

# 中华人民共和国国家标准

## 《饲料中盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和 磺胺喹噁啉的测定》

### 编制说明 (定向征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家  
饲料质量检验检测中心(北京)]

陕西省畜牧技术推广总站

陕西省农业检验检测中心

陕西中禾农检分析检测有限公司

2024年6月

# 目 录

一、工作简况 .....	1
(一) 任务来源 .....	1
(二) 标准制定背景 .....	1
(三) 工作过程 .....	4
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据 .....	4
(一) 标准编制原则 .....	4
(二) 标准主要技术内容的确定 .....	5
1 标准方法的目的 .....	5
2 高效液相色谱法的建立 .....	6
2.1 液相色谱条件 .....	6
2.2 提取条件的确定 .....	11
2.3 净化方法的确定 .....	12
2.4 标准溶液的稳定性 .....	16
2.5 方法性能考察 .....	18
3 液相色谱-串联质谱法的建立 .....	28
3.1 液相色谱-串联质谱条件 .....	28
3.2 提取净化方法的确定 .....	33
3.3 标准溶液的稳定性 .....	33
3.4 基质效应的考察 .....	34
3.5 方法性能考察 .....	37
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 .....	47
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况 .....	48
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准 .....	48
六、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系 .....	48
七、重大分歧意见的处理经过和依据 .....	48
八、涉及专利的有关说明 .....	48
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 .....	48
十、其他应予说明的事项 .....	48
参考文献 .....	49

## 一、工作简况

### （一）任务来源

本标准修订任务来源于《国家标准化管理委员会关于下达 2020 年第三批推荐性国家标准计划的通知》(国标委发[2020]48 号), 项目编号 20203888-T-469。起草单位之一的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)], 按 2021 年按国家市场监督管理总局规定, 国家饲料质量监督检验中心(北京)更名为国家饲料质量检验检测中心(北京)。修标任务由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)]、陕西省畜牧技术推广总站、陕西省农业检验检测中心和陕西中禾农检分析检测有限公司等 4 家单位组成的修标工作组共同承担。

### （二）标准制定背景

球虫病是鸡、兔、牛、犬等动物在最常罹患的疾病。从上世纪 60 年代起, 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉及其制剂就在饲料中普遍添加使用, 以期达到预防或治疗的作用。我国农业部 168 号公告饲料药物添加剂使用规范中曾就这些抗球虫剂的使用方法、添加剂量、休药期和使用中应注意的事项给出了具体规定。然而, 随着人们对细菌耐药性和食品中抗生素等兽药残留问题的认识, 世界各国不断通过法律法规发起了“禁抗”和限制使用药物添加剂地热潮, 我国农业农村部先后发布了 194 号和 246 号公告, 废止了仅有促生长用途的药物饲料添加剂, 给出了抗球虫和中药类饲料添加剂的质量标准和使用方法。针对盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的具体规定见表 1。

表 1 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉质量标准与使用

药物预混剂名称	含量规格	适用动物	用法与用量	配合饲料中折算量	休药期	注意
盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯	250 g/kg、16 g/kg	鸡、对羔羊、犊牛球虫病也有效	混饲，500g/t	125 g/t 8 g/t	鸡 7 日	产蛋期禁用
盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯、磺胺喹噁啉	200 g/kg、10 g/kg、120 g/kg	鸡、火鸡。对家兔、球虫病也有效	混饲，500g/t	100 g/t 5 g/t 60 g/t	鸡 7 日	产蛋期禁用

注：摘自农业农村部 246 号公告附件 3。

为配合相关法律法规、确保抗球虫剂的质量和药效，国内外曾出台一系列的饲料中药物的检测方法，如美国 AOAC 给出了饲料中氨丙啉测定的分光光度法（AOAC Official Method 961.24）和荧光分光光度法（AOAC Official Method 965.47）、饲料中乙氧酰胺苯甲酯测定的分光光度法（AOAC Official Method 964.29）和饲料中磺胺喹噁啉测定的分光光度法（AOAC Official Method 963.35）。欧盟采用的饲料中氨丙啉测定的分光光度法和乙氧酰胺苯甲酯测定的分光光度法（见 74/203/EEC），后来又发布了饲料中氨丙啉测定的液相色谱法（见 1999/27/EC）。我国先后发布了 GB/T 8381.11-2005《饲料中盐酸氨丙啉的测定 高效液相色谱法》、GB/T 8381.10-2005《饲料中磺胺喹噁啉的测定 高效液相色谱法》、农业农村部公告第 316 号-6-2020《饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法》，此外在多个磺胺类药物测定方法的目标化合物中都涵盖了磺胺喹噁啉（见表 2）。

表 2 饲料中 3 种抗球虫药物相关的检测方法标准

目标化合物	检测方法名称和编号
盐酸氨丙啉	GB/T 8381.11-2005 饲料中盐酸氨丙啉的测定 高效液相色谱法
乙氧酰胺苯甲酯	农业农村部公告第 316 号-6-2020 饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法
磺胺喹噁啉	GB/T 8381.10-2005 饲料中磺胺喹噁啉的测定 高效液相色谱法》
磺胺类药物 (含磺胺喹噁啉)	GB/T 19542-2007 饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法
	农业部 1486 号公告-7-2010 饲料中 9 种磺胺类药物的测定 高效液相色谱法
	农业部 2349 号公告-5-2015 饲料中磺胺类和喹诺酮类药物的测定 液相色谱—串联质谱法

由于饲料中盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉检测方法标准都是单一目标化合物的液相色谱方法，且标龄已超过 10 年，又没有液质确证法，所以急需建立一个能同时对这 3 种药物进行检测高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法，为进一步规范饲料中用药和滥用药物监管提供技术支持。

### (三) 工作过程

#### 1 成立修标工作组

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所（简称农科院质标所）接到制标任务后，2021 年 4 月成立了由农科院质标所、陕西省畜牧技术推广总站、陕西省农业检验检测中心和陕西中禾农检分析检测有限公司等组成的修标工作组。人员分工见表 4。

表 3 修标工作组人员分工

人员	单位	承担任务
宋荣	农科院质标所	制订工作方案、起草标准文本及编制说明， 汇总征求意见
李宏	陕西省畜牧技术推广总站	协助制订工作方案，液质方法建立

李丽蓓、魏书林、 张辉	农科院质标所	试样前处理条件和液相方法建立
王素琴	陕西省农业检验 检测中心	协助开展液相色谱方法性能考察
锥亚璇、杨坤	陕西中禾农检分 析检测有限公司	协助开展液质联用方法性能考察

## 2 标准修订过程

2021年4月~6月，查阅饲料和畜产品中盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉测定的国内外有关标准和资料，初步制定实验方案。

2021年7月~12月，研究确定了液相色谱分析的检测条件、比较不同的液相色谱柱对3种药物的分离能力，优化了流动相组成和梯度洗脱程序，筛选检测波长。

2022年1月~10月，考察标准储备溶液和标准中间溶液的稳定性，确定标准溶液的保质期；考察不同提取溶液、提取次数的提取效果，确定方法提取步骤；比较不同固相萃取柱的净化效果，优化固相萃取净化条件。

2022年11月~2023年6月，建立液相色谱-串联质谱联用方法的实验条件。

2023年7月~2024年3月，考察高效液相色谱方法和液质联用方法的方法性能，包括方法线性范围、准确度、精确度、检出限和定量限等，形成了方法定向征求意见稿。

## 二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

### （一）标准编制原则

本标准修订依据国家标准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。建立的饲料中3种抗球虫药的方法满足我国现行饲料法律法规（如农村部公告第194号、第246号公告等）

对兽药在允许使用领域的合理使用和不允许使用领域的非法使用的监测要求。

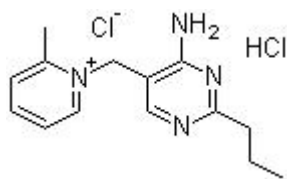
## （二）标准主要技术内容的确定

### 1 标准修订的目标、参考文献和方法研制中必用的基础信息

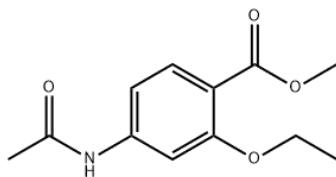
本次国家标准修订目标是将单一抗球虫药物的液相色谱法修改为盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的同时测定的高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。高效液相色谱法主要用于合规使用时，饲料中药物的定量测定，液相色谱-串联质谱法则用于饲料中药物的确证与定量，特别是对超范围或非法使用时的确证与定量。

查阅近年来相关文献发现，确有些饲料中涉及上述 1 种或 2 种以上抗球虫药物的液相色谱法（引地典雄，1995；王淑芬，1997；刘发全，2019）或液质联用法（Hormazabal，2002；Squadrone，2008；赵颖，2012；Konrad，2015）以及动物组织中 3 种药物残留的液相色谱法（Y.Takahashi，1994；吴秋侠，2007），但饲料中此 3 种药物联检方法还未见报道。

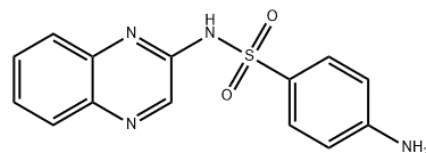
有关盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉化学结构、理化特性是在方法研究建立中必须考虑和应用的基础信息，如根据这些化合物的结构特点，充分利用其共性或相似之处，得到好的提取净化效果，利用其差异在同时测定中，实现好的分离和灵敏的检测。盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的化学结构见图 1。



盐酸氨丙啉



乙氧酰胺苯甲酯



磺胺喹噁啉

表 4 三种药物的基本信息与理化性质

化合物名称	盐酸氨丙啉	乙氧酰胺苯甲酯	磺胺喹噁啉
英文名称	Amprolium Hydrochloride	Ethopabate	Sulfaquinoxaline
分子式	$C_{14}H_{19}ClN_4 \cdot HCl$	$C_{12}H_{15}NO_4$	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$
分子量	315.24	237.25	300.34
CAS 号	137-88-2	59-06-3	59-40-5
溶解性	易溶于水、甲醇和乙醇， 稍溶于乙醚，不溶于氯仿	溶于乙醇、乙醚、丙二醇 和精油，微溶于水	微溶于水、甲醇、 DMSO，溶于碱溶液

## 2 高效液相色谱法的建立

### 2.1 液相色谱条件

#### 2.1.1 色谱柱的选择

盐酸氨丙啉极性很强，在非极性反向色谱柱（如  $C_{18}$  柱）上保留弱，乙氧酰胺苯甲酯极性弱，在反向色谱柱上有保留，磺胺喹噁啉属于酸碱两性，在一定酸性条件下在反向色谱柱上有保留。试验先采用非极性  $C_{18}$  色谱柱，用高效液相色谱仪对 3 种药物混合标准溶液进行了测定，见图 2。从图 2 可以看出，盐酸氨丙啉在  $C_{18}$  柱上的保留时间很短，在 2.6 min 出峰，不利于目标物与杂质的分离；之后采用极性 HILIC 柱用超高效液相色谱仪对 3 种药物标准溶液进行了测定，见图 3，盐酸氨丙啉保留时间能达到约 5 min，但其他 2 种药物几乎不保留（保留时间小于 1 min）；随之采用了具有一定极性的氨基柱对 3 种药物进行分离，见图 4，3 种药物的分离和保留时间虽



优于以上两种柱子，但乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的保留时间仍在 3 min ~ 4 min，同样不利于目标物与杂质的分离，所以未被采用。以上试验结果表明：对于极性差异大的 3 种化合物，简单采用非极性或极性色谱柱都无法达到良好保留和分离效果。在参考相关文献基础上，试验选择含有离子对试剂的流动相，利用氨丙啉和离子对试剂的相互作用，改变氨丙啉在非极性色谱柱上的保留性质，使氨丙啉在非极性色谱柱上的有较好保留，实现 3 种药物在 C<sub>18</sub> 柱上均有良好保留和分离。

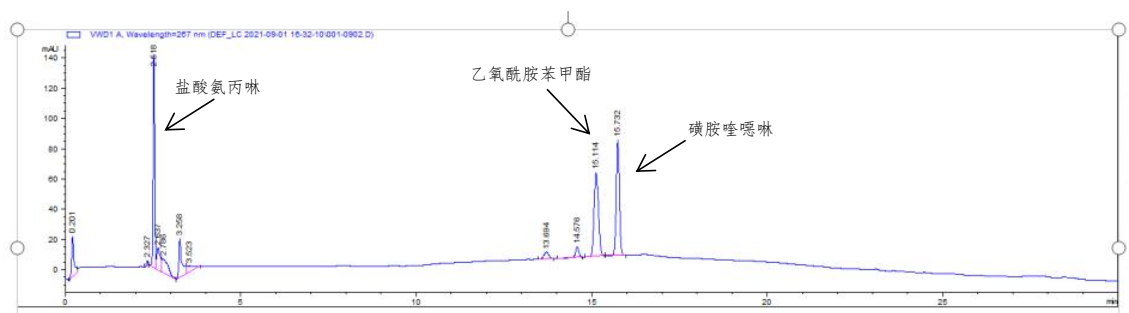


图 2 C<sub>18</sub> 色谱柱上 3 种药物的分离  
(waters 公司的 XBrigde C<sub>18</sub> 柱, 4.6×250mm, 5μm)

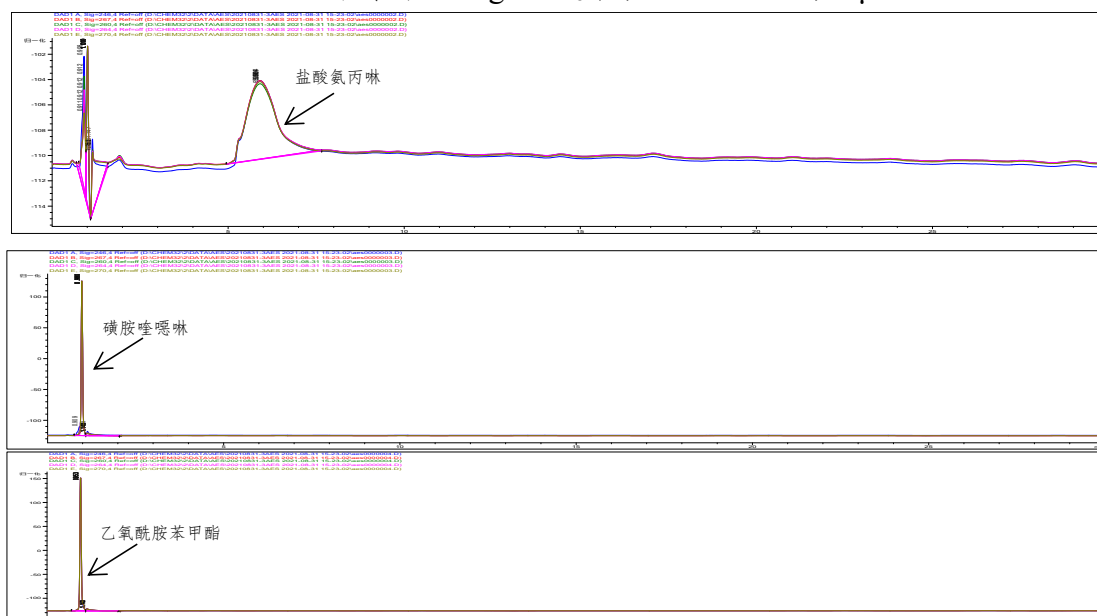


图 3 HILIC 色谱柱上 3 种药物的分离  
(Agilent 公司的 HILIC 柱, 2.1×100mm, 1.7μm)

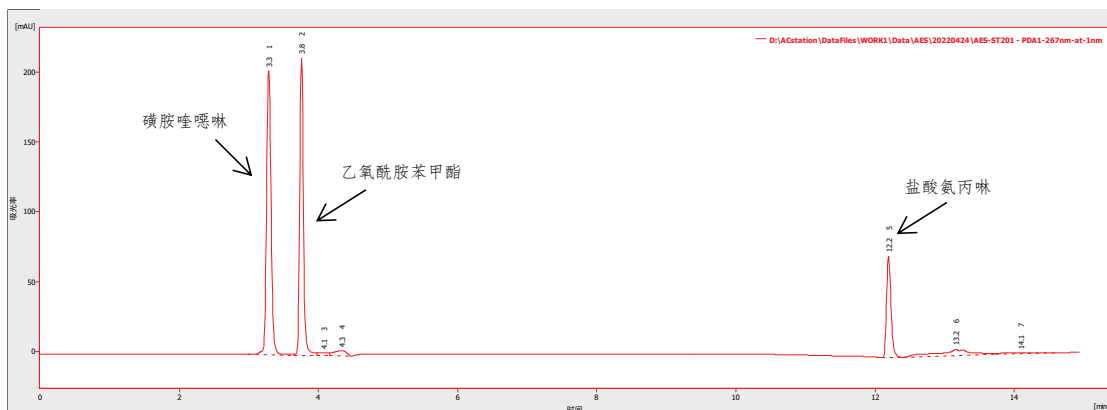


图4 氨基色谱柱上3种药物的分离  
(Agilent公司的ZORBAX NH<sub>2</sub>柱, 4.6×250mm, 5μm)

### 2.1.2 流动相的确定

在确定使用含离子对试剂的流动相后，对离子对试剂进行了筛选。经查阅，中国兽药典中离子对试剂采用庚烷磺酸钠，GB/T 8381.11-2005中采用十二烷基磺酸钠。虽然庚烷磺酸钠、己烷磺酸钠和十二烷基磺酸钠都是常用的离子对试剂，但十二烷基磺酸钠保留过强，庚烷磺酸钠保留能力适中，所以最终采用庚烷磺酸钠作为离子对试剂。流动相组成参考中国兽药典（2020版），采用梯度洗脱程序方式，通过对流动相梯度洗脱程序的优化，使3种化合物在C<sub>18</sub>柱上具有良好保留和分离，见图5。

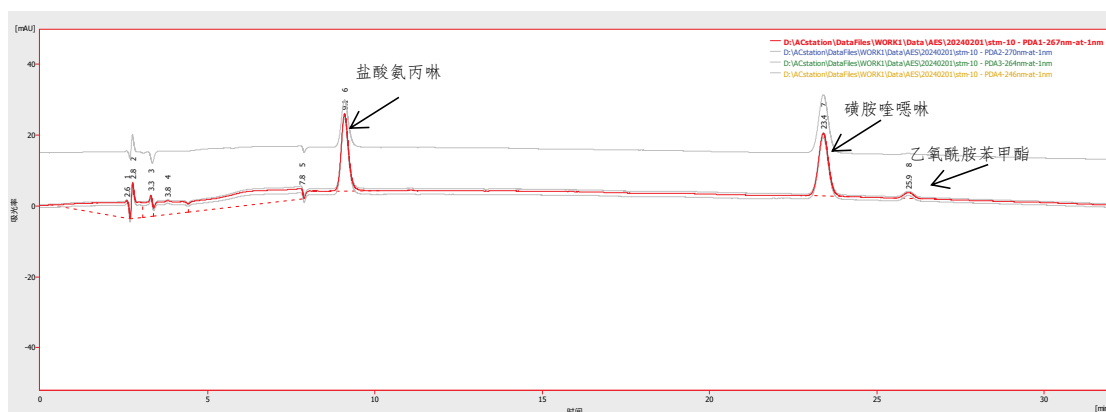


图5 离子对试剂流动相条件下3种药物的分离

### 2.1.3 检测器和检测波长的确定

3种药物均具有紫外吸收特性，在饲料和畜产品中测定方法标准或文

献中 3 种药物的紫外检测器测定波长见表 5。

表 5 紫外检测器的测定波长

样品基质	盐酸氨丙啉	乙氧酰胺苯甲酯	磺胺喹噁啉	文献来源
饲料	/	/	240 nm	GB/T 8381.10-2005
鸡组织	246 nm	/	/	徐世新 (1999)
饲料	/	/	246 nm	GB/T 19542-2007
原料药	254 nm	/	/	《中国兽药典》(2020 版) 中盐酸氨丙啉
预混剂	260 nm	260 nm	260 nm	王宏刚 (1999)
原料药	260 nm	260 nm	260 nm	《中国兽药典》(2020 版) 中盐酸氨丙啉乙氧酰胺苯甲酯磺胺喹噁啉预混剂
饲料	264 nm	/	/	欧盟 1999/27/EC, David (2004)
饲料	267 nm	/	/	GB/T 8381.11-2005, 李丹 (2019)
预混剂	267 nm	267 nm	/	《中国兽药典》(2020 版) 中盐酸氨丙啉乙氧酰胺苯甲酯预混剂
原料药	/	268 nm	/	《中国兽药典》(2020 版) 中乙氧酰胺苯甲酯
动物组织	/	/	268 nm	SN/T 5140-2019
动物组织	/	270 nm	/	GB 31660.9-2019, 徐士新 (1999)
饲料、鸡蛋	/	/	270 nm	农业部 1486 号公告-7-2010, 农业部 1025 号公告-15-2008
鸡肉	270 nm	270 nm	270 nm	吴秋侠 (2007)

试验用甲醇配制了 10  $\mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉、10  $\mu\text{g/mL}$  乙氧酰胺苯甲酯和 10  $\mu\text{g/mL}$  磺胺喹噁啉三种单标溶液, 用紫外可见分光光度计对 3 种药物进行波长扫描, 扫描范围为 200 nm~450 nm, 扫描结果见图 6, 三种化合物的紫外吸收峰值见表 6。

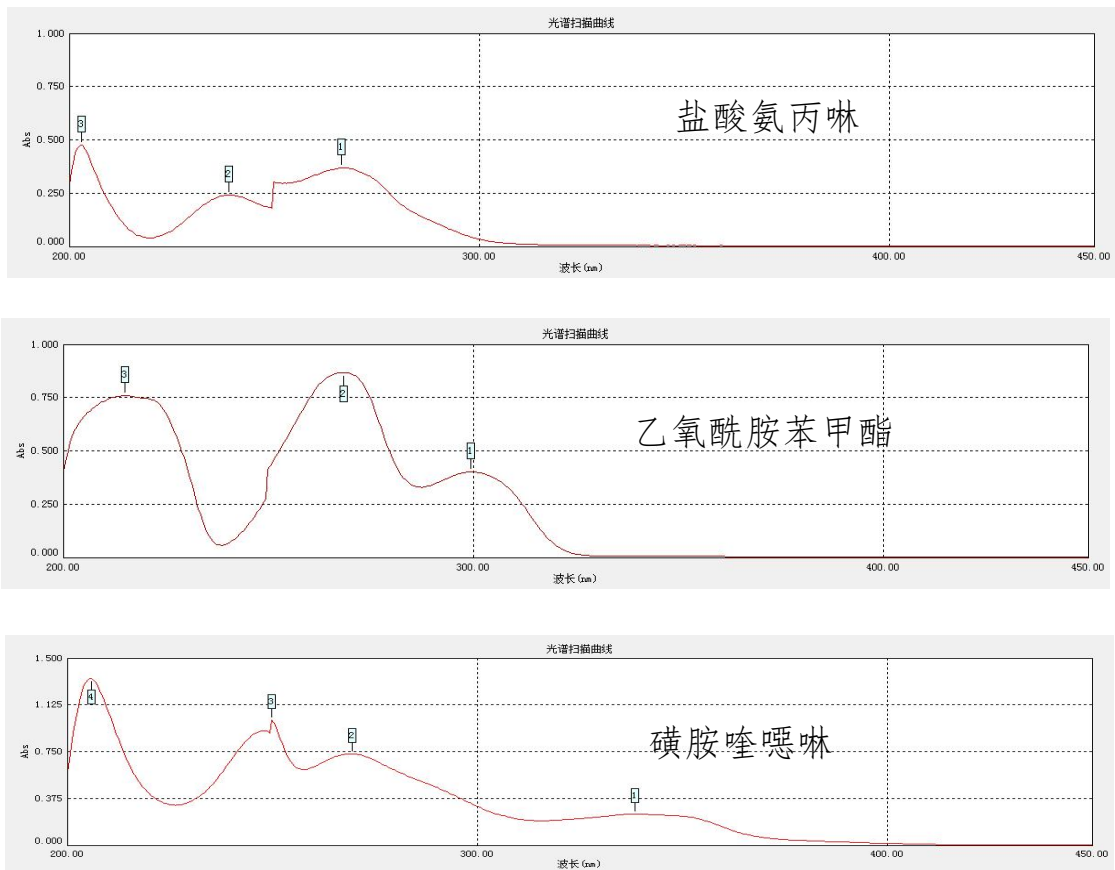


图 6 3 种药物的紫外扫描图

表 6 3 种药物紫外吸收峰值

序号	盐酸氨丙啉		乙氧酰胺苯甲酯		磺胺喹噁啉	
	波长(nm)	吸光度	波长(nm)	吸光度	波长(nm)	吸光度
1	/	/	299.50	0.403	338.50	0.251
2	266.50	0.370	268.50	0.872	269.50	0.736
3	239.00	0.242	/	/	252.00	1.008
4	203.00	0.478	215.00	0.763	206.00	1.343

根据紫外扫描结果和有关参考文献，使用高效液相色谱仪比较了 246 nm，264 nm，267 nm 和 270 nm 等 4 个波长下 3 种药物混标溶液的紫外吸收，测定结果见图 5。从图 5 可以看出，3 种药物在 4 个波长下的响应虽有差异，但差距不大，264 nm、267 nm 和 270 nm 下响应基本一致，246 nm

稍低。在后续考察配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料空白料过程中发现盐酸氨丙啉和磺胺喹噁啉在 267nm 波长下色谱图上杂峰少、干扰小，所以本标准选择 267 nm 作为盐酸氨丙啉和磺胺喹噁啉的测定波长。乙氧酰胺苯甲酯是 3 种药物配伍使用时含量最低，比其他 2 种药物低一个数量级以上，在紫外检测器上响应值明显低于其他 2 种化合物。为保证 3 种不同含量药物同步检测精密度和准确度一致性，试验利用乙氧酰胺苯甲酯的荧光特性，在紫外检测器后串联荧光检测器方式，前者用于盐酸氨丙啉和磺胺喹噁啉的测定，后者用于乙氧酰胺苯甲酯的测定。在已确定的色谱条件下，盐酸氨丙啉和磺胺喹噁啉先出峰，乙氧酰胺苯甲酯最后出峰，这也使 2 个检测器串接测定方式方便易行，见图 7。

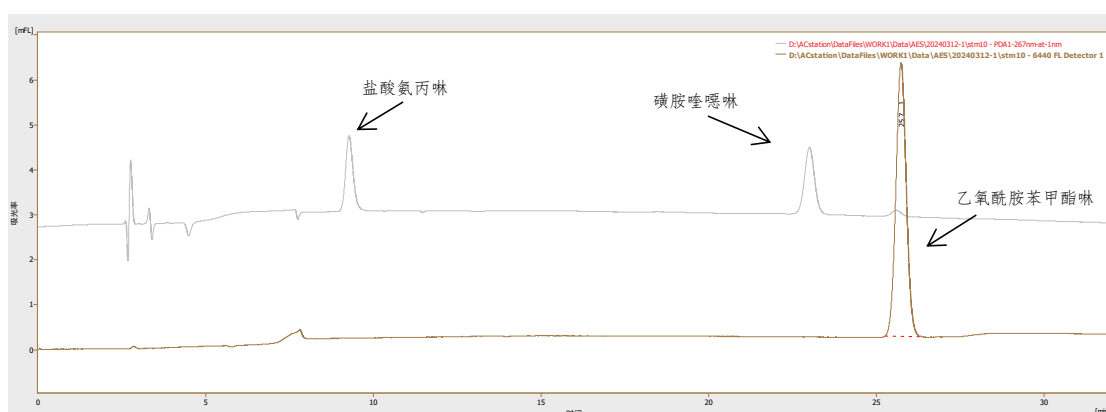


图 7 紫外检测器和荧光检测器串联条件下  
3 种药物（浓度 10  $\mu\text{g/mL}$ ）的分离

## 2.2 提取方法的确定

查阅相关标准及文献，饲料中 3 种药物大多数采用甲醇和水混合溶液进行提取。试验配制甲醇+水=1+4、甲醇+水=1+2、甲醇+水=1+1、甲醇+水=2+1、甲醇+水=4+1 等 5 种不同比例的甲醇和水混合溶液作为提取溶液，对添加 3 种药物的蛋鸡配合饲料超声提取 30 min，过膜后用液相色谱测定，

考察不同提取溶剂的提取效果，结果见表 7。

表 7 不同提取溶液的提取效率比较

单位：%

提取溶剂	甲醇+水 =1+4	甲醇+水 =1+2	甲醇+水 =1+1	甲醇+水 =2+1	甲醇+水 =4+1
盐酸氨丙啉	79.7	86.4	93.2	97.1	98.1
乙氧酰胺苯 甲酯	46.2	49.3	76.0	94.2	95.0
磺胺喹噁啉	16.5	19.6	24.7	94.0	89.7

从表 7 可以看出，甲醇+水=2+1 溶液和甲醇+水=4+1 溶液对于盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉提取效率好于其他比例提取试液，甲醇+水=2+1 溶液和甲醇+水=4+1 溶液对磺胺喹噁啉的提取效率差不多，综合考虑后，采用甲醇+水=4+1 溶液作为 3 种药物的提取溶液。在此基础上，比较了 1 次提取和 2 次提取的效果，结果表明盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯 1 次提取和 2 次提取效果差不多，磺胺喹噁啉 2 次提取比 1 次提取效率高，所以本标准采用甲醇+水=4+1 溶液作为提取溶液，并采用 2 次超声的提取方式。

### 2.3 净化方法的确定

对于三种化合物提取液的净化，早期文献中多采用极性固相萃取柱进行净化，如采用中性氧化铝柱去除极性杂质。随着固相萃取柱的发展，出现了许多不同极性的固相萃取柱，所以近年来的文献中多采用非极性固相萃取柱进行净化，如提取液经分取、吹干、转换溶剂后，用 HLB 柱进行净化。本试验分别比较了 PRiME HLB 柱、HLB 柱、WCX 柱和中性氧化铝柱的净化效果。

#### 2.3.1 PRiME HLB 柱净化效果比较

采用 Waters 公司和大连沈源检验检测咨询有限公司（简称沈源公司）生产的 PRiME HLB 3cc(60 mg) 柱，对添加 100 mg/kg 盐酸氨丙啉、5 mg/kg 乙氧酰胺苯甲酯和 60 mg/kg 磺胺喹噁啉的蛋鸡配合饲料的提取溶液进行净化，分别用 80% 甲醇和纯甲醇进行洗脱，回收率试验结果见表 8。

**表 8 PRiME HLB 柱添加回收率试验** 单位：%

PRiME HLB 柱	Waters 公司		沈源公司	
洗脱溶剂	80% 甲醇	甲醇	80% 甲醇	甲醇
盐酸氨丙啉	58.9	74.5	66.3	73.4
乙氧酰胺苯甲酯	71.7	76.0	62.4	72.9
磺胺喹噁啉	62.1	66.2	54.1	65.3

从表 8 可以看出，3 种化合物经 PRiME HLB 柱净化后，回收率在 58%~76%。由于回收率偏低，所以不采用 PRiME HLB 柱进行净化。

### 2.3.2 其他固相萃取柱净化效果比较

用 HLB 柱、WCX 柱和中性氧化铝柱，对添加盐酸氨丙啉和乙氧酰胺苯甲酯的蛋鸡配合饲料进行添加回收试验，结果表 9。

**表 9 HLB、MCX 和氧化铝柱添加回收率试验** 单位：%

固相萃取柱	Waters 公司 HLB 柱	华谱公司 HLB 柱	Waters 公司 WCX 柱	安捷伦公司中性 氧化铝柱
盐酸氨丙啉	86.6	86.8	81.4	98.7
乙氧酰胺苯甲酯	100.6	87.2	96.7	89.2
磺胺喹噁啉	88.9	83.3	46.9	40.5

从表 9 可以看出，HLB 柱对 3 种药物净化的添加回收率都能达检测方法要求；MCX 柱和中性氧化铝柱，盐酸氨丙啉和乙氧酰胺苯甲酯的添加回收率能达检测方法要求，但磺胺喹噁啉添加回收率低，达不到检测方法要

求，所以本标准采用 HLB 柱净化，不采用 WCX 柱和中性氧化铝柱净化。

### 2.3.3 上柱溶液 pH 值的确定

对于 HLB 柱的上柱溶液进行考察，添加回收试样的提取溶液经正己烷去杂、氮气吹至近干后，分别采用 pH2.8、pH6、pH7 和 pH 8.5 的磷酸缓冲溶液和 1%三氯乙酸进行溶解，过 HLB 柱后上机测定，结果见表 10。

表 10 HLB 柱不同上柱溶液的考察（回收率） 单位：%

上柱溶剂	磷酸缓冲溶液，pH 2.8	磷酸缓冲溶液，pH 6	磷酸缓冲溶液，pH 7	磷酸缓冲溶液，pH 8.5	1%三氯乙酸
盐酸氨丙啉	3.4	80.5	78.8	94.2	64.8
乙氧酰胺苯甲酯	78.3	84.9	78.4	84.7	80.8
磺胺喹噁啉	71.5	81.4	71.6	100.5	79.0

从表 10 可以看出，pH 8.5 的磷酸缓冲溶液溶解目标化合物效果最好，所以采用 pH8.5 的磷酸缓冲溶液作为上柱溶液。

### 2.3.4 淋洗和洗脱溶液考察

采用 3 种药物混合标准溶液过 HLB 柱，上柱量分别为盐酸氨丙啉 20 mg、乙氧酰胺苯甲酯 1 mg 和磺胺喹噁啉 12 mg，分别采用 10%甲醇、20%甲醇、30%甲醇、40%甲醇、50%甲醇、60%甲醇、70%甲醇、80%甲醇、90%甲醇和 100%甲醇各 3 mL 进行淋洗，收集流出液吹干后，液相色谱仪测定，上柱回收率见表 11。

表 11 淋洗和洗脱溶液考察

淋洗液	上柱回收率 (%)		
	盐酸氨丙啉	磺胺喹噁啉	乙氧酰胺苯甲酯
10%甲醇	0.0	0.0	0.0
20%甲醇	3.9	6.7	0.0
30%甲醇	12.6	4.5	0.0
40%甲醇	22.4	13.0	0.0



50%甲醇	39.8	58.6	0.0
60%甲醇	52.7	74.6	53.5
70%甲醇	74.1	84.8	82.8
80%甲醇	81.2	101.1	89.2
90%甲醇	86.4	93.4	90.6
甲醇	94.3	99.7	92.0

从表 11 看出，用 10% 甲醇淋洗，3 种化合物都能保留在柱上；随甲醇比例增加，3 种化合物洗脱量增加；80% 甲醇及以上能将大于 80% 的目标化合物洗脱下来。根据以上实验结果，本标准采用 3 mL 10% 甲醇为淋洗溶液，3 mL 甲醇为洗脱溶液。

### 2.3.5 过柱吹干后的溶解液比较

采用一定比例的庚烷磺酸钠溶液和甲醇混合溶液作为液相色谱测定前的溶解液，选择 2 种比例进行比较，一是庚烷磺酸钠溶液+甲醇=7+3，二是庚烷磺酸钠溶液+甲醇=5+5，对 3 个浓度标准混合溶液吹干后进行溶解、测定，回收率测定结果见表 12。

表 12 溶解液比较

待测物名称	待测物质量 (mg)	溶解效果 (回收率)	
		庚烷磺酸钠溶液+ 甲醇=7+3	庚烷磺酸钠溶液+ 甲醇=5+5
盐酸氨丙啉	20	99.3	109.7
	50	99.0	101.9
	100	100.1	103.3
磺胺喹噁啉	12	49.6	108.5
	30	37.0	99.0
	60	25.8	99.2
乙氧酰胺苯甲酯	1	97.6	107.6
	2.5	94.9	99.4
	5	98.0	103.4

表 12 说明，2 种溶解液都能很好地溶解盐酸氨丙啉和乙氧酰胺苯甲酯；而对于磺胺喹噁啉，庚烷磺酸钠溶液+甲醇=5+5 溶液溶解性好于庚烷磺酸钠溶液+甲醇=7+3，所以综合考虑后，采用庚烷磺酸钠溶液+甲醇=5+5 作为

液相色谱测定前溶解液。

### 2.3.6 柱容量试验

采用 7 个水平的 3 种药物上柱量，按 HLB 净化步骤操作，上柱量回收率结果见表。

表 13 柱容量试验

盐酸氨丙啉		磺胺喹噁啉		乙氧酰胺苯甲酯	
上柱量 (mg)	回收率 (%)	上柱量 (mg)	回收率 (%)	上柱量 (mg)	回收率 (%)
20	98.4	12	104.4	1	105
50	86.2	30	88.5	2.5	93.4
100	96.3	60	96.4	5	101.1
150	90.2	90	98.0	7.5	99
200	78.1	120	94.0	10	94.8
400	57.4	240	97.3	20	102.4
600	43.0	360	89.2	30	105.5

表 13 说明，盐酸氨丙啉上柱量在 20 mg~200 mg 时回收率大于 78%，400 mg、600 mg 上柱量回收率低于 80%；磺胺喹噁啉柱容量上柱量在 12 mg~360 mg 时回收率大于 88%，乙氧酰胺苯甲酯柱上柱量在 1 mg~30 mg 时回收率大于 93%。根据以上柱容量试验结果，确定配合饲料、浓缩饲料、精料补充料提取溶液上柱液体积为 5 mL，预混合饲料提取溶液的上柱液体积为 1mL。

## 2.4 标准溶液的稳定性

### 2.4.1 标准储备溶液

盐酸氨丙啉标准储备溶液 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙氧酰胺苯甲酯标准储备溶液 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和磺胺喹噁啉标准储备溶液 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，配制分装后存于  $-18^{\circ}\text{C}$  以下冰箱保存。配制当天为 0 天，在配制后第 7 天、第 14 天、1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、6 个月和 9 个月，分别将待测标准储备溶液用流动

相稀释后，以测定当日新配制的 3 种药物标准溶液测定待测标准储备溶液，测定结果见表 14。

**表 14 标准储备溶液稳定性考察**

药物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	第 1 次 (0 天)	第 2 次 (7 天)	第 3 次 (14 天)	第 4 次 (1 月)	第 5 次 (2 月)	第 6 次 (3 月)	第 7 次 (4 月)	第 8 次 (6 月)	第 9 次 (9 月)
盐酸氨丙啉	500	498	494	503	504	491	505	501	501
乙氧酰胺苯甲酯	500	499	502	501	503	504	502	499	499
磺胺喹噁啉	500	503	499	500	501	502	504	499	475

从表 14 看出，盐酸氨丙啉和乙氧酰胺苯甲酯标准储备溶液第 2 次~第 9 次的测定值与第 1 次测定值相比相对偏差均小于 5%；磺胺喹噁啉标准储备溶液第 2 次~第 8 次测定值与第 1 次测定值相比相对偏差小于 5%，第 9 次测定值与第 1 次测定值相比相对偏差大于 5%，根据以上数据， $-18^{\circ}\text{C}$  以下保存的  $500 \mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉标准储备溶液、 $500 \mu\text{g/mL}$  乙氧酰胺苯甲酯标准储备溶液有效期均为 9 个月， $500 \mu\text{g/mL}$  磺胺喹噁啉标准储备溶液有效期为 6 个月。

#### 2.4.2 标准中间溶液

盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉标准中间溶液，浓度均为  $100 \mu\text{g/mL}$ ，配制分装后存于  $-18^{\circ}\text{C}$  以下冰箱中保存。配制当天为 0 天，在配制后第 7 天、第 14 天、1 个月、2 个月、3 个月和 6 个月，分别将待测标准中间溶液用流动相稀释后，以测定当日新配制的 3 种药物标准溶液测定 3 种标准中间溶液，测定结果见表 15。

表 15 标准中间溶液稳定性考察

药物	浓度 (µg/mL)						
	第1次 (0天)	第2次 (7天)	第3次 (14天)	第4次 (1月)	第5次 (2月)	第6次 (3月)	第7次 (6月)
盐酸氨丙啉	100	99.5	99.7	97.0	98.6	98.7	94.3
乙氧酰胺苯甲酯	100	99.9	99.4	98.6	99.5	97.0	95.0
磺胺喹噁啉	100	100	99.5	97.9	98.1	97.0	93.1

从表 15 看出, 3 种药物标准中间溶液, 第 2 次~第 6 次测定值与第 1 次测定值相比相对偏差小于 5%, 第 7 次测定值与第 1 次测定值相比相对偏差大于 5%, 所以 3 种药物标准中间溶液有效期均为 3 个月。

高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法的标准储备溶液和标准中间溶液规定相同, 所以在液相色谱-串联质谱法的建立中不再赘述标准溶液稳定性考察。

## 2.5 方法性能考察

### 2.5.1 标准曲线线性范围

配制混合标准系列溶液, 在确定后的液相色谱条件下进行测定, 考察标准曲线线性范围, 结果见表 16, 色谱图见图 8, 线性曲线见图 9。

表 16 标准曲线线性范围

盐酸氨丙啉		乙氧酰胺苯甲酯		磺胺喹噁啉	
浓度 (µg/mL)	紫外检测器 峰面积	浓度 (µg/mL)	荧光检测器 峰面积	浓度 (µg/mL)	紫外检测器 峰面积
0.5	15.800	0.025	5.855	0.3	13.848
1	34.481	0.05	11.574	0.6	32.799
2	68.382	0.1	22.595	1.2	72.414
5	198.242	0.25	62.438	3	189.620
10	371.845	0.5	114.383	6	343.636

20	776.673	1.0	235.620	12	701.826
50	1982.178	2.5	606.884	30	1828.967
相关系数 r=0.9999		相关系数 r=0.9999		相关系数 r=0.9998	

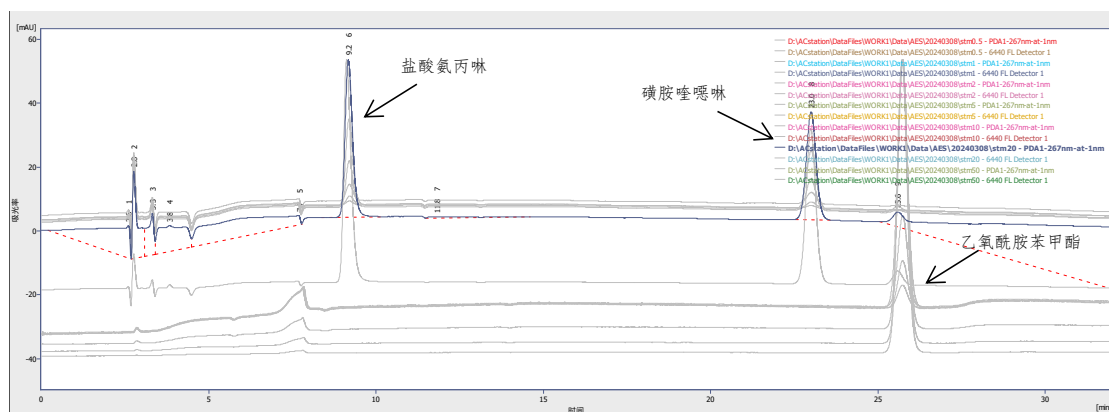
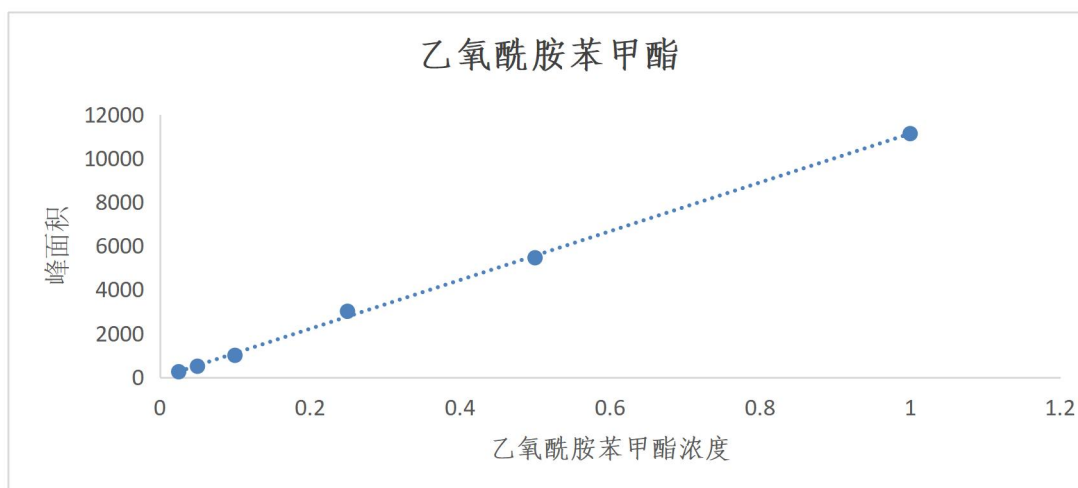
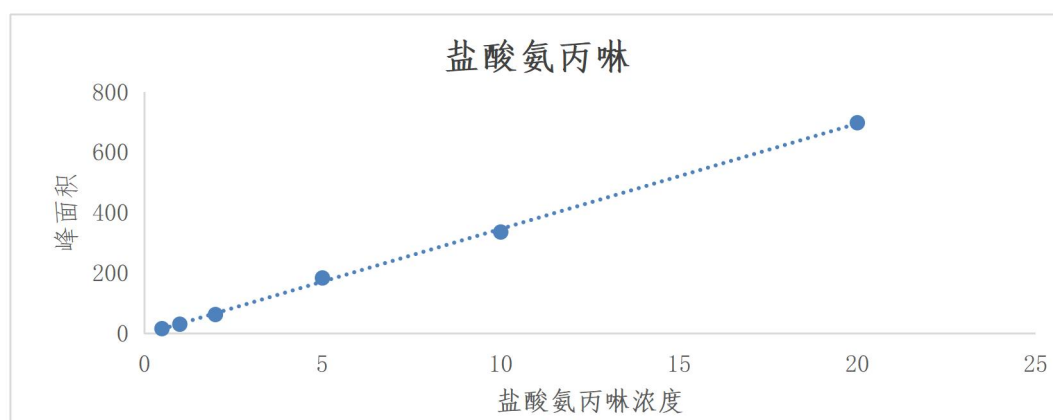


图 8 混合标准溶液（盐酸氨丙啉浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，乙氧酰胺苯甲酯 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  磺胺嘧啶 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）



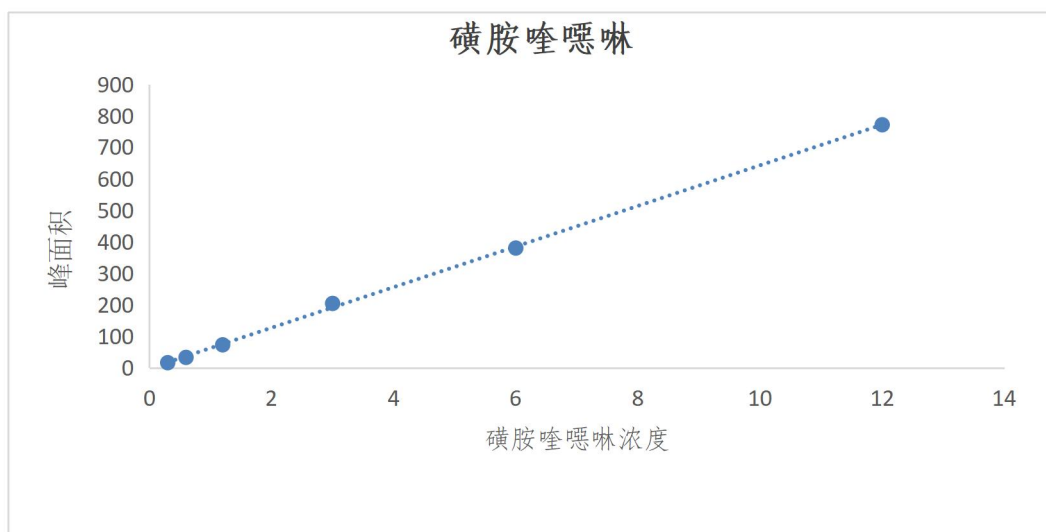


图9 3种药物的线性曲线

从表 16、图 8 和图 9 可以看出，3 种药物标准系列溶液的线性相关系数  $r$  均在 0.9990 以上，线性关系良好。

### 2.5.2 准确度和精密度

高效液相色谱方法主要用于对允许使用此 3 种药物的测定，考察方法准确度和精密度的添加回收试验，配合饲料中添加浓度以 246 号公告中规定的盐酸氨丙啉乙氧酰胺苯甲酯磺胺喹噁啉预混剂在饲料中的用量为基础，添加浓度为 0.5 倍使用剂量、1 倍使用剂量和 2 倍使用剂量。精料补充料以精粗比 4: 6 的产品、浓缩饲料以 25% 添加使用量的产品、添加剂预混合饲料以 5% 添加使用量的产品，进行折算后的浓度进行添加回收试验样品的制备。

4 种饲料基质的添加回收试验结果见表 17~表 20，空白样品和添加样品谱图见图 10~图 17。结果平均回收率在 82%~112% 之间，批内  $RSD \leq 11.0\%$ ，批间  $RSD \leq 11.8\%$ 。

表 17 蛋鸡配合饲料添加回收试验（高效液相色谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨丙啉	50	I	87.6	89.2	89.3	88.6	86.7	86.1	87.9	1.5	6.6
		II	87.9	87.8	83.9	84.1	82.1	84.8	85.1	2.7	
		III	97.5	97.1	85.6	100.0	100.2	98.0	96.4	5.6	
	100	I	92.6	93.2	91.0	90.7	90.5	90.4	91.4	1.3	5.6
		II	92.8	93.1	89.5	89.9	88.4	89.9	90.6	2.1	
		III	104.2	104.0	99.2	99.5	86.2	88.5	96.9	8.0	
	150	I	91.1	90.8	92.5	93.1	94.1	93.6	92.5	1.4	4.1
		II	92.2	92.1	92.8	91.7	92.8	92.9	92.4	0.5	
		III	98.1	99.5	101.1	101.3	101.8	99.7	100.3	1.4	
乙氧酰胺苯甲酯	2.5	I	109.8	97.8	107.1	107.2	113.1	113.2	108.0	5.3	7.3
		II	107.4	118.5	104.4	116.5	107.0	111.4	110.9	5.1	
		III	110.6	120.9	99.9	117.0	103.3	100.3	110.3	10.3	
	5	I	96.5	110.2	98.7	98.0	100.9	100.0	100.7	4.9	11.8
		II	108.8	101.4	116.0	111.9	116.2	102.4	109.5	5.9	
		III	85.0	85.0	87.6	87.4	80.3	82.0	84.6	3.4	
	7.5	I	100.8	98.4	104.5	104.2	102.9	102.4	102.2	2.2	7.2
		II	103.8	97.0	91.1	99.7	105.5	100.6	99.6	5.2	
		III	87.5	85.5	90.0	90.0	88.4	88.4	88.3	1.9	
磺胺喹噁啉	30	I	82.3	81.4	82.6	82.2	81.6	81.6	82.0	0.6	2.3
		II	83.8	83.5	84.4	84.4	83.8	85.8	84.3	1.0	
		III	87.9	87.0	82.8	84.0	82.8	87.0	85.3	2.7	
	60	I	89.4	87.2	84.9	85.0	85.4	85.7	86.3	2.0	11.2
		II	88.8	88.7	84.5	86.1	82.1	86.8	86.2	3.0	
		III	115.0	116.0	104.5	94.4	99.1	99.1	104.7	8.6	
	90	I	88.8	88.9	87.9	87.8	87.0	86.7	87.9	1.0	3.7
		II	91.2	91.0	89.6	85.0	84.8	85.7	87.9	3.5	
		III	97.7	90.5	88.8	84.3	84.0	86.7	88.7	5.7	

表 18 鸡浓缩饲料添加回收试验（高效液相色谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨丙啉	250	I	98.5	97.7	100.6	99.8	101.2	100.3	99.7	1.3	2.1
		II	99.6	98.8	100.6	99.8	105.5	104.6	101.5	2.8	
		III	101.9	101.0	99.9	98.5	98.3	97.4	99.5	1.7	
	500	I	100.3	94.4	99.6	90.6	98.0	104.5	97.9	5.0	5.5
		II	99.1	95.3	89.3	88.7	88.9	88.3	91.6	4.9	
		III	91.1	90.5	89.6	89.0	89.6	89.0	89.8	0.9	
	750	I	86.8	91.2	81.2	85.2	83.1	83.1	85.1	4.2	3.3
		II	86.8	86.2	91.2	90.6	88.9	88.3	88.7	2.3	
		III	84.9	84.3	89.0	88.4	86.0	85.4	86.3	2.2	
乙氧酰胺苯甲酯	12.5	I	113.9	103.2	90.8	83.5	94.1	86.3	95.3	12.0	7.7
		II	94.5	86.7	95.2	87.3	97.2	89.0	91.7	4.9	
		III	98.8	90.3	96.3	88.2	95.1	95.6	94.1	4.2	
	25	I	108.0	102.5	103.5	95.5	105.5	109.0	104.0	4.7	10.7
		II	109.0	107.5	89.4	88.8	94.6	83.4	95.5	11.0	
		III	91.8	81.1	93.1	82.1	90.8	80.3	86.5	6.9	
	37.5	I	82.1	85.0	86.7	81.9	85.0	82.9	83.9	2.3	6.6
		II	92.2	80.3	95.5	83.1	96.3	83.8	88.5	7.9	
		III	92.0	80.2	95.5	83.1	93.1	81.11	87.5	7.7	
磺胺喹噁啉	150	I	91.6	92.2	98.2	94.3	95.4	96.1	94.6	2.6	6.3
		II	87.3	87.9	83.9	90.5	85.0	84.4	86.5	2.9	
		III	96.2	96.9	103.1	99.1	100.2	99.6	99.2	2.5	
	300	I	89.8	84.2	88.2	80.7	86.2	85.3	85.7	3.7	5.8
		II	81.0	84.4	101.8	91.1	93.9	85.8	89.7	8.4	
		III	91.8	90.8	86.0	89.8	93.9	85.8	89.7	3.6	
	450	I	92.1	88.9	90.7	90.1	93.0	93.7	91.4	2.0	6.1
		II	86.4	85.8	83.0	83.6	82.0	84.8	84.3	2.0	
		III	96.7	83.4	95.3	84.6	97.7	98.4	92.7	7.4	



表 19 奶牛精料补充料添加回收试验（高效液相色谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨丙啉	250	I	99.9	86.0	92.7	91.5	105.7	104.8	96.8	8.2	9.9
		II	105.4	100.1	98.9	105.7	90.4	85.6	97.7	8.3	
		III	91.2	81.8	85.3	81.1	82.1	82.0	83.9	4.6	
	500	I	86.4	81.9	88.1	84.2	85.9	84.5	85.2	2.5	3.2
		II	87.8	90.3	88.6	92.6	86.1	90.9	89.4	2.6	
		III	90.5	86.5	88.2	85.8	88.7	84.1	87.3	2.6	
	750	I	81.2	84.4	97.0	85.7	82.0	86.6	86.2	6.6	6.6
		II	91.0	86.2	90.1	102.0	88.8	85.4	90.6	6.6	
		III	99.6	88.0	84.2	88.9	83.4	86.7	88.5	6.6	
乙氧酰胺苯甲酯	12.5	I	89.6	90.8	95.3	97.4	96.7	98.1	94.7	3.8	4.1
		II	93.6	92.4	93.0	91.0	86.7	85.6	90.4	3.8	
		III	87.0	88.1	92.5	94.5	93.9	95.2	91.9	3.8	
	25	I	89.6	83.8	96.0	90.7	95.6	90.9	91.1	4.9	4.6
		II	86.8	91.3	86.6	91.7	83.5	85.6	87.6	3.7	
		III	87.0	81.3	93.2	88.0	92.8	88.2	88.4	4.9	
	37.5	I	88.2	90.1	104.8	96.9	95.6	97.2	95.5	6.2	6.1
		II	92.8	91.3	92.6	100.0	86.1	84.2	91.2	6.1	
		III	85.6	87.5	101.6	94.1	92.8	94.4	92.7	6.1	
磺胺喹噁啉	150	I	94.2	91.2	88.3	92.7	83.8	94.7	90.8	4.6	7.0
		II	87.3	77.3	85.4	81.4	84.1	86.8	83.7	4.5	
		III	99.0	95.8	92.7	97.4	88.1	99.5	95.4	4.6	
	300	I	94.9	93.5	95.7	96.7	91.2	93.9	94.3	2.0	5.6
		II	93.9	86.6	84.1	89.1	88.2	86.1	88.0	3.8	
		III	99.7	98.2	100.5	101.5	95.8	98.7	99.1	2.0	
	450	I	93.9	90.7	92.2	89.3	90.1	91.4	91.3	1.8	1.7
		II	91.4	90.1	89.3	92.2	90.7	93.9	91.3	1.8	
		III	93.9	90.7	92.2	89.3	90.1	91.4	91.3	1.8	

表 20 鸡预混合饲料添加回收试验（高效液相色谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨基丙啉	1000	I	98.2	99.3	93.9	93.7	96.1	96.3	96.3	2.3	5.3
		II	85.7	91.0	93.9	89.5	100.3	87.9	91.4	5.7	
		III	102.5	99.9	94.3	94.5	95.8	84.9	95.3	6.3	
	2000	I	102.0	102.1	99.8	99.9	99.2	99.5	100.4	1.3	5.5
		II	100.0	104.2	101.9	97.8	95.0	94.9	99.0	3.8	
		III	97.7	95.3	80.8	94.9	97.3	106.2	95.4	8.6	
	3000	I	104.4	104.3	103.2	103.5	102.3	102.2	103.3	0.9	2.3
		II	100.2	101.6	99.0	98.0	99.5	100.8	99.9	1.3	
		III	99.4	98.1	99.2	97.6	100.2	104.4	99.8	2.4	
乙氧酰胺苯甲酯	50	I	109.9	111.6	108.9	105.0	109.9	105.7	108.5	2.4	4.3
		II	103.3	104.7	105.4	108.5	103.0	103.2	104.7	2.0	
		III	95.4	96.2	99.9	102.0	101.3	103.0	99.6	3.2	
	100	I	117.0	115.2	111.8	111.7	110.4	110.7	112.8	2.4	5.4
		II	105.0	106.6	103.2	101.4	103.5	107.3	104.5	2.1	
		III	103.9	96.6	98.0	99.	104.9	103.3	101.0	3.5	
	150	I	109.9	109.3	107.1	107.4	107.0	106.6	107.9	1.3	3.3
		II	106.5	107.0	103.7	105.1	104.7	103.2	105.0	1.4	
		III	98.4	100.2	99.4	100.2	101.3	103.1	100.4	1.6	
磺胺喹噁啉	600	I	92.7	93.0	90.6	90.9	92.5	93.0	92.1	1.2	3.2
		II	97.2	97.4	95.0	95.3	89.5	94.0	94.7	3.0	
		III	88.6	88.1	86.4	90.6	93.0	92.7	89.9	2.9	
	1200	I	96.2	96.1	93.6	93.8	96.8	96.5	95.5	1.5	3.1
		II	94.0	91.6	91.4	91.6	94.6	92.1	92.6	1.5	
		III	87.6	94.6	89.4	89.2	89.4	96.2	91.1	3.8	
	1800	I	102.1	101.5	99.2	99.1	99.2	98.7	100.0	1.4	4.5
		II	94.7	94.1	91.9	94.6	97.7	100.2	95.5	3.1	
		III	89.7	96.2	91.7	90.4	91.2	88.8	91.3	2.8	

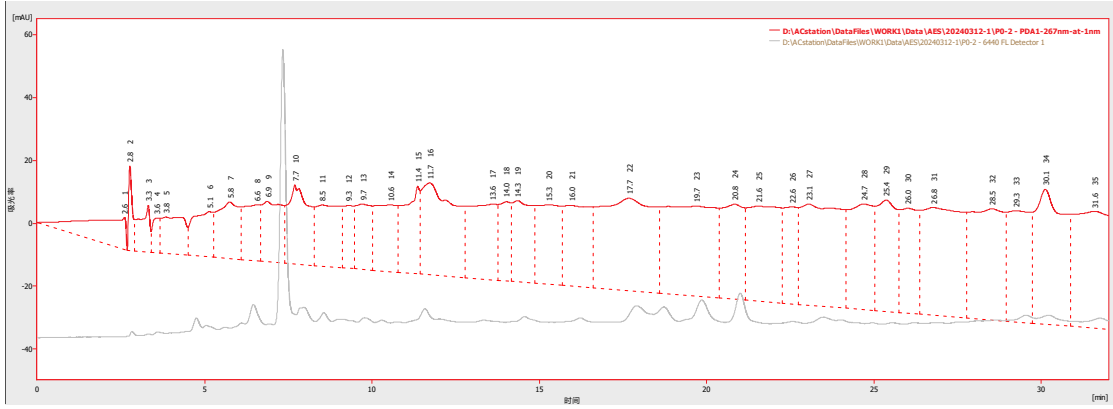


图 10 空白蛋鸡配合饲料

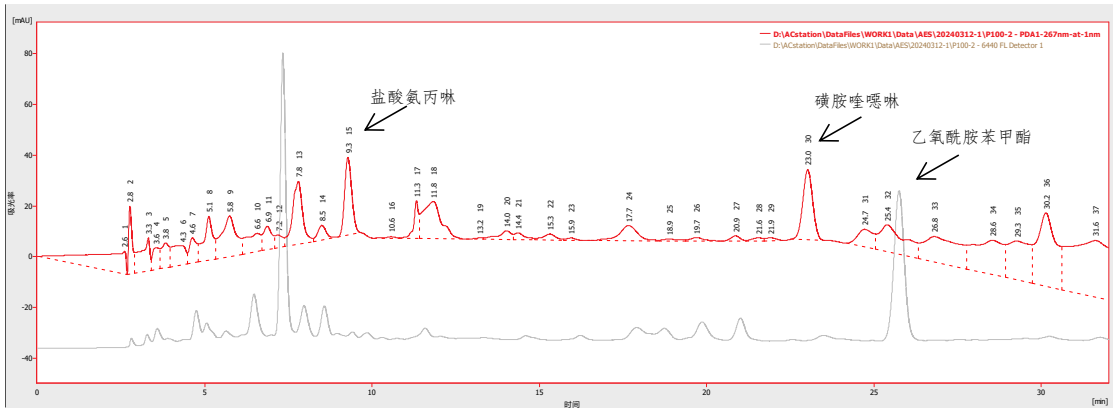


图 11 添加 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  盐酸氨基丙林 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  乙氧酰胺苯甲酯  
60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  磺胺喹噁啉的蛋鸡配合饲料

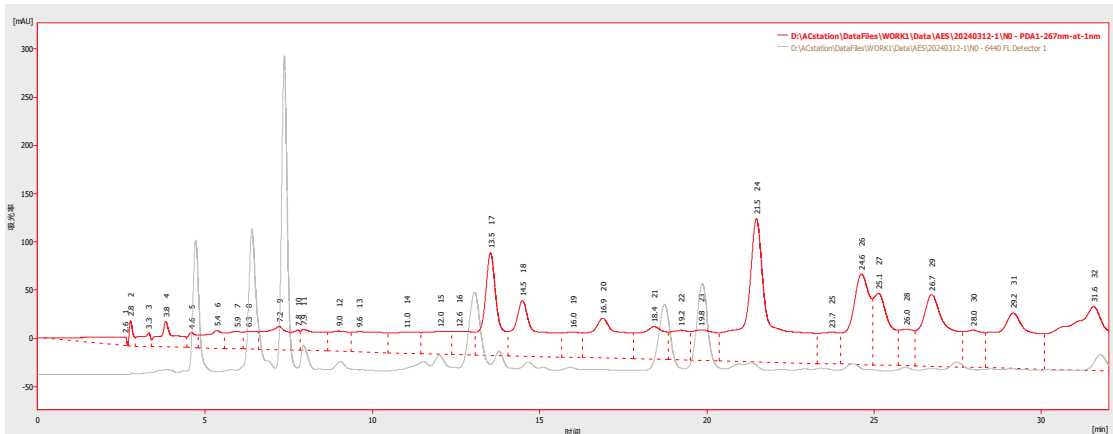


图 12 空白鸡浓缩饲料

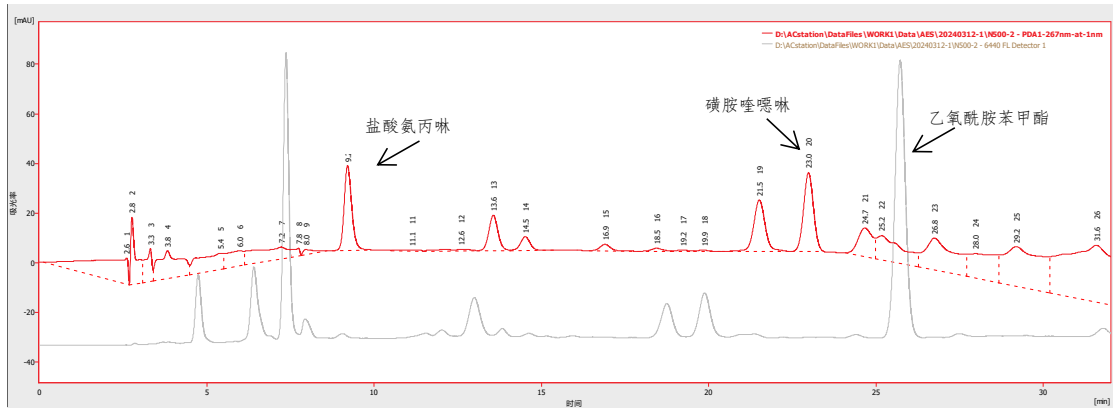


图 13 添加 500  $\mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉 25  $\mu\text{g/mL}$  乙氧酰胺苯甲酯  
300  $\mu\text{g/mL}$  磺胺喹噁啉的鸡浓缩饲料

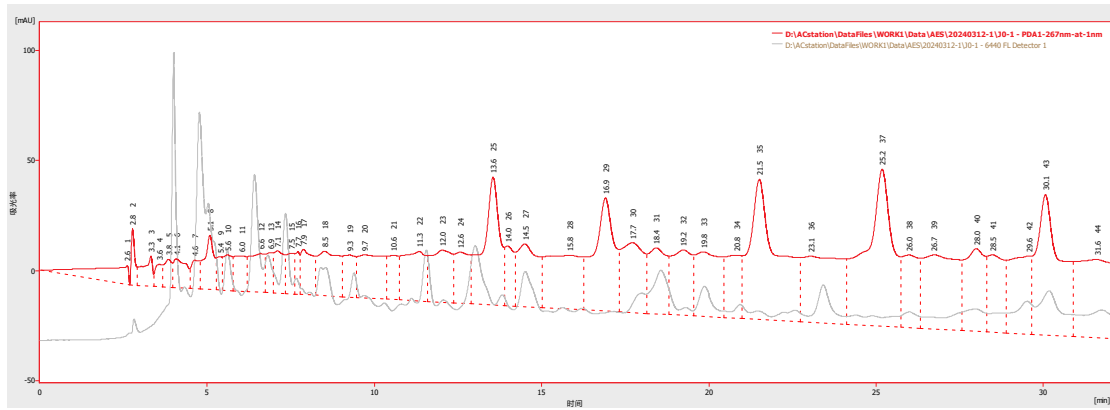


图 14 空白奶牛精料补充料

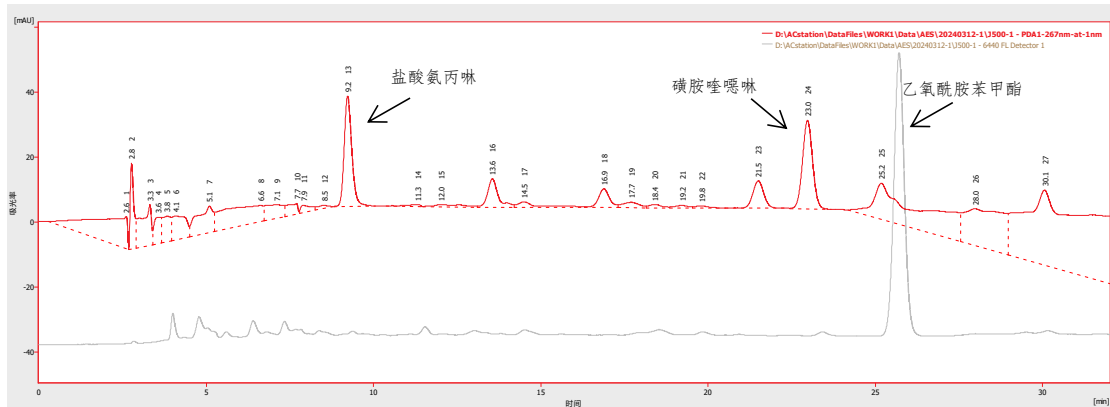


图 15 添加 500  $\mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉 25  $\mu\text{g/mL}$  乙氧酰胺苯甲酯  
300  $\mu\text{g/mL}$  磺胺喹噁啉的奶牛精料补充料

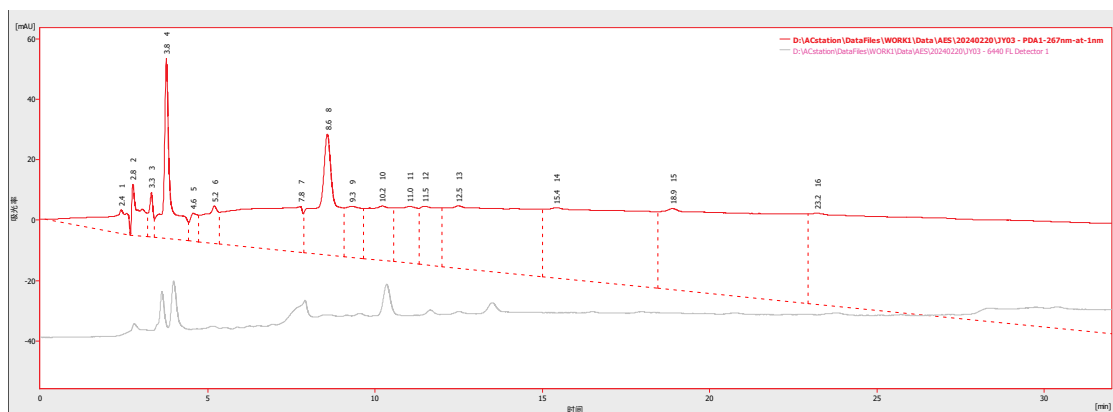


图 16 空白鸡预混合饲料

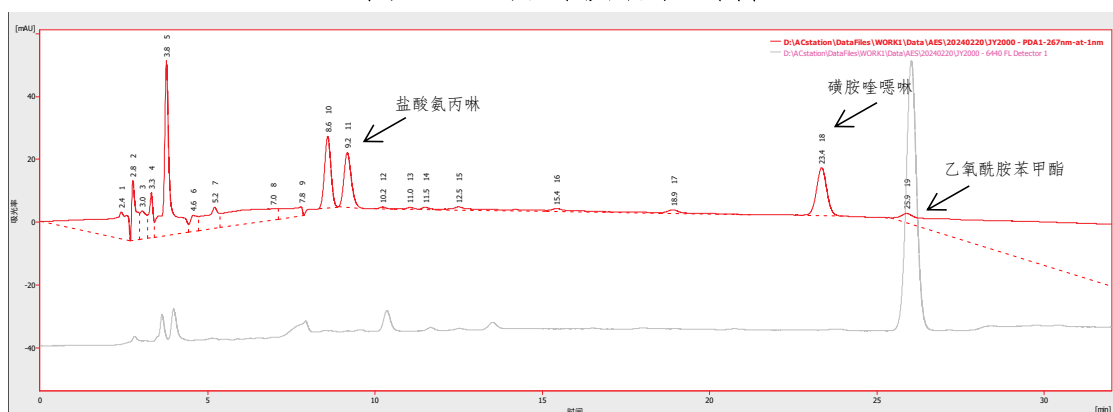


图 17 添加 2000  $\mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉 100  $\mu\text{g/mL}$  乙氧酰胺苯甲酯 1200  $\mu\text{g/mL}$  磺胺喹噁啉的鸡预混合饲料

### 2.5.3 检出限和定量限

在 4 种空白基质中添加一定量的盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉标准品，样品经前处理后，用 HPLC 进行测定，当检测样品中色谱峰的信噪比大于等于 3 时，添加盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的浓度即为检出限，试样中氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的峰的信噪比大于等于 10 时，添加盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的浓度即为定量限。该盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉高效液相色谱分析方法的检出限分别为 2 mg/kg、0.1 mg/kg 和 1.2 mg/kg，定量限分别为 5 mg/kg、0.25 mg/kg 和 3 mg/kg。4 种类型饲料基质的定量限添加回收结果见表 21。

表 21 定量限添加回收试验（高效液相色谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	样品	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸氨丙啉	5	蛋鸡配合饲料	81.2	83.0	82.4	84.7	77.4	83.7	82.1	3.1
		鸡浓缩饲料	93.9	90.7	95.2	94.4	96.3	95.8	94.4	2.1
		奶牛精料补充料	89.8	91.3	96.4	82.0	87.6	89.6	89.5	5.3
		鸡预混合饲料	90.2	88.5	85.7	93.1	89.2	94.3	90.2	3.5
乙氧酰胺苯甲酯	0.25	蛋鸡配合饲料	109.6	106.4	108.5	105.4	110.0	108.3	108.0	1.7
		鸡浓缩饲料	108.0	106.0	104.8	98.7	103.4	107.3	104.7	3.2
		奶牛精料补充料	97.2	102.8	106.8	97.9	103.7	100.6	101.5	3.6
		鸡预混合饲料	83.2	89.4	90.7	91.2	94.6	90.3	89.9	4.2
磺胺喹噁啉	3	蛋鸡配合饲料	84.5	100.3	93.4	87.4	78.7	89.0	88.9	8.4
		鸡浓缩饲料	78.3	63.2	66.9	72.1	86.6	85.2	75.4	12.7
		奶牛精料补充料	87.4	86.5	80.3	89.4	74.2	73.5	81.9	8.5
		鸡预混合饲料	84.3	87.1	89.5	89.1	93.4	90.6	89.0	3.5

### 3 液相色谱-串联质谱法的建立

#### 3.1 液相色谱-串联质谱条件

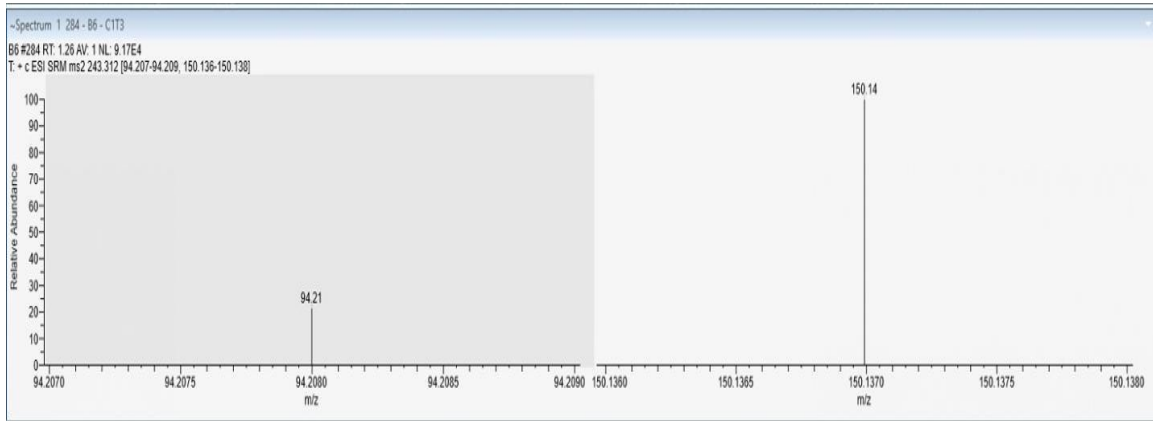
##### 3.1.1 质谱条件的选择和优化

配制 10  $\mu\text{g/mL}$  盐酸氨丙啉、磺胺喹噁啉和乙氧酰胺苯甲酯标准溶液，以微流量泵直接进质谱，进行质谱条件的优化，依据 3 种药物结构特点，选择 ESI<sup>+</sup>模式进行测定。氨丙啉通过一级全扫描质谱得到以[M-CI+H]<sup>+</sup>为母离子的 m/z 243.3，通过子离子扫描得到二级质谱，结果发现氨丙啉质谱图中 m/z 150.1 和 m/z 94.2 碎片离子强度较强，m/z 121.9 较弱，m/z 108.0 更弱，氨丙啉离子对选择 m/z 243.3/m/z 150.1 和 m/z 243.3/m/z 94.2。乙氧酰胺苯甲酯通过一级全扫描质谱得到母离子[M+H]<sup>+</sup>为 m/z 238.3，通过子离子

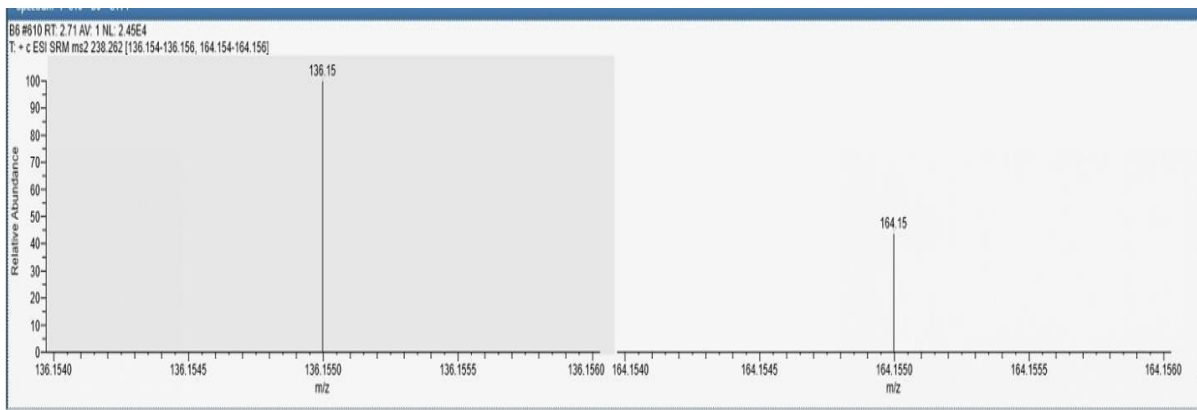
扫描得到二级质谱，其中  $m/z$  164.2 强度最强， $m/z$  136.2 次之、 $m/z$  206.2 再次之，乙氧酰胺苯甲酯离子对选择  $m/z$  238.3/ $m/z$  136.2 和  $m/z$  238.3/ $m/z$  164.2。磺胺喹噁啉通过一级全扫描质谱得到母离子 $[M+H]^+$ 为  $m/z$  301.2，通过子离子扫描得到二级质谱，其中  $m/z$  156.1 强度最强， $m/z$  108.1 次之，磺胺喹噁啉离子对选择  $m/z$  301.1/ $m/z$  156.1 和  $m/z$  301.1/ $m/z$  108.1。通过查阅相关标准和文献，氨丙啉离子对选择与 GB 31613.1-2021《食品安全国家标准 牛可食性组织中氨丙啉残留量的测定 液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法》、SN/T 4583-2016《出口动物源性食品中氨丙啉残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》和 SN/T 4812-2017《进出口食用动物氨丙啉药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》一致，磺胺喹噁啉离子对选择与 GB/T 21316-2007《动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》和农业部 1025 号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法一致，乙氧酰胺苯甲酯离子对选择与文献一致。优化后的 3 种化合物的监测离子对及碰撞能量见表 22，浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉标准溶液的碎片离子谱图见图 18。

**表 22 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的监测离子对及碰撞能量**

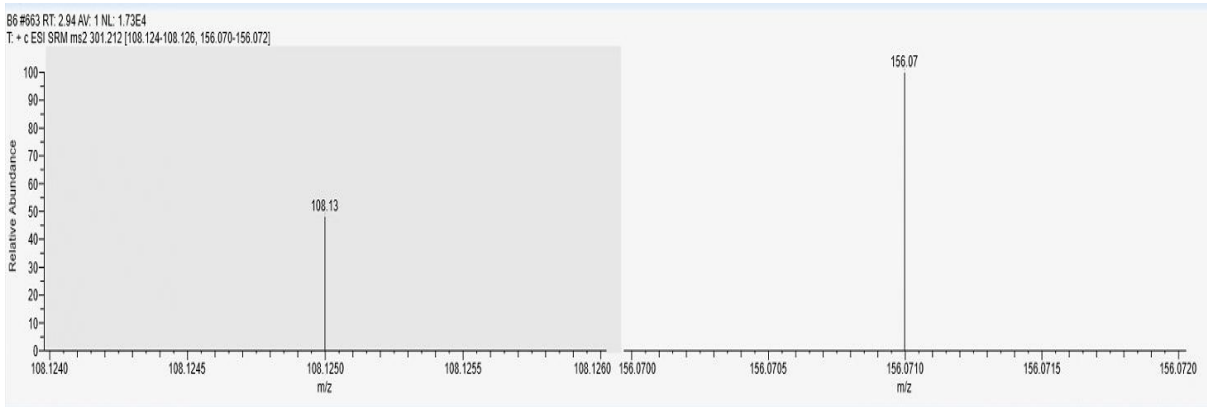
被测物名称	定性离子对 ( $m/z$ )	定量离子对 ( $m/z$ )	碰撞能量 (eV)
盐酸氨丙啉	243.3/150.1	243.3/150.1	15
	243.3/94.2		25
乙氧酰胺苯甲酯	238.3/136.2	238.3/136.2	35
	238.3/164.2		25
磺胺喹噁啉	301.2/156.1	301.2/156.1	11
	301.2/108.1		22



盐酸氨丙啉



乙氧酰胺苯甲酯



磺胺喹噁啉

图 18 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的离子碎片质谱图



### 3.1.2 色谱柱及流动相的选择

查阅标准和有关文献，大部分测定盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉 3 种化合物的标准和参考文献都采用了柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒度 2.7  $\mu\text{m}$  的  $\text{C}_{18}$  色谱柱，本方法同样选择了  $\text{C}_{18}$  柱。比较了 0.1%甲酸溶液-甲醇和 0.1%甲酸溶液-乙腈两种流动相下，三种化合物的分离度及色谱峰对称性。盐酸氨丙啉的极性较强，在 0.1%甲酸溶液-甲醇和 0.1%甲酸溶液-乙腈两种流动相下出峰快，乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉极性弱出峰时间相对较慢，当使用 0.1%甲酸溶液-甲醇作为流动相（洗脱程序见表 23，色谱图见图 19），甲醇比例从 40%~5%变化时，盐酸氨丙啉出峰时间稍有后延，峰形变宽，灵敏度下降，当甲醇为 25%、30%、35%和 40%时，由于出峰时间太快，实际样品测定时有基质效应，而甲醇为 5%、10%和 20%时，虽然基质效应减弱，但乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉峰形变差，灵敏度降低。而采用 0.1%甲酸溶液-乙腈两种流动相（洗脱程序见表 24，色谱图见图 20）时，既能克服 0.1%甲酸溶液-甲醇对盐酸氨丙啉的影响，又能确保乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉色谱峰的分离度及对称性。经过综合比较，本标准选择了 0.1%甲酸溶液-乙腈作为流动相。

表 23 0.1%甲酸溶液-甲醇流动相及洗脱程序

时间 (min)	A 相, %	B 相, %
0	70	30
2	70	30
8	40	60
9	5	95
11	5	95
12	70	30
14	70	30

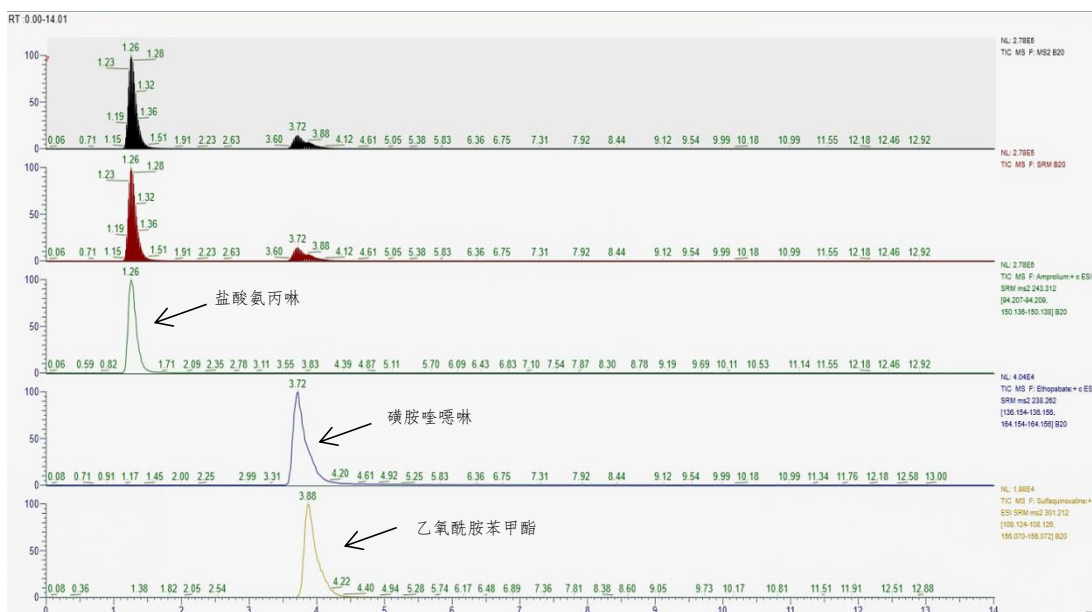


图 19 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉 3 种化合物  
(0.1%甲酸溶液-甲醇流动相)

表 24 0.1%甲酸溶液-乙腈流动相及洗脱程序

时间 (min)	A 相, %	B 相, %
0	70	30
2	70	30
3	5	95
4	5	95
4.1	70	30
6	70	30

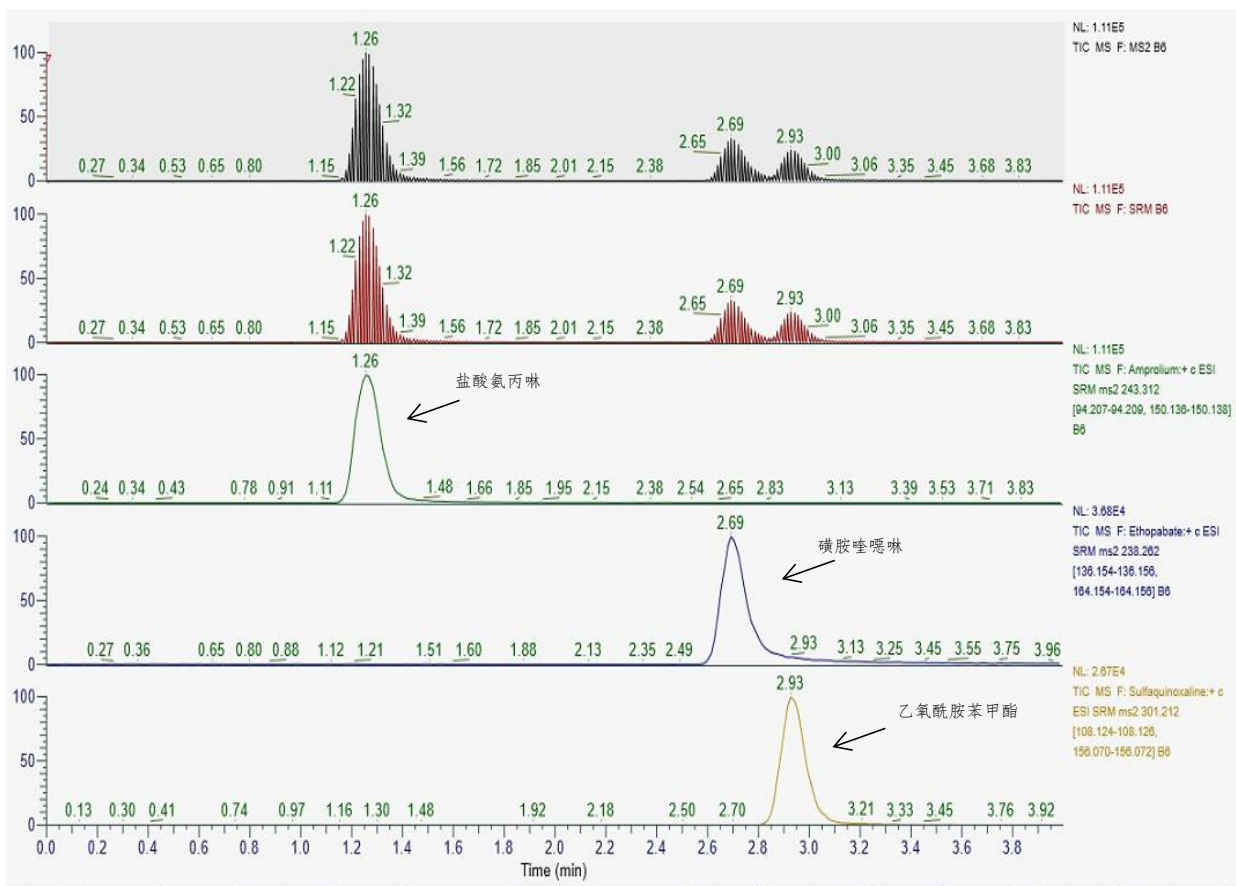


图 20 盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉 3 种化合物  
(0.1%甲酸溶液-乙腈流动相)

### 3.2 提取净化方法的确定

液质联用法，三种化合物提取和净化方法与高效液相色谱法相同，只是试样溶液净化后的定容体积并非液相色谱方法中的定容 1 mL，而采用 2 mL，取 2 mL 中的 1 mL 用于上机测定，剩余 1 mL 备用，若在测定中发现试样上机溶液浓度超出曲线范围需要重新处理试样上机溶液浓度时使用，这样做可避免从提取或净化步骤重新处理试样溶液和基质空白溶液，节省了工作量和时间，提高了工作效率。

### 3.3 标准溶液的稳定性

#### 3.3.1 标准储备溶液

同液相色谱法。

#### 3.3.2 混合标准中间溶液

盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉混合标准中间溶液，浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ，配制分装后存于 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱中保存。配制当天为 0 天，在配制后第 7 天、第 14 天、1 个月、2 个月、3 个月和 6 个月，分别将待测标准中间溶液用流动相稀释后，以测定当日新配制的 3 种药物标准溶液测定 3 种标准中间溶液，测定结果见表 25。

**表 25 混合标准中间溶液稳定性考察**

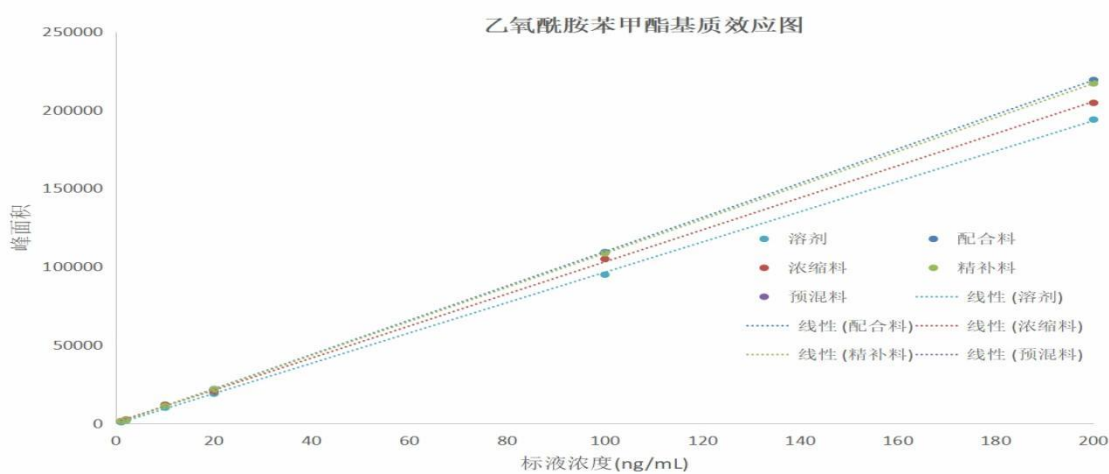
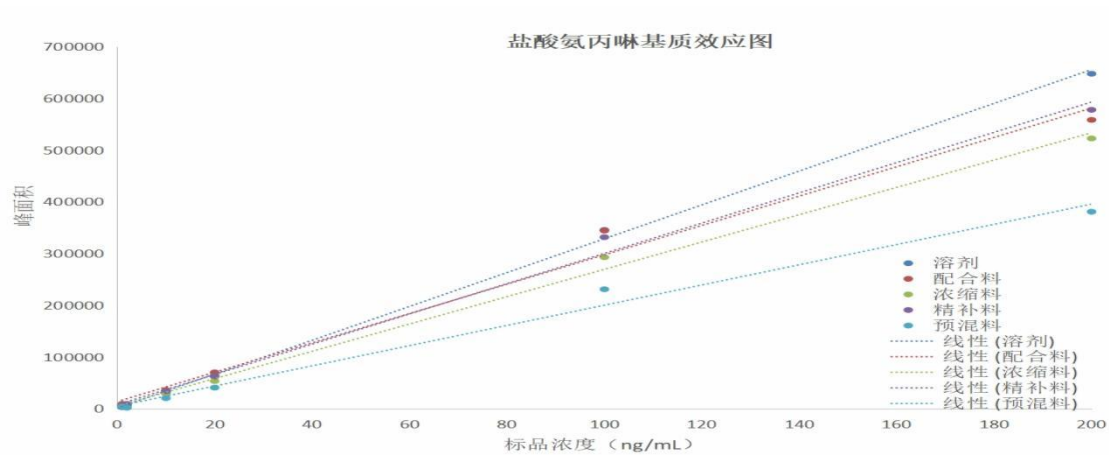
药物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	第 1 次 (0 天)	第 2 次 (7 天)	第 3 次 (14 天)	第 4 次 (1 月)	第 5 次 (2 月)	第 6 次 (3 月)	第 7 次 (6 月)
盐酸氨丙啉	100	100	100	100	97.5	95.9	94.8
乙氧酰胺苯甲酯	100	100	99.4	99.2	98.1	97.0	95.5
磺胺喹噁啉	100	100	99.5	99.5	97.6	96.6	95.7

从表 25 可以看出，3 种药物标准中间溶液，第 2 次~第 6 次测定值与第 1 次测定值相比相对偏差小于 5%，第 7 次测定值与第 1 次测定值相比，乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的相对偏差小于 5%，但盐酸氨丙啉相对偏差大于 5%，所以 3 种药物标准中间溶液有效期均为 3 个月。

### 3.4 基质效应的考察

由于不同种类饲料样品组成不同，且成分复杂。试验选取 4 种饲料样品（包括蛋鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、奶牛精料补充料和鸡预混合饲料）的空白样品，按 4.5.1 和 4.5.2 处理，得到基质空白溶液。分别准确移取混合标准系列溶液（4.2.11）各 1 mL 吹至近干，准确加入 1 mL 基质空白溶液，涡旋溶解，配制 4 组浓度分别为 1  $\text{ng/mL}$ 、2  $\text{ng/mL}$ 、10  $\text{ng/mL}$ 、20  $\text{ng/mL}$ 、100  $\text{ng/mL}$ 、200  $\text{ng/mL}$  的基质匹配混合标准系列溶液并与同浓度系列的混合标准系列溶液分别测定，得到 4 组曲线的回归方程，用基质匹配标准曲

线斜率除以标准曲线斜率的比值进行表征，当比值在 0.8~1.2 时基质干扰较小，相反基质效应较大。对 LC-MS/MS 检测盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉三种化合物时的基质效应进行考察，结果见图 21 和表 26。根据图 21 和表 26 的试验结果发现：4 种样品中盐酸氨丙啉基质效应最强，乙氧酰胺苯甲酯基质效应次之，磺胺喹噁啉基质效应最弱。考虑到样品基质对定量结果的影响和定量方法的通用性，本标准确定用基质匹配标准曲线进行定量。



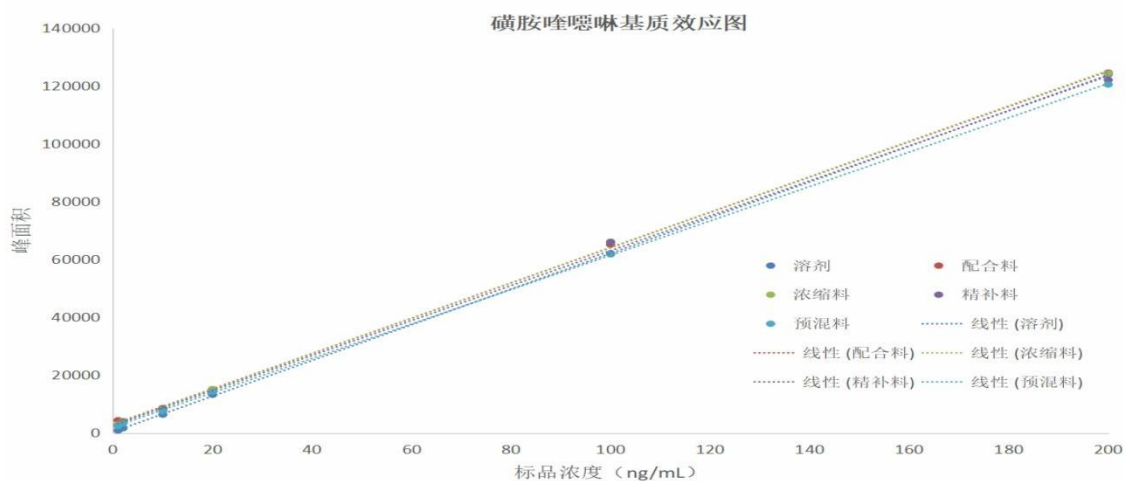


图 21 3 种化合物在四种饲料中的基质效应

表 26 基质匹配标准曲线斜率与外标曲线斜率比

参数	饲料基质	线性方程	相关系数 r	斜率比值	基质效应
盐酸丙咪	蛋鸡配合饲料	$Y_1=2728.2487X+12550.863$	$r_1 = 0.9972$	0.83	负效应
		$Y_2=3272.4864X+1437.1693$	$r_2 = 0.9994$		
	鸡浓缩饲料	$Y_1=2624.339X+3597.8504$	$r_1 = 0.9996$	0.80	负效应
		$Y_2=3272.4864X+1437.1693$	$r_2 = 0.9994$		
	奶牛精料补充料	$Y_1=2926.6076X+7723.2773$	$r_1 = 0.9976$	0.89	负效应
		$Y_2=3272.4864X+1437.1693$	$r_2 = 0.9994$		
	鸡预混合饲料	$Y_1=1901.2322X+2886.2785$	$r_1 = 0.9999$	0.58	负效应
		$Y_2=3272.4864X+1437.1693$	$r_2 = 0.9994$		
乙氧酰胺苯甲酯	蛋鸡配合饲料	$Y_1=1093.1068X+353.07452$	$r_1 = 1.0000$	1.13	正效应
		$Y_2=966.359845X-115.4714$	$r_2 = 0.9999$		
	鸡浓缩饲料	$Y_1= 1022.0581X+961.9405$	$r_1 = 0.9999$	1.06	正效应
		$Y_2=966.359845X-115.4714$	$r_2 = 0.9999$		
	奶牛精料补充料	$Y_1 = 1083.1681X+277.6690$	$r_1 = 1.0000$	1.12	正效应
		$Y_2=966.359845X-115.4714$	$r_2 = 0.9999$		
	鸡预混合饲料	$Y_1= 1018.1735X+219.3691$	$r_1 = 1.0000$	1.05	正效应
		$Y_2=966.359845X-115.4714$	$r_2 = 0.9999$		
磺胺	蛋鸡配合	$Y_1=609.88263X+3041.6805$	$r_1 = 0.9999$	0.99	负效应

喹噁啉	饲料	$Y_2=617.251331X+336.8845$	$r_2 = 1.0000$		
	鸡浓缩饲料	$Y_1=611.97544X+2901.1964$	$r_1 = 0.9998$	0.93	负效应
		$Y_2=617.251331X+336.8845$	$r_2 = 1.000$		
	奶牛精料补充料	$Y_1=603.94062X+2595.1288$	$r_1 = 0.9995$	0.99	负效应
		$Y_2=617.251331X+336.8845$	$r_2 = 1.0000$		
	鸡预混合饲料	$Y_1=593.94988X+2003.7816$	$r_1 = 1.0000$	0.96	负效应
$Y_2=617.251331X+336.8845$		$r_2 = 1.0000$			

### 3.5 方法性能考察

#### 3.5.1 标准曲线线性范围

在上述优化条件下，试验选取蛋鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、奶牛精料补充料和鸡预混合饲料空白样品，按 4.5.1 和 4.5.2 处理，得到基质空白溶液。分别准确移取混合标准系列溶液（4.2.11）各 1 mL 吹至近干，准确加入 1 mL 基质空白溶液，涡旋溶解，配制浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的基质匹配混合标准曲线，考察标准曲线线性范围，见表 27。三种化合物的线性相关系数 r 值在 0.9970~1.0000 之间，线性良好，符合检测要求。

表 27 3 种药物基质匹配混合标准曲线

待测物	蛋鸡配合饲料 基质匹配曲线		鸡浓缩饲料 基质匹配曲线		奶牛精料补充料 基质匹配曲线		鸡预混合饲料 基质匹配曲线	
	浓度 (ng/mL)	峰面积	浓度 (ng/mL)	峰面积	浓度 (ng/mL)	峰面积	浓度 (ng/mL)	峰面积
盐酸氨丙啉	1	9315	1	5071	1	6437	1	4844
	2	9142	2	7008	2	8886	2	5850
	10	36094	10	28968	10	33732	10	20408
	20	70335	20	53468	20	62082	20	40782
	100	316108	100	278332	100	331756	100	197622
	200	542818	200	522645	200	578007	200	380922

	a 值	2728.248724	a 值	2624.339032	a 值	2926.607616	a 值	1901.23222
	b 值	12550.86251	b 值	3597.850376	b 值	7723.277296	b 值	2886.278452
	r	0.9972	r	0.9996	r	0.9977	r	0.9999
乙氧酰胺苯甲酯	1	1323	1	1660	1	1590	1	1028
	2	2249	2	2606	2	2165	2	2338
	10	12029	10	11986	10	11189	10	10410
	20	22051	20	20357	20	21933	20	20010
	100	109364	100	104961	100	108554	100	103305
	200	219107	200	204547	200	216930	200	203277
	a 值	1093.106765	a 值	1022.058129	a 值	1083.168127	a 值	1018.173529
	b 值	353.0745234	b 值	961.9404968	b 值	277.6689775	b 值	219.3691508
	r	1.0000	r	0.9999	r	1.0000	r	1.0000
磺胺喹噁啉	1	4364	1	2964	1	2417	1	2350
	2	4089	2	4027	2	3741	2	3294
	10	8162	10	8636	10	8394	10	7428
	20	15087	20	15132	20	14243	20	14199
	100	65087	100	66133	100	65901	100	62099
	200	124552	200	124303	200	121987	200	120438
	a 值	609.8826331	a 值	611.9754399	a 值	603.9406217	a 值	593.9498806
	b 值	3041.680531	b 值	2901.196418	b 值	2595.128827	b 值	2003.781629
	r	0.9999	r	0.9998	r	0.9995	r	1.0000

### 3.5.2 检出限与定量限

在空白基质中添加一定量的盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉标准品，按 4.5.1 和 4.5.2 处理后，用 LC-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，添加盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的浓度即为检出限，试样中盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉的峰的信噪比大于等于 10 时，添加盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和



磺胺喹噁啉的浓度即为定量限。该盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯和磺胺喹噁啉分析方法对饲料的检出限分别为 0.02 mg/kg，定量限均为 0.05 mg/kg。4 种空白饲料的质谱图见图 22~图 25，方法检出限和定量限的信噪比见图 26~图 33。

### 3.5.3 准确度和精密度

液相色谱串联质谱方法主要用于对不允许使用此类药物的饲料产品的测定，考察方法准确度和精密度的添加回收试验浓度分别为 1 倍定量限、2 倍定量限和 10 倍定量限，按以上浓度制备添加回收试验样品，测定结果见表 28~表 31。结果平均回收率在 71%~118%之间，批内 RSD $\leq$ 19.1%，批间 RSD $\leq$ 14.8%。

表 28 蛋鸡配合饲料添加回收试验（液相色谱-串联质谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨丙啉	0.05	I	112.7	116.0	119.6	114.5	117.0	106.8	114.5	5.1	5.6
		II	109.0	111.5	118.6	118.0	103.7	108.1	111.5	6.6	
		III	118.3	118.0	104.4	102.5	116.3	106.0	110.9	6.6	
	0.1	I	103.7	116.0	107.8	109.6	114.5	109.3	110.2	4.1	3.9
		II	111.8	114.4	114.8	113.0	117.1	118.8	115.0	2.2	
		III	103.7	110.4	111.1	117.4	111.3	115.3	111.5	4.3	
	0.5	I	115.7	117.5	117.1	118.9	116.1	118.2	117.3	1.0	11.5
		II	107.7	104.6	116.1	110.6	118.6	105.7	110.5	5.2	
		III	115.0	80.4	117.8	116.3	74.8	111.3	102.6	19.1	
乙氧酰胺苯	0.05	I	98.5	103.1	93.2	114.4	104.9	111.6	104.3	7.6	5.5
		II	109.2	107.9	111.8	115.5	114.8	115.7	112.5	3.0	
		III	110.8	106.7	107.9	105.2	108.4	110.6	108.3	2.0	

甲酯	0.1	I	98.4	99.5	104.9	98.4	99.7	94.3	99.2	3.4	6.2
		II	108.0	115.9	116.6	110.0	115.0	108.7	112.4	3.4	
		III	101.8	109.9	107.0	103.4	109.4	100.5	105.3	3.8	
	0.5	I	101.3	95.5	102.5	102.7	94.3	97.1	98.9	3.8	10.8
		II	88.5	88.3	85.3	84.7	86.2	88.0	86.8	1.9	
		III	89.2	90.6	75.3	76.1	75.5	71.2	79.6	10.2	
磺胺喹噁啉	0.05	I	97.9	92.6	83.2	90.9	82.3	92.7	89.9	6.7	13.0
		II	119.0	118.0	112.6	118.9	107.1	111.0	114.4	4.3	
		III	87.6	86.4	98.5	85.9	88.5	97.1	90.7	6.2	
	0.1	I	88.5	85.1	87.1	87.1	91.7	83.5	87.2	3.3	8.9
		II	99.8	106.7	105.7	99.7	103.9	104.4	103.4	2.9	
		III	85.3	86.2	91.0	91.2	83.8	87.2	87.5	3.5	
	0.5	I	113.2	112.1	116.5	112.7	109.8	111.6	112.7	2.0	10.2
		II	98.0	101.6	97.4	99.8	98.9	97.9	98.9	1.6	
		III	104.6	112.2	98.1	95.3	71.2	102.0	97.2	14.4	

表 29 鸡浓缩饲料添加回收试验（液相色谱-串联质谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨丙啉	0.05	I	86.0	97.5	97.7	93.9	88.8	93.5	92.9	5.0	11.4
		II	116.4	115.1	113.5	117.7	113.8	113.0	114.9	1.6	
		III	88.4	91.8	93.5	86.0	106.8	100.4	94.5	8.2	
	0.1	I	102.2	108.0	105.1	104.6	103.7	106.1	105.0	1.9	5.3
		II	117.5	115.8	118.3	118.8	116.5	117.2	117.4	1.0	
		III	107.6	104.3	107.2	106.9	106.2	110.9	107.2	2.0	
	0.5	I	117.9	116.6	117.0	119.9	118.1	113.7	117.2	1.8	8.3
		II	111.3	94.6	97.5	98.6	92.3	97.4	98.6	6.7	
		III	114.0	113.6	106.4	110.7	110.1	114.8	111.6	2.8	
乙氧酰	0.05	I	114.2	115.0	119.2	112.7	110.0	113.8	114.2	2.6	3.9
		II	116.2	117.1	118.3	114.6	114.6	116.5	116.2	1.3	

胺苯甲酯	0.1	III	100.4	108.8	113.3	113.1	111.1	107.5	109.0	4.4	5.3	
		I	106.5	103.7	104.5	100.9	106.1	94.8	102.8	4.3		
		II	111.8	112.3	107.1	115.2	103.8	119.2	111.6	4.9		
	0.5	III	113.9	109.6	103.7	110.9	108.9	105.8	108.8	3.4	14.5	
		I	103.4	105.7	101.6	106.4	110.3	109.0	106.1	3.1		
		II	90.2	95.4	90.3	84.2	86.9	86.3	88.9	4.5		
	磺胺喹噁啉	0.05	III	86.1	79.6	85.9	80.7	57.6	83.1	78.8	13.6	12.6
			I	108.3	106.7	113.2	108.6	107.1	112.1	109.3	2.4	
			II	113.9	116.1	115.1	114.5	117.9	113.6	115.2	1.4	
0.1		III	75.1	85.2	93.0	95.7	98.5	80.5	88.0	10.5	7.4	
		I	93.8	96.7	92.8	94.1	94.6	96.5	94.8	1.6		
		II	111.4	97.8	101.8	111.4	97.8	101.8	103.7	6.0		
0.5		III	88.3	93.9	93.2	95.2	88.7	82.8	90.3	5.2	12.3	
		I	108.1	114.8	108.4	110.2	109.9	116.8	111.4	3.2		
		II	98.0	103.2	97.3	94.2	93.6	96.4	97.1	3.5		
		III	97.8	73.3	94.7	91.2	93.3	73.3	87.3	12.6		

表 30 奶牛精料补充饲料添加回收试验（液相色谱-串联质谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨基丙啉	0.05	I	81.5	88.5	85.0	77.5	86.0	87.3	84.3	4.8	14.1
		II	113.3	113.9	116.9	106.3	106.9	116.1	112.2	4.1	
		III	117.1	112.2	117.3	115.3	112.7	114.9	114.9	1.9	
	0.1	I	71.8	75.4	74.8	72.4	73.0	73.6	73.5	1.9	14.8
		II	94.6	106.6	99.1	106.2	101.4	102.5	101.7	4.5	
		III	93.2	100.8	97.5	99.1	100.4	103.9	99.1	3.6	
	0.5	I	119.2	119.9	118.7	118.7	118.7	116.2	118.5	1.1	4.4
		II	111.2	107.1	101.8	107.1	110.1	115.8	108.9	4.3	
		III	118.0	115.7	115.1	116.3	117.2	111.9	115.7	1.9	

乙氧酰胺苯甲酯	0.05	I	110.8	100.0	87.3	97.6	91.6	101.7	98.2	8.2	7.5
		II	106.4	95.7	96.5	99.4	101.6	102.3	100.3	4.0	
		III	105.2	105.0	116.5	101.6	105.2	117.4	108.5	6.2	
	0.1	I	78.4	79.4	82.5	84.0	80.0	79.6	80.6	2.6	4.7
		II	81.0	82.8	80.0	87.2	85.3	87.6	84.0	3.8	
		III	79.2	81.5	74.2	80.8	75.7	74.8	77.7	4.1	
	0.5	I	103.5	102.8	101.5	99.6	98.7	102.0	101.4	1.8	12.4
		II	83.2	85.4	81.8	83.0	82.7	84.6	83.5	1.6	
		III	76.7	75.3	76.1	79.3	76.8	76.3	76.8	1.8	
磺胺喹噁啉	0.05	I	103.1	96.5	98.4	100.2	93.6	103.0	99.2	3.8	4.7
		II	95.4	110.7	99.4	109.3	101.1	100.6	102.7	5.8	
		III	107.3	98.6	99.4	98.4	95.9	97.8	99.6	4.0	
	0.1	I	72.2	70.7	73.5	72.6	76.3	71.1	72.7	2.8	4.0
		II	72.2	79.1	74.1	73.2	75.7	76.0	75.0	3.3	
		III	66.9	71.1	75.8	76.0	77.8	76.0	73.9	5.6	
	0.5	I	116.1	114.3	113.7	116.8	114.5	115.2	115.1	1.0	9.1
		II	98.1	95.6	94.2	97.8	96.3	95.6	96.3	1.5	
		III	96.6	93.9	97.2	96.1	95.7	95.9	95.9	1.2	

表 31 鸡预混合饲料添加回收试验（液相色谱-串联质谱法）

目标物	添加浓度 (mg/kg)	测定批	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
盐酸氨基丙啉	0.05	I	86.9	81.7	82.3	86.4	89.6	83.5	85.1	3.6	13.0
		II	107.1	112.7	113.0	107.9	112.8	110.0	110.6	2.4	
		III	86.3	85.3	87.8	89.0	84.3	87.5	86.7	2.0	
	0.1	I	110.2	105.6	104.9	106.4	103.4	107.0	106.3	2.2	4.4
		II	119.9	114.3	113.1	111.6	113.9	112.4	114.2	2.6	
		III	103.0	102.5	109.1	111.6	114.4	111.2	108.6	4.5	
	0.5	I	119.2	119.9	118.7	118.7	118.7	116.2	118.5	1.1	5.0
		II	106.2	112.9	114.6	118.4	110.3	112.7	112.5	3.6	

		III	112.0	113.1	101.2	102.3	115.4	116.2	110.0	6.0	
乙氧酰胺苯甲酯	0.05	I	112.4	97.5	103.6	106.7	107.0	114.3	106.9	5.7	7.3
		II	115.2	115.7	117.2	114.5	111.0	118.1	115.3	2.1	
		III	97.0	104.0	96.9	103.0	96.9	97.3	99.2	3.4	
	0.1	I	105.4	105.2	108.2	111.2	105.7	103.6	106.5	2.6	4.1
		II	114.7	109.2	109.9	112.1	110.9	114.3	111.8	2.0	
		III	109.2	104.3	102.3	116.4	116.6	106.7	109.2	5.6	
	0.5	I	107.7	105.7	108.0	108.1	111.3	110.5	108.5	1.9	15.2
		II	85.2	88.1	89.4	89.3	89.9	89.9	88.7	2.0	
		III	78.3	75.2	76.8	77.1	73.9	75.0	76.0	2.2	
磺胺喹噁啉	0.05	I	102.9	100.9	97.4	104.4	96.2	103.1	100.8	3.3	11.7
		II	117.3	117.2	106.1	106.9	104.4	114.8	111.1	5.4	
		III	90.5	85.8	81.1	83.5	83.2	89.2	85.5	4.3	
	0.1	I	89.9	90.7	95.7	93.0	88.3	92.2	91.6	2.8	7.3
		II	97.7	101.8	102.9	96.6	100.8	105.2	100.8	3.2	
		III	80.2	85.4	86.0	97.6	96.5	86.6	88.7	7.7	
	0.5	I	119.4	111.8	116.9	119.4	117.7	118.5	117.3	2.4	13.0
		II	99.7	99.0	99.9	99.1	99.4	99.5	99.4	0.3	
		III	87.1	85.9	86.6	86.7	85.7	85.6	86.3	0.7	

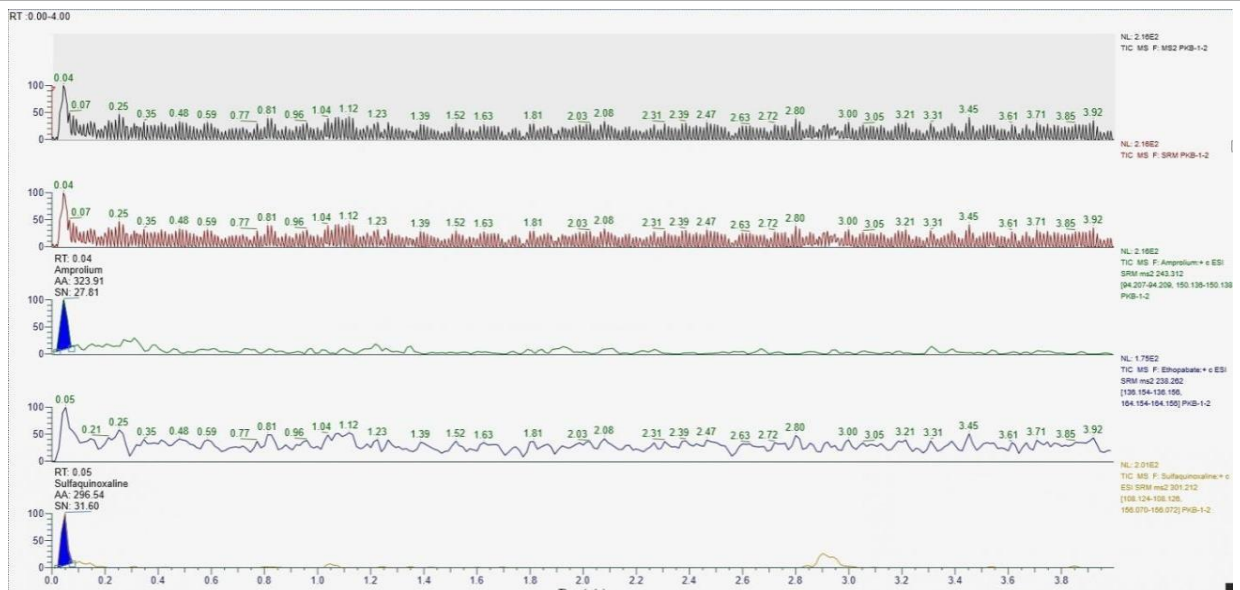


图 22 空白蛋鸡配合饲料质谱图

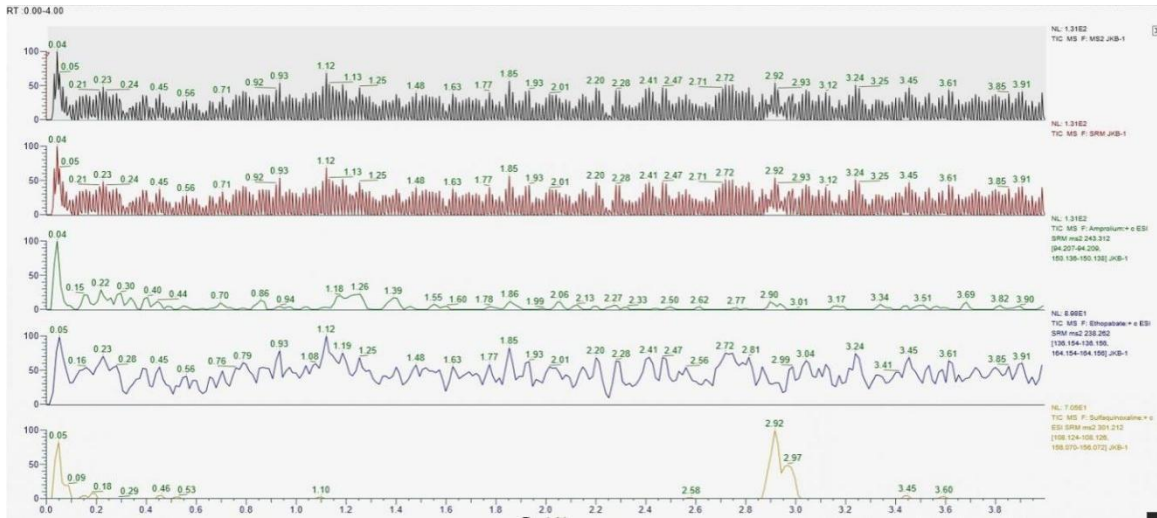


图 23 空白鸡浓缩饲料质谱图

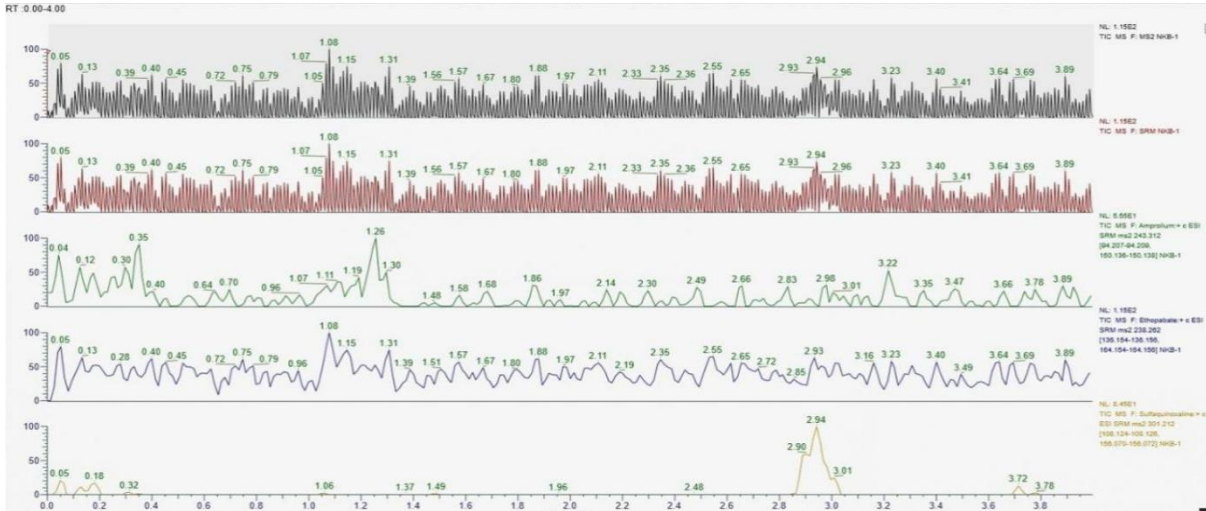


图 24 空白奶牛精料补充料质谱图

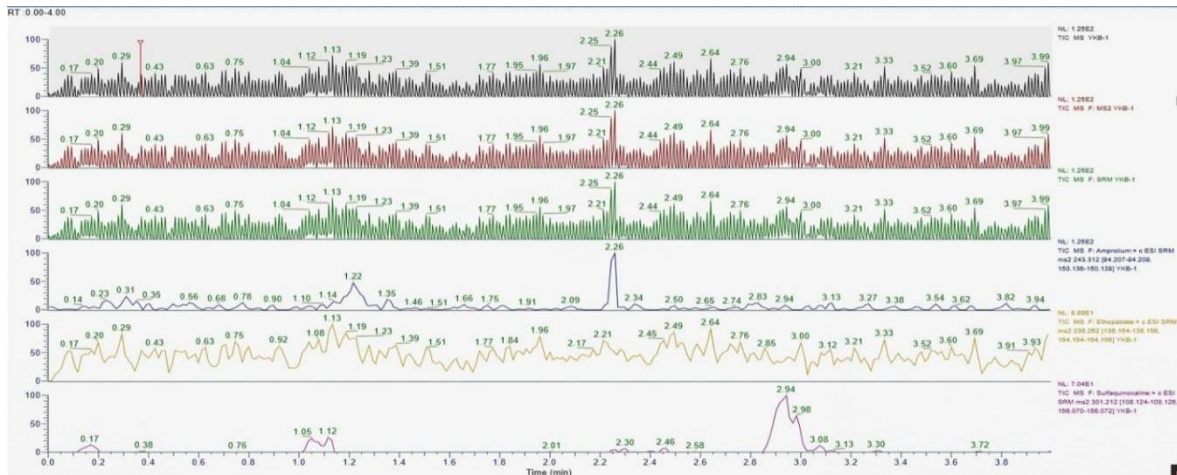


图 25 空白鸡预混合饲料

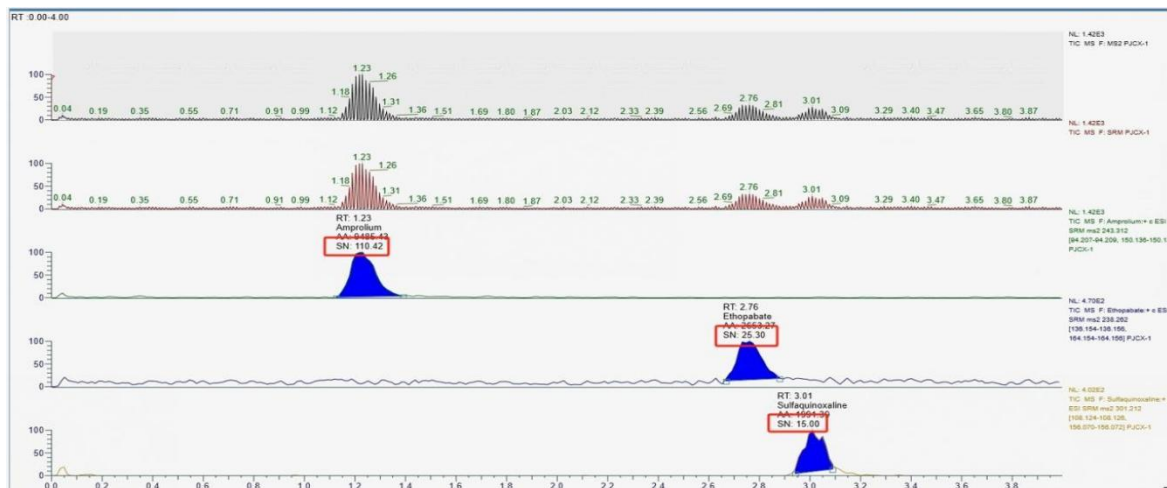


图 26 蛋鸡配合饲料检出限信噪比

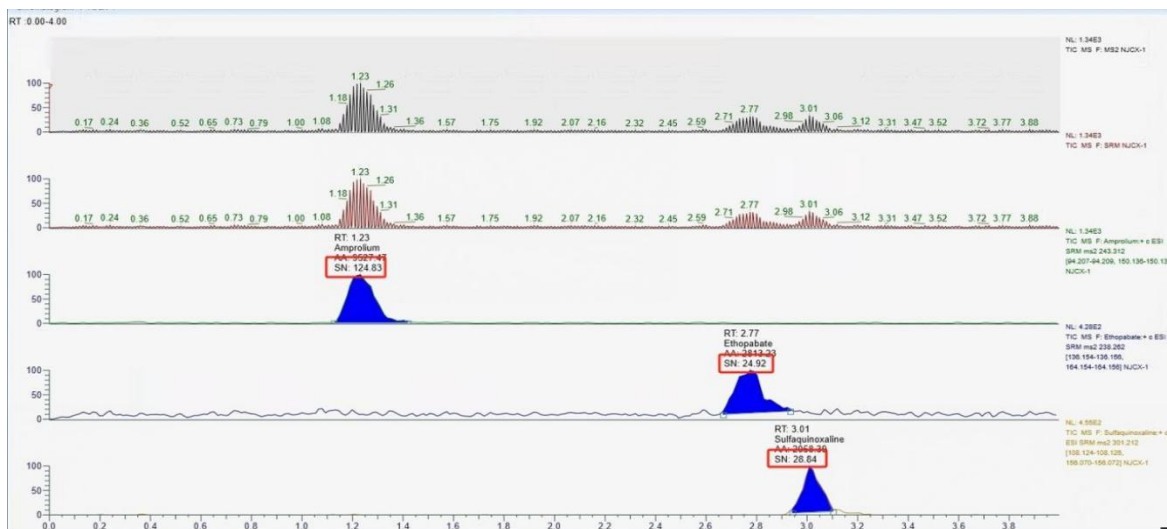


图 27 鸡浓缩饲料检出限信噪比

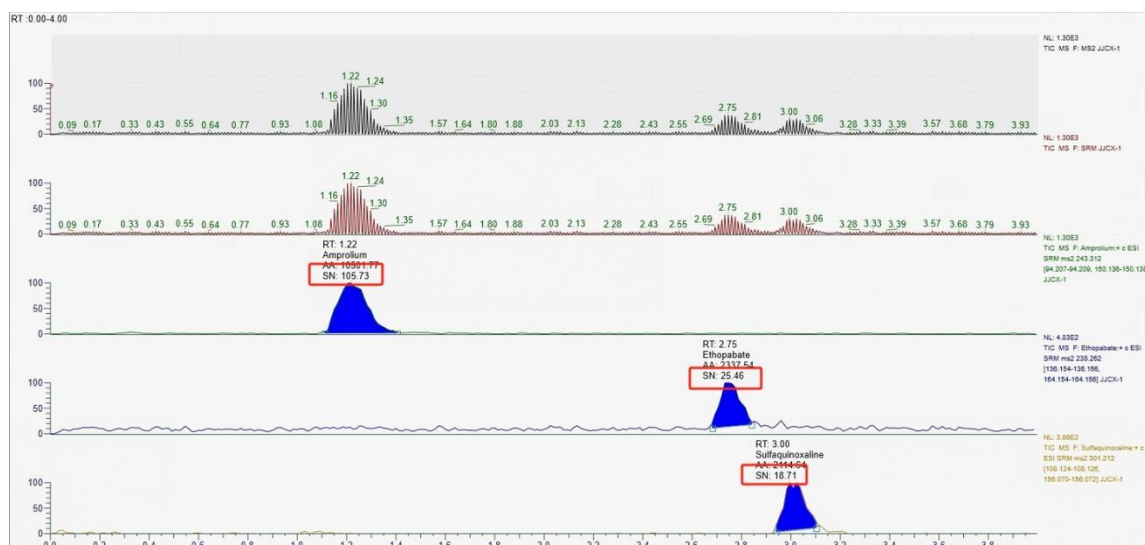


图 28 奶牛精料补充料检出限信噪比



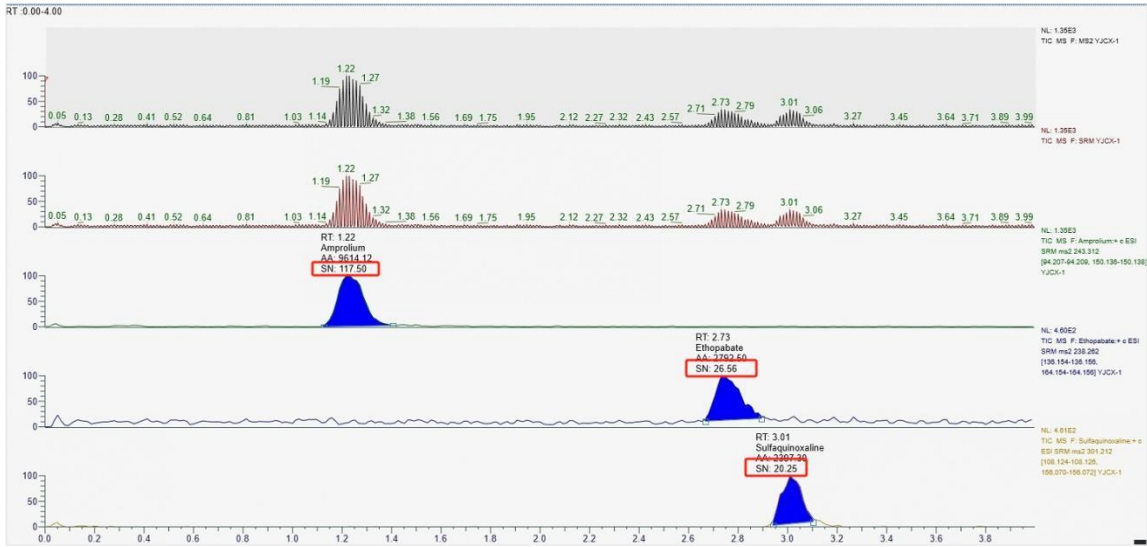


图 29 鸡预混饲料检出限信噪比

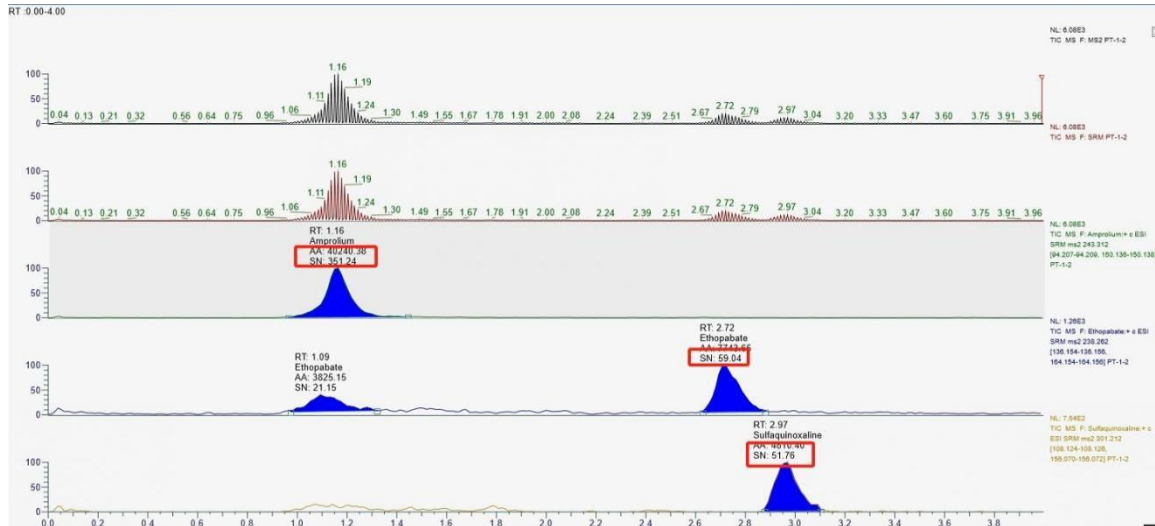


图 30 蛋鸡配合饲料 1 倍定量限信噪比

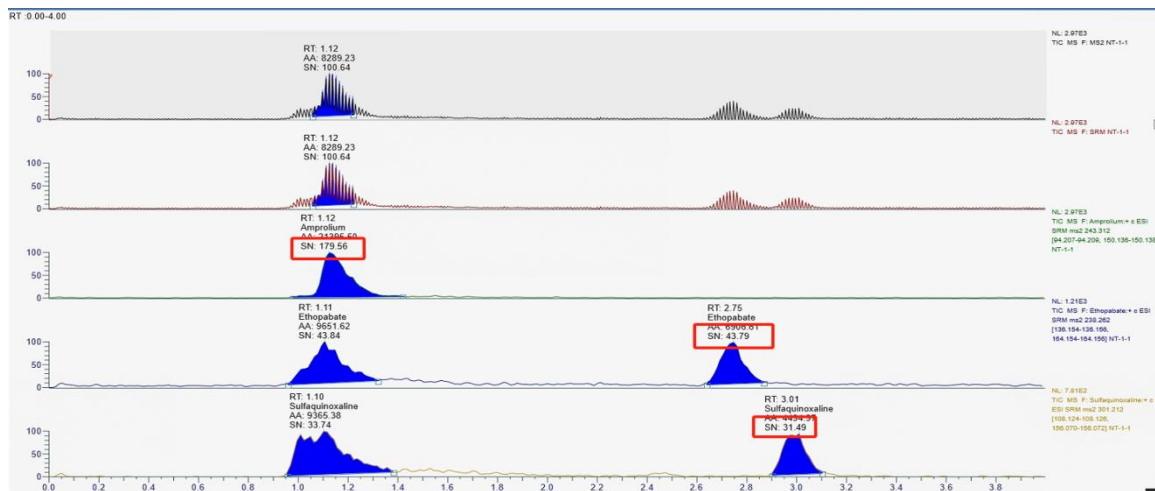


图 31 鸡浓缩饲料 1 倍定量限信噪比



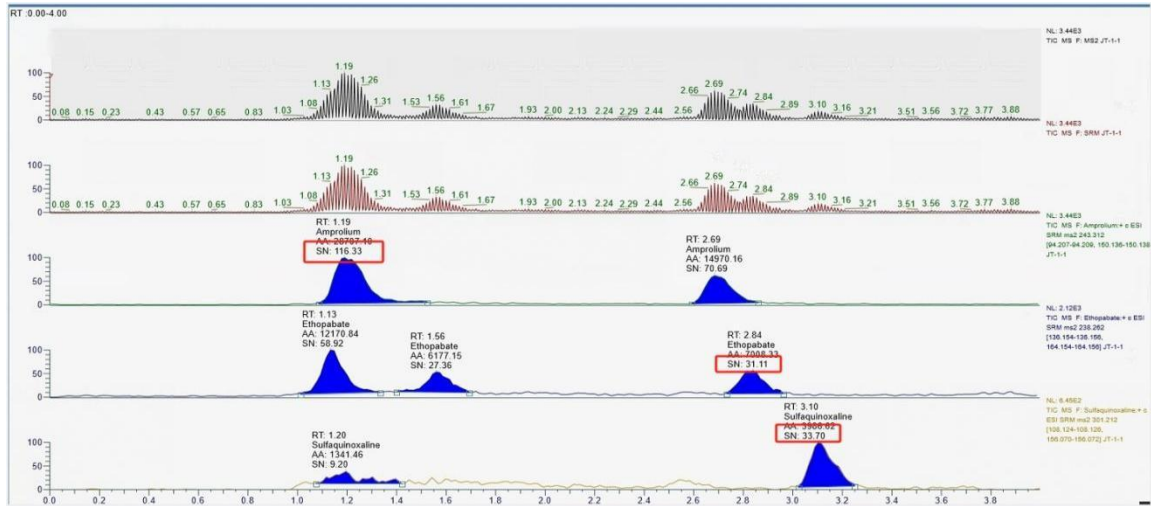


图 32 奶牛精料补充料 1 倍定量限信噪比

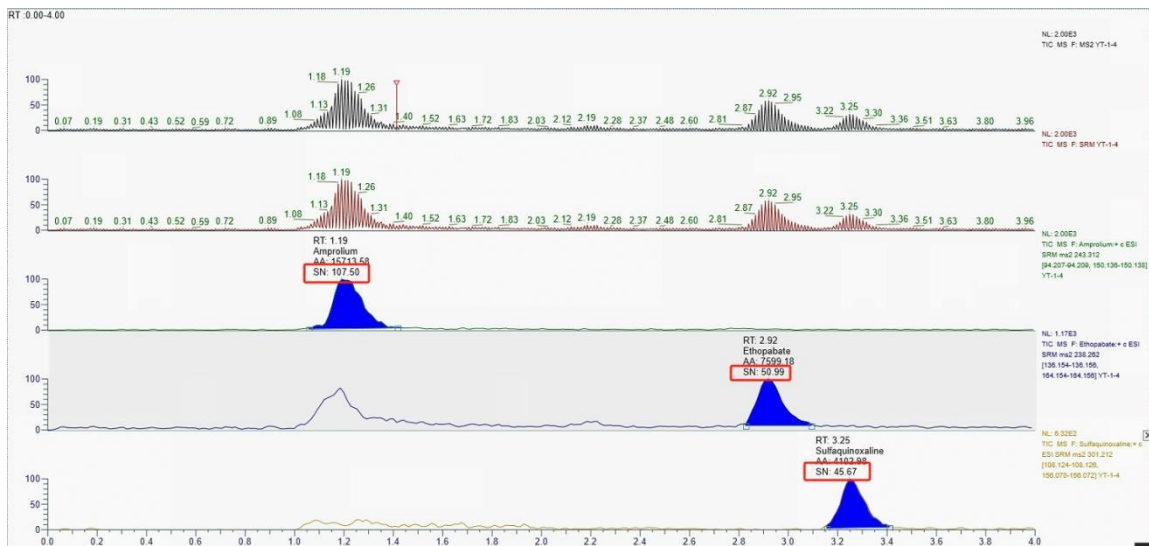


图 33 鸡预混合饲料 1 倍定量限信噪比

### 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

国标修订版修改完善了 GB/T 8381.11-2005 饲料中盐酸氨丙啉的测定高效液相色谱法，技术内容上变化包括：检测化合物的种类增加，由原来 1 种增加到 3 种，补充了液相色谱法的净化步骤，更改了检出限和定量限，增加了液相色谱-串联质谱法，为定量和定性提供了依据。此标准符合我国饲料法律法规相关要求，为规范三种兽药的正确使用提供了检测手段。

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

无。

#### **五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准**

无。

#### **六、与有关法律、法规的关系**

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

#### **七、重大分歧意见的处理经过和依据**

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

#### **八、涉及专利的有关说明**

不涉及。

#### **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**

饲料盐酸氨中丙啉的测定高效液相色谱法，标准编号 GB/T 8381.11-2005 废止。

#### **十、其他应当说明的事项**

无。

## 参考文献

- 1.中华人民共和国兽药典, 2015年版, 中国农业出版社
- 2.中华人民共和国农业农村部公告第194号
- 3.中华人民共和国农业农村部公告第246号
- 4.GB/T 8381.10-2005 饲料中磺胺喹噁啉的测定高效液相色谱法
- 5.GB/T 8381.11-2005 饲料中盐酸氨丙啉的测定高效液相色谱法
- 6.农业农村部公告第316号-6-2020 饲料中乙氧酰胺苯甲酯的测定 高效液相色谱法
- 7.GB/T 19542-2007 饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法
- 8.农业部1486号公告-7-2010 饲料中9种磺胺类药物的测定 高效液相色谱法
- 9.农业部2349号公告-5-2015 饲料中磺胺类和喹诺酮类药物的测定 液相色谱—串联质谱法
- 10.SN/T 4583-2016 出口动物源食品中氨丙啉残留量的测定 液相色谱-质谱质谱法
- 11.SN/T 4812-2017 进出口食用动物氨丙啉药物残留量的测定 液相色谱-质谱质谱法
- 12.GB 31613.1-2021 食品安全国家标准 牛可食性组织中氨丙啉残留量的测定 液相色谱—串联质谱法和高效液相色谱法
- 13.GB 31660.9-2019 食品安全国家标准 家禽可食性组织中乙氧酰胺苯甲酯残留量的测定 高效液相色谱法
- 14.农业部1025号公告-15-2008 鸡蛋中磺胺喹啉残留检测 高效液相色谱法
- 15.农业部1025号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法
- 16.GB/T 21316-2007 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱质谱法
- 17.SN/T 5140-2019 出口动物源食品中磺胺类药物残留量的测定
- 18.动物源食品中乙氧酰胺苯甲酯残留检测方法-高效液相色谱法[J].中国兽药杂志, 2002, 36(10): 7-8
- 19.窦彩云, 马育松, 艾连峰.亲水作用色谱-串联质谱法测定动物源食品中氨丙啉残留量[J].中国食品卫生杂志, 2016, 28(3): 348-351
- 20.李丹, 吴翠玲, 张聪聪.亲水作用色谱柱-高效液相色谱法测定鸡蛋中氨丙啉的残留量[J].食品安全质量检测学报, 2020, 10(17): 5648-5652
- 21.李丹, 沈昕, 张玉洁.高效液相色谱法测定鸡肉中5种磺胺类药物及乙氧酰胺苯甲酯增效剂残留量[J].食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 201-208
- 22.刘发全, 明文庆, 宋亚伟.高效液相色谱-荧光检测法测定饲料中乙氧酰胺苯甲酯含量[J].安徽农业科学, 2019, 47(23): 222-224
- 23.邵德佳, 刘佩玉.紫外分光光度法测定盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯预混剂中各组分的含量[J].中国兽药杂志, 2000, 34(2): 29-31
- 24.王淑芬, 葛明伟.饲料中尼卡巴嗪、乙氧酰胺苯甲酯共存时含量测定方法的研究[J], 辽宁畜牧兽医, 1997, 1, 23-25
- 25.王宏刚.预混剂中盐酸氨丙啉、乙氧酰胺苯甲酯、磺胺喹恶啉含量测定[J].中国兽药杂志, 1999: 33(2), 28-29
- 26.吴秋侠.HPLC测定鸡肉中EPA、APL及SQ多残留方法的建立[D].西北农林科技大学2007
- 27.徐士新, 仲锋, 郭文林.乙氧酰胺苯甲酯在鸡组织中残留的检测及消除规律的研究[J].中国兽药杂志, 1999, 33(2): 6-11

28. 赵颖, 刘瑜, 金雁.超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法同时测定配合饲料中 29 种兽药[J].色谱, 2012, 30 (9) : 908-914
29. Commission Directive 74/203/EEC, establishing Community methods of analysis for the official control of feedingstuffs
30. Commission Directive 1999/27/EC, establishing Community methods of analysis for the determination of amprolium, diclazuril and carbadox in feedingstuffs and amending Directives 71/250/EEC, 73/46/EEC and repealing Directive 74/203/EEC
31. David W, Fink. Further Studies on the Spectrophotometric Determination of Amprolium[J], Journal of AOAC International, 2004, 87(3):677-680
32. Keith D. Gallocco, Hyun Park, John Yee. Simultaneous Liquid Chromatographic Screening of Five Coccidiostats in Chicken Liver[J]. J. ASSOC OFF. ANAL. CHEM. 1988, 71(1):48-50 1985
33. Konrad Pietruk, Malgorzata Olejnik, Pintr Jedziniak. Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 112:50-59
34. Official Methods of AOAC International, 22th. Edition, 2023
35. S. Squadrone, C. Mauro, G.L. Ferro. Determination of amprolium in feed by a liquid chromatography-mass spectrometry method[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48:1457-1461
36. Tomoko Nagata, Masanobu Saeki, Hiroyuki Nakazawa. Sensitive Determination of Ethopabate Residues in Chicken Tissues by Liquid Chromatography with Fluorometric Detection[J]. J. ASSOC OFF. ANAL. CHEM., 68(1):27-28
37. Victor Hormazabal, Magne Yndestad, Oyvin Ostensvik. DETERMINATION OF AMPROLIUM ETHOPABATE LASALOCID MONENSIN NARASIN AND SALINOMYCIN IN FEED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2002, 25(17):2655-2663
38. Y. Talahashi, T. Sekiya, M. Nishikawa. SIMULTANEOUS HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF AMPROLIUM OXALINE AND N4-ACETYSULFAQUINOXALINE IN CHICKEN TISSUES[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1994, 17 (20) :4489-4512