

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202X

饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 7 macrolides including Roxithromycin etc in feeds

Liquid chromatography - tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

202X-XX-XX发布

202X-XX-XX实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院。

本文件主要起草人：龚兰、王冉、魏瑞成、栾枫婷、陈明、刘传辉、朱磊、张莉莉、张泽璟、唐敏敏、邵雪梅。

NY/T ××××—20**

饲料中罗红霉素等 7 种大环内酯类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了饲料中大环内酯类药物的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定。

本方法阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素的检出限为2.5 μg/kg，定量限为5.0 μg/kg；螺旋霉素和替米考星检出限为5.0 μg/kg，定量限为10.0 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件。不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的大环内酯类药物经氨化乙腈提取，固相萃取柱净化，用液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 甲醇-水溶液：10 mL 甲醇和 90 mL 水，混合均匀。

5.6 1%氨化乙腈溶液：10 mL 氨水加乙腈稀释至 1 L，混匀。

5.7 氢氧化钠溶液（ $c=5.0\text{ mol/L}$ ）：称取 100 g 氢氧化钠，溶解于 500 mL 水中，混匀。

5.8 磷酸盐缓冲溶液（0.1 mol/L，pH=9.0）：准确称取 6.80 g 磷酸二氢钾，溶于水中，加水至约 480 mL，用 5.0 mol/L 氢氧化钠（5.7）调节 pH 至 9.0，定容至 500 mL，混匀。

5.9 5%氨化甲醇溶液：5 mL 氨水加甲醇稀释至 100 mL，混匀。

5.10 0.1%甲酸水溶液：1 mL 甲酸（5.4）加水稀释至 1 L，混匀。

5.11 0.1%甲酸乙腈溶液：1 mL 甲酸（5.4）加乙腈稀释至 1 L，混匀。

5.12 标准储备溶液（1 000 mg/L）：分别称取适量螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素标准品（纯度不低于 92.0%，具体见附录 A）（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容

量瓶中，用甲醇（5.2）溶解后稀释至刻度，分别配制成1 000 mg/L的标准储备液。于-18℃以下避光保存，有效期为3个月。

注：如所用标准品为相应的盐或含结晶水，应折算成有效成份。

5.13 标准中间溶液（阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素1 mg/L，替米考星和螺旋霉素2 mg/L）：分别准确移取阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素标准储备溶液（5.12）0.1 mL，螺旋霉素和替米考星标准储备溶液（5.12）0.2 mL于100 mL容量瓶中，用甲醇-水溶液（5.5）定容，混匀，备用。于2℃~8℃下避光保存，有效期为7天。

5.14 标准工作溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.13）于50 mL容量瓶中，用甲醇-水溶液（5.5）稀释定容，制得阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素浓度为10.0 μg/L和100.0 μg/L，螺旋霉素和替米考星为20.0 μg/L和200.0 μg/L的混合标准工作溶液。于2℃~8℃下避光保存，有效期为7天。

5.15 固相萃取柱：氮乙炔吡咯烷酮与二乙烯基苯共聚物的混合型反相填料，200 mg/6 mL，或者相当

5.16 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量0.01 g、0.000 01 g。

6.3 旋涡混合器。

6.4 振荡器。

6.5 超声波清洗器。

6.6 离心机。

6.7 氮吹仪。

6.8 固相萃取装置。

7 样品

用四分法缩减取样不少于200 g，按GB/T 20195制备样品，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做2份试验。称取试样2 g（精确至0.01 g），置于50 mL离心管中，准确加入10 mL 1%氨化乙腈溶液（5.6），涡旋1 min，振荡5 min，超声提取20 min，于8 000 r/min离心5 min，取上清液于另一个50 mL离心管中；于残渣中加入10 mL 1%氨化乙腈溶液（5.6），重复提取一次，合并上清液，准确量取2 mL上清液（为分取液），于40℃氮气吹至近干，加入5 mL磷酸盐缓冲溶液（5.8）溶解残渣，备用，待净化。若样品中目标物浓度过高，可从提取液中分取0.5 mL~1 mL，于40℃氮气吹至近干，加入5 mL磷酸缓冲溶液（5.8）溶解残渣后待净化。

8.2 净化

固相萃取柱（5.15）依次用5 mL甲醇（5.2）、5 mL水和5 mL磷酸盐缓冲溶液（5.8）活化，备用液（8.1）全部过柱，5 mL水淋洗、抽干，用5%氨化甲醇溶液（5.9）6 mL洗脱并收集，于40℃条件下氮气吹至近干，准确加入1 mL 甲醇-水溶液（5.5）溶解残余物，涡旋混匀，过滤膜（5.16），供液相色谱—串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品，按8.1和8.2处理制得空白样品提取液，精密量取混合标准工作液（5.14）适量，用空白样品提取液稀释，配制得到阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素浓度为1 μg/L、2 μg/L、

NY/T ××××—202×

5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L和50 µg/L，螺旋霉素、替米考星为2 µg/L、4 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、40 µg/L和100 µg/L的基质匹配标准系列溶液。以色谱峰面积为纵坐标、浓度为横坐标，绘制标准曲线。螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素基质匹配大环内酯类标准溶液色谱图参见附录B中的图B.1。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 µm），或性能相当者。

柱温：40℃。

流速：0.3 mL/min。

进样量：5 µL。

流动相：A：0.1%甲酸水溶液（5.10），B：0.1%甲酸乙腈溶液（5.11），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
2.00	80	20
5.00	50	50
6.00	10	90
7.00	10	90
7.01	90	10
10.00	90	10

8.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

离子源电压：5.5 kV。

离子源温度：500℃。

雾化气：50 psi。

辅助气：55 psi。

气帘气：45 V。

碰撞气：8 V。

多反应监测（MRM）离子对、去簇电压及碰撞电压见表2。

表2 分析物的离子对、去簇电压及碰撞电压的参考值

分析物	监测离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (V)	碰撞电压 (V)
螺旋霉素	843.6/174.2	843.6/174.2	60	43
	843.6/540.5		60	41
阿奇霉素	749.5/591.3	749.5/591.3	60	28
	749.5/158.0		60	37
替米考星	869.5/696.3	869.5/696.3	38	59
	869.5/174.3		38	58

红霉素	734.3/576.3	734.3/576.3	76	27
	734.3/158.2		76	36
泰乐菌素	916.5/174.1	916.5/174.1	87	49
	916.5/772.3		87	40
克拉霉素	748.5/158.0	748.5/158.0	50	36
	748.5/590.4		50	27
罗红霉素	837.4/158.2	837.4/158.2	74	43
	837.4/679.4		74	30

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定。大环内酯标准溶液的定量离子色谱图参见附录B。

8.4.4 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列工作溶液基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/（%）	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差/（%）	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量测定

按照 8.4.1 和 8.4.2 设定仪器条件，取试样溶液和基质匹配标准工作液上机分析，以基质标准工作溶液浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，作单点或多点校准，外标法定量。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中大环内酯类药物的含量以质量分数 w 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2}{V_1 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V ——试样总提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——净化前分取液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——7.2项下溶解残余物的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2}{A_s \times V_1 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

A —— 试样溶液中待测物的色谱峰面积;

A_s —— 标准溶液中待测物的峰面积;

ρ_s —— 标准溶液中待测物的质量浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$);

V —— 试样总提取溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_1 —— 净化前分取液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 —— 7.2项下溶解残余物的体积, 单位为毫升 (mL);

m —— 试样质量, 单位为克 (g)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示, 保留3位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下, 两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附录 A

(资料性)

药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

表 A.1 大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS号
螺旋霉素	Spiramycin	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	8025-81-8
阿奇霉素	Azithromycin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	83905-01-5
替米考星	Tilmicosin	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	108050-54-0
红霉素	Erythromycin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	114-07-8
泰乐菌素	Tylosin	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	1401-69-0
克拉霉素	Clarithromycin	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	81103-11-9
罗红霉素	Roxithromycin	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	80214-83-1

附录 B
(资料性)
大环内酯类标准溶液定量离子色谱图

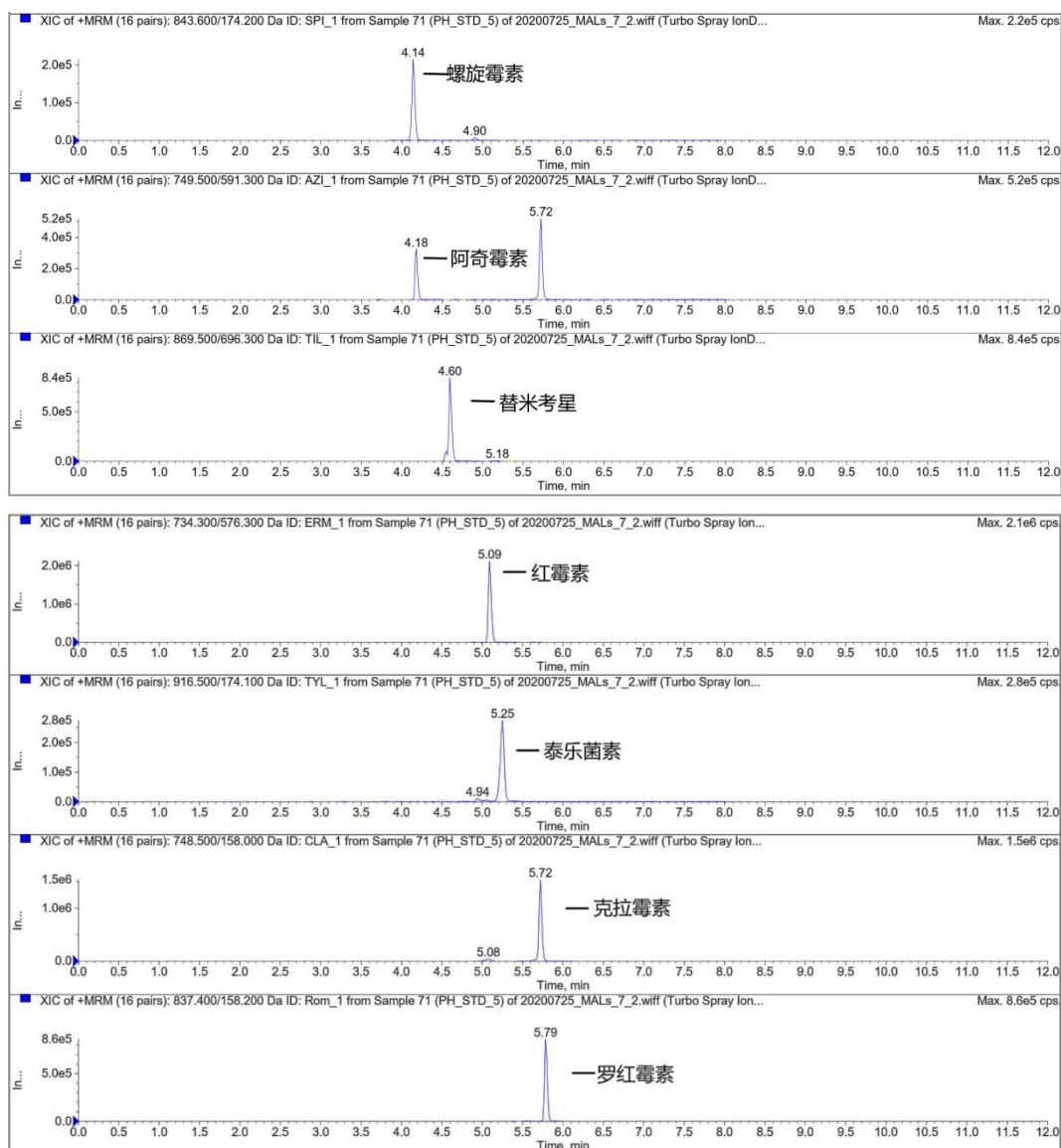


图 B.1 基质匹配大环内酯类标准品特征离子质量色谱图

(螺旋霉素 20 ng/mL, 阿奇霉素 10 ng/mL, 替米考星 20 ng/mL, 红霉素 10 ng/mL,
泰乐菌素 10 ng/mL, 克拉霉素 10 ng/mL, 罗红霉素 10 ng/mL)

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中罗红霉素等7种大环内酯药物的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

(公开征求意见稿)

起草单位：江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所

2021年2月

目 录

一、标准制定背景及任务来源.....	12
1. 标准制定背景.....	12
2. 任务来源.....	14
二、主要工作过程.....	14
1. 成立标准编制小组.....	14
2. 技术路线和项目方案的制定.....	15
3. 开展方法学研究、实际样品检测.....	15
4. 编写标准文本和编制说明征求意见稿.....	16
5. 征求意见和方法验证.....	16
6. 标准的预审、终审和报批.....	16
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	17
1. 标准编制原则.....	17
2. 主要技术内容确定的依据.....	17
2.1 液相色谱串联质谱条件的确定.....	18
2.1.1 色谱柱的确定.....	18
2.1.2 质谱条件的确定.....	19
2.2 标准溶液的稳定性.....	21
2.3 样品的前处理.....	22
2.3.1 样品提取溶剂的选取.....	22
2.3.2 样品提取方式的选取.....	23
2.3.3 样品净化方法的确定.....	24
2.3.4 pH 值的影响.....	25
2.3.5 洗脱条件的优化.....	26
2.4 基质效应.....	27
2.5 方法学考察.....	27
2.5.1 检出限与定量限的确定.....	27
2.5.2 方法的线性范围、准确度与精密度.....	28
2.6 实际样品检测.....	45
2.7 不同实验室间的对比.....	45
四、采用国际标准.....	46
五、与现行法律法规和强制性标准的关系.....	46
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	46
七、标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	46
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	47
九、废止现行有关标准的建议.....	47

十、其他应予说明的事项..... 47

一、标准制定背景及任务来源

1. 标准制定背景

大环内酯类药物（MALs）是由链霉菌产生的弱碱性抗生素，对革兰氏阳性菌和支原体具有良好的抗菌活性，临床上广泛用于治疗畜禽动物敏感菌引起的呼吸道、消化道和泌尿生殖系统感染^[1-3]。在低剂量下具有良好的促生长作用、缩短饲养周期、提高饲料回报率，有些已经成为畜禽专用抗生素，如泰乐菌素、替米考星、吉他霉素等^[2]。近年来，作为饲料添加剂的大环内酯类抗生素已成为我国乃至世界范围内需求量和销售速度增长最快的抗生素之一^[4]。长期使用这类抗生素不仅残留在动物体内，还会随粪便排出体外，污染环境^[5]；甚至导致微生物菌群的失调和革兰氏阳性菌耐药性的增加，对动物及人类健康产生危害^[6-7]。考虑到大环内酯类药物抗药性在动物之间以及抗药性在动物和人类间的传递性，欧盟委员会1999年引用“预防性原则”规定所有欧盟成员国禁止使用泰乐菌素、螺旋霉素、杆菌肽等抗生素饲料添加剂，规定在猪的肝、肾，家禽的肌肉、皮及脂肪、肝、肾中均不得检出泰乐菌素^[8]。我国最新发布的《GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定替米考星在动物组织和奶中的最大残留限量（MRL）为50~1500 μg/kg，泰乐菌素在动物组织、奶和蛋中的MRL为50~300 μg/kg^[9]。基于抗生素滥用的危害，我国相继出台了《国家遏制细菌耐药行动计划（2016-2020年）》（国卫医发[2016]43号，以下简称行动计划）和药物饲料添加剂推出计划（农业农村部194号公告）等政策，规定自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的商品饲料，目标在于有效控制动物源主要细菌耐

药率的增长^[10-11]。因此，大环内酯类药物不能作为饲料药物添加剂，但一些兽药饲料生产家和养殖户为了提高经济效益，在饲料中违禁添加此类药物。

目前，大环内酯类检测方法主要包括微生物法、毛细管电泳法、紫外分光光度计法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等^[1,12-14]。其中，微生物法、毛细管电泳法、紫外分光光度计法由于其前处理复杂、灵敏度低、准确度低、检测种类受限等缺点，鲜有报道^[12]。在饲料检测中，常用的检测方法为电化学法^[14]、液相色谱（HPLC）^[6]、液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）^[6]，基于饲料品种繁多基质复杂的特性，近年来液相色谱-串联质谱法以其灵敏度高、检出限低、具有确证性等特点，被广泛用于饲料中添加剂含量的测定^[6]。目前国内外文献报道的采用HPLC-MS/MS法测定大环内酯类主要针对畜禽肉制品、水产品、牛奶、蜂蜜等动物源性食品，而以饲料为分析对象的相关研究较少^[15-18]，其主要困难是源于动物饲料基质的复杂性和多样性，以及被检测化合物的含量低^[18]。我国目前尚未制定饲料中大环内酯类药物含量测定的方法，因此亟待建立饲料中大环内酯类抗生素的测定方法。

本文拟采用准确度和灵敏度较高的液相色谱-串联质谱法，前处理采用固相萃取净化方式测定饲料中螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素7种抗生素的残留量。该方法准确、实用、杂质干扰小、基质效应低，能够检测多种饲料（配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料）中目标化合物的含量，提高了检测范围和检测限，为我国饲料质量安全的检测和监管提供有力的技术支撑。

2. 任务来源

根据农财发[2016] 29号文件《农业部关于下达2016年农业行业标准制定与修订（农产品质量安全监管）项目资金的通知》，江苏省农业科学院农产品质量与安全研究所承担了《饲料中罗红霉素、泰乐菌素、替米考星、螺旋霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》的研究工作，项目编号为18162130109237065。在项目开展前，我们根据前期的调研和相关资料的查询发现除了罗红霉素、泰乐菌素、替米考星、螺旋霉素作为治疗和促生长作用，还会在饲料中违禁添加红霉素、阿奇霉素和克拉霉素等大环内酯类药物，因此，为了扩大饲料中大环内酯类药物测定的范围，在原有规定药物的基础上增加了红霉素、阿奇霉素和克拉霉素3种药物，最终改为螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素7种药物的测定，标准名称修改为《饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》。为此我们组织开展了本检测方法的研究工作，参考国内外有关大环内酯类药物相关文献和检测方法，并依据中华人民共和国农业部公告《兽药残留检测试验技术规范（试行）》中相关规定，优化仪器分析方法和样品前处理方法，结合实验结果起草本标准。

二、主要工作过程

1. 成立标准编制小组

2016年江苏省农业科学院根据任务下达的要求，认真组织《饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》行业标准的制定工作，确立工作小组人员安排（表2）及工作方案，制定周详的工作计划。

表2 标准主要起草人员和任务分工

人员	承担任务
龚兰	项目主持人，负责项目的全面工作
王冉、魏瑞成	项目方案设计、标准文本和编制说明编写和完善、方法验证、征求意见
栾枫婷、陈明、朱磊	检测方法研究、样品检测、标准文本和编制说明编写
刘传辉、张莉莉、张泽璟	标准文本和编制说明编写和完善、方法验证
唐敏敏、邵雪梅	检测方法研究、样品检测

2. 技术路线和项目方案的制定

2016年10月~2019年6月，通过检索收集国内外关于大环内酯类药物含量的检测方法和文献资料，以及饲料中常见兽药的检测方法和相关文献资料，确立了标准制定指导思想，制定了标准制定技术路线和试验方案。包括样品提取、净化等前处理方法和仪器检测条件等，在现有研究基础上综合分析后拟定样品前处理方法和仪器检测条件等初步实验方案。同时进行了LC-MS/MS仪器分析条件的优化，以及相关样品前处理方法的优化实验。

3. 开展方法学研究、实际样品检测

2019年7月~2020年2月，大环内酯类药物仪器分析方法和样品前处理方法的确定。考虑到标准方法的精密性和适用性，本标准采用了LC-MS/MS法进行大环内酯类药物的检测，试验结果表明LC-MS/MS对大环内酯具有较高的灵敏度。样品前处理方面，采用固液超声振荡提取、固相萃取柱净化的方法处理待测样品，然后上LC-MS/MS测定。在满足灵敏度和回收率的要求下，通过优化选择合适的提取溶剂、提取方式以及净化方法等，建立了检测方法。之后对方法学考察、饲料样品收集和样品测定。

4. 编写标准文本和编制说明征求意见稿

2020年3月~2020年4月，标准编制小组完成了标准文本、编制说明征求意见稿的编制工作。根据标准发表相关文章。

5. 征求意见和方法验证

2020年5月~2020年8月标准编制小组收集样品，分别送江西省农业科学院农产品质量安全与营养研究所、天津市农业质量标准与检测技术研究所和广东省农业科学院农产品公共监测中心3家检测机构开展农业行业标准《饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》方法验证工作。

标准编制小组将起草完成的农业行业标准《饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》标准文本和编制说明征求意见稿发送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。

本次发函征求意见10个工作日，共发函单位24家，回函单位24家，提出意见单位24家，无意见单位1个，共提出172条，采纳意见114条，部分采纳或不采纳58条。

根据征求得到意见和建议，标准编制小组对标准进行认真的修改，于2020年9月形成农业行业标准《饲料中罗红霉素等7种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》预审稿。

6. 标准的预审、终审和报批

在全国饲料工业标准化技术委员会的指导下，标准编制小组组织张若寒、樊霞、李俊、张凤枰、姜加华、王敏、汪飞杰等7位专家于2020年11月22日通过视频会议进行了预审，共提出35条意见。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、修改完善标准草案和编制说明，形成国家标准《饲料中罗红霉素等 7 种大环内酯类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》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、公开征求意见。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

1. 标准编制原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检测限和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验。使用性能的普遍性包括方法精密度、准确度、检测限等方面能满足要求，确保标准既能保持技术上的先进性，又具有经济上合理性。同时遵循了标准制定过程中的先进性、经济性和适用性原则。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》^[19] 要求编写，并参照了 GB/T 27404-2008^[20]和 GB/T 27417^[21]和 GB/T 23182-2008^[22]标准要求 and 编写格式。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2. 主要技术内容确定的依据

根据兽用大环内酯类药物的用药指导原则，此类药物用于畜类和禽类相关疾病的治疗，不用于水产动物，因此本标准的适用范围：畜禽的配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料等，使用液相色谱-串联质谱进行检测方法开发，测定螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素 7 种药物含量。

根据《GB/T 23182-2008 饲料中兽药及其他化学物检测试验规程》的要求，本标准方法学考察包括检测限（LOD）和定量限（LOQ）。其中 LOD 拟设定为信噪比为 3 时的样品添加浓度，LOQ 拟设定为信噪比为 10 时且回收率结果和相对标准偏差符合要求的样品添加浓度。本标准设低、中、高 3 个添加浓度进行回收率测定，浓度分别为方法定量限、2 倍定量限浓度和 10 倍定量限浓度。定量限以上添加浓度的回收率范围应该在 60~120%之间，结果的变异系数应在 20%以内。准标准曲线则使用标准品稀释的系列工作溶液经测定后标准曲线，设置 6 个点进行测定。

2.1 液相色谱串联质谱条件的确定

2.1.1 色谱柱的确定

液相色谱-串联质谱具有分离速度快、灵敏度高等特点，本实验选用 AB 公司 API 6500 plus 进行方法开发和验证，在方法研制过程中，我们选用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (2.1×150 mm, 3.5 μm) 色谱柱和 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行比较，发现 1.7 μm 粒径的色谱柱无论是保留时间还是峰形都比 3.5 μm 粒径的色谱柱要好，因此本标准选用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1100 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行样品的分离检测。

3.3.2 流动相及梯度的确定

大环内酯类药物属于极性化合物，选择 C₁₈ 的反相色谱柱进行分离。分别选择水相为 0.1% 甲酸水和 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液进行分离，发现 0.1% 的甲酸水能明显改善目标物的峰型，有助于碱性物质的分离，并使目标化合物在色谱柱保留时间提前；有机相分别考察甲醇和乙腈的分离效果，选用甲醇导致 7 个目标物的峰型较差，而乙腈能明显提高螺旋霉素和替米考星的响应值，峰形较好，无拖尾现象。采用梯度洗脱，达到

饲料杂质与目标分析物良好的分离，同时缩短分离分析时间的目的。综上所述所述0.1%甲酸水和0.1%甲酸乙腈作为流动相时采用梯度洗脱，保证良好的峰型和分离度。设置以下梯度洗脱条件，如表1所示。

表1 梯度洗脱程序

时间time (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	90	10
1	90	10
2	80	20
5	50	50
6	10	90
7	10	90
7.01	90	10

2.1.2 质谱条件的确定

分别用螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素的标准溶液在质谱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两对离子分别作为定量离子对和定性离子对。然后采用混合标准溶液在多反应监测（MRM）模式下优化离子源电压、气帘气、雾化气、雾化温度、辅助气、碰撞气、去簇电压和碰撞电压等质谱参数（表2）。在优化检测参数条件下的典型色谱图见图1。

离子源：电喷雾离子源，正离子；

扫描方式：多反应监测模式（MRM）；

离子源电压：5.5 kV；

雾化温度：500℃；

雾化气：50 psi；

辅助气：55 psi；

气帘气：45 V；

碰撞气：8 V

表 2 大环内酯类药物的多反应监测扫描模式的质谱参数

分析药物	药物缩写	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (V)
Tilmicosin 替米考星	TILM	869.5	696.3*, 174.3	38, 38	59, 58
Roxithromycin 罗红霉素	ROM	837.4	158.2*, 679.4	74, 74	43, 30
Spiramycin 螺旋霉素	SPI	843.6	174.2*, 540.5	60, 60	43, 41
Tylosin 泰乐菌素	TYL	916.5	174.1*, 772.3	87, 87	49, 40
Erythromycin 红霉素	ERM	734.3	576.3*, 158.2	76, 76	27, 36
Clarithromycin 克拉霉素	CLA	748.5	158.0*, 590.4	50, 50	36, 27
Azithromycin 阿奇霉素	AZI	749.5	591.3*, 158.0	60, 60	28, 37

“*”表示定量离子

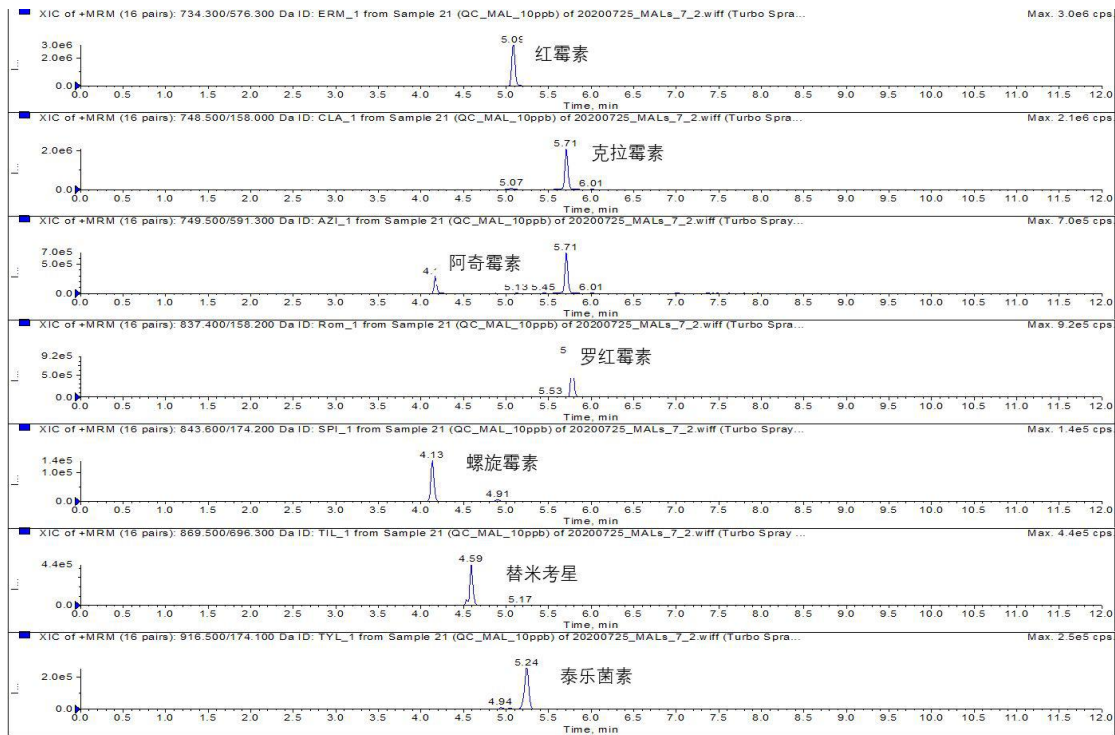


图 1 大环内酯类药物多反应监测离子流色谱图质谱图 (10ng/mL)

2.2 标准溶液的稳定性

分别准确量取适量的螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素，用甲醇溶解稀释配制成高浓度（1 mg/mL 左右）标准储备液，于-20℃下储存。用水：甲醇（9:1，v/v）稀释成三组不同浓度的标准溶液在 14 天内不定期反复进样，于 4℃下冷藏储存，每一浓度重复走 5 针，观察其峰面积的重复性及线性相关，结果表明，罗红霉素、泰乐菌素、红霉素和克拉霉素 7 天内不同浓度的标样在 5 次测定信号相应的变异系数均在 2%以内（具体统计结果见表 3），而替米考星、螺旋霉素和阿奇霉素在第 14 天响应值和峰面积显著降低，标样在 5 次测定信号相应的变异系数均大于 20%，说明药物发生了降解。因此混合标准工作溶液在 4℃左右的冰箱保存可使用 7 天。

表 3 大环内酯类药物在不同时间的稳定性

目标物	1 ng/mL 混标的峰面积				5 ng/mL 混标的峰面积				50 ng/mL 混标的峰面积				保留时间 min
	储存 0 天	储存 7 天	储存 14 天	RS D	储存 0 天	储存 7 天	储存 14 天	RSD	储存 0 天	储存 7 天	储存 14 天	RSD	
替米考星	2.35E+04	2.25E+04	1.75E+04	15.1	1.68E+05	1.70E+05	1.32E+05	13.5	1.55E+06	1.64E+06	1.35E+06	10.1	4.50
罗红霉素	1.53E+05	1.48E+05	1.43E+05	3.4	6.49E+05	6.23E+05	5.46E+05	8.8	5.80E+06	5.98E+06	5.77E+06	1.9	5.78
螺旋霉素	4.99E+04	5.12E+04	3.12E+04	25.4	1.81E+05	2.12E+05	1.19E+05	27.7	4.12E+05	4.06E+05	2.56E+05	24.7	4.13
泰乐菌素	1.93E+05	1.70E+05	1.54E+05	11.4	6.16E+05	6.29E+05	4.94E+05	12.8	4.77E+06	4.62E+06	4.57E+06	2.3	5.25
红霉素	5.35E+05	5.37E+05	5.16E+05	2.2	1.76E+06	1.89E+06	1.54E+06	10.2	1.62E+07	1.52E+07	1.23E+07	13.9	5.06
克拉霉素	7.12E+05	6.86E+05	6.20E+05	7.1	2.91E+06	2.93E+06	2.59E+06	6.8	2.57E+07	2.55E+07	1.90E+07	16.2	5.71
阿奇霉素	2.46E+04	2.56E+04	1.30E+04	33.2	1.65E+05	1.40E+05	1.11E+05	19.5	3.22E+06	3.38E+06	2.01E+06	26.1	4.16

另外，对螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素的高浓度标准储备液的稳定性也进行了考察。每隔 1 个月，分别

准确称取固体标准物质，以甲醇溶解稀释配置成 1 mg/mL 的高浓度储备液。定时准确量取适量各储备液，并用甲醇水（甲醇+水（V+V）=1+9）稀释至 100 ng/mL，上 LC-MS/MS 检测，以采用标准品新配制的溶液定量，计算标准物质的峰面积，每一浓度重复进样 5 针。结果如表 4 所示，螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素的标准储备液于 -20℃ 下储存，在 3 个月内稳定，无明显降解和变化。

表 4 不同时间储备液在不同时间的稳定性

目标物	100 ng/mL 混标的峰面积			RSD
	储存 0 天	储存 1 月	储存 3 月	
替米考星	3.53E+06	3.73E+06	3.52E+06	3.3
罗红霉素	8.08E+06	7.79E+06	7.56E+06	3.3
螺旋霉素	1.12E+07	1.11E+07	1.03 E+07	4.5
泰乐菌素	7.58E+06	7.43E+06	7.19E+06	2.7
红霉素	2.15E+07	2.05E+07	2.11E+07	2.4
克拉霉素	3.31E+07	3.05E+07	3.17E+07	4.1
阿奇霉素	7.60E+06	7.29E+06	7.19E+06	2.9

2.3 样品的前处理

2.3.1 样品提取溶剂的选取

本实验选取甲醇、乙腈、1%氯化甲醇、3%氯化甲醇、1%氯化乙腈、3%氯化乙腈、1%酸化甲醇、3%酸化甲醇、1%酸化乙腈、3%酸化乙腈作为提取剂，进行了提取效率（回收率和信噪比）的比较，具体比较结果见图2。结果发现，在酸性有机溶液中，大环内酯红霉素、泰乐菌素和螺旋霉素回收率低于70%；1%氯化甲醇和1%氯化乙腈的萃取效率高

于酸化有机溶液和3%的氨化有机溶液，且1%氨化乙腈比1%氨化甲醇利于沉淀饲料中的蛋白，7种药物的回收率为80.0%~93.8%，且明显减少其他杂质的干扰，所以选定1%氨化乙腈作为提取溶剂。

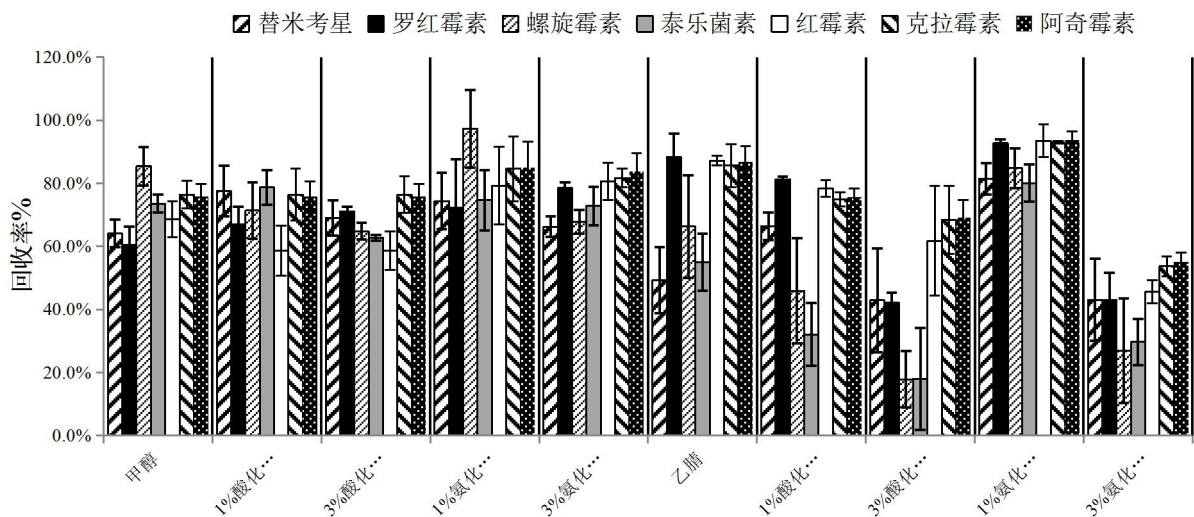


图2 不同提取液在配合饲料中的提取效率 (n=3)

2.3.2 样品提取方式的选取

本实验提取饲料的方式分为振荡、超声和超声后振荡三种方式，并对螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素提取的回收率进行了对比。对比结果如图3所示，振荡后超声的方式远高于单独振荡或超声两种提取方式。故采用1%氨化乙腈提取振荡后超声的方式。

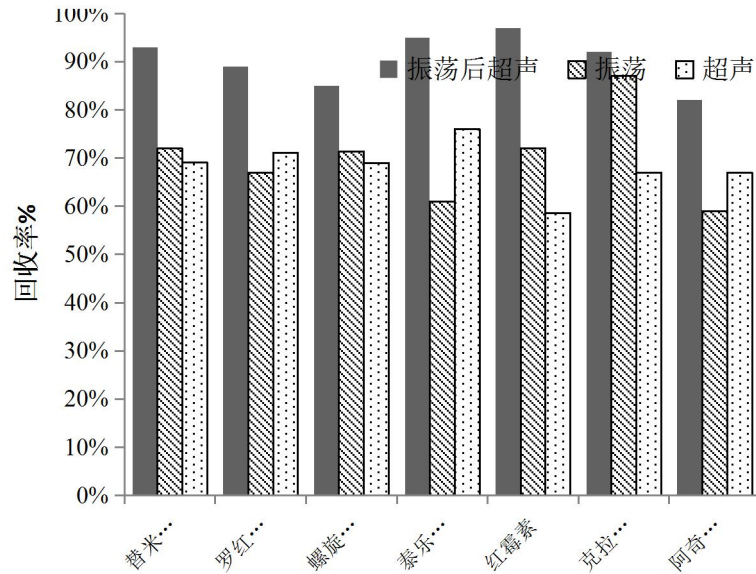


图3 配合饲料中添加 10μg/kg 时不同提取方式中大环内酯类药物的回收率

2.3.3 样品净化方法的确定

结合文献和固相萃取小柱的性质考虑, 比较了HLB (200 mg/6 mL)、MCX (150 mg/6 mL) 和C18 (200 mg/3 mL) 3种净化小柱的回收率。结果显示, 采用HLB小柱净化后7种药物的回收率为60%~120%, C18小柱的回收率为30%~108%, 而MCX小柱的回收率均低于50%, 故实验选用HLB小柱作为固相萃取净化柱。

进一步优化了HLB小柱规格, 考察了HLB (200 mg/6 mL)、PRiME HLB (200 mg/6 mL) 和HLB (60 mg/3 mL) 的回收率, 表5结果表明替米考星和螺旋霉素经HLB (60 mg/3 mL) 净化的回收率低于70%, 可能是由于该柱的填料量较少, 易造成其他杂质和目标物产生竞争性相互作用, 影响小柱的保留和洗脱; HLB (200 mg/6 mL) 和PRiME HLB (200 mg/6 mL) 的回收率高于70%, 其中PRiME HLB (200 mg/6 mL) 对7种目标物的回收率均高于HLB (200 mg/6 mL)。HLB的填料为N-乙基吡咯烷酮-二乙烯苯共聚物, PRiME HLB为氮乙基吡咯烷酮与二乙烯基苯共

聚物的混合型反相填料，两者在填料上有所区别，后者可去除更多的脂类和色素等杂质，且不影响回收率，因此最终选择PRiME HLB(200 mg/6 mL)作为净化柱，并使用PRiME HLB(200 mg/6 mL)固相萃取小柱进行后续方法的考察。

表5 不同固相萃取小柱的回收率

药物名称	C ₁₈ 小柱 (200 mg/3 mL)	MCX (150 mg/6 mL)	PRiME E HLB (200 mg/6 mL)	HLB (200 mg/6 mL)	HLB (30 mg/6 mL)
替米考星	34.2% ±25%	7.89% ±5.8%	92.6% ±1.89%	90.3% ±3.65%	68.3% ±13.8%
罗红霉素	44.2%±36%	42.1%±8.9%	89.5%±4.5%	83.6%±1.9%	55.4%±8.9%
螺旋霉素	47.8%±28%	7.45%±4.7%	107.3%±4.8%	97.9%±5.6%	63.7%±21%
泰乐菌素	59.3%±12%	18.5%±9.4%	103.6%±4.5%	95.3%±2.0%	84.2%±6.9%
红霉素	69.3%±17%	35.7%±9.6%	97.3%±3.5%	90.6%±2.5%	84.2%±5.8%
克拉霉素	52.8%±10.4%	39.1%±6.9%	93.7%±3.2%	92.5%±5.1%	81.7%±7.4%
阿奇霉素	65.1%±6.4%	42.1%±8.0%	98.1%±2.6%	95.2%±1.8%	85.4%±2.7%

2.3.4 pH 值的影响

在上样过程中，目标物的离子化程度影响其在SPE的吸附效率，实验发现， $\text{pH} \leq 4$ 和 $\text{pH} \geq 10$ 的情况均不利于药物在小柱上的保留。比较了不同pH值（5.0、6.0、7.0、8.0、9.0）的0.1 mol/L磷酸二氢钾缓冲液对7种目标物回收率的影响（见图4），结果显示， $\text{pH}=9$ 时7种目标物的回收率最佳（大于80%），这是由于弱碱性条件下大环内酯类药物以分子状态存在，易保留在HLB小柱上。综上可得， $\text{pH}=9$ 时做为净化样品的复溶液。

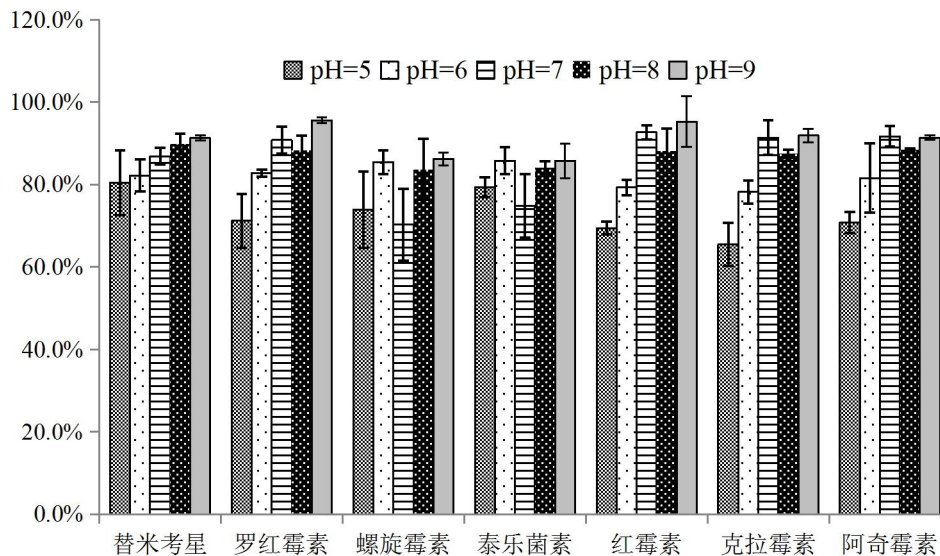


图4 不同 pH 值对固相萃取效果的影响 (加标 10 µg/kg)

2.3.5 洗脱条件的优化

PRiME HLB 固相萃取小柱的填料为氮乙烯吡咯烷酮与二乙烯基苯共聚物的混合型反相填料，能够保留多种极性差异较大的化合物，去除磷脂和部分色素。实验考察了 1%甲酸甲醇、甲醇、3%氨化甲醇和 5%氨化甲醇 4 种洗脱液的效果，结果表明 1%甲酸甲醇和甲醇只能洗脱部分大环内酯类药物，回收率低于 60%；5%氨化甲醇对 7 种药物的洗脱能力最强，回收率大于 80%，因此实验选择 5%氨化甲醇作为洗脱液（图 5）。

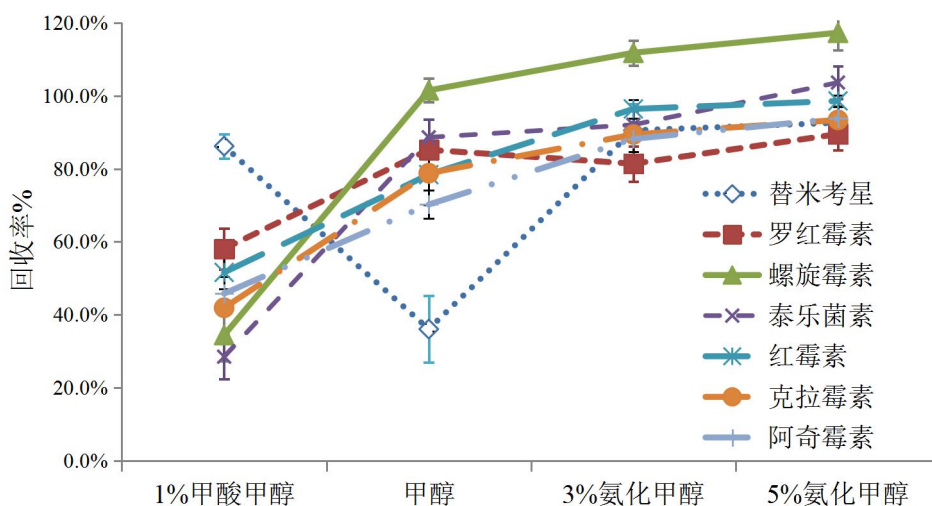


图5 不同洗脱液对回收率的影响（加标水平为 10 µg/kg）

2.4 基质效应

按照前处理步骤制备出小猪配合饲料、猪浓缩饲料、鸡预混合饲料和牛羊精补饲料的空白基质，最后配制成10 ng/mL大环内酯类药物的基质混合标准液。以空白基质中标准物质的峰面积（A）和相对应浓度的溶剂标准物质的峰面积（B）的比值考察基质效应（ME%=A/B×100%）。若比值在80%~120%范围内，则表明基质效应不明显。结果表明在最佳前处理条件下，泰乐菌素在小猪配合饲料和猪浓缩饲料中表现出较弱的基质效应，但在鸡预混合饲料和牛羊精补饲料中存在中等强度的基质增强效应；其余6种药物在小猪配合饲料、猪浓缩饲料、鸡预混合饲料和牛羊精补饲料中存在较弱的基质抑制或增强效应（表6）。因此，为了消除基质效应带来的定量偏差，采用基质混合标准工作液进行定量

表6 不同饲料中7种大环内酯类药物的基质效应

药物	基质效应ME (%)			
	小猪配合饲料	猪浓缩饲料	鸡预混合饲料	牛羊精补饲料
替米考星	102	122	107	109
罗红霉素	105	107	109	110
螺旋霉素	86	110	92	88
泰乐菌素	114	107	141	131
红霉素	87	99	906	93
克拉霉素	98	99	921	102
阿奇霉素	100	102	904	101

2.5 方法学考察

2.5.1 检出限与定量限的确定

添加 2 µg/mL 标准溶液 50 µL 于 2 g 空白饲料中（即螺旋霉素、替米考星添加浓度为 10.0 µg/kg，罗红霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素

添加浓度为 5.0 µg/kg), 经提取后测定, 药物的信噪比 $S/N > 10$ (按峰对峰计), 表明方法的定量限可至即螺旋霉素、替米考星添加浓度为 10.0 µg/kg, 罗红霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素添加浓度为 5.0 µg/kg

检测限: 添加 1 µg/mL 标准溶液 50 µL 于 2 g 空白饲料中 (即添加浓度为螺旋霉素、替米考星添加浓度为 5.0 µg/kg, 罗红霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素添加浓度为 2.5 µg/kg), 经提取后测定, 药物的信噪比 $S/N > 3$ (按峰对峰计), 表明方法的检测限可至螺旋霉素、替米考星添加浓度为 5.0 µg/kg, 罗红霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素添加浓度为 2.5 µg/kg。

另外, 阴性对照样品保留时间处响应值应低于 LOQ 响应值的 30%。

2.5.2 方法的线性范围、准确度与精密度

为了消除基质效应带来的定量偏差, 采用基质匹配标准曲线法定量。取不同饲料类型的空白样品, 按前处理步骤进行处理, 于 40°C 条件下氮气吹至近干, 精密量取适量标准系列工作溶液 (4.14), 再用 10% 甲醇水定容至 1.0 mL, 配制得到阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL, 螺旋霉素和替米考星为 2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL 和 100.0 ng/mL 基质匹配标准系列溶液, 试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内, 如超出线性范围, 应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

以目标物的峰面积Y对其含量X (ng/mL) 进行回归分析, 其相关系数 (R^2) 均大于0.99, 表明螺旋霉素和替米考星在10.0-500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、阿奇霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素在5.0-250.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内具有良好的线性关系 (表7-表10)。

表7 配合饲料中7种大环内酯类药物的线性关系

药物	线性方程	相关系数 (R^2)	线性范围 (ng/mL)
替米考星	$Y=1.68\times 10^4 X-4.77\times 10^2$	0.9999	2.0~100. 0
罗红霉素	$Y=5.05\times 10^4 X+5.78\times 10^3$	0.9982	1.0~50.0
螺旋霉素	$Y=9.26\times 10^3 X-3.01\times 10^2$	0.9924	2.0~100. 0
泰乐菌素	$Y=3.05\times 10^4 X+3.74\times 10^3$	0.9973	1.0~50.0
红霉素	$Y=4.00\times 10^4 X+1.50\times 10^3$	0.9977	1.0~50.0
克拉霉素	$Y=2.63\times 10^5 X+4.26\times 10^4$	0.9972	1.0~50.0
阿奇霉素	$Y=8.36\times 10^4 X+1.13\times 10^4$	0.9982	1.0~50.0

表8 精料补充料中7种大环内酯类药物的线性关系

Table 3 Linear relations, LODs and LOQs of 7 macrolide antibiotics in piglet compound feed

药物	线性方程	相关系数 (R^2)	线性范围 (ng/mL)
替米考星	$Y=2.30\times 10^4 X-1.79\times 10^3$	0.9998	2.0~100. 0
罗红霉素	$Y=5.26\times 10^4 X+8.32\times 10^3$	0.9975	1.0~50.0
螺旋霉素	$Y=8.54\times 10^4 X-628.4$	0.9960	2.0~100. 0
泰乐菌素	$Y=2.71\times 10^4 X-1.86\times 10^3$	0.9993	1.0~50.0
红霉素	$Y=3.96\times 10^3 X+465.1$	0.9993	1.0~50.0
克拉霉素	$Y=2.49\times 10^5 X+2.34\times 10^4$	0.9991	1.0~50.0
阿奇霉素	$Y=7.46\times 10^4 X+1.11\times 10^4$	0.9990	1.0~50.0

表9 浓缩饲料中7种大环内酯类药物的线性关系

Table 3 Linear relations, LODs and LOQs of 7 macrolide antibiotics in piglet compound feed

药物	线性方程	相关系数 (R^2)	线性范围 (ng/mL)
替米考星	$Y=1.11\times 10^4 X-4.67\times 10^3$	0.9969	2.0~100. 0
罗红霉素	$Y=3.20\times 10^4 X-2.17\times 10^4$	0.9975	1.0~50.0
螺旋霉素	$Y=8.02\times 10^3 X+223.3$	0.9979	2.0~100.

			0
泰乐菌素	$Y=2.22\times 10^4X+1.77\times 10^3$	0.9980	1.0~50.0
红霉素	$Y=3.82\times 10^3X-218.9$	0.9992	1.0~50.0
克拉霉素	$Y=2.26\times 10^5X+3.86\times 10^4$	0.9978	1.0~50.0
阿奇霉素	$Y=6.92\times 10^4X+1.78\times 10^4$	0.9981	1.0~50.0

表 10 添加剂预混合饲料中 7 种大环内酯类药物的线性关系

Table 3 Linear relations, LODs and LOQs of 7 macrolide antibiotics in piglet compound feed

药物	线性方程	相关系数 (R ²)	线性范围 (ng/mL)
替米考星	$Y=2.00\times 10^4X+1.37\times 10^3$	0.9999	2.0~100. 0
罗红霉素	$Y=4.78\times 10^4X+1.60\times 10^4$	0.9971	1.0~50.0
螺旋霉素	$Y=8.81\times 10^3X+185.2$	0.9986	2.0~100. 0
泰乐菌素	$Y=3.03\times 10^4X+2.83\times 10^3$	0.9986	1.0~50.0
红霉素	$Y=3.96\times 10^3X+1.93\times 10^3$	0.9990	1.0~50.0
克拉霉素	$Y=2.27\times 10^5X+6.57\times 10^4$	0.9984	1.0~50.0
阿奇霉素	$Y=6.81\times 10^4X+2.28\times 10^4$	0.9971	1.0~50.0

分别选择小猪配合饲料、鸡配合饲料、鸡预混饲料、猪浓缩饲料和牛羊精料补充料等 5 种空白基质进行添加回收试验，替米考星、螺旋霉素添加浓度分别为 10.0 μg/kg、20.0 μg/kg 和 100 μg/kg，罗红霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素分别为 5.0 μg/kg、10.0 μg/kg 和 50.0 μg/kg，每个浓度平行测定 5 次，重复 3 批次。采用已建立的方法测定，结果如下表 11 所示。

表 11 五种基质中 7 个大环内酯类药物的添加回收率结果

		小猪配合饲料										
药物	浓度 μg/kg	1	2	3	4	5	平均值	RSD%	批间 回收率%	批间 RSD%		
替米 考星	10	89.0	94.2	88.8	90.4	84.4	89.4	3.9	90.8	7.6		
		95.4	80.4	87.2	89.6	90.8	88.7	6.2				
		91.8	111.8	89.6	87.2	92.0	94.5	10.5				
	20	73.3	79.0	77.0	87.0	82.0	79.7	6.5				
		84.0	79.0	80.1	75.8	75.8	78.9	4.3			81.0	5.5
		80.1	86.2	82.7	86.7	86.9	84.5	3.6				
100	99.8	91.0	81.3	86.6	80.1	87.8	9.1	89.1	6.6			

		89.6	85.6	82.9	90.1	96.8	89.0	5.9		
		93.0	87.1	91.3	96.5	84.5	90.5	5.3		
		92.8	88.0	86.2	85.8	84.6	87.5	3.7		
	5	96.0	98.0	96.8	83.4	88.4	92.5	6.8	92.7	7.9
		86.6	93.8	108.0	99.2	102.8	98.1	8.4		
		91.3	87.0	86.9	85.7	83.9	87.0	3.1		
罗红霉素	10	100.8	99.7	98.2	97.8	91.7	97.6	3.6	94.5	6.8
		95.6	97.3	94.4	101.8	104.8	98.8	4.4		
		96.0	97.3	89.8	99.3	94.9	95.5	3.7		
	50	97.4	90.2	98.2	101.7	99.2	97.3	4.4	93.6	6.6
		87.5	80.7	97.7	85.5	88.2	87.9	7.1		
		102.8	97.0	98.8	88.4	103.0	98.0	6.1		
	10	89.4	91.4	94.8	96.0	86.4	91.6	4.3	93.1	6.0
		84.2	89.2	89.8	91.8	93.0	89.6	3.8		
		106.7	109.2	108.3	109.4	107.6	108.2	1.0		
螺旋霉素	20	107.5	107.3	109.9	105.3	109.1	107.8	1.7	107.4	2.9
		100.8	105.6	110.2	112.9	101.7	106.2	5.0		
		88.0	88.1	89.6	88.1	101.5	91.1	6.4		
	100	84.7	87.8	93.7	89.7	85.7	88.3	4.0	91.2	8.4
		114.4	93.7	84.3	89.3	90.0	94.3	12.4		
		79.2	79.0	97.6	79.2	88.4	84.7	9.8		
	5	81.2	86.8	101.4	72.4	87.8	85.9	12.3	80.9	12.6
		62.2	71.6	74.6	75.4	76.4	72.0	8.0		
		71.7	83.9	71.9	82.3	78.5	77.7	7.3		
泰乐菌素	10	91.0	91.4	88.9	80.9	90.1	88.5	4.9	78.7	11.8
		66.6	66.9	63.9	74.6	77.7	69.9	8.4		
		68.3	71.2	70.9	61.4	65.4	67.4	6.1		
	50	75.3	62.3	67.7	73.0	75.7	70.8	8.1	66.5	10.1
		65.5	62.0	64.9	73.8	66.4	61.4	11.6		
		86.2	77.4	78.2	68.6	84.6	79.0	8.8		
	5	88.0	85.6	91.8	79.6	81.8	85.4	5.7	83.7	7.4
		80.6	85.0	89.2	88.8	90.8	86.9	4.7		
		86.9	91.8	84.2	93.7	85.3	88.4	4.7		
红霉素	10	90.1	87.0	89.7	87.6	82.7	87.4	3.4	89.6	4.9
		95.1	89.0	87.9	96.8	96.3	93.0	4.6		
		85.9	82.6	83.5	72.0	88.7	82.6	7.7		
	50	90.2	65.2	93.6	89.3	88.4	85.4	13.4	86.4	9.7
		92.0	88.8	98.5	91.5	85.4	91.2	5.3		

克拉霉素	5	96.6	88.8	105.2	78.8	88.0	91.5	10.9	90.9	8.9
		90.6	97.6	88.2	75.2	96.4	89.6	10.0		
		80.0	90.8	96.4	97.4	93.8	91.7	7.6		
		94.0	93.1	86.5	88.5	88.5	90.1	3.6		
	10	102.3	94.5	95.8	93.6	91.1	95.5	4.4	90.9	6.8
		92.0	85.2	74.9	88.3	95.3	87.1	9.0		
		90.9	90.1	92.3	84.2	99.8	91.5	6.1		
		93.5	71.3	92.1	103.4	95.5	91.2	13.1		
阿奇霉素	5	93.6	87.0	95.0	89.4	94.4	91.9	3.8	88.5	5.3
		81.0	86.6	94.4	88.4	93.0	88.7	6.0		
		88.4	82.8	82.6	87.2	83.8	85.0	3.1		
		82.8	69.4	68.5	72.2	62.4	71.1	10.5		
	10	86.1	90.8	88.6	81.3	77.9	84.9	6.2	77.5	10.9
		76.5	74.3	67.2	80.5	84.6	76.6	8.6		
		90.4	96.2	88.1	98.1	92.7	93.1	4.4		
		84.6	80.6	91.6	97.1	83.5	87.5	7.7		
50	85.7	82.6	87.5	84.7	80.7	84.3	3.1	88.3	6.6	

鸡浓缩饲料

药物	浓度 μg/kg	1	2	3	4	5	平均值	RSD%	批间回收率%	批间RSD%
替米考星	10	89.8	99.4	96.4	85.4	98.6	93.9	6.1	91.6	6.6
		95.4	82.4	82.0	98.4	97.2	91.1	8.2		
		92.0	84.2	89.6	90.0	93.2	89.8	3.5		
		97.2	93.3	88.8	85.5	93.4	91.6	4.5		
	20	103.7	107.0	109.2	106.2	98.3	104.9	4.2	96.6	10.2
		107.1	107.9	81.4	87.4	83.1	93.4	13.1		
		89.7	99.9	87.5	93.8	91.5	92.5	4.7		
		94.2	101.7	100.1	95.5	96.9	97.7	3.1		
100	86.7	94.3	97.9	102.3	102.5	96.7	6.6	95.6	5.4	
	89.4	104.8	99.6	78.6	86.2	91.7	10.5			
	89.0	83.8	105.6	102.8	94.4	95.1	9.2			
	112.4	98.6	93.8	74.0	81.0	92.0	15.1			
罗红霉素	10	97.7	91.4	88.4	94.9	90.0	92.5	3.8	91.5	7.1
		97.2	86.7	91.2	90.6	109.7	95.1	9.0		
		92.0	86.0	83.2	89.4	84.7	87.1	3.6		
		91.8	87.7	100.0	90.1	80.9	90.1	6.9		
	50	82.3	81.6	78.5	76.6	71.9	78.2	4.2	84.4	8.9
		86.4	82.6	94.2	84.8	76.2	84.9	6.5		

		95.6	89.2	99.2	97.2	88.8	94.0	4.7		
	10	90.2	99.0	91.4	88.8	87.6	91.4	4.5	92.5	5.5
		98.2	91.2	82.2	97.8	90.6	92.0	6.5		
螺旋霉素	20	109.5	112.4	112.5	112.9	113.0	112.1	1.5		
		117.1	112.0	110.9	108.8	108.3	111.4	3.5	112.2	3.0
		115.3	117.5	116.5	109.1	107.0	113.1	4.7		
	100	112.1	109.1	97.6	94.4	75.4	97.7	14.5		
		119.6	116.8	119.7	117.8	106.4	116.4	5.9	104.9	12.4
		104.6	101.3	108.6	105.0	83.9	100.7	9.7		
泰乐菌素	5	71.8	72.2	61.8	67.8	77.0	70.1	5.7		
		73.0	64.6	60.2	74.2	71.2	68.6	6.0	68.1	7.8
		69.2	69.4	61.8	65.2	65.4	65.6	4.3		
	10	61.7	60.6	62.2	63.3	66.8	62.9	2.4		
		66.9	73.6	77.7	76.5	63.8	71.7	6.1	65.0	9.6
		58.9	58.3	59.7	60.8	64.6	60.5	2.5		
50	67.0	61.1	69.9	67.0	62.3	65.5	3.7			
	69.7	87.1	66.2	60.4	65.6	67.8	12.1	67.0	10.4	
	66.1	64.6	69.8	67.0	71.0	67.7	2.6			
红霉素	5	74.2	74.0	71.0	72.6	70.6	72.5	1.7		
		78.2	73.0	95.2	88.0	83.4	83.6	8.6	79.3	9.6
		90.0	78.2	86.4	76.4	78.8	82.0	5.9		
	10	73.9	69.1	70.4	69.1	71.0	70.7	2.0		
		83.7	79.2	85.0	82.3	90.8	84.2	4.3	79.6	8.9
		87.7	82.2	83.7	82.2	84.4	84.0	2.3		
50	80.0	78.6	81.2	76.4	84.9	80.2	3.1			
	83.6	88.0	82.0	75.2	72.6	80.3	6.3	83.1	8.4	
	93.3	91.7	94.7	89.2	75.7	88.9	7.7			
克拉霉素	5	86.0	87.2	88.4	91.2	84.2	87.4	2.6		
		93.8	95.2	105.2	93.8	93.4	96.3	5.0	88.5	8.0
		80.2	81.4	82.6	86.2	78.6	81.8	2.9		
	10	78.6	76.2	72.7	80.3	76.3	76.8	2.9		
		96.8	83.1	92.1	88.5	102.4	92.6	7.4	83.6	9.8
		83.1	80.9	77.6	84.8	80.9	81.5	2.7		
50	84.1	83.2	89.1	82.9	71.7	82.2	6.4			
	80.7	79.3	75.0	75.2	66.4	75.3	5.6	79.0	8.0	
	81.1	80.3	85.8	80.0	69.4	79.3	6.0			
阿奇霉素	5	94.4	93.6	95.2	89.2	96.2	93.7	2.7	88.5	5.7
		93.0	90.6	83.2	84.4	84.4	87.1	4.4		

		84.8	82.4	85.4	81.8	88.2	84.5	2.6		
		83.7	83.1	82.7	89.1	84.9	84.7	2.6		
	10	99.8	97.7	80.4	75.7	86.8	88.1	10.5	82.3	10.3
		73.0	73.3	72.9	77.8	74.0	74.2	2.1		
		99.2	88.7	95.8	86.2	89.2	91.8	5.5		
	50	78.3	86.5	86.7	82.2	79.7	82.7	3.9	89.3	7.3
		87.9	96.5	90.3	94.2	98.8	93.5	4.4		

牛羊精料补充料

药物	浓度 μg/kg	1	2	3	4	5	平均值	RSD%	批间回 收率%	批间 RSD%		
替米 考星	10	112.2	115.7	113.1	112.3	114.7	113.6	1.6	107.1	10.4		
		117.0	119.0	115.2	105.6	117.8	114.9	5.4				
		88.0	91.6	90.0	96.0	98.4	92.8	4.3				
	20	114.9	104.2	115.5	117.9	119.7	114.4	6.0				
		98.8	100.5	110.0	96.2	107.4	102.6	5.9			101.1	12.9
		81.5	93.2	83.9	89.5	82.9	86.2	5.0				
		94.0	94.8	99.2	101.0	102.6	98.3	3.8				
	100	116.9	119.7	118.2	118.8	116.8	118.6	2.1			103.8	11.2
		88.5	88.3	99.6	95.5	100.6	94.5	5.9				
		105.4	97.9	101.6	106.9	98.8	102.1	3.9				
5	101.6	102.8	106.4	106.8	100.2	103.6	2.9	99.5	6.2			
	100.6	89.8	86.8	91.6	96.6	93.1	5.5					
	95.4	103.9	103.1	99.9	96.0	99.7	3.9					
	10	95.7	92.3	95.9	92.6	90.8	93.5	2.2	97.2	4.4		
		102.4	97.1	103.4	94.7	95.3	98.6	4.1				
50	98.0	107.8	100.0	105.4	107.4	103.7	4.5					
	105.9	99.7	96.0	105.0	90.3	99.4	6.5	101.9	5.3			
	104.7	105.9	107.9	99.0	95.9	102.7	5.0					
	76.0	69.0	88.9	84.7	68.8	77.5	9.1					
	10	63.8	60.2	67.8	60.8	69.4	64.4	4.1	70.6	11.9		
69.4		63.7	75.8	76.9	64.1	70.0	6.2					
59.5		62.8	62.4	59.9	59.8	59.9	2.6					
螺旋 霉素	20	64.2	65.3	65.7	64.2	64.9	64.9	0.7	62.7	4.7		
		67.5	62.7	64.7	60.3	61.6	63.3	2.8				
		76.6	71.8	72.2	71.2	73.2	73.0	2.1				
	100	73.8	76.9	74.0	73.7	75.0	74.7	1.3	73.5	2.5		
71.4		75.6	72.3	72.7	72.4	72.9	1.6					
泰乐 菌素	5	60.5	63.3	67.3	67.2	61.8	60.9	3.9	62.3	7.9		
		60.2	65.8	61.4	62.2	62.4	62.0	2.7				

		75.4	69.4	68.4	69.0	61.2	66.7	6.5		
		62.9	66.5	58.2	60.1	65.0	62.5	3.4		
	10	64.2	66.2	65.3	63.3	66.4	65.1	1.3	63.5	4.3
		64.9	65.3	61.4	63.3	63.0	63.0	2.7		
		72.6	65.4	66.2	63.0	70.6	67.6	3.9		
	50	67.0	69.7	68.6	66.1	69.0	68.1	1.5	66.6	5.0
		69.6	61.2	62.8	63.1	64.7	64.3	3.2		
		112.6	101.9	103.2	105.2	109.9	106.5	4.5		
	5	103.8	98.2	91.8	86.8	85.2	93.2	7.8	102.9	8.6
		111.0	111.0	103.0	109.2	111.0	109.0	3.5		
		113.6	121.7	116.0	114.3	108.5	114.8	4.8		
红霉素	10	86.2	88.2	94.1	69.5	83.8	84.4	9.1	99.8	14.3
		104.2	94.4	102.8	104.2	96.1	100.3	4.7		
		112.2	113.4	113.8	115.2	116.0	115.1	3.5		
	50	94.2	100.4	94.1	98.9	98.4	97.2	2.9	104.5	8.4
		101.9	107.2	105.4	97.2	94.3	101.2	5.4		
		103.0	95.0	93.5	111.4	94.0	99.4	7.8		
	5	112.2	91.0	97.2	104.4	96.0	100.2	8.3	100.0	6.4
		106.8	99.2	100.0	99.4	96.6	100.4	3.8		
		86.5	76.3	87.1	76.7	86.0	82.5	5.5		
克拉霉素	10	91.0	98.1	102.9	88.7	93.9	94.9	5.7	91.6	8.8
		100.5	95.8	98.7	94.9	96.5	97.3	2.3		
		109.2	107.8	100.0	97.8	95.8	102.1	6.0		
	50	93.3	93.0	92.3	91.4	85.9	91.2	3.0	98.0	7.3
		101.9	100.4	110.5	91.5	99.2	100.7	6.8		
		112.6	107.2	117.3	115.0	114.6	113.3	3.8		
	5	115.8	95.2	105.6	106.4	85.0	103.6	15.2	108.2	8.7
		108.2	108.6	109.6	105.9	106.5	107.8	1.5		
		94.0	102.5	96.1	93.0	100.4	97.2	4.1		
阿奇霉素	10	86.7	89.1	99.1	81.5	84.8	88.2	6.7	91.3	6.9
		89.6	83.1	92.3	88.9	87.8	88.3	3.4		
		102.0	111.4	116.0	106.2	105.6	108.2	5.5		
	50	111.7	103.4	102.5	118.0	119.2	111.2	8.1	104.2	9.9
		88.6	99.3	99.7	85.2	92.9	93.1	6.4		
鸡添加剂预混合饲料										
药物	浓度 μg/kg	1	2	3	4	5	平均值	RSD%	批间回收率%	批间RSD%
替米考星	10	88.2	99.2	82.6	87.4	95.6	90.6	6.7	101.4	10.3
		98.0	116.6	101.4	102.0	104.0	104.4	7.2		

		115.8	114.4	109.6	109.6	97.0	109.3	7.4		
		90.3	97.8	90.2	98.1	93.2	93.9	3.9		
	20	86.4	104.2	104.5	117.1	111.9	104.8	11.6	101.2	10.6
		96.5	98.4	121.0	115.2	93.8	105.0	12.3		
		101.2	97.1	100.8	106.8	103.1	101.8	3.5		
	100	109.4	109.8	102.1	108.2	110.0	107.9	3.3	107.4	5.0
		114.5	114.1	109.2	114.8	109.5	112.4	2.8		
		73.8	99.4	85.0	82.0	82.0	84.4	9.3		
	5	99.6	99.2	98.0	83.2	86.0	93.2	7.9	91.2	9.7
		93.8	91.2	105.8	94.4	94.6	96.0	5.7		
		99.0	83.4	101.8	87.1	99.2	94.1	8.3		
	10	78.1	85.7	98.4	95.2	92.7	90.0	8.1	92.0	7.7
		96.1	94.6	94.2	92.9	82.1	92.0	5.6		
		104.7	88.0	98.1	94.1	88.4	94.7	7.0		
	50	96.8	101.2	88.8	88.0	98.4	94.6	5.9	91.0	8.6
		82.5	86.8	91.0	83.3	75.4	83.8	5.8		
		106.8	106.0	108.7	106.9	107.7	107.2	1.0		
	10	116.2	111.0	105.2	91.0	95.2	103.7	10.5	100.8	11.0
		88.1	90.3	89.7	110.6	78.1	91.4	11.9		
		89.1	79.2	81.8	81.0	84.7	83.1	3.9		
	20	71.9	81.1	94.8	89.3	87.1	84.8	8.7	87.1	9.3
		99.2	87.2	99.4	82.2	98.8	93.4	8.1		
		90.4	81.4	95.4	90.5	79.2	87.4	6.8		
	100	74.4	70.6	77.0	73.4	76.0	74.3	2.5	79.9	10.9
		77.0	86.2	74.2	64.0	88.4	78.0	9.8		
		94.2	96.8	95.4	100.8	99.8	97.4	2.8		
	5	118.0	102.6	111.4	102.0	104.0	109.6	9.3	103.4	7.5
		105.8	104.4	99.6	109.6	97.0	103.3	5.0		
		61.3	65.8	64.3	60.4	64.5	62.9	3.0		
	10	86.4	74.2	74.5	71.1	61.9	73.6	8.8	69.9	11.6
		76.5	70.0	71.0	65.2	83.8	73.3	7.1		
		99.0	96.1	103.7	105.8	99.8	100.9	3.9		
	50	109.4	109.8	102.1	108.2	110.0	107.9	3.3	104.4	5.7
		104.5	94.1	99.2	114.8	109.5	104.4	8.2		
		93.8	95.4	86.0	87.2	93.0	91.1	4.2		
	5	107.2	99.8	104.4	88.2	81.4	96.2	11.0	97.3	10.1
		115.6	100.0	99.8	95.0	113.0	104.7	9.1		
		103.5	85.4	96.4	95.4	101.6	96.5	7.1		
	10								94.9	7.8
		83.5	84.0	101.6	106.0	101.0	95.2	10.6		

		95.7	87.7	95.5	98.2	88.5	93.1	4.7		
		109.8	96.3	104.2	102.1	95.0	101.5	6.1		
	50	108.2	104.9	96.9	97.0	102.9	102.0	5.0	98.1	7.6
		88.5	85.0	90.6	89.6	100.1	90.8	5.6		
		81.0	84.0	93.8	97.4	98.0	90.8	7.9		
	5	109.2	108.4	108.2	100.0	93.8	103.9	6.8	97.8	9.7
		90.4	115.4	94.4	99.4	93.8	98.7	9.9		
		88.6	88.3	94.2	81.5	85.4	87.6	4.7		
克拉霉素	10	81.6	86.8	96.6	94.3	100.9	92.0	7.8	90.4	9.7
		101.0	85.7	95.0	93.3	82.2	91.4	7.5		
		100.4	84.8	92.7	90.5	86.5	91.0	6.1		
	50	95.0	94.3	84.7	83.2	88.9	89.2	5.4	87.7	8.0
		83.2	81.0	95.3	82.3	73.2	83.0	7.9		
		100.8	97.4	101.0	90.5	87.2	95.4	6.2		
	5	88.6	105.6	98.6	94.6	89.0	95.3	7.1	91.7	8.9
		86.4	72.6	88.0	90.4	85.0	84.5	6.9		
		87.7	90.3	90.9	95.5	86.9	90.2	3.4		
阿奇霉素	10	64.7	75.6	83.0	78.8	83.0	77.0	7.6	84.3	10.0
		96.2	89.9	82.7	85.3	74.3	85.7	8.2		
		107.3	91.8	95.5	92.7	88.6	95.2	7.2		
	50	114.9	112.3	114.5	104.2	118.9	113.0	5.4	107.0	9.9
		109.2	119.3	115.4	118.1	101.7	112.7	7.3		

鸡配合饲料

药物	浓度 μg/kg	1	2	3	4	5	平均值	RSD%	批间回收率%	批间RSD%
		101.8	103.6	101.0	105.6	99.6	102.3	2.3		
	10	113.4	116.8	116.4	115.4	111.8	114.8	1.8	107.7	5.5
		103.8	106.8	102.2	106.6	110.4	106.0	3.0		
		93.9	87.4	97	111.4	112.9	100.5	11.1		
替米考星	20	97.9	102.0	115.1	118.5	105.1	107.7	8.1	107.4	9.5
		101.4	115.8	118.9	119.0	114.0	113.8	6.4		
		104.9	119.0	114.5	115.0	115.2	113.7	4.6		
	100	117.5	110.1	114.0	106.9	106.4	111.0	4.3	110.8	5.7
		99.6	110.7	98.3	116.0	114.3	107.8	7.7		
		109.8	100.8	99.9	87.4	91.6	97.9	8.9		
	5	104.8	92.8	114.4	94.6	111.6	103.6	9.4	101.0	8.5
罗红霉素		107.6	88.4	108.4	102.8	100.5	101.5	7.9		
		87.8	83.4	86.4	106.9	95.4	92.0	10.3		
	10	111.7	109.5	100.2	120.5	103.9	109.2	7.1	102.3	10.8

		98.1	102.4	100.7	119.4	108.1	105.7	8.0		
		92.9	107.5	106.2	95.9	104.3	101.4	6.5		
	50	103.6	95.3	108.6	94.6	118.2	104.1	9.5		
		119.8	96.1	114.5	111.9	102.0	108.9	8.8	104.8	8.4
		102.0	89.4	90.4	111.2	93.4	97.3	9.5		
	10	85.6	92.0	76.3	95.6	108.4	91.6	13.0		
		79.2	77.4	95.0	88.4	90.1	86.0	8.7	91.6	11.1
		74.7	70.7	76.0	84.7	73.2	75.9	7.0		
螺旋霉素	20	88.8	92.8	74.6	75.5	78.1	82.0	10.1		
		73.5	86.2	84.6	85.9	84.8	83.0	6.5	80.3	8.5
		96.6	106.2	110.5	103.5	105.7	104.5	4.9		
	100	97.5	111.8	87.1	84.6	103.6	96.9	11.7		
		102.5	84.2	95.9	94.7	87.2	92.9	7.8	98.1	9.3
		60.6	67.6	63.4	68.6	66.8	65.4	5.1		
	5	61.0	62.8	63.6	60.6	67.4	63.1	4.3		
		62.2	80.8	75.4	71.6	69.5	71.9	9.6	66.8	8.7
		65.2	68.0	68.6	75.1	77.2	70.8	7.2		
泰乐菌素	10	74.5	84.1	80.3	73.3	72.2	76.9	6.6		
		64.0	80.2	74.8	77.6	73.1	73.9	8.4	73.9	7.7
		72.3	80.5	83.1	75.5	78.6	78.0	5.4		
	50	74.4	76.3	83.0	77.6	93.3	80.9	9.4		
		85.6	77.8	82.6	81.4	73.5	80.2	5.8	79.7	6.8
		79.0	88.2	84.2	85.4	91.0	85.6	5.3		
	5	93.2	85.6	95.6	94.6	95.4	92.9	4.5		
		97.6	90.2	92.2	92.0	95.2	93.4	3.1	90.6	5.7
		77.8	68.7	78.7	80.8	86.3	78.5	8.1		
红霉素	10	95.1	93.3	102.0	107.6	117.9	103.2	9.7		
		109.1	102.6	111.3	106.2	109.9	107.8	3.2	96.5	15.4
		94.9	100.2	88.7	92.6	90.6	93.4	4.8		
	50	80.4	77.7	91.1	92.7	89.5	86.3	7.8		
		100.8	91.3	95.6	97.1	99.5	96.9	3.8	92.2	7.1
		113.8	117.8	97	107.6	107	108.6	7.3		
	5	94.8	93.8	119.4	120.0	119.0	109.4	12.6		
		108.5	117.4	119.8	108.3	100.8	111.0	6.9	109.7	8.7
克拉霉素		96.1	82.6	91.5	96.4	92.7	91.9	6.1		
	10	95.5	94.0	117.9	106.5	110.6	104.9	9.7		
		107.5	107.1	100.9	102.5	103.6	104.3	2.8	100.4	8.9
	50	85.0	103.7	95.1	81.5	102.4	93.5	10.7	97.5	9.3

		114.2	109.0	97.9	93.0	99.8	102.8	8.4		
		106.5	86.4	99.0	93.0	96.6	96.3	7.7		
		102.8	118.2	105.6	103.2	113.4	108.6	6.3		
	5	86.2	95.8	95.6	98.6	95.4	94.3	5.0		
		96.6	97.6	92.8	94.6	89.9	94.3	3.3	99.1	8.5
		81.6	76.4	77.7	86.4	84.6	81.3	5.3		
阿奇霉素	10	107.4	114.1	101.8	105.5	105.6	106.9	4.2		
		100.8	109.5	103.5	107.5	90.5	102.4	7.3	96.9	13.0
		108.4	110.7	100.3	113.2	109.6	108.4	4.5		
	50	113.9	104.0	102.3	104.7	105.2	106.0	4.3		
		102.5	111.0	92.4	105.9	103.2	103.0	6.6	105.8	5.3

结果表明：在浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加回收试验中，螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和罗红霉素的回收率分别为在 73.3%~119.7%、71.9%~112.4%、59.5%~119.7%、60.1%~118.0%、65.2%~116.0%、66.4%~115.4%及 62.4%~119.3%（见表 7），批内和批间回收率的相对标准偏差均小于 20%。图 6-15 为饲料空白和典型饲料中添加定量限浓度的色谱图。

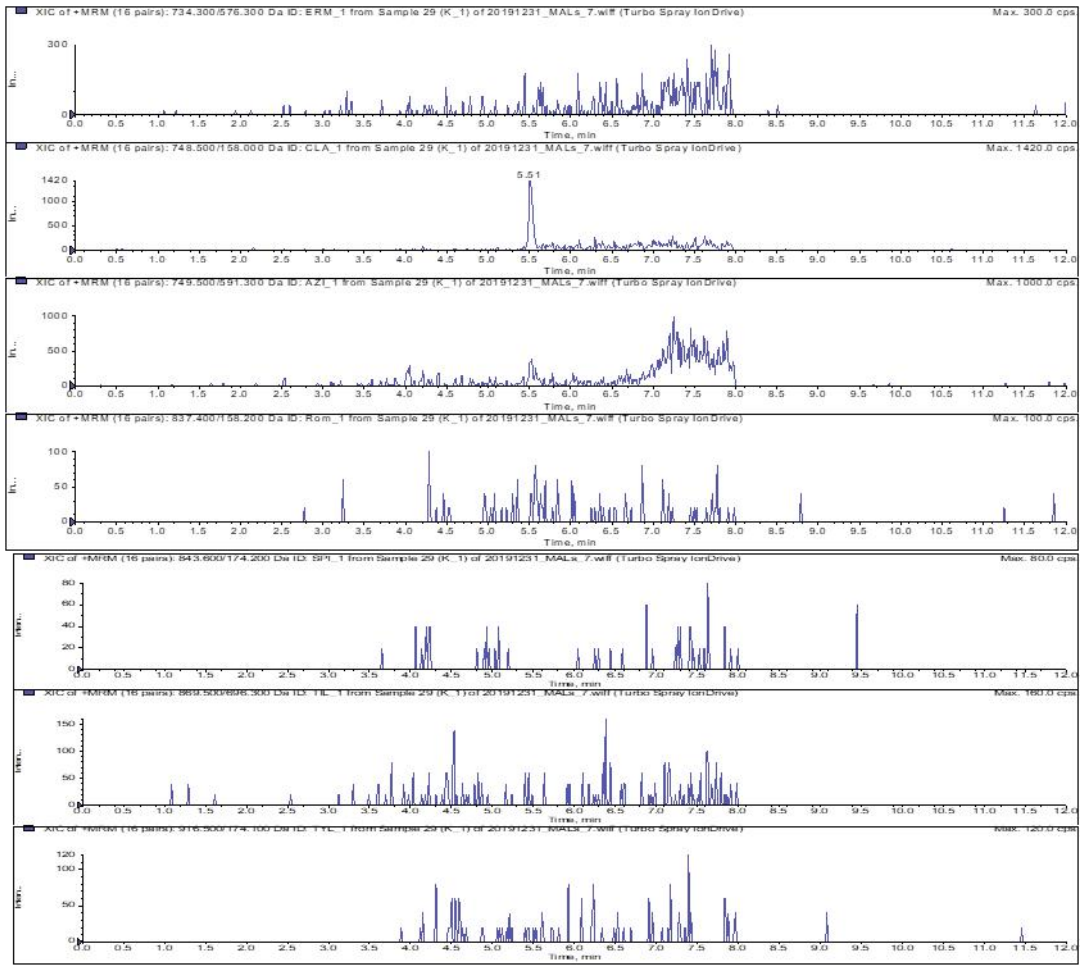


图6 空白牛羊精料补充料质谱图

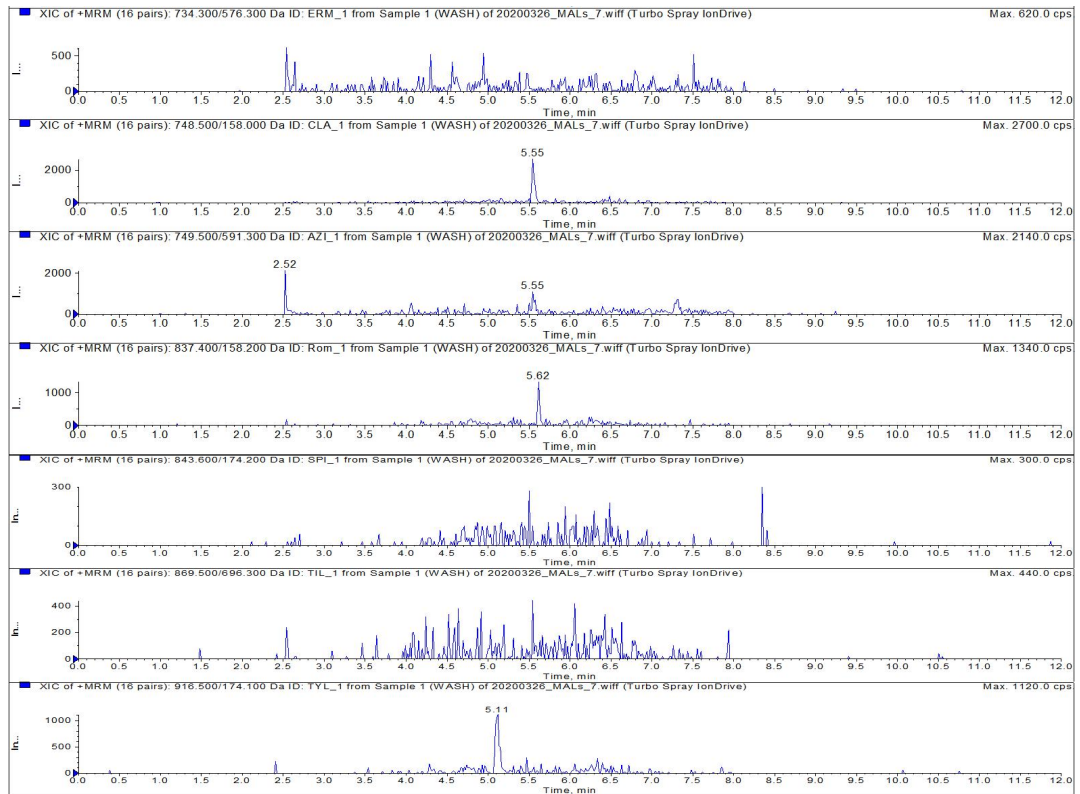


图7 空白小猪配合饲料质谱图

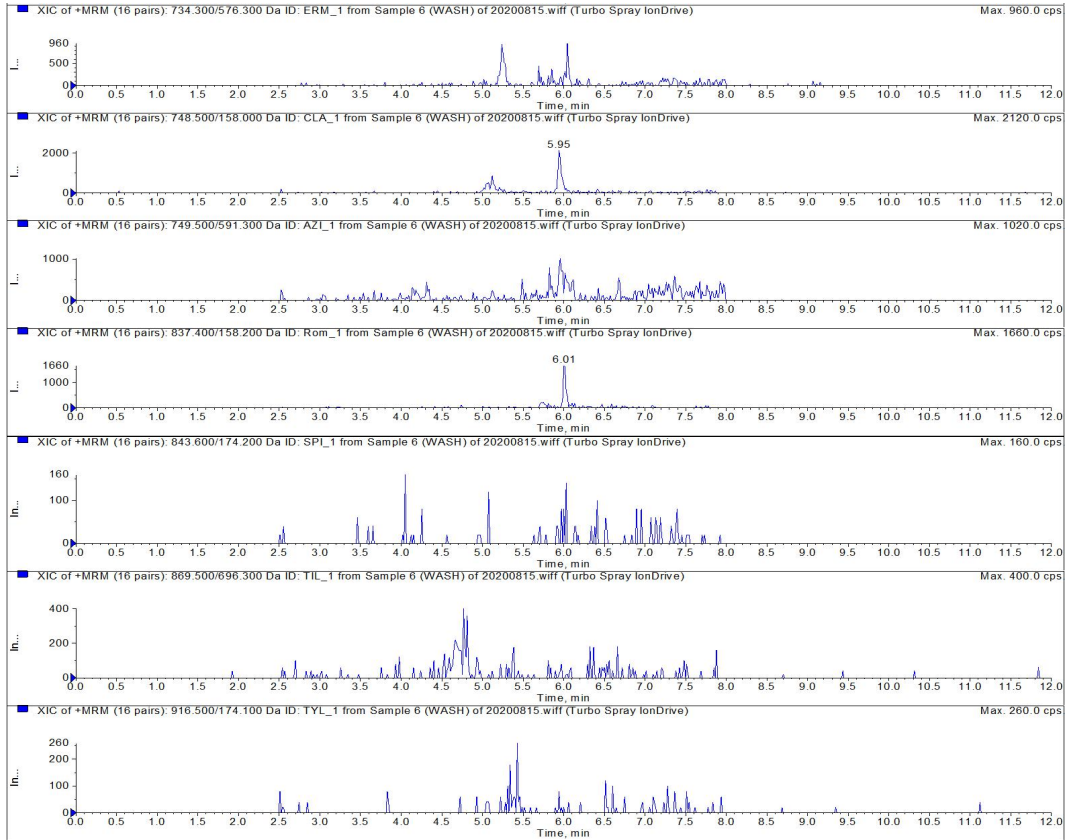


图8 空白鸡预混合饲料图谱图

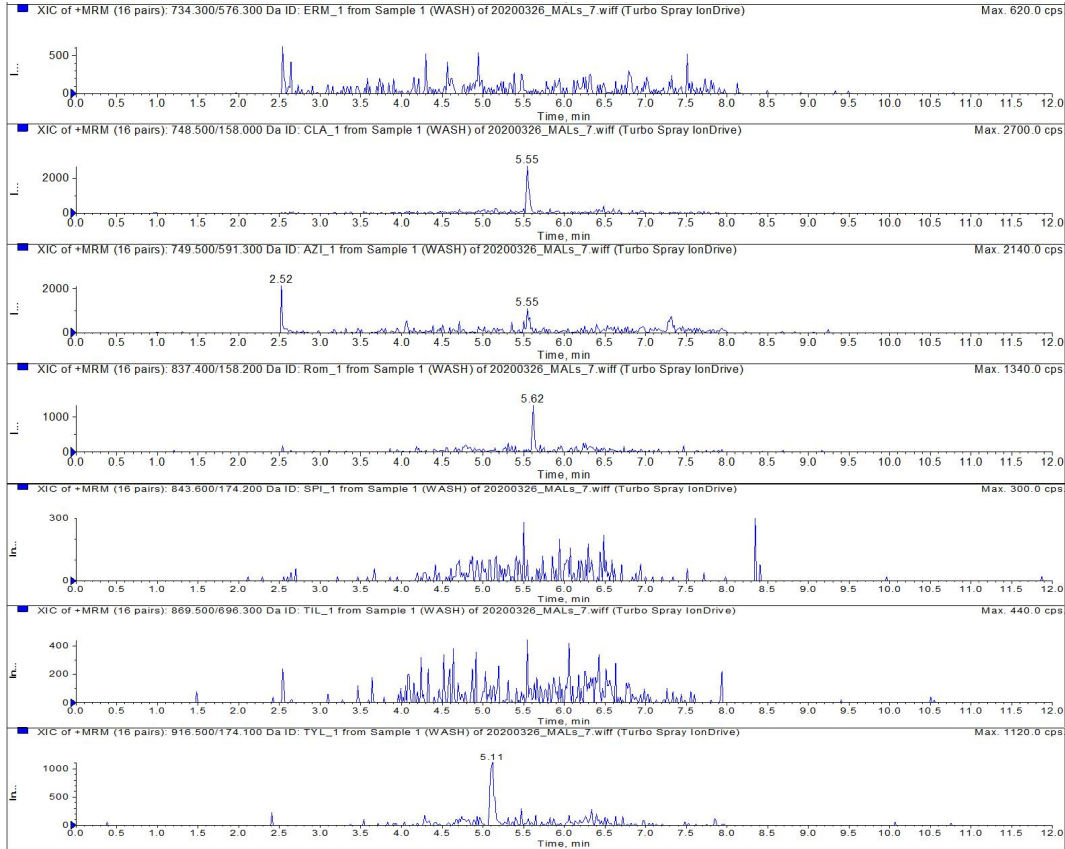


图9 空白猪浓缩饲料饲料质谱图

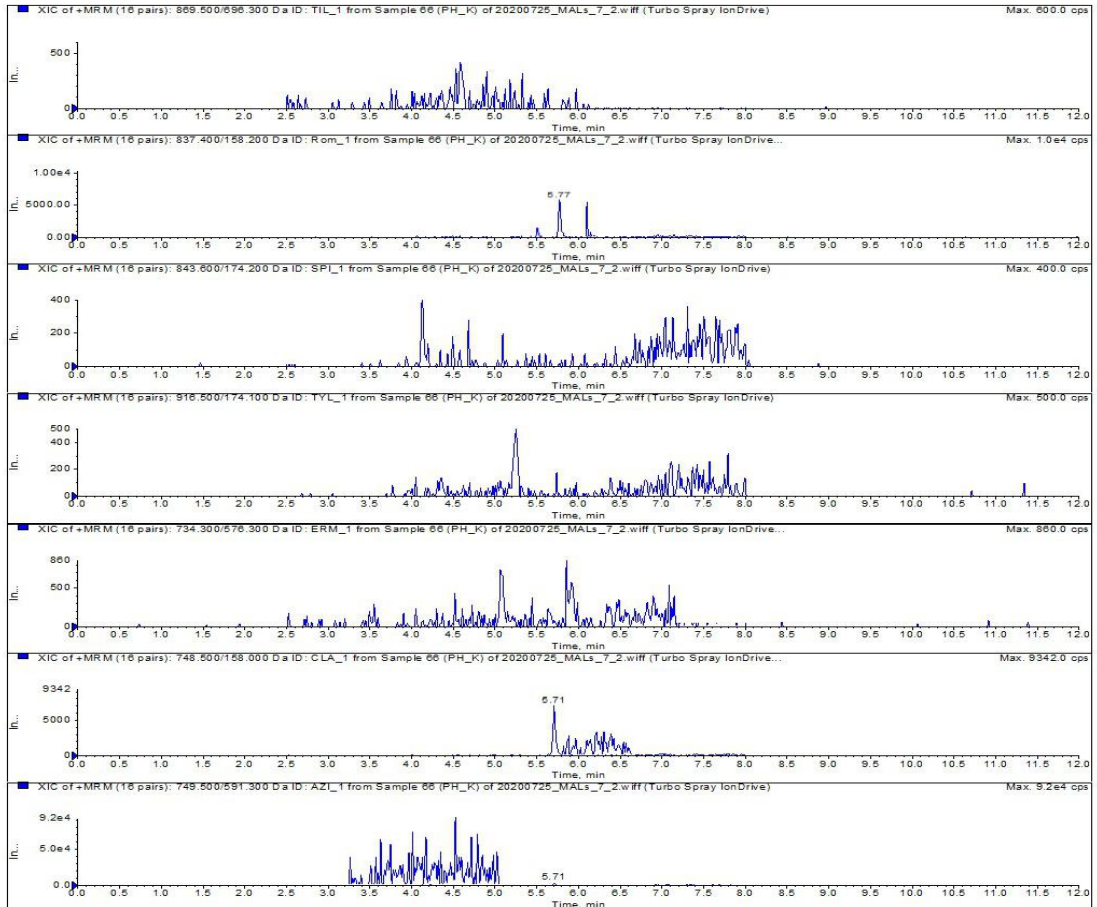


图10 空白鸡配合饲料质谱图

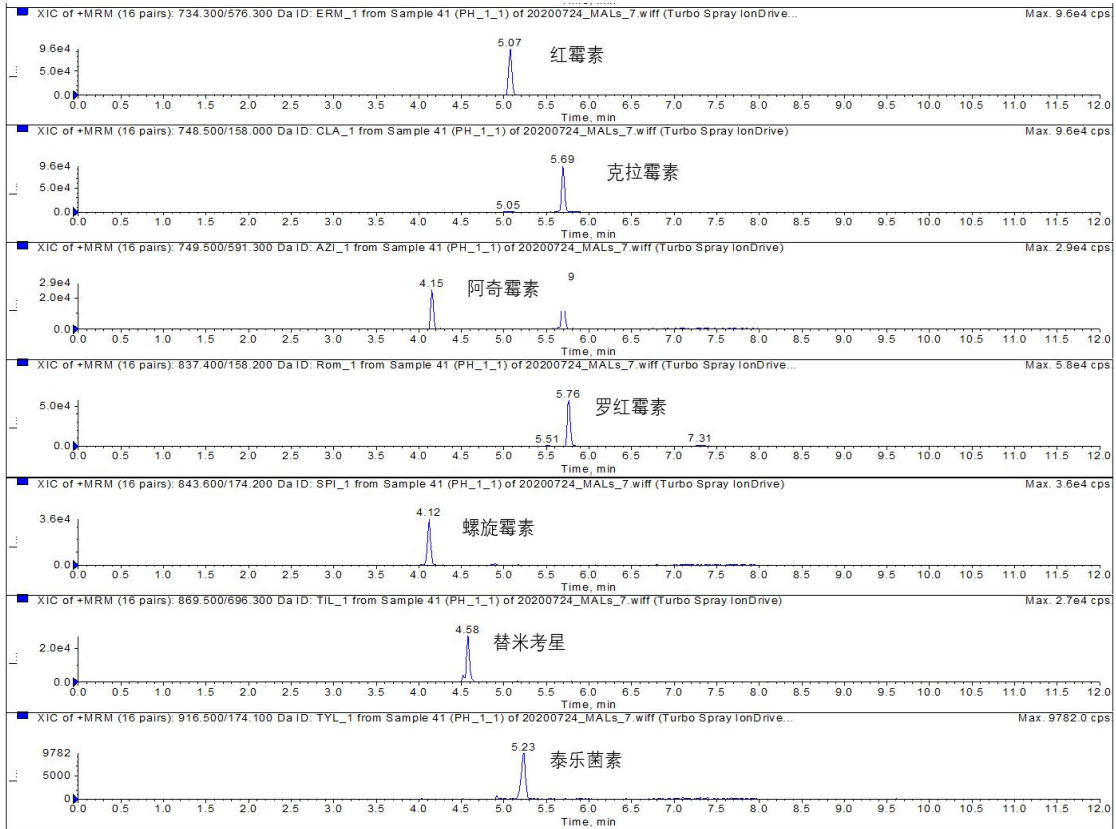


图11 小猪配合饲料添加定量限浓度的色质谱图 (5 μ g/kg)



图12 猪浓缩饲料添加定量限浓度的色谱图 (5 μ g/kg)

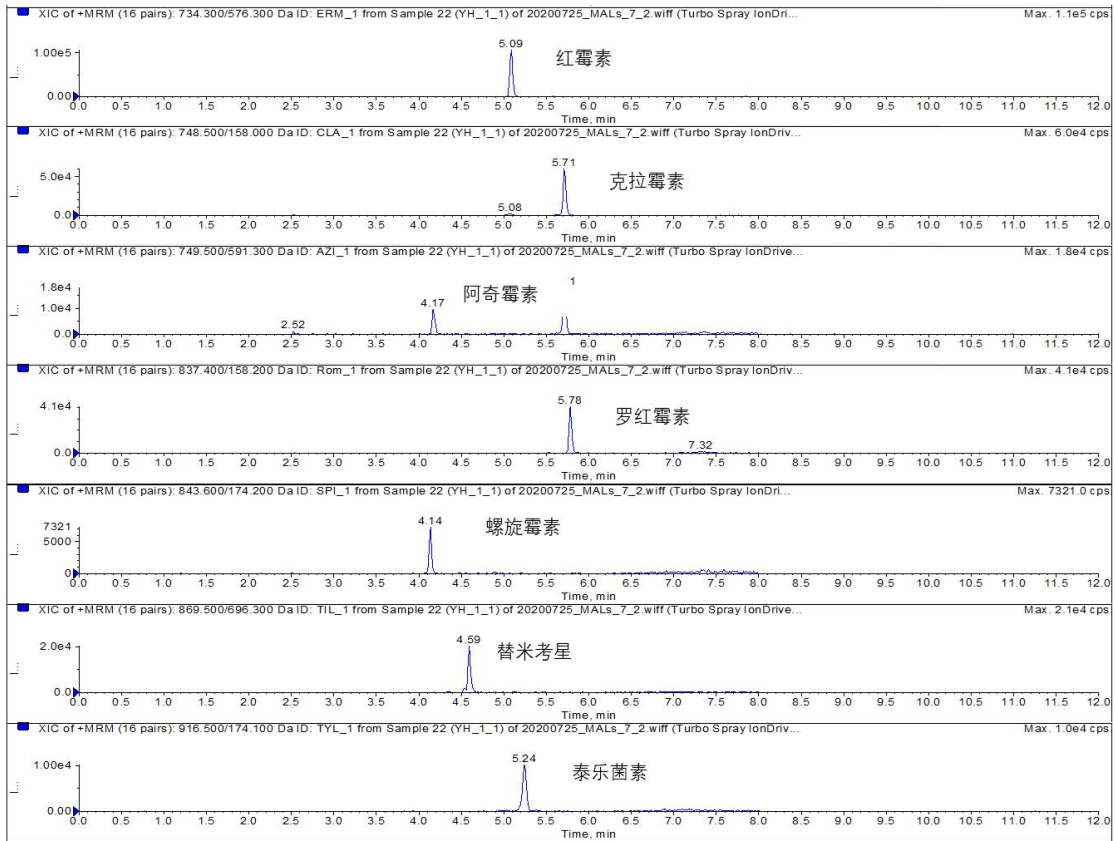


图13 鸡预混合饲料添加定量限浓度的色谱图 (5 μ g/kg)



图14 牛羊精料补充料中添加定量限浓度的色谱图 (5 μ g/kg)

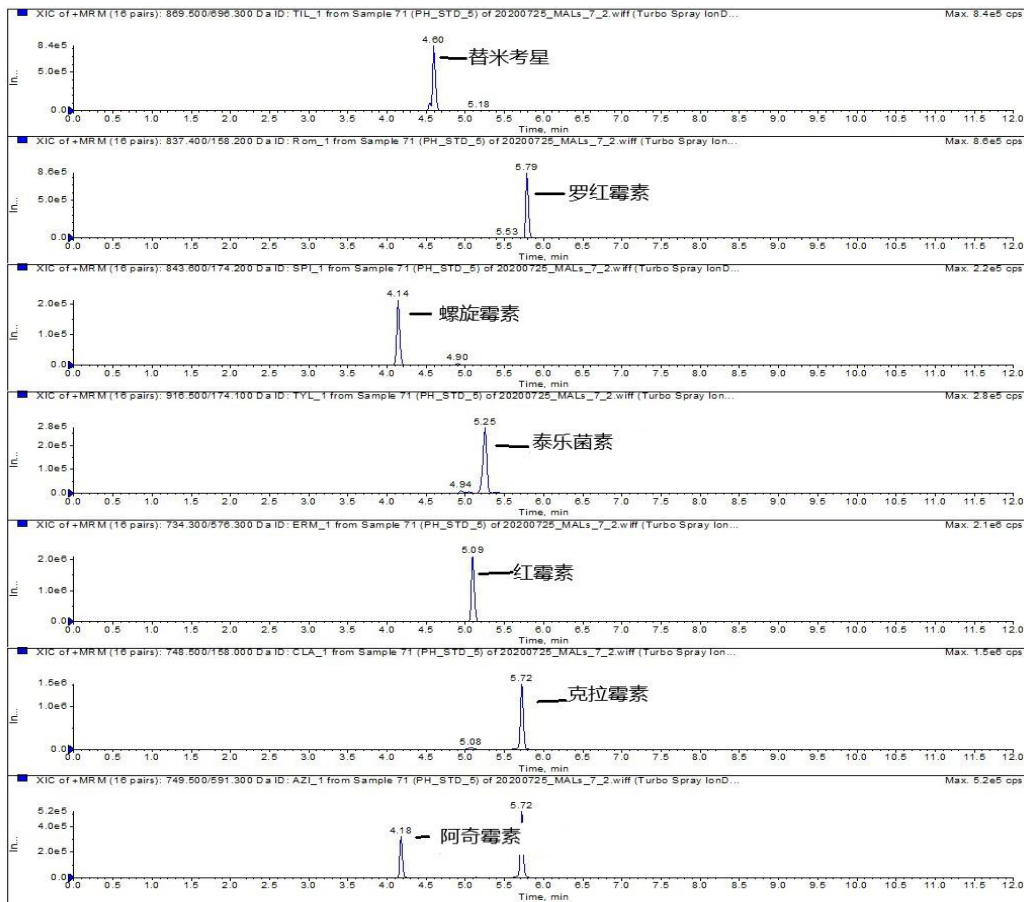


图15 鸡配合饲料中添加定量限浓度的色谱图 (5 μ g/kg)

2.6 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进行大环内酯类兽药检测，涉及饲料种类有肉鸡配合饲料、小猪配合饲料、鸡浓缩饲料、猪浓缩饲料、肉羊肉牛专用精料补充料、鸡预混合饲料、猪预混合饲料，共计 20 份饲料，经检测发现一份中期肉鸡配合饲料检出泰乐菌素，含量为 1.69 mg/kg，回收率符合实验要求，其他饲料均未检出目标物。

2.7 不同实验室间的对比

方法由我单位与江西省农业科学院农产品质量安全与营养研究所、天津市农业质量标准与检测技术研究所和广东省农业科学院农产品公共监测中心 3 家单位进行了实验室间的方法比对验证，对方法进行了配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混饲料 4 种空白饲料基质在 3 个浓度添加水平上的回

收试验，三个单位进行了复核试验，以进行本方法的准确度和重复性验证。复核实验结果显示：该标准方法的标准曲线相关系数可达 0.99，回收率范围在 60%~120%之间，相对标准偏差（RSD）均小于 20%，方法检出限、定量限可满足饲料中罗红霉素、泰乐菌素、替米考星、螺旋霉素、阿奇霉素、红霉素和克林霉素的监测要求，该方法通过验证。

四、采用国际标准

未采用任何国际标准和国外先进标准。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

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。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制小组查阅了国内外相关信息资料，向全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、高校、检测机构、企业等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

大环内酯类药物在畜禽动物养殖中使用广泛，基于对环境的污染及耐药性的危害，2020 年我国宣布禁止生产促生长抗生素类饲料添加剂，因此，制定饲料中大环内酯类药物的检测标准方法，对于加强饲料安全监管、保障我国畜禽质量安全、进而保护人民身体健康具有十分重要的意义，建议本标准以推荐性标准颁布、实施。

八、贯彻标准的要求和措施建议

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

2. 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

九、废止现行有关标准的建议

我国目前有部分关于饲料中大环内酯类药物测定的地方标准已经废止，包括《DB32/T 1452-2009 饲料中泰乐菌素的测定 高效液相色谱法》、《DB41/T 442-2006 饲料中替米考星的测定 高效液相色谱法》，其他国家标准和行业标准暂无废止。

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

1. Zhang J P, Liu Y, Dai J, NIU W M, Wang H X. *Science and Technology of Food Industry*. (张敬平, 刘晔, 戴军, 钮伟民, 王洪新. 食品工业科技), 2009, 2(7): 292-295.
2. Wang F M, Chen J H, Lin L M, Tang Z X. *J. Instrum. Anal.* (王凤美, 陈军辉, 林黎明, 汤志旭. 分析测试学报) 2009, 28(7): 784-788.
3. Sismotto M, Paschoal J A.R, Teles J A., de Rezende R A.E, Reyes F G.R. *Journal of Food Conosition and Analysis*, 2014, 24: 153-162.
4. Li Y, Shao B, Xu S H. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*. (李岩, 邵兵, 徐锁洪. 中国卫生检验杂志), 2005, 15(10): 1275-1277.
5. Wu D, Han M L, Zou D X, Wang X M, Gao M, Qiu T L. *Chinese J. Anal. Chem.* (吴丹, 韩梅琳, 邹德勋, 王旭明, 高敏, 仇天雷. 分析化学), 2017, 9(45): 1389-1396.
6. Yan L J, Zhang F, Fang E H, Guo Y N, Zhou Y, Lin L Y, Chu X G. *Chinese Journal of Chromatography*. (严丽娟, 张峰, 方恩华, 郭彦妮, 周昱, 林立毅, 储晓刚. 色谱), 2010, 28(11): 1038-1042.
7. Sum L, Zhang L, Wang S H, Wang X. *Journal of Instrumental Analysis*. (孙雷, 张骊, 王树槐, 汪霞. 分析测试学报), 2009, 28(9): 1058-106.
8. ZHANG Mei, GONG Yue-Sheng, MA Guo-Ji. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*. (张眉, 龚月生, 马国际. 畜牧兽医杂志), 2009, 3(28): 41-43.
9. GB 31650-2019. National food safety standard-Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. National Standards of the People's Republic of China (食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准)
10. National Health Commission of the People's Republic of China. No. 43 Bulletin of National Health Commission of the People's Republic of China in 2016. (中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国卫医发[2016]43号) .[2016-08-25].
http://www.gov.cn/xinwen/2016-08/25/content_5102348.htm.
11. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. No. 194 Bulletin of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. (农业农村部. 中华人民共和国农业农村部第194号公告) . [2020-01-03].
http://www.moa.gov.cn/nybgb/2019/201907/202001/t20200103_6334292.htm.
12. Zhang X G, Liu D, Liu H R, Li Q, Li L L, Wang L X, Zhang Y. *Chinese Journal of Chromatography*. (张晓光, 刘东, 刘红冉, 李强, 李立理, 王丽霞, 张岩. 色谱), 2017, 35(10): 1055-1061.
13. Xu J Z, Chu X G, Hu X Z, Ding T, Wu B, Shen C Y, Jiang Y. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*. (徐锦忠, 储晓刚, 胡小钟, 丁涛, 吴斌, 沈崇钰, 蒋原. 分析测试室), 2009, 28(12): 26-30.
14. González de la Huebra M G J, Vincent U, von Holst V. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43: 1628-1637.
15. Jia W, Wang H, Shi L, Xu X L, Chu X G. *Journal of Instrumental Analysis*. (贾玮, 王菡, 石琳, 许秀丽, 储晓刚. 分析测试学报), 2018, 37(8): 981-988.
16. Wang H T, Zhang R, Duan H A, Yao Y L. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*. (王海涛, 张睿, 段宏安, 姚燕林. 分析试验室), 2008, 27(7): 98-101.
17. Zhang Y, Li X Q, Li H M, Zhang Q H, Gao Y, Li X J. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 110: 344-356.

18. Robert C, Gillard N, Brasseur P Y, Ralet N, Dubois M, Delahaut P. *Food Control*, 2015, 50: 509-515.
19. GB/T 1.1-2020 标准化工作导则 第1部分：标准文件的结构和起草规则.
20. GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测.
21. GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南.
22. GB/T 23182-2008 饲料中兽药及其他化学物检测试验规程