



防，还可以亚治疗剂量添加于动物饲料，起到刺激动物生长和促进增产的作用。为了规范饲料中土霉素的使用，原农业部第168号公告中曾规定了土霉素钙预混剂在饲料中的使用规范：适用动物为猪、鸡。混饲，每 1000kg 饲料添加，猪 10-50g（4 月龄以内），鸡 10-50g（10 周龄以内），均以有效成分计。而实际生产过程中，有一些饲料厂及养殖企业在利益的驱使下往往会违规添加使用土霉素钙预混剂，从而使动物产生耐药性及药物残留，进而危害人们的身体健康。为维护我国动物源性食品安全和公共卫生安全，根据农业农村部第194号公告、第246号公告要求，已停用土霉素产品并注销其进口兽药注册证书。《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650-2019）中也对土霉素/金霉素/四环素在动物性食品中的最大残留限量做出了规定，见表1。这些政策法规的颁布对饲料质量安全监管提出来更高的要求。

表1 GB 31650-2019中对土霉素的最高残留限量的规定

动物种类	靶组织	残留限量 $\mu\text{g}/\text{kg}$
牛/羊/猪/家禽	肌肉	200
	肝	600
	肾	1200
牛/羊	奶	100
家禽	蛋	400
鱼	肌肉	200
虾	肌肉	200

目前饲料中土霉素检测的现行国标方法为《饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法》（GB/T 22259-2008），采用0.05mol/l盐酸溶液提取样品中的土霉素，高效液相色谱-紫外检测法检测，该方法存在空白干扰大、回收率低、适应性差等问题，并且高效液相色谱检测法灵敏度较低，不能准确定性，无法满足当前的监管需求。因此，亟需对GB/T 22259-2008进行修订，在对液相方法进行优化的基础上，增加灵敏度高、定性准确的液相色谱-串联质谱法，为饲料质量安全监管提供技术支撑，从源头保障畜产品质量安全。

在参考国内外相关检测方法的基础上，结合试验结果起草本标准，本标准采用高效液相色谱法和高效液相色谱-串联质谱法建立了饲料中土霉素的检测方法，

标准编制过程中对样品的前处理方法和仪器条件进行了优化，得到了满意的效果。

### 1.3 主要工作过程

本标准由河南省农畜水产品检验技术研究院（原河南省兽药饲料监察所）和陕西省畜牧技术推广总站负责制定工作。技术归口单位是全国饲料工业标准化技术委员会。工作流程：立项—成立工作组—查阅国内外资料—收集样品并进行试验—起草标准文本—标准复核—征求意见—预审—送审—报批。

#### 1.3.1 成立标准起草小组

2024年1月，我单位接到标准制定任务后，由河南省农畜水产品检验技术研究院与陕西省畜牧技术推广总站共同成立了工作组负责本标准的起草工作。同时对标准起草工作进行了分工，明确各自任务和职责，以确保项目的顺利实施。

#### 1.3.2 文献研究和试验

2024年2月到3月，课题组组织技术人员通过大量查阅国内外有关文献，全面掌握了土霉素的化学结构、理化特性等。在此基础上，2024年4月到7月，参考已有的文献资料，针对饲料中土霉素的检测方法、仪器条件、方法线性、灵敏度和精确度等进行探索，确定了饲料中土霉素的检测方法。并在实验室进行了多次试验验证，结果发现，本方法能很好满足饲料中土霉素的检测要求。2024年8月，通过对试验数据进行整理、分析，撰写标准文本和编制说明，形成了《饲料中土霉素的测定》（定向征求意见稿）。

#### 1.3.3 方法验证情况

2024年9月，分别由、和三家单位对本方法进行了复核试验，不同实验室间两种药物的平均回收率均在 %~ %范围内，检测结果的相对标准偏差（RSD）均小于 %，线性范围、检出限及定量限也与标准文本一致。结果表明，该方法均满足各项技术要求，最终确定了该方法的可行性。

#### 1.3.4 定向征求意见情况

2021年8月，向等家涉及国内科研、教学和管理等领域的有关单位的教授、专家和技术人员征求意见，将《饲料中土霉素的测定》标准文本和编制说明征求意见稿及征求意见表发送至各有关单位和专家。年月，先后收到份反馈意见并进行汇总。对各有关单位和专家共提出条意见，起草小组对反馈意见逐条进行研究和讨论，查阅、搜集相关内容的科学依据，对有争议的问题通过电

话和电子邮件等联系方式向有关单位的专家请教。起草小组通过讨论，统一意见后作出的处理意见并提出相应的依据、理由及修改结果（见意见汇总处理表），共采纳意见 条，部分采纳 条，不采纳 条。

根据以上工作得到意见和建议，标准编制小组对标准进行认真地修改、完善，于2024年 月形成农业行业标准《饲料中土霉素的测定》标准文本和编制说明（预审稿）。

## 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

在本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》、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求编写。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。

### 2.2 方法试验条件研究

#### 2.2.1 高效液相色谱法试验条件的研究

##### 2.2.1.1 检测波长的选择

通过查阅国内外土霉素检测标准和相关文献，土霉素的检测色谱方法主要为液相色谱-紫外检测器法和液相色谱-荧光检测器法，考虑到基质干扰及检测方法灵敏度的情况，通过比较后选择液相色谱-荧光检测器法，通过对土霉素Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine缓冲标准溶液的荧光光谱扫描发现，激发波长379nm，发射波长518nm处，土霉素有最大响应值，如图2。

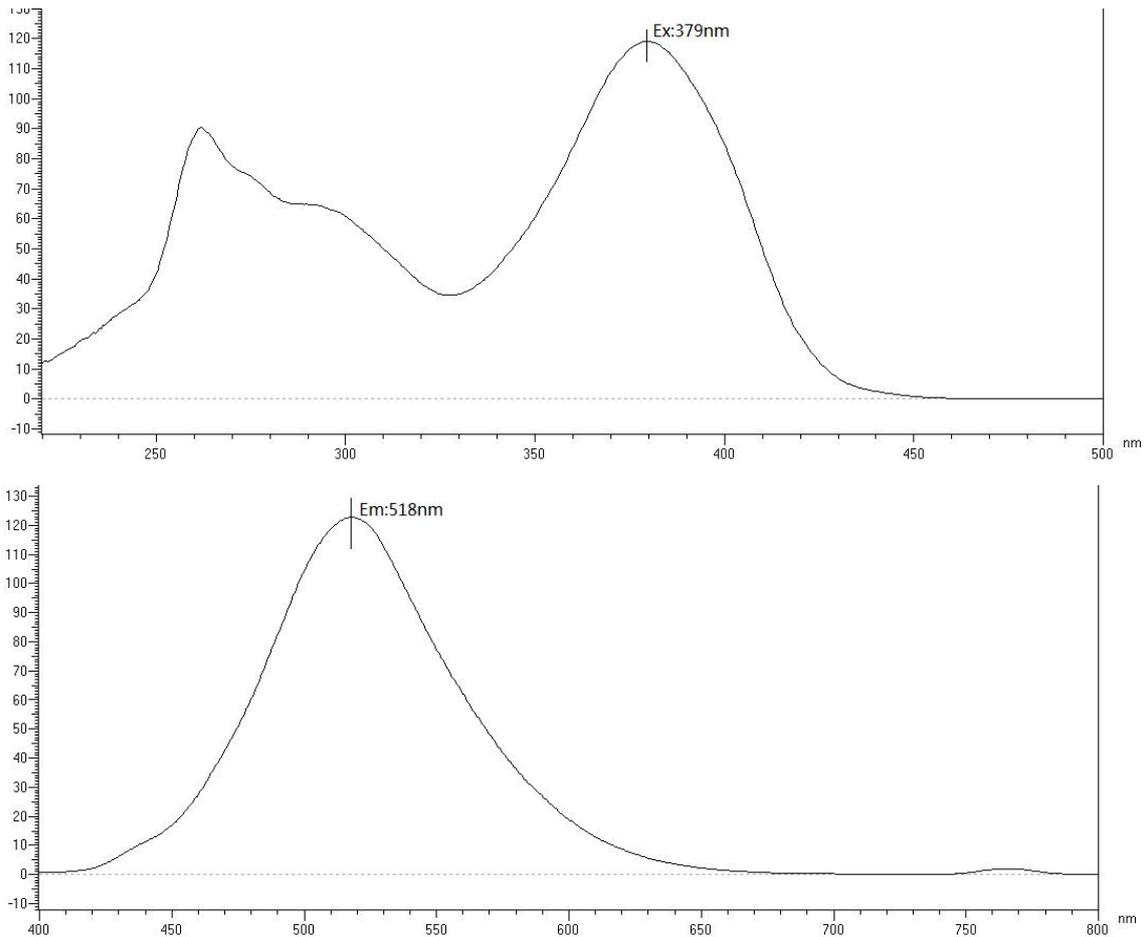


图2. 土霉素荧光扫描色谱图

同时参考农业农村部公告第 282 号-2-2020《饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定》中所述，四环素类检测激发波长 380 nm，发射波长 495 nm。并查阅资料得知，美国分析化学家协会（AOAC）国际学报第 92 卷中对土霉素检测方法的报道中，检测波长为激发波长 390 nm，发射波长 512 nm。对三种色谱波长进行比较，各波长条件下土霉素响应值如表 2。结果显示土霉素在激发波长 390 nm，发射波长 512 nm 的条件下有最大响应值。

表2 各波长下土霉素响应值（n=3）

土霉素浓度 μg/mL	文献依据	激发波长 nm	发射波长 nm	响应值
0.2	土霉素溶液荧光扫描	379	518	679148
	农业农村部公告第 282 号-2-2020	380	495	566449

	AOAC 国际学报第 92 卷	390	512	716219
--	-----------------	-----	-----	--------

### 2.2.1.2 色谱柱和流动相的选择

色谱分离条件对待测物与杂质的分离、峰面积、峰高度及出峰时间都有影响，并在很大程度上影响检测灵敏度。在农业农村部公告第 282 号-2-2020《饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定》的基础上，本试验采用 Waters XBridge C<sub>18</sub>(4.6×150 mm, 5 μm)为色谱柱，考察了该公告中所描述的甲醇-氯化钙缓冲液和 AOAC 中所描述的甲醇-氯化钙缓冲液两种配制溶液的方法，结果发现，两种流动相对检测结果没有明显差别。

当甲醇-氯化钙缓冲液初始比例为 30: 70 时，无论是等度洗，还是梯度洗脱，配合料中，目标峰与杂质无法完全分离。通过摸索，最终选择甲醇-氯化钙缓冲液初始比例为 15: 85，并在目标物出峰后，提高有机相比比例，将后续杂质完全洗脱，保证下一针峰形无干扰。所以，本标准采用液相色谱条件为：A 相：EDTA-CaCl<sub>2</sub>-乙酸盐缓冲液，B 相：甲醇。梯度洗脱程序：0~13 min，85%-85% A；13~16min，85%~65% A；16~23 min，65%~65% A；23~23.1min，65%~85% A；23.1~30 min，85%~85% A。流速：1.0 mL/min；进样量：20 μL；柱温：30 °C。色谱图见图 3。

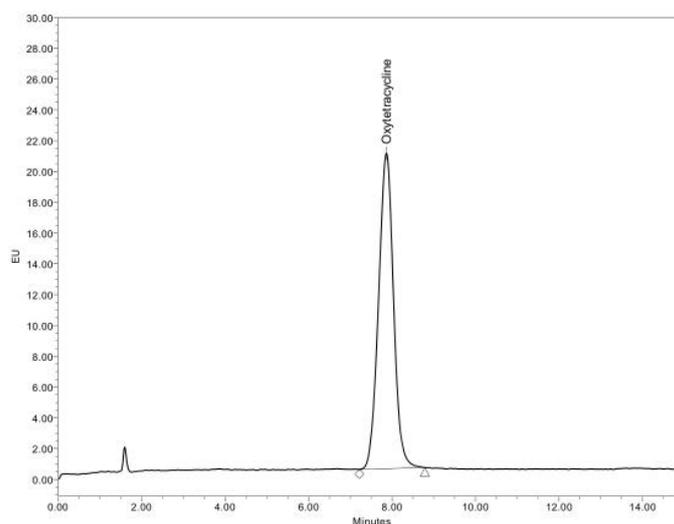


图 3. 土霉素标准溶液色谱图 (2 μg/mL)

### 2.2.1.3 前处理条件的选择

土霉素具有较强的极性，易与金属离子螯合形成配合物，同时在 pH<2 时易发生消去反应而生产脱水物，碱性条件下易生成异构体，故本方法拟采用酸性提

取液。本方法参考原标准 0.05mol/l 盐酸溶液、农业农村部公告第 282 号-2-2020 《饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定》中所描述的提取液 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液和 AOAC 所报道的酸化甲醇三种提取溶剂。经过验证, 3 种溶剂中 0.05mol/l 盐酸溶液回收率最低, Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液可有效提取饲料中的土霉素药物, 回收率在 70%~110%范围, 但提取次数为 3 次, 操作较繁琐。相比而言, 配合料、浓缩料、精料补充料用酸化甲醇提取效果更好, 并通过后续以水稀释, 除去大部分脂溶性杂质, 分离度好, 只提取一次即可满足很好的回收率要求, 在 85%~115%之间。但对于添加剂预混合饲料, 特别是微量元素预混合饲料, 由于金属元素含量较高, 与土霉素络合严重, 导致以酸化甲醇为提取溶剂的回收率较低, 在 30%左右。因此, 配合料、浓缩料、精料补充料采用酸化甲醇作为提取溶剂, 添加剂预混合饲料采用 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液作为提取溶剂。

采用 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液提取时, 提取步骤对回收率有一定影响。实验比较了振荡提取 10 min、20 min 和 30 min, 发现回收率变化不明显。但超声后提取效率有一定程度的提高。比较了超声 10 min、20 min、30min, 温度 30℃、40℃和 50℃发现, 温度及超声时间对提取效果影响不大。最终确定振荡 10 min, 超声提取 10 min。

最终确定前处理步骤如下:

#### (1) 配合饲料、浓缩饲料及精料补充料

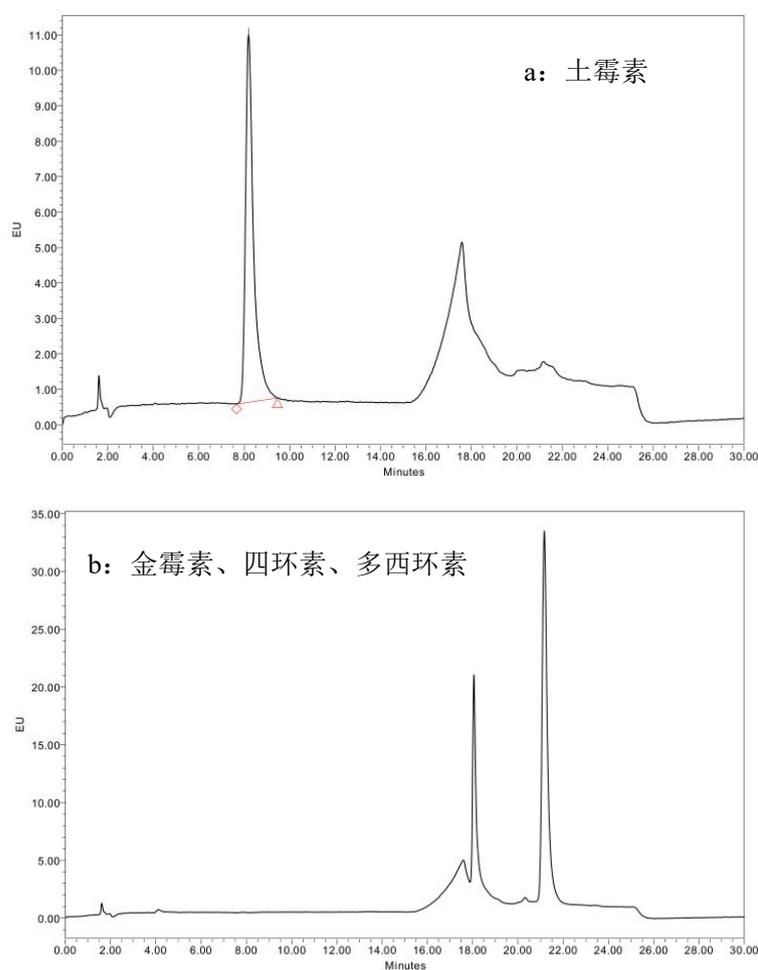
平行做两份试验。称取试样 5 g, 精确至 0.01 g, 置于 50 mL 离心管中, 准确加入盐酸甲醇溶液 25 mL, 涡旋混合后振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 移取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL 水, 涡旋混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过微孔滤膜, 供 HPLC 测定。

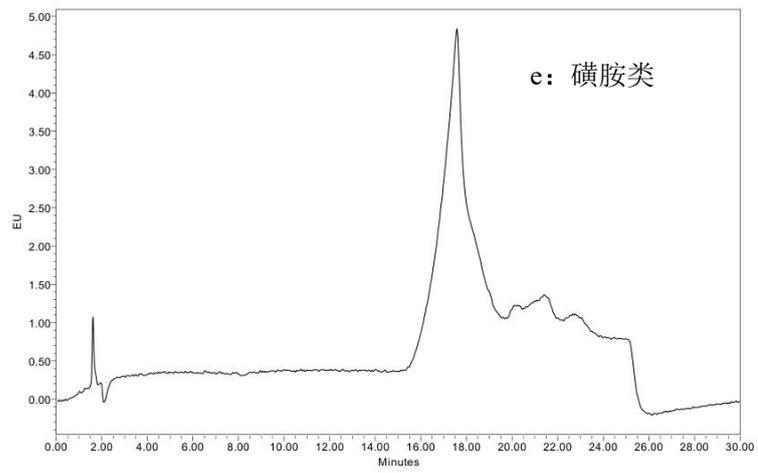
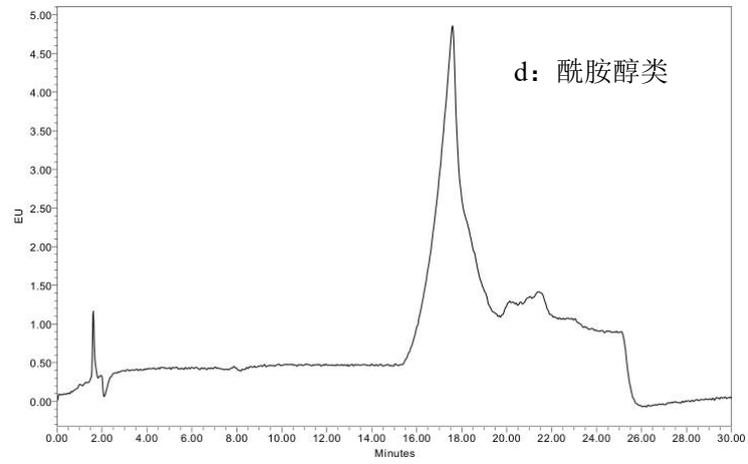
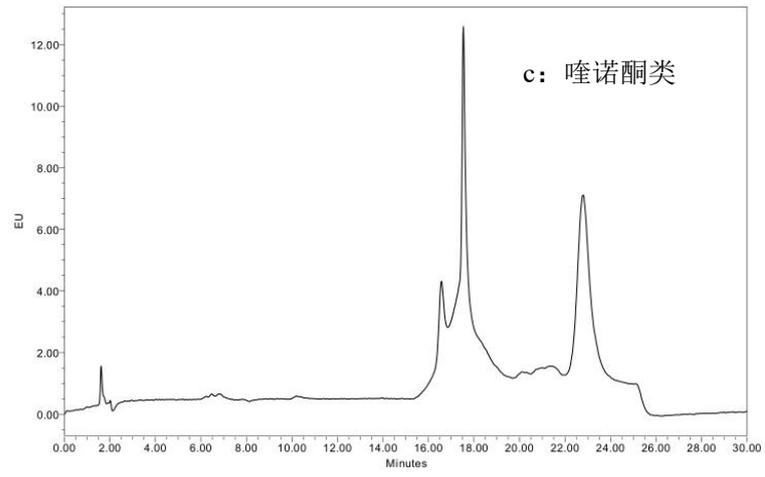
#### (2) 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

平行做两份试验。称取试样 2 g, 精确至 0.01 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液 20 mL, 涡旋混合后振荡 10 min, 超声提取 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 移取上清液至另一离心管中。残渣分别用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液 20 mL、10 mL 重复提取两次, 合并三次上清液, 用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液定容至 50 mL, 混匀备用。取备用液过微孔滤膜, 供 HPLC 测定。

#### 2.2.1.4 干扰试验

在土霉素液相条件下，考察结构类似或有关药物对土霉素检测的干扰。根据土霉素的药物用途和性质，我们选择金霉素、四环素、多西环素、磺胺类（磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑等 13 种）、大环内酯类（泰乐菌素、替米考星、吉他霉素）、氟喹诺酮类（氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、洛美沙星、培氟沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星）、酰胺醇类（氟苯尼考、氯霉素、甲矾霉素）等药物进行干扰试验。结果表明，在土霉素的液相检测条件下，无药物在土霉素处出峰。由此表明金霉素、四环素等药物对土霉素的检测无干扰。干扰试验的液相色谱图见图 4。





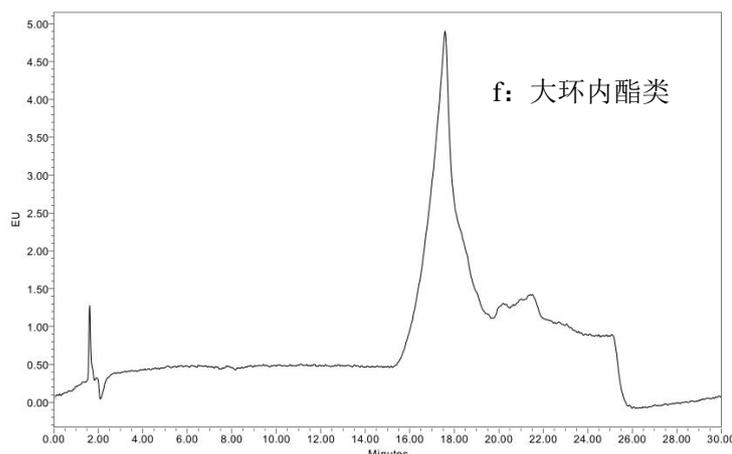


图4. 土霉素干扰试验图谱

(a: 土霉素; b: 金霉素、四环素、多西环素; c: 喹诺酮类; d: 酰胺醇类;  
e: 磺胺类; f: 大环内酯类)

### 2.2.1.5 方法学考察

#### (1) 线性

精确移取适量标准中间工作液，用 50%甲醇/McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲溶液分别稀释，制得浓度分别为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL 的标准系列溶液，由低浓度到高浓度供高效液相色谱仪测定。以色谱峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。求得以 50%甲醇稀释的土霉素回归方程为  $Y=2.62 \times 10^4 X + 7.08 \times 10^5$ ， $R^2=0.999966$ ，以 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲溶液稀释的土霉素回归方程为  $Y=3.10 \times 10^6 X - 2.71 \times 10^4$ ， $R^2=0.999968$ ，均大于 0.999，线性良好，见图 5-图 6。

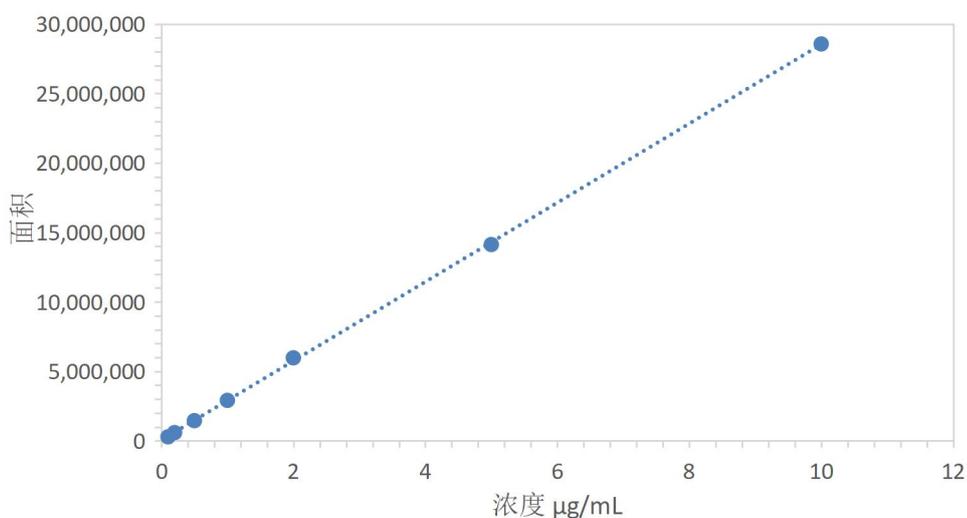


图5. 土霉素标准曲线（50%甲醇稀释）

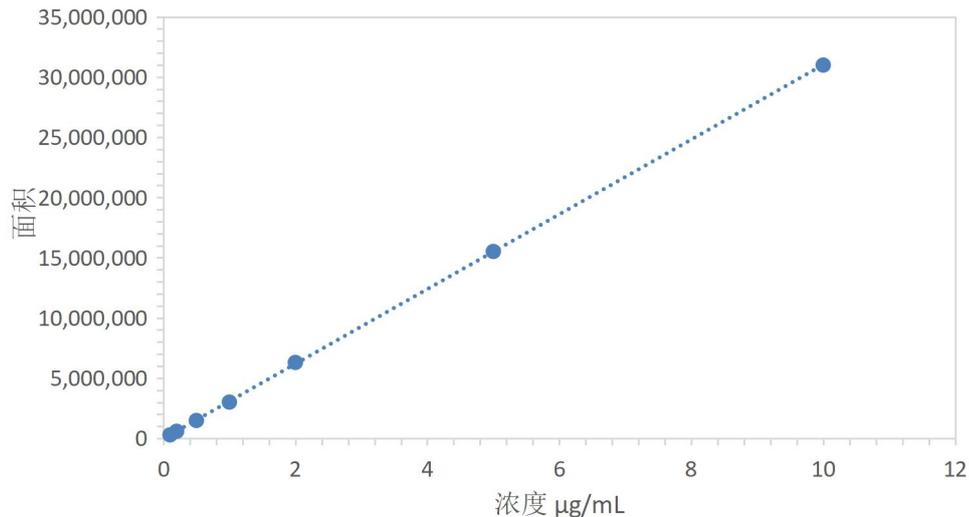


图 6. 土霉素标准曲线 (Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液稀释)

## (2) 方法的灵敏度

空白试样按相同步骤处理后，测定结果表明，在相应的保留时间处，空白试样对所测药物无干扰。

**检出限 (LOD)：** 根据要求，添加适量土霉素标准溶液于 5 g 空白配合饲料、浓缩饲料和精料补充料（预混合饲料、混合型饲料添加剂 2g）中，提取后测定，依据信噪比  $S/N \geq 3$ ，确定其检出限。试验结果表明，土霉素在猪、鸡配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中的检测限为 1.0 mg/kg，在水产饲料中的检出限为 5.0 mg/kg，在添加剂预混合饲料中的检出限为 2.0 mg/kg。

**定量限 (LOQ)：** 根据要求，添加适量土霉素标准溶液于 5 g 空白配合饲料、浓缩饲料和精料补充料（预混合饲料、混合型饲料添加剂 2g）中，提取后测定，依据信噪比  $S/N \geq 10$  且添加回收试验中回收率和批间批内 RSD 满足要求，确定其定量限。试验结果表明，土霉素在猪、鸡配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中的定量限为 2.0 mg/kg，在水产饲料中的定量限为 10.0 mg/kg，在添加剂预混合饲料中的定量限为 5.0 mg/kg。

## (3) 方法的准确度和精密度考察

本方法采用标准添加法考察了土霉素在配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中的添加回收情况。结合 168 号公告中土霉素钙的用量，在空白饲料中添加 3 个不同水平土霉素进行准确度和精密度试验，添加

量如下：猪、鸡配合饲料为 2 mg/kg、20 mg/kg、100 mg/kg，鱼配合饲料为 10 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg，浓缩饲料和精料补充料为 2 mg/kg、100 mg/kg、500 mg/kg，添加剂预混合饲料和混合型饲料剂的添加浓度为 5 mg/kg、100 mg/kg、1000 mg/kg，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 3~表 13。

表3 猪配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	96.5	97.7	93.0	96.5	95.8	95.9	1.8	4.7
	II	98.2	90.4	92.9	91.3	87.3	92.0	4.4	
	III	90.3	85.3	88.9	100.8	94.7	92.0	6.5	
20	I	89.7	91.7	91.7	90.0	91.0	90.8	1.0	6.2
	II	98.5	104.3	100.5	100.9	100.3	100.9	2.1	
	III	97.4	90.2	102.3	106.0	105.7	100.3	6.6	
100	I	92.0	92.5	92.7	94.3	92.5	92.8	0.9	6.0
	II	104.5	97.3	95.9	99.7	107.2	100.9	4.8	
	III	95.7	99.8	107.5	98.8	87.1	97.8	7.5	

表 4 猪浓缩饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	90.5	92.0	98.0	99.5	96.0	95.2	4.0	8.3
	II	94.5	114.2	102.6	108.5	91.5	102.3	9.2	
	III	114.8	108.8	99.3	92.1	107.9	104.6	8.5	
100	I	92.1	94.5	91.0	93.9	102.3	94.8	4.7	7.7
	II	92.1	103.9	99.0	100.8	92.1	97.6	5.4	
	III	109.1	114.4	105.6	101.4	112.7	108.6	4.9	
500	I	100.2	102.6	104.6	100.8	96.7	101.0	2.9	4.6
	II	92.0	94.7	95.4	91.9	94.8	93.8	1.8	
	III	98.3	100.6	95.1	104.8	105.3	100.8	4.3	

表 5 猪预混合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	81.0	79.0	79.5	80.0	78.5	79.6	1.2	5.7
	II	84.2	82.6	94.9	86.5	79.7	85.6	6.7	
	III	83.4	78.6	82.1	76.2	76.6	79.4	4.1	
100	I	96.4	95.4	97.5	95.4	95.0	95.9	1.1	3.8
	II	86.3	94.1	89.9	95.4	99.1	93.0	5.3	
	III	90.3	95.2	88.4	94.4	92.6	92.2	3.1	

<b>1000</b>	I	98.7	100.8	96.1	98.1	99.5	98.6	1.8	4.7
	II	92.0	90.1	85.4	95.4	89.0	90.4	4.1	
	III	96.8	93.0	99.0	93.5	99.1	96.3	3.0	

表 6 鸡配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
<b>2</b>	I	95.1	98.5	93.9	96.9	95.7	96.0	1.8	6.8
	II	105.7	99.6	100.6	112.7	113.9	106.5	6.2	
	III	114.3	103.9	104.3	96.3	107.0	105.2	9.2	
<b>20</b>	I	98.1	91.2	93.4	110.2	97.5	98.1	7.5	7.3
	II	98.6	106.1	112.0	91.8	112.9	104.3	8.6	
	III	100.8	95.5	101.1	95.8	92.3	97.1	3.9	
<b>100</b>	I	99.5	89.9	107.1	114.9	107.7	103.8	9.2	8.0
	II	89.9	102.8	101.0	95.7	93.2	96.5	5.6	
	III	105.0	110.3	89.1	108.9	100.5	102.8	9.3	

表 7 鸡浓缩饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
<b>2</b>	I	95.0	86.6	85.6	96.0	99.0	92.4	6.5	4.7
	II	94.3	90.7	98.0	98.6	98.8	96.1	3.7	
	III	92.0	90.1	90.2	91.1	96.7	92.0	3.0	
<b>100</b>	I	93.7	87.3	92.0	86.2	94.5	90.7	4.2	4.5
	II	94.6	99.1	97.1	94.8	99.9	97.1	2.5	
	III	98.4	88.9	89.9	97.2	92.9	93.5	4.5	
<b>500</b>	I	86.0	97.2	87.0	86.1	92.5	89.8	5.5	5.2
	II	98.4	98.1	94.2	87.6	91.2	93.9	4.9	
	III	98.3	87.7	88.2	96.5	94.3	93.0	5.2	

表 8 鸡预混合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
<b>5</b>	I	80.3	81.8	76.9	79.1	85.6	80.7	4.0	6.9
	II	80.7	88.4	76.8	84.5	76.1	81.3	6.4	
	III	92.9	88.4	92.2	91.3	88.6	90.7	2.3	
<b>100</b>	I	105.2	104.1	104.7	105.9	100.1	104.0	2.2	6.6
	II	102.0	89.3	103.7	105.4	98.7	99.8	6.4	
	III	106.9	86.5	94.4	91.4	96.5	95.1	8.0	
<b>1000</b>	I	103.2	103.2	104.1	104.0	103.6	103.6	0.4	4.5
	II	103.9	92.2	102.8	98.1	91.0	97.6	6.1	

III	97.6	95.5	102.1	95.5	98.6	97.9	2.8
-----	------	------	-------	------	------	------	-----

表 9 精料补充料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
2	I	96.6	94.8	93.1	90.4	82.7	91.5	5.9	6.1
	II	86.4	95.4	85.4	102.1	98.1	93.5	7.8	
	III	93.3	97.7	86.3	94.1	86.8	91.6	5.4	
100	I	93.3	92.7	94.1	93.6	92.9	93.3	0.6	6.7
	II	90.2	104.8	93.1	107.8	89.1	97.0	8.9	
	III	108.0	97.7	101.6	103.9	103.8	103.0	3.6	
500	I	107.4	101.4	101.0	101.8	101.0	102.5	2.7	6.1
	II	100.7	94.7	85.4	104.4	94.6	96.0	7.5	
	III	97.1	91.9	94.1	102.3	89.8	95.0	5.1	

表 10 鱼配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
10	I	90.4	91.8	90.3	109.3	101.5	96.7	8.8	7.3
	II	94.4	101.7	89.1	100.1	103.2	97.7	6.0	
	III	103.6	93.8	96.2	111.2	106.5	102.3	7.1	
100	I	111.5	108.1	92	102.8	93.4	101.6	8.5	6.8
	II	93.9	112.1	91.8	103	108.1	101.8	8.6	
	III	101	100.9	98.5	108.2	100.3	101.8	3.7	
300	I	92.8	90.8	90.3	108.2	101.9	96.8	8.2	6.9
	II	109.8	96.7	103.1	90	90.9	98.1	8.5	
	III	95.4	99.2	94.5	102.2	106.5	99.6	5.0	

表 11 微量元素预混料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	85.1	82.5	81.2	80.7	83.4	82.6	2.1	4.5
	II	86.7	84.6	93.5	87.7	89.0	88.3	3.8	
	III	90.4	89.9	88.5	92.3	85.4	89.3	2.9	
100	I	92.6	93.0	91.6	92.7	95.6	93.1	1.6	6.9
	II	98.5	111.1	100.1	108.2	96.9	103.0	6.1	
	III	110.4	104.9	108.3	100.6	97.3	104.3	5.2	
1000	I	101.1	104.6	104.5	104.8	104.2	103.8	1.5	4.1
	II	99.7	99.3	96.1	94.7	104.0	98.8	3.7	
	III	109.0	104.8	106.8	96.9	100.1	103.5	4.8	

表 12 植物提取物（蒲公英根固体提取物）中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	101.3	102.1	108.5	101.2	102.8	103.2	3.0	4.8
	II	108.9	102.8	101.0	97.1	107.8	103.5	4.7	
	III	101.4	90.5	96.9	96.2	101.9	97.4	4.7	
100	I	105.5	106.8	104.8	108.2	99.2	104.9	3.3	3.9
	II	104.0	104.1	106.3	111.1	105.1	106.1	2.8	
	III	103.1	107.0	94.1	101.1	101.9	101.4	4.6	
1000	I	96.3	97.5	97.2	94.1	94.6	95.9	1.6	5.3
	II	97.5	102.1	100.8	110.4	105.6	103.3	4.8	
	III	108.7	104.0	102.1	96.6	108.1	103.9	4.7	

表 13 微生态制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
5	I	90.8	92.4	90.3	93.5	89.1	91.2	1.9	3.0
	II	89.4	96.8	91.1	92.0	93.2	92.5	3.0	
	III	85.0	91.8	94.9	89.2	92.4	90.7	4.1	
100	I	84.1	95.6	83.1	93.5	93.9	90.1	6.6	8.7
	II	95.1	106.4	107.3	97.7	107.3	102.8	5.7	
	III	100.8	86.1	104.1	94.9	86.2	94.4	8.7	
1000	I	88.1	95.2	94.6	90.6	97.5	93.2	4.1	6.5
	II	102.6	106.0	101.0	98.4	89.7	99.5	6.2	
	III	103.8	105.4	105.7	100.2	109.1	104.8	3.1	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 2 mg/kg~1000 mg/kg 的土霉素，回收率为 76.1%~114.9%，批内、批间相对标准偏差均小于 9.3%。说明该方法对不同饲料样品中不同含量土霉素的测定均有较好的准确度。色谱图见图 7~图 29。

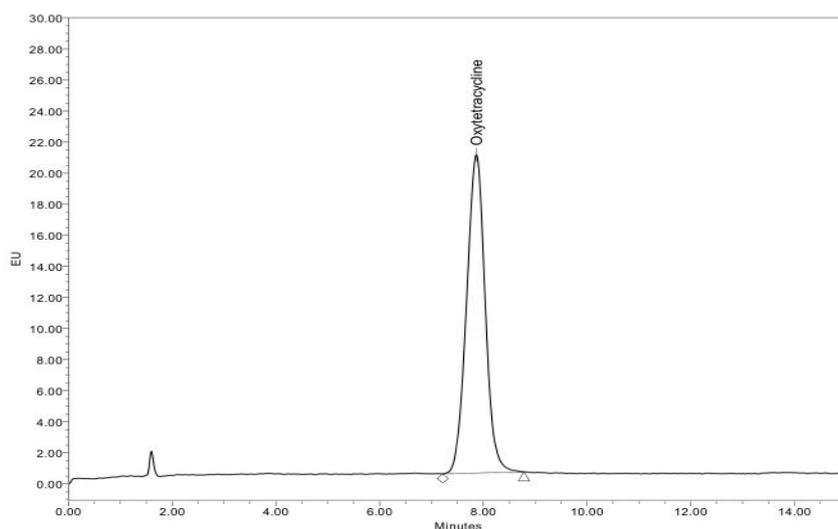


图7.土霉素标准溶液色谱图 (2µg/mL)

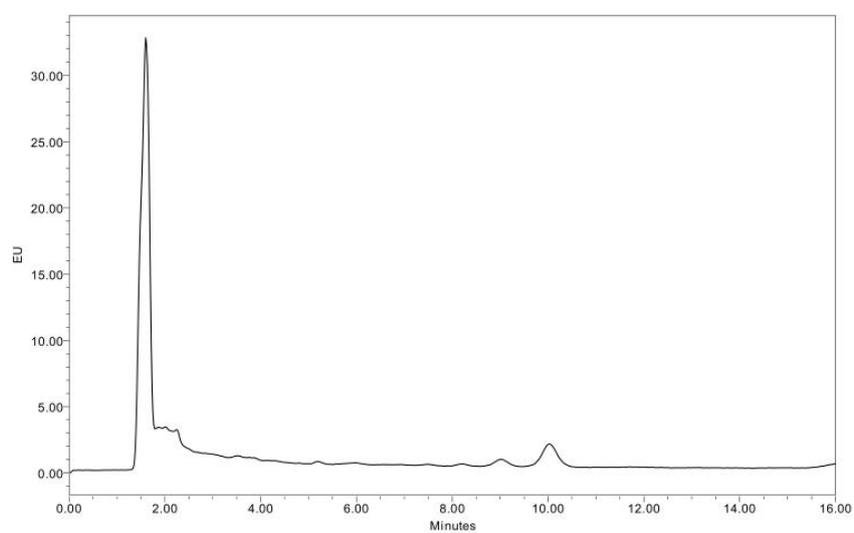


图8.猪配合饲料空白色谱图

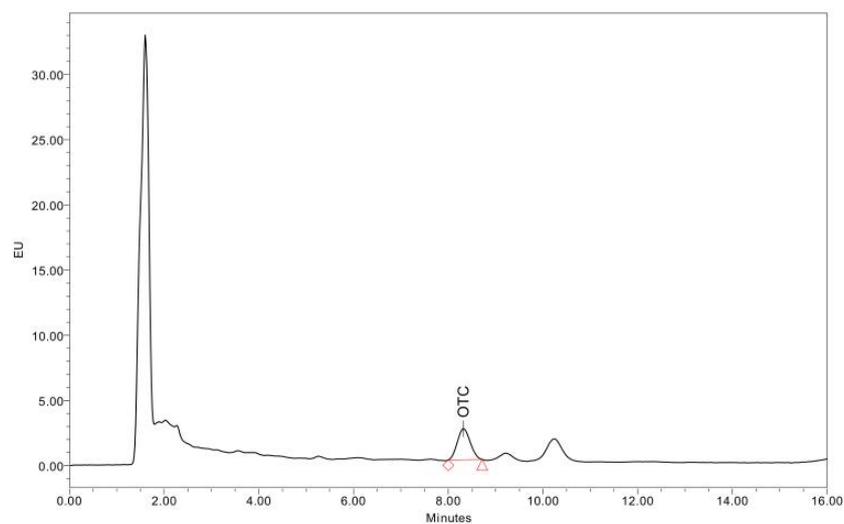


图9.猪配合饲料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

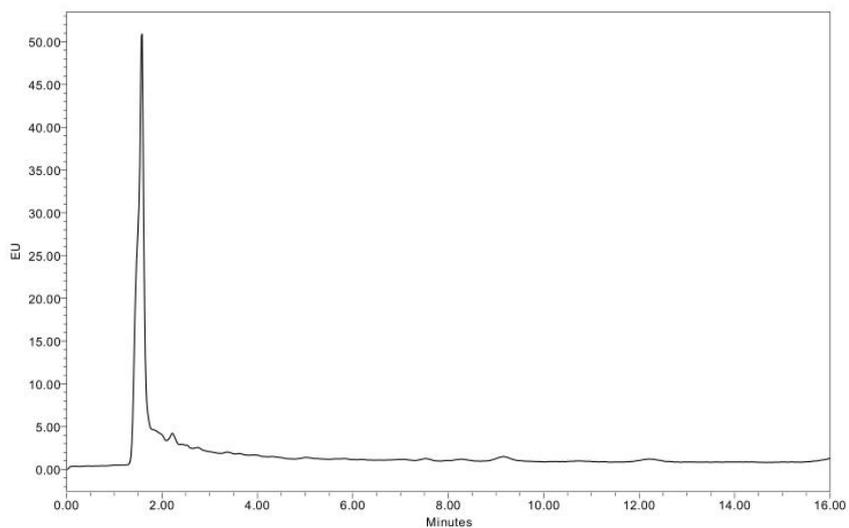


图10. 猪浓缩饲料空白色谱图

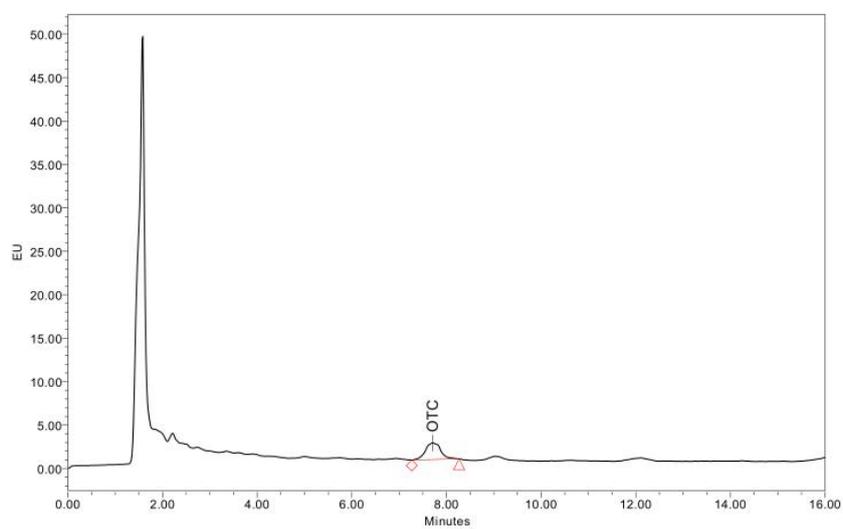


图11. 猪浓缩饲料空白添加色谱图（2 mg/kg）

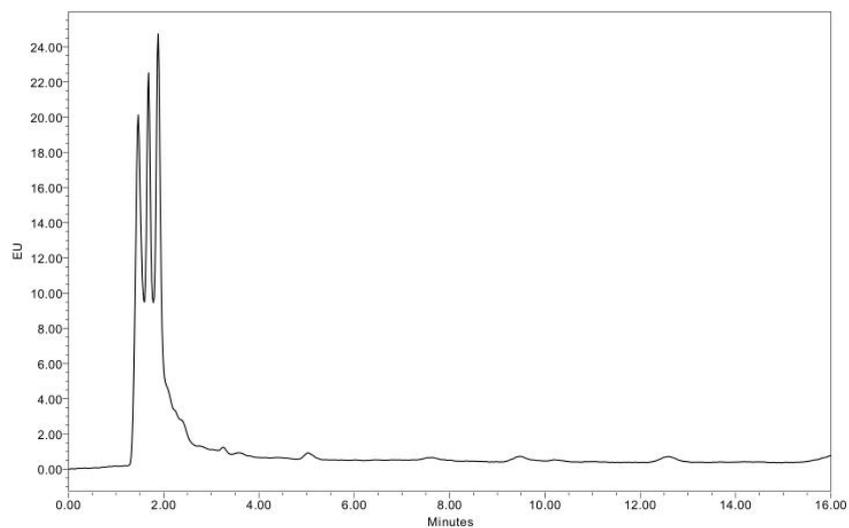


图12. 猪预混合饲料空白色谱图

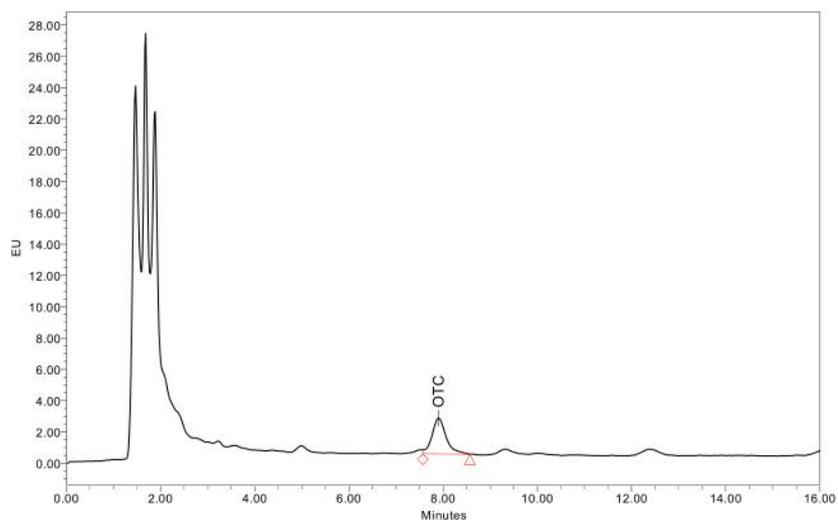


图13. 猪预混合饲料空白添加色谱图 (5 mg/kg)

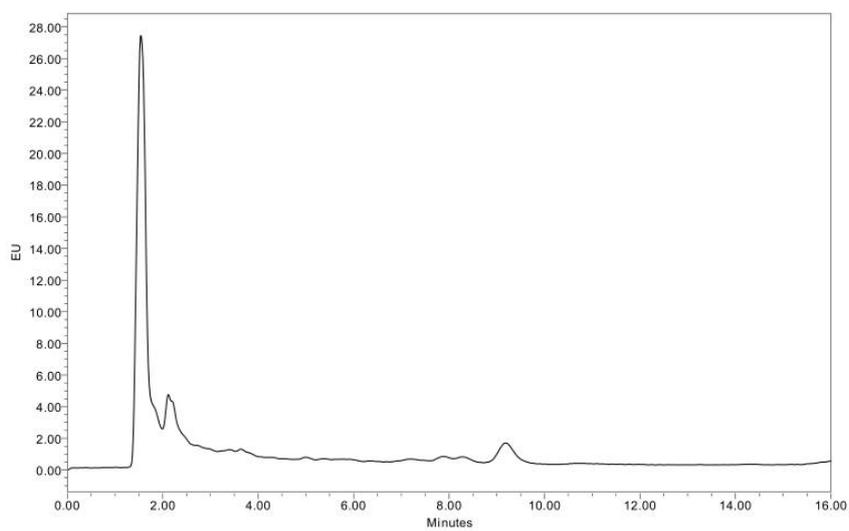
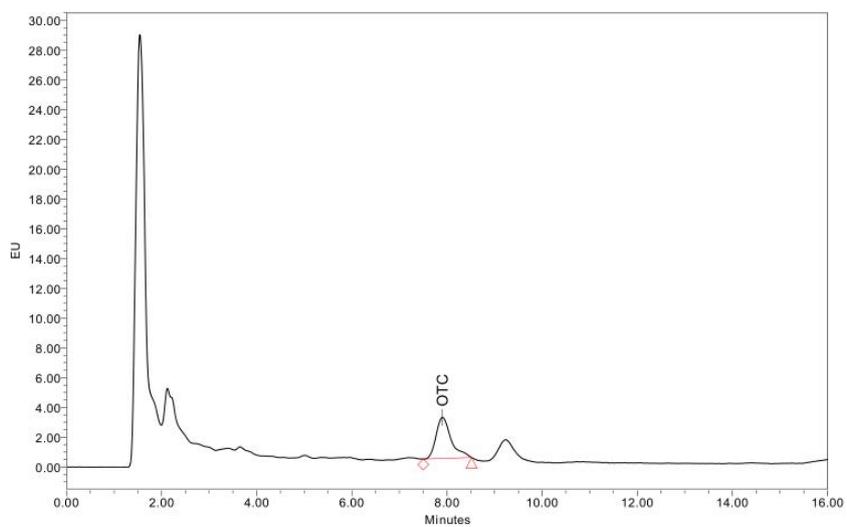


图14. 鸡配合饲料空白色谱图



15. 鸡配合饲料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

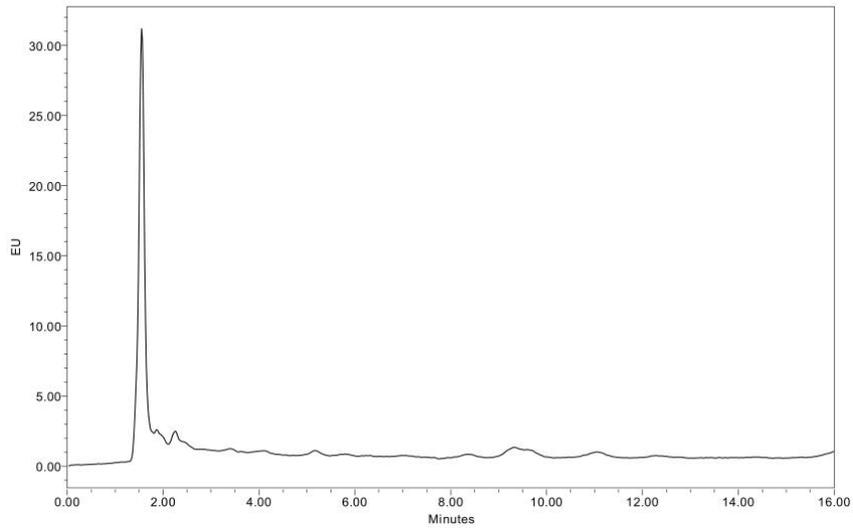


图 16. 鸡浓缩饲料空白色谱图

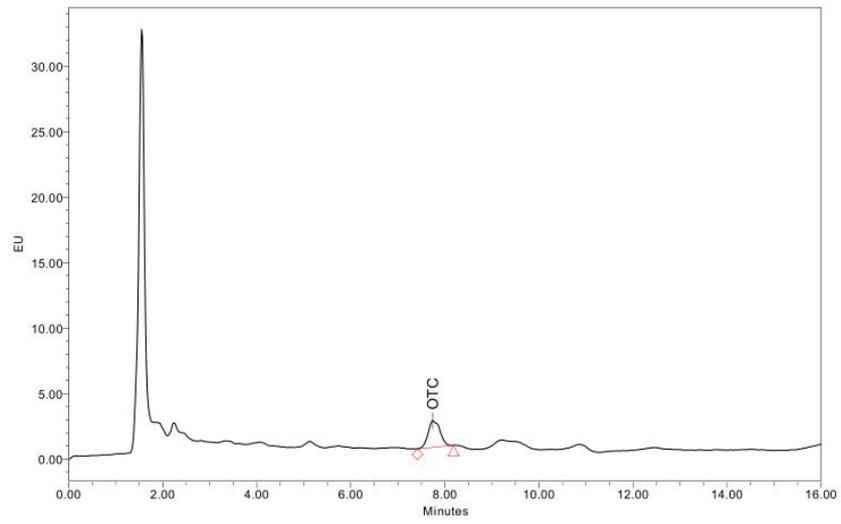


图 17. 鸡浓缩饲料添加色谱图 (2 mg/kg)

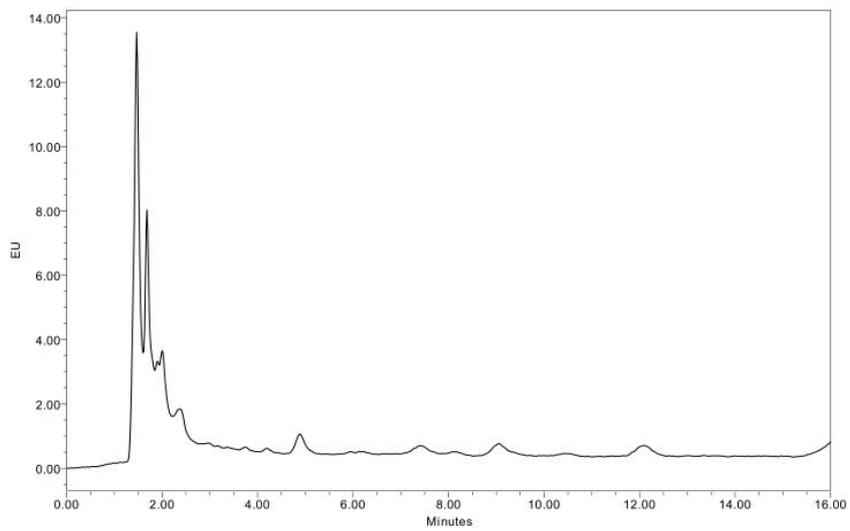


图 18. 鸡预混合饲料空白色谱图

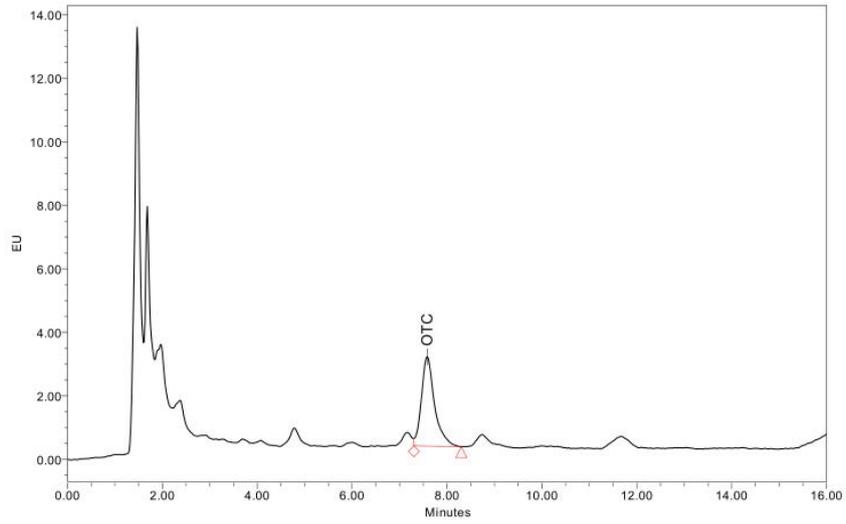


图 19. 鸡预混合饲料空白添加色谱图 (5 mg/kg)

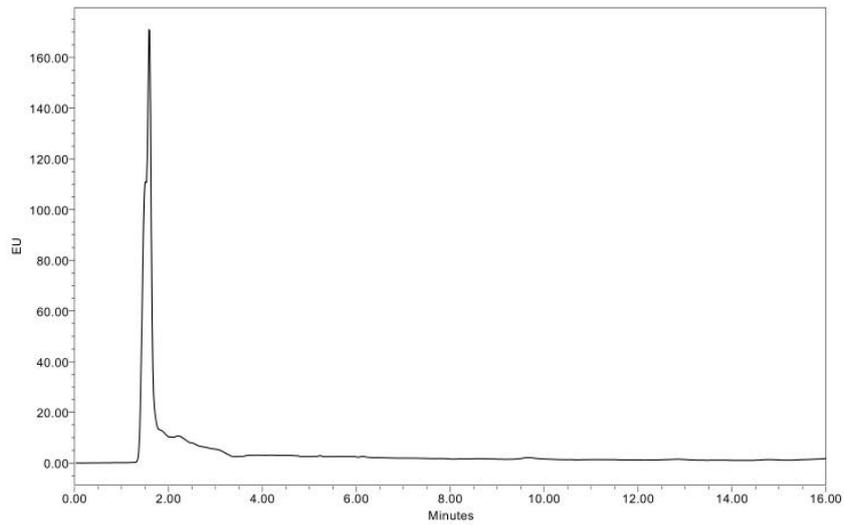


图 20. 精料补充料空白色谱图

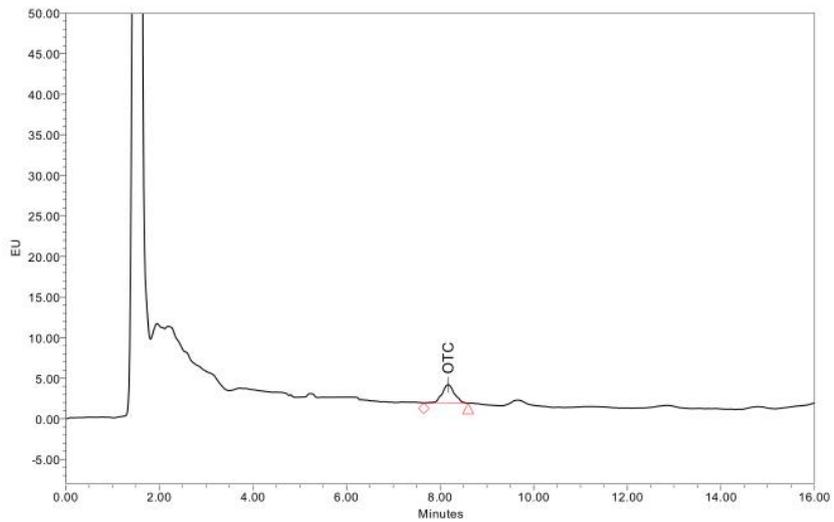


图 21. 精料补充料空白添加色谱图 (2 mg/kg)

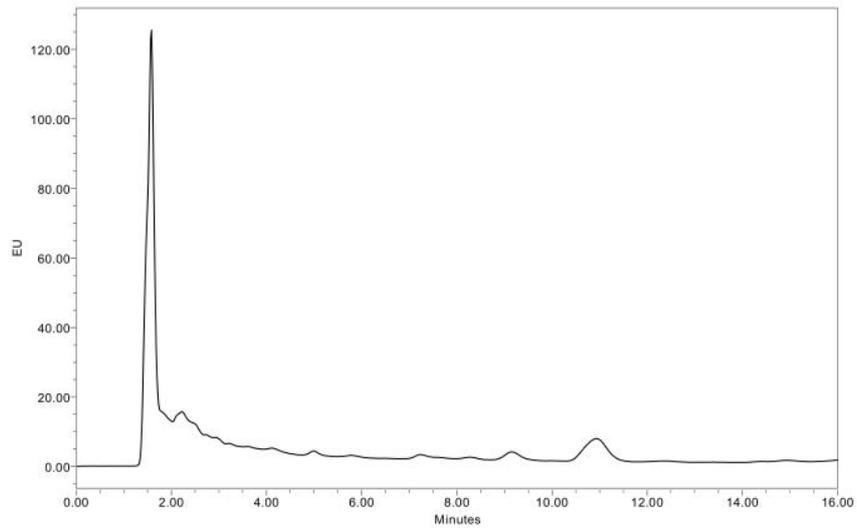


图 22. 鱼配合饲料空白色谱图

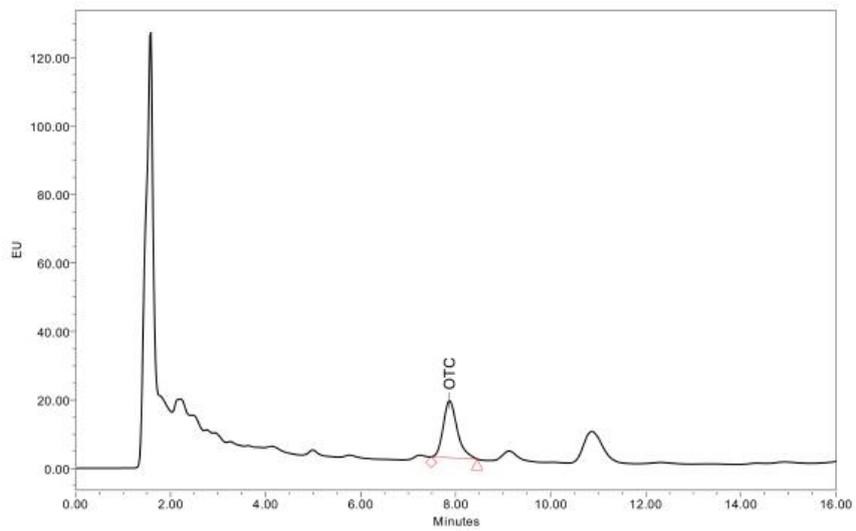


图 23. 鱼配合饲料空白添加色谱图（10 mg/kg）

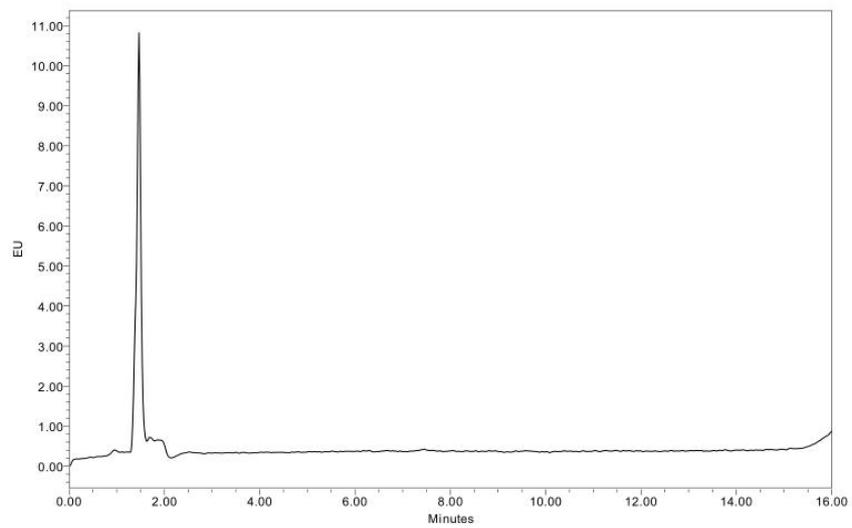


图 24. 微量元素预混料空白色谱图

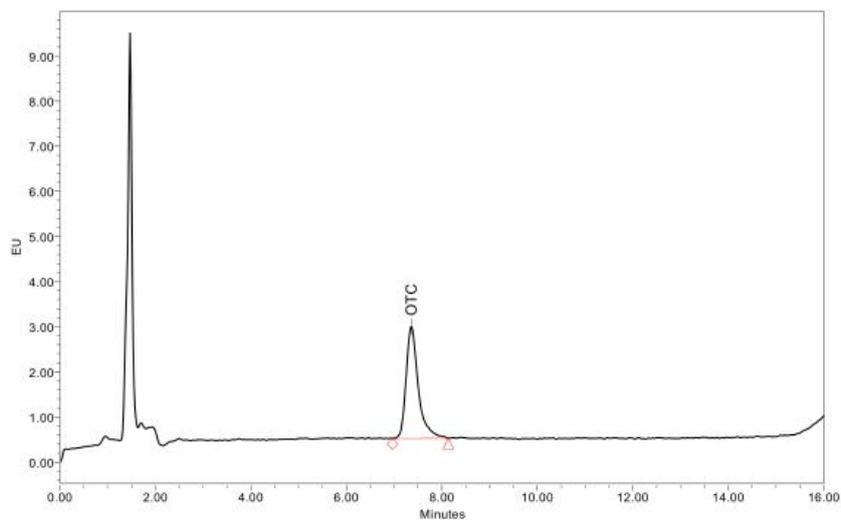


图 25. 微量元素预混料空白添加色谱图 (5 mg/kg)

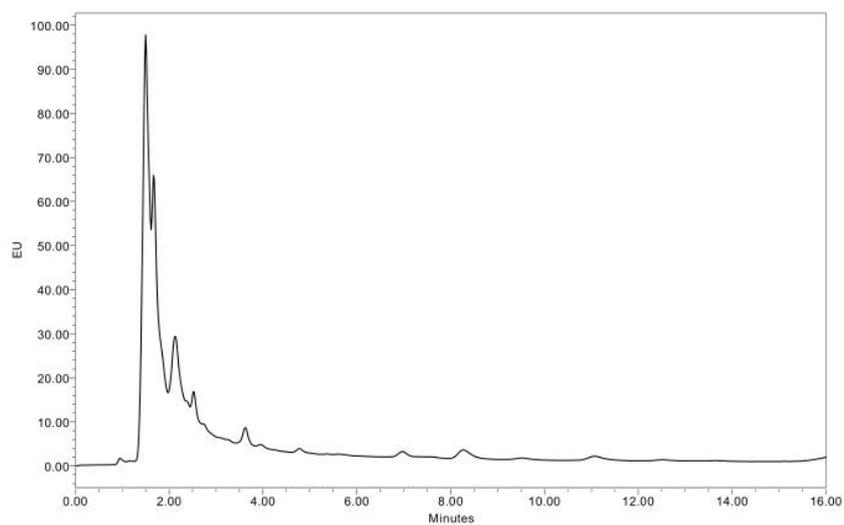


图 26. 植物提取物 (蒲公英根固体提取物) 空白色谱图

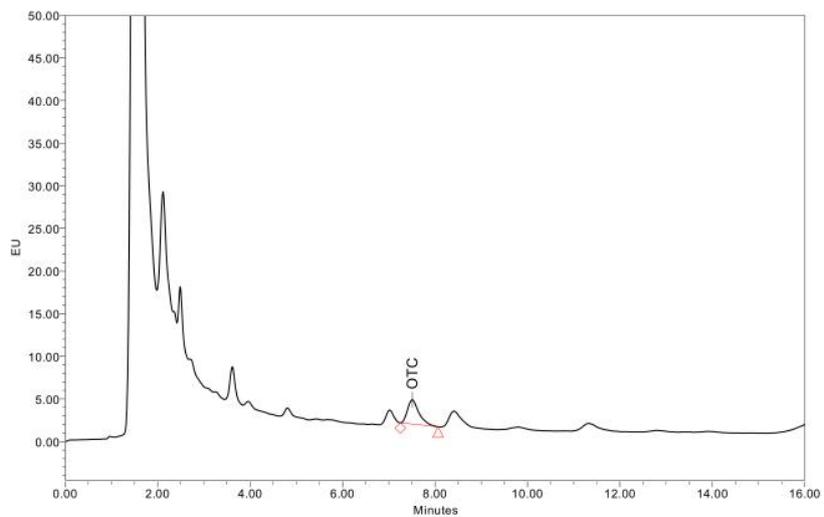


图 27. 植物提取物 (蒲公英根固体提取物) 空白添加色谱图 (5 mg/kg)

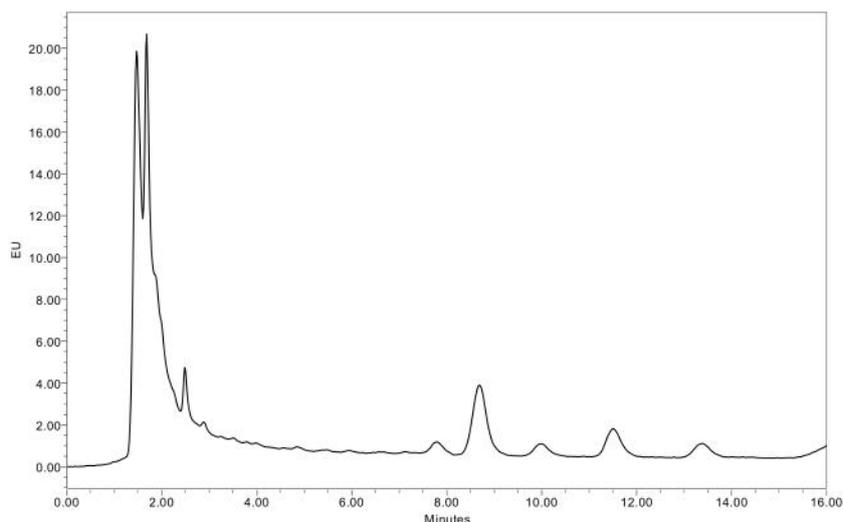


图 28. 微生物制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）空白色谱图

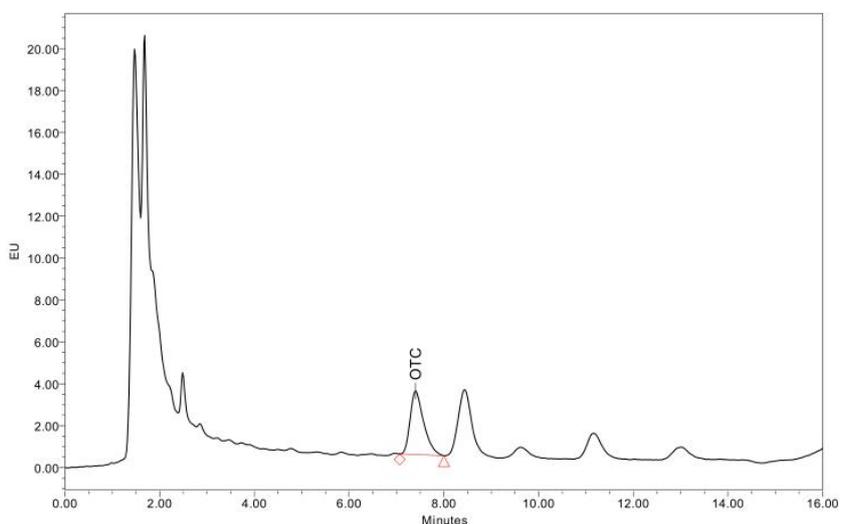


图 29. 微生物制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）空白添加色谱图（5 mg/kg）

## 2.2.2 液相色谱-串联质谱法试验条件的研究

### 2.2.2.1 液相色谱试验条件的确定

根据带电喷雾离子源质谱的工作原理，目标化合物在溶液状态下电离，因此，流动相的种类和比例不仅影响目标化合物的保留时间和峰形，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。本实验分别考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水等作为流动相，发现以乙腈-0.1%甲酸水为流动相时，响应值高，峰型好，故选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。最终色谱条件如下：

色谱柱：C18 色谱柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7  $\mu\text{m}$ ；

柱温：35  $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量：2  $\mu$ L；

流速：0.3 mL/min；

流动相：A：乙腈；B：0.1%甲酸溶液，梯度洗脱程序见表 14。

表14 梯度洗脱程序

时间(min)	A 相(%)	B 相(%)
0	10	90
1.0	10	90
3.0	40	60
4.0	40	60
4.1	10	90
5.5	10	90

#### 2.2.2.2 质谱试验条件的确定

土霉素在酸性条件下稳定，易被质子化，本方法使用 Waters ACQUITY UPLC-Xevo TQ-S 液相色谱-串联质谱仪，ESI+ 离子模式进行分析。以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相，在 ESI+ 离子模式进行全扫描。经优化，最终所获得仪器条件如下：

检测方式：多反应监测（MRM）；

毛细管电压：1.0 kV；

离子源温度：150  $^{\circ}$ C；

雾化温度：500  $^{\circ}$ C；

锥孔气流速：50 L/h；

雾化气流速：1000 L/h；

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 15。

表15 定性、定量离子的锥孔电压和碰撞能量

被测物名称	监测离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
土霉素	461.2 >426.1 <sup>a</sup>	38	18
	461.2 >337.0		26

a 为定量离子。

#### 2.2.2.3 前处理条件的选择

##### 2.2.2.3.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

配合料、浓缩料、精料补充料采用酸化甲醇提取，提取液中没有不挥发的盐，并且通过后续以水稀释，可以除去部分脂溶性杂质，净化效果可以满足检测需要。

#### 2.2.2.3.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

由于添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂提取液中含有大量不挥发的盐，同时为最大程度的除去样品中的杂质，液相色谱-串联质谱法最好对样品提取液进行净化，因此比较了 C18、PEP-2、HLB 和 Plexa 固相萃取柱，结果见表 16，可见 HLB 固相萃取柱对土霉素的净化效果和回收率均可以较好的满足试验要求。由于采用 HLB 固相萃取柱净化，洗脱液于氮气下吹干，30%甲醇 1ml 涡旋溶解残渣，过滤后上机测定。研究发现洗脱液氮气下吹干再定容至 1mL，多西环素回收率下降至 50%左右，其他 3 种四环素药物的回收率都有不同程度下降。因此，本部分采用基质标准曲线进行校正，回收率均能满足试验要求。

表16 不同固相萃取柱对的回收率的影响(n=3)

固相萃取柱	回收率 (%)
C18	93.8
PEP-2	71.0
HLB	95.1
Plexa	84.5

本试验分别考察了 20%甲醇、30%甲醇、50%甲醇、80%甲醇溶液作为稀释溶液，结果显示土霉素的响应没有明显差异。但随着有机相比比例增高，残渣中脂溶性杂质增多。综合考虑选择 20%甲醇作最终的复溶液。

#### 2.2.2.3.3 前处理步骤

##### (1) 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

提取步骤同液相方法，移取提取液 0.2 mL，加入 0.8 mL 水，涡旋混匀，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液过微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

##### (2) 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

提取步骤同液相方法。

HLB 固相萃取柱依次用甲醇、水、Mcllvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液各 3 mL 活化，准确移取备用液 1 mL 过柱，水 3 mL、10%甲醇溶液 3 mL 依次淋洗，抽干。

用甲醇 3 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40℃ 下氮气吹干。准确加入 20% 甲醇溶液 1 mL 溶解残余物，混匀后过微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 2.2.2.4 基质效应考察

采用将空白基质匹配标准溶液与纯溶剂配制标准溶液所制得的标准曲线的斜率进行比较的方法，来评价基质效应的强弱，基质效应值介于 0.85 和 1.15 之间表明无明显基质效应，大于 1.15 是基质增强，小于 0.85 是基质抑制。针对不同种类饲料的基质效应进行考察，结果见表 17，从表中可以看出，基质效应范围为 0.33~2.03，基质效应显著，因此标准采用基质匹配标准曲线进行校正。

表17 不同饲料的基质效应表

基质	基质效应
猪配合料	1.32
猪浓缩料	2.03
猪预混合饲料	1.05
鸡配合料	2.02
鸡浓缩料	0.90
鸡预混合饲料	1.23
精料补充料	1.10
鱼配合饲料	1.03
微量元素预混合饲料	0.33
植物提取物（蒲公英根固体提取物）	1.73
微生物制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）	1.06

#### 2.2.2.5 方法学考察

##### (1) 线性

配合饲料、浓缩饲料和精料补充料：

取空白试样，处理得到空白基质溶液，准确移取标准系列工作液各 50  $\mu$ L，加空白基质溶液均稀释至 1mL，制得浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。

添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂：

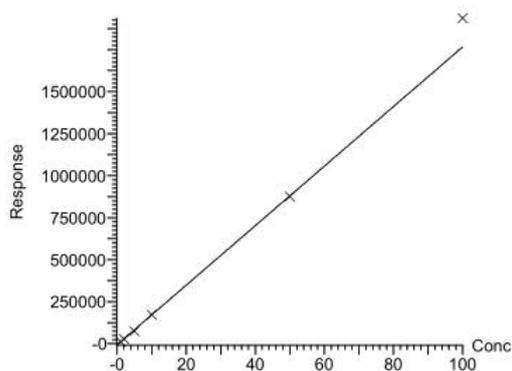
取空白试样，按处理至氮气吹干，准确移取系列标准溶液各 1mL 溶解残余物，制得浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL

的基质匹配标准系列溶液。

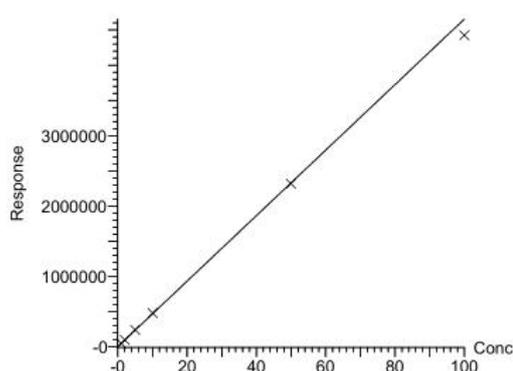
以土霉素的基质匹配标准溶液浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，各标准曲线的线性方程和相关系数见表 18。从表中可以看出，标准曲线的线性相关系数均不低于 0.99。

图 18. 土霉素基质匹配标准曲线线性方程和相关系数

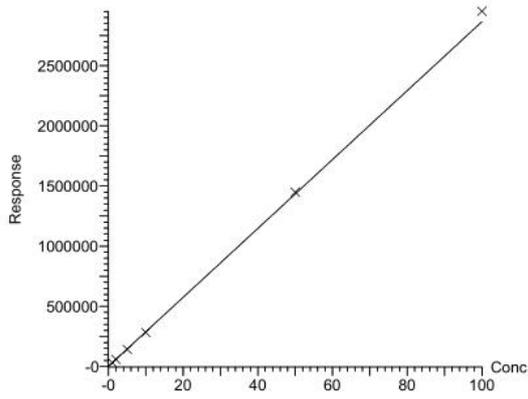
基质	线性方程	相关系数
猪配合料	$Y=17715.9 X - 5520.53$	0.9931
猪浓缩料	$Y=46506.1 X + 4621.43$	0.9986
猪预混合饲料	$Y=28621.9 X + 3095.16$	0.9993
鸡配合料	$Y=47176.4 X - 9026.3$	0.9993
鸡浓缩料	$Y=19571.7 X + 261.005$	0.9970
鸡预混合饲料	$Y=33684.7 X - 317.993$	0.9961
精料补充料	$Y=16937.6 X - 24.4921$	0.9999
鱼配合饲料	$Y=11472.6 X + 1705.09$	0.9998
微量元素预混合饲料	$Y=7372.33 X - 558.402$	0.9992
植物提取物（蒲公英根 固体提取物）	$Y=38528.5 X + 5027.4$	0.9957
微生物制剂（枯草芽孢 杆菌+酿酒酵母）	$Y=23623.5 X + 733.837$	0.9990



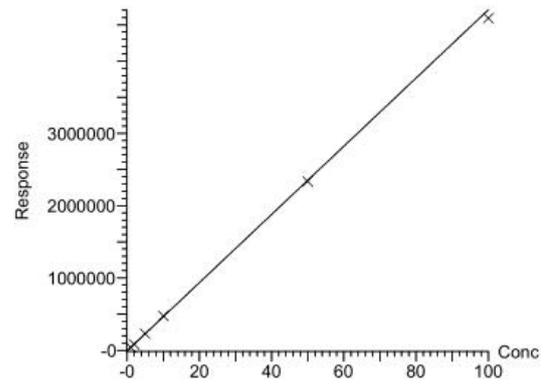
猪配合料



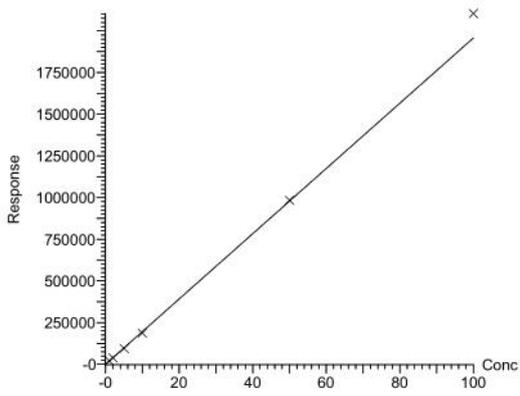
猪浓缩料



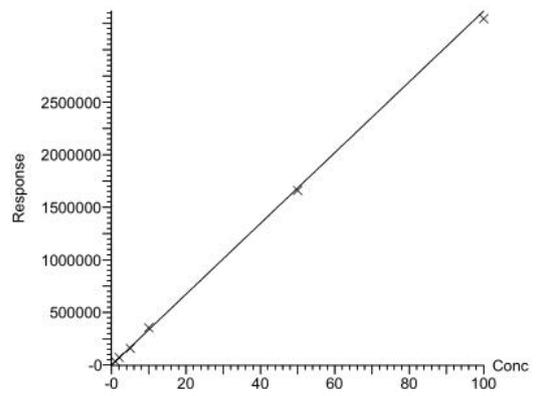
猪预混合饲料



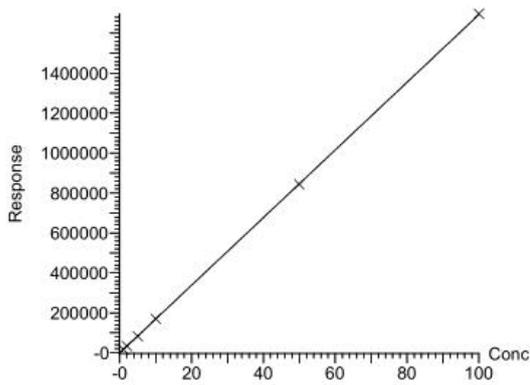
鸡配合料



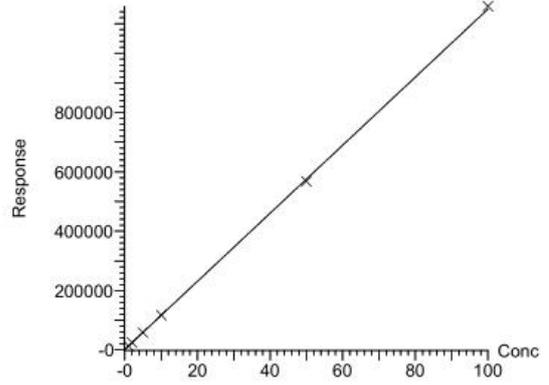
鸡浓缩料



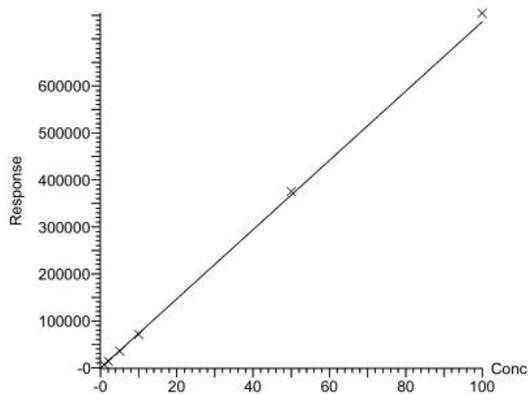
鸡预混合饲料



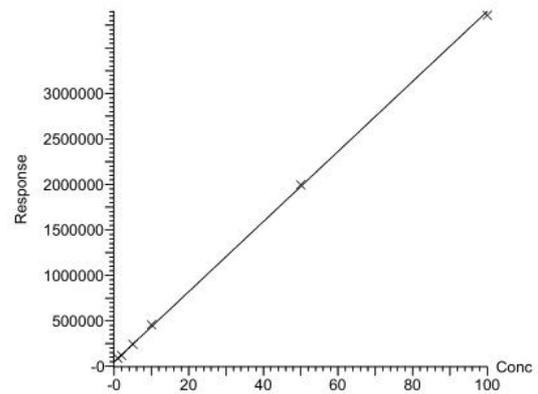
精料补充料



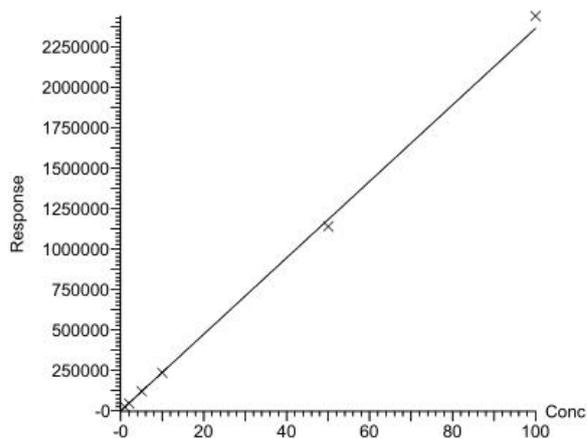
鱼配合饲料



微量元素预混合饲料



植物提取物（蒲公英根固体提取物）



微生态制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）

图 30 土霉素基质匹配标准曲线图

## (2) 方法的灵敏度

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了空白试样按相同的步骤处理后，结果表明：在相应的保留时间，空白试料对所测土霉素无干扰。

**检出限（LOD）：**根据要求，添加适量土霉素标准溶液于空白饲料中，提取后测定，依据信噪比  $S/N \geq 3$ ，确定其检出限。试验结果表明，土霉素在饲料中的检出限为 0.02 mg/kg。

**定量限（LOQ）：**根据要求，添加适量土霉素标准溶液于空白饲料中，提取后测定，依据信噪比  $S/N \geq 10$ （按 PtP 算）且添加回收试验中回收率、批间批内 RSD 满足要求，确定其定量限。试验结果表明，土霉素在饲料中的定量限为 0.05 mg/kg。

### (3) 方法的准确度和精密度考察 (LC-MS)

采用标准添加法考察了土霉素在配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和精料补充料中的添加回收情况。添加量同液相方法，分别为：猪、鸡配合饲料为 0.05 mg/kg、20 mg/kg、100 mg/kg，鱼配合饲料为 0.05 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg，浓缩饲料和精料补充料为 0.05 mg/kg、100 mg/kg、500 mg/kg，添加剂预混合饲料和混合型饲料剂的添加浓度为 0.05 mg/kg、100 mg/kg、1000 mg/kg，各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 19~表 29。

表 19 猪配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	90.2	93.4	96.8	102.5	103.5	97.3	5.9	
	II	98.0	89.3	89.4	96.4	86.4	91.9	5.5	5.9
	III	90.4	88.2	87.3	99.6	94.2	91.9	5.5	
20	I	86.5	85.3	91.4	86.1	95.5	89.0	4.9	
	II	91.5	93.2	85.6	93.2	78.1	88.3	7.4	4.9
	III	91.7	86.9	87.0	91.4	89.1	89.2	2.6	
100	I	95.8	93.5	79.2	89.1	86.6	88.8	7.3	
	II	86.5	85.0	89.5	88.5	95.1	88.9	4.4	4.8
	III	89.8	89.6	94.4	91.4	91.5	91.3	2.1	

表 20 猪浓缩饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	75.3	71.2	72.1	70.8	70.9	72.1	2.6	
	II	83.2	79.5	85.0	74.3	75.0	79.4	6.0	6.8
	III	85.0	78.9	83.5	74.5	74.3	79.2	6.3	
100	I	85.6	85.2	93.2	76.3	76.8	83.4	8.4	
	II	84.7	86.8	77.7	88.0	78.6	83.2	5.7	6.3
	III	89.0	92.4	83.0	87.6	84.2	87.2	4.3	
500	I	78.8	89.2	77.9	84.4	84.6	83.0	5.6	
	II	83.2	86.3	79.1	78.1	79.2	81.2	4.3	4.8
	III	88.2	78.0	84.9	79.3	80.2	82.1	5.2	

表 21 猪预混合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	84.6	79.2	71.7	75.1	77.5	77.6	6.2	5.6

	II	73.7	74.7	76.1	74.4	83.1	76.4	5.0	
	III	72.0	76.1	83.4	75.8	83.6	78.2	6.5	
100	I	77.9	90.9	87.2	76.3	78.7	82.2	7.8	
	II	84.1	84.0	77.4	77.1	86.9	81.9	5.4	6.3
	III	87.6	77.5	79.3	81.6	91.1	83.4	6.9	
1000	I	84.5	84.3	91.0	86.5	86.3	86.5	3.1	
	II	97.5	85.4	89.0	88.9	80.4	88.2	7.1	6.5
	III	76.1	86.8	79.7	90.7	77.8	82.2	7.6	

表 22 鸡配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	96.8	86.5	103.3	99.2	104.1	98.0	7.2	
	II	98.3	101.5	98.5	91.4	91.9	96.3	4.6	6.4
	III	88.6	99.1	85.4	88.7	98.2	92.0	6.8	
20	I	89.6	108.5	106.8	106.7	98.1	101.9	7.9	
	II	100.5	96.2	106.3	96.9	87.5	97.5	7.0	10.9
	III	85.6	85.9	77.6	83.5	82.0	82.9	4.1	
100	I	102.9	98.4	96.0	90.9	102.3	98.1	5.0	
	II	107.0	92.1	87.0	92.7	94.6	94.7	7.9	6.7
	III	107.2	89.6	101.3	102.1	105.3	101.1	6.8	

表 23 鸡浓缩饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	92.9	86.4	80.7	75.9	74.3	82.0	9.4	
	II	95.4	80.1	84.6	96.4	97.5	90.8	8.7	8.6
	III	80.8	93.2	84.1	85.2	85.2	85.7	5.3	
100	I	93.6	103.9	101.8	91.9	99.1	98.1	5.3	
	II	95.3	88.9	104.3	98.6	101.8	97.8	6.1	5.0
	III	95.5	89.5	93.6	97.1	96.7	94.5	3.3	
500	I	89.8	79.2	86.4	95.4	79.6	86.1	8.0	
	II	79.0	87.6	97.4	79.3	91.8	87.0	9.2	7.1
	III	92.4	94.1	90.6	92.7	90.6	92.1	1.6	

表 24 鸡预混合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	90.4	84.6	79.0	71.7	80.0	81.1	8.6	
	II	88.4	81.9	85.6	80.0	79.1	83.0	4.7	5.7
	III	85.7	82.4	79.4	83.3	87.3	83.6	3.7	

100	I	86.6	91.9	87.4	101.1	102.4	93.9	8.0	9.5
	II	104.0	89.3	104.5	98.3	105.4	100.3	6.7	
	III	79.3	94.0	88.7	87.8	79.3	85.8	7.5	
1000	I	96.3	81.6	94.5	88.5	86.8	89.5	6.7	6.1
	II	92.5	92.6	94.7	92.5	85.8	91.6	3.7	
	III	81.2	97.6	81.2	89.3	93.5	88.6	8.3	

表 25 精料补充料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	77.9	80.7	82.8	80.6	83.6	81.1	2.7	7.0
	II	83.4	92.3	90.9	83.3	94.1	88.8	5.7	
	III	78.3	95.1	93.4	82.4	82.4	86.3	8.6	
100	I	82.9	89.0	78.4	87.6	90.9	85.8	5.9	5.7
	II	78.8	76.1	88.4	90.7	82.3	83.3	7.4	
	III	81.8	86.0	83.2	91.3	86.7	85.8	4.3	
500	I	100.8	92.0	92.4	92.5	107.2	97.0	7.0	4.6
	II	96.6	97.7	88.9	92.4	94.4	94.0	3.7	
	III	95.0	96.0	94.3	93.0	96.7	95.0	1.5	

表 26 鱼配合饲料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	88.2	84.6	93.9	83.5	95.7	89.2	6.1	6.4
	II	97.0	86.5	87.3	93.1	95.5	91.9	5.2	
	III	80.9	80.1	86.1	87.8	96.1	86.2	7.5	
100	I	83.4	88.9	84.0	93.0	97.9	89.4	6.9	5.2
	II	87.2	90.4	88.9	92.6	95.2	90.9	3.5	
	III	87.6	85.6	98.5	90.4	94.7	91.4	5.7	
300	I	92.4	82.2	97.7	87.2	79.5	87.8	8.4	6.5
	II	78.4	86.8	97.6	83.2	91.0	87.4	8.4	
	III	85.9	89.4	87.5	84.9	88.6	87.3	2.1	

表 27 微量元素预混料中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
0.05	I	84.6	85.0	70.7	78.8	70.5	77.9	9.1	9.2
	II	85.0	77.9	83.1	87.6	92.5	85.2	6.3	
	III	98.2	81.9	92.4	87.2	78.1	87.6	9.2	
100	I	88.9	83.4	90.9	83.4	95.2	88.4	5.7	6.7
	II	91.5	97.3	95.3	81.1	94.1	91.9	6.9	

	III	79.9	94.3	81.0	89.0	92.2	87.3	7.5	
<b>1000</b>	I	88.1	86.8	83.9	80.2	84.2	84.6	3.6	
	II	86.0	92.1	86.1	87.2	86.8	87.6	2.9	4.7
	III	84.0	79.8	76.7	82.5	80.2	80.6	3.5	

表 28 植物提取物（蒲公英根固体提取物）中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
<b>0.05</b>	I	97.7	97.5	100.0	101.6	107.3	100.8	4.0	
	II	97.1	97.6	93.4	96.5	85.6	94.0	5.3	4.7
	III	101.5	98.4	98.5	96.5	98.3	98.6	1.8	
<b>100</b>	I	94.4	94.4	97.3	97.2	103.7	97.4	3.9	
	II	88.3	84.6	96.7	95.4	90.0	91.0	5.5	5.9
	III	99.1	92.8	98.7	107.1	98.0	99.1	5.2	
<b>1000</b>	I	98.6	97.1	81.3	96.0	98.4	94.3	7.8	
	II	97.0	93.8	85.0	94.4	92.3	92.5	4.9	5.8
	III	91.8	98.2	98.3	97.0	86.4	94.3	5.5	

表 29 微生态制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）中土霉素添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	测定批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5			
<b>0.05</b>	I	97.8	86.8	96.1	93.8	93.1	93.5	4.5	
	II	90.6	98.5	94.8	103.5	96.4	96.8	4.9	4.1
	III	98.1	96.5	98.7	97.9	99.1	98.1	1.0	
<b>100</b>	I	95.4	96.2	105.6	95.4	105.7	99.7	5.5	
	II	102.3	98.3	93.6	99.7	101.0	99.0	3.4	4.2
	III	92.7	101.8	98.8	95.4	101.9	98.1	4.1	
<b>1000</b>	I	97.2	89.8	98.9	91.4	87.7	93.0	5.2	
	II	87.0	95.8	100.3	92.0	101.9	95.4	6.4	5.6
	III	101.2	98.9	90.2	102.1	92.8	97.0	5.4	

从表中可以看出，本方法在空白饲料中添加 0.05 mg/kg~1000 mg/kg 的土霉素，回收率为 70.5%~108.5%，批内、批间相对标准偏差均小于 10.9%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量的土霉素测定均有较好的准确度。不同饲料的空白及空白添加样品的特征离子色谱见图 31~图 53。

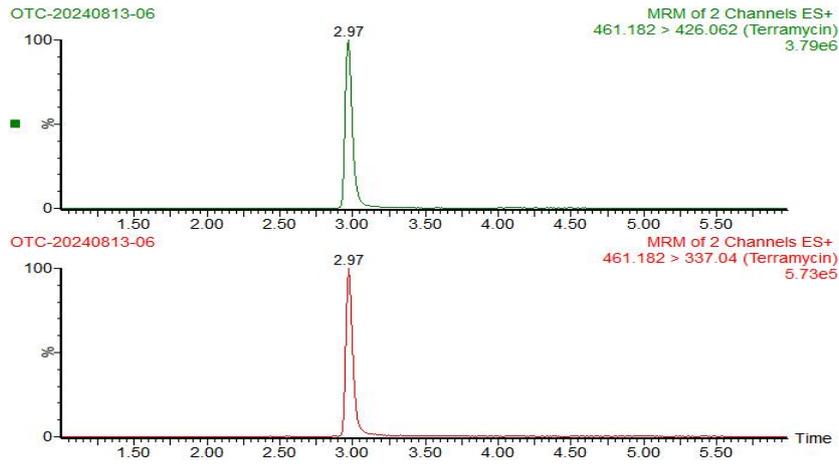


图 31.土霉素标准溶液特征离子色谱图 (10 ng/mL)

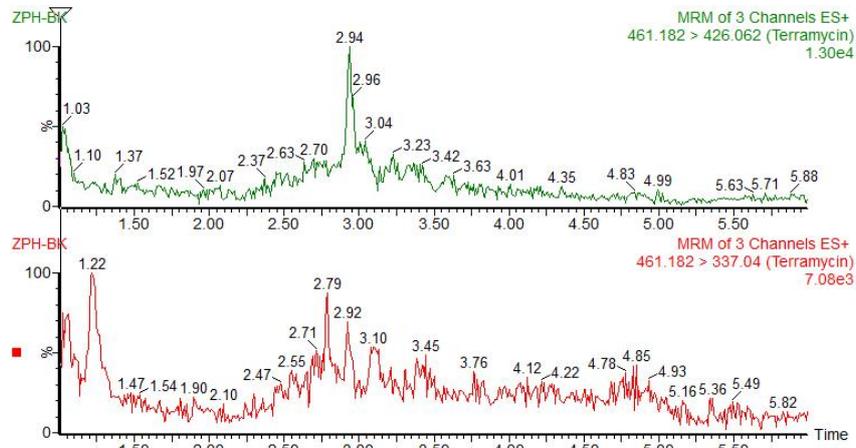


图 32.猪配合饲料空白特征离子色谱图

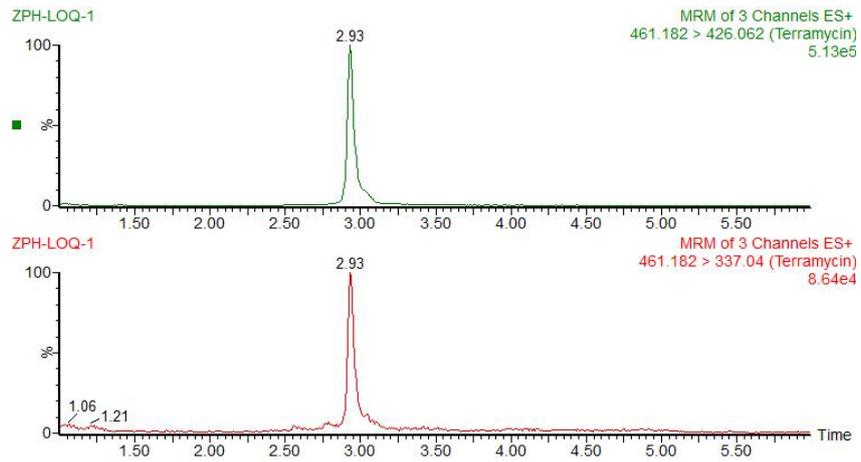


图 33.猪配合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

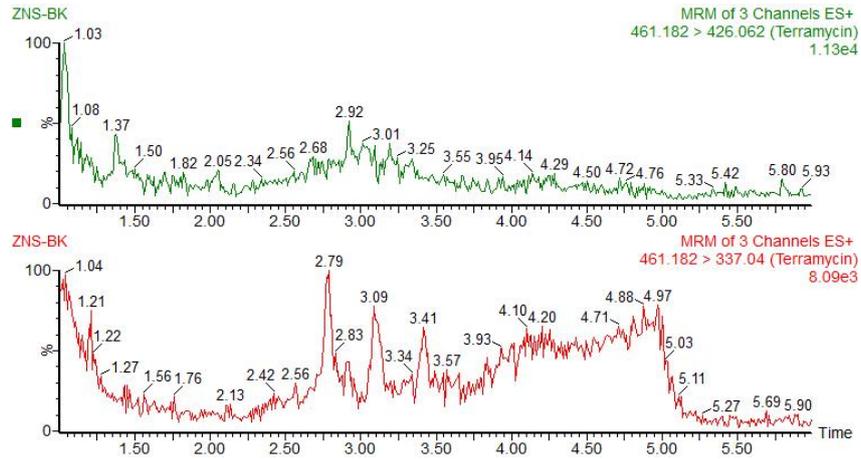


图 34.猪浓缩饲料空白特征离子色谱图

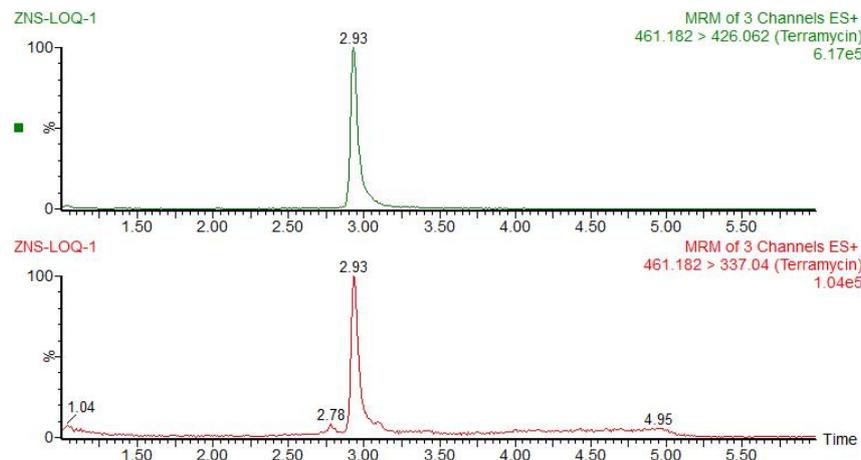


图 35.猪浓缩饲料空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

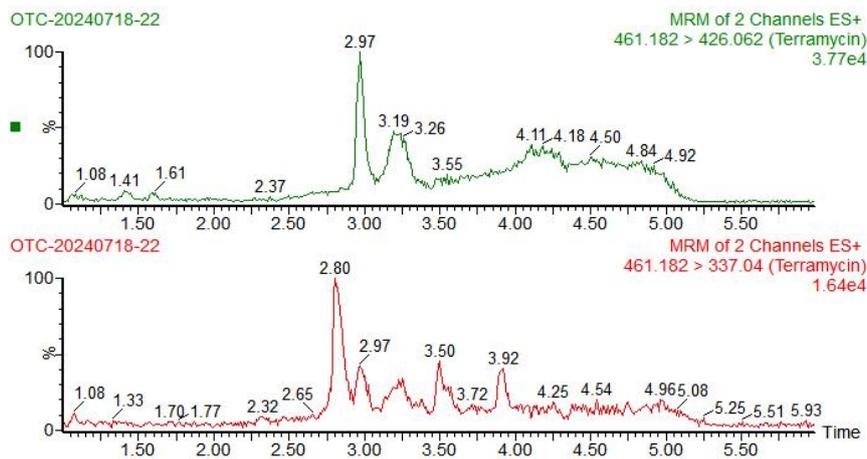


图 36.猪预混合饲料空白特征离子色谱图

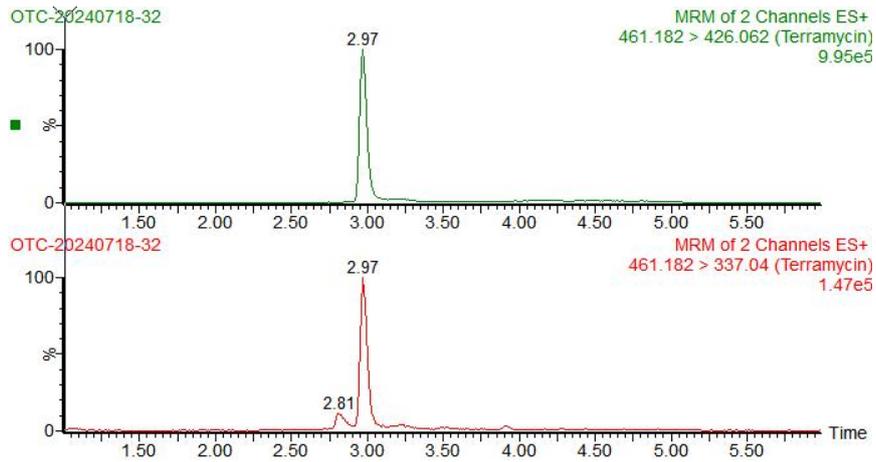


图 37.猪预混合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图（0.05 mg/kg）

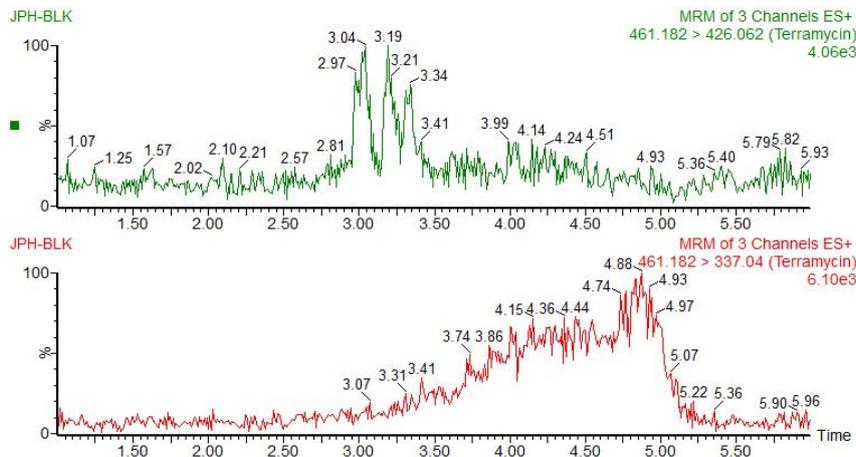


图 38.鸡配合饲料空白特征离子色谱图

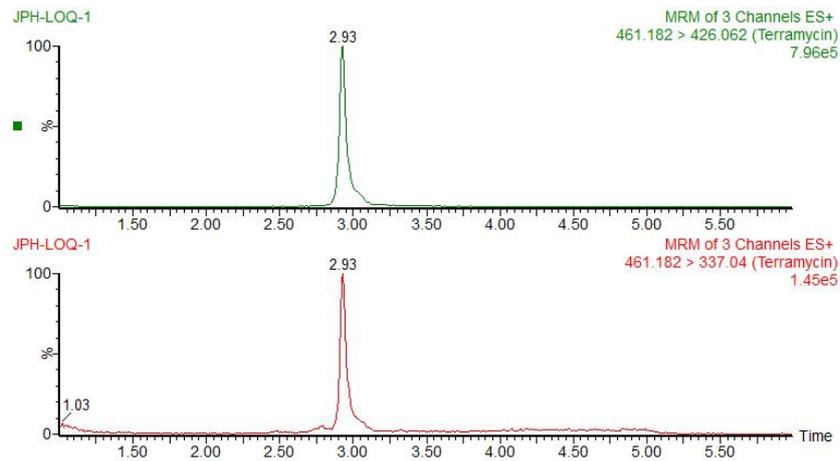


图 39.鸡配合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图（0.05 mg/kg）

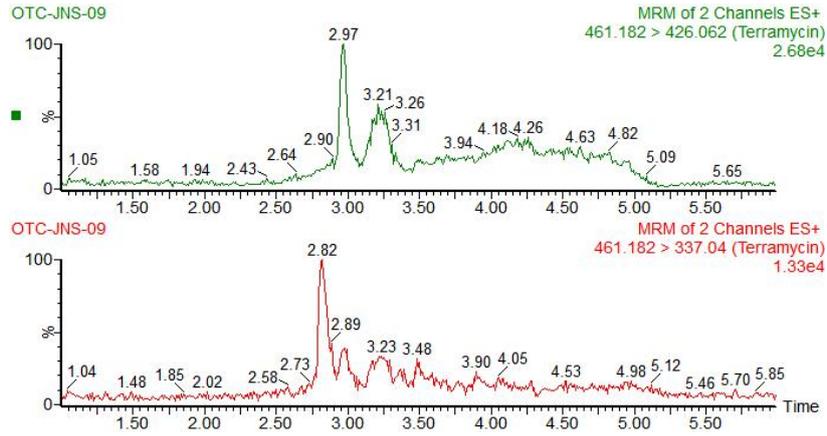


图 40.鸡浓缩饲料空白特征离子色谱图

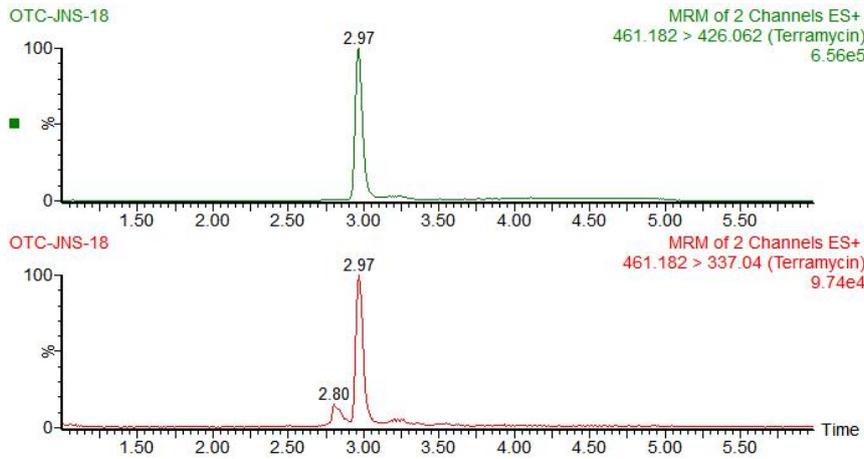


图 41.鸡浓缩饲料空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

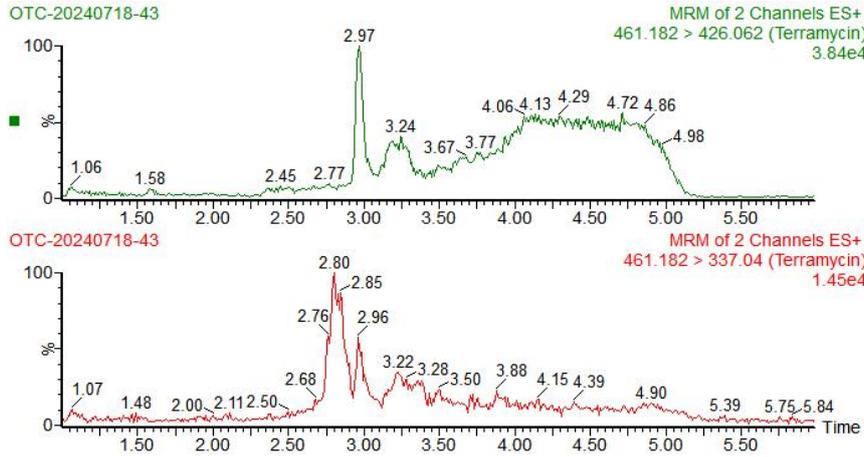


图 42.鸡预混合饲料空白特征离子色谱图

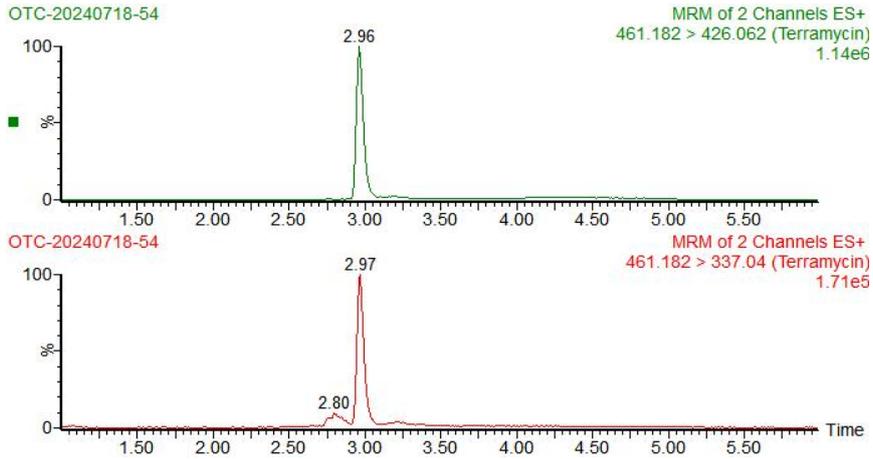


图 43.鸡预混合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图（0.05 mg/kg）

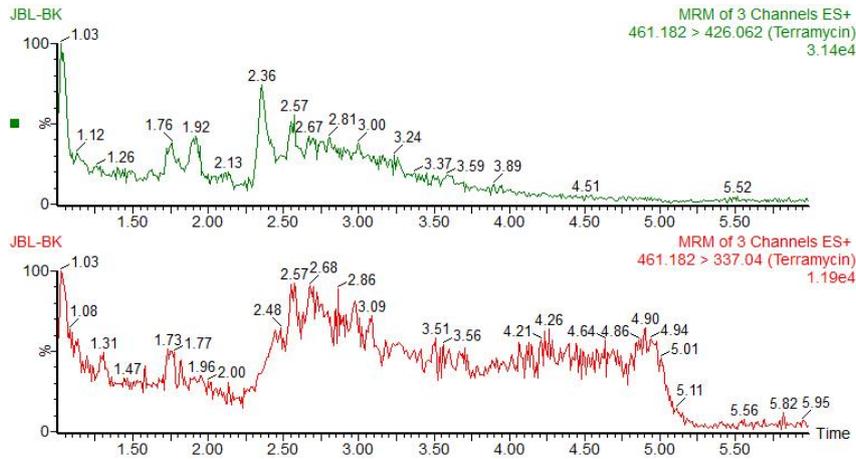


图 44.精料补充料空白特征离子色谱图

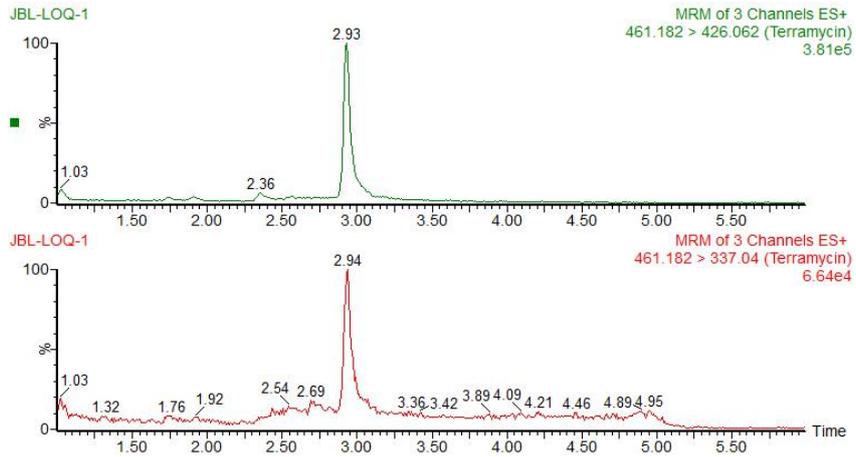


图 45.精料补充料空白添加土霉素特征离子色谱图（0.05 mg/kg）

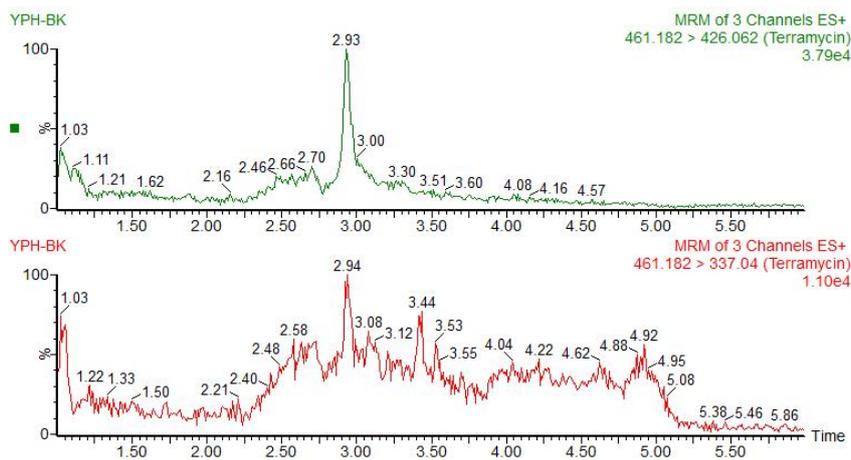


图 46.鱼配合饲料空白特征离子色谱图

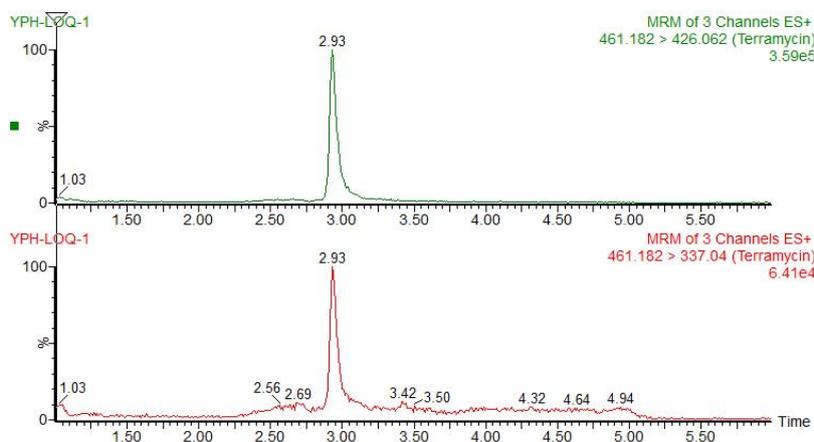


图 47.鱼配合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

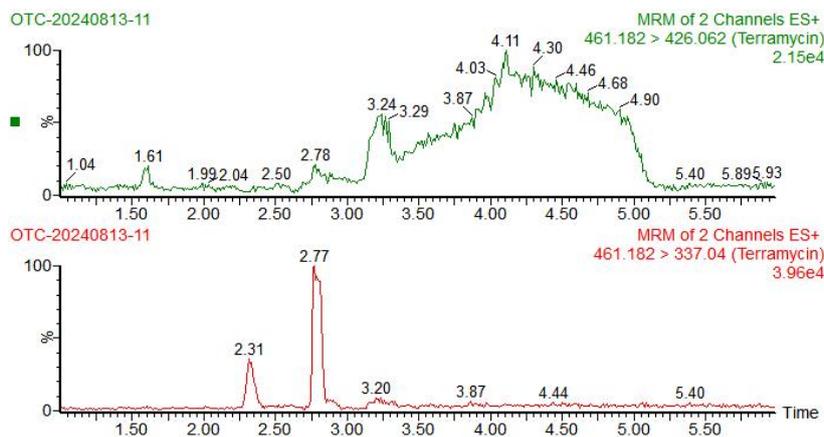


图 48.微量元素预混合饲料空白特征离子色谱图

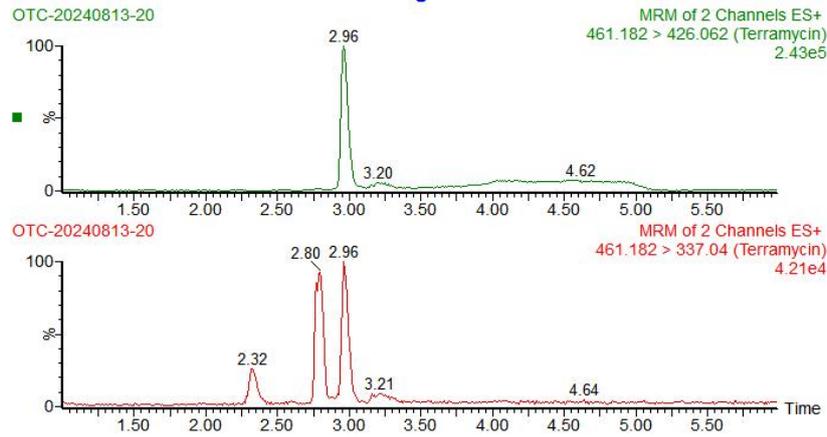


图 49.微量元素预混合饲料空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

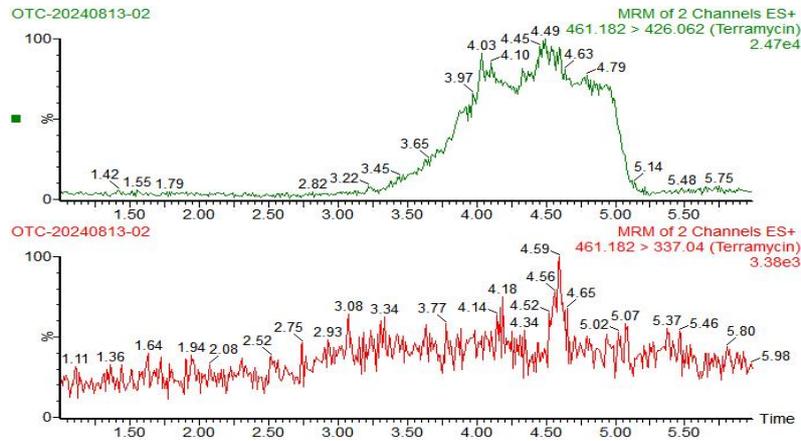


图 50.植物提取物（蒲公英根固体提取物）空白特征离子色谱图

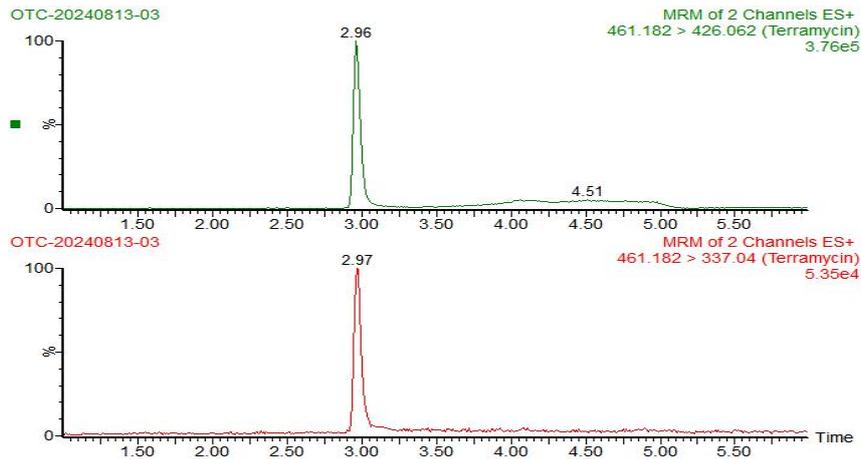


图 51.植物提取物（蒲公英根固体提取物）空白添加土霉素特征离子色谱图 (0.05 mg/kg)

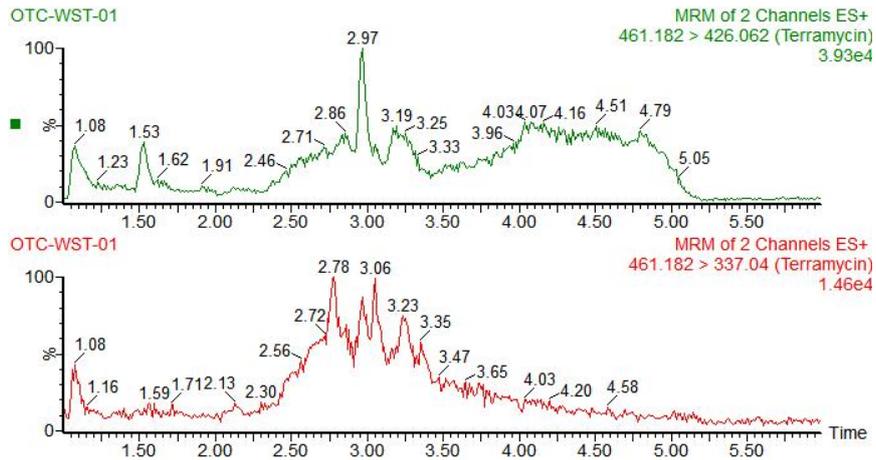


图 52.微生物制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）空白特征离子色谱图

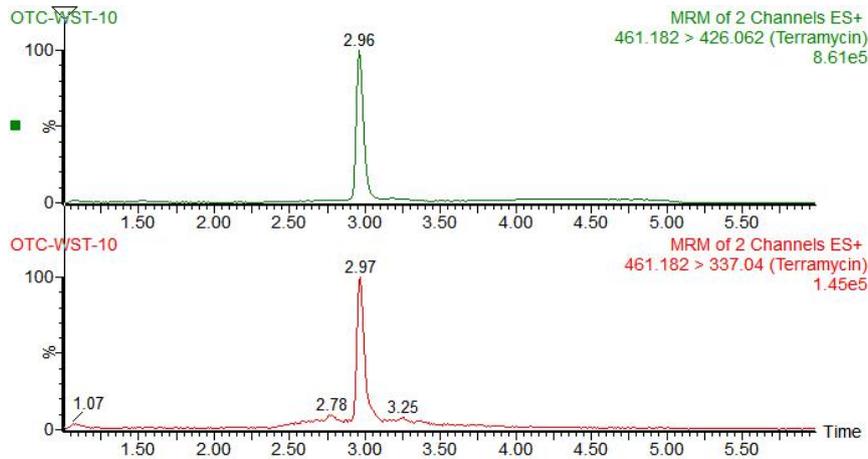


图 53.微生物制剂（枯草芽孢杆菌+酿酒酵母）空白添加土霉素特征离子色谱图  
(0.05 mg/kg)

### 2.2.3 标准溶液稳定性考察

采用高效液相色谱-紫外检测法进行稳定性实验，试验条件如下：

色谱柱：Waters XBridge C<sub>18</sub>柱；检测器：紫外检测器；检测波长：350 nm；  
进样量：20 μL；流动相：乙腈-0.01 mol/L三氟乙酸（10+90），等度洗脱。将土霉素贮备液（1 mg/mL）及土霉素标准中间工作液(100 μg/mL)分别稀释至10 μg/mL上机测定。土霉素贮备液稳定性如图54所示，土霉素标准中间工作液稳定性如图55所示。因此我们将土霉素贮备液的有效期定为1个月，将浓度为100 μg/mL的土霉素中间液的有效期定为1周。由于土霉素药物不稳定，因此，标准工作液浓度低于100 μg/mL以下时建议现用现配。

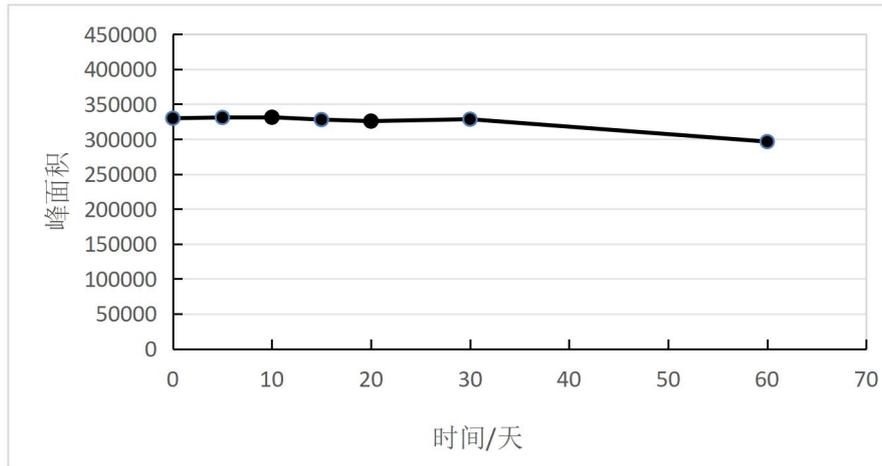


图 54 土霉素标准贮备液稳定性(1 mg/mL)

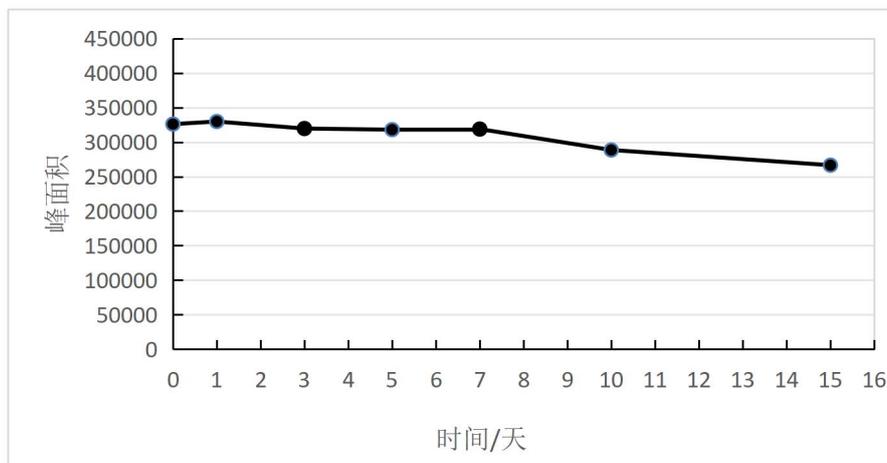


图 55 土霉素标准中间工作液稳定性(100 µg/mL)

## 2.2.4 标准内容说明

### 2.2.4.1 检测方法基本原理

#### (1) 液相色谱法

配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用盐酸甲醇提取样品中的土霉素并用水稀释，添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液提取样品中的土霉素，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

#### (2) 液相色谱-串联质谱法

配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用盐酸甲醇提取样品中的土霉素并用水稀释。添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液提取样品中的土霉素，HLB 固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配外标法定量。

### 2.2.4.2 准确度结果

根据土霉素检测方法不同添加浓度的回收率原则要求，三个复核单位的高效液相色谱法回收率范围也都在 %~ %之间，批内批间变异系数也都小于 %；液相色谱-串联质谱法回收率范围也都在 %~ %之间，批内批间变异系数也都小于 %。因此本方法将回收率范围定在 %~ %之间。

### 2.2.5 结论

本标准建立了饲料中土霉素的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法，明确规定了适用范围、提取净化方法以及高效液相色谱条件、质谱条件等，具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

### 2.3 修订前后技术内容的对比

本修订稿与 GB/T 22259-2008 的比较见表 30。

表 30 修订稿与 GB/T 22259-2008 的比较

GB/T 22259-2008		修订稿		修订内容
章节号和章节标题	内容	章节号和章节标题	内容	
标题	饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法	标题	饲料中土霉素的测定	增加液质方法，名字更改为《饲料中土霉素的测定》
1 范围	<p>本标准规定了饲料中土霉素含量的高效液相色谱测定方法。</p> <p>本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中土霉素的测定，检出限为 0.5 mg/kg, 定量限为 2mg/kg.</p>	1 范围	<p>本文件规定了饲料中土霉素的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。</p> <p>本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、水产饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂中土霉素的测定。</p> <p>本文件高效液相色谱法配合料、浓缩料和精补料的检出限为 1 mg/kg, 定量限为 2 mg/kg; 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂的检出限为 2 mg/kg, 定量限为 5 mg/kg; 水产饲料的检出限为 5.0 mg/kg, 定量限为 10.0 mg/kg。液相色谱-串联质谱法在的检出限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.05 mg/kg。</p>	<p>适用范围增加了水产饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂。</p> <p>更改了液相方法检出限和定量限，增加了液质方法的检出限和定量限。</p>
2 规范性引用文件	<p>下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款，凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。</p> <p>GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682- 1992, neq ISO 3696:1987)</p> <p>GB/T 14699.1 饲料 采样</p> <p>GB/T 20195 动物饲料 试样的制备</p>	2 规范性引用文件	<p>下列文件中的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。</p> <p>GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法</p> <p>GB/T 20195 动物饲料 试样的制备</p>	更新了规范性引用文件声明。

/	/	3 术语和定义	本文件没有需要界定的术语和定义。	增加了“术语和定义”。
3 原理	试样中土霉素经酸性溶液提取后，注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离,用紫外检测器（或二极管阵列检测器）检测，外标法计算土霉素的含量。	4.1 原理	配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用酸化甲醇提取样品中的土霉素并用水稀释，添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用Mcllvaine-Na <sub>2</sub> EDTA缓冲液提取样品中的土霉素，高效液相色谱荧光法测定，外标法定量。	更改了液相方法原理。
4 试剂和溶液	<p>除特殊说明外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水，色谱用水符合 GB/T/5682中一级用水规定。</p> <p>4.1 盐酸：优级纯。</p> <p>4.2 盐酸溶液(0.05mol/L)：取盐酸(4.1)4.5mL，溶解于1000 mL水中</p> <p>4.3 乙腈:色谱纯。</p> <p>4.4 磷酸二氢钠。</p> <p>4.5 磷酸。</p> <p>4.6 磷酸盐缓冲液：取磷酸二氧钠(4.4)1.2g.加水使溶解并稀释至1000 mL,用磷酸(4.5)调pH 值至3.50，摇匀，过滤。</p> <p>4.7 土霉素标准品：纯度应大于 97.0%</p> <p>4.8 土霉素标准贮备液：准确称取已知纯度的土霉素标准品 20 mg,置于 100 mL 棕色容量瓶中，用盐酸溶液(4.2)溶解定容、摇匀，其浓度为0.2 mg/mL。贮存于4℃冰箱中，溶液有效期1个月。</p> <p>4.9 土霉素标准曲线工作液：分别准确移取标准贮备液(4.8)0.05、0.50、2.50、7.50、12.5、25 mL于100 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度。该标准系列中土霉素的相应浓度分别为 0.1、1、5、15、25、50 ug/mL。现配现用。</p>	4.2 试剂或材料	<p>除非另有规定，仅使用分析纯试剂。</p> <p>4.2.1 水：GB/T 6682，一级。</p> <p>4.2.2 甲醇：色谱纯。</p> <p>4.2.3 盐酸甲醇：移取 10 mL 盐酸于 1000 mL 甲醇中混匀。</p> <p>4.2.4 50% 甲醇：移取 50 mL 甲醇，加水至 100 mL，混匀。</p> <p>4.2.5 盐酸溶液（1 mol/L）：移取盐酸 9 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。</p> <p>4.2.6 氢氧化钠溶液（10 mol/L）：称取氢氧化钠 40 g，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。</p> <p>4.2.7 Mcllvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液：分别称取一水柠檬酸 12.9 g，十二水磷酸氢二钠 27.6 g，二水乙二胺四乙酸二钠 37.2 g，加水 900 mL 溶解，用盐酸溶液（4.2.5）或氢氧化钠溶液（4.2.6）调 pH 至 4.0±0.5，加水稀释至 1000 mL，混匀，即得。</p> <p>4.2.8 EDTA-CaCl<sub>2</sub>-乙酸盐缓冲液：取乙二胺四乙酸二钠（C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O）9.3 g，加水 500 mL，溶解，加氢氧化钠 4.0 g，溶解，冷至室温，再依次加无水氯化钙 5.5 g，乙酸 5.7 mL，混匀，加水至 1 000 mL，用氢氧化钠溶液（4.2.6）调 pH 至 6.6±0.1。</p> <p>.....</p>	更改了溶液及其配制方法。

5 仪器和设备	<p>5.1 分析天平:感量 0.000 1 g。  5.2 振荡器。  5.3 超纯水处理器。  5.4 高效液相色谱仪:紫外检测器 (或二极管阵列检测器)。  5.5 pH 计。  5.6 0.45 μm 滤膜。</p>	4.3 仪器设备	<p>4.3.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。  4.3.2 天平:感量 0.01g 和 0.01 mg。  4.3.4 离心机:转速≥10 000 r/min。  4.3.5 涡旋混合器。  4.3.6 旋涡振荡器。  4.3.7 超声波清洗器。  4.3.8 酸度计。</p>	<p>高效液相色谱仪检测器更改为荧光检测器;  增加了离心机、涡旋振荡器、超声波清洗器等仪器。</p>
6 试样制备	<p>6.1 按 GB/T 14699.1 采样。  6.2 选取具有代表性的饲料样品至少 500 g, 按 GB/T 20195 制备样品。</p>	4.4 样品	<p>按GB/T 20195制备样品,至少200 g,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。</p>	<p>更改了样品制备方法。</p>
7 试样溶液的制备	<p>称取试样适量 (配合饲料 10 g、浓缩饲料 5g、预混料 1 g)精确至 1 mg。置于 250 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 100 mL 盐酸溶液 (4.2),于振荡器上振荡提取 10 min,溶液用滤纸过滤或用盐酸溶液(4.2)作适当稀释,滤液过 0.45 μm 滤膜(5.6),备用。</p>	4.5 试验步骤	<p>4.5.1 提取  4.5.1.1 配合饲料、浓缩饲料及精料补充料  平行做两份试验。称取试样 5 g,精确至 0.01 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入盐酸甲醇 (4.2.3) 25 mL,涡旋混合后振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min,移取上清液 0.5 mL,加入 0.5 mL 水 (4.2.1),涡旋混匀, 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液过微孔滤膜 (4.2.12),供 HPLC 测定。  4.5.1.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂  平行做两份试验。称取试样 2 g,精确至 0.01 g,置于 50 mL 离心管中,加入 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液 (4.2.7) 20 mL,涡旋混合后振荡 10 min,超声提取 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min,移取上清液至另一离心管中。残渣分别用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液 (4.2.7) 20 mL、10 mL 重复提取两次,合并三次上清液,用 McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液缓冲液 (4.2.7) 定容至 50 mL,混匀备用。取备用液过微孔滤膜</p>	<p>更改了液相方法的试验步骤。</p>

			(4.2.12), 供 HPLC 测定。																			
7.2 色谱条件	<p>7.2.1 色谱柱: C<sub>g</sub> 柱,柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径为 5<math>\mu</math>m, 或相当者。</p> <p>7.2.2 柱温: 室温。</p> <p>7.2.3 流动相: 磷酸缓冲液(4.6)+乙腈=84+16, 混匀, 脱气。</p> <p>7.2.4 流速: 1.0 mL/min。</p> <p>7.2.5 检测器: 紫外检测器(或二极管阵列检测器), 检测波长 353 nm。</p> <p>7.2.6 进样量: 20 <math>\mu</math>L。</p>	4.5.2.1 液相色谱参考条件	<p>液相色谱参考条件如下:</p> <p>a) 色谱柱: C<sub>18</sub> 柱, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 <math>\mu</math>m, 或性能相当者;</p> <p>b) 柱温: 30 <math>^{\circ}</math>C;</p> <p>c) 检测波长: 激发波长 390nm, 发射波长 512nm;</p> <p>d) 流速: 1.0 mL/min;</p> <p>e) 进样量: 20 <math>\mu</math>L;</p> <p>f) 流动相: A 相: EDTA-CaCl<sub>2</sub>-乙酸盐缓冲液, B 相: 甲醇, 梯度洗脱, 见表 1。</p> <p>表 1 梯度洗脱条件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间(min)</th> <th>A 相(%)</th> <th>B 相(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table>	时间(min)	A 相(%)	B 相(%)	0	75	25	20	30	70	24	30	70	28	75	25	30	75	25	更改了液相色谱条件。
时间(min)	A 相(%)	B 相(%)																				
0	75	25																				
20	30	70																				
24	30	70																				
28	75	25																				
30	75	25																				
/	/	4.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定	在仪器的最佳条件下, 分别取标准系列溶液(4.2.11)和试样溶液(4.5.1)上机测定。在上述色谱条件下, 土霉素标准溶液色谱图见附录 A。	增加了标准系列溶液和试样溶液测定方法。																		
/	/	4.5.3.3 定性	以保留时间定性, 试样溶液中土霉素保留时间应与标准工作溶液(浓度相当)中土霉素的保留时间一致, 其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。	增加了定性要求, 规定了保留时间相对偏差范围。																		
7.3 定量测定	按上述色谱条件, 分别将土霉素标准曲线工作液(4.9)及试样溶液(7.1)上机测定, 以单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定	4.5.3.4 定量	以土霉素的浓度为横坐标, 色谱峰面积(响应值)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其线性相关系数应不低于 0.99。试样溶液(4.5.1)中土霉素的浓度应在标准曲线	更改了定量方法, 增加了超范围样品稀释方法。																		

	量。		的线性范围内。如超出范围，配合饲料、浓缩饲料及精料补充料试样溶液用50%甲醇（4.2.4），添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂试样溶液用McIlvaine-Na <sub>2</sub> EDTA缓冲液缓冲液（4.2.7）稀释（n倍）后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液（4.5.1）中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。	
8 结果计算	<p>试样中土霉素的含量(X)以质量分数(mg/kg)表示，按式(1)计算：</p> $X = \frac{C}{m} \times V \dots\dots\dots(1)$ <p>式中：  X——试样中土霉素的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；  C——试样溶液中土霉素的含量，单位为微克每毫升(ug/mL)；  m- 试样质量，单位为克(g)；  V—样品的稀释液总体积，单位为毫升(mL)。  结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。</p>	4.6 试验数据处理	<p>试样中土霉素的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示。多点校准按式 (1) 计算；单点校准按式 (2) 计算：</p> $w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots(1)$ <p>式中：  ρ——从标准曲线查得的试样溶液土霉素的浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；  V——提取液的总体积，单位为毫升 (mL)；  V<sub>1</sub>——用于稀释/进样的提取液体积，单位为毫升 (mL)；  V<sub>2</sub>——最终上机溶液的体积，单位为毫升 (mL)；  m——试样的质量，单位为克 (g)；  n——稀释倍数。</p> $w = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots(2)$ <p>式中：  A——试样溶液中土霉素的峰面积；  A<sub>s</sub>——标准溶液中土霉素的峰面积；  ρ——土霉素标准溶液浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；  V——提取液的总体积，单位为毫升 (mL)；  V<sub>1</sub>——用于稀释/进样的提取液体积，单位为毫升 (mL)；</p>	更改了液相方法计算公式，增加了单点和多点计算方法。

			$V_2$ ——最终上机溶液的体积，单位为毫升（mL）； $m$ ——试样的质量，单位为克（g）； $n$ ——稀释倍数。 测定结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留3位有效数字。	
9 精密度	在重复性试验条件下两次平行测定结果的相对偏差不大于10%。	4.7 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10%。	更改了精密度表述。
/	/	5 液相色谱-串联质谱法	5.1 原理 配合饲料、浓缩饲料及精料补充料用盐酸甲醇提取样品中的土霉素并用水稀释。添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂用McIlvaine- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 缓冲液提取样品中的土霉素，HLB固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配外标法定量。 .....	增加了液质检测方法。

### 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

本标准在制定过程中，起草组分别委托 三家单位对本方法进行了复核试验，结果表明，该方法均满足各项技术要求，最终确定了该方法的可行性。

本标准的制定和实施，一方面将大幅度提高饲料产品的安全性，把好饲料关口，提高相关农畜产品的安全性；另一方面也将为国家饲料质量安全监控提供有效的技术支撑，实现饲料工业和畜牧业绿色可持续发展。本标准的发布实施将为生产者提供技术服务，保证安全饲料产品的生产，避免生产者受到损失，间接提高生产者的经济效益。

### 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

本标准与国家标准《饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法》（GB/T 22259-2008）相比，有以下提升：1.将提取液 0.05mol/l 盐酸溶液改为盐酸甲醇和 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液，提高了提取效率，并且 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液能够掩蔽预混合饲料中金属离子的干扰，提高预混合饲料中土霉素的回收率；2.将紫外检测法改为荧光检测法，提高方法选择性和灵敏度；3.适用范围增加了水产饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂，提高了标准适用性；4.增加液相色谱-串联质谱法，满足更高的检测需求。

与农业农村部公告第 282 号-2-2020《饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定》相比，本标准针对土霉素进行进一步优化了仪器条件，提高了方法灵敏度，具体见表 31，适用范围增加了水产饲料和混合型饲料添加剂。

表 31 修订稿与农业农村部公告第 282 号-2-2020 的比较

方法	农业农村部公告第 282 号-2-2020	修订稿
液相法	配合饲料中的检测限为 3 mg/kg， 定量限为 5 mg/kg； 添加剂预混合饲料、浓缩饲料和精料补充料中检测限 10 mg/kg，定量限为 20 mg/kg	配合料、浓缩料和精补料的检出限为 1 mg/kg，定量限为 2 mg/kg； 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂的检出限为 2 mg/kg，定量限为 5 mg/kg；

		水产饲料的检出限为 5 mg/kg, 定量限为 10 mg/kg。
液质法	配合饲料中的检测限为 0.01 mg/kg, 定量限为 0.05 mg/kg; 在添加剂预混合饲料、浓缩饲料和精料补充料中检测限 0.025 mg/kg, 定量限为 0.1 mg/kg。	检出限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.05 mg/kg。

## 五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准在制定过程中未采用国际标准。

## 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同一性的原则。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、实施国家标准的要求，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。

《饲料中土霉素的测定》课题组

二零二四年八月

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则.
- [3] GB/T 20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准.
- [4] GB 31650-2019 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量.
- [5] GB/T 22259-2008 饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法.
- [6] 农业农村部公告第282号-2-2020 饲料中土霉素、四环素、金霉素、多西环素的测定.
- [7] VF Samanidou, KI Nikolaidou, IN Papadoyannis et al. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci*[J]. Oct 2007; 30(15): 2430-9.
- [8] Thiex N J , Richard L ,Collaborators.Determination of oxytetracycline/oxytetracycline hydrochloride in animal feed, fish feed, and veterinary medicinal products by liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study.[J].*Journal of Aoac International*, 2009(1):- .DOI:10.1134/S1061934809010171.
- [9]胡晓颖,孙凯,朱娜,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定混合型饲料添加剂中土霉素和金霉素[J].*中国饲料*,2024,(13):124-128+133.DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2024010061-05.
- [10]周平,郑强,胡深,等.液相色谱——串联质谱法测定饲料中金霉素、土霉素方法的探讨[J].*湖北畜牧兽医*,2018,39(12):7-8+15.DOI:10.16733/j.cnki.issn1007-273x.2018.12.002.
- [11]贾涛.高效液相色谱法检测饲料中的土霉素[J].*饲料与畜牧*,2016,(07):51-54.
- [12]宋慧敏,耿士伟,冯三令,等.高效液相色谱法测定饲料中土霉素[J].*中国农业科技导报*,2008,10(S2):43-47.
- [13]胡凤祖,董琦. HPLC-荧光法测定牦牛肉中土霉素、四环素残留方法研究[C]// 甘青宁色谱协作中心,青海省化学会色谱委员会,甘肃省化学会色谱委员会,中国科学院西北高原生物研究所生化测试中心. 西北地区第五届色谱学术报告会暨甘肃省第十届色谱年会论文集. 中国科学院西北高原生物研究所, 2008: 6.