

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中抗生素滤渣的鉴别

液相色谱-高分辨质谱法》

编制说明

(征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

2025 年 1 月

一、工作简况

1.1 任务来源

应行业监管需要，特制订行业标准《饲料中抗生素滤渣的鉴别显微红外光谱法》，承担单位为中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心(北京)]、中国农业大学、……等。

1.2 制定背景

1.2.1 制定行业标准的意义

抗生素滤渣是采用工业发酵法生产抗生素后剩余的多组分固体废弃物，其成分大致包括三部分：一是微生物菌丝体及未完全利用的培养基；二是提取抗生素时加入的絮凝剂、酸化剂、助滤剂等；三是未提取完全的抗生素及未知的发酵过程中间产物。以发酵生产土霉素为例，抗生素滤渣的产生过程为：（1）斜面培养基生长制备微生物孢子，培养基成分由麸皮、水、琼脂等组成；（2）种子培养，培养基成分由水、玉米浆、原辅料、氯化钠、黄豆饼粉、碳酸钙、糊精、淀粉等组成；（3）发酵，培养基成分由氯化钠、硫酸铵、磷酸二氢钾、淀粉、酵母粉、黄豆饼粉、碳酸钙、玉米浆等组成；（4）酸化，该过程需要加入黄血盐、硫酸锌、草酸等；（5）结晶过滤，将滤液分离后剩下的残渣即为土霉素滤渣。

抗生素滤渣营养成分丰富，粗蛋白含量高，很多抗生素滤渣粗蛋白含量高在40%以上，加之我国蛋白饲料资源短缺，在畜牧业发展初期，抗生素滤渣曾被作为饲料或饲料添加剂饲喂动物。但抗生素滤渣用作饲料的风险隐患逐渐显现：由于抗生素滤渣含有未被完全提取

的抗生素残留和未经安全性评价的次级代谢产物,能人类健康带来大量危害:如 1、诱发细菌耐药;原微生物为躲避药物在不断变异,耐药菌株也随之产生。目前几乎没有一种抗菌药物不存在耐药现象。 2、损害人体器官;抗生素在杀菌同时也会造成人体损害。影响肝、肾脏功能、胃肠道反应等。3、导致二重感染;在正常情况下,人体的口腔、呼吸道、肠道都有细菌寄生,寄殖菌群在相互拮抗下维持着平衡状态。如果长期使用广谱抗菌药物,敏感菌会被杀灭,而不敏感菌乘机繁殖,未被抑制的细菌、真菌及外来菌也可乘虚而入诱发又一次的感染。4、造成社会危害。滥用抗生素可能引起某些细菌耐药现象的发生,对感染的治疗会变得十分困难。因此,抗生素滤渣 2008 年被列入《国家危险废物名录》。同时,养殖过程使用含有抗生素滤渣的饲料原料具有危害养殖动物健康、影响食品安全和诱导产生细菌耐药性等潜在风险隐患。因此,2002 年我国农业部、卫生部和国家药品监督管理局联合发布的第 176 号公告《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》明确规定禁止将抗生素滤渣掺加到饲料中使用。同年,最高人民法院和人民检察院共同发布了《关于办理非法生产、销售、使用禁止在饲料和动物饮用水中使用药品等刑事案件具体应用法律若干问题的解释》(法释[2002] 26 号),进一步强化了禁止将抗生素滤渣应用到饲料中的管理规定;2008 年我国又将抗生素滤渣按照化学药品原料药生产过程中的培养基废物列入了《国家危废名录》,按规定抗生素滤渣只能被焚烧处置和限制填埋。

我国是抗生素生产大国,抗生素的产量约占全球的 20%~30%。抗生素的生产方法主要是工业发酵法,根据抗生素产量与对应滤渣产

量的比例关系取均值后的换算比为 12.8，即生产 1 吨抗生素，会产生 12.8 吨抗生素滤渣。2020 年，我国抗生素的总产量已达 23.14 万吨，计算抗生素滤渣约 300 万吨。我国蛋白资源短缺，抗生素滤渣作为工业废弃物成本低廉，受利益驱使，将抗生素滤渣作为饲料的现象仍可能存在。为了保证饲料安全，促进饲料行业与畜牧业的健康发展，保障消费者能够获得健康安全放心的动物性食品，因此，制订饲料中抗生素滤渣的鉴别方法标准具有重要意义。

1.2.3 抗生素滤渣检测方法进展

抗生素滤渣是一种典型的混合污染物，具有成分复杂、难表征的特点。抗生素滤渣检测的相关研究较少，目前已有的报道多是将抗生素滤渣中残留的抗生素作为检测目标。随着各国政府对抗生素残留实施越来越严格的规定，抗生素滤渣检测方法的研究也取得了显著的进展。近年来研究者们开发了一系列新型抗生素滤渣检测方法。

一、基于标志物的鉴别方法

这种方法通常涉及对抗生素滤渣中的特定化学标志物进行检测。通过比对样品中检测到的标志物与已知抗生素滤渣的标志物，可以判断样品中是否含有抗生素滤渣。

二、基于光谱成像和模式识别的鉴别方法

利用显微近/中红外成像、光谱重构、模式识别等原理，研制了抗生素滤渣快速识别技术。这种方法通过采集样品的光谱信息，利用机器学习等算法对光谱数据进行处理和分析，实现对抗生素滤渣的快速识别。

三、基于生产菌株的鉴别方法

那些能够产生特定抗生素的微生物，如细菌、放线菌等，通过发酵过程，这些菌株在适当的培养基和条件下产生抗生素。在抗生素生产过程中，发酵液经过提取、纯化等步骤后，会剩余一些含有未完全提取的抗生素、抗生素基因、培养基成分等，通过设计针对特定抗生素基因的引物和探针，荧光 PCR 可以特异性地扩增并检测这些基因的存在，从而间接判断抗生素滤渣中是否含有存在。

四、基于微生物降解特性的鉴别方法

这种方法利用某些微生物对特定抗生素的降解能力，通过观察微生物的生长情况或代谢产物来间接判断样品中是否含有抗生素滤渣。然而，这种方法通常不如前几种方法直接和准确，因此在实践中应用较少。

综上所述，抗生素滤渣的鉴别方法多种多样，选择哪种方法取决于具体的应用场景和需求。在实际操作中，应根据样品的性质、检测目的和实验室条件等因素综合考虑，选择最合适的方法进行鉴别。

1.3 工作过程

1.3.1 成立标准编制小组

2024 年 6 月，中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 [国家饲料质量监督检验中心（北京）] 接到任务后，成立了标准编制小组，落实了人员分工，详见表 1。

表 1 标准主要起草人员和任务分工

人 员	职 称	任务分工

人 员	职 称	任务分工
...		

1.3.2 标准修订技术路线和方案制定

2024 年 6 月，标准编制小组查阅了抗生素滤渣检测方法国内外研究现状，同时调研国内抗生素滤渣生产状况，基于已有的研究基础形成标准制订内容和技术路线草案，草案经制定团队多轮讨论，最终确定了标准制订的主要内容、技术路线（见图 1）、分工、完成时限等。

1.3.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2024 年 6 月~2025 年 1 月，开展样品收集、方法学研究和实际样品检测。

1.3.4 编写编制说明和征求意见稿、定向征求意见和标准验证

2025 年 1 月，标准编制小组完成标准文本、编制说明定向征求意见稿编制工作。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

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》的规定和要求进行编写。编制依据如下：

- （1）遵循国家颁布的相关法律法规；
- （2）有关国家或行业标准；
- （3）国内外有关标准和参考文献；
- （4）标准编制小组调研和实测的样品检测数据。

图 1 技术路线图

2.2.2 抗生素滤渣的获取

样品采集：收集来自河北、山东、河南、内蒙古、浙江、湖北、福建等多个省份共 22 家抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的抗生素滤渣样本 44 个，种类及数量见表 1，共 19 类抗生素滤渣。采集的样品均为湿滤渣，统一将湿滤渣放置在空气中自然晾晒风干，所有样品使用旋风磨(ZM100, 德国 Restsh 公司)粉碎过 0.425 mm 筛。

表 1 抗生素滤渣采集信息表

类别	抗生素滤渣名称	数量
氨基糖苷类	单硫酸卡那霉素滤渣	1
	硫酸新霉素滤渣	5
	硫酸安普霉素滤渣	2
	吉他霉素滤渣	1
	硫酸庆大霉素滤渣	1
	盐酸大观霉素滤渣	2
	硫酸链霉素滤渣	2
大环内酯类	酒石酸泰万菌素滤渣	4
	酒石酸泰乐菌素滤渣	4
	阿维菌素滤渣	3
	硫氰酸红霉素滤渣	1
截短侧耳素类	截短侧耳素滤渣	1
	泰妙菌素滤渣	1
四环素类	盐酸金霉素滤渣	3
	土霉素滤渣	4
林可酰胺类	盐酸林可霉素滤渣	1
多肽类	硫酸粘菌素滤渣	4
β -内酰胺类	青霉素滤渣	3
其它类	黄霉素滤渣	1

2.2.2 抗生素滤渣的提取

由于所列抗生素滤渣种类繁多且差异较大，因此选择合适的提取溶剂尤为重要。现有的标准与文献中，一般采用甲醇、乙腈、二甲基亚砜，磷酸缓冲盐和 EDTA-McIlvaine 溶液（MC 溶液）等体系单

独或混合体系常被用来作为提取饲料中各种抗生素滤渣。为此，本研究从 17 类抗生素中每类挑选一种典型药物考察在不同提取溶剂中的提取情况。分别考察了甲醇、乙腈、二甲基亚砷，磷酸缓冲盐和 MC 溶液等提取溶剂对饲料中 18 种化合物的提取情况：取 5g 空白饲料样品，加入混合标准溶液至配置成抗生素含量 $1000\mu\text{g/kg}$ 的样品，分别用 20 mL 不同的溶剂提取，同时作基质标准曲线进行校正，利用加标回收率来体现提取效率，结果见图 4。可以看出，由于抗生素性质不同，不同溶液对不同类型的抗生素提取效果差异比较显著。MC 溶液对阿莫西林、万古霉素、替硝唑、磺胺二甲基嘧啶、土霉素提取效果较好外，对于水溶性差的喹乙醇、头孢曲松、泰妙菌素、灰黄霉素、制霉菌素、那西肽等化合物提取效果较差。磷酸缓冲溶液对阿莫西林、恩诺沙星和头孢曲松比 MC 溶液提取效果好，可能由于磷酸缓冲溶液 pH 为弱酸性环境。抗生素在弱酸比较稳定。乙腈对多数目标化合物均有较好的溶解性和较高的提取率，但是对土霉素、制霉菌素、头孢曲松、万古霉素提取效果不理想。二甲基亚砷是一种既溶于水又溶于有机溶剂的非质子极性溶剂。能有效提取大部分抗生素（吉他霉素、土霉素和替硝唑回收率低于 50%）。但是极性过强，提取过程中会带出较多的杂质，对一些不稳定的化合物具有较大影响。因此采用乙腈与其混合既可以避免共提出太多的脂溶性杂质，又能去除一些蛋白。另外糖肽类水溶解性较好，需要加入一定比例的水有助提高饲料的提取效果，同时由于四环素类结构含有四个环状结构，容易金属离子配合，加入 EDTA 后会螯合钙、镁等金属离子，提高四环素和部分喹诺酮类化合物提取效率，此外柠檬酸还能调节体系的

pH 值，抑制化合物酸性基团的解离，从而加强聚醚类、青霉素类和头孢菌素等提取效率和稳定性。由于 MC 溶液的配制过程中应用大量的钠盐会对质谱产生不良影响，我们改良了 MC 溶液的配方，去除了钠盐。最终，本方法以乙腈、甲醇二甲基亚砷和改良 MC 溶液的混合溶液做为提取溶剂。

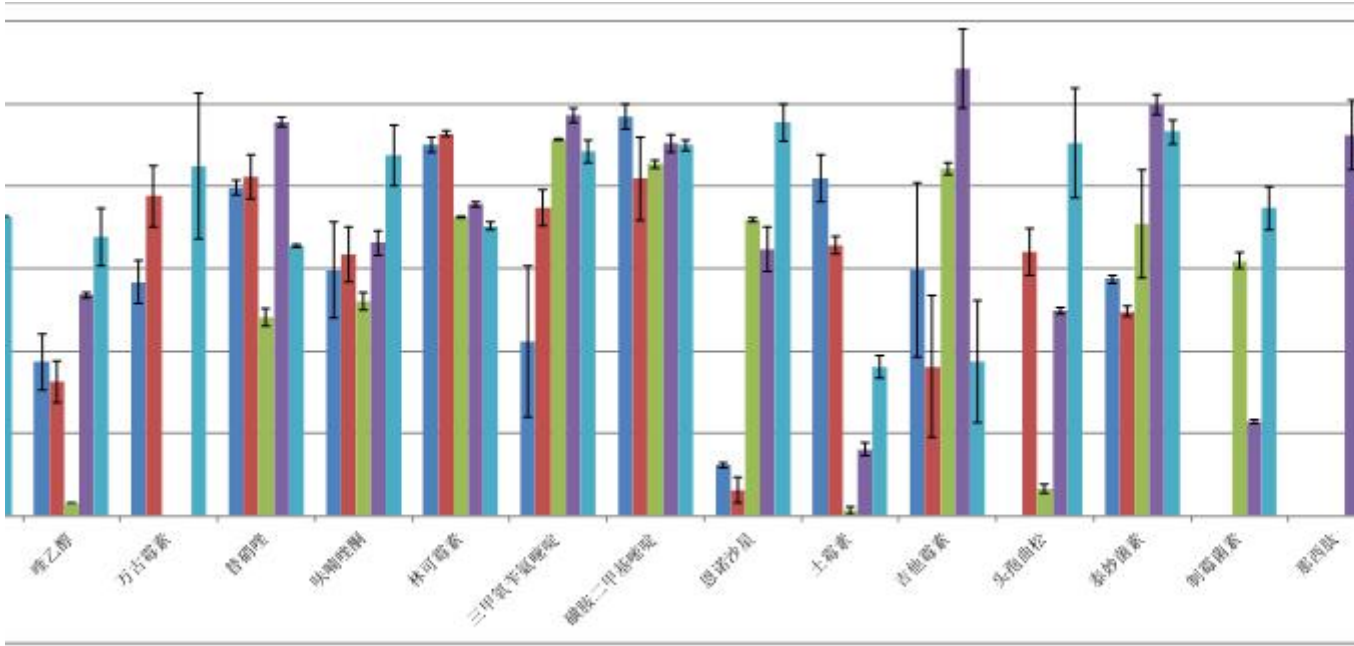


图 2 不同提取溶剂对抗生素提取效果比较

2.2.3 色谱与质谱条件

色谱与质谱条件参考了中华人民共和国农业农村部公告第 676 号《饲料中风险物质的目标物筛查与确认 液相色谱-高分辨质谱法》，在设定好的质谱条件下，分别将 1ng/mL 各种抗生素滤渣提取溶液流动注入 QE 质谱仪进行参数优化，进行了正负离子扫描。具体条件如下：

色谱柱：Waters BEH C18 柱（100mm× 3.0mm, 1.7 μm）；柱温：40℃；进样量：5 μL；流动相流速为 0.4 mL/min，梯度淋洗，流动相组成和梯度见表 2

表 2 流动相梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%
0.00	0.3	90	10
1.50	0.3	90	10
4.00	0.3	70	30
9.00	0.3	5	95
10.00	0.3	5	95
10.01	0.3	90	10
12.00	0.3	90	10

QE 质谱采用电子喷雾离子源，正离子模式，喷雾电压为 3.5 kV，毛细管和碰撞气温度分别为 320 °C 和 300 °C，鞘气和辅助气压力分别设为 40、10 arb，喷雾气和碰撞气均为氮气。快速筛查扫描方式采用 Full-dd MS2 模式。扫描范围：100 ~ 1500；全扫描分辨率：120000；扫描 AGC target 设为 5.0e5；maximum IT 设为 100 ms；dd MS2 扫描分辨率为：60000；二级扫描 AGC target 设为 1.0e5；maximum IT 设为 50 ms；碰撞方式为 NCE 模式；碰撞能设 20,40,60 ev；Loop 次数设为 2。

2.2.4 抗生素滤渣质谱库的构建

使用质谱仪对处理后的样本进行质谱分析，获取了质谱数据。典型的抗生素滤渣全面全扫描质谱图见图 3-8，对采集到的质谱数据进行基线校正、噪声去除等预处理步骤，以提高数据的质量。并利用 Compound Discoverer 3.0 软件识别并分析质谱数据中的特征峰，用于后续的数据库建立。抗生素滤渣质谱 PCA 散点图见图 9，清晰地展示了不同抗生素滤渣间的差异性。泰乐菌素和泰万菌素在散点图上倾向于聚集在一起，形成明显的聚类；而不同类抗生素滤渣则分布在相对独立的位置，呈现出明显的分离趋势。这表明利用质谱数据建立识

别模型可以进行抗生素滤渣分类和鉴别。

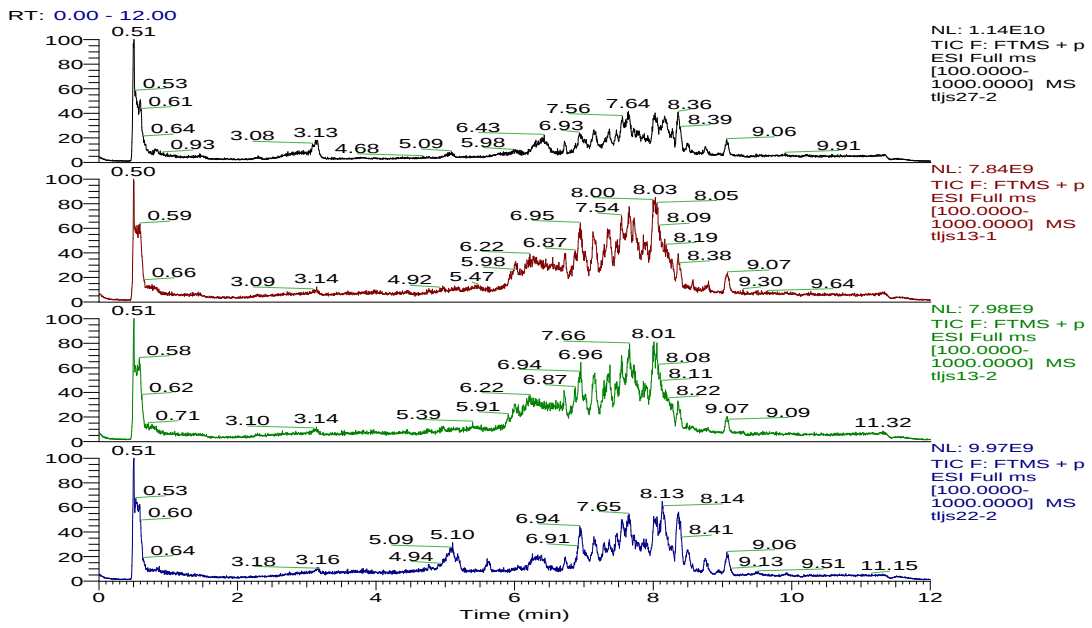


图 3 泰乐菌素滤渣全面全扫描质谱图

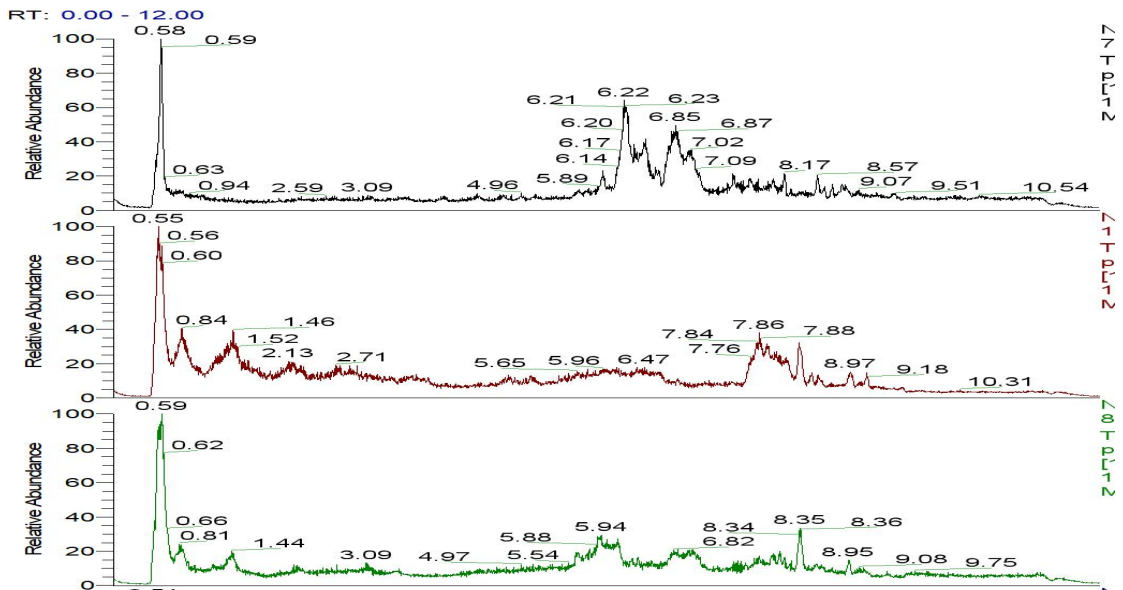


图 4 泰万菌素滤渣全面全扫描质谱图

RI: 0.00 - 12.00

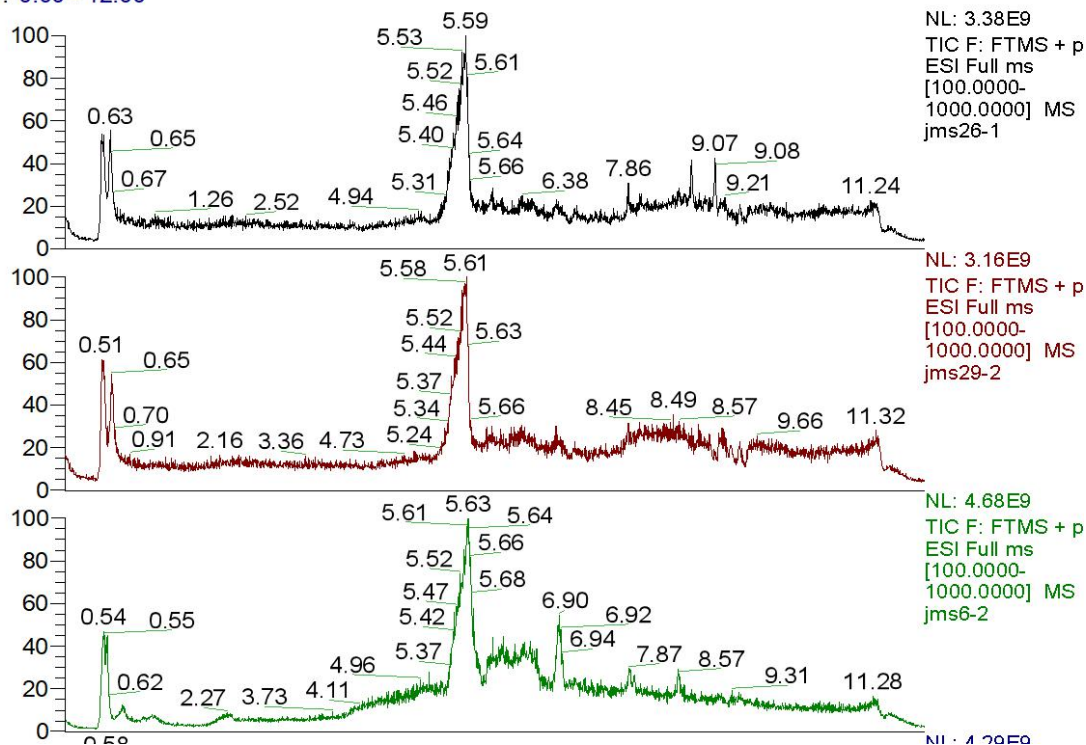


图 5 金霉素滤渣全面全扫描质谱图、

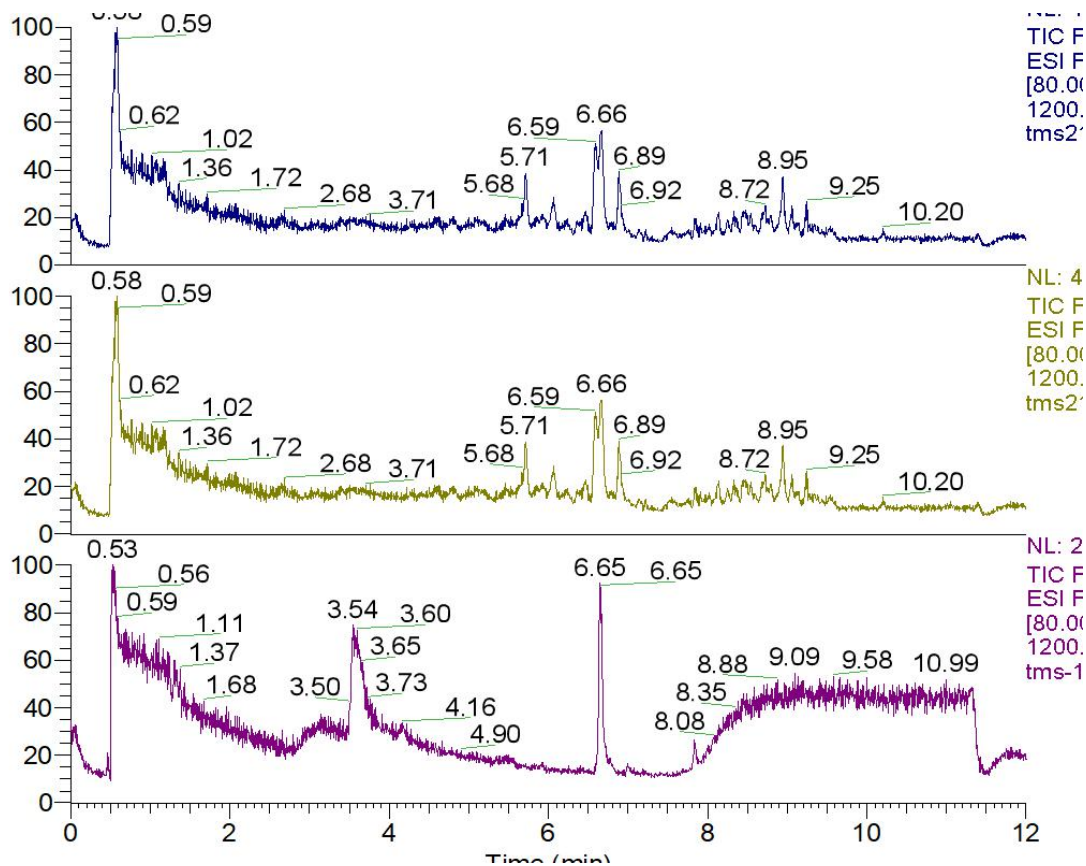


图 6 土霉素滤渣全面全扫描质谱图

RT: 0.00 - 12.00

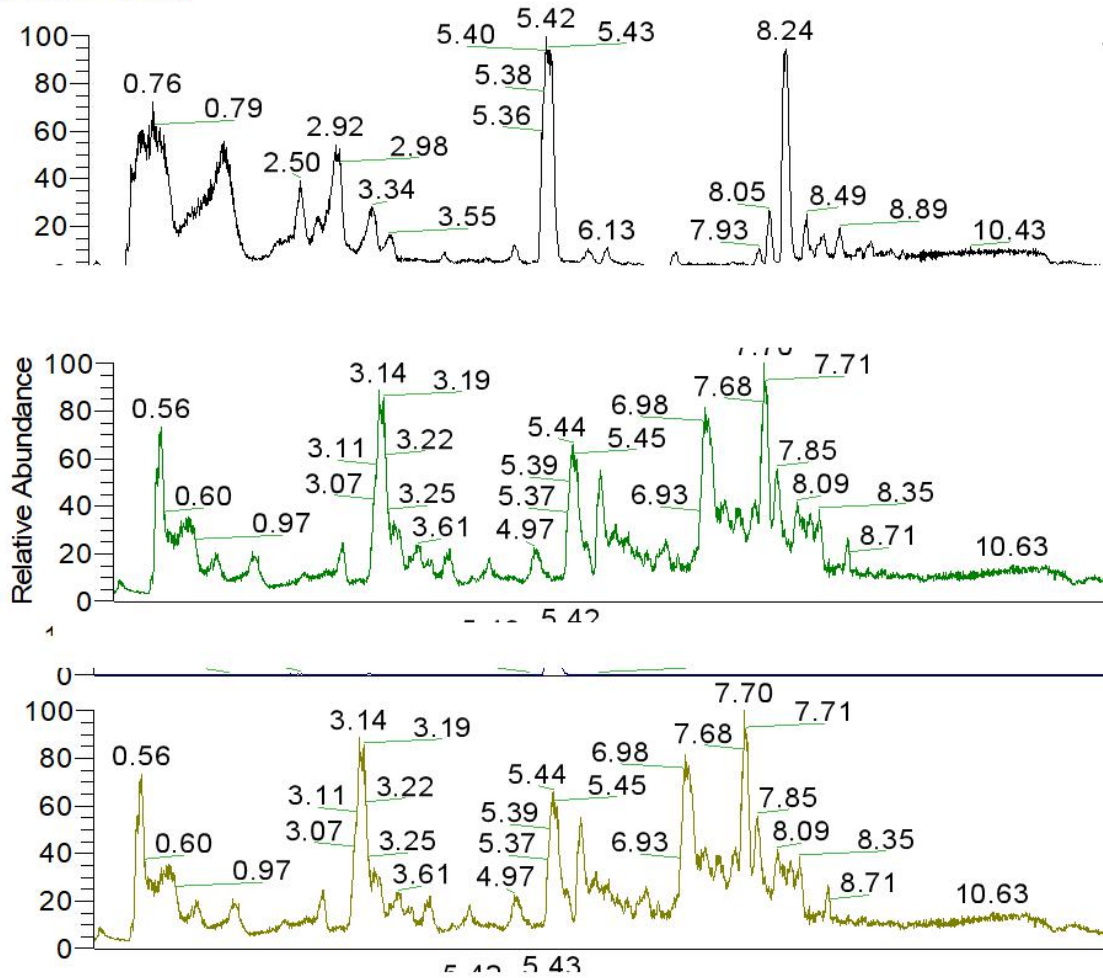


图 7 青霉素滤渣全面全扫描质谱图

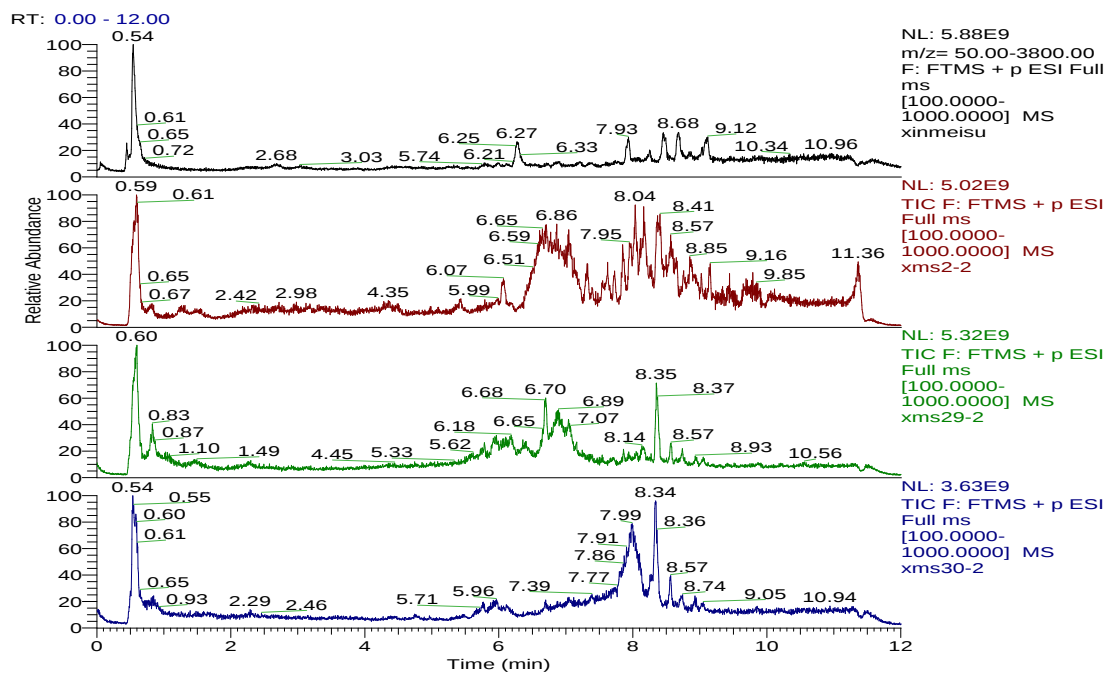


图 8 新霉素滤渣全面全扫描质谱图

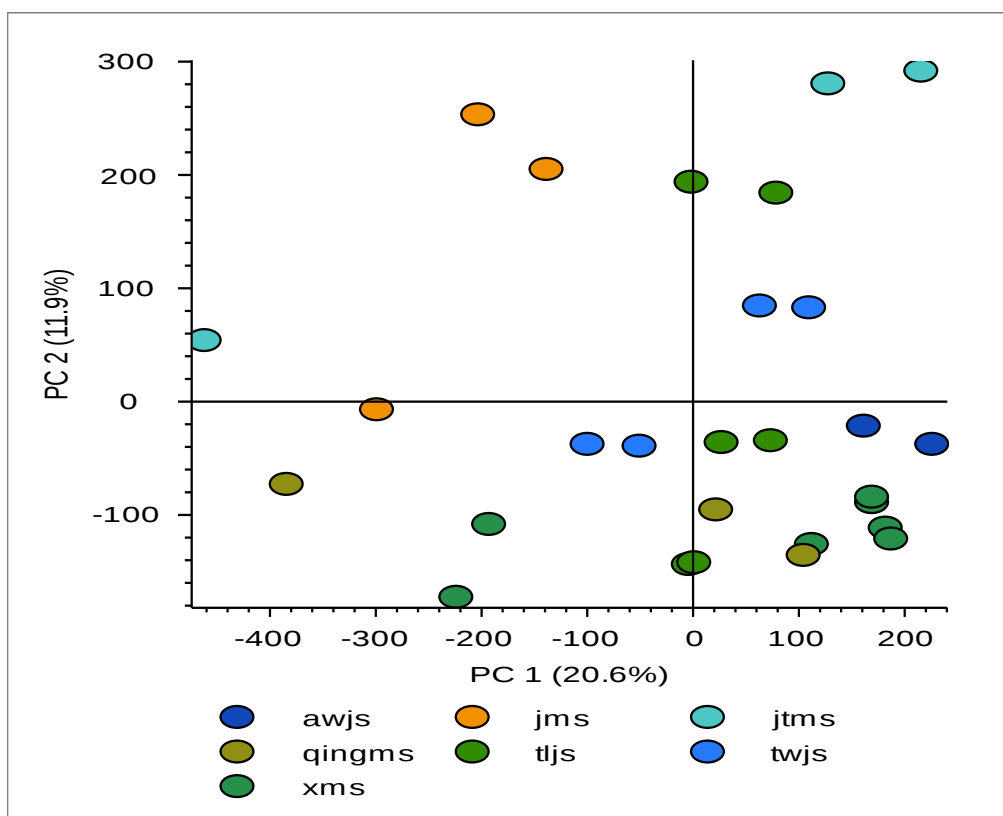


图 9 金霉素滤渣、土霉素滤渣、泰乐菌素滤渣、泰万菌素滤渣、新霉素滤渣、青霉素滤渣和其他滤渣质谱图 PCA 图

同时进行了各种抗生素滤渣和饲料的质谱数据对比,各种抗生素滤渣与饲料的质谱差异见图 10-15. 可见抗生素滤渣与饲料的数据差异明显,、通过上述分析发现高分辨质谱对不同的抗生素滤渣具有很好的辨识能力,如果再借助可以利用所有质谱信息的多元分析技术则可以很好的实现不同抗生素滤渣的鉴别。

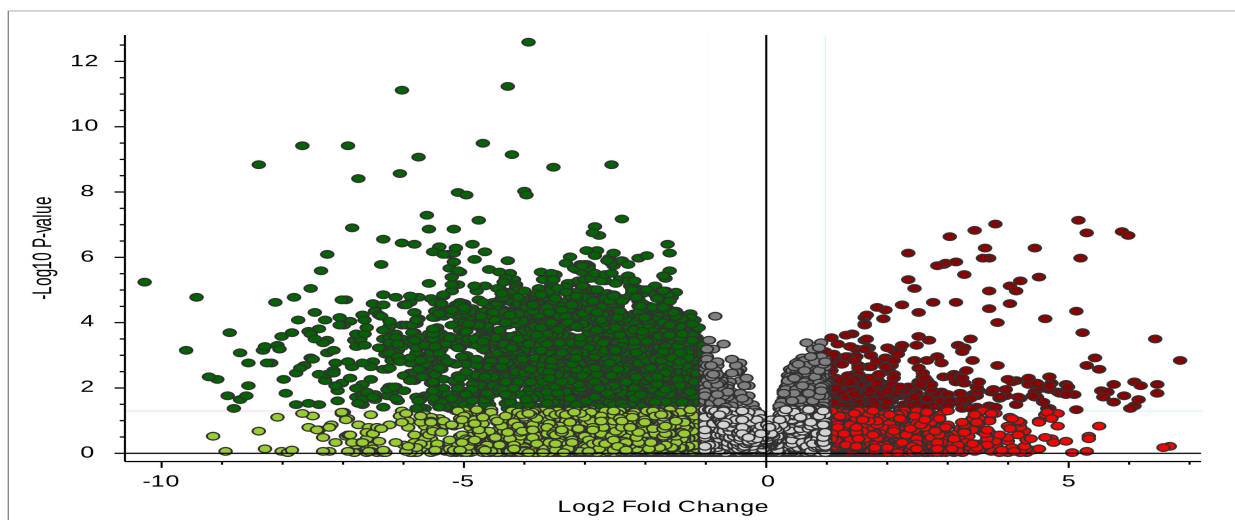


图 10 金霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

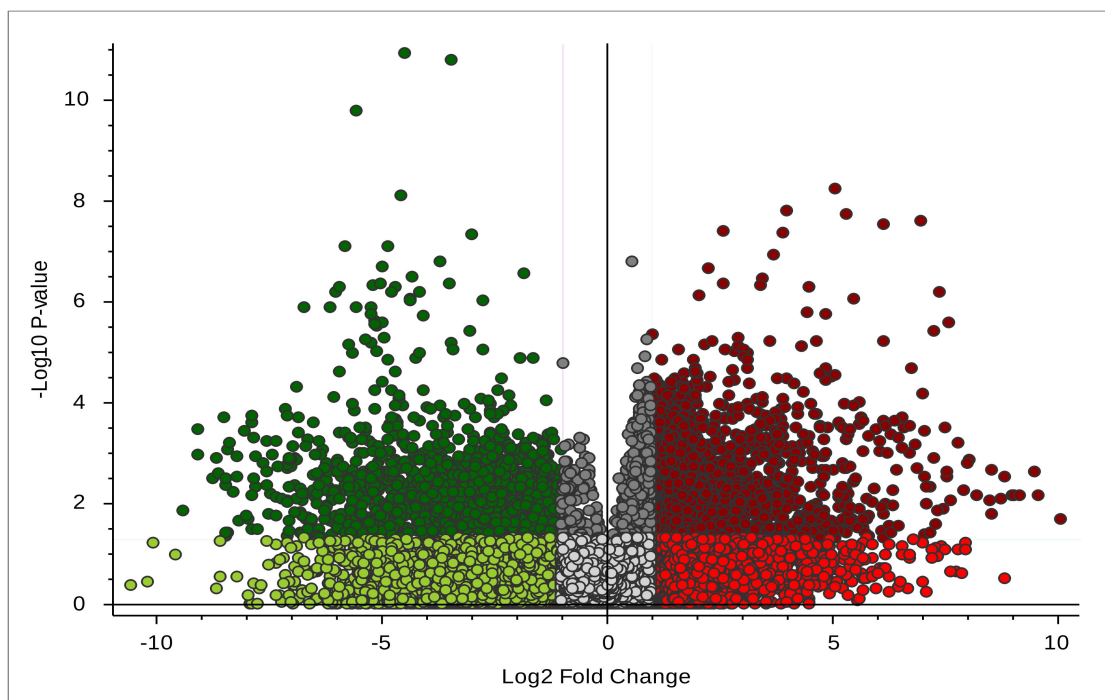


图 11 土霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

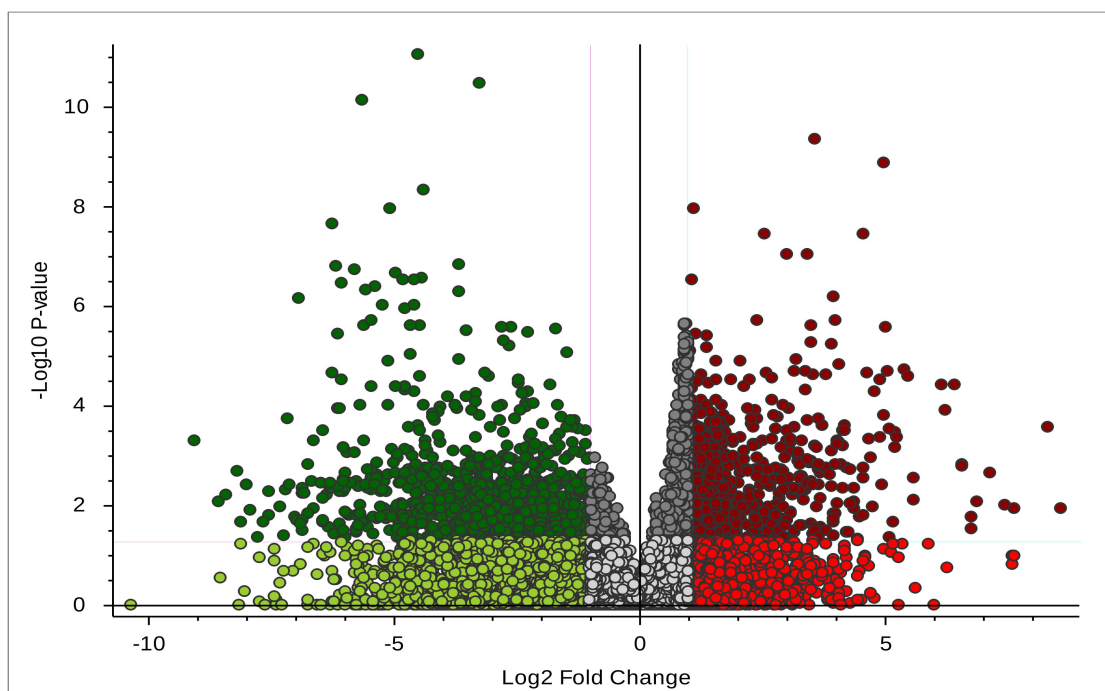


图 12 青霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

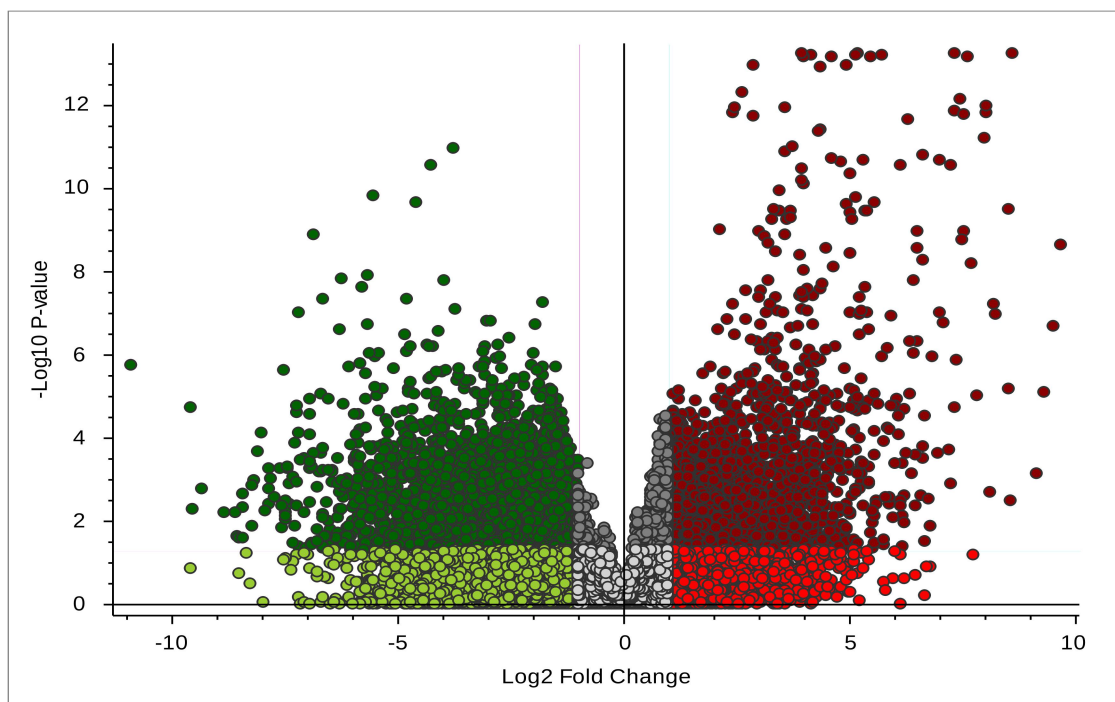


图 13 泰乐霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

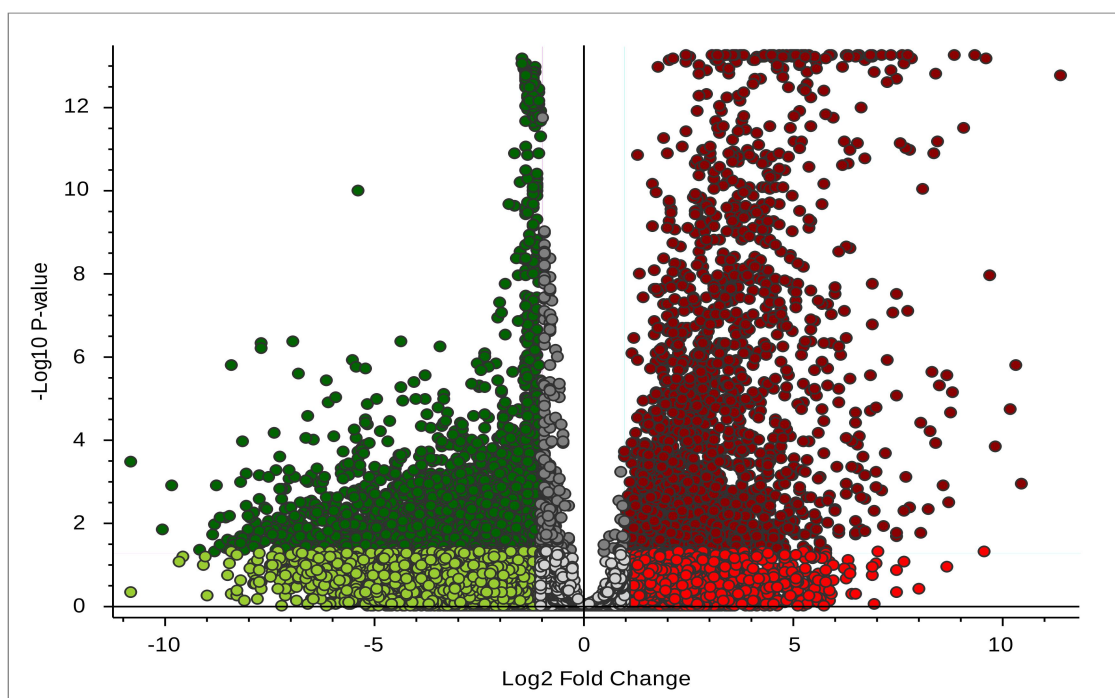


图 14 泰万霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

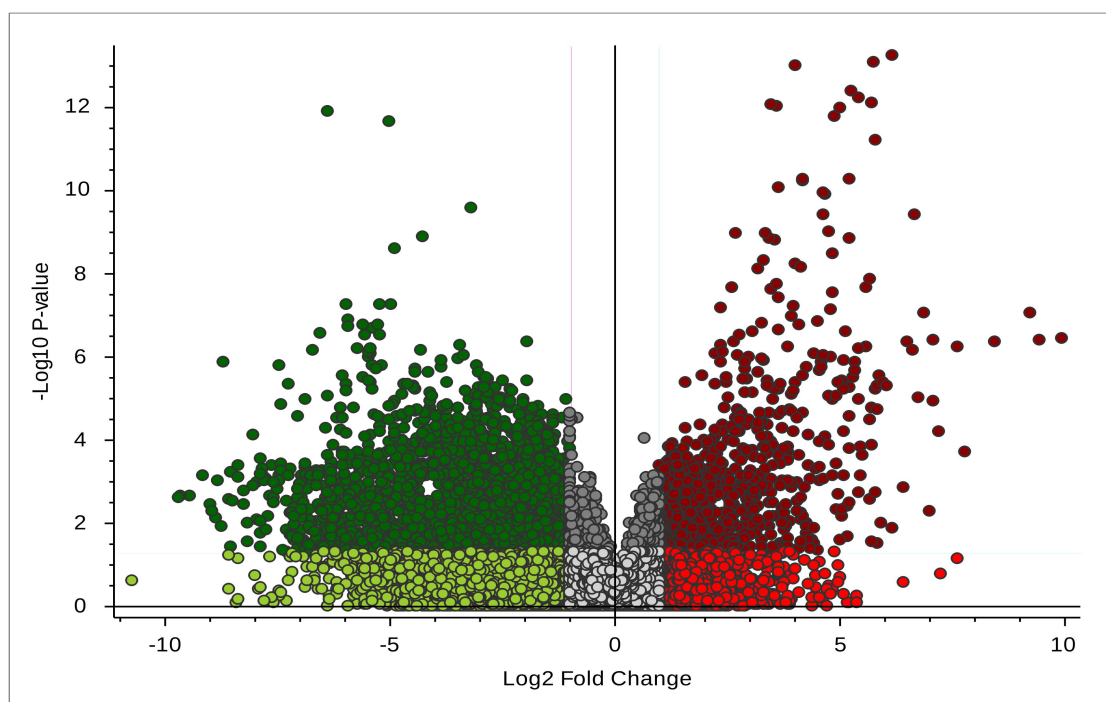


图 15 新霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

2.2.5 抗生素滤渣的合成中间产物和终产物的初选和特征标志物的筛选

1) 四环素类抗生素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

四环素类抗生素由龟裂链霉菌发酵产生，其生物合成途径涉及多个中间产物，由放线菌（如 *Streptomyces rimosus*）通过聚酮合酶（PKS）途径合成。其生物合成过程可分为聚酮链形成→环化→修饰→氨基化四个阶段，由图 16 可知。金霉素与土霉素同属四环素类抗生素，共享聚酮链组装与环化步骤，但通过氯化（C7）或羟基化（C5）修饰可以区分终产物的结构与活性。通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，从最初的 D-Glucose 到最终合成四环素类抗生素，主要中间产物和终产物共涉及 25 个目标物。通过 KEGG Pathway 数据库对这 32 个化合物可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径（> 5 种），由于本研究的目的是识别滤渣中特有的因子，并希望将其作为环素类抗生素滤渣的特征标志物，因此这 11 个化合物被确定为高关注度目标物。通过分析 11 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法尽可能将目标化合物从四环素类抗生素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离子扫描模式）以及精确分子

量扫描范围（50-1200Da）。

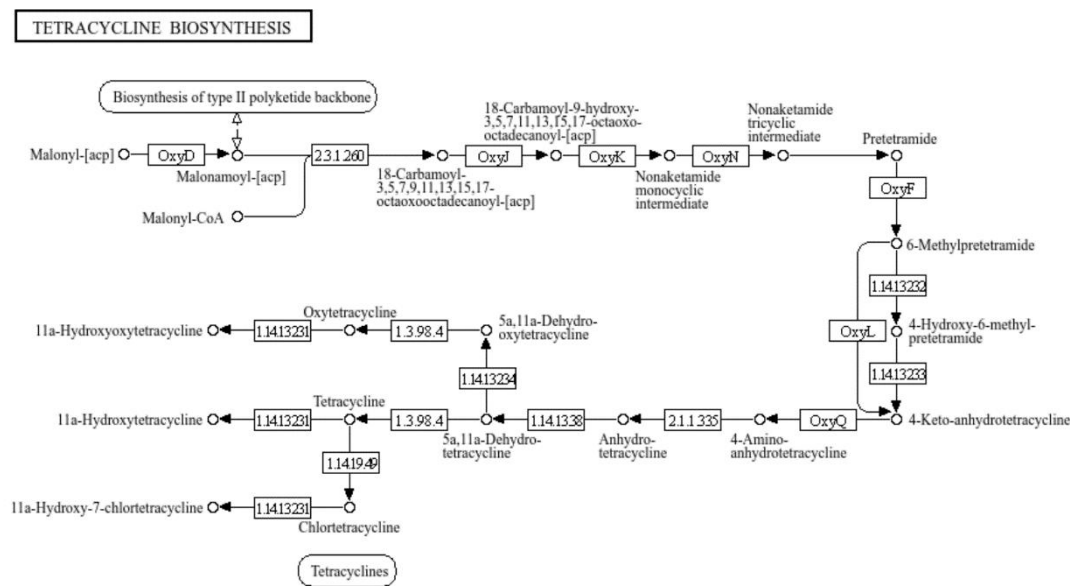
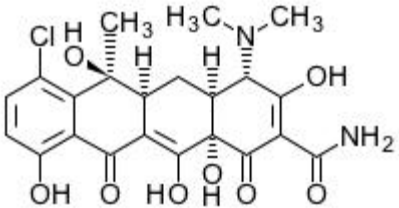
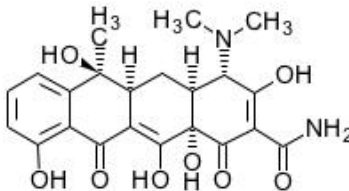
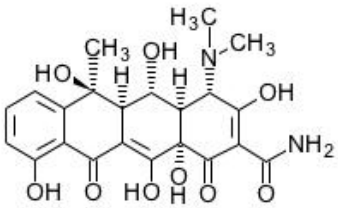
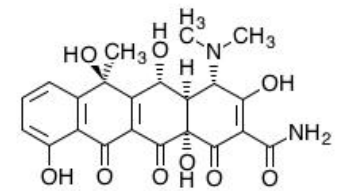
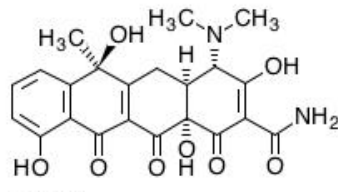
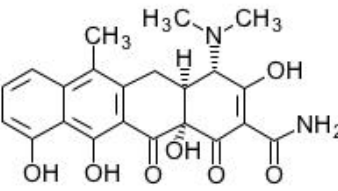
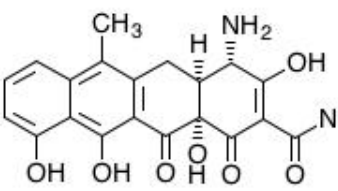
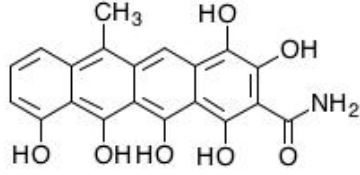
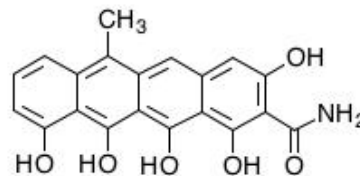
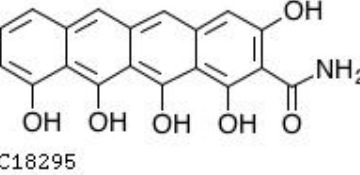
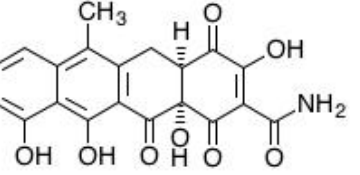


图 16 四环素类抗生素生物合成路径图

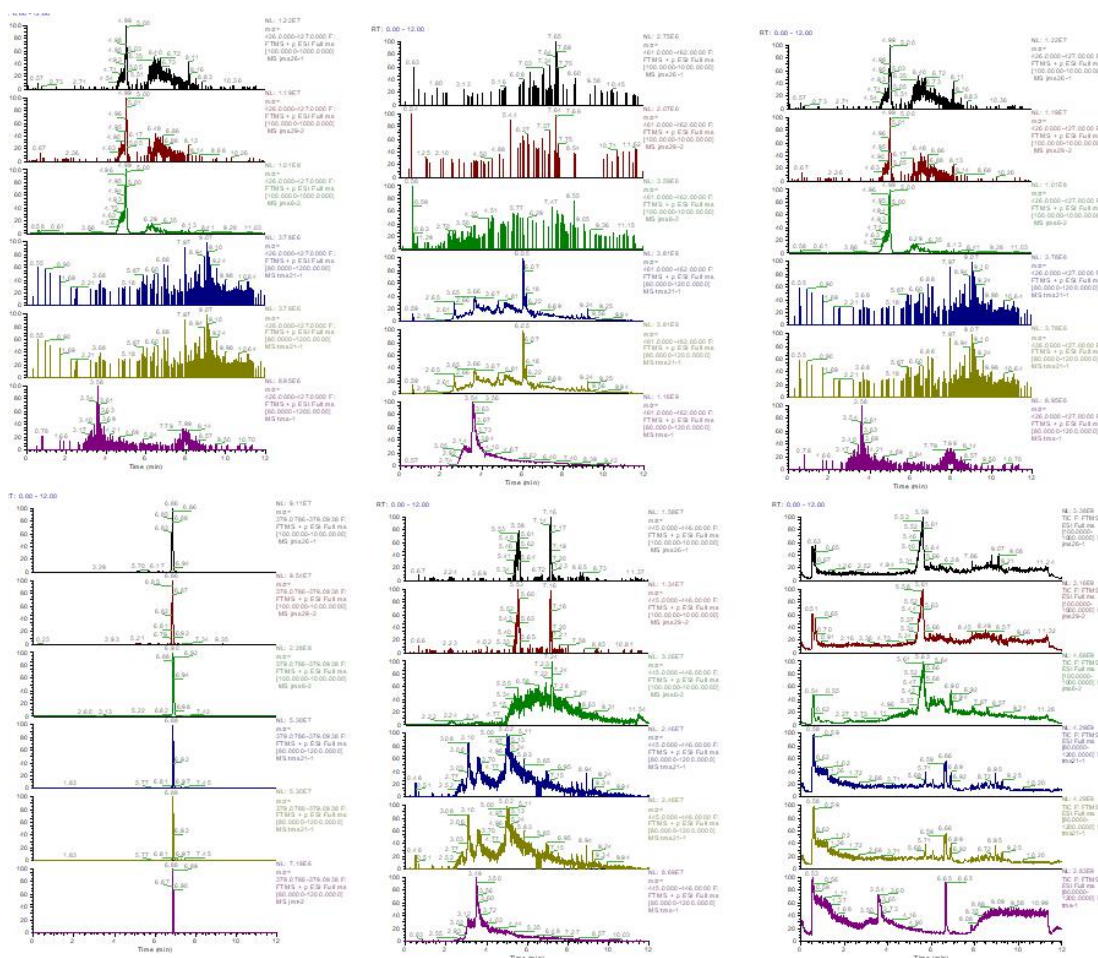
表 3 四环素类抗生素合成中间产物

序号	名称	分子量	分子式	结构式
1	Chlortetracycline	478.1143	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	 C06571
2	Tetracycline	444.1533	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	 C06570
3	Oxytetracycline	460.1482	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	 C06624

4	5a,11a-Dehydro- -oxytetracycline	458.1325	$C_{22}H_{22}N_2O_9$	 C18296
5	5a,11a-Dehydrotetracycline	442.1376	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	 C03206
6	Anhydrotetracycline	426.1427	$C_{22}H_{22}N_2O_7$	 C02811
7	4-Amino-anhydrotetracycline	398.1114	$C_{20}H_{18}N_2O_7$	 C06654

8	4-Hydroxy-6-methylpretetramide	381.0849	$C_{20}H_{15}NO_7$	 C06628
9	6-Methylpretetramide	365.0899	$C_{20}H_{15}NO_6$	 C06629
10	Pretetramid	351.0743	$C_{19}H_{13}NO_6$	 C18295
11	4-Keto-nhydrotetracycline	397.0798	$C_{20}H_{15}NO_8$	 C06627

17 四环素类抗生素滤渣特征标志物母离子色



谱图

从上述次级代谢产物与完全提取的四环素类抗生素滤渣进行对比中，经过大量的筛选、组合，在液相色谱-高分辨质谱图中，通过特征碎片提取。通过碎片离子分析，根据结果确定了土霉素和金霉素的特征标志物。如表所示。

表 4 土霉素和金霉素的特征标志物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
金霉素药渣	金霉素	478.12	479.1215	292.1054,307.1287,335.1237,367.1499
	去甲基金霉素	464.1063	465.1065	428.0749、410.0643、358.0921

	四环素四 并苯骨架	357.10	358.1029	323.0659,308.0428,341.0708
	脱水四环 素	442.14	443.1448	154.0500,201.0549,426.1186,226.0712
土霉素 药渣	土霉素	460.15	461.1554	154.0500,201.0549,337.0708,426.1186
	四环素	444.16	445.1605	154.0500,201.0549,392.1129,410.1235
	4-氨基脱 水四环素	442.14	443.1448	201.0549,426.1186, 358.0921
	脱水四环 素	426.14	427.1453	358.0921, 409.1350, 392.1085

2) 青霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

青霉素的生物合成途径还涉及到复杂的化学反应和酶促反应。青霉素的生物合成起始于起始于非核糖体多肽合成酶（NRPS）的活化。NRPS 首先被泛酰巯基乙胺化，成为有催化活性的全酶。NRPS 包含多个结构域，其中 A 结构域负责特异性地选择特定的氨基酸参与肽链合成。这些氨基酸包括 L-半胱氨酸、L-缬氨酸和非蛋白氨基酸 L- α -氨基己二酸。这些氨基酸在酶的催化下，通过非核糖体多肽合成途径形成 ACV 三肽（氨基己二酰基-半胱氨酰基-缬氨酸）。ACV 三肽随后在异青霉素 N 合成酶的催化下环化合成出异青霉素 N（IPN），再经酰基转移酶的作用，通过侧链转换得到青霉素 G。通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 7 个化合物参与多种代谢途径（>5 种，表）因此这 11 个化合物被确

定为高关注度目标物。通过分析 11 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法尽可能将目标化合物从四环素类抗生素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离子扫描模式）以及精确分子量

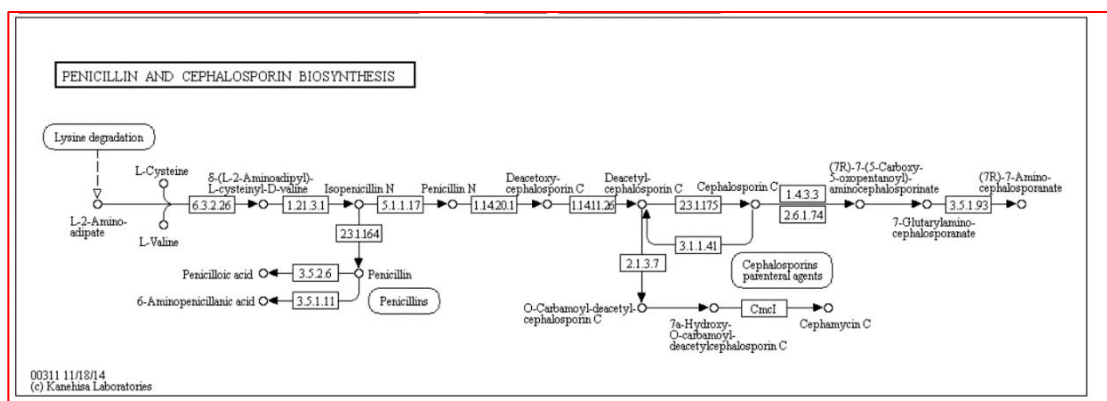
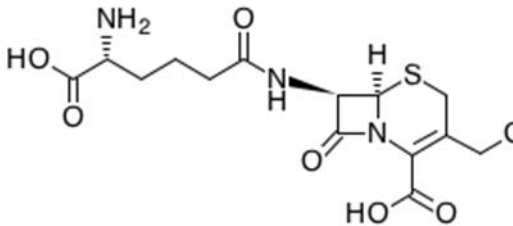
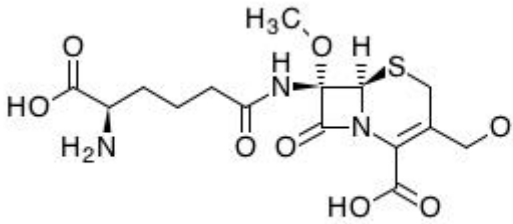
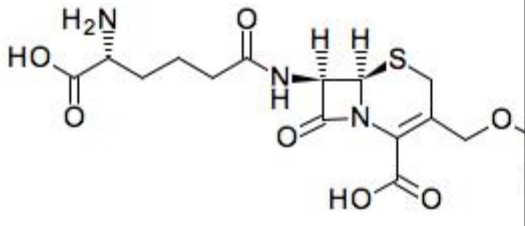
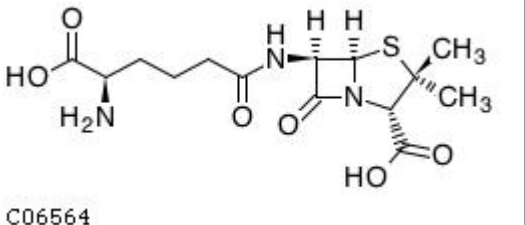
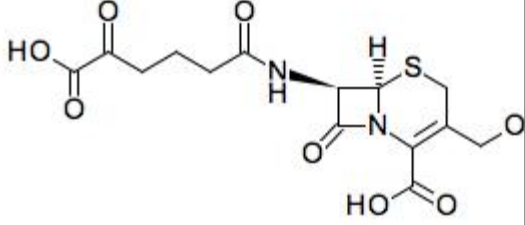
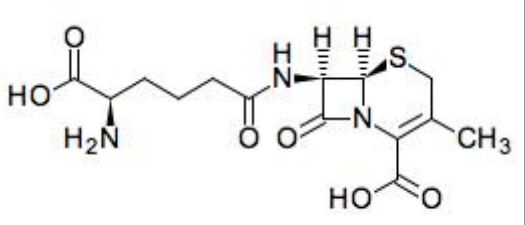
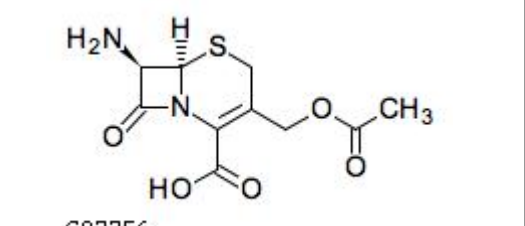


图 18 青霉素生物合成路径图

序号	名称	分子式	结构式
1	Cephalosporin C	$C_{16}H_{21}N_3O_8S$	 Chemical structure of Cephalosporin C, showing the cephalosporin core with a 6-aminocaproic acid side chain. The structure includes a fused beta-lactam and thiazolidine ring system, with a carboxylic acid group and an amino group on the side chain. C00916
2	Cephamycin C	$C_{16}H_{22}N_4O_9S$	 Chemical structure of Cephamycin C, showing the cephamycin core with a 6-aminocaproic acid side chain. The structure includes a fused beta-lactam and thiazolidine ring system, with a carboxylic acid group and an amino group on the side chain, and a methoxy group on the thiazolidine ring. C06566

3	O-Carbamoyl-deacetylcephalosporin C	$C_{15}H_{20}N_4O_8S$	 C06568
4	Penicillin N (Adicillin)	$C_{14}H_{21}N_3O_6S$	 C06564
5	(7R)-7-(5-Carboxy-5-oxopentanoyl)aminocephalosporinate	$C_{16}H_{18}N_2O_9S$	 C04712
6	Deacetoxycephalosporin C	$C_{14}H_{19}N_3O_6S$	 C06565
7	7-Aminocephalosporanic acid	$C_{10}H_{12}N_2O_5S$	 C07756

从上述次级代谢产物与完全提取的青霉素滤渣进行对比中，经过大量的筛选、组合，在液相色谱-高分辨质谱图中，通过特征碎片提取。通过碎片离子分析，根据结果确定了青霉素的特征标志物。如表 所示

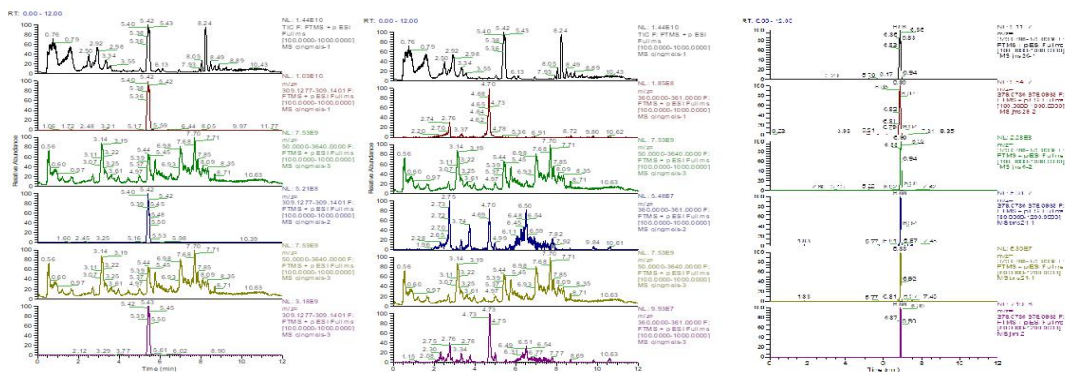


图 19 青霉素抗生素滤渣特征标志物母离子色谱图

表 6 青霉素类特征标记物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
青霉素药渣	盘尼西林 N	359.39	360.2224	201.1257,243.1442
	Cephameycin C	308.05	309.1367	174.0603,128.0544,263.1314
	ACV 三肽	361.41	3622.2019	144.0672,219.1445,245.12236

3) 泰乐霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

泰乐菌素，是美国于 1959 年从弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)的培养液中获得的一种大环内酯类抗生素。泰乐菌素的生物合成途径主要是在大环内酯的基础上，接上了三个糖基：泰内酯在碳霉胺糖基转移酶的作用下生成碳霉胺糖-泰内酯，碳霉胺糖-泰内酯在阿洛糖基转移酶的作用下生成碳霉胺糖-阿洛糖-泰内酯，碳霉胺糖-阿洛糖-泰内酯最终在碳霉糖基转移酶的作用下生成泰乐菌素 A，即泰乐菌素。泰乐菌素属于大环内酯类抗

生素，由弗氏链霉菌产生。大环内酯类的合成通常涉及聚酮合酶（PKS）。泰万菌素是泰乐菌素的衍生物，泰乐菌素经酰化反应制的，以增强其抗菌活性或药代动力学特性。

具体途径如下：

聚酮前体 → PKS 催化延伸 → 16 元大环内酯 → 羟基化 → 糖基化

（Mycaminose/Mycarose/Mycinose）→ 甲基化 → 泰乐菌素 A → 化学酰化（C3 乙酰基 + C4 异戊酰基）→ 纯化 → 泰万菌素

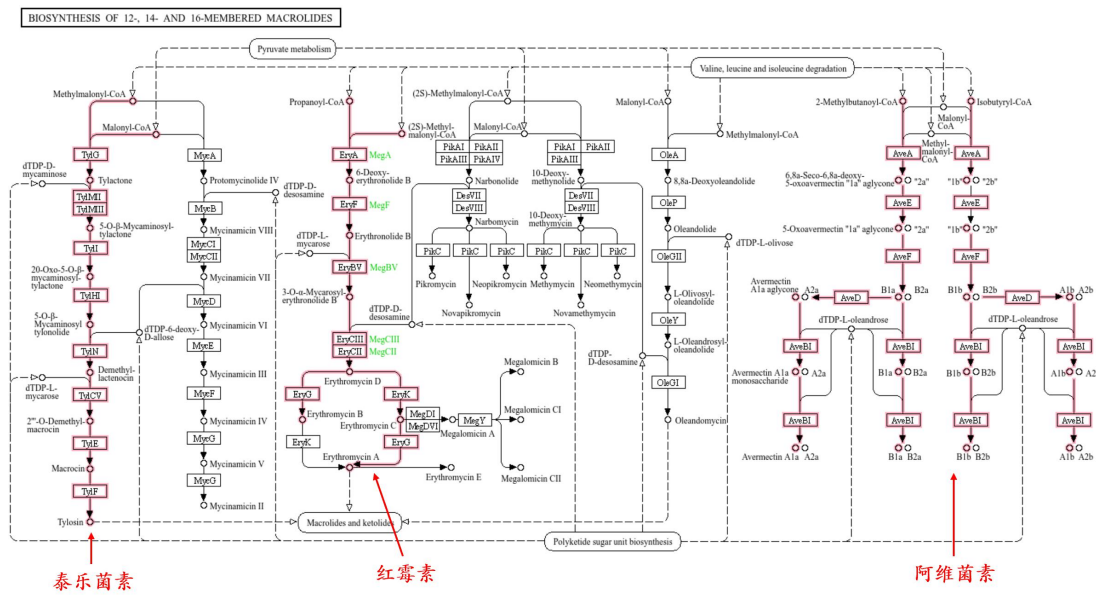
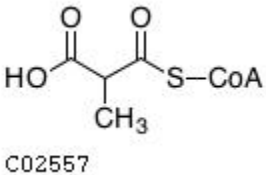
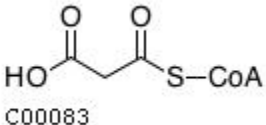
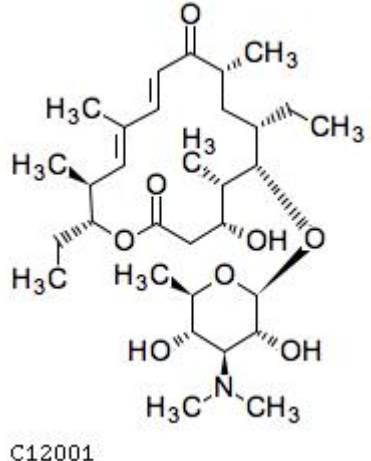
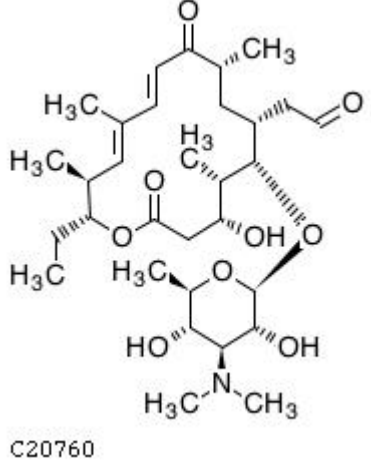
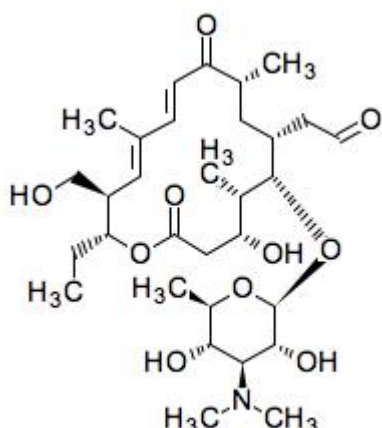
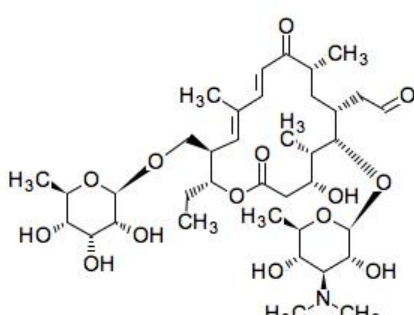
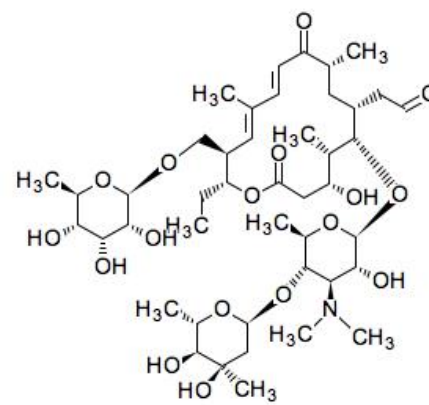


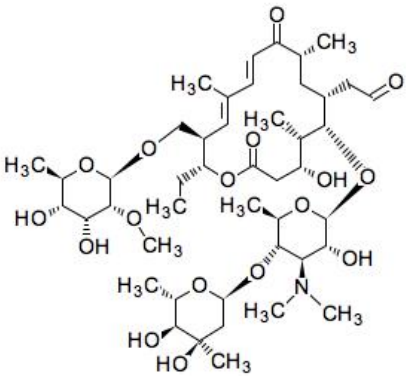
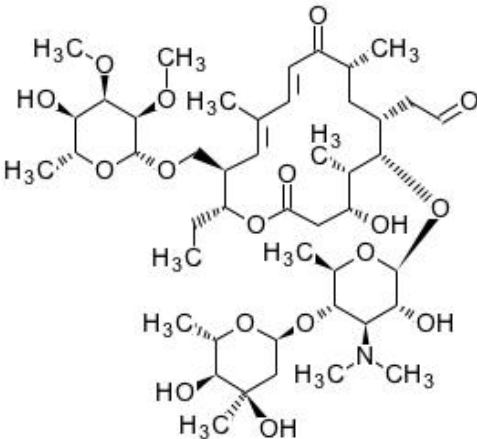
图 20 泰乐菌素合成路径图、

表 7 泰乐菌素的中间产物

序号	名称	分子量	分子式	结构式
1	Methylmalonyl-CoA	867.6069	C25H40N7O19P3 S	

2	Malonyl-CoA	853.5803	C ₂₄ H ₃₈ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	 C00083
3	Tylactone	394.5448	C ₂₃ H ₃₈ O ₅	 C12000
4	5-O-beta-D-Mycaminosyltylactone	567.7544	C ₃₁ H ₅₃ N ₁ O ₈	 C12001
5	20-Oxo-5-O-beta-mycaminosyltylactone; 23-Deoxy-5-O-beta-mycaminosyltylonol	581.7379	C ₃₁ H ₅₁ N ₁ O ₉	 C20760

6	5-O-beta-D-Mycaminosyltylonolide	597.7373	C ₃₁ H ₅₁ NO ₁₀	 C12002
7	Demethylactenocin	743.8785	C ₃₇ H ₆₁ NO ₁₄	 C12003
8	Demethylmacrocin	888.0469	C ₄₄ H ₇₃ NO ₁₇	 C02400

9	Macrocin	902.0735	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₇	 C00744
10	Tylosin	916.1001	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	 C01457

由图 2-1 可知，从最初的 D-Glucose 到最终合成泰乐菌素，主要中间产物和终产物共涉及 32 个目标物。通过 KEGG Pathway 数据库对这 32 个化合物可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径（>5 种），由于本研究的目的是识别滤渣中特有的危害因子，并希望将其作为泰乐菌素滤渣的特征标志物，因此这 10 个化合物被确定为低关注度目标物。通过分析 19 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法（高水相、高有机相和低 pH），目的是尽可能将目标化合物从泰乐菌素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了不同色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离

子扫描模式)以及精确分子量扫描范围(50–1200Da)。

采用提取溶剂提取泰乐菌素滤渣,并应用高分辨质谱进行测定,在测得的数据中提取10种目标化合物分子量。筛查结果表明,泰乐菌素滤渣中含泰乐菌素色谱峰如图1所示;在5.620min处提取出脱甲基大菌素色谱峰如图2所示;通过碎片离子分析,检测出泰乐菌素特征碎片离子916.5264m/z和772.4478m/z如图3所示,并且检出脱甲基大菌素特征碎片离子888.4951m/z和596.3429m/z如图4所示。其他目标化合物未检出。这两种目标化合物在3种提取溶剂中均有发现,其在亲水色谱柱上能够有效保留和分离,在正离子模式(ESI+)下被电离。为此选择泰乐菌素、做为泰乐菌素滤渣的特征标记物。

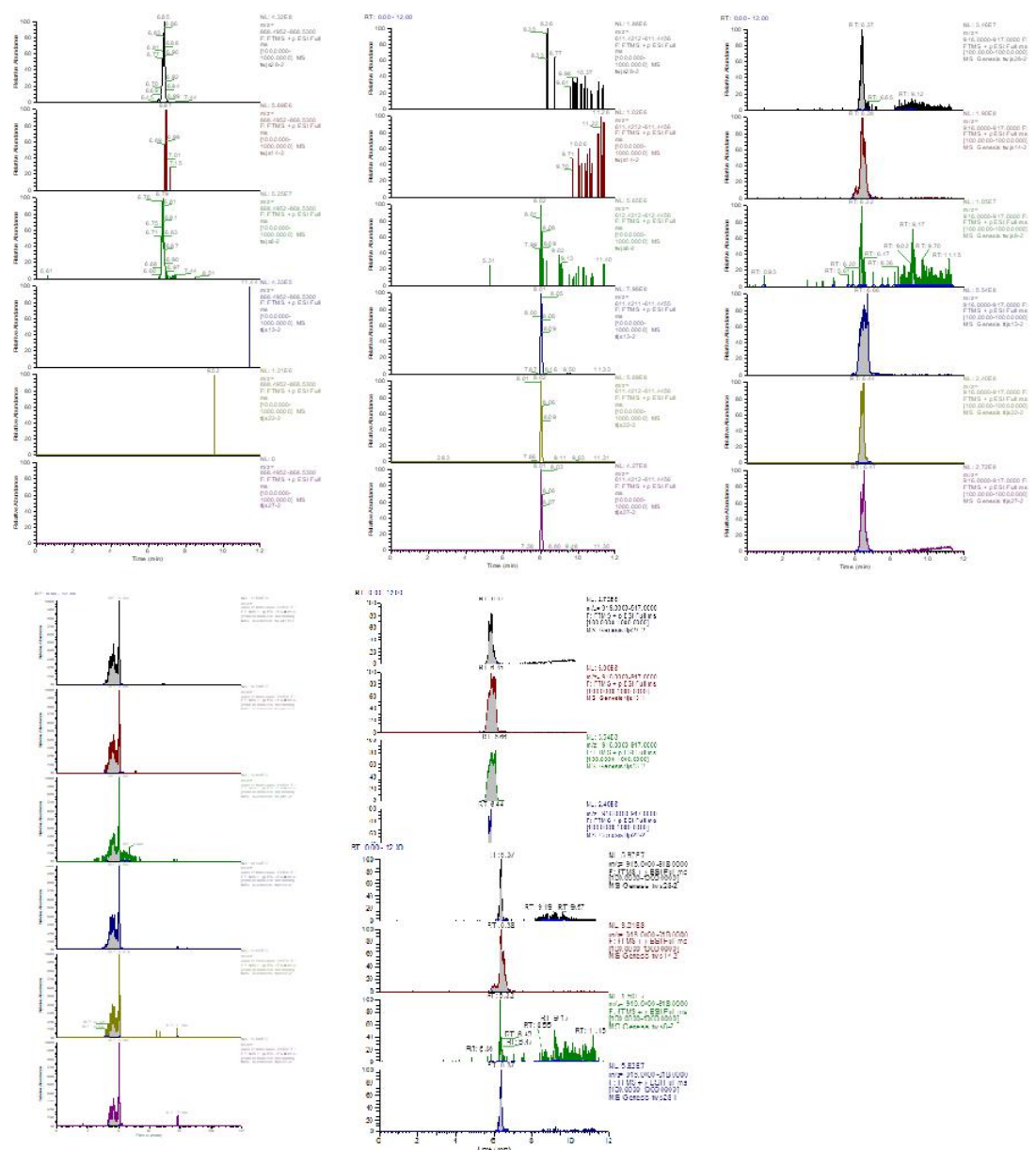


图 21 泰乐菌素和泰万菌素抗生素滤渣的特征标记物母离子色谱图

表 8 泰乐菌素和泰万菌素抗生素滤渣的特征标记物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
泰乐菌素药渣	泰乐菌素、	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,814.1421
	泰乐酮	394.54	395.2836	189.1652,207.1842

	3-乙酰泰乐菌素		611.4335	317.2169,295.2354
泰万菌素药渣	泰乐菌素	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,229.1421
	Methylmalonyl-CoA	867.60	868.5124	174.1139,109.0659,640.3743
	泰乐酮	394.54	295.28	189.1652,207.1842

4)新霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

新霉素属于氨基糖苷类抗生素，由弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)等放线菌通过次级代谢途径合成。其结构由两个氨基环醇(2-deoxystreptamine, 2-DOS)与多个氨基糖(如新霉胺、新霉二糖胺)通过糖苷键连接而成。新霉素主要包括新霉素B和新霉素C两种组分，差异在于糖基取代的位置。新霉素的合成可分为以下关键步骤：1. 2-Deoxystreptamine (2-DOS)的合成, D-葡萄糖通过磷酸化生成D-葡萄糖-6-磷酸, D-葡萄糖-6-磷酸经脱氢酶(如NeoB)转化为2-deoxy-scylo-inosose (DOI)。DOI在氨基转移酶(如NeoC)催化下引入氨基, 生成2-deoxystreptamine (2-DOS), 这是新霉素的核心氨基环醇骨架。2-DOS与第一个氨基糖(如新霉胺)通过糖基转移酶(如NeoD)连接, 形成paromamine。Paromamine进一步与第二个氨基糖(如核糖胺)连接, 生成neamine(新霉胺二糖苷)。Neamine与第三个氨基糖(L-新霉二糖胺)通过糖基转移酶(如NeoH)连接, 形成新霉素B。在部分菌株中, 糖基取代位置不同(如C5羟基取代), 形成新霉素C。

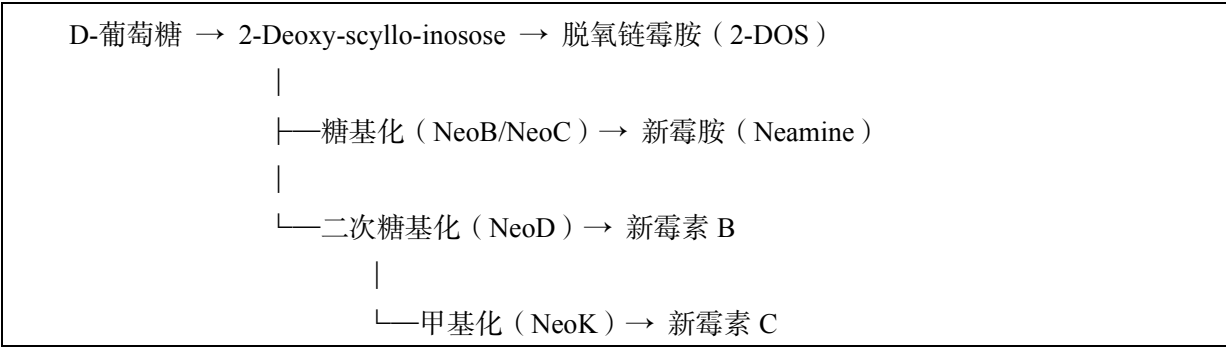


图 22 新霉素的合成路径图

通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径（>5 种），由于本研究的目的是识别新霉素滤渣中特有的因子，并希望将其作为新霉素滤渣的特征标志物，因此这 10 个化合物被确定为高关注度目标物。通过分析 10 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，目的是尽可能将目标化合物从新霉素滤渣中提取出来。

表 9 新霉素滤渣的中间产物

中间产物名称	分子式	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构特征
1. D-葡萄糖-6-磷酸	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	260.14	56-73-5	葡萄糖的磷酸化形式，C6 位磷酸基团，为 2-DOS 合成的起始前体。
2. 2-Deoxy-scylo-inosose	C ₆ H ₁₀ O ₅	162.14	未收录	环己酮衍生物，C2 位脱氧，通过葡萄糖脱氢和

(DOI)				环化生成，为 2-DOS 的直接前体。
3. 2-Deoxystreptamine (2-DOS)	$C_6H_{14}N_2O_3$	162.18	2037-48-1	氨基环醇核心骨架，含 C1 和 C3 位氨基，C4、C5、C6 位羟基，为新霉素的中央结构。
4. Neosamine C	$C_5H_{11}NO_4$	161.14	未收录	氨基糖单体，由葡萄糖经脱氧、氨基化生成，后续连接到 2-DOS 的 C4 位。
5. Paromamine	$C_{12}H_{23}N_3O_8$	337.33	7542-51-2	2-DOS 与 Neosamine C 通过 β -1,4 糖苷键连接，C4 位糖基化初步产物。
6. Ribostamycin	$C_{17}H_{34}N_4O_{10}$	466.47	25546-65-0	Paromamine 与核糖胺 (Ribosamine) 在 C5 位连接，含三个糖单元 (假设中间体)。
7. Neamine	$C_{12}H_{26}N_4O_6$	322.36	3947-65-7	Paromamine 进一步添加核糖胺，形成二糖胺结构，C5 位糖基化。
8. Neomycin B 前体 (含	$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	614.65	未收录	Neamine 与 L-新霉二糖

L-新霉二糖胺)				胺 (L-neobiosamine) 在 C6 位连接, 形成完整四糖链。
9. Neomycin C 前体 (异构体)	$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	614.65	未收录	与 Neomycin B 差异在于糖基取代位置(如 C5 羟基取代), 具体结构依赖菌株修饰。
10. 磷酸化中间体 (如 Neomycin 磷酸酯)	$C_{23}H_{47}N_6O_{16}P$	694.62	未收录	生物合成中可能的磷酸化形式, 用于糖基转移前的活化步骤。

采用提取溶剂提取新霉素滤渣, 并应用高分辨质谱进行测定, 在测得的数据中提取 10 种目标化合物分子量。筛查结果表明, 新霉素滤渣中含泰帕罗马明, Ribostamycin。这二种目标化合物为此选择做为新霉素滤渣的特征标记物。

表 10 新霉素特征标志物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
新霉素药渣	帕罗马明	337.33	338.1372	295.1313, 177.0559
	Ribostamycin	466.47	467.2128	338.1375, 295.1316

2.2.4 饲料原料中抗生素滤渣的鉴别

样品的采集与制备: 采集 5 类代表性饲料样品, 包括: 植物性蛋白饲料原料豆粕, 发酵类蛋白饲料原料酵母蛋白渣、玉米酒精糟 (DDGS)、核苷

酸渣（NR）和配合饲料鸡配合饲料。所有样品使用旋风磨（ZM100，德国 Restsh 公司）粉碎过 0.425 mm 筛。将抗生素滤渣以 5%（质量分数）的掺假量添加到 5 类饲料中，制备掺有抗生素滤渣的饲料试样。

饲料样品按上述方法处理，具体做法是利用主成分分析（PCA）方法选取质谱的前 100 个主成分对数据进行对比。计算掺有抗生素滤渣的饲料样品的质谱数据与抗生素滤渣质谱库中相似度，根据确定的鉴别阈值，进行饲料中抗生素滤渣的鉴别，鉴别结果如图 23-30 所示。从结果可以看出含有抗生素滤渣的饲料试样中均检测出了对应的抗生素滤渣。

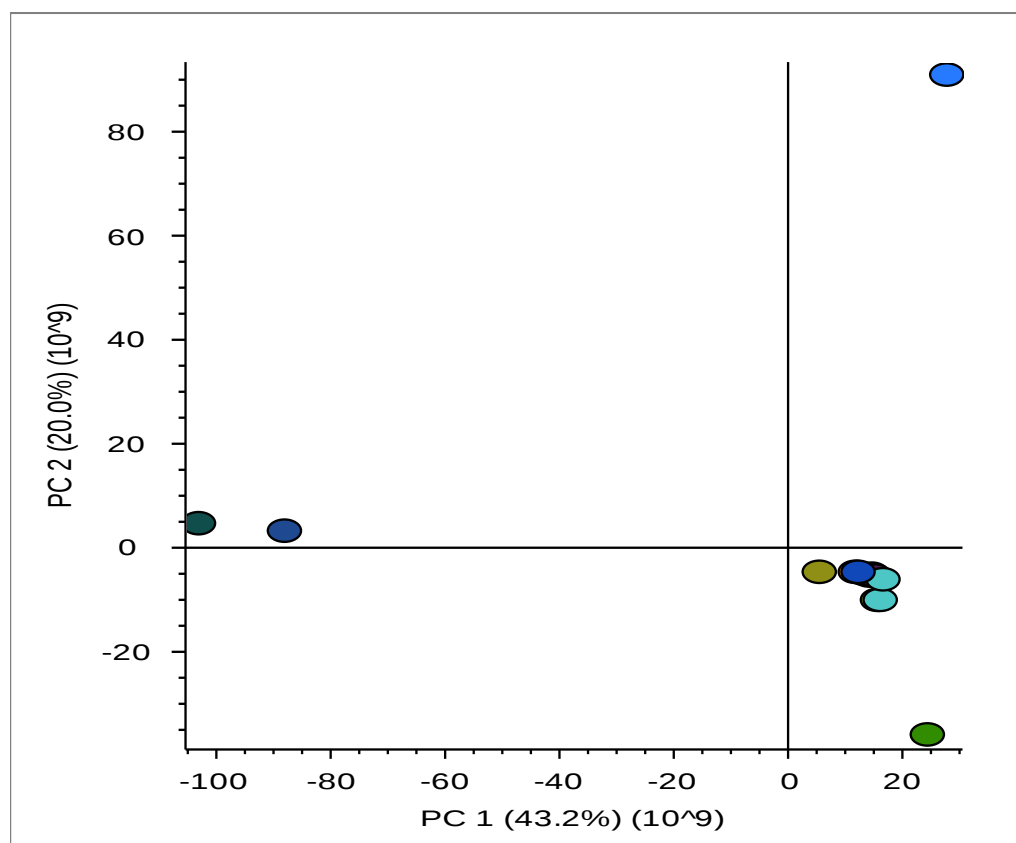


图 23 饲料中添加 3%金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣鉴别结果

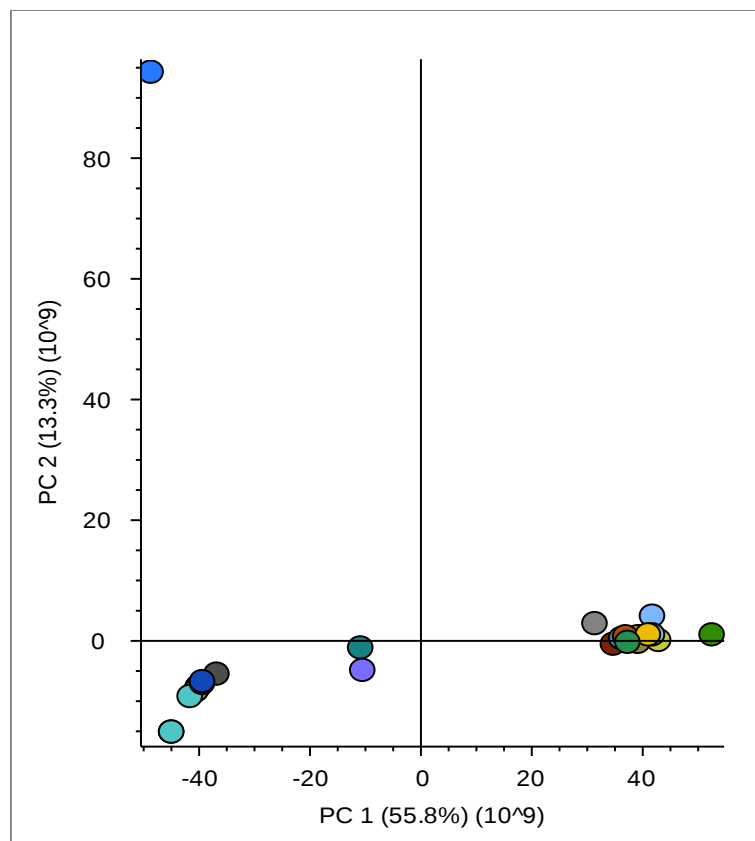


图 24 饲料中添加 5%金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣鉴别结果

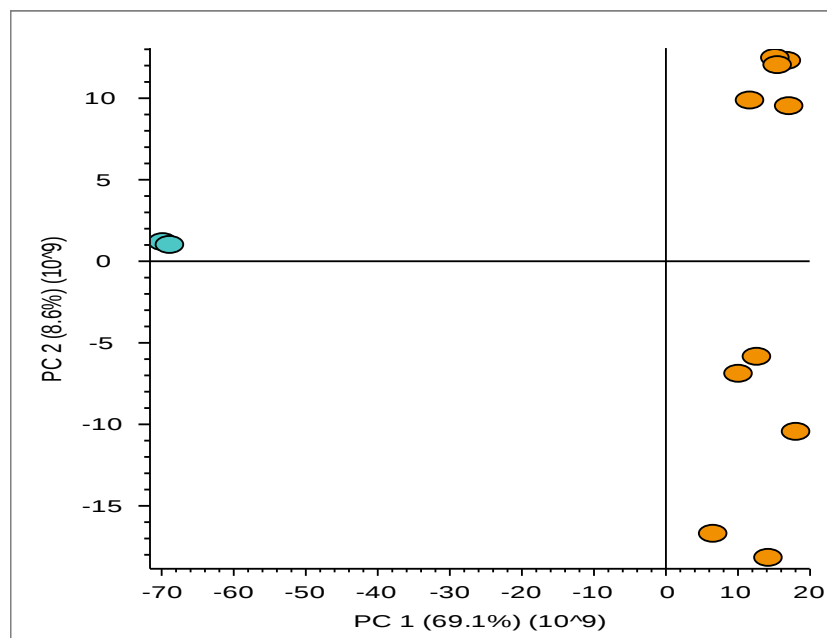


图 25 饲料中添加不同浓度（2%~50%的土霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中蓝色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、橙色像素点是饲料

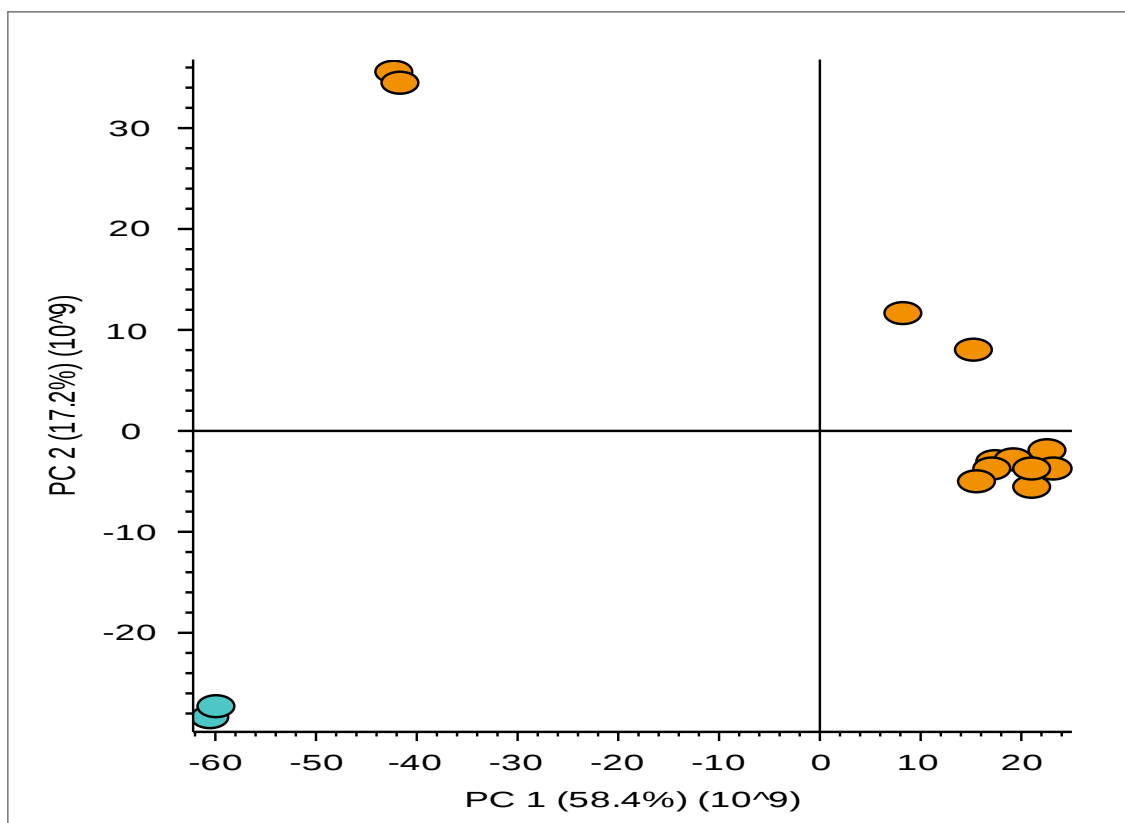


图 26 饲料中添加不同浓度（2%-50%的泰乐菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中蓝色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、橙色像素点是饲料

2.3 总结

该研究路径通过选择性提取→多维分离→精准质谱→智能评价的全链条设计，为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣的高效筛选提供了系统性解决方案。未来可进一步拓展至其他抗生素滤渣的风险管控研究。

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

2025 年 1 月~2 月，标准编制小组委托完成本标准的复核验证工作。三家检测机构对本标准的复核验证结论为：经试验验证，采用该方法能满足饲料中抗生素滤渣的鉴别，故该方法通过验证，可作为饲料中抗生素滤渣的鉴别标准方法。详见附件。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

五、采标情况

本标准未采用国际国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等、严格执行国家强制性标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

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) 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；

(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 个月后实

施。

十、其他应当说明的事项

无。

参考文献

- [1] 谢玉荣. 畜禽养殖中饲料安全影响因素及解决措施[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(10):98-99.
- [2] 陈立文, 方森海, 王明兹. 抗生素发酵废菌渣的无害化及资源再利用研究进展[J]. 生物技术通报, 2015,31(5):13-19.
- [3] 邹书娟, 王一迪, 张均雅, 杨萍, 王伟. 抗生素菌渣理化性质分析[J]. 环境科学与技术, 2018,41(S1):47-52.
- [4] 白净, 张娇娇, 常春, 陈俊英. 抗生素菌渣的综合处理研究进展: 中国环境科学学会 2019 年科学技术年会[C]——环境工程技术创新与应用分论坛, 中国陕西西安, 2019.
- [5] 邓良斌. 固体菌渣处理技术与装置研究[J]. 中国设备工程, 2020(8):73-74.
- [6] 朱培, 张建斌, 陈代杰. 抗生素菌渣处理的研究现状和建议[J]. 中国抗生素杂志, 2013,38(09):647-651.
- [7] 石鹏, 艾晗, 王辉, 孙德智. 抗生素制药菌渣的处理处置技术进展与分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015,40(07):486-494.
- [8] 苑丽梅, 王梦梦, 王璞, 刘惠玲. 头孢菌渣理化性质研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015,31(06):691-693.
- [9] 任士明. 土霉素滤渣作为饲料蛋白添加剂的应用研究[D]. 河北大学, 2016.
- [10] 肖艳春, 黄婧, 林香信, 陈彪. 抗生素菌渣饲料化工艺技术[J]. 能源与环境, 2016(05):25-26.
- [11] Chen B, Hao L, Guo X, Wang N, Ye B. Prevalence of antibiotic resistance genes of wastewater and surface water in livestock farms of Jiangsu Province, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015,22(18):13950-13959.
- [12] Cheng W, Chen H, Su C, Yan S. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China[J]. Environment International, 2013,61:1-7.
- [13] 李阳. 链霉素滤渣危害因子确证及其诱导细菌耐药机制研究[D]. 中国农业科学院, 2017.
- [14] 李再兴, 田宝阔, 左剑恶, 余忻, 沈洪艳, 王勇军, 赵秀梅. 抗生素菌渣处理处置技术进展[J]. 环境工程, 2012,30(02):72-75.
- [15] 杨帆, 张莲. 我国抗生素菌渣处置现状及建议[J]. 科技与创新, 2017(15):86-87.
- [16] 霍然, 李再兴, 钟为章, 李贵霞. 菌渣中土霉素残留的高效液相检测法[J]. 煤炭与化工, 2019,42(12):120-124.
- [17] 郑景娇. 食品中抗生素残留常用检测技术应用浅析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020,11(21):7884-7889.

- [18] 林嫚婷, 苏亚霞, 胡汉昆. 食品中抗生素残留的预处理及检测方法研究进展[J]. 食品与药品, 2020,22(04):304-309.
- [19] 李阳,樊霞,肖志明,等.一种检测菜籽粕中是否掺杂抗生素滤渣的方法.CN201810510072.9[2025-02-15].
- [20] ang C , Gao X , Tang G ,et al.Thermogravimetric study on oxy-fuel co-combustion characteristics of semi-coke and antibiotic filter residue[J].Journal of thermal analysis and calorimetry, 2022(17):147.DOI:10.1007/s10973-022-11220-y.
- [21] Zhao X , Zhu G , Liu J ,et al.Efficient Removal of Tetracycline from Water by One-Step Pyrolytic Porous Biochar Derived from Antibiotic Fermentation Residue[J].Nanomaterials (2079-4991), 2024, 14(17).DOI:10.3390/nano14171377.
- [22] Yang G , Xu Y , Wang J .Antibiotic fermentation residue for biohydrogen production: Inhibitory mechanisms of the inherent antibiotic[J].Science of the Total Environment, 2024, 944.DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.173986
- [23]