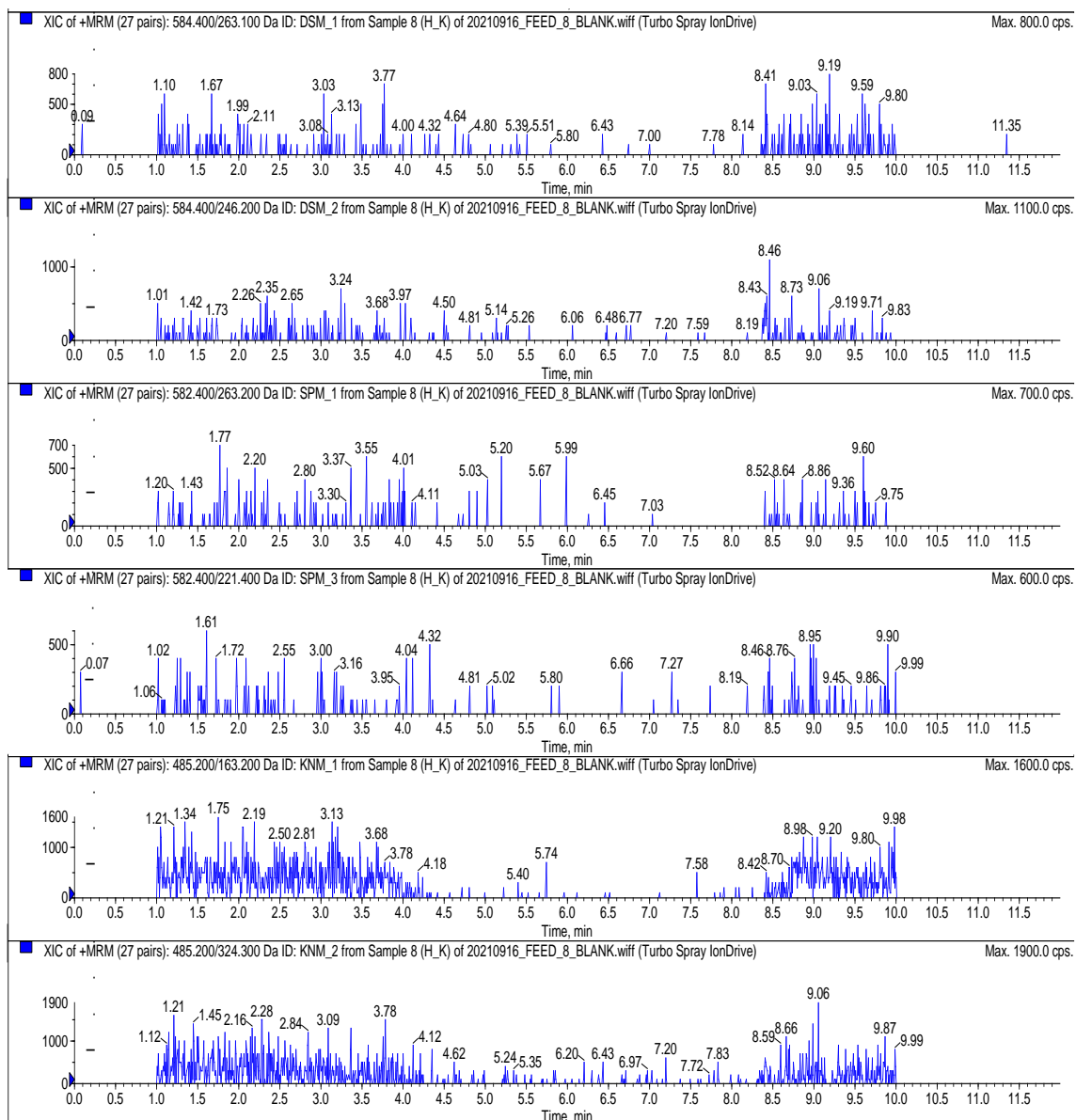


图44. 空白维生素预混料特征离子色谱图

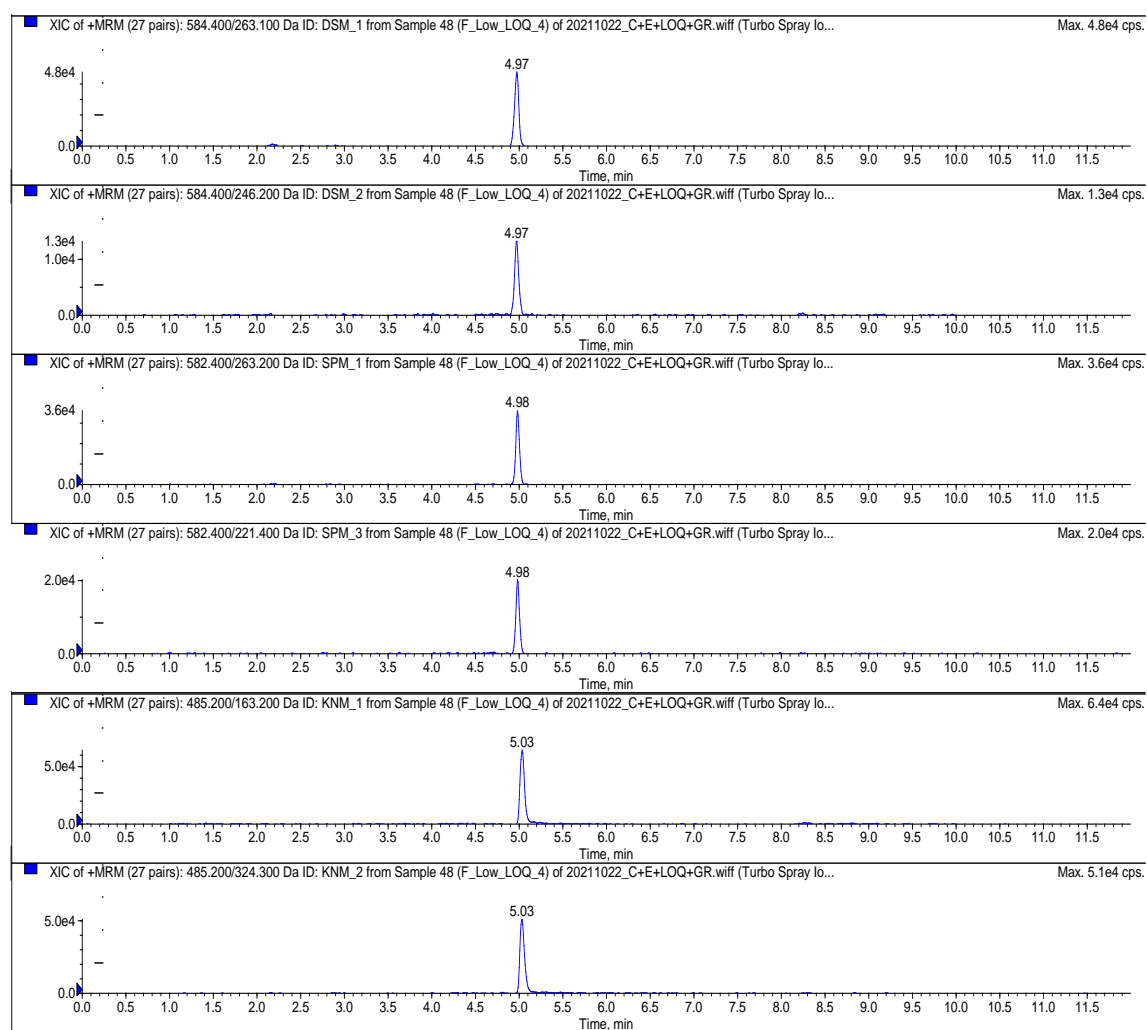


图45. 添加浓度为0.1 mg/kg维生素预混料特征离子色谱图

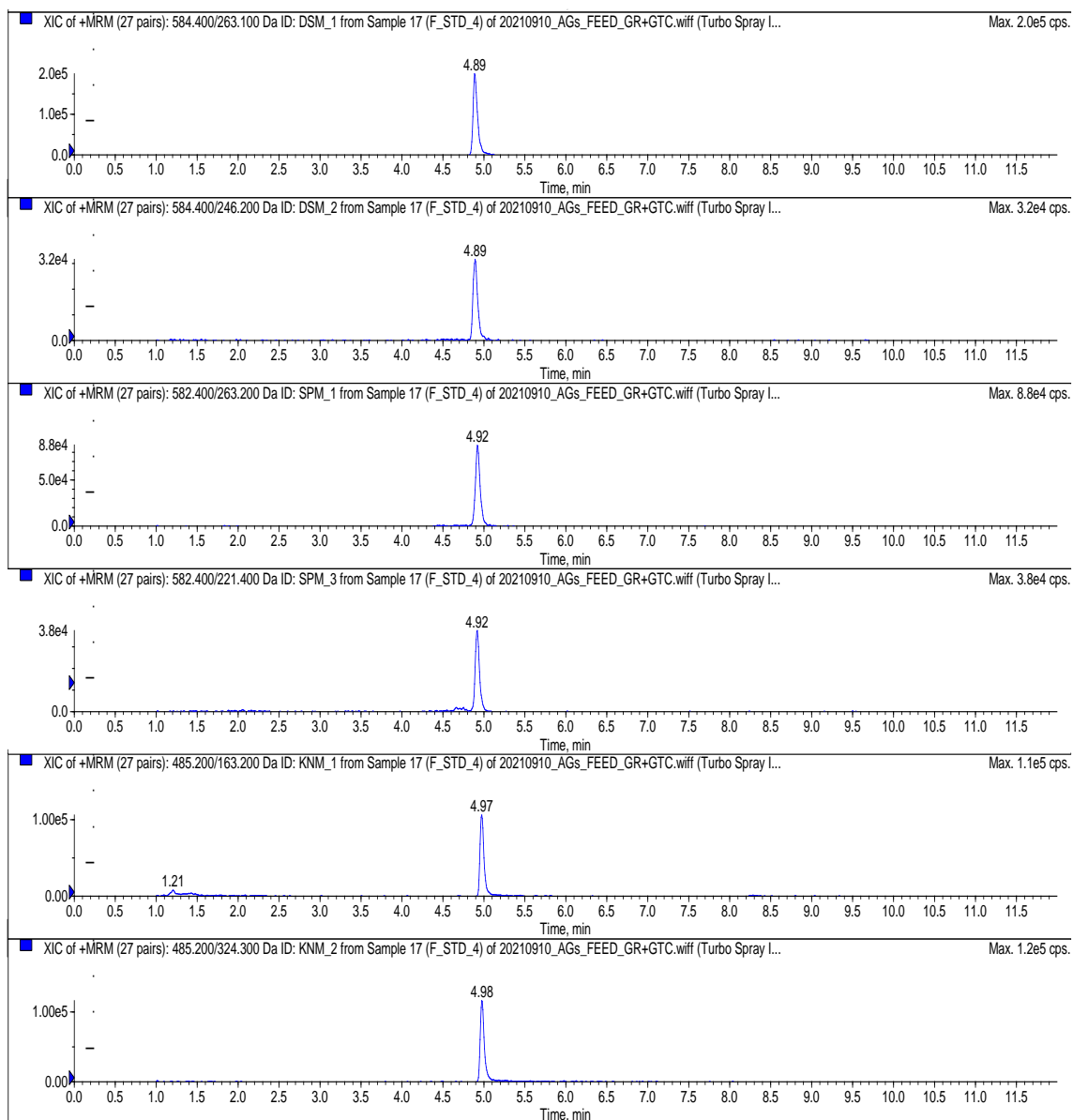


图46. 添加浓度为3 mg/kg维生素预混料特征离子色谱图

表15. 猪配合料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	86.9	74.1	79.8	89.5	87.5	98.0	86.0	9.6	82.1	7.0
		82.7	82.7	78.4	84.4	81.3	83.3	82.1	2.5		
		80.6	77.8	76.2	76.2	79.3	79.4	78.2	2.3		
	0.3	82.4	83.1	76.9	79.6	81.1	70.2	78.9	6.1	79.3	7.1
		78.9	92.7	82.3	76.0	72.6	80.7	80.5	8.6		
		73.8	75.6	74.9	85.5	74.4	86.7	78.5	7.5		
	1.5	83.6	87.9	96.3	87.9	97.9	102.2	92.6	7.8	89.2	10.5
		90.6	104.8	94.2	95.7	86.6	98.2	95.0	6.6		
		70.4	80.3	80.8	87.1	86.9	73.4	79.8	8.5		
	3	74.8	83.7	98.3	92.5	90.2	90.3	88.3	9.2	86.9	12.8
		105.2	98.6	106.9	87.7	94.0	86.3	96.5	9.0		
		79.9	74.6	72.1	74.0	83.9	70.9	75.9	6.6		
	50	97.0	88.3	88.2	94.3	95.5	92.4	92.6	4.0	91.8	4.2
		88.7	86.5	86.3	91.5	95.8	90.4	89.9	4.0		
		95.5	98.9	88.0	94.8	88.5	92.0	93.0	4.6		
	100	94.9	91.4	93.0	90.1	92.2	93.1	92.4	1.8	90.1	4.3
		82.8	87.4	93.7	83.9	92.0	92.4	88.7	5.3		
		90.2	86.7	83.0	92.2	94.5	88.8	89.3	4.6		
链霉素	0.1	72.2	86.4	68.3	71.9	71.0	69.2	73.2	9.1	72.5	7.8
		72.0	79.2	65.8	72.0	69.1	79.7	73.0	7.6		
		76.1	70.7	68.9	65.1	79.8	67.9	71.4	7.7		
	0.3	72.5	83.4	79.1	71.8	84.7	85.4	79.5	7.7	86.2	11.2
		78.8	101.6	95.5	98.4	97.8	97.4	94.9	8.6		
		95.9	87.6	87.2	72.7	81.4	79.8	84.1	9.4		
	1.5	83.1	85.6	78.2	75.2	89.7	94.7	84.4	8.5	86.6	9.6
		89.2	87.3	88.0	76.1	75.5	71.8	81.3	9.4		
		98.3	94.6	92.4	97.5	94.3	86.4	93.9	4.5		
	3	71.6	79.5	79.9	86.8	89.5	87.4	82.4	8.2	80.9	7.6
		88.0	83.8	84.9	72.4	79.0	78.6	81.1	6.9		
		75.4	73.9	71.1	82.2	87.5	85.4	79.3	8.5		
	50	71.6	70.2	75.4	85.2	85.1	87.6	79.2	9.7	79.8	6.6
		81.9	76.4	82.3	75.6	74.5	86.1	79.5	5.8		
		81.7	76.4	82.1	82.2	85.5	77.0	80.8	4.3		
	100	87.6	92.8	86.8	84.4	86.8	87.6	87.7	3.2	86.4	4.3
		84.7	84.6	87.9	93.6	89.1	82.0	87.0	4.7		



		90.5	84.6	87.6	80.0	80.6	84.9	84.7	4.7		
卡那霉素	0.1	79.5	90.6	81.9	100.1	95.7	87.8	89.3	8.9	86.9	7.9
		82.3	86.7	98.7	82.9	83.1	82.6	86.0	7.5		
		83.2	80.9	80.2	82.7	87.8	98.4	85.5	8.0		
	0.3	89.7	80.1	77.4	77.7	80.6	84.6	81.7	5.8	85.6	11.3
		104.9	84.7	104.7	89.6	93.0	97.3	95.7	8.5		
		72.4	83.7	87.7	76.0	83.3	73.4	79.4	8.0		
	1.5	92.3	90.3	78.1	86.6	82.9	74.1	84.1	8.4	83.8	6.5
		90.9	87.1	89.4	83.5	77.3	86.9	85.9	5.7		
		79.8	75.3	82.0	81.4	82.5	87.8	81.5	5.0		
	3	92.2	88.6	73.3	83.6	88.9	82.6	84.9	7.9	82.3	6.2
		82.0	79.3	79.8	78.2	88.5	74.1	80.3	5.9		
		82.5	82.3	76.9	82.1	80.3	85.7	81.6	3.6		
	50	70.7	83.8	73.9	74.6	75.4	83.7	77.0	7.1	78.1	6.3
		75.1	77.7	86.1	78.3	82.1	72.2	78.6	6.3		
		70.3	80.6	74.6	81.6	82.9	81.8	78.6	6.4		
	100	80.8	79.1	82.6	89.7	83.8	90.0	84.3	5.4	84.7	5.0
		82.8	84.1	85.3	75.8	87.0	91.1	84.4	6.0		
		92.7	83.5	83.4	84.7	83.2	85.9	85.6	4.3		

表16. 猪浓缩料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间 RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	96.3	108.0	84.3	97.1	99.9	88.5	95.7	8.8	92.6	6.1
		94.2	92.9	85.1	89.0	93.9	88.2	90.6	4.1		
		88.7	90.4	91.6	95.5	93.3	89.9	91.6	2.7		
	0.3	87.3	103.7	88.5	90.9	89.2	91.2	91.8	6.5	81.2	11.2
		69.9	71.3	84.4	73.2	73.4	79.1	75.2	7.3		
		79.2	80.3	79.5	76.4	71.7	72.9	76.7	4.8		
	1.5	100.2	89.2	99.0	89.7	92.1	95.8	94.3	5.0	82.2	11.9
		85.7	75.4	76.1	73.4	72.2	72.3	75.8	6.7		
		73.0	83.6	75.2	74.1	77.9	75.1	76.5	5.0		
	3	109.4	94.1	89.4	85.3	85.0	96.1	93.2	9.8	82.3	12.4
		88.5	79.1	73.6	71.2	79.1	75.6	77.8	7.8		
		77.2	80.7	74.2	72.3	80.5	70.4	75.9	5.6		
	250	104.2	88.1	98.5	87.5	88.4	91.2	93.0	7.4	94.1	5.6
		93.2	99.1	88.6	98.7	88.4	96.2	94.0	5.1		
		89.6	99.3	99.1	89.4	96.0	97.7	95.2	4.8		
链霉素	0.1	105.0	105.2	84.0	96.6	101.3	90.8	97.1	8.7	93.5	7.4
		86.2	86.0	99.7	92.5	97.8	91.0	92.2	6.2		
		82.6	99.2	88.7	95.9	90.5	90.5	91.2	6.3		
	0.3	90.6	73.3	84.5	72.1	80.8	82.6	80.7	8.7	78.2	7.3
		73.3	72.1	74.4	73.9	83.4	71.7	74.8	5.8		
		73.9	80.6	79.9	73.0	82.9	83.8	79.0	5.8		
	1.5	82.1	85.4	88.0	95.4	95.9	99.0	91.0	7.4	91.5	5.1
		91.3	86.5	94.2	98.3	87.0	89.7	91.2	5.0		
		91.6	91.6	95.4	93.3	93.9	88.1	92.3	2.7		
	3	95.5	86.5	96.8	86.3	91.5	95.2	92.0	5.1	92.4	5.7
		86.7	79.7	96.2	96.2	95.2	88.1	90.3	7.4		
		94.9	95.3	90.4	98.4	99.8	91.2	95.0	3.9		
	250	89.3	79.4	79.8	76.7	73.4	78.1	79.4	6.7	79.2	6.5
		85.2	88.4	73.4	77.8	81.6	70.8	79.5	8.6		
		75.6	73.8	82.6	83.7	79.2	76.8	78.6	5.0		
卡那霉素	0.1	82.6	84.0	75.2	73.5	79.1	68.2	77.1	7.7	79.4	7.6
		89.3	84.0	82.7	76.4	79.9	80.0	82.1	5.3		
		71.8	78.7	80.3	70.6	84.1	89.7	79.2	9.2		
	0.3	68.0	76.2	82.8	80.3	77.6	75.8	76.8	6.6	76.2	6.6
		71.3	63.4	76.0	80.4	77.0	82.6	75.1	9.2		
		73.9	74.4	80.9	79.3	73.0	78.7	76.7	4.3		

	1.5	78.9	72.3	84.4	82.7	78.2	80.0	79.4	5.3	76.0	5.9
		73.2	71.1	71.5	70.1	77.1	72.5	72.6	3.4		
		76.8	71.2	81.7	78.8	76.6	71.4	76.1	5.4		
	3	70.7	83.4	77.1	75.2	77.7	76.4	76.7	5.4	75.4	5.5
		74.3	70.3	75.0	83.4	73.9	73.4	75.1	5.9		
		70.5	71.0	76.7	76.8	80.8	70.4	74.4	5.9		
	250	78.1	76.3	79.0	74.3	70.4	76.4	75.7	4.1	76.4	4.4
		76.1	75.8	80.1	83.7	71.3	73.9	76.8	5.8		
		76.5	77.3	82.1	72.8	76.3	75.6	76.8	3.9		

表17. 鸡配合料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	100.1	104.1	104.6	98.3	96.7	84.4	98.0	7.5	94.2	5.6
		95.8	94.5	92.2	89.3	91.4	87.0	91.7	3.5		
		92.9	94.9	93.6	90.5	94.2	91.3	92.9	1.8		
	0.3	97.6	109.0	96.1	92.2	93.6	92.2	96.8	6.6	99.5	6.2
		103.5	105.2	101.6	106.2	91.7	100.3	101.4	5.2		
		107.6	93.5	94.0	101.5	96.1	109.6	100.4	7.0		
	1.5	103.8	86.4	89.1	91.9	96.0	93.0	93.4	6.5	96.5	6.3
		99.1	96.4	103.0	90.1	104.6	93.5	97.8	5.7		
		95.2	92.0	90.5	104.1	103.0	104.8	98.3	6.6		
	3	82.9	85.2	99.7	85.1	97.5	91.4	90.3	7.8	96.5	8.2
		91.5	94.3	99.1	92.8	93.3	107.5	96.4	6.3		
		95.1	108.9	101.6	107.5	106.0	97.7	102.8	5.4		
	50	87.7	94.6	101.3	82.6	92.7	83.3	90.4	8.0	96.5	7.8
		103.4	107.0	101.8	97.9	97.2	108.9	102.7	4.6		
		91.9	97.2	93.0	101.0	104.1	90.6	96.3	5.6		
	100	93.7	83.7	89.4	98.5	87.8	99.4	92.1	6.7	91.7	5.3
		90.5	97.8	90.7	91.3	88.1	92.3	91.8	3.5		
		86.6	93.8	85.9	94.9	99.1	87.0	91.2	6.0		
链霉素	0.1	81.5	76.6	83.5	75.0	78.1	78.1	78.8	4.0	80.7	4.6
		77.2	87.7	77.4	82.8	81.8	80.1	81.2	4.8		
		87.0	82.2	86.2	78.5	79.0	79.3	82.1	4.6		
	0.3	81.1	71.7	80.7	70.7	74.7	80.8	76.6	6.3	88.0	13.3
		106.0	97.4	103.6	93.9	95.7	106.6	100.5	5.5		
		94.7	85.4	81.1	80.3	99.5	80.1	86.8	9.6		
	1.5	75.9	72.7	76.6	83.5	77.0	75.6	76.9	4.6	82.0	8.5
		94.2	86.3	96.4	88.2	84.6	87.8	89.6	5.2		
		80.3	82.5	80.2	86.0	71.9	76.6	79.6	6.1		
	3	70.9	70.9	71.3	79.7	74.2	83.7	75.1	7.2	83.5	10.4
		92.6	94.4	86.7	89.9	97.6	89.9	91.8	4.2		
		90.0	72.3	86.9	79.9	89.0	83.3	83.6	8.0		
	50	81.4	88.9	90.4	80.6	83.2	83.9	84.7	4.7	87.4	5.9
		95.2	92.7	88.4	81.9	90.7	93.3	90.4	5.3		
		88.3	88.4	80.0	97.1	83.5	85.9	87.2	6.6		
	100	93.6	82.2	91.6	83.1	90.6	87.1	88.0	5.3	88.6	5.3
		87.5	92.5	80.7	90.5	90.5	85.1	87.8	4.9		
		84.8	94.7	81.9	93.2	89.3	95.2	89.9	6.1		

卡那霉素	0.1	77.4	80.8	75.5	64.1	83.4	83.4	77.4	9.4	82.8	8.2
		89.6	75.3	86.1	89.3	89.3	84.6	85.7	6.4		
		75.8	88.3	86.6	88.9	85.8	86.7	85.3	5.6		
	0.3	90.0	103.1	91.8	94.2	89.9	88.6	92.9	5.8	86.2	8.5
		79.4	79.6	77.2	71.5	84.0	84.7	79.4	6.1		
		86.2	80.2	82.5	90.1	92.8	86.5	86.4	5.4		
	1.5	83.1	95.1	98.0	97.9	89.7	96.0	93.3	6.3	84.2	10.4
		73.7	71.1	73.3	82.5	80.4	77.9	76.5	5.9		
		88.0	75.0	77.1	89.0	83.7	83.7	82.7	6.8		
	3	73.0	71.1	83.4	72.5	73.4	81.5	75.8	6.9	91.7	13.6
		92.2	105.1	99.3	98.6	104.7	99.2	99.8	4.7		
		98.0	106.4	103.8	99.1	94.7	94.8	99.4	4.8		
	50	70.5	86.4	85.9	86.4	77.3	84.5	81.8	8.0	82.1	6.6
		84.2	81.8	89.8	86.1	85.4	80.7	84.7	3.8		
		75.3	80.5	89.9	76.4	82.6	75.0	80.0	7.2		
	100	97.5	86.2	86.3	88.1	77.8	81.6	86.3	7.8	86.3	6.2
		84.9	86.7	86.8	93.7	86.6	85.8	87.4	3.6		
		93.8	92.6	81.5	81.0	80.7	80.8	85.1	7.4		

表18. 鸡浓缩料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间 RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	98.2	96.3	93.2	81.0	97.3	99.2	94.2	7.2	92.4	6.7
		87.0	81.2	99.1	86.2	97.1	84.5	89.2	8.1		
		96.4	88.4	98.9	94.8	90.4	94.0	93.8	4.1		
	0.3	86.8	88.8	87.0	87.5	90.3	96.3	89.4	4.0	93.0	8.6
		82.2	91.7	85.4	97.0	99.5	80.0	89.3	9.0		
		98.4	96.6	107.3	100.0	108.6	91.1	100.3	6.6		
	1.5	81.7	82.2	80.0	97.2	81.1	82.5	84.1	7.7	92.6	10.2
		94.3	81.5	88.3	97.5	90.6	91.6	90.7	6.0		
		106.5	101.3	101.1	101.7	99.4	107.7	102.9	3.2		
	3	103.0	97.9	99.8	96.0	82.6	97.6	96.1	7.3	98.8	5.8
		98.4	95.9	104.4	94.2	103.6	106.7	100.6	5.0		
		90.3	100.3	101.7	102.8	99.7	103.8	99.8	4.9		
	250	87.7	94.6	101.3	96.6	92.2	94.8	94.5	4.8	95.1	6.9
		91.4	93.6	89.5	94.4	82.6	94.3	90.9	5.0		
		91.9	90.7	97.2	104.8	108.1	106.6	99.9	7.6		
链霉素	0.1	87.8	86.4	99.1	96.2	96.4	86.5	92.1	6.3	90.3	6.8
		92.4	96.8	80.9	91.9	96.8	99.0	93.0	7.0		
		85.5	81.8	90.0	80.6	86.9	90.5	85.9	4.8		
	0.3	78.6	83.0	84.2	82.2	86.0	81.7	82.6	3.1	84.3	9.1
		89.4	79.4	70.5	73.2	83.3	77.5	78.9	8.7		
		83.0	89.1	95.8	99.7	96.7	83.9	91.4	7.7		
	1.5	75.0	75.0	76.6	74.9	89.7	83.7	79.1	7.8	82.6	8.7
		78.9	75.7	85.6	74.4	86.4	80.2	80.2	6.2		
		89.3	84.7	80.7	98.7	82.8	95.0	88.5	8.1		
	3	92.5	90.1	86.2	101.9	95.5	99.5	94.3	6.2	96.7	5.8
		96.5	98.5	98.9	95.8	88.3	91.2	94.9	4.5		
		102.6	107.5	94.5	102.2	101.5	97.1	100.9	4.5		
	250	81.4	88.9	90.4	89.0	87.8	93.3	88.5	4.5	93.9	6.7
		91.2	99.5	96.2	84.1	94.8	96.0	93.6	5.7		
		98.4	104.8	101.5	96.1	102.5	93.9	99.5	4.2		
卡那霉素	0.1	85.4	80.5	79.2	84.4	72.9	85.8	81.4	6.1	80.7	8.1
		79.1	71.1	76.5	70.3	84.1	73.2	75.7	7.0		
		88.8	88.6	72.1	85.7	88.6	85.6	84.9	7.6		
	0.3	65.3	64.4	69.5	62.3	73.4	73.6	68.1	7.1	73.0	11.0
		65.0	65.3	68.0	64.1	78.0	70.7	68.5	7.7		
		84.6	81.1	81.3	80.5	79.5	87.4	82.4	3.6		
	1.5	78.0	79.9	70.1	73.6	74.0	77.5	75.5	4.8	77.2	6.6

		79.2	70.5	79.7	70.4	79.8	75.8	75.9	5.9		
		83.8	86.6	71.2	82.7	83.2	72.9	80.1	8.0		
	3	80.7	75.9	80.9	86.8	85.2	94.5	84.0	7.6	82.7	6.9
		82.5	83.6	70.3	82.2	71.8	85.7	79.4	8.2		
		87.5	87.2	86.6	81.6	82.2	82.5	84.6	3.3		
	250	70.5	86.4	85.9	74.5	72.4	83.1	78.8	9.1	83.4	10.7
		89.8	73.7	74.6	79.3	86.4	76.3	80.0	8.3		
		96.4	85.9	100.0	82.1	85.7	98.2	91.4	8.4		

表19. 牛精料补充料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间 RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	85.6	83.4	85.0	77.7	91.2	89.6	85.4	5.6	79.9	7.8
		70.4	73.2	76.9	81.0	79.2	77.3	76.3	5.1		
		80.7	70.8	85.1	70.3	81.4	79.1	77.9	7.8		
	0.3	73.9	87.0	89.9	96.6	90.6	96.9	89.1	9.5	91.3	6.8
		101.8	91.7	96.1	91.1	85.5	94.0	93.3	5.9		
		93.3	86.8	89.7	95.5	86.7	97.3	91.6	4.9		
	1.5	85.2	86.8	91.9	88.8	95.8	86.6	89.2	4.5	90.1	4.7
		95.3	87.2	86.7	86.3	96.3	97.4	91.5	5.8		
		93.9	87.5	86.2	86.9	89.1	94.9	89.7	4.1		
	3	82.8	88.2	92.6	94.0	89.8	98.6	91.0	5.9	92.4	5.4
		86.7	95.9	91.9	88.0	98.5	86.4	91.2	5.6		
		93.3	97.7	98.1	89.6	90.6	99.7	94.8	4.5		
	250	97.5	93.6	97.3	92.8	90.7	94.2	94.4	2.8	86.0	8.3
		89.6	80.8	80.6	82.8	83.9	78.7	82.7	4.6		
		85.6	73.3	76.9	81.6	83.7	84.4	80.9	6.0		
链霉素	0.1	70.6	72.3	65.7	74.1	72.5	74.0	71.5	4.4	69.8	4.5
		70.5	66.4	67.7	72.5	73.7	69.4	70.0	4.0		
		66.0	65.9	73.0	65.9	67.0	70.0	68.0	4.3		
	0.3	83.9	76.8	74.1	84.6	78.4	83.0	80.1	5.4	84.6	7.6
		89.7	91.5	84.6	82.9	71.9	81.2	83.6	8.4		
		86.0	87.0	92.7	90.9	94.3	89.6	90.1	3.6		
	1.5	85.1	87.9	81.6	78.4	70.8	73.0	79.5	8.5	79.2	6.7
		86.9	76.4	85.0	82.1	78.1	72.1	80.1	7.0		
		81.2	78.2	78.3	70.2	81.0	80.0	78.1	5.3		
	3	84.7	77.4	81.2	83.4	81.6	83.0	81.9	3.1	80.2	6.9
		73.2	87.7	78.0	77.0	80.8	71.2	78.0	7.5		
		90.9	81.2	84.6	73.6	83.0	71.0	80.7	9.1		
	250	86.7	82.4	74.1	84.7	75.7	71.9	79.2	7.7	77.6	6.3
		77.9	77.9	74.7	80.4	70.3	84.5	77.6	6.2		
		76.9	76.9	78.0	80.7	72.5	70.8	76.0	4.8		
卡那霉素	0.1	67.4	70.7	73.8	72.6	66.1	73.6	70.7	4.7	70.2	4.2
		65.9	68.9	71.0	67.8	72.2	71.6	69.6	3.5		
		69.0	66.9	74.4	74.9	68.1	69.2	70.4	4.8		
	0.3	91.5	99.7	98.9	86.2	98.9	91.8	94.5	5.8	94.7	5.0
		100.6	84.2	98.2	97.7	92.8	94.4	94.6	6.2		
		92.2	98.2	91.1	98.2	93.1	97.1	95.0	3.4		
	1.5	84.4	95.6	86.6	97.8	95.1	89.2	91.4	6.0	89.6	7.9



		75.2	74.0	86.1	89.7	83.8	93.4	83.7	9.3		
		96.0	95.1	92.4	94.5	86.0	97.6	93.6	4.4		
	3	94.9	87.4	87.2	88.6	87.8	93.5	89.9	3.8	91.9	5.2
		80.3	89.9	96.8	96.4	92.9	91.4	91.3	6.6		
		89.9	89.1	98.4	94.0	99.2	95.7	94.4	4.5		
	250	91.5	80.3	98.0	93.7	97.4	87.3	91.4	7.3	89.1	7.6
		86.5	80.3	93.2	85.1	85.5	99.4	88.3	7.7		
		80.6	78.1	88.2	95.6	96.3	86.5	87.5	8.6		

表20. 猪复合预混料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	107.2	107.6	102.6	97.8	104.3	101.6	103.5	3.6	95.8	7.9
		86.2	90.7	97.5	93.6	84.5	89.9	90.4	5.3		
		96.7	96.7	96.7	99.9	91.1	80.6	93.6	7.5		
	0.3	89.1	108.2	86.2	88.9	91.0	99.2	93.8	8.9	94.3	7.6
		85.4	107.6	96.4	85.2	98.4	99.5	95.4	9.1		
		99.7	95.7	85.1	91.6	94.2	96.4	93.8	5.3		
	1.5	96.5	102.8	96.5	86.5	86.7	95.1	94.0	6.7	95.5	6.8
		104.0	108.2	98.1	96.7	99.3	85.4	98.6	7.9		
		99.5	92.6	98.0	96.4	87.8	88.8	93.9	5.2		
	3	89.0	91.3	86.3	98.6	89.6	95.7	91.7	5.0	93.9	5.1
		97.2	100.9	97.2	99.8	88.8	98.6	97.1	4.4		
		97.4	85.2	91.8	91.4	94.6	96.2	92.8	4.7		
	250	101.3	93.8	90.4	95.9	93.4	98.7	95.6	4.1	94.2	4.4
		98.7	86.7	89.0	88.8	94.6	98.5	92.7	5.7		
		95.4	96.7	90.7	98.3	91.1	93.9	94.4	3.2		
	2500	99.2	91.3	96.8	89.7	97.1	86.9	93.5	5.2	93.5	6.8
		107.3	95.1	93.3	99.9	92.1	88.1	96.0	7.0		
		87.5	78.1	93.7	93.5	96.1	97.9	91.1	8.0		
链霉素	0.1	104.1	90.2	96.8	93.0	89.6	100.8	95.7	6.1	92.5	6.8
		95.2	93.2	85.9	91.5	80.4	92.9	89.9	6.2		
		95.8	99.2	80.3	93.7	86.8	95.4	91.9	7.6		
	0.3	94.1	77.9	91.2	95.4	91.4	89.0	89.8	7.0	91.5	5.6
		88.0	90.4	96.5	92.7	88.3	87.5	90.6	3.8		
		87.7	91.2	98.4	97.3	90.6	99.4	94.1	5.2		
	1.5	84.3	77.9	88.3	86.8	90.5	92.2	86.7	5.9	89.2	5.3
		97.4	90.4	85.2	94.6	85.4	87.3	90.0	5.6		
		90.7	91.1	91.4	97.0	85.9	89.3	90.9	4.0		
	3	75.3	81.2	93.9	85.5	86.7	88.0	85.1	7.4	91.2	8.2
		90.1	105.6	97.0	98.1	86.3	99.7	96.1	7.2		
		86.0	99.8	89.6	93.9	95.5	88.9	92.3	5.5		
	250	90.0	97.9	95.7	86.9	91.0	90.0	91.9	4.5	92.0	4.4
		87.0	90.1	96.5	89.4	93.9	85.4	90.4	4.6		
		96.4	91.8	93.8	88.8	99.7	91.5	93.7	4.2		
	2500	91.8	97.0	86.8	85.6	99.6	92.6	92.2	6.0	89.5	6.9
		93.9	87.0	85.2	89.5	97.1	85.5	89.7	5.4		
		74.8	80.6	91.3	93.0	86.4	92.7	86.5	8.6		
卡那	0.1	78.8	77.8	79.0	79.7	77.0	78.5	78.5	1.2	75.9	4.4

霉素		74.6	74.3	78.2	72.5	75.9	74.7	75.0	2.5		
		80.0	70.7	71.9	70.0	80.1	72.6	74.2	6.2		
	0.3	83.1	71.5	73.7	78.7	81.9	81.6	78.4	6.1	81.8	8.3
		94.9	92.3	73.2	83.0	78.0	84.6	84.3	9.8		
		90.7	88.7	71.9	83.3	80.9	80.5	82.7	8.1		
	1.5	73.2	72.3	81.9	75.3	81.7	80.0	77.4	5.6	78.4	7.4
		90.8	88.7	77.0	84.8	71.4	74.0	81.1	9.9		
		75.5	73.8	81.6	75.1	82.2	71.7	76.7	5.6		
	3	77.8	70.5	72.4	84.2	78.0	84.2	77.8	7.3	80.6	8.2
		91.7	86.0	74.4	75.5	82.5	79.5	81.6	8.1		
		87.0	96.0	76.6	78.4	80.5	76.2	82.5	9.3		
	250	83.8	85.5	72.9	79.6	82.3	80.8	80.8	5.5	78.3	6.4
		70.8	79.7	80.6	73.4	79.5	72.2	76.0	5.7		
		70.6	72.0	80.6	78.0	83.7	83.6	78.1	7.3		
	2500	78.1	85.7	73.5	78.1	80.8	73.5	78.3	5.9	77.7	7.7
		87.4	84.8	82.8	71.3	70.8	83.8	80.1	9.0		
		85.7	72.4	70.9	73.7	72.7	72.9	74.7	7.3		

表21. 鸡复合预混料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	86.1	81.1	87.6	89.0	85.8	94.7	87.3	5.1	89.1	4.8
		85.7	89.0	85.9	95.8	91.3	95.2	90.5	4.9		
		88.4	85.8	85.6	92.4	95.9	88.9	89.5	4.5		
	0.3	102.2	101.5	104.7	101.3	100.3	107.7	102.9	2.7	101.6	5.0
		94.4	94.0	101.1	107.7	93.1	93.4	97.3	6.1		
		103.1	103.7	108.8	102.4	107.9	101.4	104.5	2.9		
	1.5	108.9	104.6	103.4	96.8	93.2	97.1	100.7	5.9	100.8	6.7
		109.3	109.4	108.7	104.0	95.7	90.8	103.0	7.7		
		102.8	109.7	100.5	92.1	92.8	94.1	98.7	7.0		
	3	104.3	100.8	95.0	103.8	91.5	100.8	99.4	5.1	98.0	4.9
		95.1	96.8	102.8	101.8	92.7	90.6	96.6	5.0		
		95.3	96.9	101.5	98.2	90.5	104.8	97.9	5.1		
	250	102.1	105.7	101.2	103.1	94.9	97.6	100.8	3.9	100.2	5.3
		105.5	100.8	100.3	108.8	102.8	93.0	101.9	5.3		
		109.3	97.0	102.7	92.5	93.1	93.8	98.1	6.8		
	2500	91.0	92.5	93.8	92.3	99.2	101.3	95.0	4.4	97.4	5.1
		93.3	99.3	95.4	90.1	108.7	103.1	98.3	6.9		
		103.2	97.0	101.5	94.5	98.0	99.1	98.9	3.2		
链霉素	0.1	75.9	77.9	77.4	90.4	77.1	84.9	80.6	7.2	82.2	7.0
		80.1	76.8	85.5	89.1	87.6	72.2	81.9	8.1		
		89.1	75.0	86.4	83.5	88.7	81.8	84.1	6.3		
	0.3	100.5	106.5	103.4	104.6	100.9	104.1	103.3	2.2	99.8	5.7
		90.5	100.5	100.6	92.9	90.1	107.1	97.0	7.1		
		108.0	98.3	97.2	99.3	90.6	101.8	99.2	5.8		
	1.5	107.7	102.8	108.9	104.0	102.4	90.0	102.6	6.5	100.7	6.3
		107.1	100.9	90.2	96.3	103.0	107.7	100.9	6.6		
		100.1	96.8	108.5	95.4	90.9	99.4	98.5	6.0		
	3	109.3	103.2	109.7	95.2	105.5	105.7	104.8	5.1	100.4	6.2
		93.6	92.8	95.5	93.8	98.3	97.7	95.3	2.4		
		94.4	94.3	105.5	105.9	109.6	97.2	101.1	6.6		
	250	93.8	92.0	97.0	105.7	99.3	104.8	98.8	5.7	98.9	6.4
		92.5	94.6	106.7	92.8	98.4	93.0	96.3	5.7		
		108.3	91.9	109.0	93.1	106.0	100.8	101.5	7.4		
	2500	103.2	96.9	97.9	106.7	94.4	106.5	100.9	5.2	101.7	6.0
		106.1	98.1	91.8	109.2	108.3	102.6	102.7	6.5		
		105.4	100.8	90.2	106.4	96.7	109.8	101.6	7.1		
卡那	0.1	73.6	77.2	75.1	73.9	71.2	69.7	73.4	3.7	78.2	8.1

霉素		73.9	87.4	77.1	81.9	78.3	89.4	81.3	7.5		
		88.5	79.2	70.2	84.8	83.3	73.7	80.0	8.7		
	0.3	108.0	107.5	105.6	108.4	93.5	109.6	105.4	5.7	100.5	7.0
		94.6	101.7	102.6	100.7	107.4	101.9	101.5	4.1		
		91.6	93.7	93.6	90.2	90.3	107.7	94.5	7.0		
	1.5	88.9	94.9	89.1	97.0	91.4	96.2	92.9	3.9	92.0	5.4
		97.1	80.4	93.8	96.0	88.9	98.6	92.5	7.4		
		89.9	89.1	94.6	97.2	83.8	89.6	90.7	5.2		
	3	92.5	84.4	86.8	85.9	80.7	95.2	87.6	6.1	90.1	7.3
		90.7	96.3	81.2	98.1	82.9	93.5	90.4	7.8		
		99.3	94.3	93.8	80.2	98.6	86.8	92.1	8.0		
	250	80.3	78.3	77.2	74.7	84.3	75.1	78.3	4.6	80.0	7.7
		89.8	88.8	76.3	71.6	88.9	81.9	82.9	9.2		
		87.1	73.3	73.3	75.0	77.6	86.9	78.9	8.2		
	2500	101.8	90.1	103.1	105.9	104.7	95.8	100.2	6.1	100.7	5.7
		109.4	105.9	93.1	102.5	106.4	90.6	101.3	7.6		
		102.2	98.7	94.7	104.6	104.7	98.4	100.5	3.9		

表22. 维生素预混料回收率试验结果

化合物	添加浓度 (mg/kg)	平行样回收率 (%)						批内添加平均回收率 (%)	批内RSD (n=6,%)	批间添加平均回收率 (%)	批间RSD (n=18,%)
双氢链霉素	0.1	92.0	85.7	93.3	86.4	92.1	94.3	90.6	4.0	90.6	4.3
		85.0	93.7	94.2	85.7	94.9	91.0	90.7	4.8		
		93.8	85.6	93.0	86.5	87.5	95.9	90.4	4.8		
	0.3	97.7	103.3	97.1	100.7	106.4	106.5	102.0	4.0	100.4	5.4
		94.3	94.5	106.4	109.1	107.1	100.7	102.0	6.4		
		93.9	96.2	95.3	94.9	96.3	107.2	97.3	5.1		
	1.5	98.7	96.1	97.7	88.7	94.5	82.2	93.0	6.8	89.4	7.1
		84.4	94.7	84.6	91.9	86.0	81.7	87.2	5.7		
		95.5	82.1	97.3	87.1	80.6	85.8	88.1	7.8		
	3	100.6	100.2	103.1	92.5	104.8	90.8	98.6	5.8	101.4	5.4
		104.9	106.5	92.6	104.4	104.1	99.5	102.0	5.1		
		108.6	107.5	94.0	105.4	103.0	103.7	103.7	5.0		
	250	102.1	105.7	101.2	102.5	108.4	97.6	102.9	3.6	102.5	5.0
		108.8	96.6	106.3	96.0	107.1	96.9	101.9	5.9		
		102.7	103.3	108.6	106.0	103.9	90.7	102.5	6.0		
	2500	98.9	108.2	92.9	94.3	97.6	95.4	97.9	5.6	100.1	4.9
		94.7	108.0	105.6	103.6	92.5	99.7	100.7	6.1		
		102.3	102.8	101.8	97.9	104.0	101.0	101.6	2.1		
链霉素	0.1	92.6	91.8	93.0	88.3	91.4	86.2	90.6	3.0	91.6	2.8
		90.4	88.9	95.5	90.3	94.6	93.1	92.1	2.9		
		92.3	92.9	88.1	90.1	94.4	94.7	92.1	2.8		
	0.3	61.6	63.7	70.9	64.9	77.1	69.6	68.0	8.4	71.9	8.0
		79.2	75.3	78.6	71.6	73.4	75.0	75.5	3.9		
		73.9	62.1	77.2	67.9	74.1	77.8	72.2	8.4		
	1.5	78.1	87.6	83.6	84.3	87.2	85.7	84.4	4.1	82.5	6.9
		85.1	75.6	72.5	88.7	76.3	89.2	81.2	9.0		
		71.3	77.6	86.5	82.8	87.5	85.5	81.8	7.7		
	3	74.1	74.1	75.8	86.8	70.4	81.0	77.0	7.7	77.5	6.4
		82.4	74.7	71.6	81.6	78.1	79.9	78.0	5.4		
		71.4	74.1	72.8	83.8	78.0	84.2	77.4	7.2		
	250	93.8	92.0	97.0	109.3	108.4	109.1	101.6	8.1	100.6	6.7
		95.3	108.6	109.3	92.1	96.6	97.6	99.9	7.3		
		109.8	99.8	94.9	100.4	101.9	94.7	100.3	5.5		
	2500	91.6	93.4	95.3	90.7	95.5	95.1	93.6	2.2	96.8	5.1
		90.3	101.7	97.8	106.4	103.8	97.9	99.7	5.7		
		96.0	101.3	101.8	90.9	92.0	100.3	97.1	5.0		
卡那	0.1	88.6	89.3	86.3	92.0	85.2	85.9	87.9	3.0	90.0	3.6

霉素		87.3	86.7	91.5	88.7	93.2	94.4	90.3	3.5		
		95.3	92.8	95.0	92.1	88.6	88.1	92.0	3.3		
	0.3	98.3	105.7	100.3	102.8	105.4	90.6	100.5	5.6	98.7	5.3
		93.7	97.9	93.6	106.5	95.9	97.6	97.5	4.9		
		91.0	92.7	105.2	103.4	100.4	95.6	98.0	5.9		
	1.5	81.1	79.5	82.7	83.7	70.1	73.7	78.5	6.9	79.8	7.2
		73.6	87.2	87.2	74.1	78.5	74.2	79.1	8.2		
		78.3	75.5	87.4	77.1	89.7	83.5	81.9	7.1		
	3	81.9	86.9	85.9	75.0	84.7	77.7	82.0	5.8	80.9	6.2
		78.3	84.2	80.5	84.6	76.3	87.2	81.8	5.1		
		75.6	74.6	72.9	85.8	77.5	87.5	79.0	7.8		
	250	80.0	78.9	77.3	72.0	86.4	89.7	80.7	7.9	82.3	6.1
		78.1	87.3	78.6	84.8	75.0	85.2	81.5	6.0		
		89.7	84.6	81.8	80.7	86.8	84.2	84.6	3.9		
	2500	99.0	90.5	100.1	109.6	95.1	109.3	100.6	7.6	100.0	6.1
		109.1	94.3	101.7	102.4	92.6	107.1	101.2	6.6		
		102.7	102.4	100.2	97.4	91.4	95.0	98.2	4.5		

结果可知，猪鸡配合饲料、猪鸡浓缩饲料和牛精料补充料中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的添加平均回收率为 68.0%~102.9%，批内和批间 RSD 为 1.8%~13.6%；猪复合预混料、鸡复合预混料、维生素预混料中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的添加平均回收率为 68.0%~105.4%，批内和批间 RSD 为 1.2%~9.9%。表明本方法准确度和精密度良好，适用于上述类型饲料中三种氨基糖苷类药物的测定。

液相色谱串联质谱仪为高灵敏度高精密度仪器，饲料样品种类繁多，所含杂质无法准确确定，且实验前处理过程影响因素多，因此会给同一样品的检测结果造成不同程度的偏差。因此，依据本实验检测结果的相对偏差值，参照国内相关液质联用方法标准，最终将本标准重复性允许偏差确定为不大于 20%。

## 2.4 实际样品（非添加样）的测定

为进一步验证方法的适用性和科学性，应用所建立的测定方法对

养殖场的 20 份饲料样品进行检测，包括配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料，结果发现所检样品中三种 AGs 均低于检测限，说明饲料禁抗政策得到了有效实施，违禁添加行为得到有效制止，代表性饲料样品图谱见图 47~50。实际样品种类汇总表见表 23。

**表23.** 实际样品种类汇总表

饲料	数量（个）	检出值（mg/kg）
鸡配合饲料	8	ND
猪浓缩饲料	6	ND
猪预混合饲料	3	ND
精料补充料	3	ND



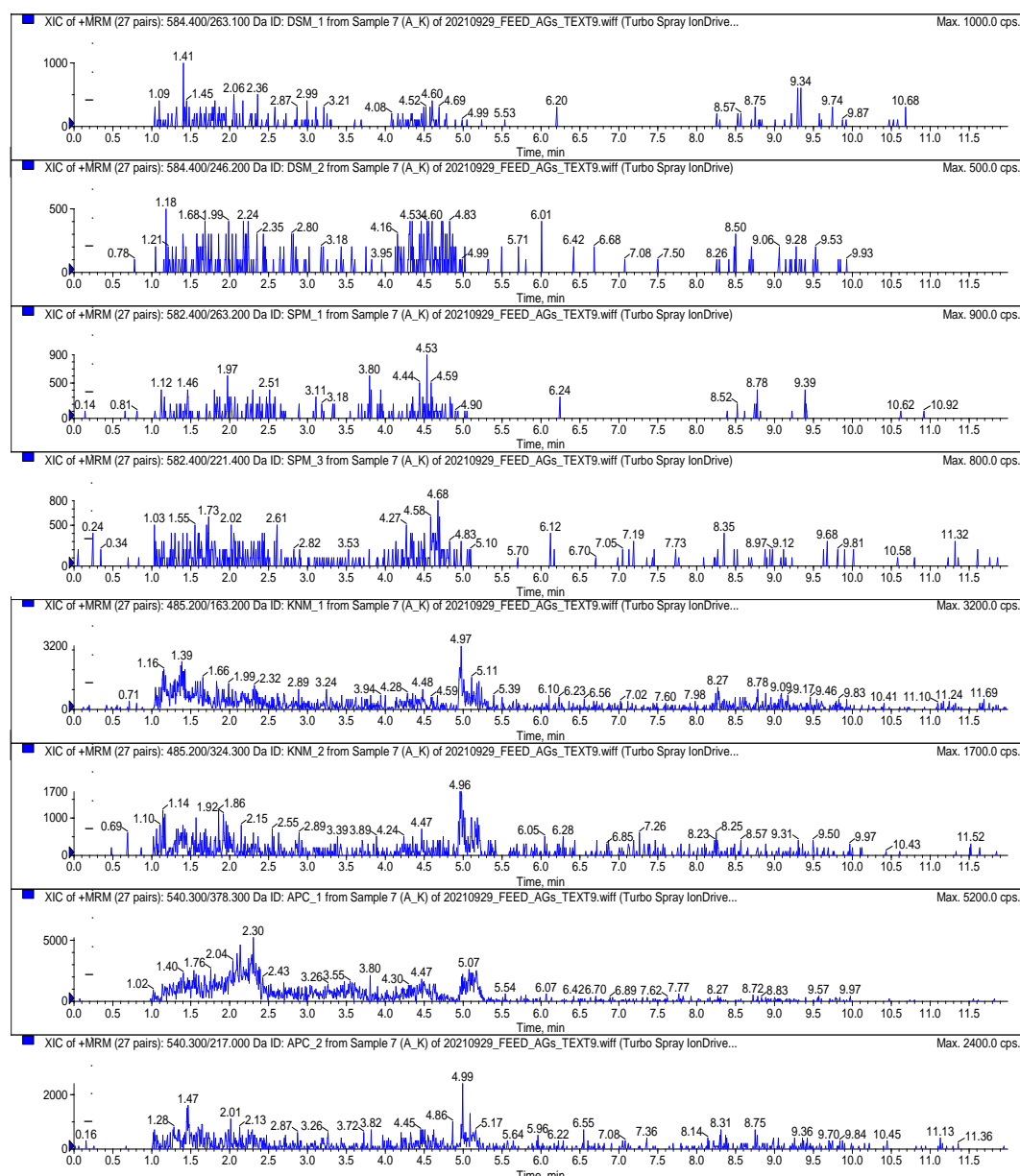


图47. 鸡配合饲料样品特征离子色谱图

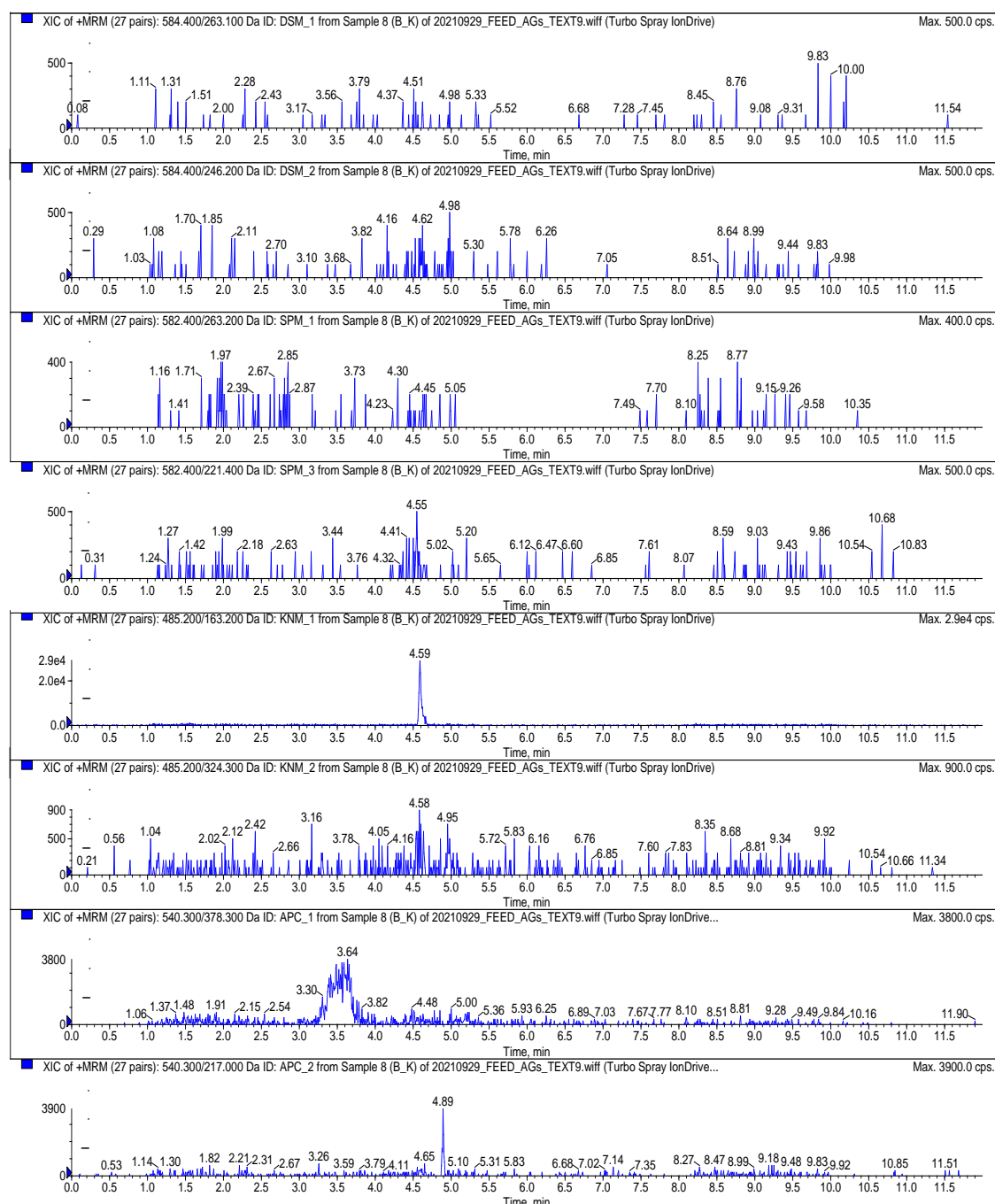


图48. 猪浓缩饲料样品特征离子色谱图

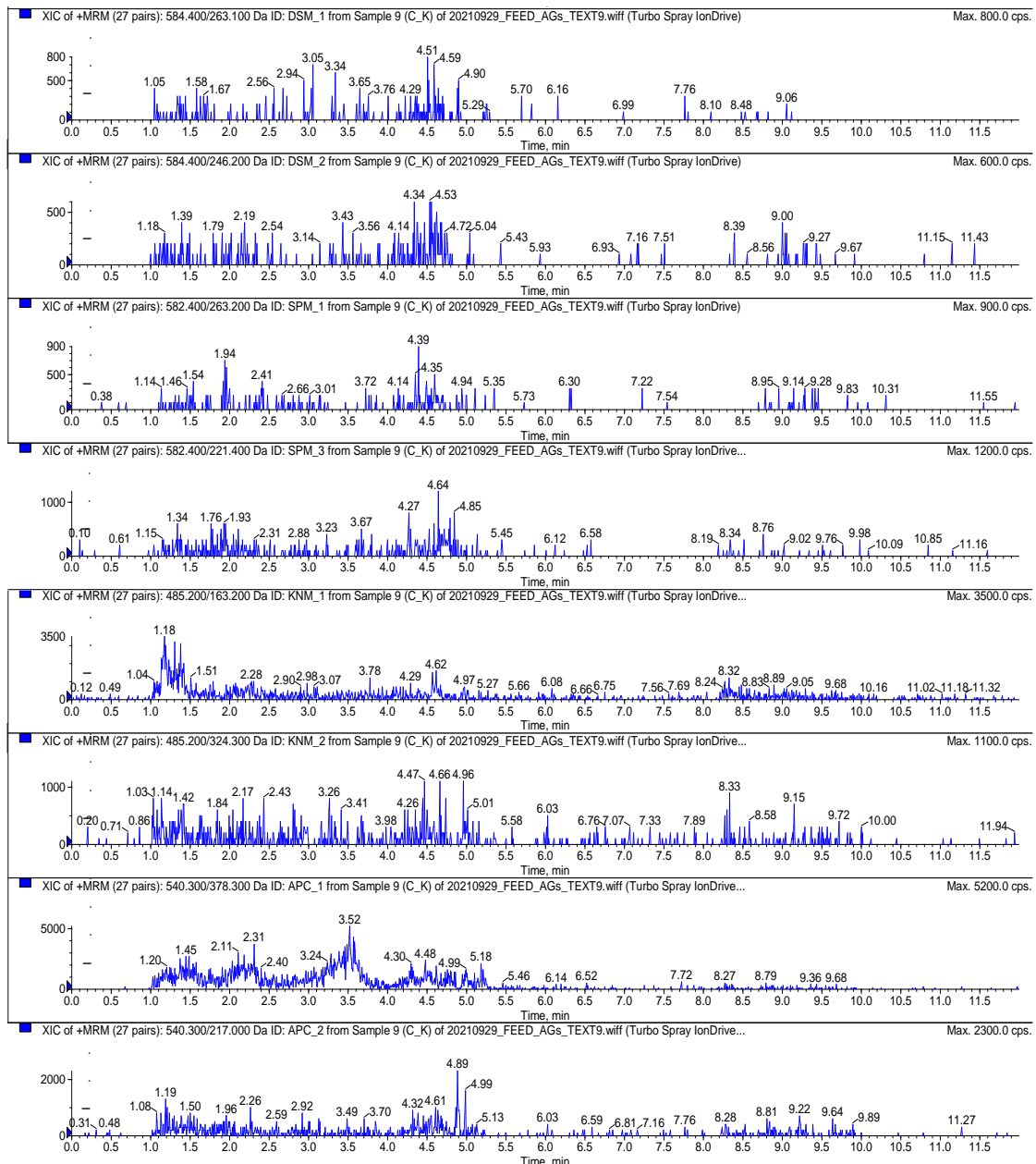


图49. 牛精料补充饲料样品特征离子色谱图

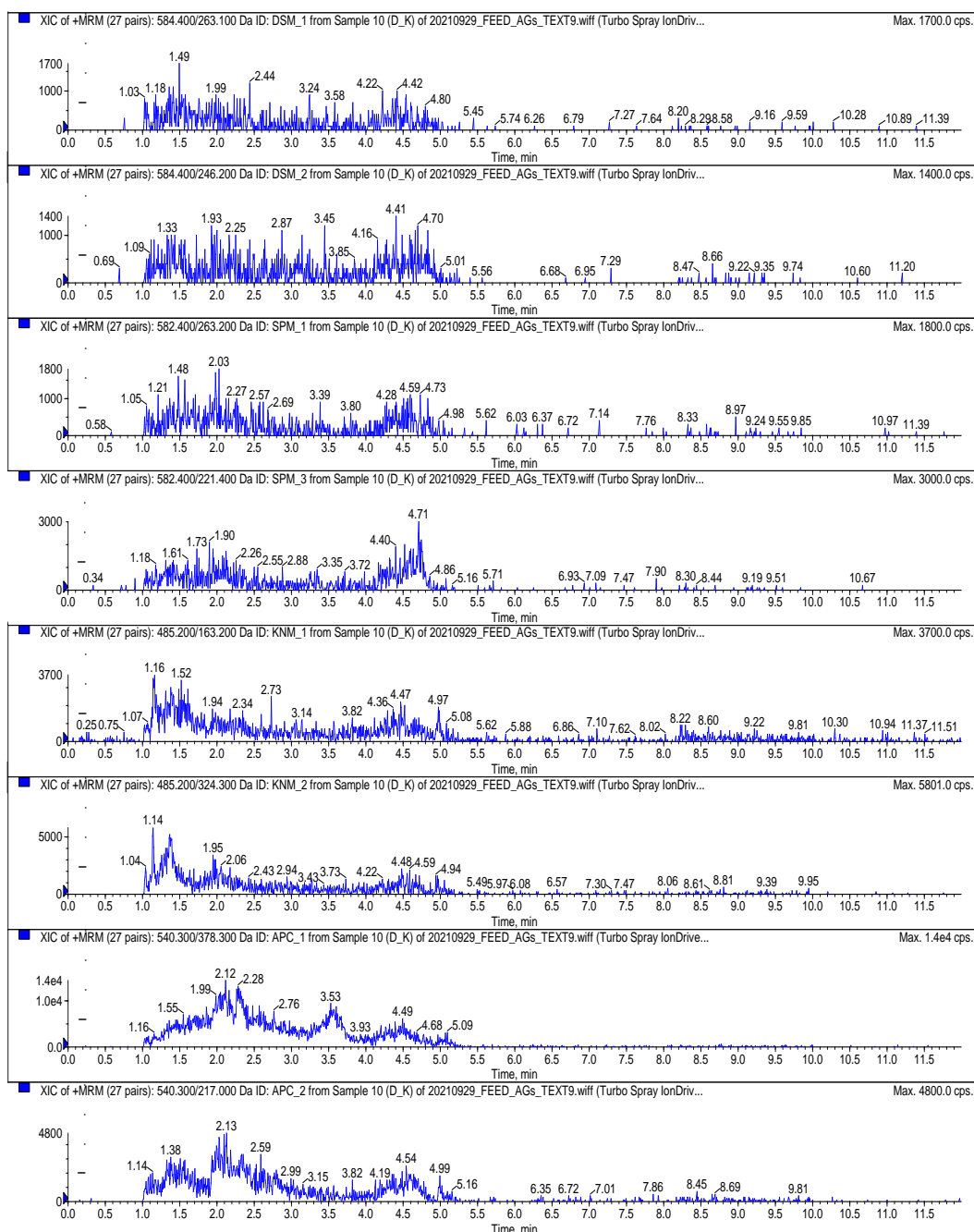


图50. 猪预混合饲料样品特征离子色谱图

### 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

2021 年 10 月，标准编制小组委托农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）、广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所和江苏省兽药饲料质量检验所完成本标准的复核验证工作。

验证结果表明，目标分析物在不同仪器上的母离子和子离子之间分别相差 0.2 和 0.3 单位（见表 24），属于仪器的误差范围，基本无差异性变化。目标物在各自浓度范围内线性良好，相关系数>0.99；加标回收率范围、相对标准偏差与标准规定相符合；方法检出限、定量限与标准规定一致；方法灵敏度高、重复性好，适用于饲料中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的测定。

表24. 三种 AGs 药物的母离子和子离子在不同仪器间差异性变化

本方法			验证单位 1		验证单位 2		验证单位 3	
仪器类型	AB 6500 plus		Agilent 6495		SHIMADZU 8060		AB 5500	
化合物	母离子	子离子	母离子	子离子	母离子	子离子	母离子	子离子
链霉素	582.4	221.4 263.2	582.3	221.2 263.1	582.26	221.10 263.10	582.4	221.4 263.2
双氢链霉素	584.4	246.2 263.1	584.3	246.1 263.1	584.21	246.05 263.20	584.4	246.2 263.1
卡那霉素	485.2	324.3 163.2	485.2	324.2 163.1	485.00	324.15 163.10	485.2	324.3 163.2

制定、发布、实施本标准，有利于农业主管部门对饲料中氨基糖苷类药物进行质量安全监管，保证饲料、畜禽产品和水产品的质量安全，促进我国饲料工业的高质量发展。

### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

美国分析化学家协会发布了《AOAC Official Method 971.49

Streptomycin in Feeds》、《AOAC Official Method 973.81 Spectinomycin in Feeds》和《AOAC Official Method 998.02 Neomycin in Feeds》标准，采用微生物法分析链霉素、大观霉素和新霉素含量，而本标准采用液相色谱串联质谱的仪器方法，在方法种类、技术内容和药物品种等方面存在较大差异。

与国内同类标准技术内容对比情况见表 1。结果表明：我国现行的《SN/T 5117-2019 进出口食用动物、饲料 链霉素类（链霉素、二氢链霉素）药物残留测定 液相色谱-质谱/质谱法》规定了玉米粉、小麦粉、高粱粉中链霉素和二氢链霉素的测定，测定低限 10 µg/kg。本标准适用范围与 SN/T 5117-2019 不同，检出限、定量限也不同。

## **五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准**

未采用国际标准或国外标准。

## **六、与有关法律、法规的关系**

本标准与现行的有关饲料法律、法规、规章和政策以及有关基础标准和强制性标准方向统一一致，相互支持，互相配合、协调一致，形成统一的有机整体。

## **七、重大分歧意见的处理经过和依据**

标准编制小组发送给国家饲料质检中心、省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见，发函单位 21 个，回函单位 21 个，未回函单位 0 个；提出意见单位 21 个，无意见单位 0 个；收到回函意见 29 份，合并相同意见后共计 98 条，

采纳 86 条，部分采纳或不采纳 12 条。无重大分歧意见。

2022 年 4 月 15 日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对我单位起草的该项行业标准（预审稿）进行了认真审查，提出审查意见 14 条，标准编制小组全部予以采纳。本方法在研制过程中包含了安普霉素的有关内容，因与饲料标准方法体系冲突，预审会后删除了该药物。无重大分歧意见。

## **八、涉及专利的有关说明**

本标准未明确涉及某一具体专利，但某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

## **九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议**

（1）本标准在实施前，使用者应得到有效的电子和纸质文本，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，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作。

（3）建议本标准正式发布后，设定 6 个月的过渡期，过渡 6 个月 after 实施。

## **十、其他应当说明的事项**

无

## 参考文献

- [1] 武丹,张圆圆,杨雪.氨基糖苷类抗生素的作用机制及其在兽医临床中的应用[J].当代畜禽养殖业,2020(08):42-43.
- [2] 张静,赵立军,李云.HPLC-MS/MS 法测定饲料中硫酸新霉素的含量[J].饲料研究,2017(11):27-32.
- [3] 胡小莉,刘绍璞,罗红群,何佑秋.氨基糖苷类抗生素分析方法的研究进展[J].分析科学学报,2005(03):316-321.
- [4] Liu Q Y, Li J F, Song X Q, Zhang M Y, Li E F, Gao F M , He L M. RSC Advances, 2017,7(3): 1251-1259.
- [5] Zhou Y X, Yang W J, Zhang L Y, Wang Z Y. Journal of liquid chromatography and related technologies, 2007, 30(9-12): 1603-1615.
- [6] 刘清颖. 饲料和环境水中氨基糖苷类药物分析测定研究[D]. 华南农业大学, 2017.
- [7] 李佩佩,龙举,方益,严忠雍,张小军.液相色谱法检测动物源食品中氨基糖苷类药物残留的研究进展[J].理化检验(化学分册),2019,55(11):1356-1364.
- [8] Frédérique L. van Holthoon, Martien L. Essers, Patrick J. Mulder, Sara L. Stead, Marianne Caldow, Helen M. Ashwin and Matthew Sharman(2009). A generic method for the quantitative analysis of aminoglycosides (and spectinomycin) in animal tissue using methylated internal standards and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 637 :135-143.
- [9] 万译文,黄向荣,伍远安,肖维,索纹纹.固相萃取净化-高效液相色谱串联质谱法测定鱼肉制品中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的含量[J].现代食品科技,2018,34(08):255-259.
- [10] Feng, J., X. She, X. He, J. Zhu, Y. Li and C. Deng (2018). Synthesis of magnetic graphene/mesoporous silica composites with boronic acid-functionalized pore-walls for selective and efficient residue analysis of aminoglycosides in milk. Food Chem 239: 612-621.
- [11] 钟名琴,黄婷,吴雯娟,罗燕,丁燕玲.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物肌肉组织中 6 种氨基糖苷类药物残留[J].饲料博览,2019(05):1-6.
- [12] 陶大利,白鹤,李琴.SPE 净化-液质联用测定氨基糖苷类药物残留[J].中国乳品工业,2019,47(02):51-53+57.
- [13] 王钦钦. 饲料中氨基糖苷类抗生素和地昔尼尔的测定[D].烟台大学,2019.
- [14] Wang, Y., S. Li, F. Zhang, Y. Lu, B. Yang, F. Zhang and X. Liang (2016). Study of matrix effects for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 4 aminoglycosides residues in milk. J Chromatogr A 1437: 8-14.
- [15] GB/T 21323-2007 动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法
- [16] GB/T 22954-2008 河豚鱼和鳗鱼中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [17] SN/T 5117-2019 进出口食用动物、饲料 链霉素类(链霉素、二氢链霉素) 药物残留测定 液相色谱-质谱/质谱法



- [18]United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS, CLG-AMG1.03.
- [19]农业农村部公告第 197 号-3-2019 饲料中硫酸新霉素的测定 液相色谱-串联质谱法
- [20]GB/T 22969-2008 奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [21]GB/T 22945-2008 蜂王浆中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [22]GB/T 22995-2008 蜂蜜中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法