

中华人民共和国国家标准

饲料中安普霉素的测定

编制说明

西南民族大学

四川特驱农牧科技集团有限公司

四川众检四方检验检测技术有限公司

2022 年 11 月

目录

一、工作简况	1
1 任务来源	1
2 标准修订背景	1
2.1 安普霉素的性质及其限量标准	2
2.2 安普霉素的检测方法	2
2.3 安普霉素检测的前处理技术	4
3 工作过程	5
3.1 成立标准编制小组	5
3.2 查询国内外相关标准和文献资料	6
3.3 确定标准制定技术路线，制定原则	6
3.4 进行论证实验，建立新标准方法	6
3.5 编写标准征求意见稿	6
3.6 征求专家意见	7
3.7 组织方法验证	7
3.8 标准初审	7
3.9 形成公开征求意见稿	10
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据	10
1 编制原则	10
2 主要修订内容	11
3 主要技术内容的确定依据	14
3.1 高效液相色谱法	14
3.2 液相色谱-串联质谱法	29
3.3 标准溶液稳定性	50
3.4 实际样品检测	52
3.5 两种方法精密度比较	53
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	54
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	55
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	55
六、与有关法律、法规的关系	55
七、重大分歧意见的处理经过和依据	56
八、涉及专利的有关说明	56
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	56
十、其他应当说明的事项	56
参考文献:	57

一、工作简况

1 任务来源

农业农村部于 2019 年 11 月启动了《饲料中安普霉素的测定 高效液相色谱法》的修订工作（2019-合同-10），修订内容主要包括增加饲料中安普霉素的测定第二法质谱法和拓宽原高效液相色谱法的适用范围，增加精料补充料。项目承担单位为西南民族大学、四川特驱农牧科技集团有限公司、四川众检四方检验检测技术有限公司，本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

2 标准修订背景

安普霉素（apramycin）又名阿普拉霉素，是一种氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)，主要成分为硫酸安普霉素（戴青，2016）。作为一种兽用抗生素，安普霉素因其抗菌谱广，在临床上主要用于大肠杆菌、沙门氏杆菌和支原体等引起的动物疾病治疗。安普霉素不仅能够有效预防动物疾病，而且能提高畜禽的饲料转化率，促进动物快速生长，但该类物质能够在人体内蓄积，从而产生耳毒性、肾毒性等危害，更重要的是长期广泛超量使用会造成细菌耐药性（高月，2016）。

《兽药典》中规定，硫酸安普霉素预混剂的常用剂量为 80~100 mg/kg（以安普霉素计）。根据农业农村部第 194 号公告，从 2020 年 7 月 1 日起，饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂（中药类除外）的商品饲料。标准《饲料中安普霉素的测定 高效液

相色谱法》规定了饲料中安普霉素的测定方法，其检出限和定量限分别为 3 mg/kg 和 10 mg/kg。因此，在新的饲料发展趋势和安全管理形势下，原标准高效液相色谱法已不足以适应当前饲料行业对安普霉素的监管需要，需要增加灵敏度更高的液相色谱-串联质谱确证方法。

2.1 安普霉素的性质及其限量标准

硫酸安普霉素分子式为 $C_{21}H_{41}N_5O_{11} \cdot H_2SO_4$ ，分子量为 637.65，结构式见图 1。根据农业农村部第 194 号公告，安普霉素严禁在商品饲料中使用。

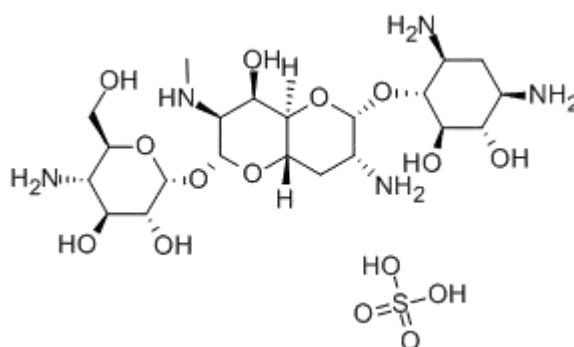


图 1 硫酸安普霉素 (Apramycin sulfate)

2.2 安普霉素的检测方法

2.2.1 酶联免疫检测法 (ELISA)

ELISA 法是目前氨基糖苷类药物检测中应用较为广泛的一种免疫学检测方法，主要采用竞争 ELISA 模式，即酶标抗原或抗体与待测物竞争结合包被在固相载体上的抗体或抗原，加入显色液（可被酶催化而显色的物质）后根据颜色深浅对待测物进行定性和定量。

徐飞等（2014）建立了安普霉素可视化凝胶 ELISA 方法，方法

灵敏度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ ，对猪肉、鸡肉的检出限为 3 $\mu\text{g/kg}$ ，对牛奶的检出限为 3 $\mu\text{g/L}$ ，对猪肝、鸡肝的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。Burkin 等（2013）利用安普霉素单抗建立 ELISA 检测方法，测得检测限为 0.015 ng/mL 。ELISA 法以其成本低、灵敏度高、特异性强等优点广泛应用于 AGs 残留的筛选检测，但该方法也具有稳定性、重复性差、易出现基质效应和交叉反应且只能同时检测一种或少数几种药物的缺点。

2.2.2 高效液相色谱法

氨基糖苷类抗生素的化学性质决定了其较适合于液相色谱的检测，即水溶性好且极性大，但由于其缺乏可发光的基团，因此不能用紫外检测器或荧光检测器直接检测，需在此之前经过衍生化处理，再进行检测。

钱疆等（2011）过柱后用次氯酸钠溶液氧化，邻苯二甲醛衍生，高效液相色谱荧光检测器测乳制品中 9 种氨基糖苷类抗生素，测得安普霉素的检测限为 100 $\mu\text{g/L}$ 。我国农业部 1025 号公告中采用 OPA 柱后衍生—高效液相色谱法检测牛奶中安普霉素、新霉素、卡那霉素和庆大霉素的残留量。液相色谱法的优点是选择性好、灵敏度高、重复性好、操作简单，而且可与不同灵敏度、选择性和线性范围的检测器连接，灵活度高，应用性强，分离和净化效果好；缺点是受基质影响大，对前处理要求比较严格。

2.2.3 液相色谱-串联质谱法

在液相色谱-串联质谱的各种检测器中，串联质谱由于灵敏度和选择性高于其他检测器，目前应用最为广泛。质谱技术可以对通过色谱无法分离的物质进行定量，且具有较高的灵敏度和较宽的线性范围，而对于缺乏发色基团和荧光基团的氨基糖苷类抗生素要获得较高灵敏性的结果来说，质谱方法无疑是最优选的方法。

刘雪红等（2015）建立了牛奶中 7 种 AGs（链霉素、双氢链霉素、庆大霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、安普霉素、大观霉素）的检测方法，样品经乙酸铵缓冲液提取，固相萃取柱净化，采用甲酸铵溶液作为流动相进行梯度洗脱，通过多反应监测模式进行测定，在 20、50、200 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下，平均回收率为 80%~117.5%，检测限为 10 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。方秋华等（2016）建立了牛奶中 8 种 AGs 的检测方法，试样经过 5%三氯乙酸提取，经 Plexa 固相萃取柱进一步净化，液相色谱分离，采用多反应监测正离子模式进行定性定量分析，测得安普霉素的检测限为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

然而质谱法仪器成本高，对操作人员要求高，同时由于样品前处理过程中和色谱分离的流动相中使用高含量的离子对试剂，会对质谱系统造成一定程度的污染，从而使得质谱仪器与许多流动相不“兼容”，流动相的选择也相对“挑剔”（张元，2016）。

2.3 安普霉素检测的前处理技术

前处理技术对于饲料中安普霉素的检测至关重要，主要包括提取

和净化两个步骤。提取的主要目的是从饲料基质中最大程度的获取目标物,净化的目的是去除目标物中的杂质,降低饲料基质对其的影响,从而更大程度的降低检出限。目前在饲料中安普霉素前处理技术的提取过程中主要有振荡提取和超声提取两种方式,而净化方式主要分为液-液萃取(Liquid-Liquid Extraction, LLE)和固相萃取(Soild Phase Extraction, SPE)。

液-液萃取技术主要通过向液体混合物中加入与其不相混溶(或稍相混溶)的溶剂,利用其组分在溶剂中的不同溶解度而使目标物达到分离纯化的目的。苯、乙酸乙酯和异丙醚为常用的有机萃取剂。Chiaochan 等(2010)采用了 LLE 的净化方法,先通过对鸡肉中 24 种兽药残留物(含 3 种 AGs)用 2%三氯乙酸溶液进行提取,再使用正己烷作为萃取剂去除蛋白质,脂质的干扰,最后再用液相色谱串联质谱仪进行检测,测得回收率为 53%~99%,检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。由于 LLE 具有操作复杂,费时,且有机溶剂使用量大的缺点,已在纯化过程中很少使用,现已被 SPE 逐步取代。

3 工作过程

3.1 成立标准编制小组

西南民族大学,四川特驱农牧科技集团有限公司以及四川众检四方检验检测技术有限公司接到标准修订任务后,成立了标准编制小组,落实了分工,详见表 1。

表 1 标准主要起草人员及任务分工

姓名	职称	单位	分工
柏雪	副研究员	西南民族大学	项目负责人，负责项目的全面工作
何利梅	硕士研究生	西南民族大学	检测方法研究、样品检测
梅绍锋	高级畜牧师	四川特驱农牧科技集团有限公司	负责样品采集、方法验证
虞洁	教授	四川特驱农牧科技集团有限公司	负责样品采集、方法验证、意见收集
付晓	工程师	四川众检四方检验检测技术有限公司	标准文本和编制说明修改、方法验证
黄李蓉	畜牧师	四川特驱农牧科技集团有限公司	负责样品采集、方法验证

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。

3.3 确定标准制定技术路线，制定原则

本标准依据安普霉素的理化性质，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定。

3.4 进行论证实验，建立新标准方法

通过试验摸索，优化样品前处理条件和上机条件，修订饲料中安普霉素的高效液相色谱法，增加液相色谱-串联质谱法。

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，最终形成标

准征求意见稿，编写标准文本内容和编制说明。

3.6 征求专家意见

总共发送“征求意见稿”55 份，回函 33 份，合并相同意见后共计 126 条，在此基础上修改征求意见稿，形成标准预审稿。

3.7 组织方法验证

本标准方法经四川省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）和成都海关技术中心 3 家单位验证。验证结果表明，该标准方法设计合理，实用有效。

3.8 标准初审

2022 年 4 月，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本标准的文本及编制说明进行了审查，提出了修改意见（见表 2），与会专家一致同意通过初审。

表 2 预审会意见汇总处理表

标准项目名称： 饲料中安普霉素的测定

共 2 页

负责起草单位： 西南民族大学

2022 年 4 月 15 日填写

序号	标准章条编号	意 见 内 容	提出单位	处理意见	备注
1	标准全文	明确安普霉素及内标所接触的容器材质	专家组	采纳	
2	4.2.4-4.2.7	乙酸、乙酸铵等试剂若非必须使用色谱纯应删除	专家组	采纳	
3	4.2.13	核实安普霉素标准品 CAS 号与浓度	专家组	采纳	
4	4.2.15	液相方法的标准曲线增加一个低浓度点	专家组	采纳	
5	4.3.9	明确酸度计的精密度	专家组	采纳	
6	4.5.3.1	补充流动相流速	专家组	采纳	
7	4.6	V2改成复溶后体积	专家组	采纳	

序号	标准章条编号	意 见 内 容	提出单位	处理意见	备注
8	5.5.3.1	amide柱表述改成酰胺柱	专家组	采纳	
9	5.5.3.5	如超出线性范围的处理修改为需从5.5.1重新处理、测定	专家组	采纳	
10	5.6	结果单位统一为 mg/kg	专家组	采纳	
11	附录	优化附录中的色谱和质谱图	专家组	采纳	
12	编制说明	表 2 中 3 µg/kg 改为 3 mg/kg	专家组	采纳	
13	编制说明	核实标准溶液的稳定性数据	专家组	采纳	
14	编制说明	补充安普霉素在饲料中的常用使用剂量	专家组	采纳	
15	编制说明	补充添加内标校正的必要性	专家组	采纳	
16	编制说明	详细阐述液质法提取液选择依据	专家组	采纳	
17	验证报告	如果改变了色谱条件,需要根据新的测定条件给出验证报告。	专家组	采纳	

3.9 形成公开征求意见稿

项目组根据初审专家的意见补充相关试验、对标准进行修改并再次验证后，报秘书处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

早在 2010 年，农业农村部就制定发布并实施了农业部 1486 号公告-3-2010《饲料中安普霉素的测定 高效液相色谱法》，由于标准实施时间较长，饲料相关法规变化，因此需进行进一步修订。查阅标准，目前国内有关饲料中安普霉素的检测标准有：

(1)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

(2) DB34/T 1367-2011 饲料中硫酸安普霉素的测定 高效液相色谱法

查阅相关文献，饲料中安普霉素的检测也多采用液相色谱法和液相色谱-串联质谱法，因此，我们修订农业部 1486 号公告-3-2010 的主要内容确定为修订老标准中已有的高效液相色谱法，并增加液相色谱串联质谱法，以满足饲料中高低浓度安普霉素的检测要求。

1 编制原则

本标准是依据安普霉素的理化性质，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定的。在标准制定过程中严格遵循国家有关

方针、政策、法规和规章，依据 GB/T 1.1 - 2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的要求，以参照国内外相关标准与文献为基础而编制，确保方法标准的科学性、可行性和可靠性。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。本标准的液相方法使用液相色谱仪型号为 Agilent 公司的 Agilent 1200 高效液相色谱仪，配备有荧光检测器。液相色谱-串联质谱法使用仪器型号为 Agilent 公司的 Agilent 6460 三重串联四级杆液质联用仪。

2 主要修订内容

修订内容主要包括增加饲料中安普霉素的测定第二法液相色谱-串联质谱法和拓宽原高效液相色谱法的适用范围，增加精料补充料。

修订后标准与原标准的对比详见表 3。

表 3 修订后标准与原标准的对比

序号	对比条目	原标准（农业部 1486 号公告-3-2010）	修订后
1	标准名称	《饲料中安普霉素的测定 高效液相色谱法》	《饲料中安普霉素的测定》
2	检测方法	高效液相色谱法	高效液相色谱法，液相色谱-串联质谱法
3	适用范围	配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料
4	检出限和定量限	检出限为 3 mg/kg，定量限为 10 mg/kg	高效液相色谱法的检出限为 2 mg/kg，定量限为 5 mg/kg；液相色谱-串联质谱法的检出限为 0.04 mg/kg，定量限为 0.10 mg/kg。
5	液相色谱法提取步骤	<p>称取适量试样（配合饲料 5g，浓缩饲料 2g~3g，添加剂预混合饲料 1g，准确至 0.0001g）置于 50 mL 离心管中，加盐酸溶液 40 mL，盖好盖，置于磁力搅拌器上搅拌提取 25 min，于离心机上 3000 r/min~4000 r/min 离心 10 min。上清液转移至 100 mL 容量瓶中，再分别用 35 mL、25 mL 盐酸溶液提取两次，汇集上清液，并用盐酸溶液稀释至刻度，摇匀，用中速定量滤纸过滤，滤液备用。</p> <p>浓缩饲料和添加剂预混合饲料上述滤液需要分别做 5 倍和 10 倍稀释。</p>	称取试样 2 g，精确至 0.0001 g，置于 50 mL 聚丙烯离心管中，加入 20 mL 0.1mol/L 盐酸溶液，涡旋 1 min，超声提取 30 min，7 000 r/min 离心 10 min，上清液备用。

6	液相色谱法净化步骤	分别用 1 mL 甲醇和 1mL 水活化固相萃取小柱，然后准确加载 1.00 mL 样品提取液于固相萃取小柱，并以不超过 1.0 mL/min 的流速过柱。然后分别用 1.0 mL 盐酸溶液和 1.0 mL 甲醇各淋洗一次，用氨水甲醇溶液洗脱至 10mL 试管中，然后置于 60℃水浴中，用氮气吹干。用 1.00 mL 硼酸盐缓冲溶液溶解后，待上机测定。	依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化固相萃取小柱，准确移取 5 mL 备用液过柱，控制流速不超过 1 mL/min。分别用 5 mL 0.1mol/L 盐酸溶液、5 mL 甲醇淋洗，抽干，用 5 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱，收集洗脱液于聚丙烯离心管中，在 60℃氮气吹干。准确加入 1 mL 硼酸盐缓冲溶液溶解后，过微孔滤膜于聚丙烯瓶，待测。																					
7	液相色谱法色谱条件	色谱柱：C18柱，柱长300 mm，内径3.9 mm，粒径5 μm，或性能相当者。 柱温：室温。 流动相：流动相A+流动相B=1+1（v/v），流速1.0 mL/min，洗脱时间15 min。 检测器：激发波长230 nm，发射波长389 nm。 进样量：100 μL。	色谱柱：C18柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者。 柱温：30℃。 检测器：激发波长230 nm，发射波长389 nm。 进样量：20 μL。 流动相：流动相A+流动相B，流速1.0 mL/min，洗脱时间15 min，梯度洗脱。 <table><tr><td>时间/min</td><td>A/%</td><td>B/%</td></tr><tr><td>0.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>3.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>5.50</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>8.50</td><td>30</td><td>70</td></tr><tr><td>8.51</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>15.00</td><td>95</td><td>5</td></tr></table>	时间/min	A/%	B/%	0.00	95	5	3.00	95	5	5.50	75	25	8.50	30	70	8.51	95	5	15.00	95	5
时间/min	A/%	B/%																						
0.00	95	5																						
3.00	95	5																						
5.50	75	25																						
8.50	30	70																						
8.51	95	5																						
15.00	95	5																						
8	液相色谱-串联质谱法	无	增加液相色谱-串联质谱法																					

3 主要技术内容的确定依据

3.1 高效液相色谱法

遵照原标准中高效液相色谱法的试验条件,称取猪配合饲料 5 g、猪浓缩饲料 2 g、牛精料补充料 2 g、猪复合预混合饲料 1 g,准确至 0.0001 g,置于 50 mL 离心管中,向其中添加安普霉素标准储备液(添加浓度为 10 mg/kg)。然后加入 0.10 mol/L 盐酸溶液 40 mL,盖好盖,振荡提取 25 min,于离心机上 4000 r/min 离心 10 min。将离心后的上清液转移至 100 mL 容量瓶中,再分别用 35 mL、25 mL 0.10 mol/L 盐酸溶液提取残渣两次,汇集上清液,并用 0.10 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,用中速定量滤纸过滤,滤液备用。

分别用 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化 MCX 固相萃取小柱,然后准确加载 1 mL 样品提取液于固相萃取小柱,缓慢过柱,然后分别用 1 mL 0.10 mol/L 盐酸溶液和 1 mL 甲醇各淋洗一次,吹干,用 5 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱至 10 mL 试管中,置于 60 °C 水浴中氮气吹干。用 1 mL 硼酸盐缓冲液(准确称取 24.73 g 硼酸于 1 000 mL 烧杯中,用约 900 mL 水溶解,然后用 6 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 9.5,用水定容至刻度)溶解后,待上机测定。

取安普霉素标准中间液(100 µg/mL)0.125 mL、0.25 mL、0.5 mL、1.25 mL、2.5 mL 分别于 25.0 mL 容量瓶中,用硼酸盐缓冲溶液稀释至刻度,摇匀,其浓度分别为 0.500 µg/mL、1.00 µg/mL、2.00 µg/mL、5.00 µg/mL 和 10.0 µg/mL。此为安普霉素标准工作液。

准确移取安普霉素标准工作液和加标样品液 0.4 mL 置于高效液相色谱仪的进样瓶中，加入 0.2 mL 的衍生试剂（准确称取 0.134 g 邻苯二甲醛于 25 mL 棕色容量瓶中，依次加 5 mL 甲醇、0.1 mL 2-巯基乙醇，混合溶解，并用硼酸盐缓冲溶液定容至刻度）混合，控制衍生时间 5.0 min，立即进样，进行分离测定。

由原方法中公式求得猪配合饲料、猪浓缩饲料、牛精料补充料、猪复合预混合饲料中安普霉素加标 10 $\mu\text{g/mL}$ 回收率分别为 85.9%、87.2%、86.7%、92.6%，表明原标准高效液相色谱法对于饲料中安普霉素的测定切实可行。但是，原标准提取过程繁琐且浪费试剂，出峰时间早，样品峰与试剂峰不能完全分离。因此，本方法在原标准的基础上做出如下优化。

3.1.1 流动相组成及梯度的确定

在现有流动相组成及梯度下，安普霉素出峰时间早，其色谱图见图 2。通过进一步优化洗脱梯度，在表 4 所示梯度洗脱程序下效果较优，其色谱图见图 3。

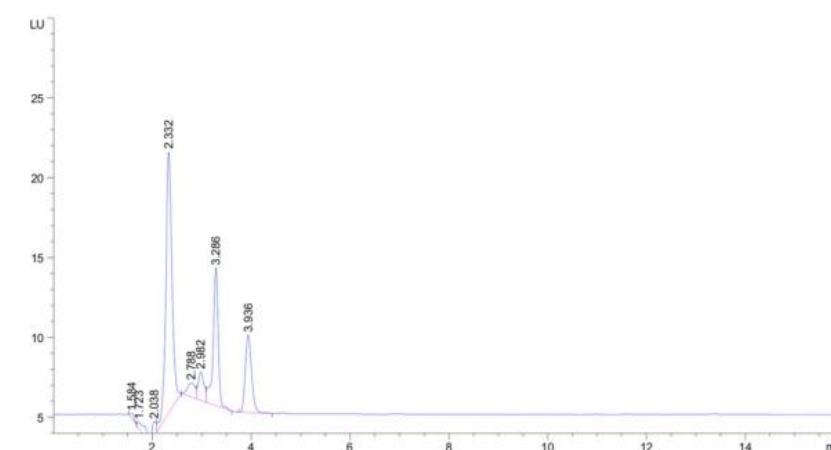


图 2 等梯度下安普霉素标准溶液液相色谱图谱（2 $\mu\text{g/mL}$ ）

表 4 液相色谱梯度洗脱程序

时间 (min)	A 相 (10 mmol/L 乙酸铵 —4%乙酸溶液: %)	B 相 (乙腈: %)
0.00	95	5
3.00	95	5
5.50	75	25
8.50	30	70
8.51	95	5
15.00	95	5

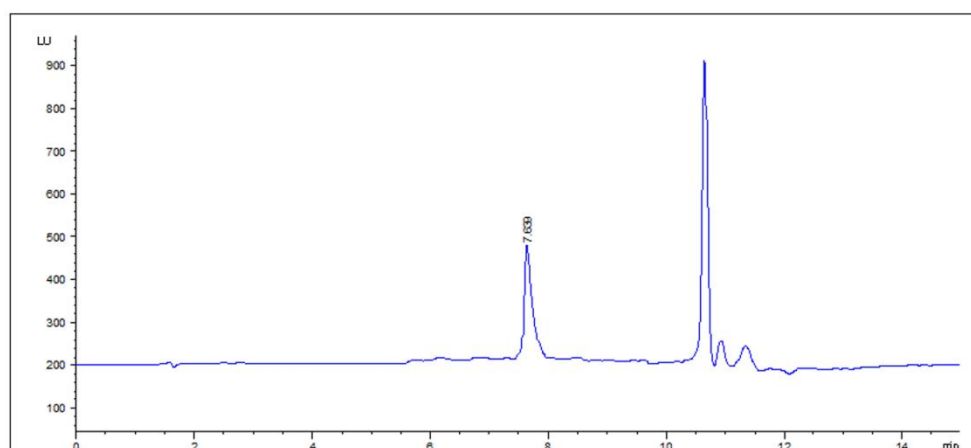


图 3 梯度洗脱程序下安普霉素标准溶液液相色谱图谱 (2 $\mu\text{g/mL}$)

3.1.2 提取液的确定

安普霉素等氨基糖苷类抗生素易溶于水，微溶于乙醇，查阅相关文献，其提取液多采用低浓度盐溶液。本项目选取小猪配合料，比较了以下 6 种提取液：

- (1) 5%三氯乙酸溶液；
- (2) 10%三氯乙酸溶液 18 mL+10 mmol/L 乙酸铵溶液 2 mL
- (3) 5%甲酸溶液；

(4) 乙酸铵缓冲溶液：称取 0.77 g 乙酸铵，加入 900 mL 水，用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 为 4.0，再加入 0.15 g 乙二胺四乙酸二钠、5 g 氯化钠和 20 g 三氯乙酸，混匀，加水至刻度，混匀；

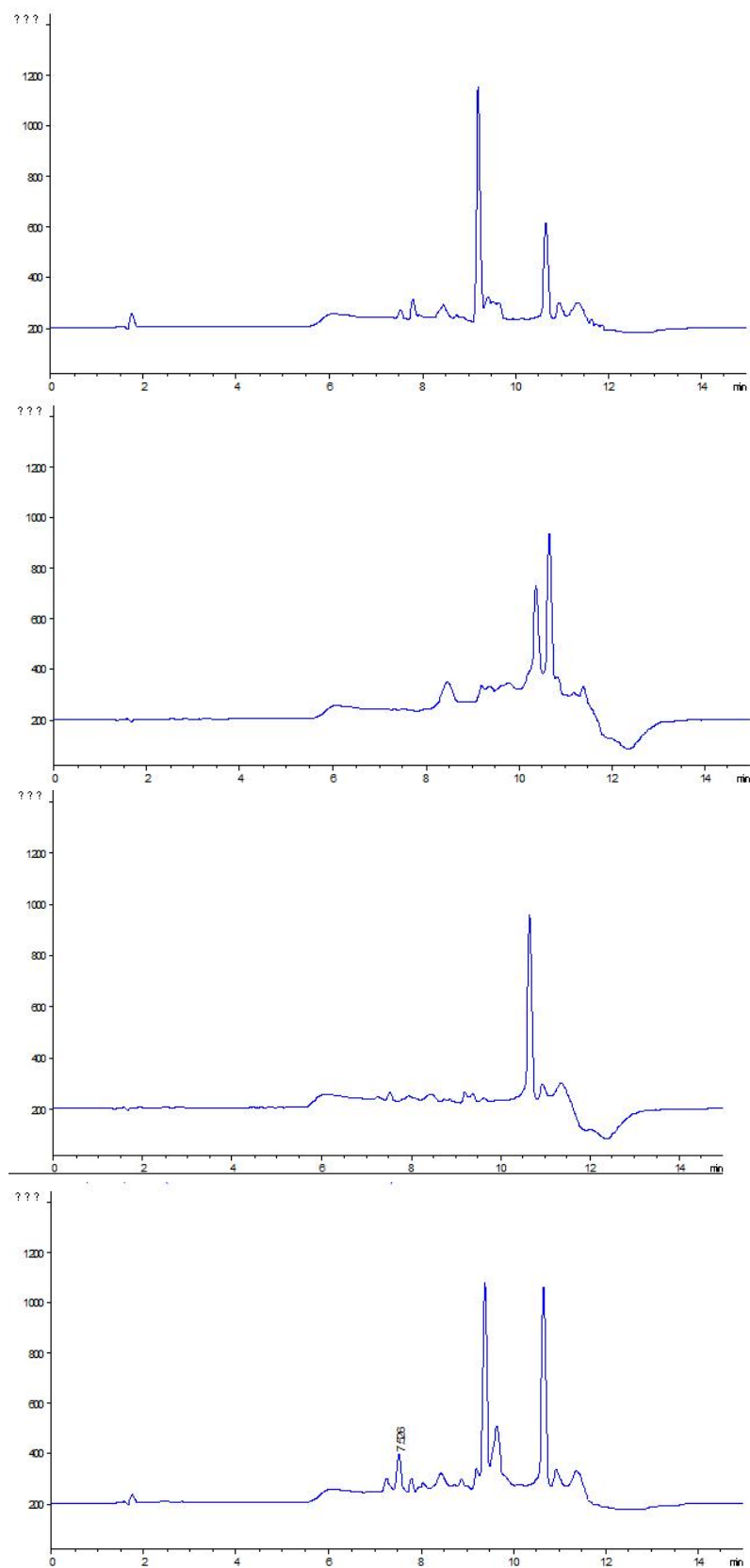
(5) 磷酸盐缓冲溶液：准确称取 1.36 g 磷酸二氢钾，用 980 mL 水溶解，并用 1.0 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 4.0，然后分别加入 0.15 g 乙二胺四乙酸二钠和 20 g 三氯乙酸，溶解混匀并定容至 1000 mL；

(6) 0.1 mol/L 盐酸溶液。

平行做两份试验，提取、净化、衍生过程同原标准，进行分离测定，6 种提取液对安普霉素的添加回收试验结果见表 5，色谱图见图 4。比较色谱图并结合回收率结果，表明原标准所选 0.1 mol/L 盐酸溶液做提取液时，提取效果好且试剂干扰小，最终确定为本试验的提取液。

表 5 6 种提取液对安普霉素的添加回收试验结果（高效液相色谱法）

提取液	平均回收率（，%）
5%三氯乙酸溶液	/
10%三氯乙酸溶液 18 mL +10 mmol/L 乙酸铵溶液 2 mL	/
5%甲酸溶液	/
乙酸铵缓冲溶液	38.52
磷酸盐缓冲溶液	61.58
0.1 mol/L 盐酸溶液	87.52



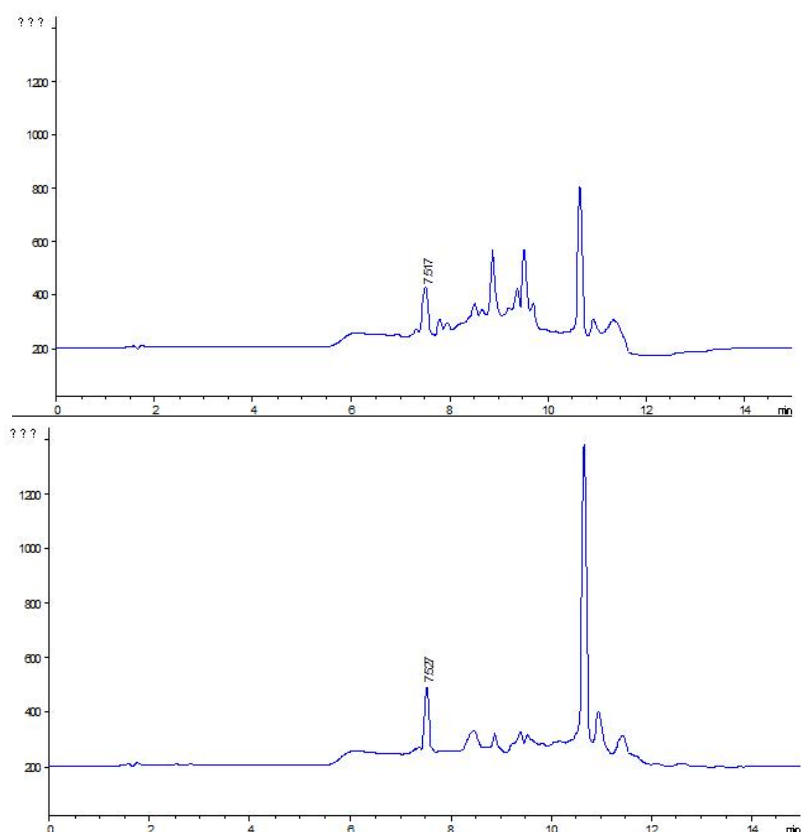


图4 6种提取液对安普霉素的添加回收图谱（高效液相色谱法）
从上往下分别是：5%三氯乙酸溶液；10%三氯乙酸溶液+乙酸铵溶液；5%甲酸溶液；乙酸铵缓冲溶液；磷酸盐缓冲溶液；0.1 mol/L 盐酸溶液。

3.1.3 提取液体积和提取方式的确定

蔡春燕等（2014）在饲料中安普霉素前处理的提取过程中对超声提取和振荡提取两种方法进行对比发现，超声提取的回收率高达74%~93%，而振荡提取的回收率只有40%~53%。因此，本项目选取了超声提取。对于超声提取的方式，本项目试验了四种条件，分别为：

（1）20 mL 提取液振荡提取 30 min 一次；（2）20 mL 提取液超声提取 30 min 一次；（3）20 mL 提取液振荡提取 30 min 一次后，再加入 20 mL 提取液振荡提取残渣一次；（4）20 mL 提取液超声提取 30 min 一次后，再加入 20 mL 提取液超声提取残渣一次。其回收率结果见图5。由图5得出，超声提取两次时回收率最高，但考虑提取液体积对

回收率影响不大，40 mL 提取液造成了试剂浪费，最终确定提取液体积为 20 mL，提取方式为超声提取。

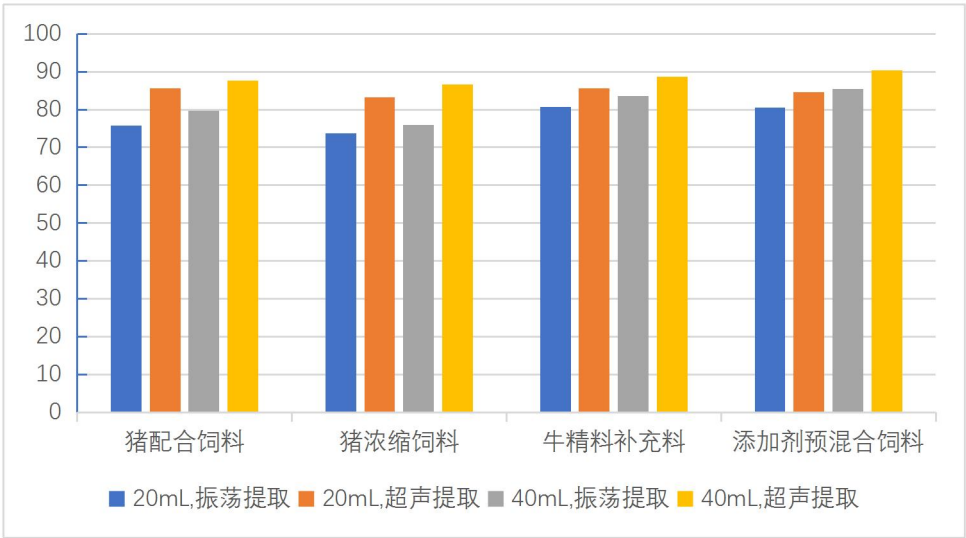


图 5 提取液体积和提取方式对不同饲料的回收率试验结果

3.1.4 衍生时间的确定

取安普霉素标准储备溶液，用硼酸盐缓冲溶液稀释成浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的上机液，取 0.4 mL 置于高效液相色谱仪的进样瓶中，加入 0.2 mL 的衍生试剂邻苯二甲醛，衍生 5 min 开始上机测定，连续测定 10 次，每次测定时间为 15 min。其峰面积变化如图 6 所示。结果显示，在衍生后 5 min - 20 min 时，衍生化合物峰面积变化较大。

在衍生后的 0 - 10 min 内，用荧光分光光度计每分钟测定衍生物荧光值，其对应的变化如图 7 所示，由图可以看出 0-2 min 内衍生物的荧光值快速下降，在 5-10 min 内较稳定。根据图 6 和图 7 综合考虑，安普霉素的衍生产物在 5-10min 内较稳定，确定衍生时间为 5 min，然后立刻上液相色谱仪测定。

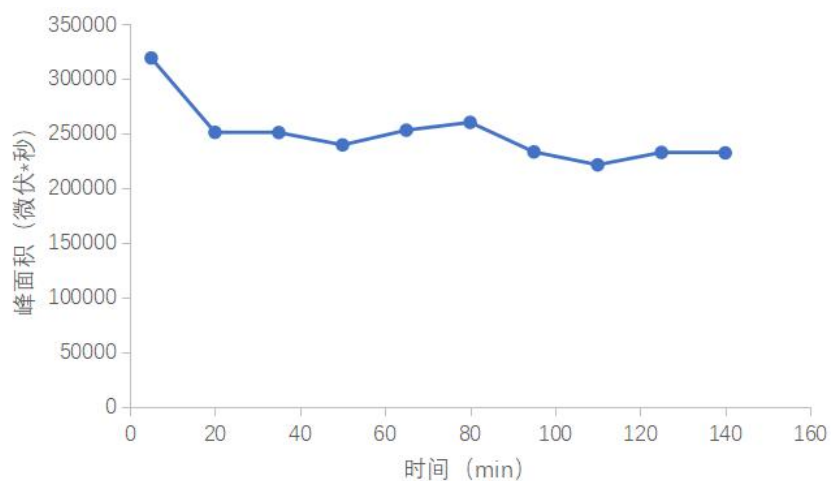


图 6 衍生时间对安普霉素衍生物液相色谱峰面积的影响

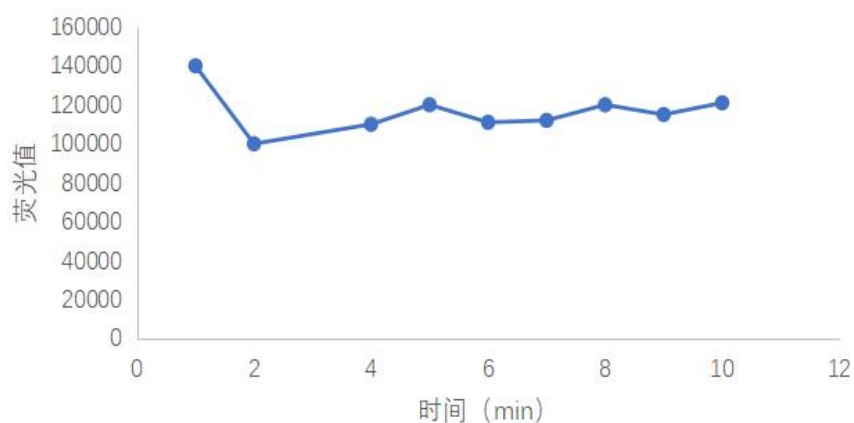


图 7 衍生时间对安普霉素衍生物荧光值的影响

3.1.5 方法学考察

3.1.5.1 检出限和定量限

在本试验条件下，在空白饲料中添加不同浓度的安普霉素标准溶液，经提取测定，根据信噪比（S/N） ≥ 3 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出方法的检出限为 2 mg/kg，信噪比（S/N） ≥ 10 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出方法的定量限为 5 mg/kg。

3.1.5.2 线性范围

将浓度分别为 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的安普霉素标准工作液衍生后分别进样 20 μL ，以进样浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标，以峰面积为纵坐标，做标准曲线。结果表明，安普霉素标准工作液在 0.500 $\mu\text{g/mL}$ ~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内有良好的线性关系， R^2 为 0.9993。标准曲线和回归方程见图 8。

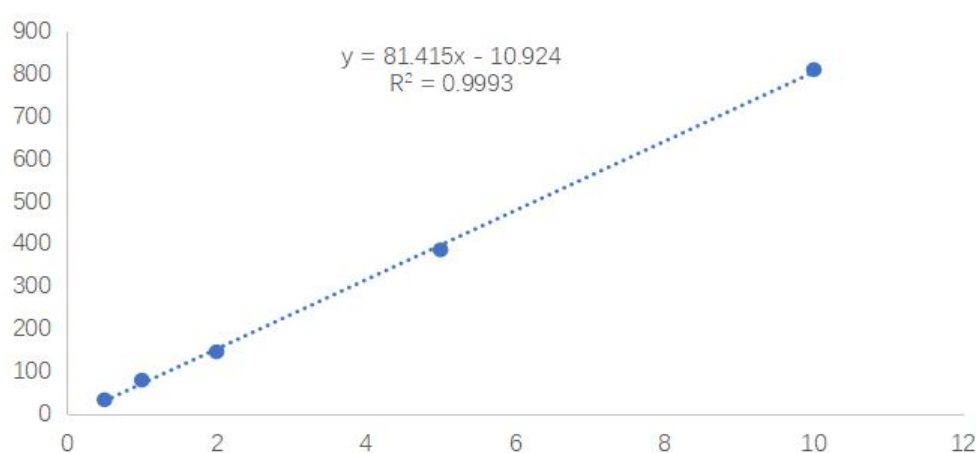


图 8 安普霉素标准曲线和回归方程（高效液相色谱法）

3.1.5.3 方法的准确度和精密度

为了考察方法准确度和精密度，对猪配合饲料、鸡配合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、猪用复合预混合饲料、畜禽用维生素预混合饲料进行了加标回收试验。采用低、中、高3个水平的添加量，每个水平平行测定5份，重复3次，批内、批间相对标准偏差结果见表6~表12。猪配合饲料、鸡配合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、猪复合预混合饲料、维生素预混合饲料的空白、10倍定量限添加浓度的添加回收图谱见图9~图15。

结果表明，在浓度范围 5 mg/kg ~500 mg/kg 的添加回收试验中，

安普霉素的液相色谱法回收率在 71.59%~105.63%，方法的批内相对标准偏差在 5.46%~11.98%，批间相对标准偏差在 6.45%~9.32%。

表 6 猪配合饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	81.03	86.52	91.56	78.24	95.23	86.52	8.17	88.87	7.77
	89.63	102.36	92.42	80.98	95.46	92.17	8.52		
	85.26	95.86	80.35	90.63	87.51	87.92	6.61		
50	86.53	93.56	90.85	76.98	81.47	85.88	7.87	88.27	8.20
	83.96	87.52	89.53	105.63	95.53	87.62	9.69		
	80.89	93.25	87.63	80.29	90.36	86.48	6.64		
100	80.29	86.58	92.15	79.63	97.26	87.18	8.72	86.53	8.98
	94.52	76.89	87.52	85.36	82.57	85.37	7.59		
	84.26	101.53	81.20	74.98	93.20	87.03	11.98		

表 7 鸡配合饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	86.32	89.52	98.21	81.05	93.20	89.66	7.29	87.69	8.75
	89.56	102.36	82.41	95.42	79.13	89.78	10.54		
	76.69	85.59	81.49	80.49	93.85	83.62	7.82		
50	93.50	103.25	98.52	89.63	80.29	93.04	9.44	90.30	7.86
	82.59	98.52	87.52	86.95	90.27	89.17	6.62		
	84.53	96.82	89.63	93.52	79.03	88.71	7.99		
100	86.59	103.21	95.86	81.53	82.47	89.93	10.38	88.70	8.42
	86.95	92.58	83.65	80.49	101.79	89.09	9.42		
	87.69	82.21	94.50	90.26	80.79	87.09	6.52		

表 8 猪浓缩饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	84.76	75.26	97.42	80.28	90.62	85.67	10.12	86.75	8.99
	90.26	86.59	102.43	82.47	84.10	89.17	8.94		
	95.41	85.47	82.16	89.63	74.32	85.40	9.28		
50	81.13	92.15	84.25	96.74	89.63	88.78	7.00	89.50	6.56
	87.59	90.89	96.53	81.28	95.81	90.42	6.95		
	93.52	89.36	97.17	85.42	81.05	89.30	7.15		
200	80.49	87.56	92.58	104.52	83.32	89.69	10.55	87.15	8.90
	73.58	89.01	80.59	86.52	94.52	84.84	9.48		
	89.63	80.49	81.59	96.31	86.52	86.91	7.40		

表 9 鸡浓缩饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	81.59	95.46	82.35	86.58	101.63	89.52	9.75	88.08	9.32
	96.43	85.49	71.59	93.25	81.75	85.70	11.48		
	85.37	90.38	100.86	82.18	86.34	89.03	8.13		
50	93.52	80.02	82.48	86.95	87.52	86.10	6.03	87.24	7.05
	85.49	80.59	97.63	82.97	91.52	87.64	7.88		
	96.85	82.19	80.49	85.63	94.82	88.00	8.44		
200	84.59	80.76	92.58	94.52	83.25	87.14	6.94	85.97	6.83
	86.52	78.59	93.15	82.19	89.54	86.00	6.71		
	89.57	92.48	75.54	85.97	80.29	84.77	8.11		

表 10 牛精料补充料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	86.26	82.57	100.54	93.58	80.59	88.71	9.32	89.64	8.49
	89.63	81.25	85.52	97.26	93.52	89.44	7.08		
	82.15	97.13	81.49	89.52	103.54	90.77	10.53		
50	84.56	80.57	93.85	87.69	81.57	85.65	6.26	87.91	6.45
	96.45	91.82	89.20	86.85	83.59	89.58	5.46		
	87.59	83.59	90.24	99.54	81.52	88.50	7.96		
100	89.63	80.49	82.13	94.52	74.39	84.23	9.39	86.31	9.14
	92.48	81.59	103.49	79.32	87.34	88.84	10.87		
	94.51	89.63	76.39	82.19	86.52	85.85	8.08		

表 11 猪用复合预混合饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	86.63	80.19	104.69	94.52	83.29	89.86	10.97	88.60	8.88
	96.58	83.29	92.09	80.41	85.20	87.51	7.60		
	82.56	86.52	80.12	91.50	101.46	88.43	9.57		
50	89.24	82.49	86.52	81.45	95.81	87.10	6.64	86.11	7.48
	84.52	76.38	95.24	80.51	89.63	85.26	8.71		
	86.52	81.02	89.52	95.86	76.89	85.96	8.58		
500	89.66	94.52	100.46	97.03	82.49	92.83	7.53	90.34	7.59
	85.49	87.01	80.29	98.31	93.52	88.92	7.94		
	81.08	83.59	99.63	89.63	92.45	89.28	8.25		

表 12 畜禽用维生素预混合饲料液相色谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
5	93.56	87.59	80.26	79.28	82.49	84.64	7.01	86.08	6.63
	86.52	81.59	84.59	96.51	80.21	85.88	7.49		
	80.41	91.56	87.56	94.56	84.58	87.73	6.37		
50	86.57	83.35	81.49	91.58	97.63	88.12	7.43	88.05	8.60
	89.52	98.32	87.59	81.05	100.58	91.41	8.77		
	80.79	85.69	76.38	97.68	82.59	84.63	9.50		
500	87.56	84.52	83.57	80.21	96.89	86.55	7.33	87.41	8.15
	98.02	101.23	85.36	79.38	81.08	89.01	11.23		
	94.52	80.57	85.49	90.26	82.49	86.67	6.59		

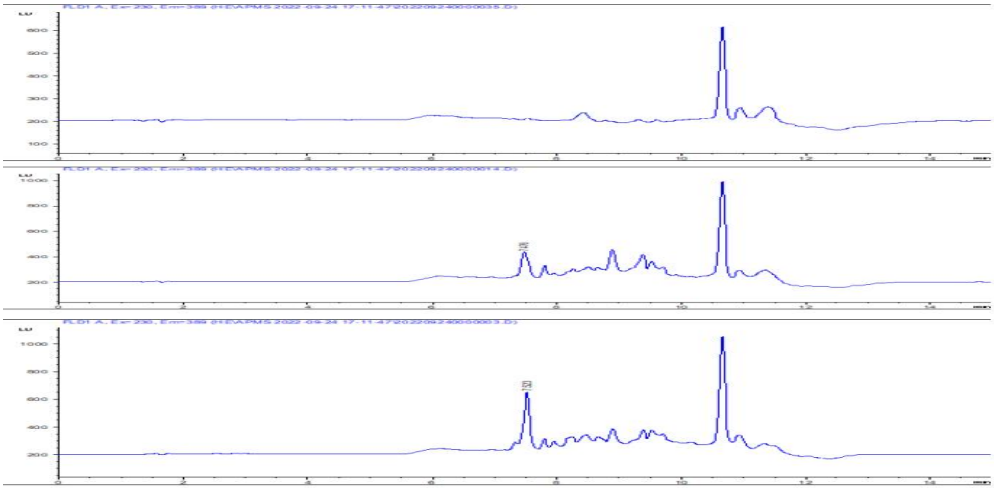


图 9 猪配合饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱法图谱

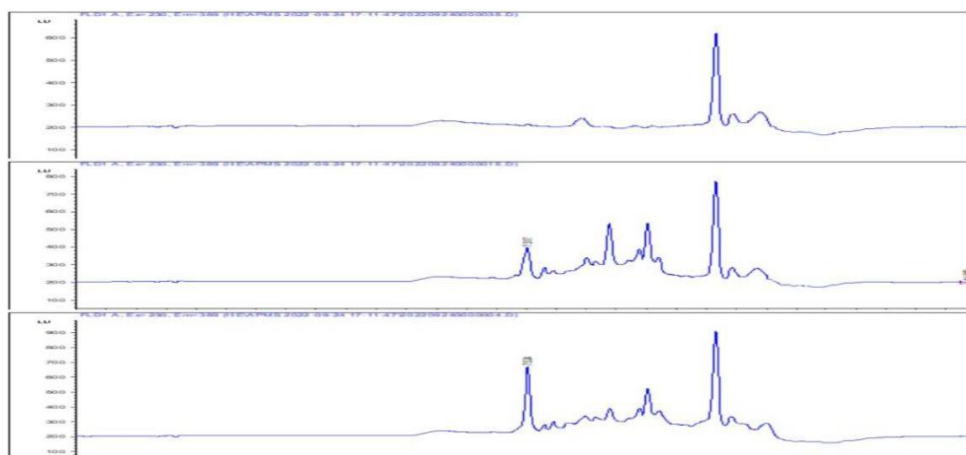


图 10 鸡配合饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱法图谱

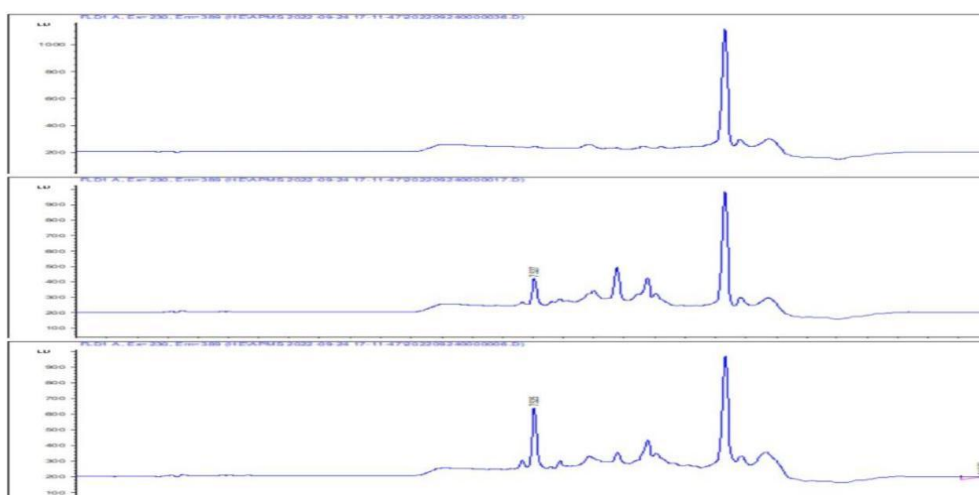


图 11 猪浓缩饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱法图谱

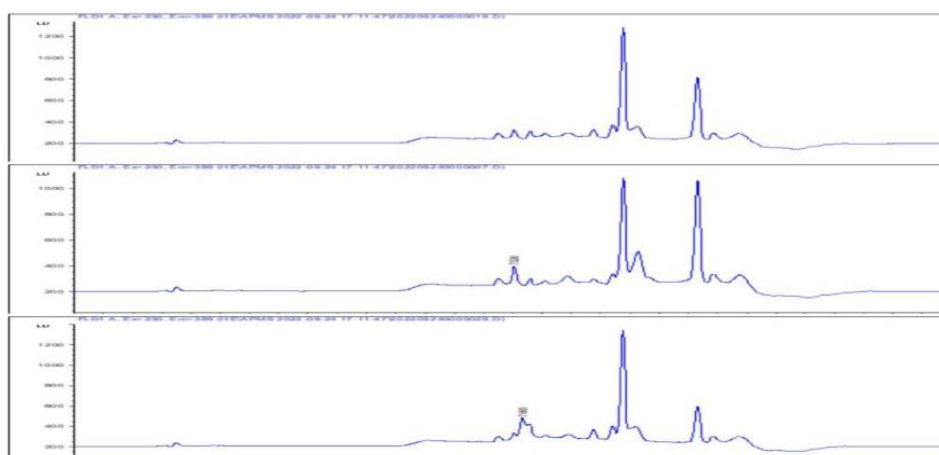


图 12 鸡浓缩饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱法图谱

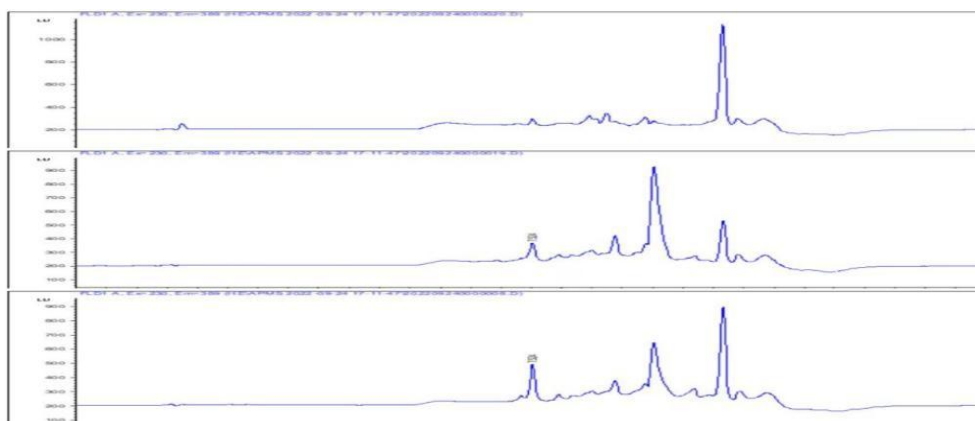


图 13 牛精料补充料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱图谱

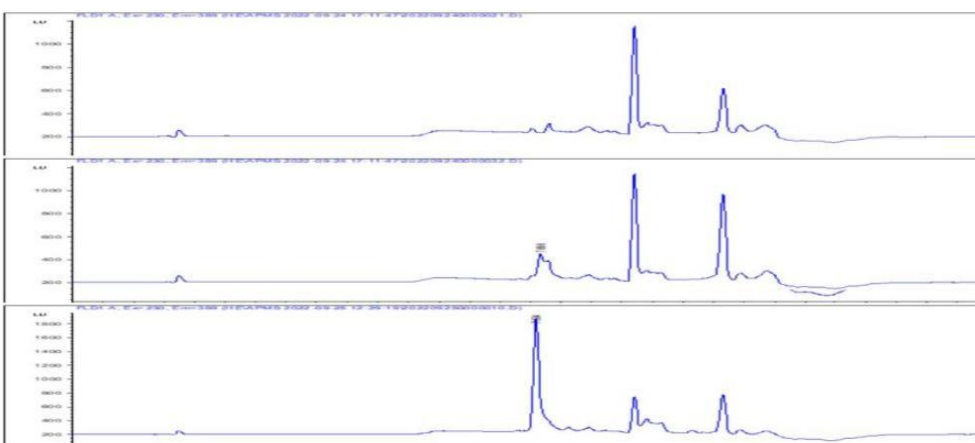


图 14 猪用复合预混合饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱图谱

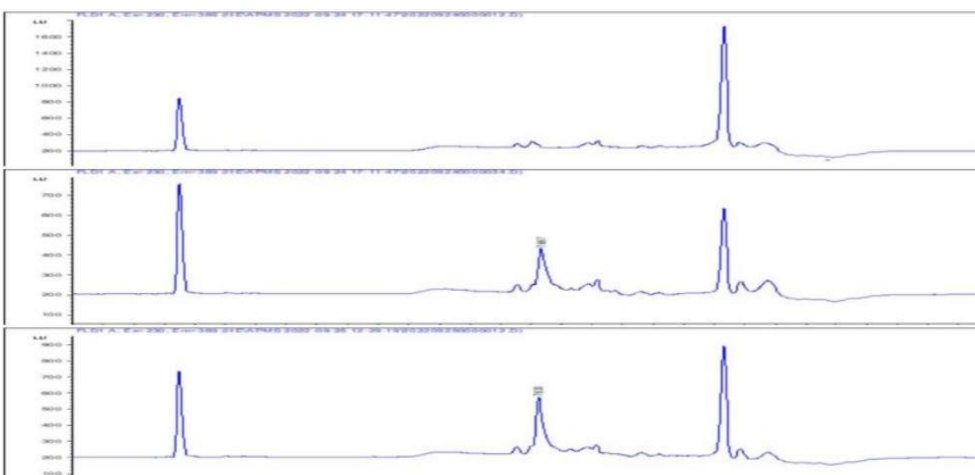


图 15 畜禽用维生素预混合饲料空白（上）、添加浓度为 5 mg/kg（中）和 50 mg/kg（下）液相色谱法图谱

3.2 液相色谱-串联质谱法

3.2.1 色谱柱的选择

安普霉素等 AGs 结构上含有羟基、氨基等基团，易溶于水，极性较强，用 C18 色谱柱为反相色谱柱，则目标药物保留较弱，文献多在流动相中加入离子对试剂如七氟丁酸、五氟丙酸等，增强其在柱上的保留。本研究前期研究也发现加入离子对试剂后，分离效果和响应均较好，其色谱图如图 16。

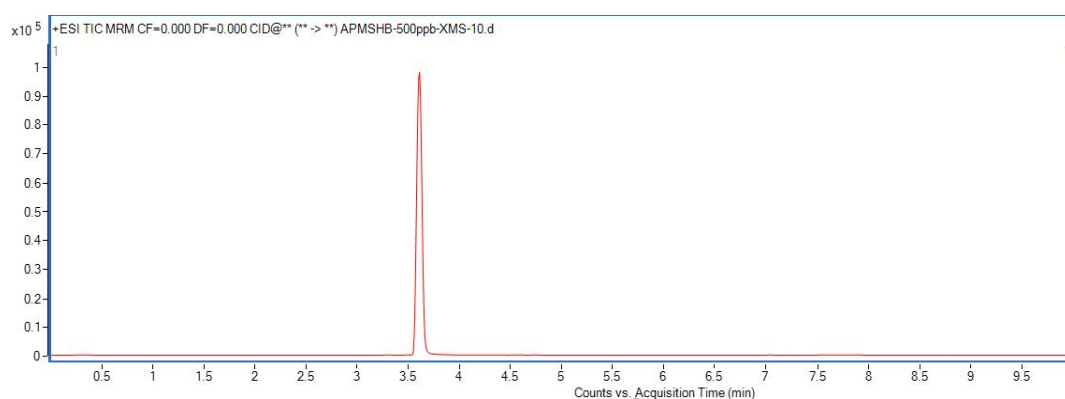


图 16 安普霉素标准溶液图谱（添加离子对试剂，500 ng/mL）

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，长期使用离子对试剂会严重抑制质谱仪的电喷雾离子化效果，降低仪器灵敏度，对实验结果的重复性和重现性也有一定影响，对仪器后续使用影响较大。因此，本项目不添加离子对试剂，比较了色谱柱 Waters ACQUITY BEH C18（2.1×100mm，1.7μm）、Waters ACQUITY BEH HILIC（2.1×100mm，1.7μm）和 Waters ACQUITY BEH Amide（2.1×100mm，1.7μm）对安普霉素的分离效果，其色谱图见图 17。结果表明酰胺基（Amide）色谱柱较 C18 反相柱和 BEH HILIC 正相柱，具有易保留与分离强极性分析物的特点，因此，最终选择

ACQUITY UPLC BEH Amide 作为实验方法的分析柱。

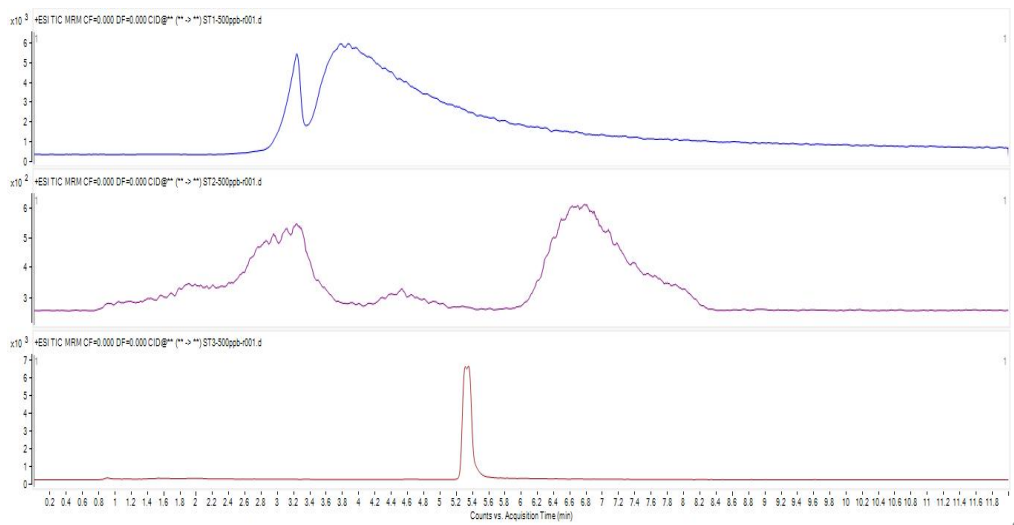


图 17 不同色谱柱对安普霉素标准溶液的分离效果图谱（500 ng/mL）
从上往下分别是：C18；HILIC；Amide。

3.2.2 流动相的选择

考虑到标准的推广应用，本项目查阅文献发现，在不添加离子对试剂的前提下，检测安普霉素的有机相多用乙腈，甲醇，水相多用无机盐溶液，因此比较了表 13 所示流动相，在梯度洗脱为 50:50 (v: v) 时，其色谱图见图 18。

表 13 液相色谱-串联质谱法流动相组成（50:50）

序号	有机相	水相	色谱图
1	甲醇	0.4%甲酸水	见图 18 中谱图 1
2		1%甲酸水	见图 18 中谱图 2
3		1%甲酸水(含 10mmol/L 乙酸铵)	见图 18 中谱图 3
4	乙腈	0.4%甲酸水	见图 18 中谱图 4
5		1%甲酸水	见图 18 中谱图 5
6		1%甲酸水(含 10mmol/L 乙酸铵)	见图 18 中谱图 6

7	乙腈 (含 1%甲酸 水, 2mmol/L 乙酸铵)	0.4%甲酸水	见图 18 中谱图 7
8		1%甲酸水	见图 18 中谱图 8
9		1%甲酸水(含 2mmol/L 乙酸铵)	见图 18 中谱图 9
10		1%甲酸水(含 10mmol/L 乙酸铵)	见图 18 中谱图 10
11	乙腈(含 1% 甲酸水)	0.4%甲酸水	见图 18 中谱图 11
12		1%甲酸水	见图 18 中谱图 12
13		1%甲酸水(含 10mmol/L 乙酸铵)	见图 18 中谱图 13

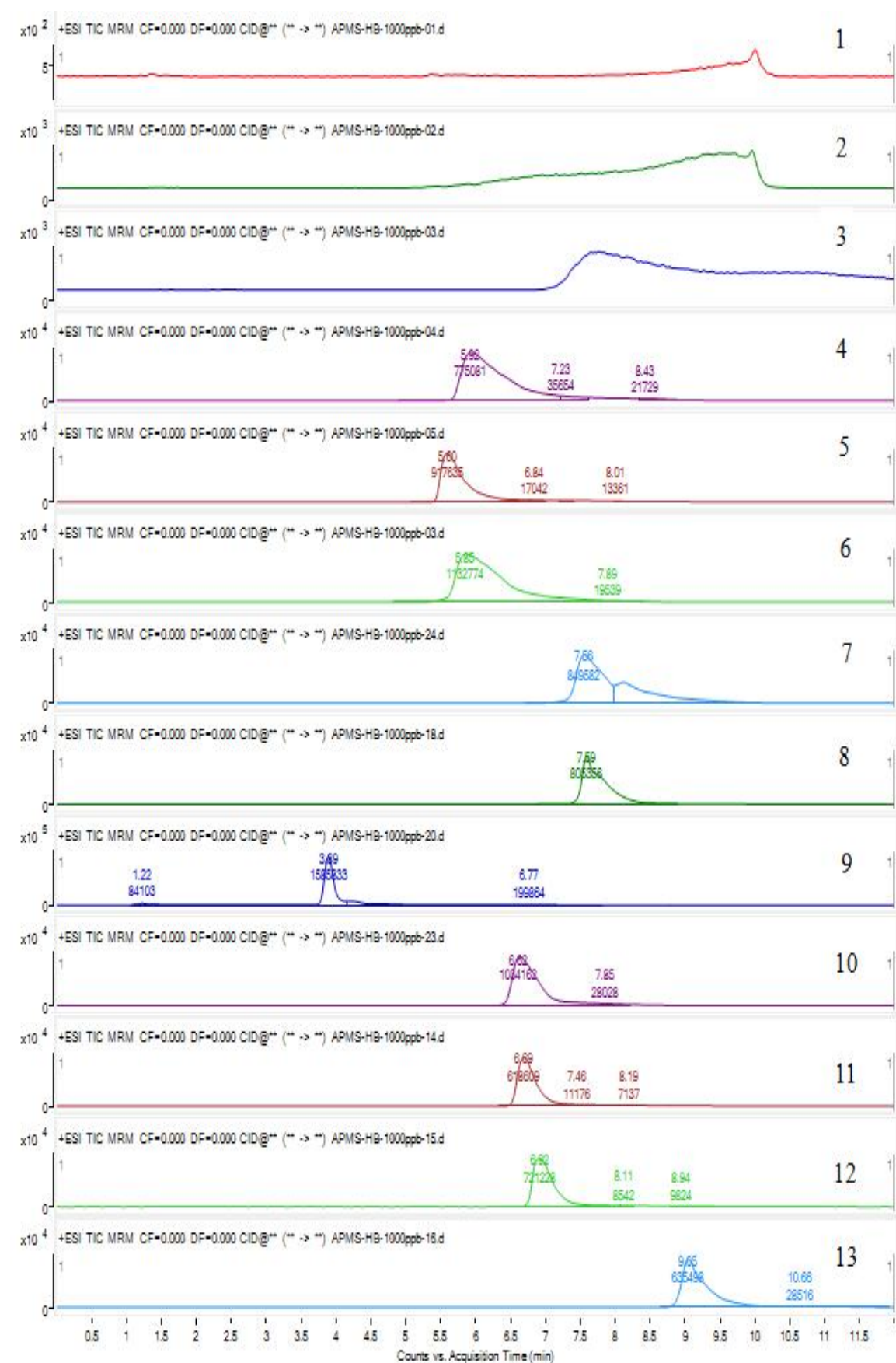


图 18 不同流动相下安普霉素混合标准溶液 (1 000 ng/mL) 图谱

通过比较色谱图峰形并计算回收率，结果表明，在有机相为乙腈（含 1%甲酸，2 mmol/L 乙酸铵），水相为 1%甲酸溶液（含 2 mmol/L 乙酸铵）时，安普霉素响应较高、峰形良好。采用梯度洗脱方式能更好的分离杂质、减小峰宽、保护色谱柱。经优化，色谱条件确定如下：

柱温：35 °C

流速：0.3 mL/min

进样量：10 µL

流动相：A 相：乙腈（含 1%甲酸，2 mmol/L 乙酸铵）；

B 相：1%甲酸溶液（含 2 mmol/L 乙酸铵）。

梯度洗脱程序见表 14。

表 14 液相色谱-串联质谱梯度洗脱程序

时间（min）	A 相（%）	B 相（%）
0.0	80	20
2.5	80	20
3.5	35	65
5.5	10	90
6.7	10	90
7.5	80	20
12.0	80	20

此流动相及梯度洗脱条件下的安普霉素混合标准溶液图谱见图 19。

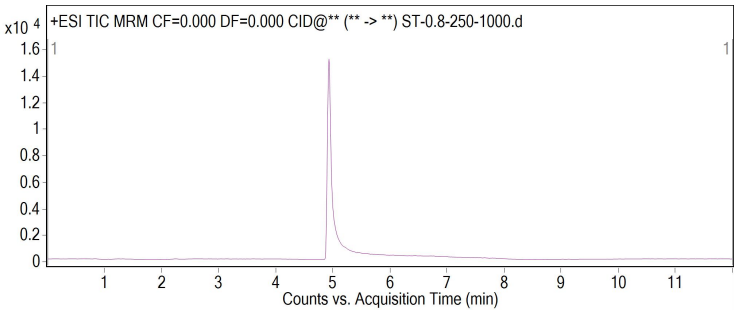


图 19 梯度洗脱下安普霉素混合标准溶液图谱（1000 ng/mL）

3.2.3 质谱条件的确定

将安普霉素标准溶液和其内标（安普霉素-D₇）标准溶液进行质谱扫描获得一级和二级质谱图,其对应的二级质谱图见图 20 和图 21。

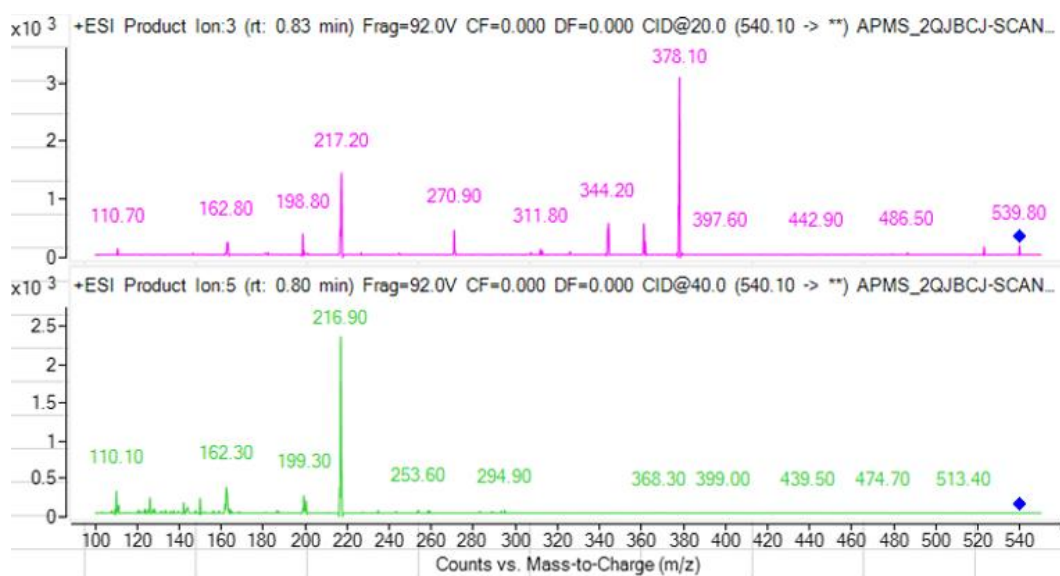


图 20 安普霉素标准溶液二级质谱图

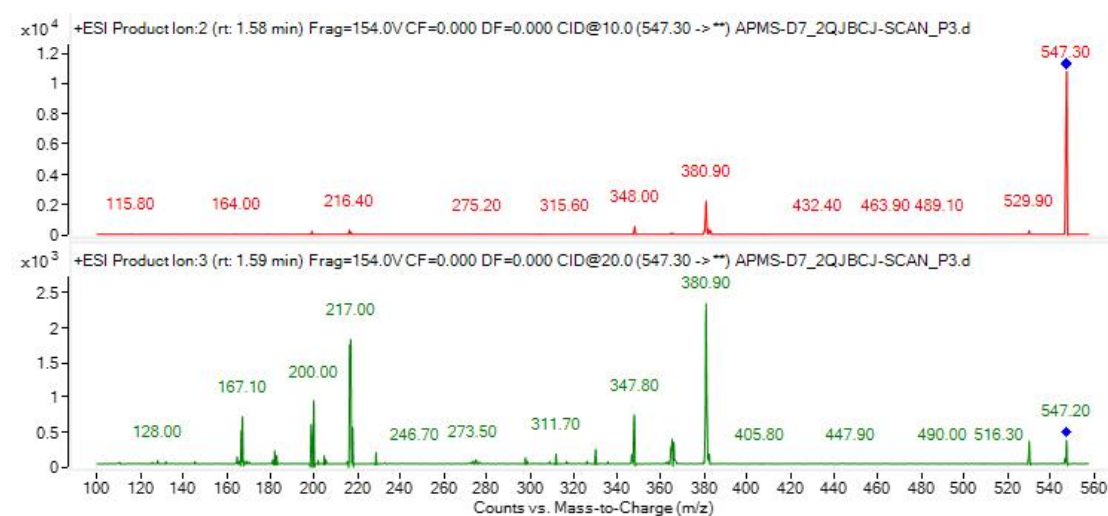


图 21 安普霉素-D7 标准溶液二级质谱图

选择响应值最高、干扰最小的且具有代表性的两对离子分别作为定量离子对和定性离子对。选择正离子扫描模式多反应监测，优化毛细管电压、碰撞能量等质谱参数，获得最终质谱参考条件：

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

毛细管电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度；

定性离子对、定量离子对等参数见表 15。在优化条件下的特征离子色谱图见图 22。

表 15 安普霉素及其内标的定性、定量离子对参考值

名 称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
安普霉素	540.1/216.9	540.1/378.0
	540.1/378.0	
安普霉素-D ₇	547.3/217.0	547.3/381.1
	547.3/381.1	

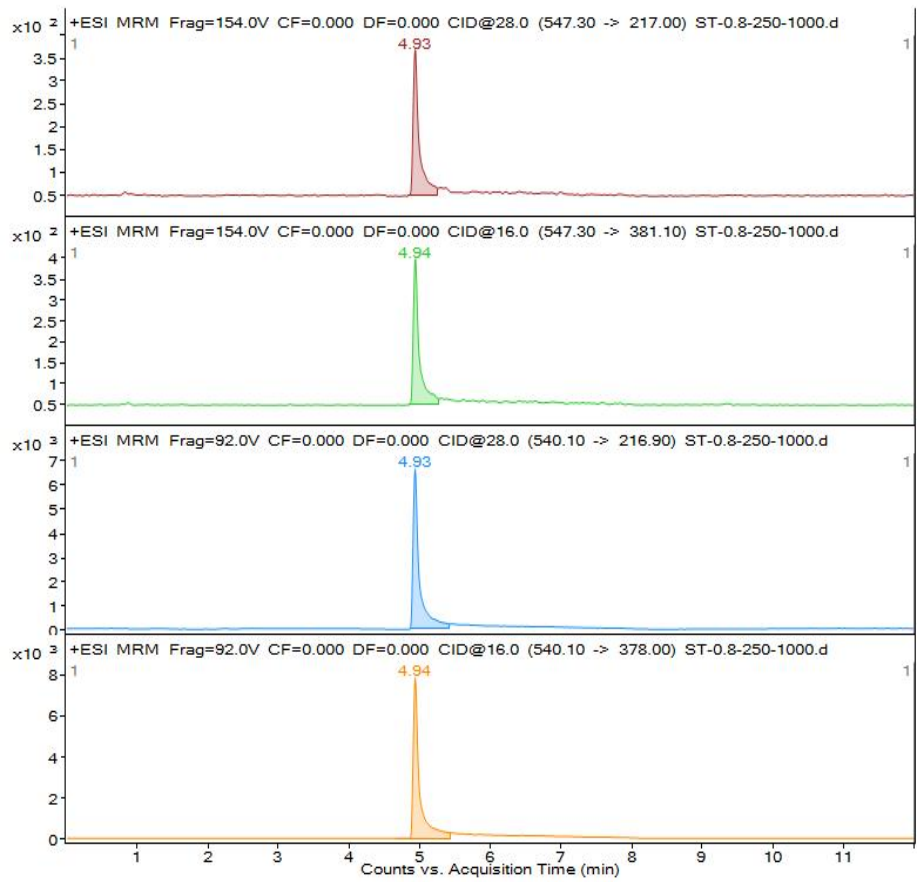


图 22 安普霉素和其内标（安普霉素-D7）标准溶液特征离子色谱图

3.2.4 提取净化条件的确定

3.2.4.1 提取液的确定

由于饲料基质复杂，且其中存在多种物质的干扰，直接提取过柱回收率低，无法达到实验要求，因此在实验过程中选择添加内标物质安普霉素-D7，以提高其回收率。

查阅相关文献后，本实验选取小猪配合饲料，比较了以下 6 种提取液：

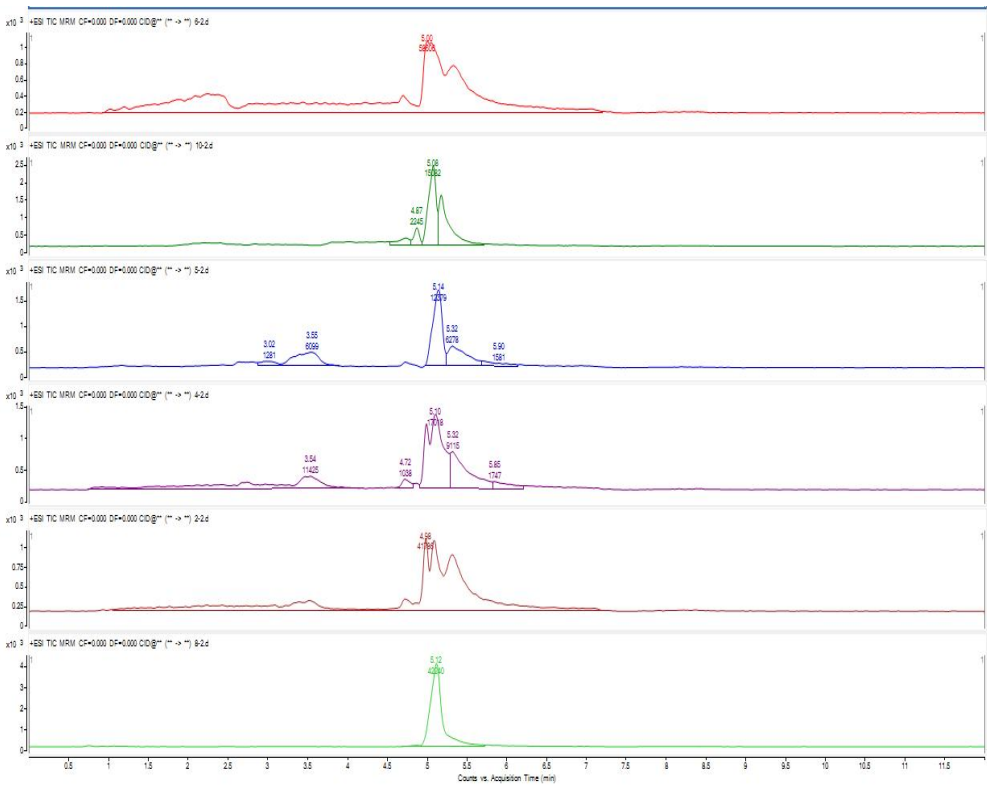
- (1) 5%三氯乙酸溶液；
- (2) 10%三氯乙酸溶液 18 mL+10 mmol/L 乙酸铵溶液 2 mL；
- (3) 磷酸盐缓冲溶液：准确称取 1.36 g 磷酸二氢钾，用 980 mL 水溶解，并用 1.0 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 4.0，然后分别加入 0.15 g 乙二胺四乙酸二钠和 20 g 三氯乙酸，溶解混匀并定容至 1 000 mL；
- (4) 乙酸铵缓冲溶液：称取 0.77 g 乙酸铵，加入 900 mL 水，用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 为 4.0 ± 0.05 ，再加入 0.15 g 乙二胺四乙酸二钠、5 g 氯化钠和 20 g 三氯乙酸，混匀，加水至刻度，混匀；
- (5) 5%甲酸溶液；
- (6) 0.1 mol/L 盐酸溶液。

各取 20 mL 提取、净化后上高效液相色谱-串联质谱仪。6 种提取液对安普霉素的添加回收结果见表 16，色谱图见图 23。比较色谱图并结合回收率结果，发现提取液 (3) 磷酸盐缓冲溶液和提取液 (6)

0.1 mol/L 盐酸溶液回收率均较好，为了与高效液相色谱法的前处理过程统一，最终选择 0.1 mol/L 盐酸溶液为本方法的提取液。

表 16 6 种提取液对安普霉素的添加回收结果（液相色谱-串联质谱法）

提取液	平均回收率（内标法计算，%）
5%三氯乙酸溶液	35.12
10%三氯乙酸溶液 18 mL +10 mmol/L 乙酸铵溶液 2 mL	56.23
磷酸盐缓冲溶液	80.51
乙酸铵缓冲溶液	40.23
5%甲酸溶液	36.20
0.1 mol/L 盐酸溶液	95.45



3.2.4.2 固相萃取柱的选择

查阅文献发现，氨基糖苷类的净化柱多选择 C₁₈、HLB、MCX 三种，然而用 C₁₈ 柱净化时多在活化、淋洗、洗脱过程中添加七氟丁酸。因此，本项目比较了 HLB、MCX 柱对安普霉素的净化效果。

HLB 柱：用甲醇、水各 5 mL 活化，取备用液过柱，依次用水、5% 甲醇水溶液各 5 mL 淋洗，抽干；精确量取 2.0 mL 甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵溶液（取甲酸 20 mL、异丙醇 10 mL 和 170 mL 0.002 mol/L 乙酸铵溶液，混匀，用甲酸调节 pH 至 0.80）洗脱。

MCX 柱：用甲醇、水各 5 mL 活化，取备用液过柱，用 5 mL 水淋洗，抽干；用 5mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱，60 °C 氮吹至干，取 1 mL 硼酸盐缓冲液复溶。

MCX 柱：用甲醇、水各 5 mL 活化，取备用液过柱，用 5 mL 水淋洗，抽干；用 5mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱，60 °C 氮吹至干，取 1 mL 甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵溶液复溶。

HLB、MCX 柱对安普霉素的添加回收实验图谱见图 24。由图并计算可得，用甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵溶液做洗脱液或者复溶液时，HLB 和 MCX 固相萃取柱的回收率均较好，为了与高效液相色谱法的前处理过程统一，因此最终选择 MCX 柱为本方法的固相萃取柱。

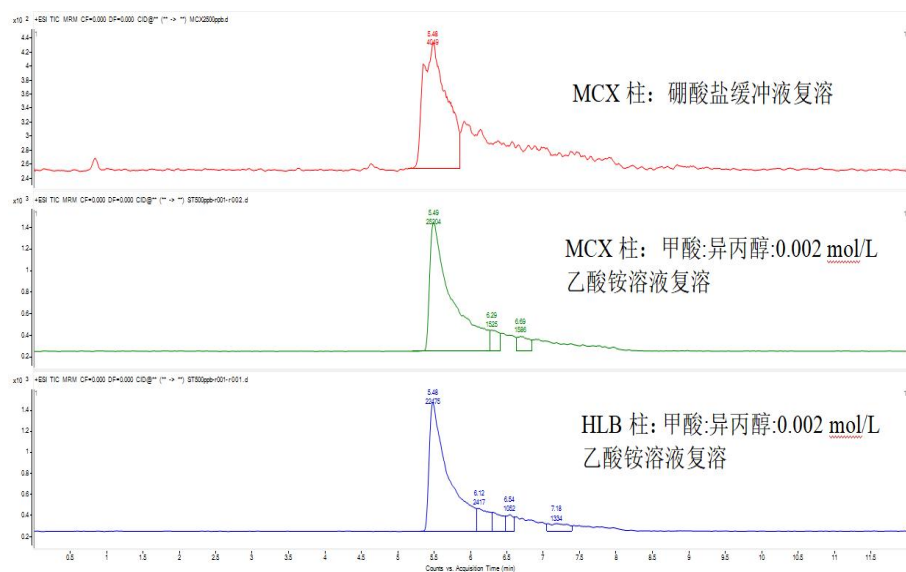


图 24 HLB、MCX 柱对安普霉素的添加回收实验图谱

3.2.5 固相萃取柱承载量考察

考虑到 MCX 净化柱的普及性，最终选取 60 mg/3mL 规格的混合型阳离子交换固相萃取柱进行实验。为考察净化柱承载量，防止样品上样液和淋洗过程出现过载现象，采用空白饲料样品添加高浓度的安普霉素按上述方法进行处理上机，回收率见表 17。结果表明，样品中待测物含量在 2 000 mg/kg 以内，不会出现固相萃取柱过载情况。

表 17 固相萃取柱承载量考察结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)			
	猪配合饲料	猪浓缩饲料	牛精料补充料	猪复合预混合饲料
500	98.32	92.53	84.69	88.93
800	86.59	91.28	87.69	101.36
1000	92.36	84.59	91.52	87.39
1 500	89.37	90.13	88.59	94.10
2 000	86.51	89.10	93.21	91.14

3.2.6 内标法定量测定的确定

准确称取猪配合饲料、猪浓缩饲料、牛精料补充料和猪复合预混合饲料，经提取、净化、氮吹、复溶，制得 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL 基质匹配标准系列溶液，待测，结果见表 14。由于饲料基质复杂，存在多种物质的干扰，基质标的回收率在 56.34~70.19%。因此本项目在实验过程中添加了内标物质安普霉素-D7，以提高其回收率。

将提取、净化后的样品和基质匹配标准曲线按前文所确立的条件上液相色谱-串联质谱仪，样品添加回收图谱见图 25，回收率结果见表 18。添加内标校正后回收率大大提高，为 88.49~95.24%。因此，本项目最终确定采用内标法定量。

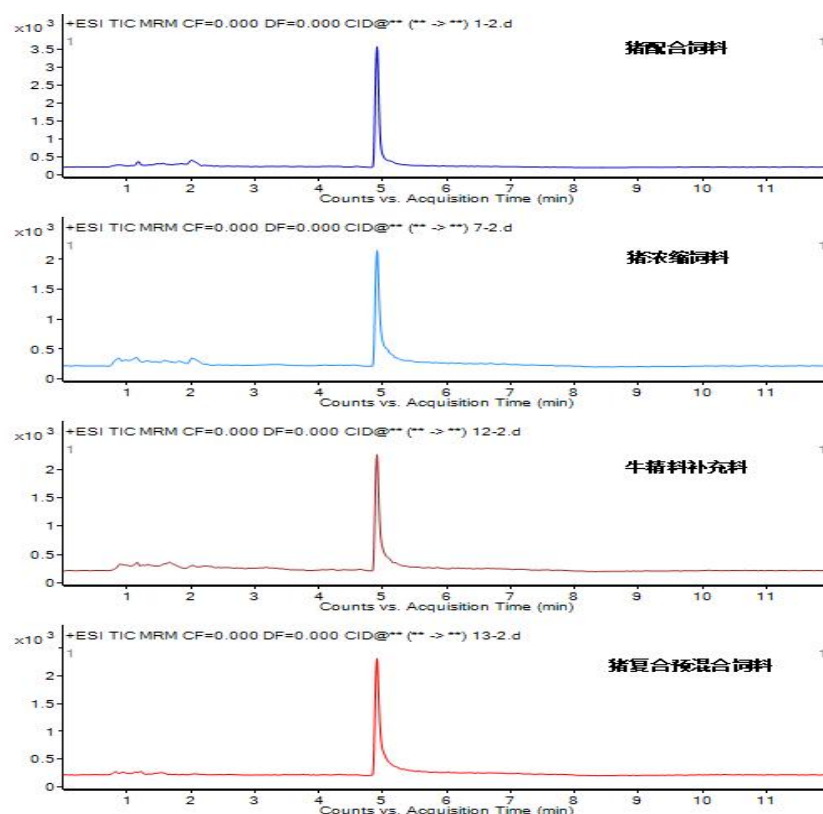


图 25 不同饲料的液相色谱-串联质谱法添加回收图谱

表 18 不同饲料的基质标与内标添加回收结果对比

饲料种类	猪配合饲料	猪浓缩饲料	牛精料补充料	猪复合预混合饲料
基质标回收率 (%)	59.34	63.51	65.98	70.19
内标计算回收率 (%)	89.52	91.57	88.49	95.24

3.2.7 方法学考察

3.2.7.1 检出限和定量限

在本试验条件下,在空白饲料中添加不同浓度的安普霉素混合标准溶液,经提取测定,根据信噪比 (S/N) ≥ 3 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数,得出饲料中安普霉素检出限为 0.04 mg/kg,根据信噪比 (S/N) ≥ 10 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数,得出饲料中安普霉素的定量限为 0.10 mg/kg。

3.2.7.2 线性范围

精确移取适量标准中间溶液和内标工作溶液于 10 mL 聚丙烯容量瓶中,用洗脱液稀释定容配成标准系列溶液,浓度分别为:20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL。内标浓度为 250 ng/mL。供液相色谱-串联质谱测定。以安普霉素混合标准系列溶液的浓度为横坐标,待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,线性方程为 $y=0.0033x+0.0295$, R^2 为 0.9992。结果表明,安普霉素标准工作液在 20~1 000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。

标准曲线和回归方程见图 26。

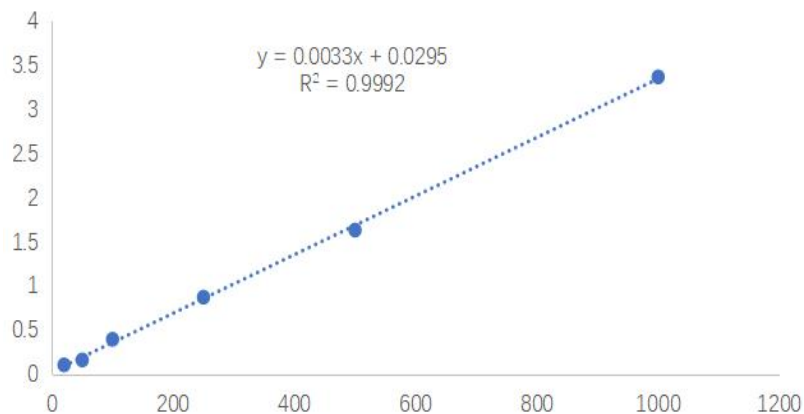


图 26 液相色谱-串联质谱安普霉素标准曲线和回归方程

3.2.7.3 方法的准确度和精密度

为了考察方法准确度和精密度，对猪配合饲料、鸡配合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、猪用复合预混合饲料、畜禽用维生素预混合饲料分别进行了加标回收试验，每种饲料采用低、中、高水平的添加量，每个水平平行测定 5 份，重复 3 次，批内、批间相对标准偏差结果见表 19~表 25。其对应的液相色谱-串联质谱空白图谱及添加浓度为定量限和 10 倍定量限浓度时的特征离子色谱图见图 27~图 33。

表 19 猪配合饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	83.52	102.69	90.30	82.59	95.52	90.92	9.27	91.19	7.82
	84.59	82.59	100.58	90.18	94.35	90.46	8.09		
	86.95	93.52	103.58	91.45	85.46	92.19	7.76		
1	89.52	91.23	94.52	84.51	102.49	92.45	7.22	89.98	7.78
	86.98	81.49	103.52	89.63	85.49	89.42	9.41		
	86.52	81.49	83.57	98.21	90.58	88.07	7.51		
10	87.59	82.29	93.58	102.57	85.40	90.29	8.87	90.71	7.89
	89.61	87.95	84.56	101.25	94.51	91.58	7.09		
	103.46	86.52	92.78	81.05	87.56	90.27	9.38		

表 20 鸡配合饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	82.56	88.63	94.52	86.52	91.05	88.66	5.10	89.37	6.25
	82.59	93.20	90.12	91.05	102.34	91.86	7.72		
	90.51	94.85	82.49	83.57	86.52	87.59	5.84		
1	84.59	101.36	93.52	92.54	87.41	91.88	7.01	90.70	6.30
	82.52	96.58	90.00	87.40	92.45	89.79	5.89		
	86.52	94.85	98.74	89.52	82.48	90.42	7.17		
10	83.51	87.52	103.52	85.56	93.52	90.73	8.90	90.66	7.44
	95.52	84.52	98.52	81.45	94.05	90.81	8.15		
	94.81	86.59	82.49	98.20	90.11	90.44	6.94		

表 21 猪浓缩饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	82.59	85.45	82.52	93.52	91.10	87.04	5.78	88.15	6.70
	83.52	92.52	94.52	82.45	84.52	87.51	6.38		
	100.20	94.10	85.63	80.10	89.52	89.91	8.58		
1	95.52	91.52	85.95	86.96	95.82	91.15	5.08	88.98	6.40
	85.49	80.49	89.61	85.49	98.41	87.90	7.63		
	93.51	95.52	82.51	82.50	85.45	87.90	7.05		
20	82.78	101.21	87.52	83.20	93.52	89.65	8.68	91.16	6.95
	96.52	84.52	92.63	100.02	94.50	93.64	6.18		
	82.49	93.52	95.52	94.15	85.28	90.19	6.53		

表 22 鸡浓缩饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	82.52	89.61	82.49	81.49	93.58	86.80	6.66	84.15	7.31
	81.47	101.45	86.52	93.52	96.68	91.93	8.68		
	89.63	82.49	94.85	90.08	98.40	91.09	6.60		
1	84.52	86.52	93.52	93.52	100.49	91.71	6.94	91.02	6.93
	94.52	87.89	98.41	86.52	86.52	90.77	5.95		
	81.59	89.52	102.32	94.85	84.52	90.56	9.15		
20	86.52	85.46	86.52	87.85	94.52	88.17	4.14	89.06	6.49
	87.52	93.52	103.20	84.56	82.15	90.19	9.34		
	93.52	82.59	92.41	92.52	83.10	88.83	6.17		

表 23 牛精料补充料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	82.56	100.47	89.52	96.52	103.20	94.45	8.90	89.47	8.17
	86.52	82.48	80.19	82.49	91.48	84.63	5.26		
	89.63	96.64	82.24	93.52	84.52	89.31	6.73		
1	85.42	89.61	95.52	82.49	95.82	89.77	6.63	89.50	6.23
	84.56	82.29	95.54	92.52	89.31	88.84	6.16		
	89.63	93.58	98.63	85.49	82.10	89.89	7.26		
10	87.52	85.52	85.26	97.63	83.59	87.90	6.39	87.55	6.98
	89.61	94.85	90.26	81.59	86.58	88.58	5.53		
	82.59	82.15	82.40	101.28	82.45	86.17	9.80		

表 24 猪用复合预混合饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	96.63	93.52	85.41	89.64	80.15	89.07	7.32	88.97	6.38
	85.62	81.49	86.95	86.52	93.52	86.82	4.98		
	89.25	81.59	94.82	91.05	98.41	91.02	6.97		
1	87.52	87.96	93.52	102.49	82.48	90.79	8.39	90.29	7.96
	85.49	83.52	98.41	82.10	86.52	87.21	7.44		
	89.63	98.85	85.47	87.20	103.20	92.87	8.34		
50	92.15	84.59	94.50	89.85	80.24	88.27	6.57	90.31	7.79
	84.15	97.25	82.48	86.63	90.12	88.13	6.64		
	93.52	106.52	97.08	92.58	83.02	94.54	8.97		

表 25 畜禽用维生素预混合饲料液相色谱-串联质谱方法回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内 平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
0.1	86.59	82.59	105.23	96.63	90.87	92.38	9.60	91.90	9.18
	96.52	84.86	80.10	103.49	92.58	91.51	10.14		
	84.36	99.36	94.85	100.43	80.04	91.81	9.96		
1	89.63	96.85	105.63	93.56	81.49	93.43	9.54	90.89	8.82
	102.56	94.85	84.59	82.45	86.59	90.21	9.26		
	94.82	86.53	80.59	99.57	83.59	89.02	8.91		
50	96.85	95.82	87.92	83.52	102.59	93.34	8.12	91.61	7.15
	85.49	103.20	84.52	89.61	86.52	89.87	8.56		
	86.95	94.85	86.59	98.46	91.25	91.62	5.58		

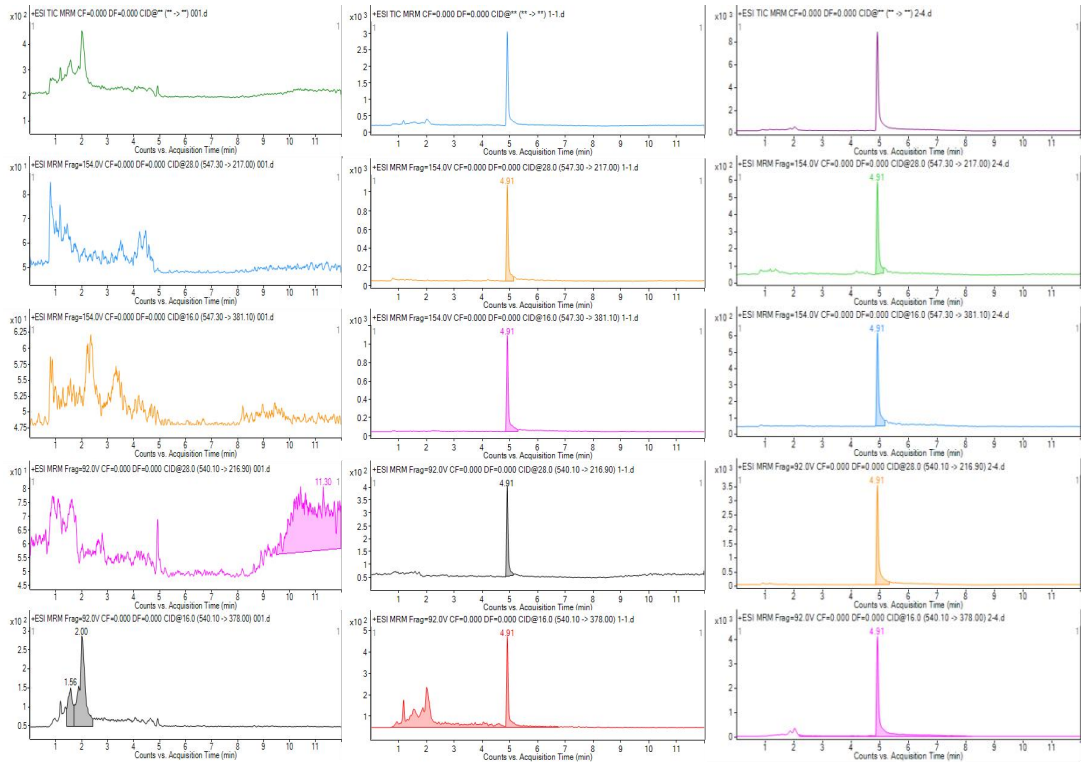


图 27 猪配合饲料空白（左）、添加浓度为 0.1 mg/kg（中）和 1 mg/kg（右）液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

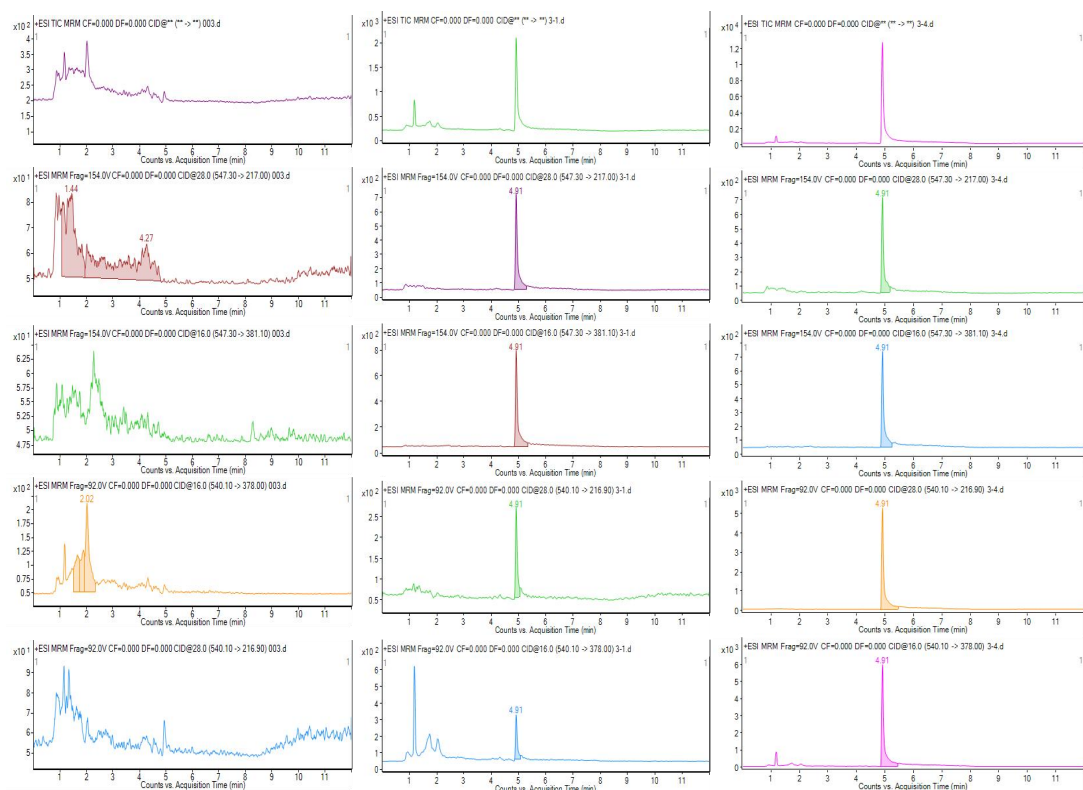


图 28 鸡配合饲料空白（左）、添加浓度为 0.1 mg/kg（中）和 1 mg/kg（右）液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

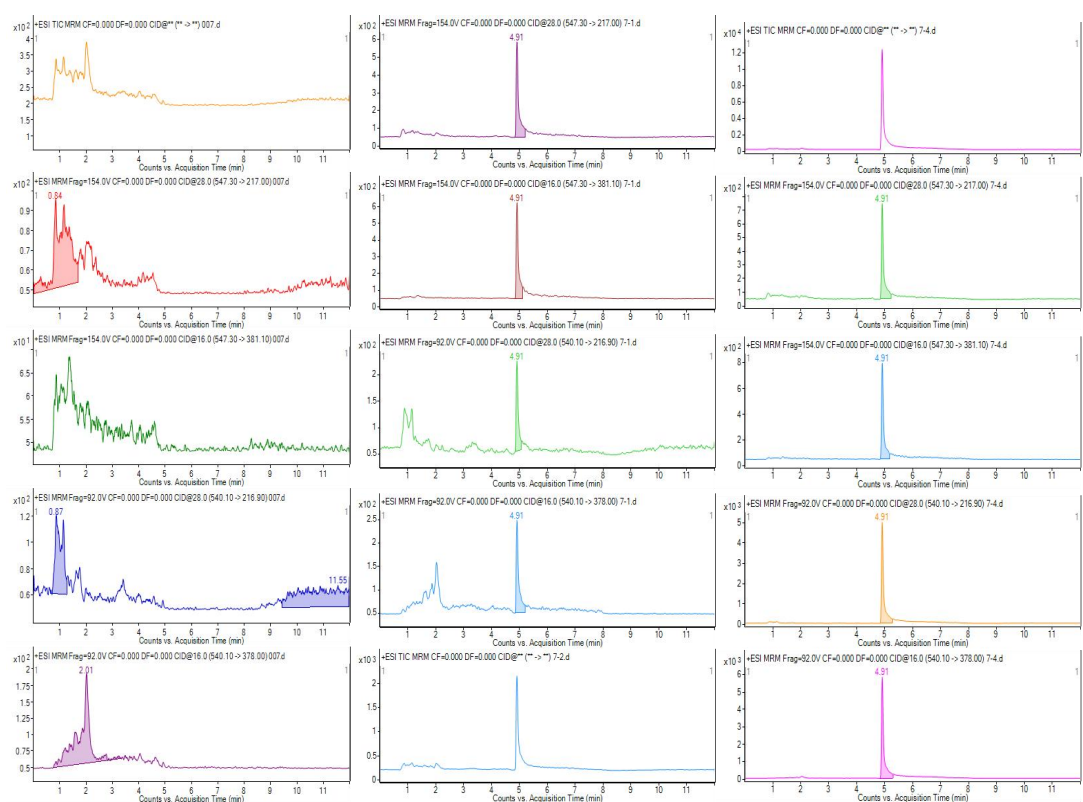


图 29 猪浓缩饲料空白（左）、添加浓度为 0.1 mg/kg（中）和 1 mg/kg（右）液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

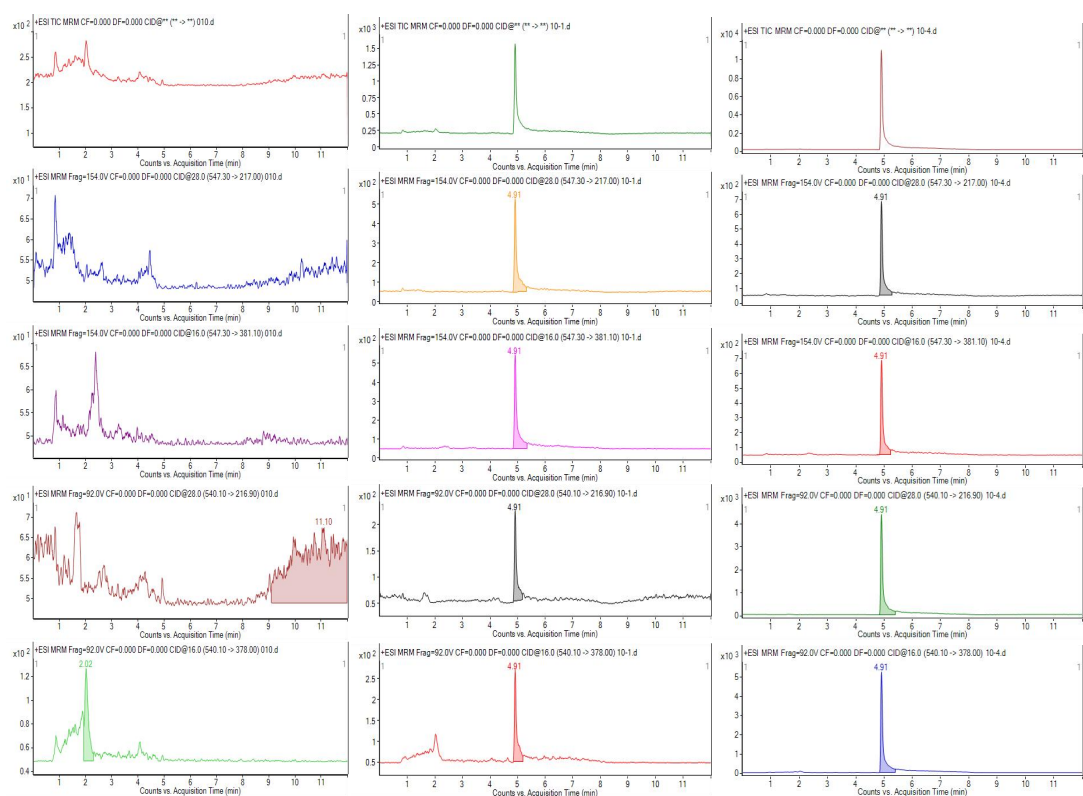


图 30 鸡浓缩饲料空白（左）、添加浓度为 0.1 mg/kg（中）和 1 mg/kg（右）液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

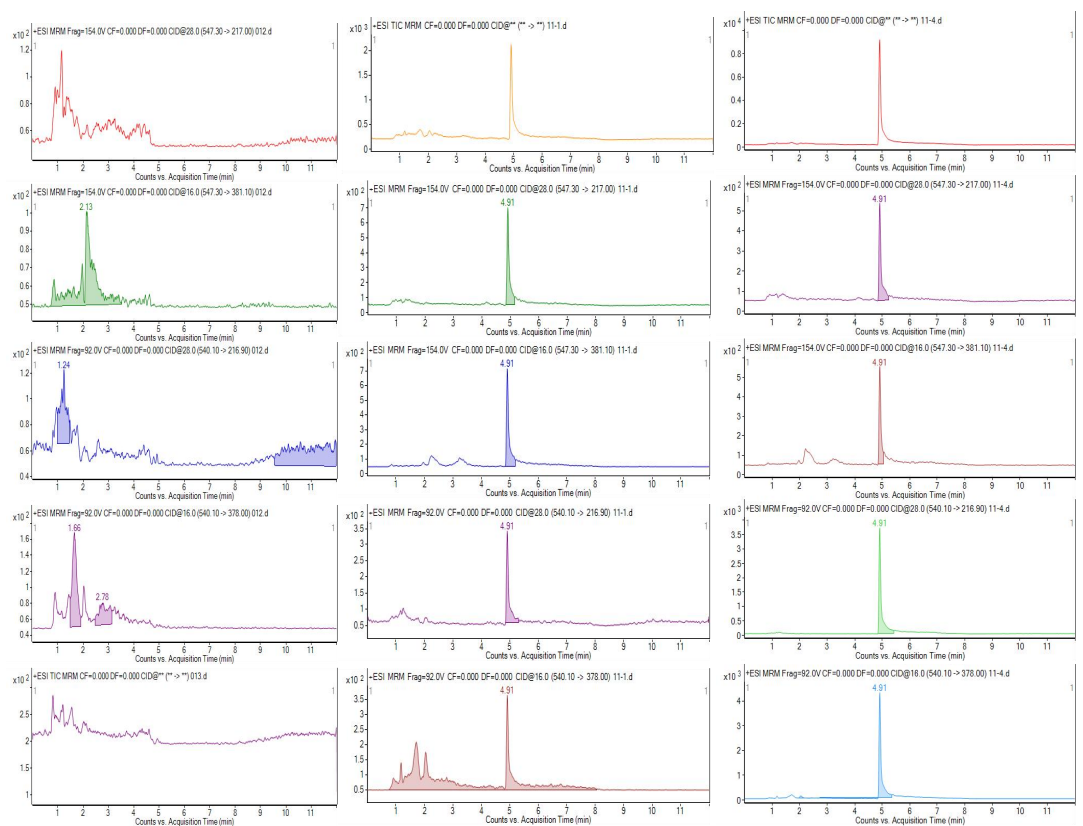


图 31 牛精料补充料空白（左）、添加浓度为 0.1 mg/kg（中）和 1 mg/kg（右）液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

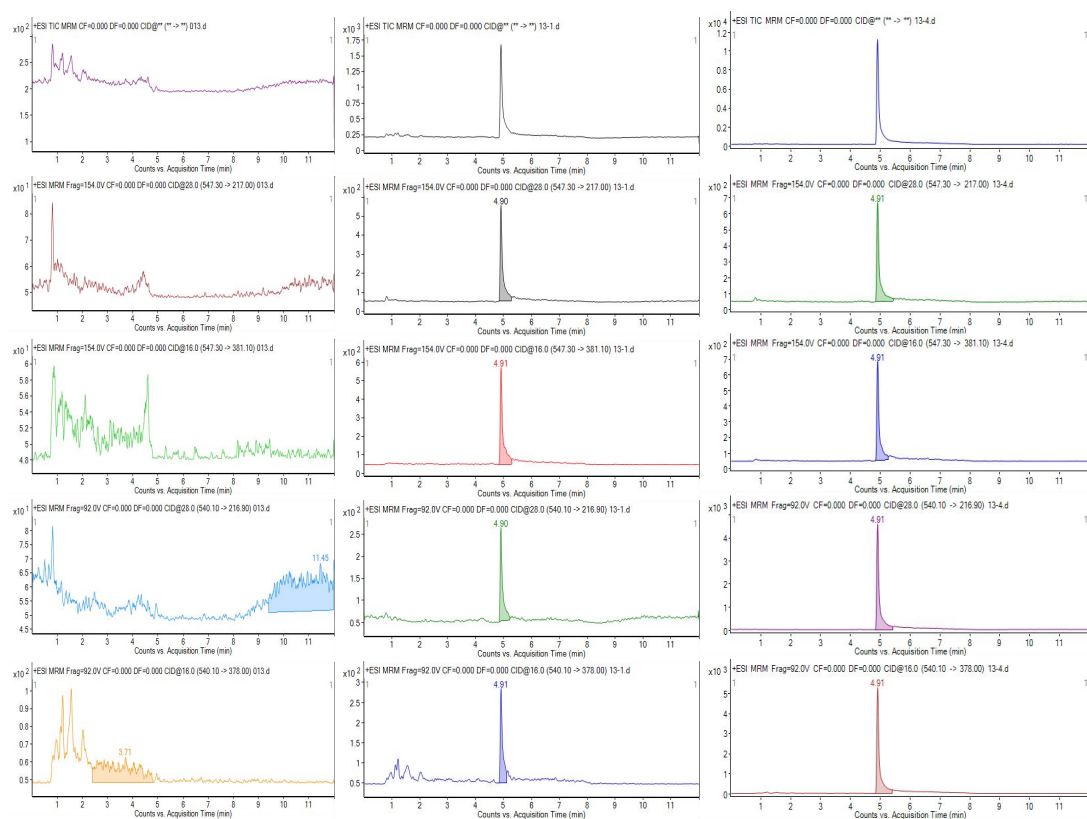


图 32 猪用复合预混合饲料空白(左)、添加浓度为 0.1 mg/kg(中)和 1 mg/kg(右)液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

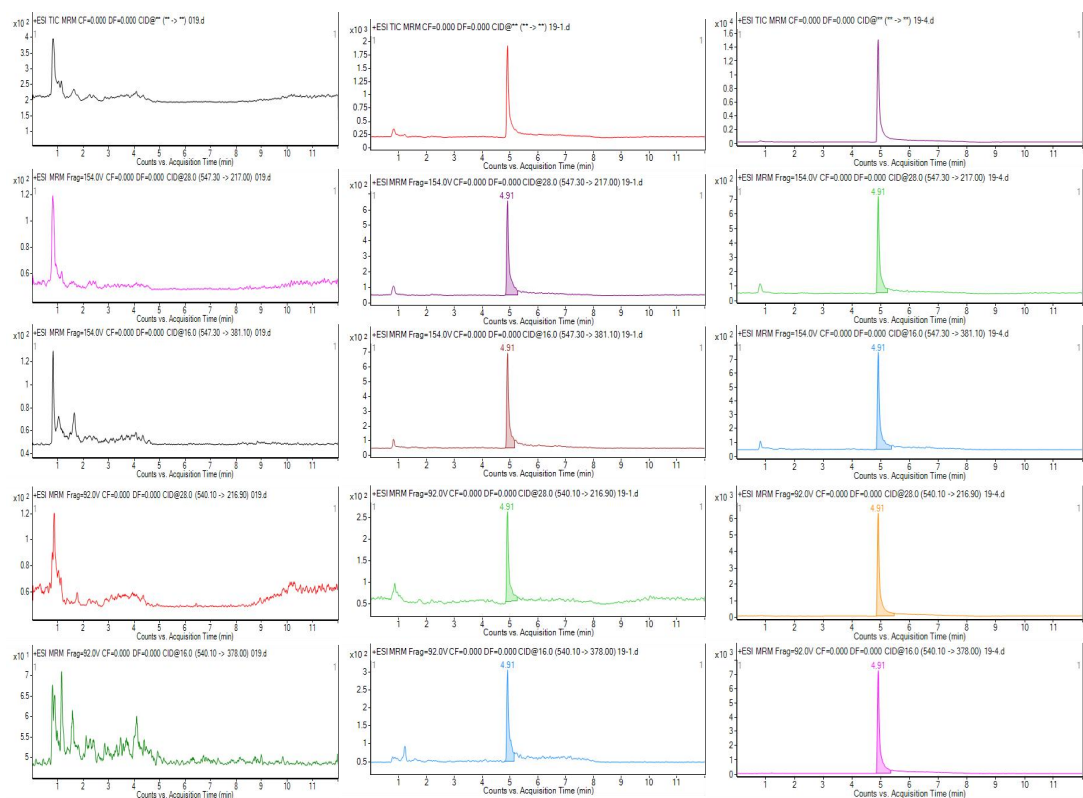


图 33 畜禽用维生素预混合饲料空白(左)、添加浓度为 0.1 mg/kg(中)和 1 mg/kg(右)液相色谱-串联质谱法特征离子色谱图

结果表明,按已确定的样品提取方法和检测条件测定猪配合饲料、鸡配合饲料、猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、猪用复合预混合饲料、畜禽用维生素预混合饲料的添加回收,安普霉素的液相色谱-串联质谱法平均回收率在 80.04%~106.52%,方法的批内相对标准偏差在 4.14%~10.14%,批间相对标准偏差在 6.23%~9.18%。液质联用检测仪属于高灵敏度高精密度仪器,而饲料样品种类繁多,基质复杂,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。依据本实验检测结果的相对偏差值,并参照国内相关液质联用检测标准,最终将本标准重复性允许偏差确定为不大于 20%。

3.3 标准溶液稳定性

安普霉素标准储备溶液（1 mg/mL）在 2℃~8℃条件下保存,分别于 0 周、1 周、2 周、3 周、4 周取出储备液稀释至 1.00 μg/mL,并重新称取固体标准品配制标准溶液,以新配制的标准溶液测定储备溶液的浓度,结果见表 26,说明标准储备溶液在该条件下储存,1 个月内稳定,无明显降解和变化。

表 26 安普霉素标准储备溶液稳定性

	安普霉素储备溶液（1 mg/mL）				
时间（周）	0	1	2	3	4
浓度(μg/mL)	1.00	0.96	0.98	0.97	0.94
RSD（%）	2.30				

安普霉素标准中间溶液(100 µg/mL)在 2~8 °C 条件下保存 1 周, 分别于 0 天、1 天、3 天、5 天、7 天取出储备液稀释至 1.00 µg/mL, 测定峰面积, 结果见表 27, 说明标准中间溶液在该条件下储存, 1 周内稳定, 无明显降解和变化。

表 27 安普霉素标准中间溶液稳定性

	安普霉素标准中间溶液 (1.00 µg/mL)				
时间 (天)	0	1	3	5	7
峰面积	16864	16298	15896	15463	14998
RSD (%)	4.54				

安普霉素-D₇ 标准储备溶液 (0.02 mg/mL) 在 2°C~8°C 条件下保存, 分别于 0 周、1 周、2 周、3 周、4 周取出储备溶液稀释至 0.25 µg/mL, 并重新称取固体标准品配制标准溶液, 以新配制的标准溶液测定储备溶液的浓度, 结果见表 28, 说明标准储备溶液在该条件下储存, 1 个月内稳定, 无明显降解和变化。

表 28 安普霉素-D₇ 标准储备溶液稳定性

	安普霉素-D ₇ 标准储备溶液 (0.02 mg/mL)				
时间 (周)	0	1	2	3	4
浓度 (µg/mL)	0.25	0.24	0.23	0.23	0.24
RSD (%)	3.51				

安普霉素-D₇ 标准工作溶液 (10 µg/mL) 在 2~8 °C 条件下保存 2 周, 分别于 0 天、3 天、7 天、10 天、14 天取出安普霉素-D₇ 储备溶液稀释至 0.25 µg/mL, 测定峰面积, 结果见表 29, 说明安普霉素-D₇ 标准工作溶液在该条件下储存, 2 周内稳定, 无明显降解和变化。

表 29 安普霉素-D7 标准工作溶液稳定性

	安普霉素-D ₇ 标准工作溶液 (0.25 µg/mL)				
时间 (天)	0	3	7	10	14
峰面积	5984	5906	5829	5749	5603
RSD (%)	2.52				

3.4 实际样品检测

根据所建立的检测方法对市售不同类型的饲料样品进行安普霉素残留的检测, 涉及饲料种类有猪配合饲料、鸡配合饲料、鱼配合饲料、猪浓缩饲料、牛羊浓缩饲料、鸡浓缩饲料、精料补充料和复合预混合饲料、维生素预混合饲料和微量元素预混合饲料, 共计 48 份, 分别按高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法前处理方法处理后上液相色谱仪和液相色谱串联质谱仪测定, 经检测发现均未检出目标物, 结果见表 30。

表 30 实际饲料样品中安普霉素的检测结果 (mg/kg)

样品种类	检测结果	
	液相色谱法	液相色谱-串联质谱法
仔猪配合饲料 1	未检出	未检出
仔猪配合饲料 2	未检出	未检出
乳猪配合饲料 1	未检出	未检出
乳猪配合饲料 2	未检出	未检出
母猪妊娠期配合饲料 1	未检出	未检出
母猪妊娠期配合饲料 2	未检出	未检出
肉小鸡配合饲料 1	未检出	未检出
肉小鸡配合饲料 2	未检出	未检出
蛋鸡产蛋高峰期配合饲料 1	未检出	未检出
蛋鸡产蛋高峰期配合饲料 2	未检出	未检出
混养鱼中期配合饲料 1	未检出	未检出
混养鱼中期配合饲料 2	未检出	未检出
乳猪浓缩饲料 1	未检出	未检出

乳猪浓缩饲料 2	未检出	未检出
仔猪浓缩饲料 1	未检出	未检出
仔猪浓缩饲料 2	未检出	未检出
乳仔猪浓缩饲料 1	未检出	未检出
乳仔猪浓缩饲料 2	未检出	未检出
肉牛浓缩饲料 1	未检出	未检出
肉牛浓缩饲料 2	未检出	未检出
肉牛肉羊浓缩饲料 1	未检出	未检出
肉牛肉羊浓缩饲料 2	未检出	未检出
雏鸡浓缩饲料 1	未检出	未检出
雏鸡浓缩饲料 2	未检出	未检出
生长牛精料补充料 1	未检出	未检出
生长牛精料补充料 2	未检出	未检出
奶牛精料补充料 1	未检出	未检出
奶牛精料补充料 2	未检出	未检出
肉牛精料补充料 1	未检出	未检出
肉牛精料补充料 2	未检出	未检出
羔羊精料补充料 1	未检出	未检出
羔羊精料补充料 2	未检出	未检出
肉羊精料补充料 1	未检出	未检出
肉羊精料补充料 2	未检出	未检出
育肥羊精料补充料 1	未检出	未检出
育肥羊精料补充料 2	未检出	未检出
猪通用复合预混合饲料 1	未检出	未检出
猪通用复合预混合饲料 2	未检出	未检出
禽通用复合预混合饲料 1	未检出	未检出
禽通用复合预混合饲料 2	未检出	未检出
畜禽用维生素预混合饲料 1	未检出	未检出
畜禽用维生素预混合饲料 2	未检出	未检出
反刍动物用维生素预混合饲料 1	未检出	未检出
反刍动物用维生素预混合饲料 2	未检出	未检出
肉禽微量元素预混合饲料 1	未检出	未检出
肉禽微量元素预混合饲料 2	未检出	未检出
反刍动物用微量元素预混合饲料 1	未检出	未检出
反刍动物用微量元素预混合饲料 2	未检出	未检出

3.5 两种方法精密度比较

为了考察本研究两种方法的准确度和精密度，对猪配合饲料进行了加标回收试验，每个水平平行测定 5 份，重复 3 次，批内、批间相

对标准偏差结果见表 31。由表看出，两种方法的回收率均在 70%~110%之间，批内、批间相对标准偏差均小于 10%，适用于饲料中安普霉素的测定。

表 31 两种方法对猪配合饲料的添加回收率试验结果

添加 浓度 (mg/kg)	测定 方法	回收率 (%)					批内 平均 回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 平均 回收 (%)	批间 RSD (%)
10	液相 色谱 法	89.56	91.54	81.47	93.85	78.91	87.07	7.49	87.87	6.85
		79.85	86.51	91.47	98.32	84.57	88.14	8.00		
		83.59	94.52	81.23	89.90	92.76	88.40	6.53		
	液相 色谱 串联 质谱 法	84.59	90.74	94.72	89.63	81.10	88.16	6.07	90.14	6.90
		102.53	93.84	86.75	82.75	96.51	92.48	8.49		
		89.52	81.74	93.52	96.71	87.39	89.78	6.41		

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

本标准方法经四川省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）和成都海关技术中心 3 家单位验证。验证结果表明，本方法样品前处理步骤科学合理，易于掌握，与现有饲料中兽药和违禁药物的检测方法要求基本类似，减轻了操作人员工作负担，提高了检测效率，增强了方法的实用性和适用性。从方法灵敏度、准确度和精密度试验进行了方法学验证，证明本方法灵敏度、准确度和精密度良好，可满足饲料中高低浓度安普

霉素的检测要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

与同类标准技术内容的对比详见表 32。

表 32 与同类标准技术内容对比

编号	标准号和标准名称	检测方法	本标准
1	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》	高效液相色谱法	高效液相色谱法 液相色谱-串联质谱法
2	DB34/T 1367-2011 《饲料 中硫酸安普霉素的测定 高 效液相色谱法》	高效液相色谱法	

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准参考农业部 1486 号公告-3-2010《饲料中安普霉素的测定
高效液相色谱法》

六、与有关法律、法规的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，
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。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

2021 年 8 月~9 月，本标准定向征求意见发函单位 52 个，回函单位 33 个，未回函单位 19 个；提出意见单位 31 个，无意见单位 2 个；共提出意见 126 条；采纳 87 条，部分采纳或不采纳 39 条。

本标准无重大分歧意见。

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

本标准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行业标准颁布实施。

十、其他应当说明的事项

暂无。

参考文献:

- [1]戴青,于丽娜,张璐,等.安普霉素的研究进展[J].中国兽药杂志,2016,50(07):66-69.
- [2]高月,王耀,胡晓飞,等.氨基糖苷类药物的危害及其检测方法研究进展[J].河南农业科学,2016,45(06):9-14.
- [3]蔡春燕,杨芳,闫爱国,等.UPLC-MS/MS法同时检测饲料中5种氨基糖苷类抗生素[J].广东化工,2014,41(10):144-145+141.
- [4]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.
- [5]Chayada Chiaochan, Urairat Koesukwiwat,Soparat Yudthavorasit,Natchanun Leepipatpiboon. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 682(1):117-129.
- [6]高巍,武中平,徐春祥,等.固相萃取技术研究[J].江苏食品与发酵,2006(03):17-21.
- [7]龚强,丁利,朱绍华,等.高效液相色谱-串联质谱法检测乳制品中10种氨基糖苷类抗生素残留[J].色谱,2012,30(11):1143-1147.
- [8]黄原飞.水产品及其饲料中11种氨基糖苷类药物超高效液相色谱—串联质谱检测方法的建立及应用[D].上海海洋大学,2018.
- [9]徐飞.氨基糖苷类药物残留检测筛选和确证方法的研究[D].中国农业大学,2014.
- [10]Maksim Burkin,Inna Galvidis. Immunochemical detection of apramycin as a contaminant in tissues of edible animals[J]. Food Control,2013,34(2).
- [11]钱疆,余孔捷,陈健,等.液相荧光法检测乳制品中9种氨基糖苷类药物残留[J].福建分析测试,2011,20(03):13-17.
- [12]刘雪红,张秀芹,侯颖,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中7种氨基糖苷类药物残留[J].中国兽药杂志,2015,49(03):48-52.
- [13]方秋华.牛奶中氨基糖苷类药物残留量的测定高效液相色谱串联质谱法[C].

中国畜牧兽医学会动物药品学分会第五届全国会员代表大会暨 2016 年学术年会论文集. 2016: 238-244.

[14]张元, 周昱, 周伟娥, 等. 食品中氨基糖苷类残留前处理及分析方法研究进展[J]. 食品工业, 2016, 37(04):223-227.

[15] Tao Y, Chen D, Yu H, et al. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 676-683.