

中华人民共和国国家标准

《饲料中庆大霉素的测定 液相色谱-串  
联质谱法》

# 编制说明

(公开征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

四川威尔检测技术股份有限公司

通威农业发展有限公司

2023年12月

# 目 录

一、工作简况.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 标准制定背景.....	1
1.3 工作过程.....	5
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	7
2.1 标准编制原则.....	7
2.2 主要技术内容确定的依据.....	7
2.2.1 质谱条件的选择和优化.....	7
2.2.2 色谱条件的选择和优化.....	9
2.2.3 不同浓度七氟丁酸甲醋酸溶液的比较.....	11
2.2.4 提取方法的确定.....	12
2.2.5 固相萃取柱的选择.....	14
2.2.6 洗脱试剂的选择和优化.....	15
2.2.7 洗脱溶液用量的选择和优化.....	15
2.2.8 标准储备溶液稳定性考察.....	16
2.2.9 样品提取和净化方法.....	17
2.3 方法学考察.....	17
2.3.1 检出限（LOD）与定量限（LOQ）的确定.....	17
2.3.2 基质效应考察.....	17
2.3.3 线性范围考察.....	18
2.3.4 准确度和精密度考察.....	19
2.3.5 方法的重复性.....	31
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.....	31
四、与国内、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.....	31
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....	32
六、与有关法律、法规的关系.....	32
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....	32
八、涉及专利的有关说明.....	32
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.....	32
十、其他应当说明的事项.....	32
参考文献.....	33

## 一、工作简况

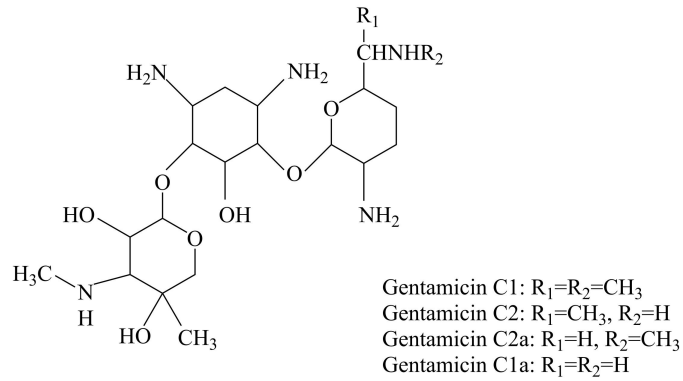
### 1.1 任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2021 年第四批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发[2021] 41 号），本标准修订项目编号为 20214591-T-469，项目名称为《饲料中庆大霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》，项目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、四川威尔检测技术股份有限公司、通威股份有限公司。2022 年 6 月，因通威股份有限公司内部组织架构变革，对公司板块业务进行细分，新成立通威农业发展有限公司，承担原通威股份有限公司农牧板块全部业务，计划未来单独拆分上市，使后续业务更聚焦。因此，主要起草单位现变更为中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、四川威尔检测技术股份有限公司、通威农业发展有限公司。

### 1.2 标准制定背景

#### 1.2.1 庆大霉素的理化性质

庆大霉素（Gentamicin, GM），CAS: 1403-66-3，分子式  $C_{19-21}H_{39-41}N_5O_7$ ，中国药典规定本品为庆大霉素 C1、C1a、C2、C2a 等组分为主混合物的硫酸盐。按无水物计算，每 1 mg 的效价不得少于 590 庆大霉素单位。主要由庆大霉素 C1、庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2、庆大霉素 C2a 组成。分子量分别为 477.6(C1)，449.5 (C1a)，463.6 (C2+C2a)。是由小单孢子属产生的多组分氨基糖苷类抗生素，结构中含有氨基环醇环与氨基糖。这四个组分因结构不同而造成药物疗效和毒理也存在差异：C1 组份毒理副作用较小，也不容易产生抗药性，在药物疗效上次于 C2 组分和 C1a 组分；C2 组分和 C1a 组分虽治疗效果好但副作用和毒性大，且容易产生抗药性，庆大霉素结构式如图 1。



**Gentamicin**

**图 1. 庆大霉素结构式**

庆大霉素解离度大、脂溶性小、易溶于水，难溶于乙醇等有机溶剂，常温下比较稳定。庆大霉素在 pH 7.8 ~ 8 时药理活性最强，是碱性化合物。主要和硫酸结合，成为普遍使用的白色或类白色结晶性粉末—硫酸庆大霉素，主要作用机制是与细菌核糖体 30S 亚基结合后使 t-RNA 误读，进而造成细菌无法合成蛋白质，使细菌无法生长并发育，对静止期细菌杀灭作用较强，且对许多致病菌有抗生素后效应。

### 1.2.2 庆大霉素的药理作用

庆大霉素在氨基糖苷类中抗菌谱较广，对革兰氏阳性和阴性菌都有抑制作用。在阴性菌中，对大肠杆菌、嗜血杆菌、沙门氏菌、布鲁氏菌和变形杆菌等具有很好的药理作用。在阳性菌中，对耐药金黄色葡萄菌、溶血性链球菌、炭疽杆菌等有较好作用。

庆大霉素主要用于耐药金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、变形杆菌和大肠杆菌等所引起的各种疾病，例如多种败血症、泌尿道感染、呼吸道感染、胃肠道感染、腹膜炎、乳腺炎及皮肤和软组织感染以及传染性鼻炎等。

### 1.2.3 庆大霉素在养殖与饲料中的使用

庆大霉素是广谱抗生素，对葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、炭疽杆菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、巴氏杆菌等革兰氏阴性菌均有

良好抑杀作用，对结核杆菌的杀菌力也较强，是目前我国畜牧业和水产业中常用的兽药之一，主要用于敏感菌引起的消化道、呼吸道、泌尿生殖系统感染及败血症等。对猪牛羊的治疗，如肺炎、鼻炎等，可抑制引起呼吸道感染的细菌的生长，减轻炎症症状，并帮助恢复呼吸系统的正常功能，修复肠道功能，减轻腹泻症状，并促进消化道健康。在水产领域，庆大霉素用于治疗鱼类的许多细菌性感染疾病，包括细菌性鳃炎、皮肤溃疡、细菌性肝胰脏炎等，对鱼仔鱼卵浸洗可防治松鳞病。庆大霉素可主要以饮水使用或注射使用为主。但仍有不少网络上报道加入饲料中用于预防和治疗疾病；根据相关资料，一般庆大霉素在鸡、猪、鱼的饲料的用量在 10 mg/kg~200 mg/kg 之间。根据适用动物的不同、年龄段不同、适用方式的不同和使用目的的不同添加庆大霉素的用量有所区别。由于效果明显、使用方便、群体治疗、均匀分布等优势，得到了养殖行业的青睐。

#### **1.2.4 庆大霉素的毒性作用机理**

在人类正常生理 pH 值时，庆大霉素中游离的正电荷氨基基团和肾脏中肾小管上皮细胞或毛细胞表面的特异性受体结合→自由氨基基团和结合的受体进入体细胞内形成囊泡→囊泡和初级溶酶体结合形成次级溶酶体，导致次级溶酶体膜的通透性增加，使溶酶体酶释放后作用于线粒体，抑制线粒体呼吸酶的合成，导致细胞代谢障碍，结构破坏。庆大霉素主要造成肾毒性和耳毒性。

#### **1.2.5 饲料庆大霉素的危害及研究意义**

由于庆大霉素的毒性，饲料中添加的庆大霉素被动物机体吸收，产生动物蓄积，使人食用含有庆大霉素的动物性食品后在人体内产生耐药性和一定的毒性。因此，饲料中庆大霉素的残留和抗生素污染已成为国内外的关注热点之一。农业部出台了一系列公告禁止抗生素在饲料中的使用，并于 2019 年发布 194

号公告，规定自 2020 年起，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，随着抗生素在饲料中的禁用，庆大霉素也正式在饲料中禁用。然而庆大霉素在饲料中非法添加和外源污染问题时有发生，对饲料工业发展、人类健康和环境安全带来大量的负面影响。因此，制订饲料中庆大霉素的检测标准具有重要意义。

### 1.2.6 庆大霉素残留限量及检测方法进展

庆大霉素热稳定性好、价格低廉，是目前我国畜牧业、农业和水产业中常用的兽药之一，但由于其毒性，我国在 GB 31650-2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》中已经对庆大霉素最高残留限量作了规定，在牛/猪肌肉或脂肪中为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，肝脏中为 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，肾脏中为 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛奶中为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，鸡/火鸡可食组织中为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前关于庆大霉素检测标准则有“GB/T 21329-2007 动物源性食品中庆大霉素残留量检验方法 酶联免疫法”、“SN/T 0669-2011 出口肉及肉制品中庆大霉素残留检测方法 杯碟法”、“农业部 1163 号公告-7-2009 饲料中庆大霉素残留检测高效液相色谱法”以及“GBT21323-2007 动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法”等，不少学者也建立不同的庆大霉素检测方法，主要以动物性食品以及尿液为主。主要有微生物法、酶联免疫法、液相色谱法等。其中酶联免疫法和杯碟法常用于筛查分析，且无法对庆大霉素 C1、庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2 和庆大霉素 C2a 组分进行区分；现有液相色谱分析方法无法准确测定庆大霉素各组分的含量。因此液相色谱-串联质谱法具有高灵敏度、高选择性、多组分分析、适用范围广等优点，是非常强大和有效的分析技术，已应用动物源性食品、血液、尿液等方面中庆大霉素的测定。如 David N. Heller 等人在 2005 年开发并验证了几种牛组织中庆大霉素浓度的

测量方法，该方法的范围为 10 ng/g ~ 50 ng/g，LOQ 为 26 ng/g。刘雪红等建立了牛奶中庆大霉素残留的高效液相色谱-串联质谱检测方法，定量检出限为 10 µg/kg。吕芳等人建立了超高效液相色谱-串联质谱法检测鲟鱼中庆大霉素的分析方法，方法检出限为 10 µg/kg，定量限为 25 µg/kg。但缺乏饲料中庆大霉素的检测方法。

本标准旨在建立一种能同时提取并净化饲料中庆大霉素的前处理方法及相应的高效液相色谱串联质谱方法，以期为庆大霉素在饲料中最高残留限量和检测提供快速、准确、经济、高灵敏的检测方法。

### 1.3 工作过程

#### 1.3.1 成立标准编制小组

2022 年 1 月，中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、四川威尔检测技术股份有限公司、通威股份有限公司接到国家标准修订任务后，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
		项目主持人，负责项目的全面工作
		检测方法研究，标准文本和编制说明编写和完善、方法验证
		实施方案制定，标准文本和编制说明编写和完善、征求意见
		样品检测、数据收集分析
		样品采集、数据收集分析
		标准文本和编制说明编写和完善、征求意见
		样品采集、标准文本和编制说明编写和完善
		标准文本和编制说明编写和完善

### 1.3.2 标准修订技术路线和方案制定

2022年1月，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，同时调研国内主要饲料质检机构、饲料生产企业等标准方法采用情况，制定了标准修订内容和技术路线草案，确定标准修订的主要内容、技术路线（见图2）、分工、完成时限等。

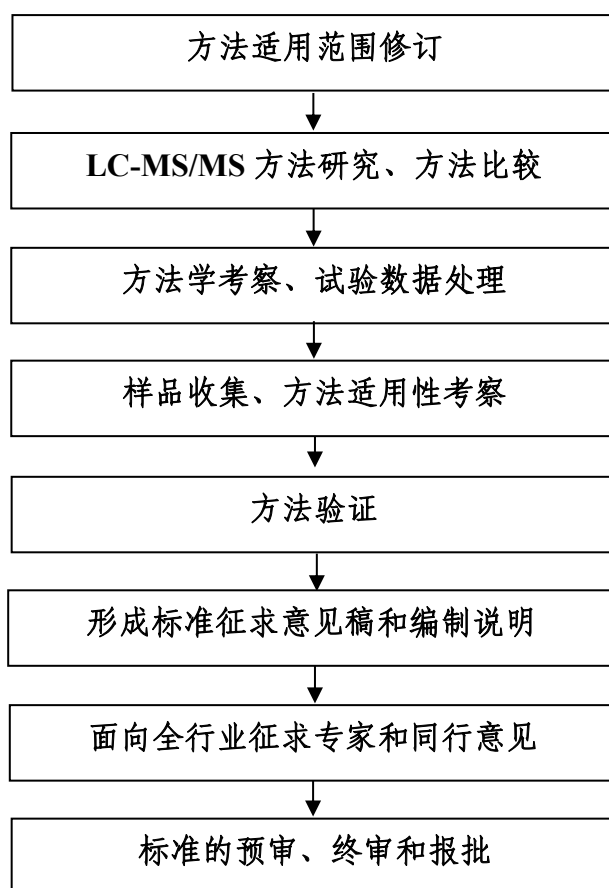


图2 标准修订技术路线图

### 1.3.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2022年2月~2023年10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

2023年11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。2023年12月，标准编制小组发送给省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研



院所、高校、企业等单位的专家征求意见。

## 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。

标准修订结合国内外检测技术发展趋势和我国饲料行业发展现状，力求做到技术上先进、经济上合理，确保标准方法的准确性、可靠性和通用性。

### 2.2 主要技术内容确定的依据

#### 2.2.1 质谱条件的选择和优化

配制 10  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素标准溶液，以微流量泵直接进质谱，进行质谱条件的优化。由于正离子比负离子响应强度高，所以采用 ESI<sup>+</sup>模式的测定。通过一级全扫描质谱得到庆大霉素 C1a、C2a 和 C2、C1 的母离子  $[\text{M}+\text{H}]^+$  为质荷比 ( $m/z$ ) 450.0、 $m/z$ 464.0、 $m/z$ 478.2；通过子离子扫描得到二级质谱，图 2 为 1 mg/kg 浓度的庆大霉素在优化过程中的子离子谱图。查阅文献和相关标准可知一般选择 C1a( $m/z$ 450.2)、C2a 和 C2( $m/z$ , 464.0)、C1( $m/z$ 478.2)为母离子， $m/z$  322.1、159.9 和 160.1 的子离子来监测庆大霉素。本方法调谐所得的庆大霉素的母离子、子离子分子量的数值均与文献报道的一致。其中分别选择  $m/z$  较大、强度较稳定的 3 组 322.2、274.0 和 322.2、288.0 和 322.2、157.2；其中碎片

450.0/322.2、464.0/322.2、478.2/322.2 的响应强度最强且背景干扰小，所以选为定量离子对，另 2 组子碎片 450.0/274.0、478.2/157.2 组成定性离子对。在 MRM 模式下，进一步优化了上述离子对的去簇电压（DP）和碰撞电压（CE），结果见表 2。

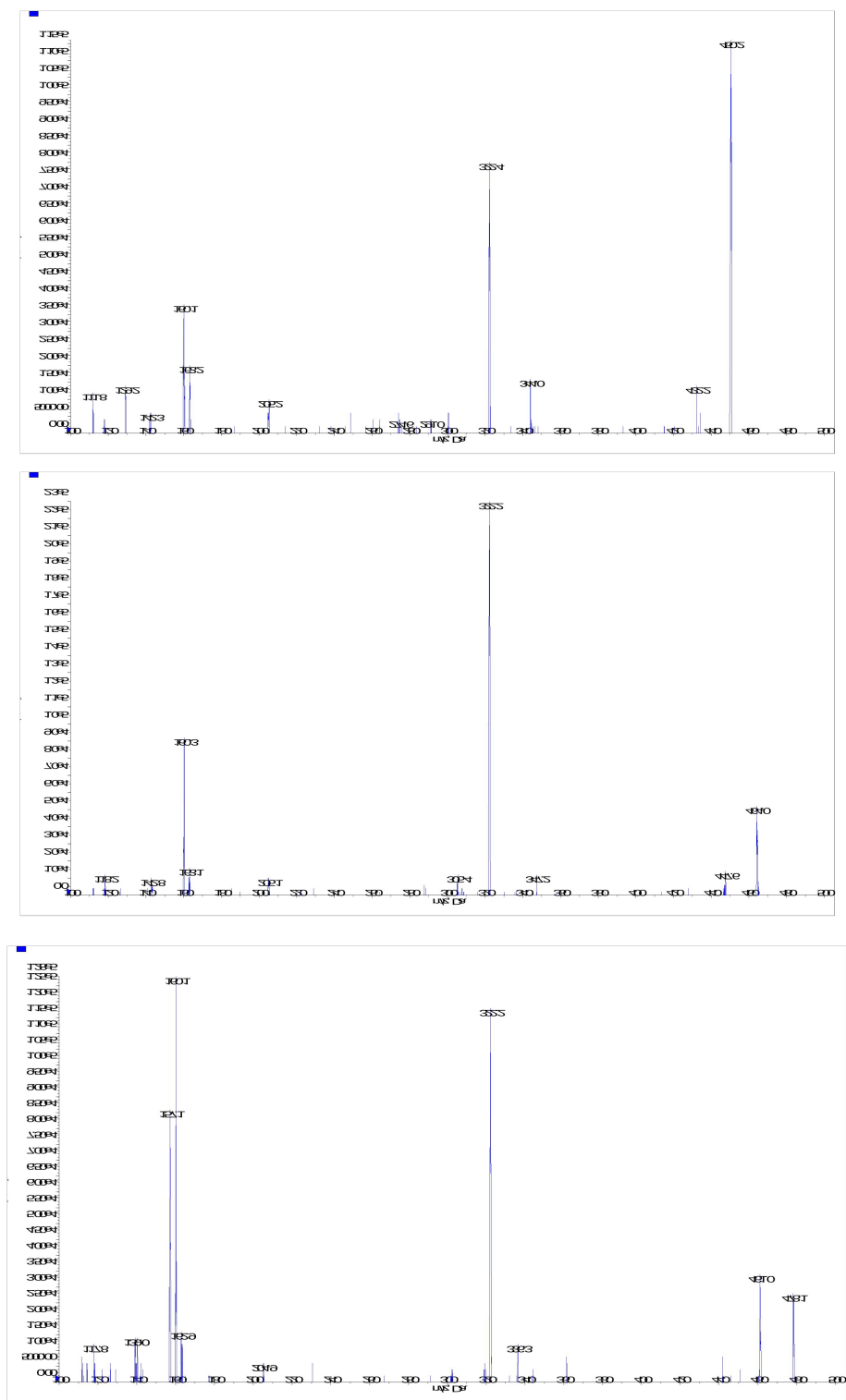


图 3 庆大霉素母离子和子离子质谱图（从上到下为：庆大霉素 C1a、C2a 和 C2、C1）

表 2 庆大霉素质谱条件

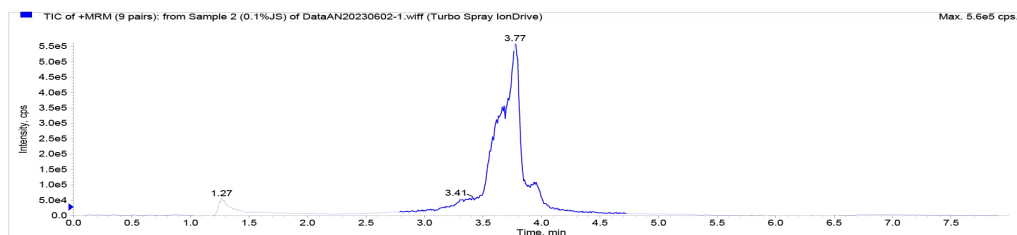
目标物	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
庆大霉素C1a	450.2	322.1*	95	20
		159.9	95	30
庆大霉素C2+C2a	464.2	322.1*	105	20
		160.1	105	25
庆大霉素C1	478.2	322.1*	105	25
		160.1	105	30

注: \*为定量离子。

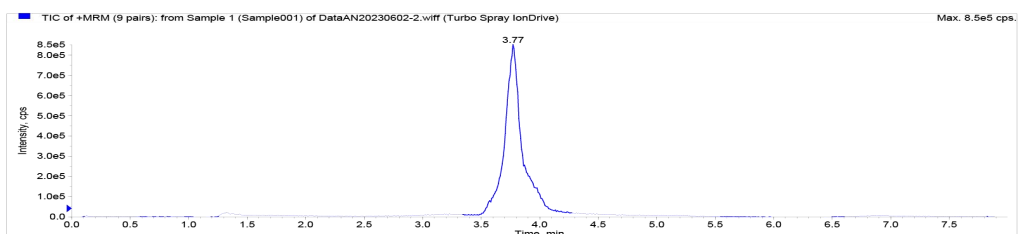
### 2.2.2 色谱条件的选择和优化

本实验采用 SB-Aq 色谱柱。SB-Aq 是一款极性封尾 C18 键合硅胶色谱柱，可增加难以分离的酸性、碱性和极性化合物的保留值，保留作用比许多传统的 C18 色谱柱要强。由于其具有亲水性的表面，即使是使用 100%水溶液流动相也可以有效地防止固定相的塌陷。因此，用 SB-Aq 柱分析极性化合物仍可以获得良好的重复性和出色的峰形。SB-Aq 柱最低可以用到 pH1，最高可以用到 80 度的条件，为本实验中强酸性七氟丁酸杆的使用提供了良好的条件。本研究通过对出峰时间、分离效果、峰形和灵敏度等因素分别考察了 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B)、2 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸溶液 (A) -乙腈 (B)、水 (A) -乙腈 (B) 以及 2 mmol/L 甲酸铵 (A) -乙腈 (B) 作为流动相时的梯度洗脱效果，如图 4。

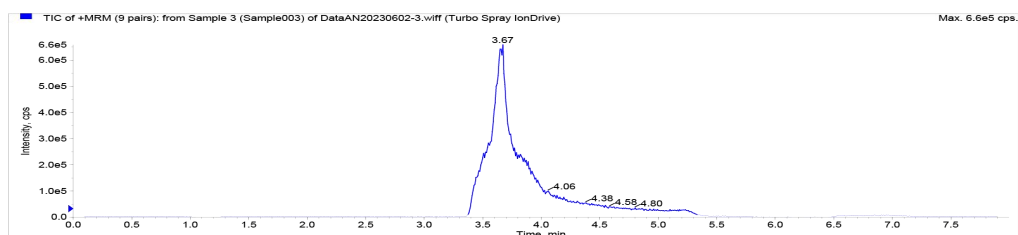
A



B



C



D

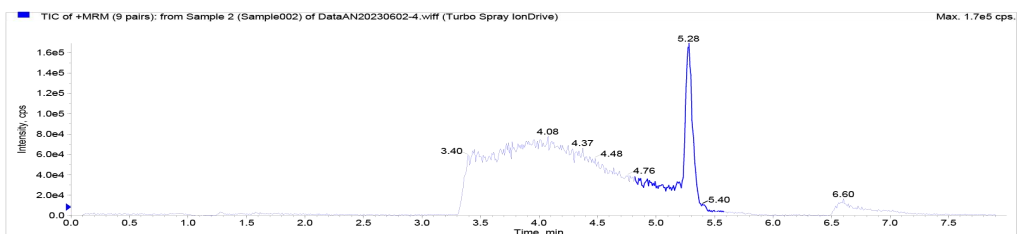


图 4 不同流动相的庆大霉素 C1 MRM 色谱图

注: A 为 0.1%甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), B 为 2 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), C 为水 (A)-乙腈 (B), D 为 2 mmol/L 甲酸铵 (A)-乙腈 (B)

结果显示: 在相同的梯度洗脱条件下, 2 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸溶液 (A)-乙腈 (B) 作为流动相时, 采用 0.4 mL/min 的流速, 洗脱效果更好, 但没有区分 4 种同分异构体, 对洗脱梯度进行了摸索、具体优化梯度见表 3。在上述条件下, 庆大霉素 C1a、C2+C2a、C1 能够做到良好的分离、在色谱柱上的保留时间分别为 1.96 min、1.99 min、2.04 min, 色谱图见图 5。由于庆大霉素 C2+C2a 为同分异构体, 在液相色谱上极难分离, 故本方法没有进一步研究分离技术。

表 3 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速(mL/min)	2 mmol 甲酸铵+0.1%甲酸水溶液 (%)	0.1%甲酸乙腈 (%)
0	0.4	90	10
1.0	0.4	90	10
4.0	0.4	70	30
4.1	0.4	5	95
5.0	0.4	5	95
5.1	0.4	90	10
8	0.4	90	10

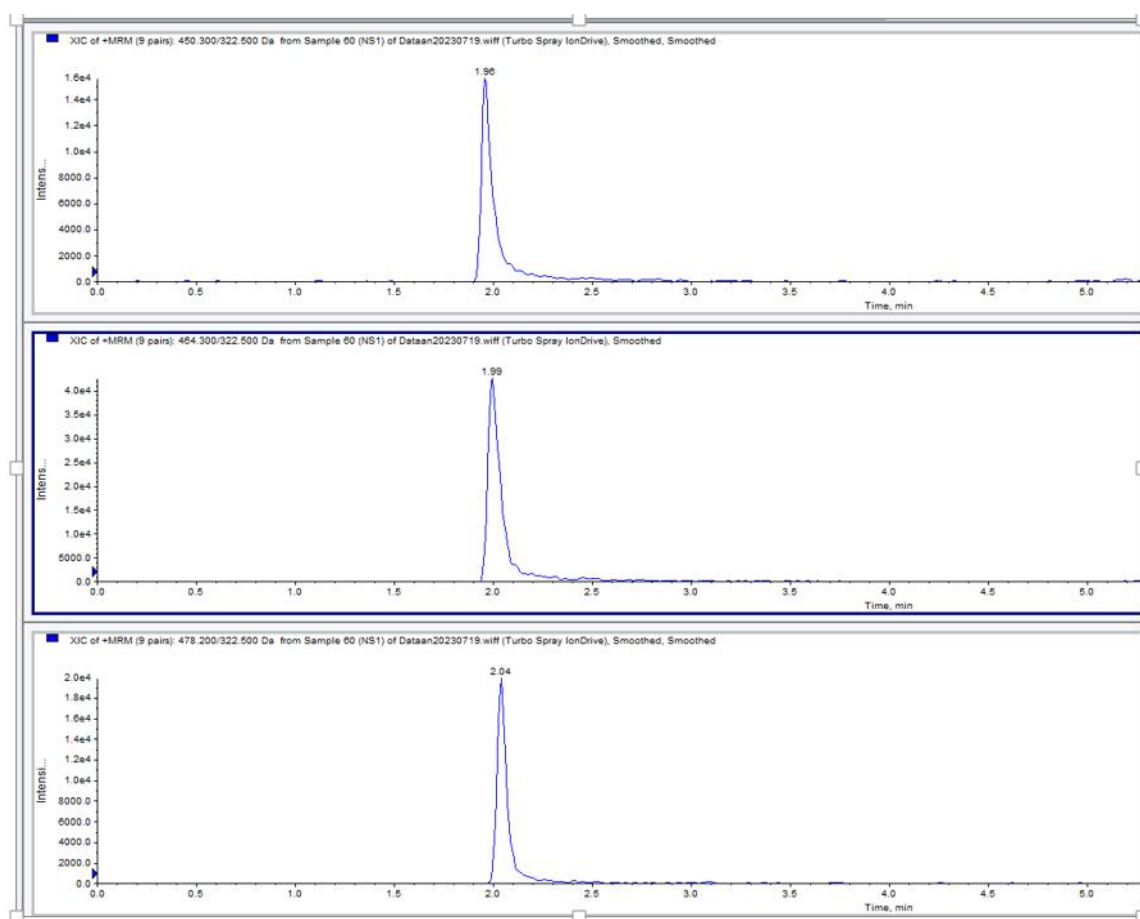


图 5 庆大霉素 MRM 色谱图 (从上到下为: 庆大霉素 C1a、C2a 和 C2、C1)

### 2.2.3 不同浓度七氟丁酸甲醋酸溶液的比较

由于 1%七氟丁酸甲醋酸溶液呈强酸性，故实验设置了不同浓度的七氟丁酸甲醋酸溶液进行比较。本研究通过对出峰时间、分离效果、色谱柱的使用寿命

命等因素分别考察了 0.05%、0.5%、1%、2%七氟丁酸甲醋酸溶液的实验效果。如图 6，结果显示，0.05%、0.5%、2%七氟丁酸甲醋酸溶液的出峰时间分别为 0.85 min、0.81 min、0.81 min；0.82 min、0.81 min、0.81 min；分离度较差。而 1%、2%七氟丁酸甲醋酸溶液的出峰时间为 1.96 min、1.99 min、2.04 min，3.74 min、3.78 min、3.82 min 明显分离度较好。但 2%七氟丁酸甲醋酸峰型较宽，且 pH 较高对色谱柱影响较大，因此采用了 1%七氟丁酸甲醋酸溶液。

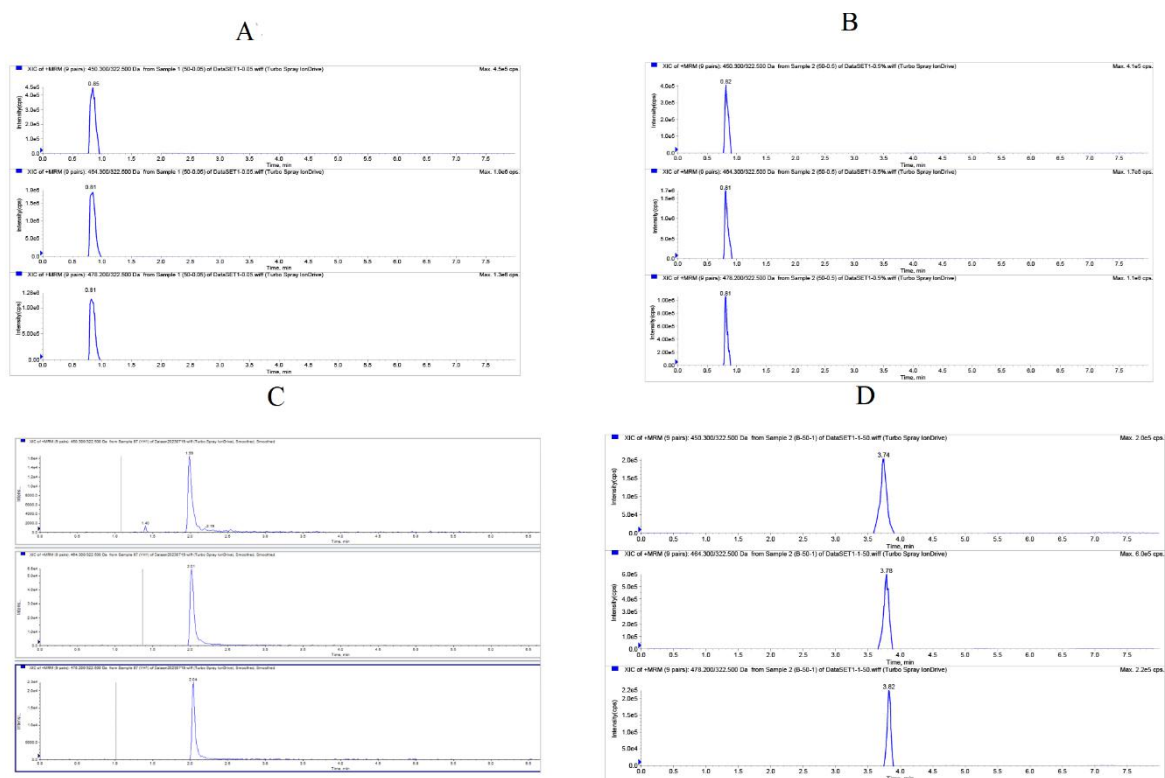


图 6 不同浓度七氟丁酸甲醋酸溶液 MRM 色谱图

注：A 为 0.05%七氟丁酸甲醋酸溶液、B 为 0.5%七氟丁酸甲醋酸溶液、C 为 1%七氟丁酸甲醋酸溶液、D 为 2%七氟丁酸甲醋酸溶液。

### 2.2.4 提取方法的确定

由于庆大霉素具有较高的水溶性和质子化倾向，易与组织成分结合或被玻璃器皿吸附，样品处理的回收率低；异构体较多，色谱分离过程复杂，分离条件不易控制；分子结构缺少发色基团，但活性基团众多，衍生条件的通用性差，使其理化测定方法相当复杂，灵敏度往往较差。国外报道有利用 10%三氯乙酸沉淀液体试样中蛋白后，通过离子对反相色谱与电喷雾电离串联质谱联用对组

分进行测定的方法<sup>[13]</sup>；也有利用 2%三氯乙酸溶液对庆大霉素提取，用 NaOH 调节提取液 pH，HLB 柱净化，最后通过 LC-MS 进行测定的方法，这些方法在流动相中加入了氟化离子对试剂，会对负电离模式下质谱设备的灵敏度。国内则有利用 3%三氯乙酸溶液提取，SCX 柱净化后使用 LC-MS 进行测定；利用 5%三氯乙酸进行提取，用 HLB 柱净化后利用 LC-MS 进行测定。庆大霉素常用的提取剂有乙腈、不同浓度的三氯乙酸、氢氧化钠溶液等。通过提取过程比较，用氢氧化钠和乙腈提取庆大霉素样品时需要调 pH 到酸性，而使用不同浓度的三氯乙酸则无需其他操作。通过文献得到，不同浓度的三氯乙酸溶液是提取庆大霉素的常用提取液，根据样品成分复杂情况，常用的浓度一般为 2%~10%。试验以配合饲料为对象，研究了 2%、3%、5%、10% 三氯乙酸溶液作为提取溶剂庆大霉素的提取效果，称取 10 份 5 g 饲料样品，分别加入 4 种不同浓度的提取剂 20 mL，结果见图 7。从图 7 可以看出，选取 2%~3%三氯乙酸的提取效率在 30%~90%，5%三氯乙酸的提取效率在 70%~95%。

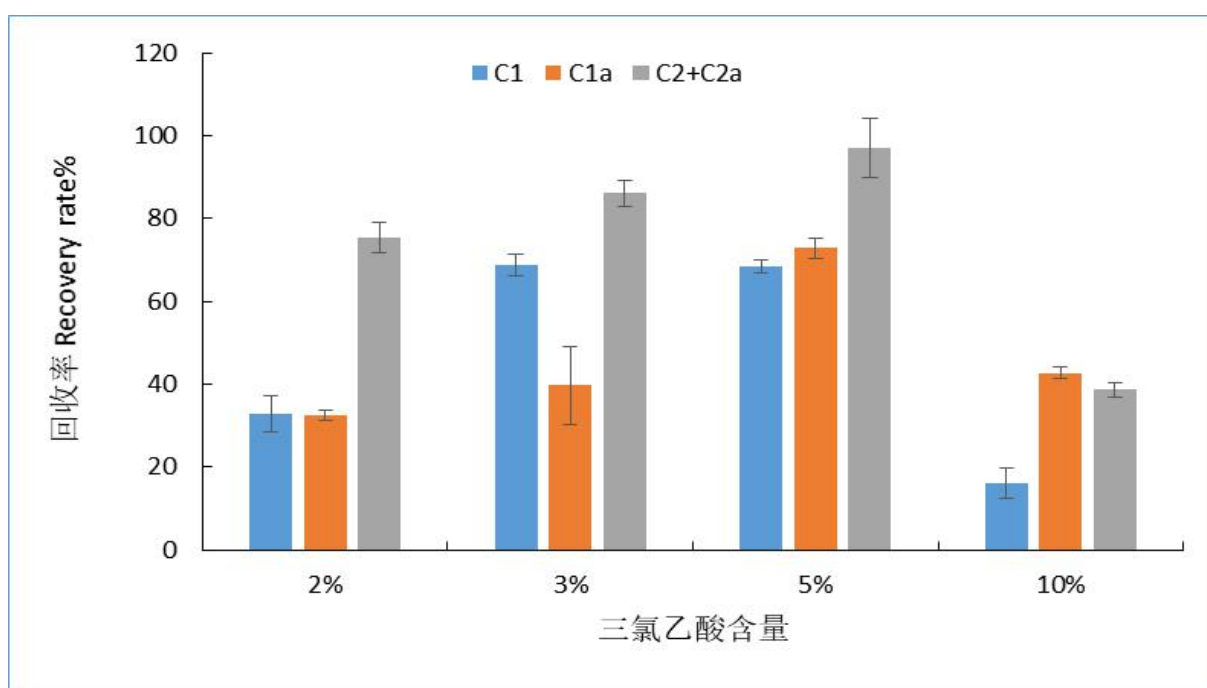


图 7 不同浓度三氯乙酸提取效果

综合分析发现，庆大霉素在 5%三氯乙酸提取效果较好，故最终选取 5%三

氯乙酸作为提取饲料中庆大霉素的提取剂。同时提取液中加入乙二胺四乙酸二钠以减少庆大霉素与溶液中金属离子的螯合作用，促进药物释放，提高回收率。

### 2.2.5 固相萃取柱的选择

试验比较了4种市售的PCX、MCX、HLB、C18固相萃取柱对饲料中庆大霉素的净化效果。先对4种固相萃取柱进行活化处理：加入3 mL 甲醇，待甲醇流出后，再加入3 mL 水。然后将提取离心后的上清液加入固相萃取柱中，每个小柱5 mL，待样液全部流出后，依次PCX、MCX加入3 mL 水和甲醇淋洗固相萃取柱，最后PCX、MCX用3 mL 10%氨水甲醇溶液洗脱，加入3 mL 水，淋洗固相萃取柱、C18、HLB固相萃取柱用3 mL 甲醇洗脱，各收集洗脱液氮吹至近干，加入1 mL 1%七氟丁酸杆醋酸：2 mol/L 的甲酸铵（90：10，v/v）溶液溶解残余物溶液溶解定容至1 mL，上机检测，结果见图8。

从图8可以看出，经过PCX固相萃取柱净化后，饲料中的庆大霉素具有很好的回收率，在100%左右，而MCX、HLB、C18固相萃取柱的回收率相对较低。

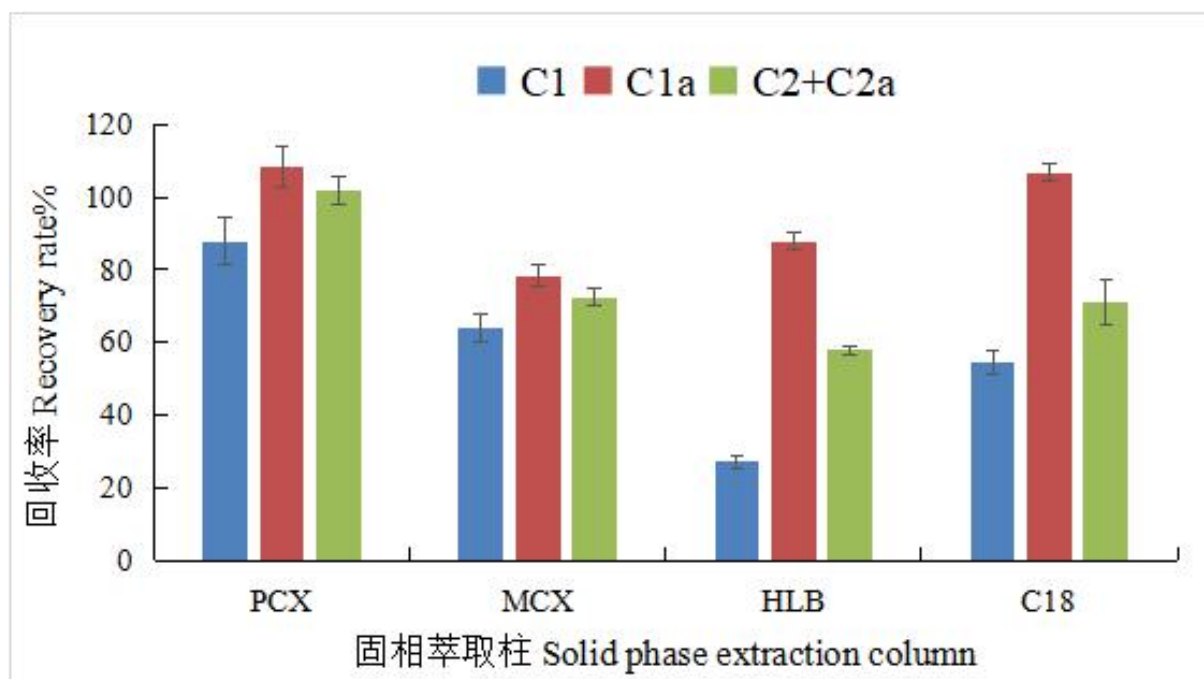


图7 不同固相萃取柱净化效果



## 2.2.6 洗脱试剂的选择和优化

本试验研究了不同比例的氨水甲醇对庆大霉素的洗脱效果，按照上述操作，洗脱时用不同比例的氨水甲醇进行洗脱，最终上机检测，结果见图 9。从图 9 可以看出，10%氨水甲醇洗脱效果最好，饲料中的庆大霉素具有很好的回收率。其他比例的氨水甲醇，虽然也有不错的回收率，但效果不如 10%氨水甲醇显著。

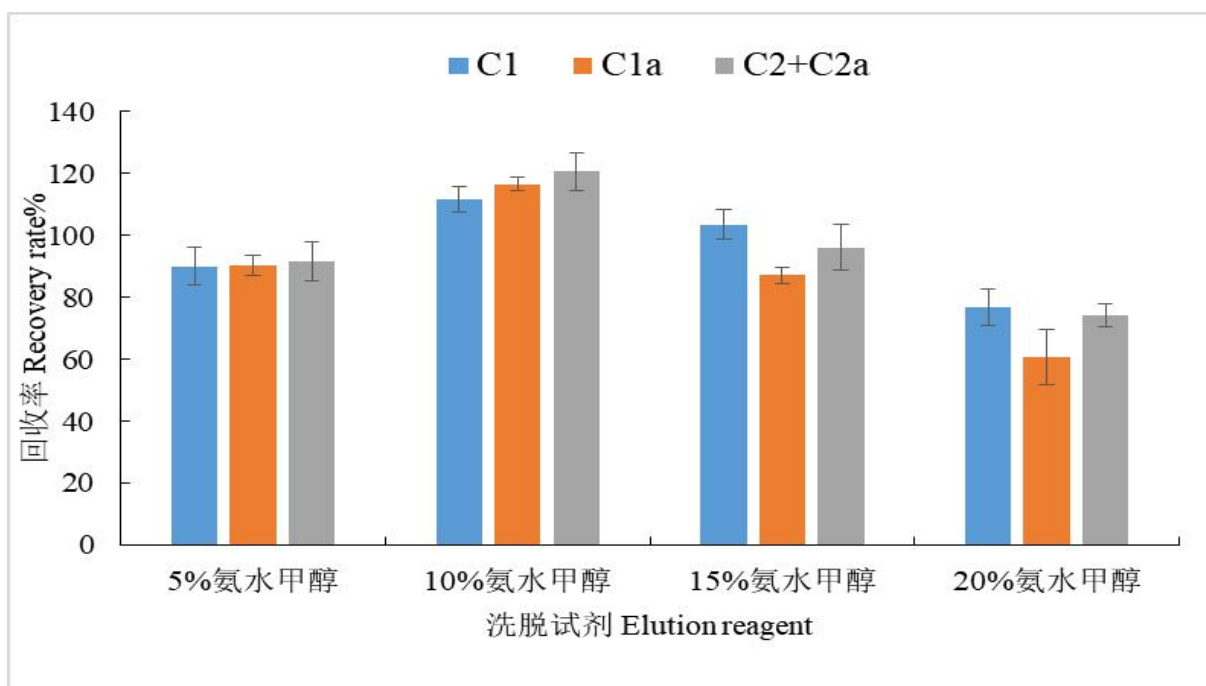


图 8 不同洗脱试剂的洗脱效果

## 2.2.7 洗脱溶液用量的选择和优化

洗脱溶剂用量的选择是一个关键参数，因此，试验评估了 1.0 mL~5.0 mL 10%氨水甲醇溶液对饲料中庆大霉素的洗脱效果。结果见图 10，从图 10 可以看出，使用 3 mL 洗脱液能几乎将目标物全部洗脱下来。因此，本研究最终选择 3 mL 作为 PCX 固相萃取柱的洗脱液用量。

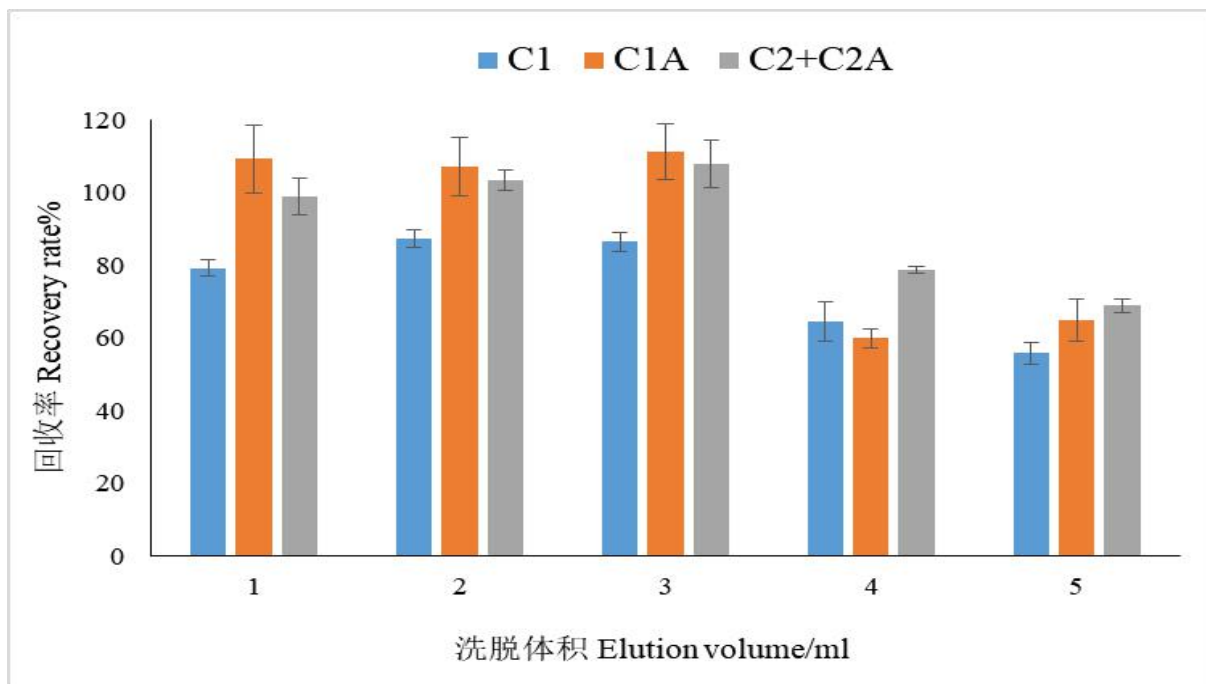


图 10 不同洗脱体积的洗脱效果

### 2.2.8 标准储备溶液稳定性考察

进行了标准储备溶液在  $-18^{\circ}\text{C}$  以下贮存 180 天的稳定性实验,新鲜制备及制备后保存 180 天的储备液中待测药物的响应值的变异系数低于 10%,表明标准储备溶液在低温条件下稳定性较好。(新鲜制备及 180 天后的溶液浓度为  $1.0\text{ mg/mL}$ 。注:因  $1.0\text{ mg/mL}$  浓度太高,仪器响应值过高,因此稀释成  $100\text{ ng/mL}$  进行测定。详见表 4。

表 4 标准储备溶液稳定性考察

浓度	储存时间	检测浓度	回收率 (%)			变异系数
1 mg/mL	7 天	100 ng/mL	103.13	96.36	102.61	3.05
1 mg/mL	15 天	100 ng/mL	107.37	97.16	96.23	5.03
1 mg/mL	30 天	100 ng/mL	98.45	99.45	101.87	1.44
1 mg/mL	60 天	100 ng/mL	103.11	97.65	96.47	2.92
1 mg/mL	90 天	100 ng/mL	95.25	96.38	97.96	1.15
1 mg/mL	180 天	100 ng/mL	94.25	98.76	99.39	2.35

## 2.2.9 样品提取和净化方法

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.1 mg，置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 5% 三氯乙酸提取溶液，超声提取 30 min，于 8000 r/min 离心 5 min，取上清液，备用。

PCX 阳离子交换柱依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化，取 7.5 mL 的备用液上柱，流干后，依次用水 5 mL 和甲醇 5 mL 淋洗，抽干，用氨化甲醇 5 mL 洗脱，收集洗脱液于 10 mL 塑料离心管中，于 40 °C 下用氮气吹至近干，加入 1 mL 1% 七氟丁酸甲酸溶液复溶，充分涡旋，用 0.22 μm 滤膜过滤，滤液装塑料进样小瓶，供液相色谱-串联质谱仪测定。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 检出限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 的确定

在空白基质中添加一定量的庆大霉素标准品，样品经前处理后，用 HPLC-MS/MS 进行测定，当检测样品中色谱峰的信噪比大于等于 3 时，添加庆大霉素的浓度即为检出限，样品中庆大霉素的峰的信噪比大于等于 10 时，添加庆大霉素的浓度即为定量限。该庆大霉素分析方法对饲料的检测限 0.05 mg/kg，定量限均为 0.10 mg/kg。根据庆大霉素 (C1:31%、C1a: 22.2%、C2+C2a 共 46.8%) 各组分所占的比例，所以庆大霉素组分 C1、C1a、C2+C2a 在饲料的检测限分别为 15.5 μg/kg、11.1 μg/kg、23.4 μg/kg；庆大霉素组分 C1、C1a、C2+C2a 在饲料的定量限分别为 31 μg/kg、22.2 μg/kg、46.8 μg/kg。

### 2.3.2 基质效应考察

由于不同饲料样品的组成十分复杂，LC-MS/MS 检测庆大霉素时基质干扰非常明显，所以基质效应的校正必不可少。取不同饲料样品进行前处理，以此基质提取液作稀释液配制 1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、

100  $\mu\text{g/mL}$  的基质标准溶液，与直接用 1%七氟丁酸杆醋酸：2 mol/L 的甲酸铵（90 : 10, v/v）溶液配制的标准溶液对比，结果见图 11。庆大霉素表现为基质增强，增强约 0~20%。

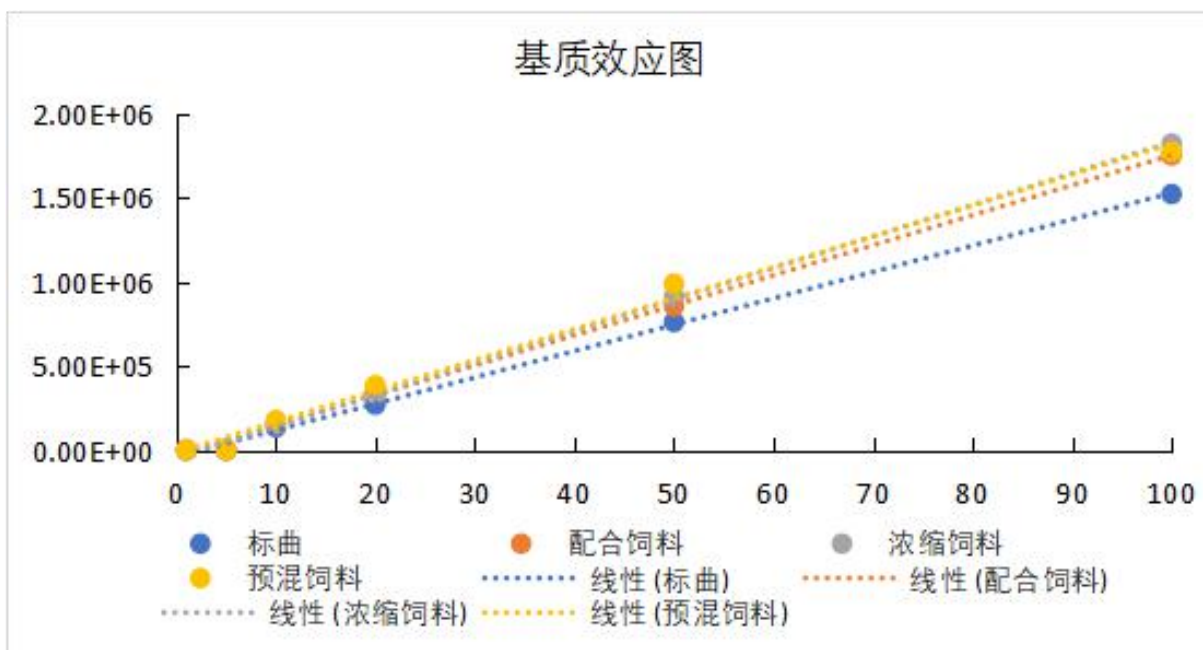


图 11 庆大霉素基质效应图

### 2.3.3 线性范围考察

在上述优化条件下，取空白基质溶液将庆大霉素配制成包含定量限在内的由低到高浓度的基质标准溶液，其质量浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL，经 LC-MS/MS 测定分析，以定量离子色谱峰面积与基质添加标准溶液浓度作标准曲线。结果见表 5。基质添加标准溶液在 5 ng/mL~500 ng/mL 的线性关系良好；能够满足饲料中庆大霉素含量的分析需要。

表 5 基质添加标准曲线的线性方程和相关系数

饲料基质	线性方程	决定系数 R <sup>2</sup>	检出限 (mg / kg)	定量限 (mg / kg)
配合饲料 Compoundfeed	y = 36915x - 36476	R <sup>2</sup> = 0.9982	0.05	0.1
浓缩饲料 Concentratedfeed	y = 34964x - 41256	R <sup>2</sup> = 0.9986	0.05	0.1
预混料饲料 Premixedfeed	y = 34921x - 44127	R <sup>2</sup> = 0.9952	0.05	0.1

### 2.3.4 准确度和精密度考察

分别取各饲料，每个样品 5.0 g，按照 LOQ、2LOQ、最低添加浓度和最高添加浓度进行添加回收试验。同时做空白对照，样品经前处理提取、净化后进行 HPLC-MS/MS 测定，要求样品进行五次上样，重复三天，求每个组分的平均回收率和批内、批间相对标准偏差，结果见表 6~表 13。相关空白饲料色谱图与标准样品添加饲料色谱图见图 12~图 27。

表 6 猪配合饲料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率(%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	82.1	83.4	81.2	82.1	81.1	82.0	0.94	2.18
	II	82.3	77.8	83.9	81.5	77.4	80.6	2.87	
	III	82.6	82.3	84.2	83.9	78.3	82.2	2.35	
0.2	I	80.5	82.2	92.9	80.6	80.6	83.3	5.36	4.75
	II	77.2	85.1	83.0	79.8	92.4	83.5	5.82	
	III	77.8	78.8	83.8	85.9	79.5	81.2	3.49	
25	I	84.3	84.8	85.9	85.5	84.3	85.0	0.70	2.23
	II	84.0	85.8	83.5	83.5	83.9	84.1	0.94	
	III	83.1	86.3	89.8	85.5	90.8	87.1	3.20	
100	I	79.5	89.8	80.3	89.3	79.0	83.6	5.46	4.60
	II	79.4	86.7	79.2	82.9	79.2	81.5	3.31	
	III	83.2	91.0	77.2	78.0	83.3	82.5	5.50	

表 7 猪浓缩饲料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	80.8	80.6	80.2	92.4	82.2	83.2	5.15	5.16
	II	78.3	79.6	83.9	82.4	77.9	80.4	2.64	
	III	67.9	81.3	85.9	77.8	83.7	79.3	7.04	
0.2	I	80.9	67.5	82.0	80.8	85.9	79.4	7.00	9.24
	II	82.2	81.1	85.4	85.2	67.9	80.4	7.22	
	III	92.9	92.9	62.9	82.8	67.6	79.8	14.03	
50	I	79.9	77.3	78.0	80.4	82.6	79.6	2.08	2.09
	II	81.8	78.0	83.4	82.3	79.9	81.1	2.14	
	III	82.8	83.3	78.8	80.0	82.6	81.5	1.99	
1000	I	82.9	78.0	81.5	78.6	83.1	80.8	2.41	2.12
	II	82.8	77.8	79.5	77.8	82.6	80.1	2.47	
	III	80.6	79.3	79.3	83.8	80.9	80.8	1.84	

表 8 猪预混料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	78.0	85.3	80.1	79.1	78.8	80.3	2.91	5.55
	II	94.0	87.2	89.5	90.6	80.0	88.3	5.23	
	III	93.8	88.3	87.9	83.0	90.4	88.7	3.96	
0.2	I	83.1	79.9	85.8	83.1	62.8	78.9	9.26	7.67
	II	83.6	80.1	82.9	83.0	80.3	82.0	1.65	
	III	92.3	92.2	80.3	83.8	67.4	83.2	10.28	
500	I	67.1	79.8	62.8	67.3	85.3	72.5	9.61	8.72
	II	82.8	81.3	85.3	85.1	92.5	85.4	4.31	
	III	83.8	92.5	79.9	83.9	84.0	84.8	4.64	
5000	I	79.6	92.8	83.6	81.2	67.9	81.0	8.95	6.20
	II	82.8	80.9	79.0	67.8	83.0	78.7	6.28	
	III	86.0	83.9	81.1	80.6	79.3	82.2	2.70	

表 9 鸡配合饲料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	78.8	83.1	90.1	83.8	85.6	84.3	4.10	5.14
	II	85.2	94.9	91.8	77.9	91.4	88.2	6.77	
	III	82.6	87.2	82.9	78.2	83.2	82.8	3.21	
0.2	I	92.8	80.0	86.2	97.1	84.8	88.2	6.79	6.79
	II	86.8	84.9	89.1	77.8	77.1	83.1	5.42	
	III	85.8	87.3	102.2	87.0	81.6	88.8	7.86	
10	I	96.8	86.0	96.0	97.2	81.6	91.5	7.23	6.94
	II	77.0	80.3	78.0	82.1	83.5	80.2	2.70	
	III	77.8	78.2	84.0	81.0	83.1	80.8	2.79	
100	I	96.3	98.2	99.8	84.3	85.0	92.7	7.48	8.62
	II	80.3	82.3	86.2	81.5	83.3	82.7	2.24	
	III	80.5	78.8	77.8	67.1	77.4	76.3	5.28	

表 10 鸡预混料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	83.1	77.8	92.8	82.0	85.6	84.3	5.55	6.49
	II	92.9	80.6	92.6	80.8	67.9	83.0	10.35	
	III	81.0	80.8	79.8	79.4	82.6	80.7	1.23	
0.2	I	80.4	82.3	85.4	81.8	92.9	84.6	5.02	5.78
	II	67.8	92.2	85.2	80.1	80.9	81.2	8.90	
	III	85.3	81.2	79.4	83.9	82.8	82.5	2.31	
100	I	81.8	87.6	82.6	78.9	81.3	82.4	3.18	2.00
	II	81.1	82.4	80.3	82.2	81.2	81.4	0.86	
	III	84.3	81.3	83.1	83.3	80.8	82.5	1.47	
2000	I	82.9	83.4	81.4	92.2	79.0	83.8	5.01	10.50
	II	85.9	62.1	92.1	85.1	86.0	82.2	11.59	
	III	85.8	62.3	85.1	62.5	92.2	77.6	14.14	

表 11 鱼配合饲料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	78.0	82.1	82.0	83.1	79.2	80.9	2.16	2.51
	II	83.4	80.9	79.4	86.9	80.5	82.2	3.02	
	III	80.2	83.8	83.2	78.0	78.9	80.8	2.60	
0.2	I	80.2	81.5	79.0	97.6	83.8	84.4	7.59	6.50
	II	82.8	80.4	78.0	79.6	77.3	79.6	2.17	
	III	82.5	92.3	82.9	97.1	83.5	87.7	6.68	
20	I	77.1	80.8	78.8	77.0	80.1	78.8	1.72	2.12
	II	81.8	79.4	81.3	80.5	79.8	80.6	1.00	
	III	79.9	80.0	82.5	85.2	82.8	82.1	2.21	
200	I	81.4	81.4	78.3	78.5	81.5	80.2	1.67	5.53
	II	83.8	98.8	77.5	83.4	79.3	84.6	8.42	
	III	82.4	91.6	86.0	82.9	82.0	85.0	4.01	

表 12 鱼浓缩饲料中庆大霉素的添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	76.02	71.05	72.97	74.09	73.16	73.46	2.46	5.67
	II	83.37	80.68	79.36	86.91	80.48	82.16	3.69	
	III	80.20	74.71	74.21	75.96	78.88	76.79	3.43	
0.2	I	69.21	72.53	76.96	67.62	74.73	72.21	5.32	4.98
	II	71.82	69.41	78.02	73.55	75.30	73.62	4.46	
	III	82.48	66.33	71.89	67.13	74.46	82.06	4.81	
100	I	75.05	69.79	78.84	77.04	69.12	73.97	5.86	6.54
	II	81.76	73.38	81.30	80.50	79.82	79.35	4.31	
	III	73.92	69.02	82.52	68.23	71.73	82.68	3.19	
1000	I	81.39	81.40	76.34	78.47	81.54	79.83	2.93	5.46
	II	74.63	78.64	75.49	74.38	79.27	76.48	3.01	
	III	71.41	72.60	68.99	71.94	71.03	71.19	1.92	



表 13 精料补充料中庆大霉素添加回收率、批内和批间精密度

浓度 (mg/kg)	测定 批次	回收率(%)					平均回 收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.1	I	83.2	80.4	67.8	79.2	92.2	80.6	8.74	5.26
	II	78.5	77.9	85.4	78.0	77.2	79.4	3.38	
	III	79.1	82.0	84.9	79.8	77.9	80.7	2.75	
0.2	I	79.8	85.2	67.8	67.6	81.4	76.4	8.13	6.88
	II	81.5	82.5	82.4	86.0	85.9	83.7	2.11	
	III	83.2	91.9	79.4	91.2	77.8	84.7	6.57	
10	I	81.5	79.9	85.2	85.8	92.8	85.0	4.98	3.74
	II	80.8	78.0	83.5	85.4	82.5	82.0	2.81	
	III	78.1	80.8	85.5	85.3	84.0	82.8	3.19	
200	I	81.5	80.2	80.9	67.9	92.1	80.5	8.56	5.58
	II	79.2	79.3	77.9	81.0	79.2	79.3	1.08	
	III	91.3	80.3	81.8	77.6	78.3	81.9	5.53	

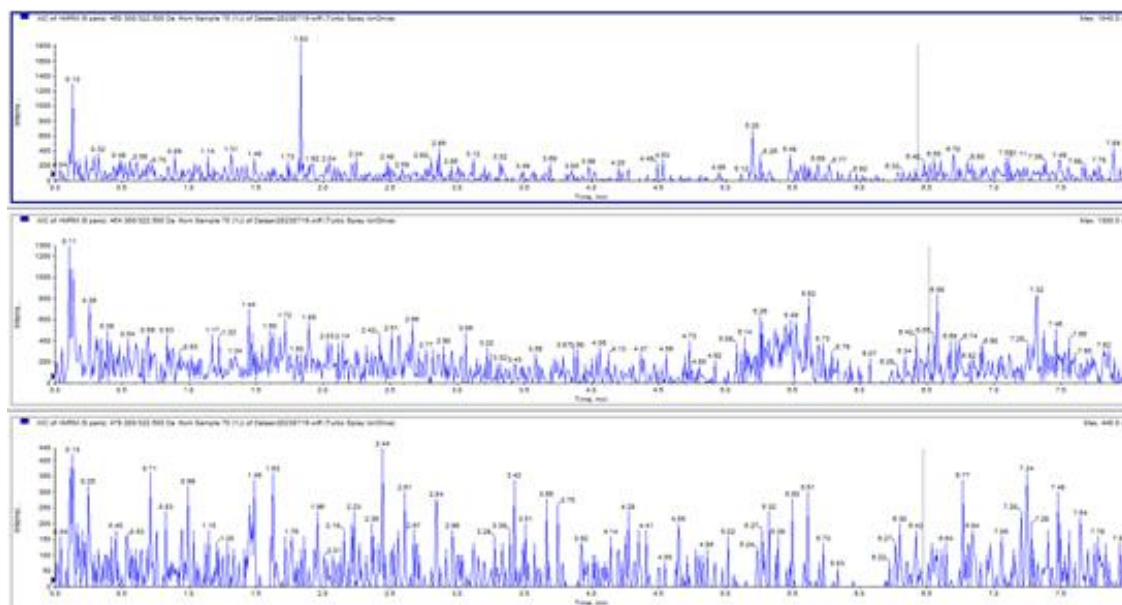


图 12 猪配合饲料空白样品特征离子色谱图  
(从上到下为：庆大霉素 C1a、C2a 和 C2、C1，以下皆同)

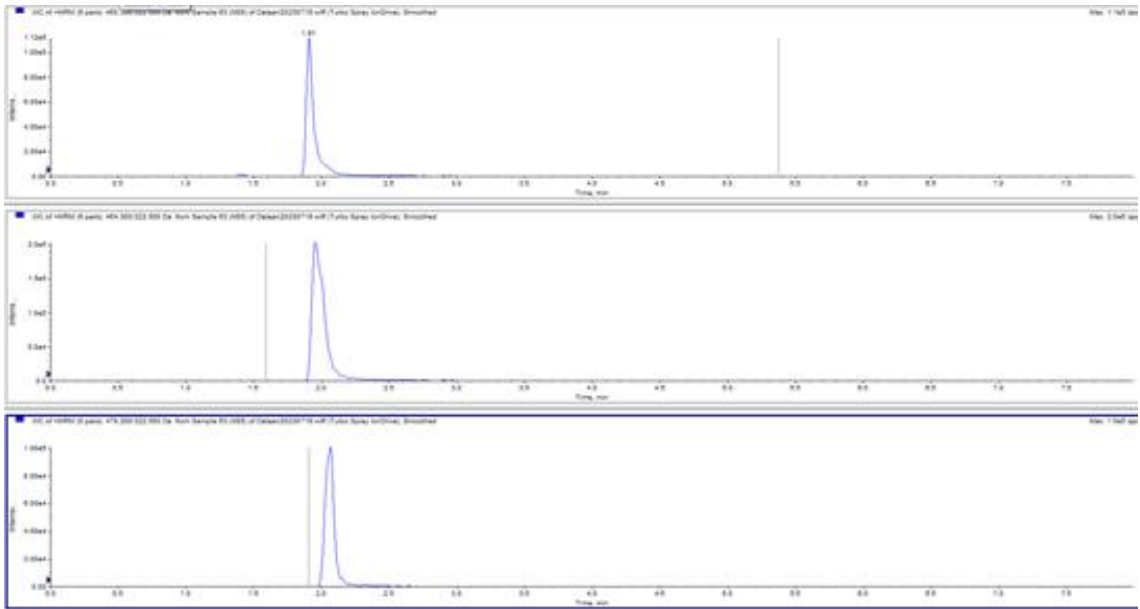


图 13 猪配合饲料添加样品特征离子色谱图

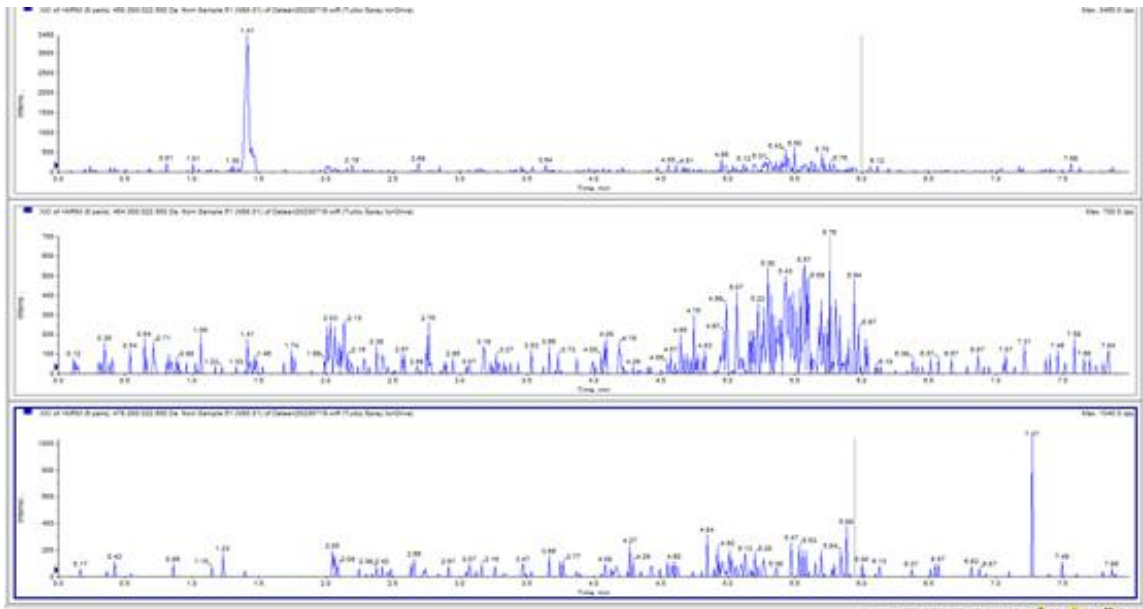


图 14 猪浓缩饲料空白样品特征离子色谱图

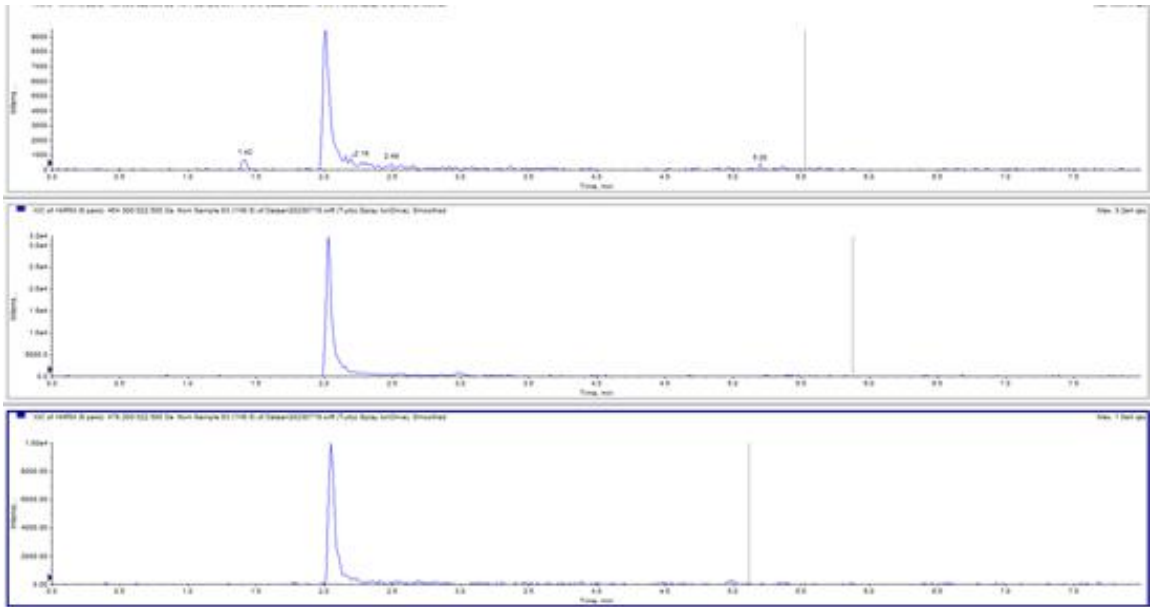


图 15 猪浓缩饲料添加样品特征离子色谱图

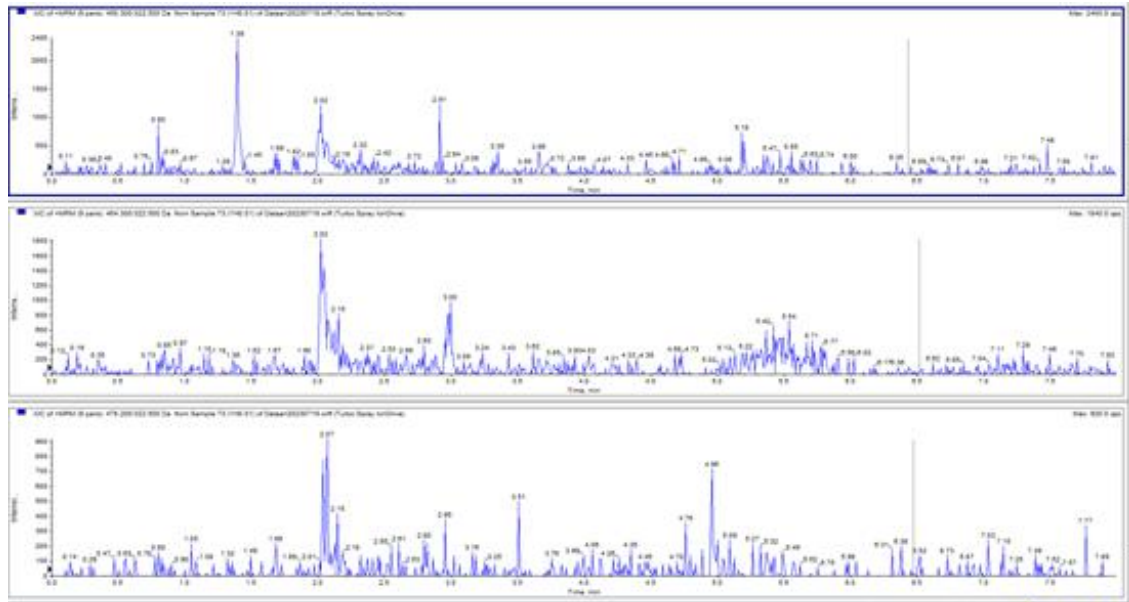


图 16 猪猪预混料空白样品特征离子色谱图

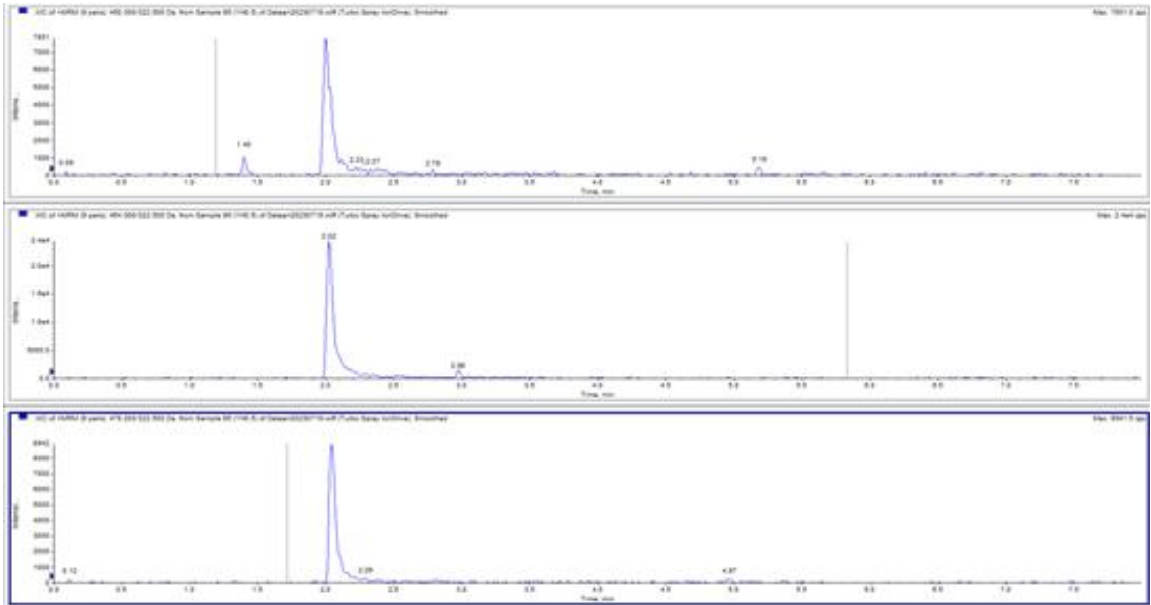


图 17 猪猪预混料添加样品特征离子色谱图

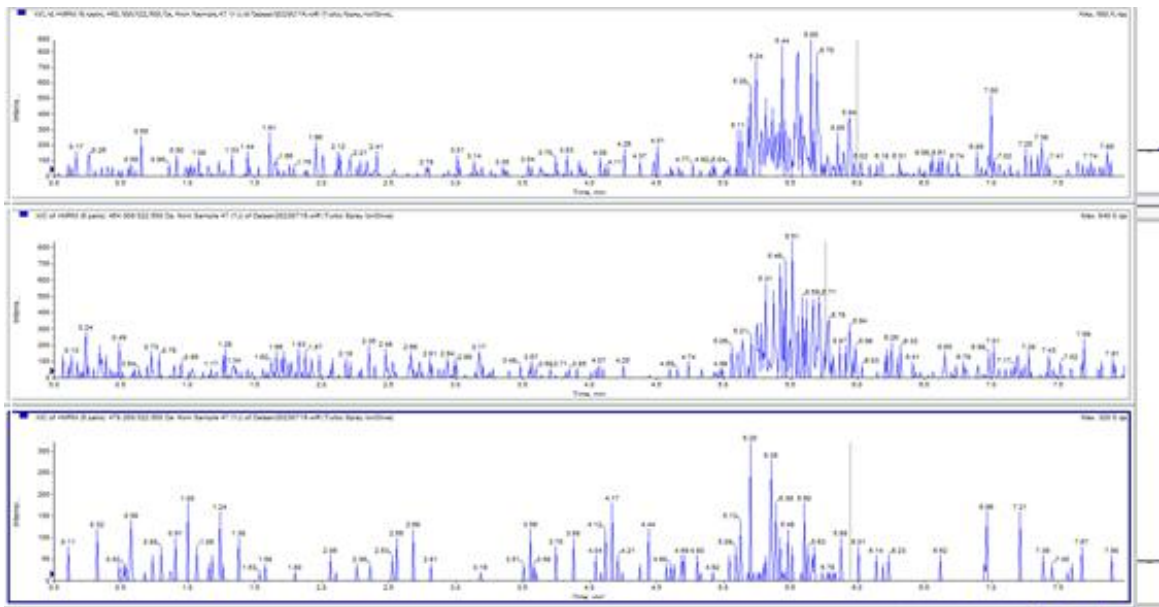


图 18 鸡配合饲料空白样品特征离子色谱图

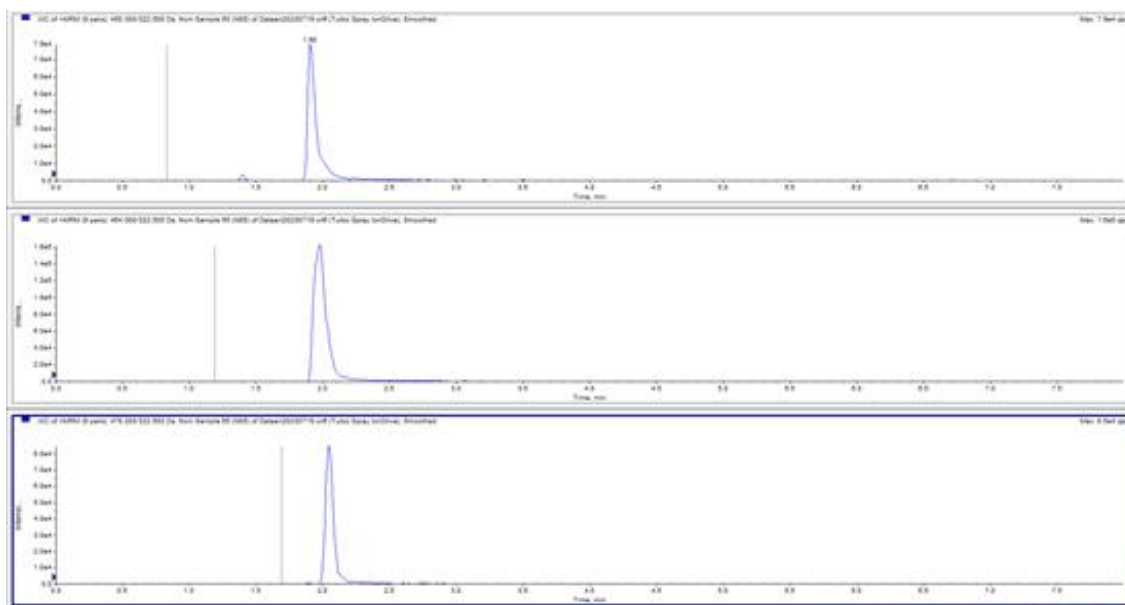


图 19 鸡配合饲料添加样品特征离子色谱图

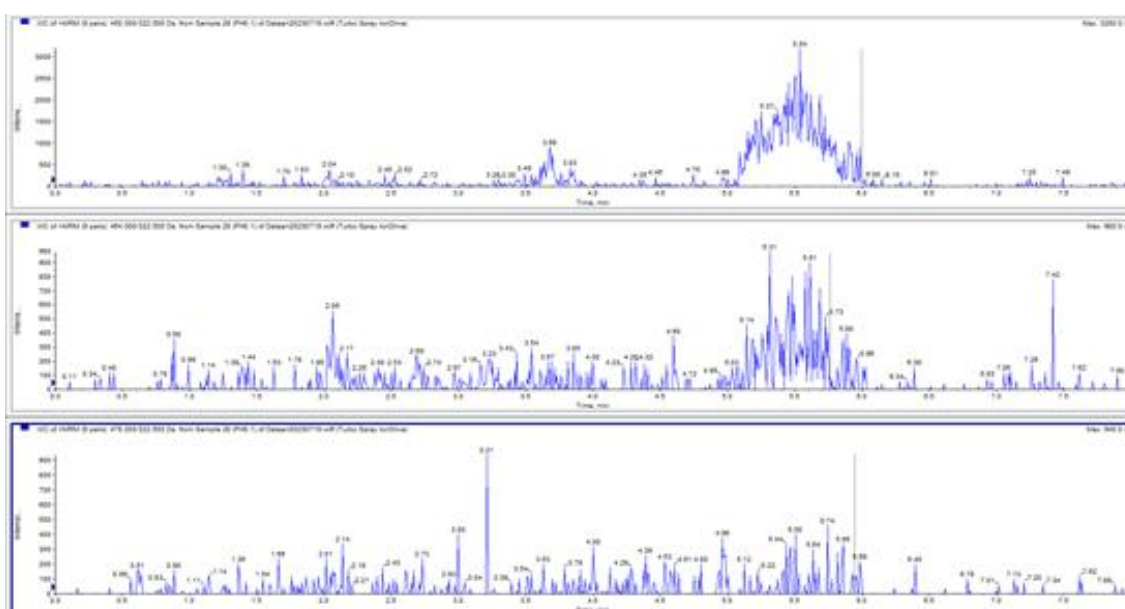


图 20 鸡预混料空白样品特征离子色谱图

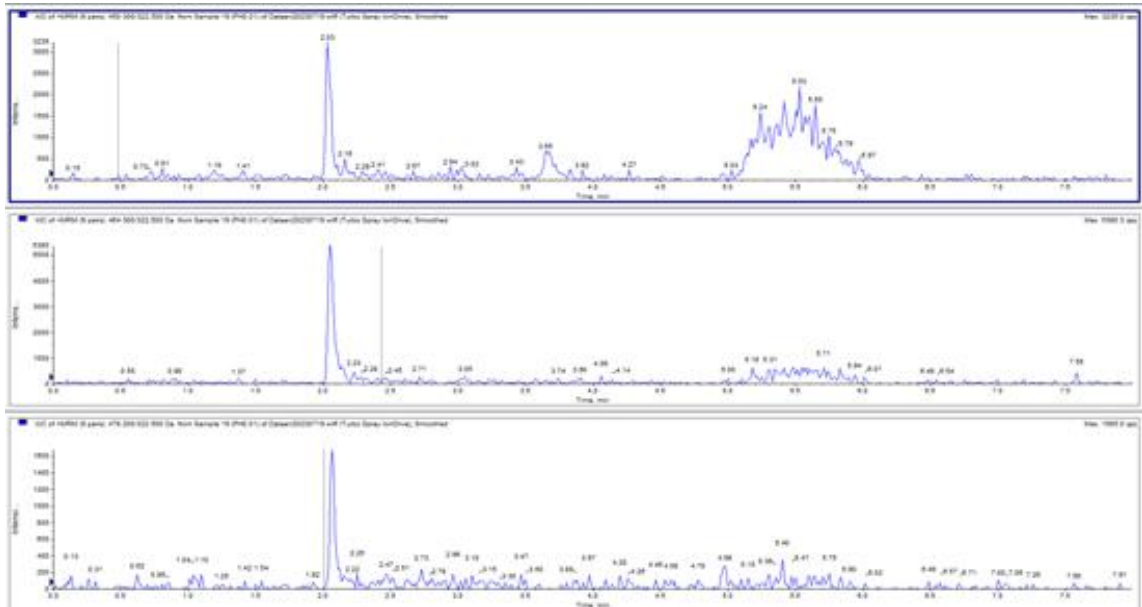


图 21 鸡预混料添加样品特征离子色谱图

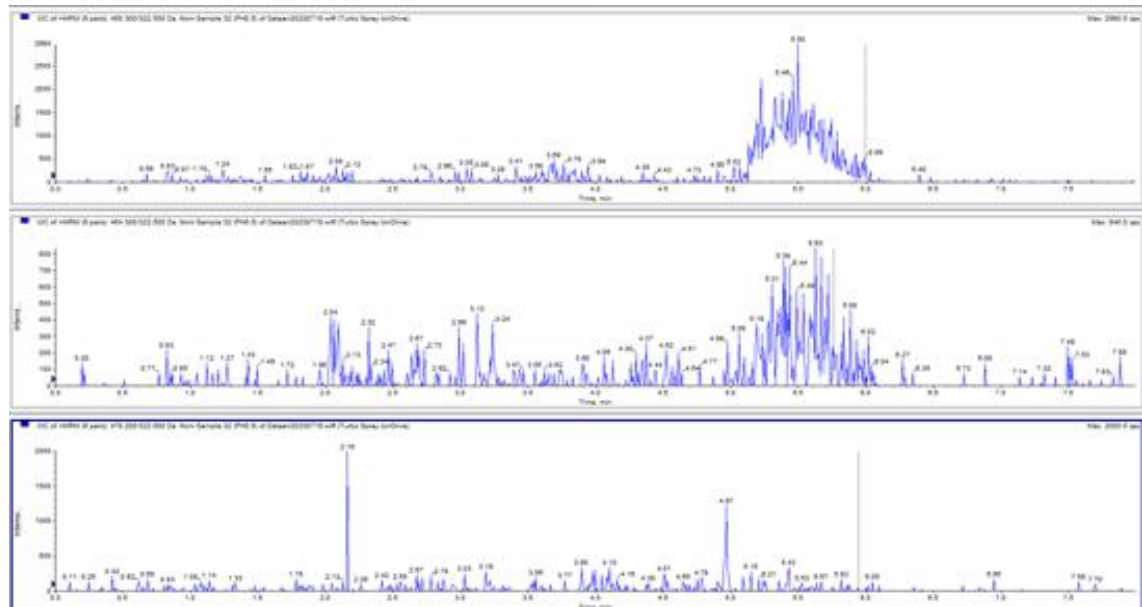


图 22 鱼配合饲料空白样品特征离子色谱图

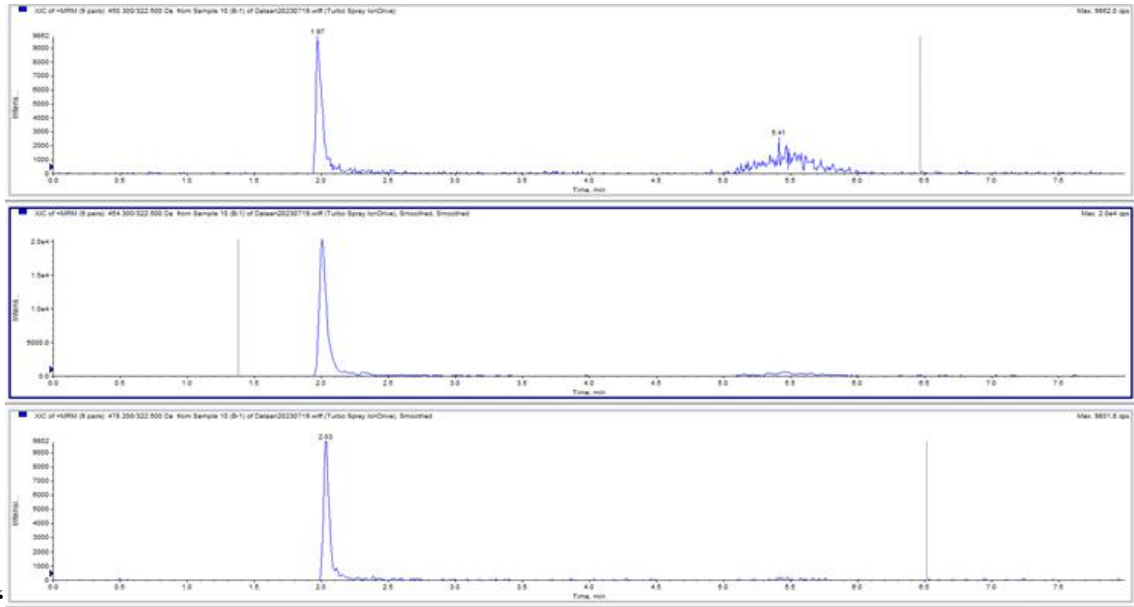


图 23 鱼配合饲料添加样品特征离子色谱图

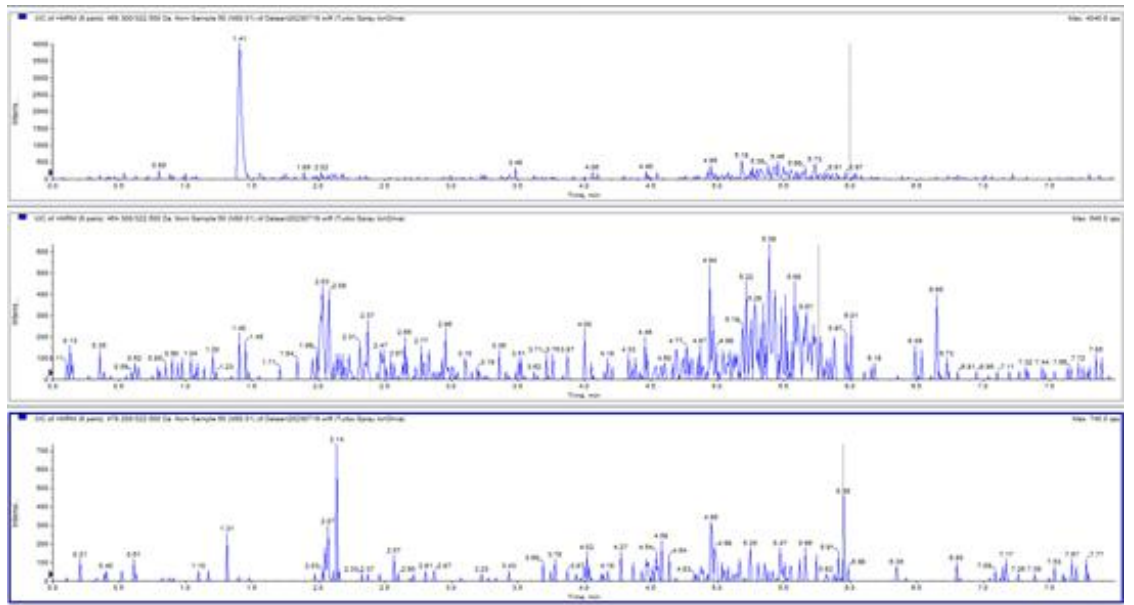


图 24 鱼浓缩饲料空白样品特征离子色谱图



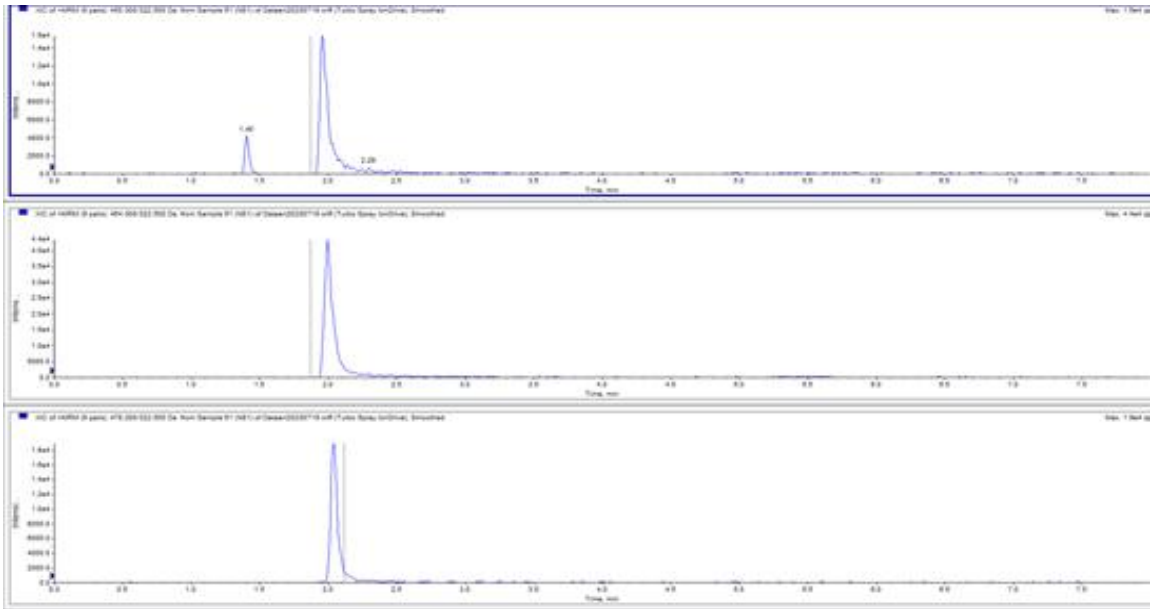
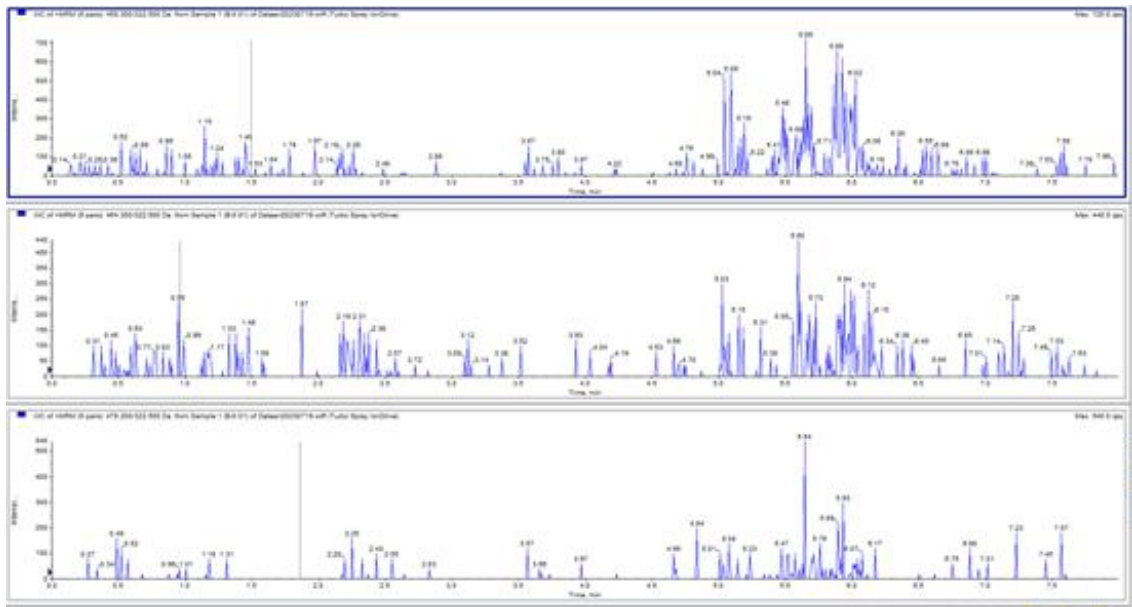


图 25 鱼浓缩饲料添加样品特征离子色谱图





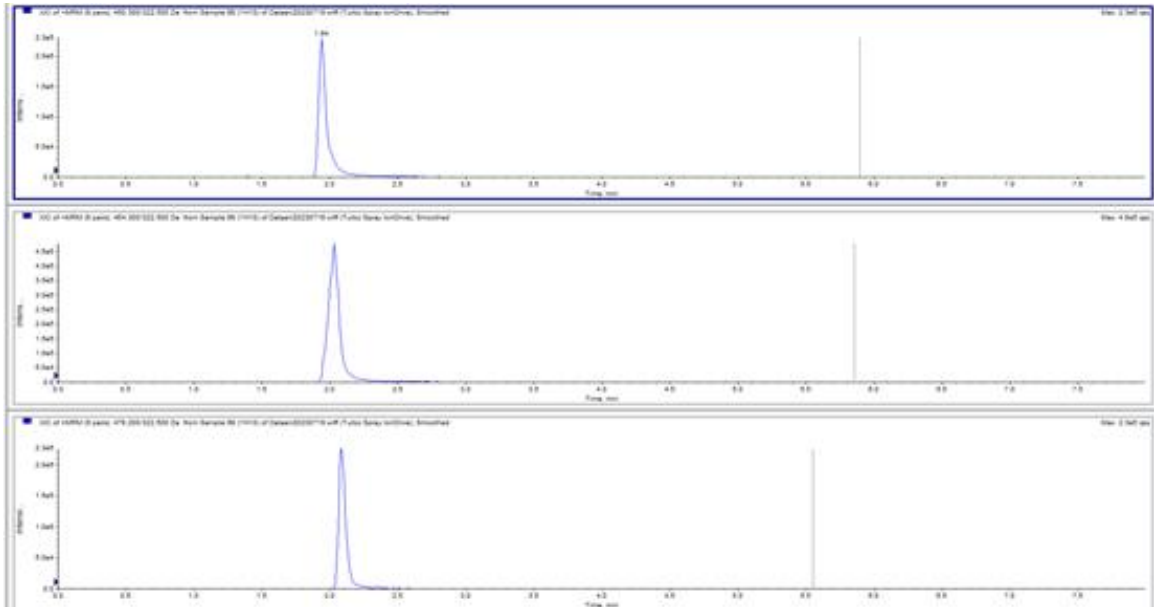


图 27 精料补充料添加样品特征离子色谱图

### 2.3.5 方法的重复性

由表 6~表 11 可以看出，不同的基质样品，在同一添加水平下，在重复性条件下获得的三次独立结果的相对偏差值均不超过 20%，符合本标准研究需要。

以上结果表明，本标准建立的饲料中庆大霉素的超高效液相色谱-串联质谱测定方法，其色谱质谱条件易于掌握，仪器性能稳定，测试数据重复性好，回收率范围、精密度和准确度均能满足分析要求，无论单独计算各组分的含量还是庆大霉素总含量，该方法都能够满足饲料中庆大霉素含量的测定要求。

## 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

### 四、与国内、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

与国内、国际、国外同类标准技术内容的对比详见表 。

## **五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准**

本标准未合规引用或采用国际国外标准。

## **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**

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**

(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] Gentamicin.(WHO Food Additives Series 41).
- [2] Jao R L,Jackson G G.Gentamicin Sulfate,New Antibiotic against Gram-Negative Bacilli[J].JAMA,1964,189:817-822.
- [3] McKellar Q 1Antimicrobial resistance:A veterinary perspective[J].BMJ,1998,317:610-611.
- [4] Rosenkrantz B E,Greco J R,Hoogerheide J G,et al.Gentamicin Sulfate[J].Analytical Profiles of Drug Substances,1981,9:295-340.
- [5] 谢桂芬.庆大霉素在猪病防治中的使用[J].现代农业科技,2008(19):302-304.
- Xie G F.Application of gentamicin in prevention and treatment of pig disease [J]. Modern Agricultural Science and Technology,2008(19): 302-304.(in Chinese)
- [6] 罗文柳.庆大霉素在兽医临床中的应用[J].兽医导刊,2020(13):106.
- Luo W L. Application of gentamicin in veterinary clinic [J]. Veterinary Guide,2020(13):106.(in Chinese)
- [7] 田强兵,巨欢,任惠丽,等.高效液相色谱-质谱法测定鱼肉中庆大霉素主要组分C1、C1a、C2[J].理化检验(化学分册),2019,55(01):97-100.
- Tian Q B, Ju H, Ren H L, et al. Determination of gentamicin components C1, C1a and C2 in fish meat by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Physical and Chemical Examination (Chemistry Branch),2019,55(01):97-100.(in Chinese)
- [8] Pourfeizi H H,Saleh P,Abbasalizadeh S,et al.Gentamicin-mediated ototoxicity and nephrotoxicity:A clinical trial study[J].Nigerian Medical Journal,2016,57(6):347-352.
- [9] 李福刚,袁玉国.致病性大肠杆菌对庆大霉素的耐药性研究[J].江西畜牧兽医杂志,2002(01): 6-8.
- Li F G, Yuan Y G.Study on resistance of pathogenic Escherichia coli to gentamicin [J].Jiangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2002(01):6-8.(in Chinese)
- [10] 王秀英.禽大肠杆菌对庆大霉素的耐药性诱导试验[J].中国畜禽种业,2019,15(09):191.
- Wang X Y.Induction of resistance to gentamicin in avian Escherichia coli [J].Chinese Journal of Livestock and Poultry Breeding,2019,15(09):191.(in Chinese)
- [11] 中华人民共和国农业部公告第1519号,禁止在饲料和动物饮水中使用的物质[EB/OL]. 2010.中华人民共和国农业部公告 第1519号 (molgov.cn)
- Announcement No. 1519 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Substances prohibited in feed and animal drinking water [EB/OL]. 2010. Announcement No. 1519 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (molgov.cn).(in Chinese)
- [12] 中华人民共和国农业农村部公告第194号,发布药物饲料添加剂退出计划和相关管理政策[EB/OL]. 2019.中华人民共和国农业农村部公告 第194号 (molgov.cn)
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China Announcement No. 194, Release of drug feed additives withdrawal plan and related management policies [EB/OL]. 2019. Announcement No. 194

of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China (molgov.cn).(in Chinese)

[13] 农业农村部畜牧兽医局, 农业农村部畜牧兽医局关于2020年全国饲料质量安全监督抽查结果的通报 [EB/OL].中华人民共和国农业农村部公报,2021(02): 122-123.www.molgov.cn/nybgb/2021/202102/202110/t20211008\_6378916.htm

Ministry of Agriculture and Rural Affairs Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs Animal Husbandry and Veterinary Bureau on 2020 national feed quality and safety supervision results Notice [EB/OL]. The agricultural NongCunBu communique of the People's Republic of China, 2021 (02) : 122-123. www.molgov.cn/nybgb/2021/202102/202110/t20211008\_6378916.htm.(in Chinese)

[14] Tang S P, Canfarotta F, Smolinska-Kempisty K, et al. A pseudo-ELISA based on molecularly imprinted nanoparticles for detection of gentamicin in real samples[J]. Analytical Methods, 2017, 9(19): 2853-2858.

[15] Xia Y, Su R, Huang R, et al. Design of elution strategy for simultaneous detection of chloramphenicol and gentamicin in complex samples using surface plasmon resonance[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 92: 266-272.

[16] Wu S M, Yan C X, Fan X H, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold-based immunochromatographic assay for the rapid detection of gentamicin in chicken muscle and milk[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2022, 50(10).

[17] Radhakumary C, Sreenivasan K. Gentamicin induced formation of gold nanoparticles as an assay protocol for its detection[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 443: 326-330.

[18] Li C, Zhang Y, Eremin S A, et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA[J]. Food Chemistry, 2017, 277: 48-54.

[19] Gukowsky J C, Tan C, Han Z, et al. Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles as a Colorimetric Sensor for the Rapid Detection of Gentamicin[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(6): 1631-1638.

[20] Adams E, Roelants W, De Paepe R, et al. Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 18(4-5): 689-698.

[21] Mahon W A, Ezer J, Wilson T W. Radioimmunoassay for Measurement of Gentamicin in Blood[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1973, 3(5): 585-589.

[22] Heller D N, Peggins J O, Nochetto C B, et al. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821(1): 22-30.

[23] 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(3): 48-52.

Liu X H, Zhang X Q, Hou Y, et al. Determination of 7 aminoglycosides residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015(3): 48-52. (in Chinese)

- [24] 吕芳,李英,沈媛,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定鲟鱼中庆大霉素和新霉素残留量[J].食品安全质量检测学报,2019,10(01):234-239.
- Lv F,Li Y,Shen Y,et al.Determination of gentamicin and neomycin residues in Sturgeon by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].Journal of Food Safety and Quality Inspection,2019,10(01):234-239.(in Chinese)
- [25] 马凯,蔡芳叶,黄永桥,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中九种氨基糖苷类药物残留[J].食品与发酵工业,2020,46(18):203-208.
- Ma K,Cai F Y,Huang Y Q,et al.Determination of nine aminoglycosides residues in honey by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J].Food and Fermentation Industry,2019,46(18):203-208.(in Chinese)
- [26] 王美丽,李敦毅.QuEChERS法提取-液相色谱-质谱法检测分析制药园区污水中青霉素、洁霉素、土霉素、四环素和庆大霉素残留方法的建立[J].分析仪器,2021(04):150-154.
- Wang M L, Li D Y. Establishment of QuEChERS extraction-liquid chromatography-mass spectrometry method for detection and analysis of penicillin, lincomycin, oxytetracycline and gentamicin residues in wastewater of pharmaceutical park [J]. Analytical Instruments,2021(04): 150-154.(in Chinese)
- [27] 赵国宝,罗飞,臧勇军.超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中庆大霉素残留量[J].肉类工业,2019(07):40-42+51.
- Zhao G B, Luo F, Zang Y J. Determination of gentamicin residue in pork by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].Meat Industry,2019(07):40-42+51.(in Chinese)
- [28] 刘晓云,迟秋池,夏苏捷,等.高效液相-串联质谱法测定餐饮冷菜中的庆大霉素残留量[J].上海预防医学,2018,30(06):468-471.
- Liu X Y, Chi Q C, Xia S J,et al. Determination of gentamicin residue in cold food by HPLC tandem mass spectrometry[J].Shanghai Preventive Medicine,2018,30(06):468-471.(in Chinese)
- [29] Yuma Bijleveld, Timo de Haan, Jan Toersche, et al. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study[J].Journal of Chromatography B,2014,951-952.
- [30] 猪拉稀治疗常用庆大霉素和拌料  
<https://b2b.baidu.com/q/alant?q=1F24096406681F07080F7A6A1A0A0E257D3A0A700211730479210806&id=qid327a6d2ec0ffbcb4be4c8a906315ba3&answer=17693759961205202428&utype=2>
- [31] 硫酸庆大霉素-主要用于鸡坏死性皮炎、鸡白痢、大肠杆菌病  
<http://m.1866.tv/qiyeku/dlxwyy/213997.html>
- [32] GB/T 1.1-2009 标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则的要求.
- [33] GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则.
- [34] GB/T 20001.4-2001 标准编写规则第4部分：化学分析方法.

[35] Commission E (EC). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, as amended by Decision 2003/181/EC 2002; vol. 4, pp. 8–36.