

中华人民共和国国家标准

《饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的测定
液相色谱-串联质谱法》

编制说明

(征求意见稿)

广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所

广东农科监测科技有限公司

海南威尔检测技术有限公司

广州广电计量检测股份有限公司

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)]

2024年9月

目 录

一、工作简况	1
1.1 任务来源	1
1.2 标准修订背景	1
1.3 现行检测方法比较	2
1.4 主要工作过程	3
1.4.1 成立标准编制小组	3
1.4.2 标准修订技术路线和方案制定	4
1.4.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测	4
1.4.4 定向征求意见和标准验证	4
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	5
2.1 标准编制原则	5
2.2 修订内容的说明	5
2.3 主要技术内容确定的依据	15
2.3.1 仪器分析条件确定	15
2.3.2 提取溶剂选择	19
2.3.3 提取方式确定	22
2.3.4 提取溶剂体积的选择优化	23
2.3.5 复溶液对比	24
2.3.6 净化方式选择	25
2.3.7 标准溶液有效期确定	26
2.4 分析步骤的确定	27
2.5 技术指标	27
2.5.1 线性范围	27
2.5.2 检出限与定量限	29
2.5.3 方法准确度与精密度实验	30
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	42
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	43
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	43
六、与有关法律、法规的关系	43
七、重大分歧意见的处理经过和依据	43
八、涉及专利的有关说明	43
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	43
十、其他应当说明的事项	44

一、工作简况

1.1 任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年国家标准复审修订计划的通知》(国标委发[2023] 64 号),本标准修订项目编号为 20232779-T-469,项目名称为《饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考的测定 高效液相色谱-串联质谱法》,项目承担单位为广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司、海南威尔检测技术有限公司、广州广电计量检测股份有限公司。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)]在起草过程中给予了重要的技术支持,并且参与到标准的起草过程中,因此,起草单位中申请加入。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)],本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

1.2 标准修订背景

氯霉素(CAP)、甲矾霉素(TAP)和氟苯尼考(FF)属氯霉素类抗生素,对革兰氏阴性菌、阳性菌及厌氧菌均表现出很强的抑制作用,具有广谱的抗菌能力,且价格便宜易获得,因此被广泛地应用于畜禽及水产动物养殖业。但氯霉素残留不仅能诱发致病菌产生耐药性,同时对人体产生严重副作用,如再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症、灰婴综合症等。美国、欧盟等多个国家都相继禁止了氯霉素在食品动物上的使用。我国不仅将氯霉素从《中国兽药典》中删除,并且于 2002 年全面禁止氯霉素及其盐、酯在食品动物上的使用。对于氯霉素检测限要求也在不断的降低,欧盟从 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,美国从 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

甲矾霉素和氟苯尼考作为氯霉素的衍生物,抗菌活性与氯霉素类似。这两种衍生物不会造成不可逆的再生障碍性贫血,因此经常被作为氯霉素

的替代药物应用于畜禽和水产品疾病的预防与治疗。北美国家如今还未批准甲砒霉素的使用，而氟苯尼考商品化制剂有 300 mg/mL 的注射剂、添加到饮水中的溶液剂或用于猪的拌料粉剂，用于鱼类则有 500 mg/mL 的预混剂。虽然其相对于氯霉素毒性显著降低，但若任意滥用或者使用时不遵守休药期也极易在动物体内产生残留，造成蓄积毒性，潜在威胁人类健康。各国对于甲砒霉素和氟苯尼考这两种替代药物的使用也做了严格的规定，欧盟规定甲砒霉素的最高残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，氟苯尼考为 100~3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

最近几年，频繁发生的动物源食品安全事故引发人们对兽药残留的高度关注，饲料作为养殖业必备生产原料，其安全问题已直接或间接影响到动物源性食品和人类的安全问题，因此建立一个氯霉素类药物多残留检测的统一标准已经变得尤为重要。

对于这 3 种药物的检测对象主要为畜禽肉、水产品、蜂蜜以及奶制品等动物源性食品，以配合饲料和饲料预混料中的检测研究相对较少，且很少能达到 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级的。本研究在查阅了国内外大量的文献的基础上，全面掌握了氯霉素类药物的化学结构、理化性质等资料，经过反复试验，针对样品前处理方法、液相色谱和串联质谱条件进行了反复摸索和优化，最终建立了饲料中氯霉素类药物的检测方法，以便对食品动物所食饲料进行有效监控，从而进一步保证动物源食品的安全。

1.3 现行检测方法比较

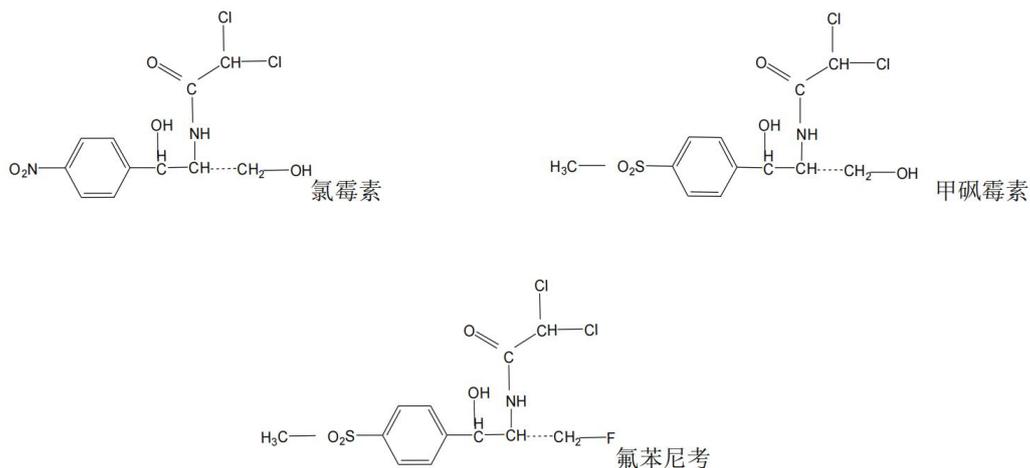


图 1 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的分子结构式

氯霉素的化学结构含有对硝基苯、丙二醇与二氯乙酰胺 3 个部分，其抗菌活性主要与丙二醇结构有关。氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考具体分子结构式见图 1。目前国内外文献中报道的检测方法主要有微生物法、免疫分析法、气相色谱法、液相色谱法、气质联用和液质联用等。其中微生物法检出限高，受其他抗生素干扰较大；免疫分析法容易出现假阳性，只适用于初始筛选，不能作为残留确证；气质联用在前处理过程中需要添加衍生生物，操作复杂。液相色谱-串联质谱作为国际公认的残留确证方法，具有检测灵敏、选择性强，结果可靠等优点。本方法是在借鉴相关液相色谱-串联质谱检测方法的基础上研究制定完成的。

1.4 主要工作过程

1.4.1 成立标准编制小组

2024 年 1 月，广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司、海南威尔检测技术有限公司、广州广电计量检测股份有限公司和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）]接到国家标准修订任务后，成立了标准编制小组，落实了人员分工。

1.4.2 标准修订技术路线和方案制定

2024年初，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，同时调研国内主要饲料质检机构、饲料生产企业等针对酰胺醇类药物使用情况，制定了标准修订内容和技术路线草案。标准修订的主要内容、技术路线（见图2）。

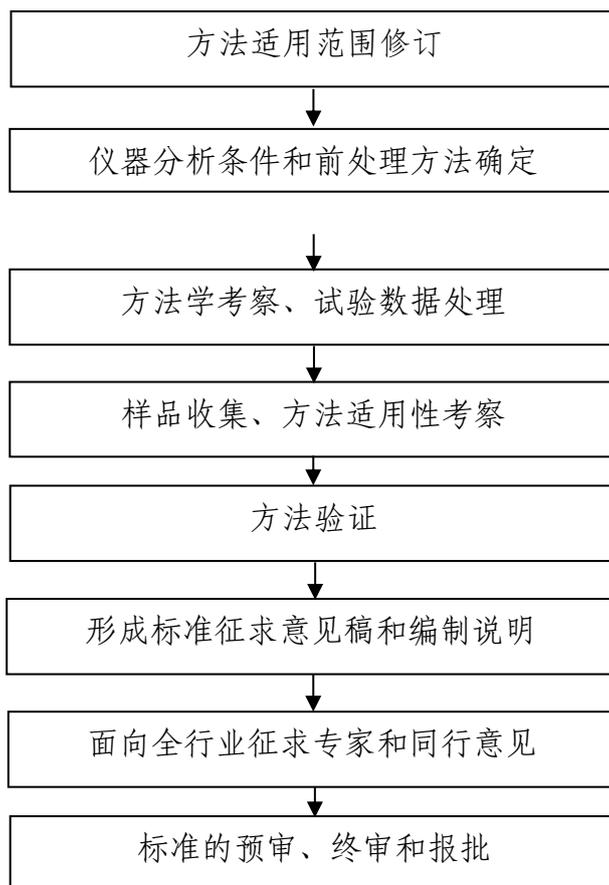


图2 标准修订技术路线图

1.4.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2024年1月~2024年3月，开展样品收集、制定实施方案。

2024年4月~2024年8月，开展方法学研究和精密度实验。

1.4.4 定向征求意见和标准验证

2024年9月，标准编制小组开展定向征求意见、3家检测机构标准验

证工作。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

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 20001.4—2015《标准编制规则 第4部分：试验方法标准》的规定和要求编写标准全文。查阅了国内外相关标准，结合现行标准实施情况，以保证标准的先进性和衔接性。编制依据如下：

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

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

2.2 修订内容的说明

本文件代替 GB/T 21108—2007《饲料中氯霉素的测定 高效液相色谱串联质谱法》和 GB/T 8381.9—2005《饲料中氯霉素的测定 气相色谱法》，与 GB/T 21108—2007 和 GB/T 8381.9—2005 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：a) 增加了甲砒霉素和氟苯尼考的测定方法（见第1章，2007年版的第1章）；b) 适用范围中增加了浓缩饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂（见第1章，2007年版的第1章）；c) 更改了检出限和定量限（见第1章，2007年版的第1章）；d) 更改了原理（见5.1，2007年版的第3章）；e) 更改了试验步骤（见8.1，2007年版的第7章）；

f) 更改了精密度（见 10，2007 年版的第 9 章）。详见表 1。

表 1 标准修订前后技术内容对比

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因
1.	首页	饲料中氯霉素的测定 高效液相色谱串联质谱法	饲料中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的测定 液相色谱-串联质谱法	根据标准适用范围进行修改
2.	1	本标准规定了测定饲料中氯霉素的高效液相色谱串联质谱法（LC/MS/MS）。 本标准适用于配合饲料和预混合饲料中氯霉素的测定，其最低定量限为 10 µg/kg，最低检测浓度为 5µg/kg。	本文件描述了饲料中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的液相色谱-串联质谱测定方法。 本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的测定。 本文件氯霉素的检出限为 1 µg/kg，定量限为 2.0 µg/kg，甲砒霉素和氟苯尼考的检出限为 5 µg/kg，定量限为 10 µg/kg。	根据方法的适用范围和技术指标进行重新描述。
3.	2	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。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。 GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 GB/T 14699.1 饲料 采样（GB/T 14699.1 - 2005，ISO 6497:2002，IDT）	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。 GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 GB/T 20195 动物饲料 试样的制备	根据 GB/T 1.1 重新进行描述
4.	4	3 原理 饲料中的氯霉素用乙酸乙酯提取，取部分提取液用氮气吹干。残渣溶于甲醇氯化钠溶液，用正己烷萃取除去脂溶性杂质。再将氯霉素回提至乙酸乙酯，吹干。用乙腈水溶液溶解，过 C18 小柱净化。最	4 原理 试样中的待测物在碱性条件下用乙酸乙酯提取、正己烷脱脂，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。	根据前处理方法进行修改

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因
		后用 LC/MS/MS 法分离、检测和定量。		
5.	7	<p>6 试样的制备</p> <p>按 GB/T 14699.1 选取有代表性的实验室样品，用四分法缩分至约 200g，粉碎过 0.45mm 孔径筛，混合均匀，装入磨口瓶中备用。</p>	<p>7 样品</p> <p>按照 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部过 0.425 mm 试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。</p>	按照要求重新描述。
6.	8.1 试样溶液制备	<p>7.1 提取</p> <p>称取一定量的试样(配合饲料 5g，预混合饲料 1g，精确至 0.001g)，置于 50ml 塑料离心管内加 40.0mL，乙酸乙酯盖好密封盖于涡旋混合器上混合 2min。放入超声波提取器中提取 20 min，其间用手摇动两次。将离心管取出，置离心机上 4000r/min 离心分离 4min。用移液管取上清液 20m，于 50°C 加热器上用氮气吹至近干，待净化。</p> <p>7.2 净化</p> <p>7.2.1 液-液分配净化</p> <p>用氯化钠甲醇溶液 2、1、1ml 分三次溶解残渣，均转移到同一个 10ml，具塞试管内。加 4ml 正己烷，涡旋混合 2 min，放入离心机于 4 000 r/min 离心 4min，弃去上层正己烷，重复上述操作一次。水相加乙酸乙酯 3 ml，涡旋混合 2min，放入离心机 4000r/min 离心 4min。吸取上层乙酸乙酯，水相</p>	<p>8.1 试样溶液制备</p> <p>平行做两份试验。称取试样约 2 g (精确至 0.01 g)，置于 50 mL 离心管中，准确加入 100 μL 内标工作溶液(5.12)、10 mL 水(5.1)、0.5 mL 氨水 (5.3)、20 mL 乙酸乙酯 (5.4)，涡旋混合 2 min，200r/min 水平振荡提取 30 min，于 4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min。准确移取上层清液 10 mL，于另一 50mL 离心管中，50 °C 下氮气吹干，准确加入 2 mL 水 (5.1) 和 5 mL 水饱和正己烷 (5.6)，轻轻摇动 10~15 次，静置 5 min，取下层溶液约 1 mL，13000 r/min，离心 5 min，过微孔滤膜 (5.14)，滤液待测。</p>	针对前处理进行优化，并确定的前处理方法进行修改。

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因
		<p>置另一个 5ml, 具塞试管内, 加乙酸乙酯 2ml 重复上述操作一次。吸取上层乙酸乙酯, 置于上述同一个水相具塞试管内, 置加热器上 50°C下, 用氮气吹干。用 3ml 乙腈溶液 I 溶解, 待 SPE 小柱净化。</p> <p>7.2.2 SPE 柱净化</p> <p>每一试样各准备一支°C 小柱, 顺序用 5 ml, 甲醇, 5 ml, 三氯甲烷, 5 ml, 甲醇和 10 ml, 水预清洗 C18 柱。将样液过此小柱(流速<1mL/min), 用 5ml, 乙腈溶液 I 淋洗, 最后用 3 mL 乙腈溶液II洗脱, 收集洗脱液于 10mL, 具塞试管内。洗脱液加 5mL 乙酸乙酯涡旋混合 1 min, 2000 r/min 离心, 下层水相用乙酸乙酯重复萃取一次, 合并乙酸乙酯提取液于 5ml, 具塞试管内。在加热器上(50°C)用氮气吹干, 用 2ml, 乙腈溶液II溶解, 调节试样溶液浓度, 使上机浓度不高于 100 ng/mL。</p>		

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因																		
7.	8.2.1 液相色谱参考条件	<p>7.3.1 液相色谱条件</p> <p>色谱柱: C₁₈ 柱, 柱长 150 mm, 柱内径 2.1 mm, 粒度 3.5 μm, 或性能类似的分析柱。</p> <p>柱温: 室温。</p> <p>流动相组成: 乙腈+水=30+70 (V1+V2)。</p> <p>流速: 250 μL/min。</p> <p>进样量: 10 μL。</p>	<p>8.2.1 液相色谱参考条件</p> <p>液相色谱参考条件如下:</p> <p>a) 色谱柱: C₁₈ 柱, 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 2.6 μm, 或性能相当者;</p> <p>b) 柱温: 35 °C;</p> <p>c) 流速: 0.3 mL/min;</p> <p>d) 进样量: 5 μL;</p> <p>e) 流动相: A 相为水 (5.1), B 相为甲醇 (4.2.15), 梯度洗脱程序见表 1。</p> <p style="text-align: center;">表 1 梯度洗脱程序</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>时间, min</th> <th>A相, %</th> <th>B相, %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>5.1</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	时间, min	A相, %	B相, %	0.0	80	20	3.0	80	20	5.0	25	75	5.1	25	75	8.0	80	20	根据优化后条件进行描述。
时间, min	A相, %	B相, %																				
0.0	80	20																				
3.0	80	20																				
5.0	25	75																				
5.1	25	75																				
8.0	80	20																				
8.	8.2.2 质谱参考条件	<p>7.3.2 质谱条件</p> <p>电喷雾离子源(ESI)负离子方式检测。</p> <p>喷雾电压:3 500 V。</p> <p>壳气流速:0.68L/min。</p> <p>辅助气流速:3.6L/min</p> <p>毛细管温度:300°C</p> <p>母离子 321, 二级子离子为 257、152、121。碰撞电压如表 1:</p>	<p>8.2.2 质谱参考条件</p> <p>质谱参考条件如下:</p> <p>a) 电离方式: 电喷雾电离, 负离子模式 (ESI-);</p> <p>b) 检测方式: 多反应监测 (MRM);</p> <p>c) 毛细管电压: 4.0 kV;</p> <p>d) 离子源温度: 350 °C;</p> <p>e) 脱溶剂气温度: 300 °C;</p>	重新描述																		

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因																																																	
		<p>表 1 氯霉素的子离子及碰撞电压</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>母离子</th> <th>子离子</th> <th>碰撞能量 eV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>321</td> <td>257</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>321</td> <td>152</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>321</td> <td>121</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	母离子	子离子	碰撞能量 eV	321	257	23	321	152	18	321	121	12	<p>f) 脱溶剂气流速: 7 L/min。 多反应监测 (MRM) 定性离子对、定量离子对及碰撞能量见表2。</p> <p>表 2 多反应监测 (MRM) 离子对、碰撞能量参考值</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>待测物名称</th> <th>定性离子对 m/z</th> <th>定量离子对 m/z</th> <th>碰撞能量 eV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">氯霉素</td> <td>321 > 152*</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>321 > 257</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">甲砒霉素</td> <td>354 > 230.2</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>354 > 261.0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">氟苯尼考</td> <td>275.4 > 259.3</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>275.4 > 123.3</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>氘代氯霉素 (d5- 氯霉素)</td> <td>300.2 > 234.0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>氘代甲砒霉素 (d5-甲砒霉素)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>氘代氟苯尼考 (d5-氟苯尼考)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	待测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 eV	氯霉素	321 > 152*			321 > 257			甲砒霉素	354 > 230.2			354 > 261.0			氟苯尼考	275.4 > 259.3			275.4 > 123.3			氘代氯霉素 (d5- 氯霉素)	300.2 > 234.0			氘代甲砒霉素 (d5-甲砒霉素)				氘代氟苯尼考 (d5-氟苯尼考)				
母离子	子离子	碰撞能量 eV																																																			
321	257	23																																																			
321	152	18																																																			
321	121	12																																																			
待测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 eV																																																		
氯霉素	321 > 152*																																																				
	321 > 257																																																				
甲砒霉素	354 > 230.2																																																				
	354 > 261.0																																																				
氟苯尼考	275.4 > 259.3																																																				
	275.4 > 123.3																																																				
氘代氯霉素 (d5- 氯霉素)	300.2 > 234.0																																																				
氘代甲砒霉素 (d5-甲砒霉素)																																																					
氘代氟苯尼考 (d5-氟苯尼考)																																																					
9.	8.2.3 混合标准系列溶液和试样溶液	7.3.3 试样的测定在上述仪器条件下, 分别注入标准工作液(4.11.5)和试样溶液(7.2.2)10 μ L, 以保留时间和二级子离子(m/z)257、152、121 进行定性, 其相对丰度比见表 2。以 152 作为定量离子, 并用氯霉素标准工作液做单点或多点校准, 以峰面积比	<p>8.2.3 混合标准系列溶液和试样溶液测定</p> <p>在仪器的最佳条件下, 分别取混合标准系列溶液 (5.13) 和试样溶液 (8.1) 上机测定。混合标准溶液中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和内标的定量离子色谱图见附录A。</p>	根据最新要求进行描述。																																																	

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因																				
	测定 8.2.4 定性 8.2.5 定量	<p>较进行定量计算。 表2 氯霉素的子离子及相对丰度比</p> <table border="1"> <tr> <td>相对离子丰度</td> <td>>50%</td> <td>>20%~50%</td> <td>>10%~20%</td> <td>≤10%</td> </tr> <tr> <td>允许的相对偏差</td> <td>±20%</td> <td>±25%</td> <td>±30%</td> <td>±50%</td> </tr> </table>	相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%	允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%	<p>8.2.4 定性</p> <p>在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物监测离子对的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。</p> <p>表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差</p> <table border="1"> <tr> <td>相对离子丰度</td> <td>>50%</td> <td>>20%~50%</td> <td>>10%~20%</td> <td>≤10%</td> </tr> <tr> <td>允许的相对偏差</td> <td>±20%</td> <td>±25%</td> <td>±30%</td> <td>±50%</td> </tr> </table> <p>8.2.5 定量</p> <p>以标准溶液中待测组分的峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标，以标准溶液中待测组分的质量浓度和内标质量浓度的比值为横坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测组分质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。</p>	相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%	允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%	
相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%																				
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%																				
相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%																				
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%																				
10.	9 试验 数据处理	<p>8 结果计算与表述 8.1 结果计算 试样中氯霉素的含量 X，以质量分数微克每千克</p>	<p>9 试验数据处理</p>	<p>根据最新方法进行调 整。</p>																				

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因
		<p>($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示, 单点校准时可用式(1)计算:</p> $X = \frac{P_2 \times V_1 \times c \times V_2 \times n}{P_1 \times m \times V_3} \dots\dots\dots(1)$ <p>式中: P2——试样溶液对应的色谱峰面积响应值; V1——加入定容液的体积, 单位为毫升(mL); c——氯霉素标准溶液的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL); V2——氯霉素标准溶液的进样体积, 单位为微升(μL); n——稀释倍数; P1——氯霉素标准溶液对应的色谱峰面积响应值; m——试样质量, 单位为克(g); V3——试样溶液的进样体积, 单位为微升(μL).</p> <p>多点校准时可用式(2)计算:</p> $X = \frac{V_1 \times c_x \times V_2 \times n}{m \times V_3} \dots\dots\dots(2)$ <p>式中: V1——加入定容液的体积, 单位为毫升(mL); c_x——标准曲线上查得的试样中氯霉素的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL); V2——氯霉素标准溶液的进样体积, 单位为微升(μL); n——稀释倍数; m——试样质量, 单位为克(g);</p>	<p>试样中氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考含量以质量分数w_i计, 数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。多点校准按公式(1)计算; 单点校准按公式(2)计算:</p> $w_i = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots(1)$ <p>式中: ρ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL); V_1——试样提取用乙酸乙酯总体积, 单位为毫升(mL); V_3——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积, 单位为毫升(mL); V_2——净化用试样提取溶液体积, 单位为毫升(mL); m——试样质量, 单位为克(g); 1 000——换算系数。</p> $w_i = \frac{A \times A_{si} \times \rho_s \times \rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times A_i \times \rho_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots(2)$ <p>式中: A——试样溶液待测物色谱峰面积; A_{si}——标准溶液内标物色谱峰面积; ρ_s——标准溶液待测物的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL); ρ_i——试样溶液内标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升</p>	

No.	章条编号	修订前	修订后	修订原因
		<p>V3——试样溶液的进样体积，单位为微升(μL)。</p> <p>8.2 结果表示</p> <p>结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留三位有效数字。</p>	<p>(ng/mL)；</p> <p>V_1——试样提取用乙酸乙酯总体积，单位为毫升 (mL)；</p> <p>V_3——净化、氮气吹至近干后复溶试样溶液定容体积，单位为毫升 (mL)；</p> <p>A_s——标准溶液待测物色谱峰面积；</p> <p>A_i——试样溶液内标物的色谱峰面积；</p> <p>ρ_{si}——标准溶液内标物的质量浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；</p> <p>V_2——净化用试样提取溶液体积，单位为毫升 (mL)；</p> <p>m——试样质量，单位为克 (g)；</p> <p>1 000——换算系数。</p> <p>测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。</p>	
11.	10 精密度	<p>9 重复性</p> <p>在同一实验室由同一操作人员使用同一仪器完成的两个平行测定的相对偏差不大于 10%。</p>	<p>10 精密度</p> <p>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 15%。</p>	根据最新要求进行调整。

2.3 主要技术内容确定的依据

2.3.1 仪器分析条件确定

2.3.1.1 监测离子选择

根据欧盟 2002/657/EC 要求，要确证一种化合物，至少需要 3 个鉴别点 (IP)，一个母离子 1 个鉴别点，一个子离子 1.5 个鉴别点。查阅文献和相关国家标准得知一般选择母离子分子量为 321，分子量 152 和 257 的子离子来监测氯霉素；母离子分子量 354，分子量 185 以及 290 的子离子监测甲砒霉素；母离子分子量 356，分子量 336 以及 185 的子离子监测氟苯尼考。本试验配制氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准溶液，由于氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考在水中以负离子存在，因此，采用负离子模式进行母离子扫描，可以发现氯霉素母离子 321、甲砒霉素母离子 354、氟苯尼考母离子 356。随后，针对氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考产物离子、电压等参数进行 MRM 优化。调谐所得的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的母离子、子离子分子量的数值均与 GB 31658.20-2022《食品安全国家标准 动物性食品中酰胺醇类药物及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》一致。并且采用同样方法优化出氯霉素-d₅、甲砒霉素-d₃、氟苯尼考-d₃ 内标的产物离子及电压参数。

表 2 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标质谱参数

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	Q1 电压/V	碰撞能量/eV	Q3 电压/V
氯霉素	321	152 ^a	21	20	25
		257	21	12	16
甲砒霉素	354	185 ^a	17	21	30
		290	17	13	30
氟苯尼考	356	336 ^a	17	11	21
		185	23	20	18

氘代氯霉素(d ₅ -氯霉素)	326	157 ^a	22	19	29
氘代甲砒霉素(d ₃ -甲砒霉素)	357	293 ^a	17	12	20
氘代氟苯尼考(d ₃ -氟苯尼考)	359	339 ^a	17	10	14
^a 为定量离子					

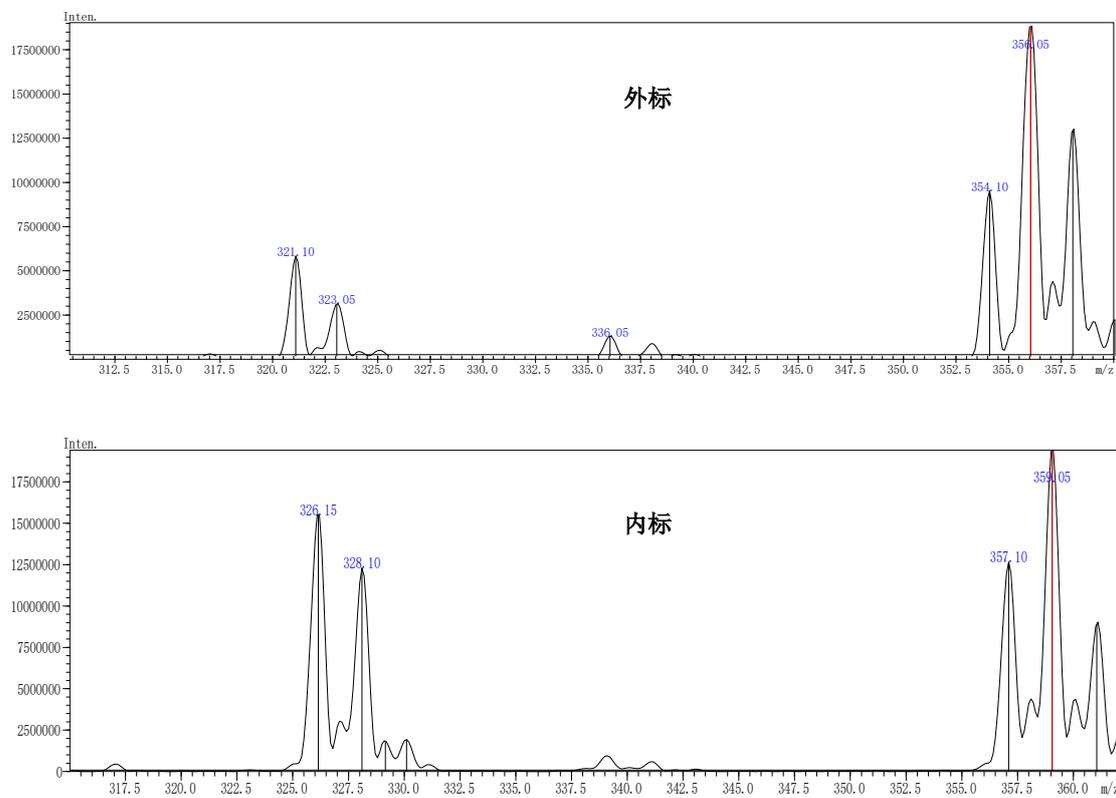


图3 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标母离子扫描图

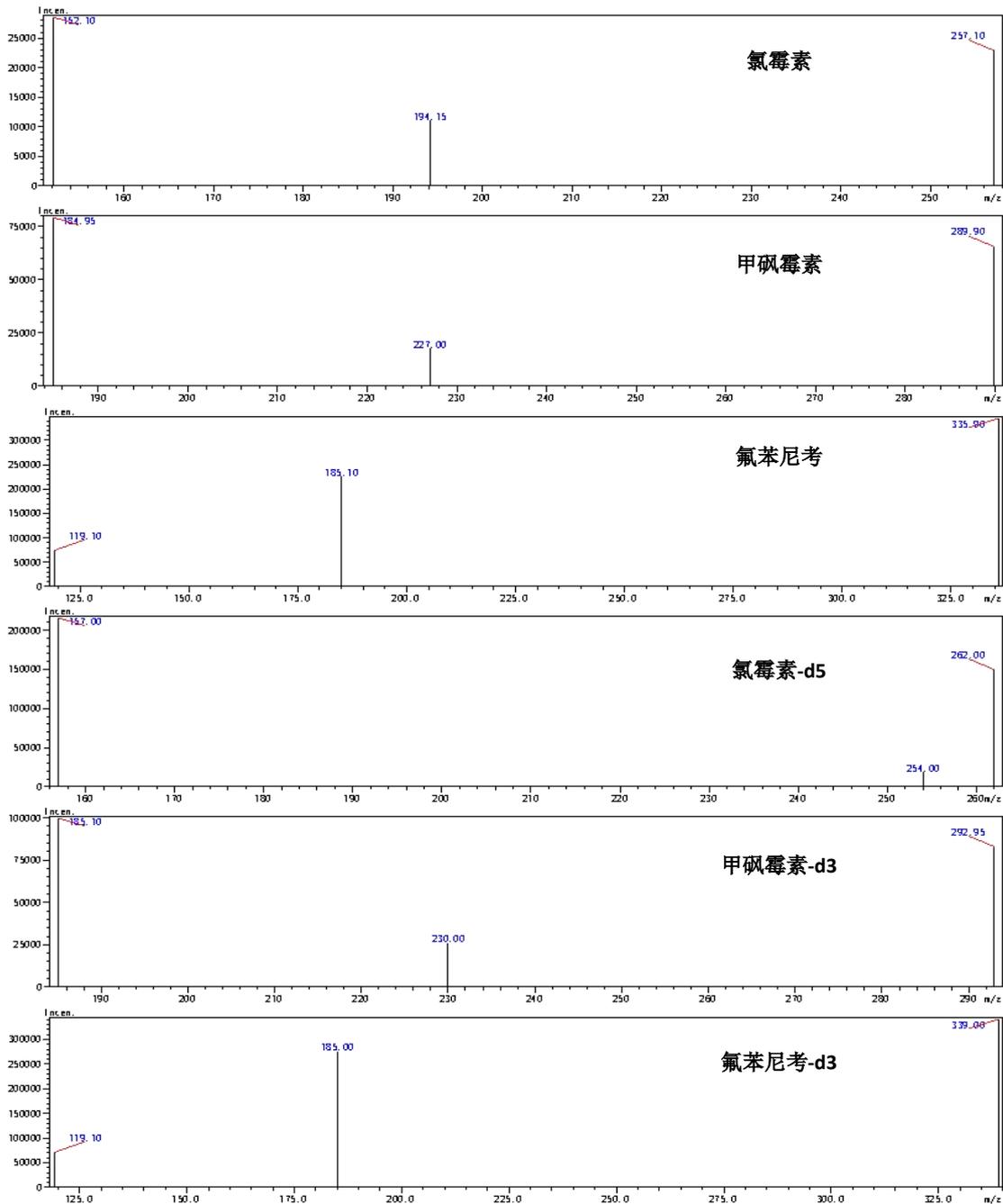


图 4 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标离子图

2.3.1.2 流动相的选择

文献报道的流动相分为 4 种，甲醇和水、乙腈和水、甲醇和乙酸铵溶液、乙腈和乙酸铵溶液。四种流动相均能有较好的峰形和分离度，水相中增加铵盐，并未能改变峰形和保留时间，但是显著降低了响应值，且盐溶

液对仪器损耗较大。甲醇和乙腈响应值无明显变化，考虑到乙腈毒性较高，最终选择甲醇+水作为流动相组成。见图 5-6。

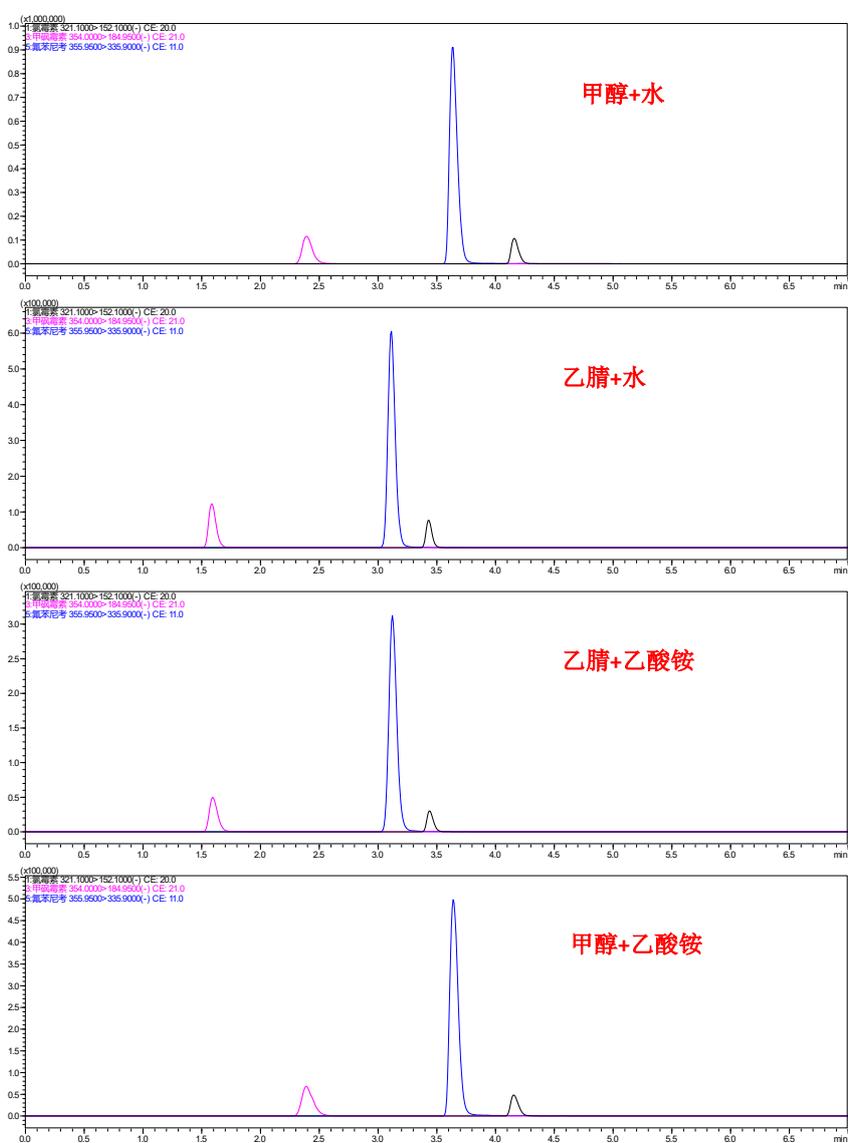


图 5 不同流相对比

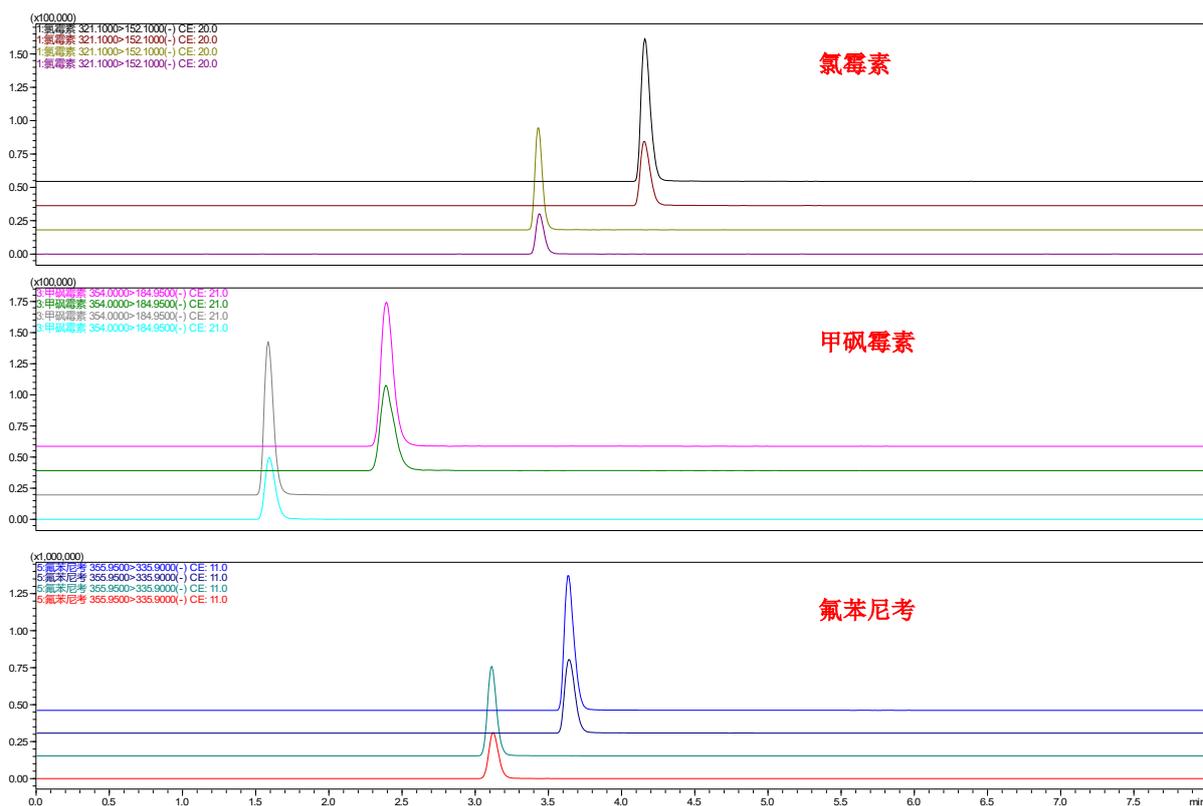


图 6 不同流动相对比

表 3 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	80	20
1.0	80	20
3.0	25	75
5.0	25	75
5.1	80	20
8.0	80	20

2.3.1.3 色谱柱对比

验对比不同厂家色谱柱的分离效果，对比峰型和响应值。结果表明，不同厂家 C₁₈ 柱，除了保留时间稍微有些差异，其峰型和峰面积没有明显差异，本实验采用 C₁₈ 柱对目标物进行分离。

2.3.2 提取溶剂选择

氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考均微溶于水，易溶于乙酸乙酯、甲醇和

乙腈等有机溶剂。刘红云等人试验验证比较了乙腈、甲醇、乙酸乙酯提取饲料中氯霉素类药物的效果，发现乙酸乙酯的提取能力最强。根据三种化合物结构在碱性条件下，可以以分子状态存在，非极性较强，根据相似相溶原理，其可更加容易提取。同时考虑，饲料中含有无机盐，填入水后，可以有效出去无机盐的影响。因此试验选取配合饲料、添加剂预混合饲料、和混合型饲料添加剂对比乙腈、甲醇、乙酸乙酯、氨水乙酸乙酯、以及先加水再加乙酸乙酯等几种提取溶剂。结果如图 7-10 所示，配合饲料和添加剂预混合饲料中氨水+水+乙酸乙酯和甲醇作为提取剂时，均具有较好的提取效果。在混合型饲料添加剂中所有提取剂均表现出较好的提取效果，其中甲醇和乙腈这两种溶剂对人体毒性较大，且提取杂质较多，不利于后续净化，因此排除。同时由于先加水再加乙酸乙酯进行提取，比直接进行乙酸乙酯提取，多进行了液液萃取精华，提取杂质更少，利于后续净化，因此选择，先加水溶解饲料，再加入氨水造成碱性环境后用乙酸乙酯进行提取，见图 11。

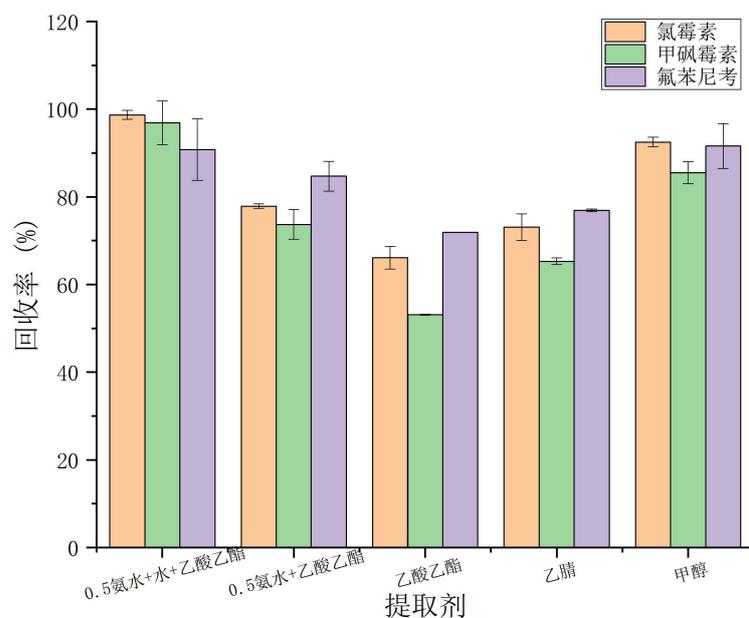


图 7 不同提取剂对配合饲料中酰胺醇类提取效率

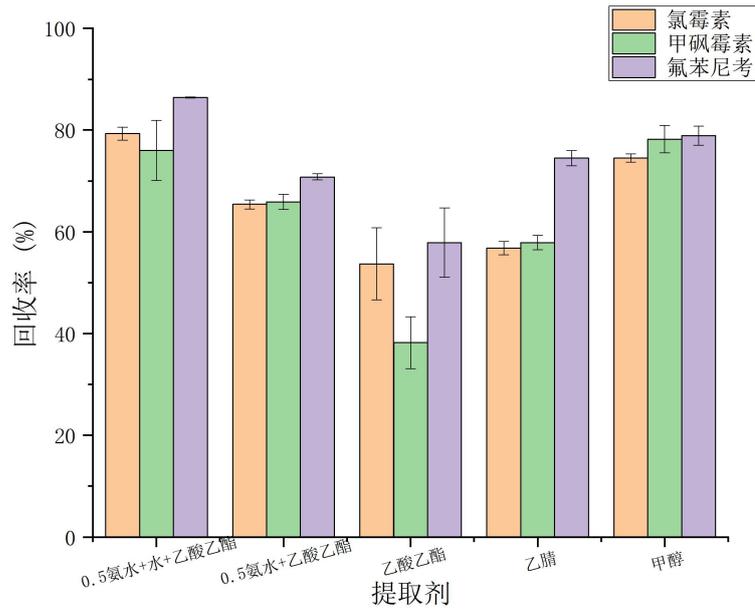


图 8 不同提取剂对添加剂预混合饲料酰胺醇类提取效率

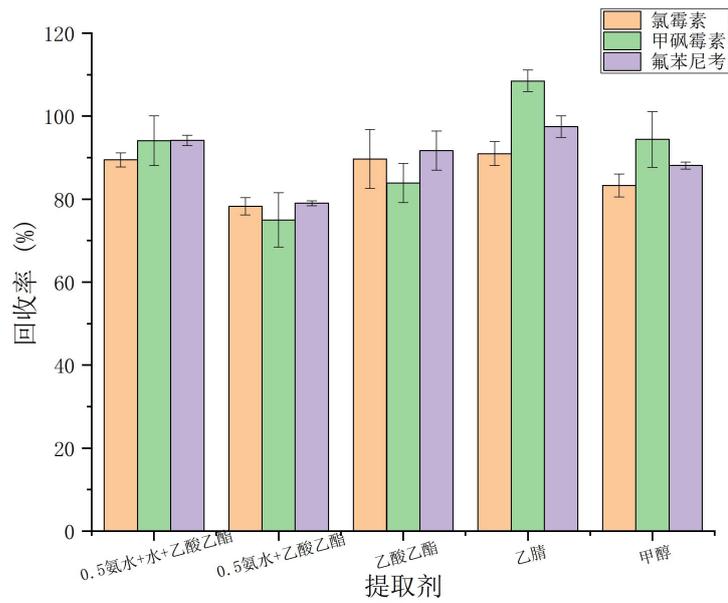


图 9 不同提取剂对添加剂预混合饲料（矿物）酰胺醇类提取效率

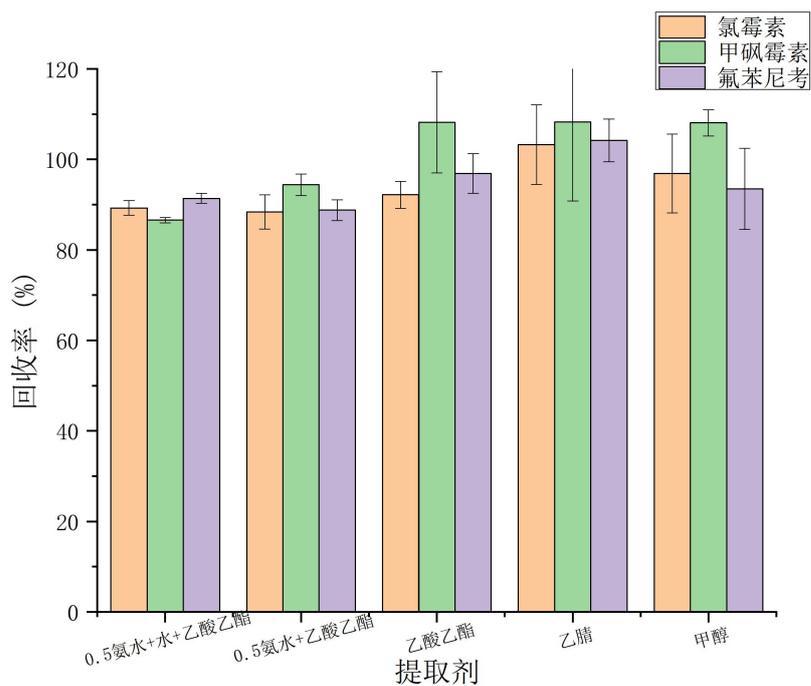


图 10 不同提取剂对混合型饲料添加剂（富马酸亚铁+硫酸亚铁）酰胺醇类提取效率



图 11 不同提取剂吹干后效果

2.3.3 提取方式确定

为了验证不同提取方式对测定结果的影响，选取配合饲料和添加剂预混合饲料，考察了 25mL 提取液超声 30min 和振荡提取 30min 提取的回收率情况，结果见表 4。结果表明，对于添加剂预混合饲料，振荡略好于超声，超声需要每间隔几分钟摇动一次。从整个实验的易操作程度考虑，采取振荡的提取方式。

表4 不同提取方式回收率试验结果 (n=3)

待测组分	饲料类型	平均回收率 (%)	
		振荡提取30 min	超声30 min
配合饲料	氯霉素	98.7 ± 1.0	92.5 ± 0.9
	甲砒霉素	96.9 ± 5.0	91.4 ± 1.6
	氟苯尼考	90.8 ± 7.0	95.4 ± 4.6
添加剂预混合饲料	氯霉素	89.5 ± 1.7	84.0 ± 0.1
	甲砒霉素	94.1 ± 6.0	84.7 ± 0.3
	氟苯尼考	94.2 ± 1.2	85.8 ± 0.3

2.3.4 提取溶剂体积的选择优化

为了考察提取剂体积的选择，充分提取样品中的左旋咪唑，取配合饲料和添加剂预混合饲料作为对象，空白饲料样品添加 100 µg/kg 酰胺醇类药物，分别用 10mL、20mL、25mL、30mL 提取液提取，取提取液一半氮气吹干，复溶脱脂后，过膜后上机测定。分别进行三个平行样品的测定，比较提取的绝对回收率。结果显示，对于配合饲料和添加剂预混合饲料在提取一次情况下，当提取体积达到 20mL 后提取，提取效率能达到 75%以上，随着提取体积增加，提取效率增加不明显，因此最终确定，20 mL 提取剂提取 1 次。

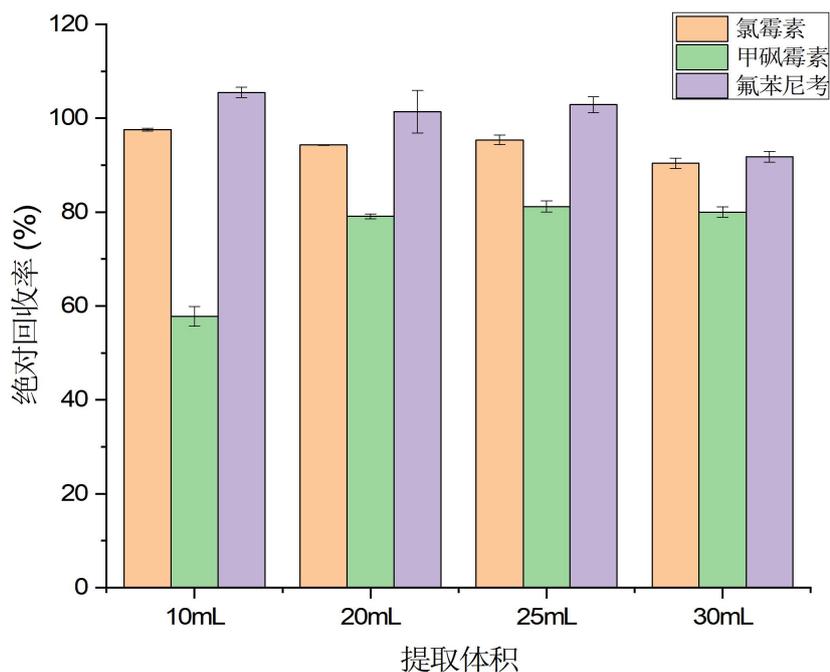


图 12 配合饲料提取不同提取体积酰胺醇回收率

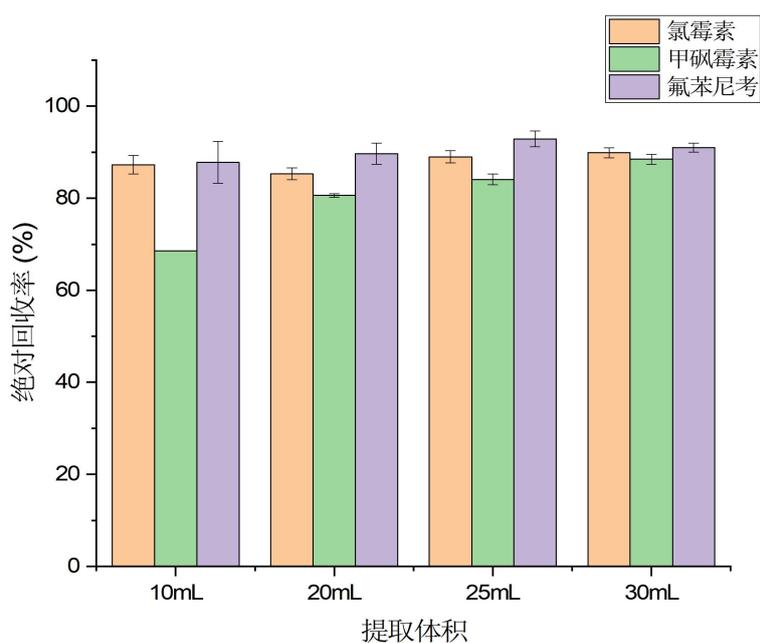


图 13 添加剂预混合饲料提取不同提取体积酰胺醇回收率

2.3.5 复溶液对比

为了考察不同复溶液对饲料中酰胺醇类药物的复溶效果，试验对比了水、5%甲醇溶液和10%甲醇溶液，从结果来看，3种复溶液的复溶回收率均能达到85%以上，同时，水作为复溶液是可以减少乳化现象。最终选择

超纯水作为复溶液。

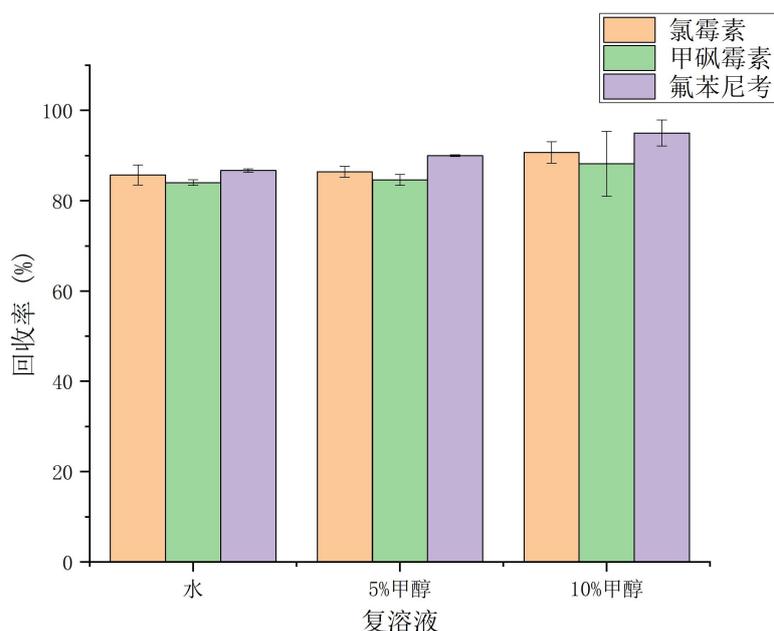


图 14 不同复溶液对饲料中酰胺醇类药物复溶效果

2.3.6 净化方式选择

样品提取过程中，乙酸乙酯将酰胺醇类从饲料中完全提取出来，无机盐由于无法溶解于乙酸乙酯非极性较强溶剂中，从而保留在下层水溶液中。此步骤可以除去饲料中无机盐等极性杂质，因此，与提取液中杂质主要是样品中的脂肪类物质等非极性杂质。液液萃取是最常见的除杂方式，同时萃取回收率较高且成本低廉，因此，本标准考虑采用正己烷脱脂进行净化，大大减少过柱造成的繁琐步骤，同时可以大大节约成本。将提取液氮气吹干后，加入复溶液，同时加入正己烷进行脱脂，考察样品绝对回收率，结果如图 15-16 所示，可以看出，正己烷脱脂脱脂后，目标物回收率均能达到 90%左右，并且可以除去非极性杂质。因此，正己烷脱脂作为本方法净化方式。

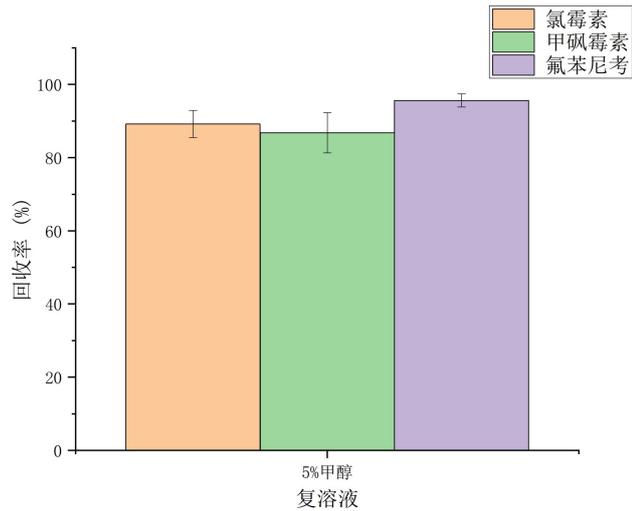


图 15 正己烷脱脂对酰胺醇类回收率的效率

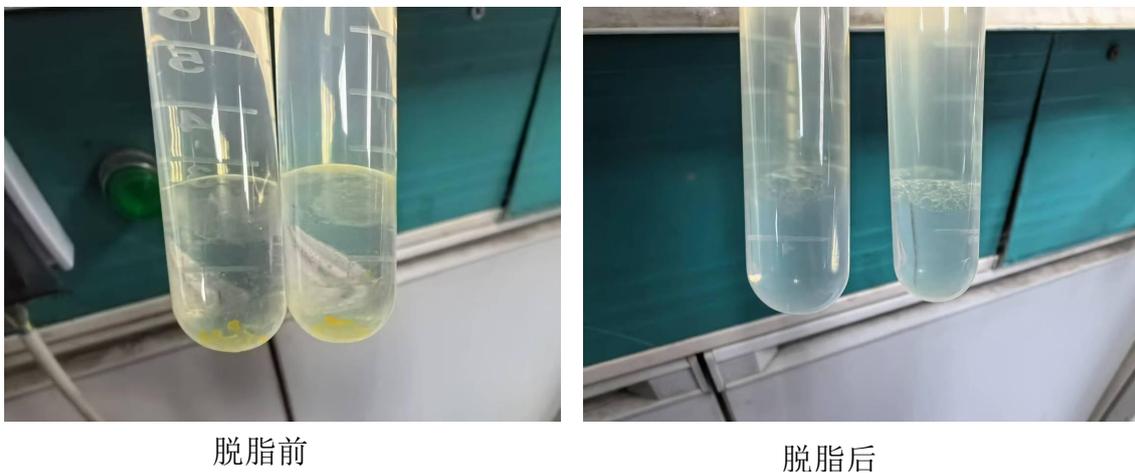


图 16 正己烷脱脂效果图

2.3.7 标准溶液有效期确定

起草组收集对比了现行国家标准和行业标准中规定酰胺醇类药物标准溶液有效期，详见表 5。酰胺醇类储备液有效期一般规定 6-12 个月，工作液一般规定 3-6 个月。本标准借鉴国家和行业标准中关于有效期的规定，规定储备液有效期为 6 个月，中间液的有效期为 3 个月。

表 5 现行标准中规定氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准溶液有效期

标准号	标准名称	药物	标液有效期
农业部 958 号公告-14-2007	水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的测定 气相色谱	氯霉素、甲砒霉素、	标准储备溶液 (200mg/L) :12 个月 混合储备溶液 (1 μg/mL) : 6 个月

	谱-质谱法	氟苯尼考	内标工作溶液 (1000 μg/L) :6 个月 内标工作溶液 (100 μg/L) :3 个月
农业部 2483 号公告-8-2016	饲料中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的测定 液相色谱-串联质谱法	氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考	标准储备溶液 (100mg/L) :6 个月 内标工作溶液 (100 μg/L) :3 个月
GB 31656.16-2022	食品安全国家标准 水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量的测定 气相色谱法	氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺	标准储备溶液 (150mg/L) :3 个月 标准储备溶液 (30mg/L) :1 个月
GB 31658.2-2021	食品安全国家标准 动物性食品中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法	氯霉素	标准储备溶液 (100mg/L) :12 个月 内标储备溶液 (100mg/L) :12 个月 标准储备工作 (50mg/L) :3 个月 内标储备工作 (20mg/L) :3 个月
GBT8381.9-2005	饲料中氯霉素的测定 气相色谱法	氯霉素	标准储备溶液 (200mg/L) :12 个月 标准中间溶液 (10mg/L) :3 个月 标准中间溶液 (2mg/L) :3 个月
GBT20756-2006	可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法	氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考	标准储备溶液 (100mg/L) :12 个月 标准中间溶液 (1mg/L) :6 个月 标准中间溶液 (0.2mg/L) :3 个月 内标储备溶液 (1mg/L) :6 个月 标准中间溶液 (0.2mg/L) :3 个月
GBT21108-2007	饲料中氯霉素的测定 高效液相色谱串联质谱法	氯霉素	标准储备溶液 (1000mg/L) :12 个月 标准中间溶液 (100mg/L) :3 个月 标准中间溶液 (1mg/L) :3 个月 标准工作溶液 (0.1mg/L) :7 天

2.4 分析步骤的确定

平行做两份试验。称取试样约 2 g (精确至 0.01 g)，置于 50 mL 离心管中，加入 100 μL 内标工作溶液、5 mL 水和 0.5 mL 氨水，涡旋混合 1 min，准确加入 20 mL 乙酸乙酯，涡旋混合 2 min，振荡提取 20 min，于 4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min，准确移取上层乙酸乙酯 10 mL 于 15mL 离心管中，于 50 °C 下氮气吹干，准确加入 2 mL 水，再加入 10 mL 水饱和正己烷溶液，轻轻摇动数次脱脂，静置 5 min，取下层溶液约 1 mL，10000r/min，离心 5 min，过微孔滤膜，滤液待测。

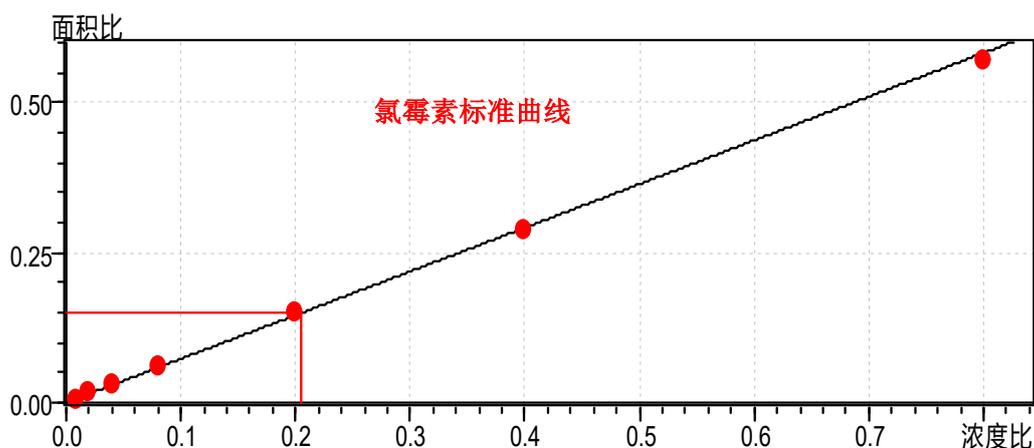
2.5 技术指标

2.5.1 线性范围

精确量取适量的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准工作液与基质空白溶液，配制成氯霉素质量浓度为 0.2 μg /L、0.5 μg /L、1 μg /L、2μg /L、5 μg /L、10 μg /L、20 μg /L、50 μg /L、100 μg /L，甲矾霉素和氟苯尼考质量浓度为 1 μg /L、2μg /L、5 μg /L、10 μg /L、25 μg /L、50 μg /L、100 μg /L，内标浓度为 25 μg /L 的基质匹配标准溶液。用液相色谱-串联质谱测定。在上述确定参数条件下，从低浓度到高浓度进样，按其所得外标与内标峰面积比值的平均值与对应的溶液浓度做基质标准曲线，得出回归方程和相应系数。结果如见表 6 和图 17。

表 6 氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准曲线

化合物	线性范围 (ng/mL)	回归方程	相关系数 r ²
氯霉素	0.2 -20 μg/L	Y = 0.728224X + 0.000338769	0.9995
甲矾霉素	1.0 -100 μg/L	Y = 1.01041X + 0.000493145	0.9995
氟苯尼考	1.0 -100 μg/L	Y = 0.782301X + 0.00800256	0.9951



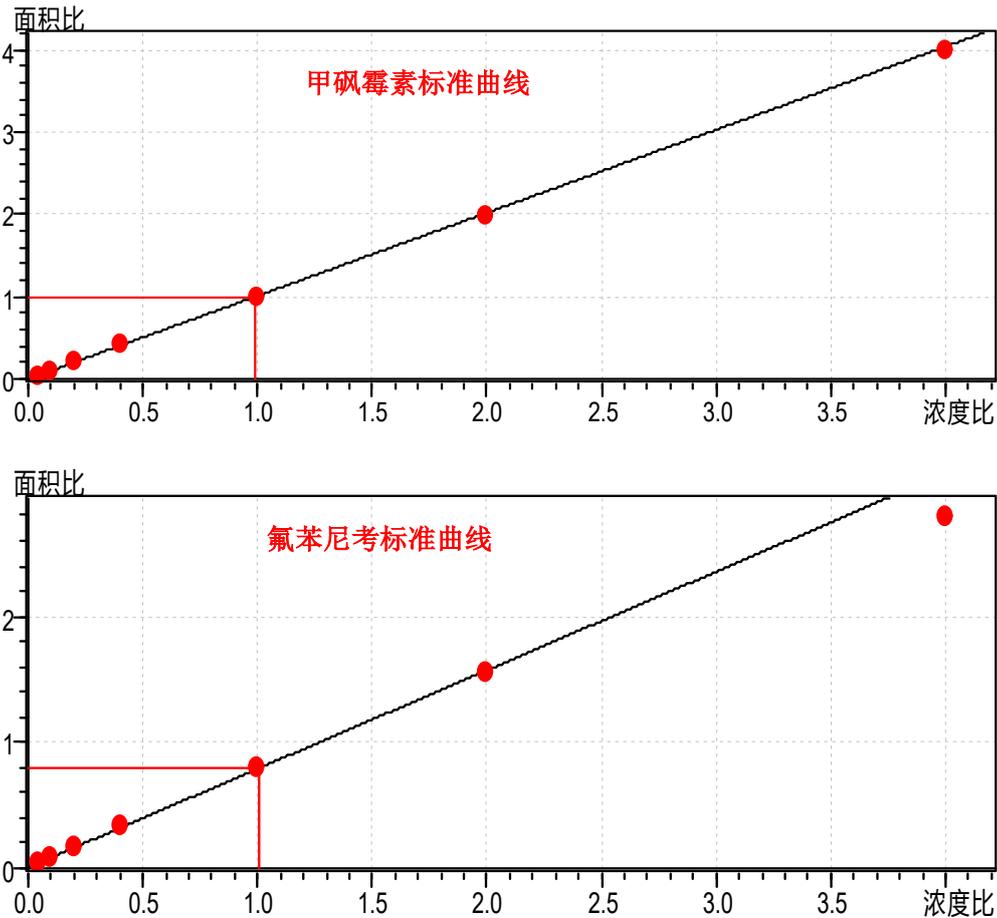


图 17 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考标准曲线

2.5.2 检出限与定量限

原标准氯霉素的定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，本次修订新增氟苯尼考和甲砒霉素的测定。空白试料按相同的步骤处理后，在相应的保留时间，空白试料对所测分析物无干扰。检测限（LOD）与定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于 2 g 空白样品，经提取净化后测定，根据所测药物的 $S/N \geq 3$ 为方法检测限， $S/N \geq 10$ 为方法定量限的原则，测得在配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料、混合型饲料添加剂中的氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考检测限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

由于饲料中允许使用鸡肉粉、肉骨粉等原料。根据 GB31650 规定，动物源食品中氟苯尼考（以氟苯尼考+氟苯尼考胺之和计）在肌肉中限量值为

100~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 皮脂限量为 200~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 鱼肉中氟苯尼考限量值为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 皮脂。甲砒霉素限量值为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。通过干燥制粉后, 值会更高。动物油脂和动物肌肉制成的肉骨粉均可使用到饲料中。如果定量限过低, 使用含有氟苯尼考和甲砒霉素的鱼粉、肉骨粉或动物油脂造成饲料中检出氟苯尼考或甲砒霉素可能对饲料企业进行误伤, 影响饲料企业发展。鱼粉在配合饲料中使用量一般为 3%~5%, 肉骨粉在配合饲料中使用量一般为 2%~8%。综合考虑, 将氟苯尼考和甲砒霉素定量限确定为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5.3 方法准确度与精密度实验

分别取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂进行方法准确度和精密度测试。分别称取饲料各 2.0 g, 分别添加适量 3 种酰胺醇类标准工作溶液使配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中氯霉素添加浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 甲砒霉素和氟苯尼考添加浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 经提取净化后进行液相色谱-串联质谱法测定, 每个梯度平行测定 6 次, 以考察方法的准确度和精密度。结果见表 7~表 13。标准溶液图谱、不同饲料空白样品和空白添加色谱图见图 18-30。

由结果可以看出, 不同的饲料样品, 添加回收率均在 90%以上, 批内变异系数均在 10%范围内, 批间变异系数在 15%内, 方法满足饲料中氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素的测定的方法学要求。通过样品的添加回收试验, 证明本方法可适用于包括配合饲料、浓缩饲料、预混饲料及牛精料补充料和混合型饲料添加剂中氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素的检测。

表 7 猪配合饲料回收率及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	1.99	1.95	1.86	1.87	1.83	1.97	95.6	3.5	101.1	5.5
		2	2.10	2.17	1.94	2.19	1.92	2.17	104.1	5.8		
		3	2.04	2.03	2.13	2.08	2.09	2.05	103.5	1.8		
	20	1	20.1	20.7	20.0	20.0	20.7	19.9	101.2	1.8	99.3	3.4
		2	18.9	19.5	19.8	18.7	20.0	19.9	97.3	2.8		
		3	20.8	19.6	18.8	19.1	20.3	20.8	99.5	4.3		
	200	1	196	204	195	196	196	189	98.0	2.4	101.3	4.2
		2	212	195	211	213	210	192	102.8	4.6		
		3	210	203	205	206	195	217	103.0	3.6		
甲砒霉素	10	1	10.0	9.94	9.73	10.1	9.60	10.4	99.6	2.8	99.2	2.0
		2	10.1	10.2	9.82	9.94	9.68	9.88	99.4	1.9		
		3	10.0	9.64	9.79	9.88	9.84	9.94	98.5	1.3		
	100	1	105	102	106	108	103	104	104.7	2.1	101.6	3.4
		2	102	103	101	96.6	99.1	101	100.5	2.3		
		3	103	98.0	104	101	97.4	94.9	99.7	3.5		
	1000	1	987	998	979	1001	974	993	98.9	1.1	98.1	3.8
		2	1021	1007	932	921	952	1039	97.9	5.1		
		3	956	1034	936	965	938	1029	97.6	4.5		
氟苯尼考	10	1	9.32	9.08	9.44	9.62	8.80	9.09	92.3	3.2	97.2	5.0
		2	9.93	9.87	9.70	9.80	10.3	9.57	98.6	2.8		
		3	9.91	10.3	10.6	10.3	9.87	9.52	100.8	3.9		
	100	1	99.6	98	95.8	97.6	96.9	97.6	97.6	1.3	98.5	2.9
		2	103	102	98.9	95.5	102	97.5	99.8	3.0		
		3	93.1	99.3	93.8	99.7	103	99.5	98.1	3.9		
	1000	1	928	973	928	980	898	969	94.6	3.5	97.6	4.2
		2	961	926	967	1009	1025	970	97.6	3.6		
		3	1033	1033	951	1008	982	1030	100.6	3.3		

表 8 猪浓缩饲料添加回收率及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	1.96	2.01	1.99	2.05	1.92	2.12	100.3	3.5	102.5	3.6
		2	2.06	2.11	2.07	2.16	2.07	2.05	104.3	2.0		
		3	2.13	2.00	1.93	2.07	2.06	2.17	103.0	4.2		
	20	1	22.0	21.1	21.4	21.3	20.6	21.7	106.7	2.2	101.4	5.4
		2	18.6	20.1	20.2	19.0	20.8	21.4	100.1	5.3		
		3	19.0	18.8	19.6	20.8	19.9	18.8	97.4	4.0		

	200	1	216	212	207	210	211	216	106.0	1.7	103.6	4.2
		2	196	215	216	219	196	200	103.5	5.2		
		3	214	192	206	204	193	205	101.2	4.2		
甲砒霉素	10	1	9.02	9.53	9.82	9.28	9.55	9.54	94.6	2.9	97.7	3.4
		2	10.00	10.20	9.54	10.00	9.60	9.89	98.7	2.6		
		3	10.20	10.30	9.70	9.88	10.00	9.82	99.8	2.3		
	100	1	105.7	101.2	105.7	100.9	104.3	103.9	103.6	2.0	99.1	4.4
		2	96.5	98.4	93.2	101.0	94.6	93.4	96.2	3.2		
		3	92.4	103.0	97.1	98.7	95.3	99.1	97.6	3.7		
	1000	1	1013	1017	1027	1016	1012	1013	101.6	0.5	98.2	3.8
		2	975	921	935	1010	974	934	95.8	3.5		
		3	1005	929	971	1013	985	932	97.3	3.7		
氟苯尼考	10	1	10.23	10.30	10.00	11.10	10.43	10.71	104.6	3.8	99.8	4.3
		2	9.64	9.77	9.99	9.60	9.79	10.00	98.0	1.7		
		3	9.57	9.66	9.52	9.84	9.57	9.84	96.7	1.5		
	100	1	100.0	101.7	101.5	99.6	102.3	100.3	100.9	1.1	99.2	3.4
		2	96.0	92.7	102.0	93.7	97.6	96.6	96.4	3.4		
		3	102.0	97.2	94.8	103.0	103.0	102.0	100.3	3.5		
	1000	1	973	988	977	971	977	973	97.7	0.6	97.8	3.4
		2	955	1026	931	984	959	1028	98.1	4.1		
		3	924	934	970	1034	1027	981	97.8	4.7		

表 9 猪预混合饲料准确度及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	1.95	2.14	2.00	2.1	2.00	1.97	101.3	3.7	101.4	4.0
		2	2.03	1.91	2.18	2.08	2.10	2.06	103.0	4.3		
		3	1.95	2.09	2.09	1.92	1.98	1.94	99.8	3.8		
	20	1	20.2	20.4	20.5	20.6	19.5	20.3	101.3	1.9	100.8	3.6
		2	18.6	19.9	21.2	20.3	19.1	19.7	99.0	4.6		
		3	20.7	19.3	21.4	20.0	20.0	21.0	102.0	3.8		
	200	1	195	194	192	189	193	196	96.6	1.3	99.9	4.8
		2	200	204	193	195	219	217.5	102.4	5.4		
		3	197	202	220	203	194	194	100.8	4.8		
甲砒霉素	10	1	8.71	9.71	9.95	9.4	9.53	9.51	94.7	4.4	97.4	3.7
		2	10.2	9.53	9.59	10.3	9.8	9.81	98.7	3.2		
		3	9.70	10.2	9.93	10.0	9.8	9.62	98.8	2.2		
	100	1	99.2	104	100	103	105	102	102.2	2.2	100.1	3.6
		2	98.6	95.1	104	102	99.9	102	100.3	3.1		
		3	95.4	102	94	94.5	97.2	104	97.9	4.3		

	1000	1	957	993	980	968	984	1034	98.6	2.7	99.3	3.1
		2	993	1017	992	1027	983	1014	100.4	1.7		
		3	993	1034	963	973	1038	923	98.7	4.5		
氟苯尼考	10	1	9.49	10.3	10.7	10.2	9.94	10.1	101.2	4.0	99.6	3.0
		2	9.8	9.84	10.15	9.93	10.18	9.66	99.3	2.1		
		3	10.1	9.91	10.0	9.64	9.61	9.68	98.2	2.1		
	100	1	98.8	101	101	97.9	104	97.4	100.0	2.5	98.0	3.7
		2	92.7	97	92.5	94.9	100	102	96.5	4.0		
		3	101	95.7	97.6	103	94.0	93.7	97.5	3.9		
	1000	1	1002	993	1007	998	975	1016	99.9	1.4	98.5	3.2
		2	926	964	1021	1028	923	945	96.8	4.8		
		3	981	979	989	992	965	1033	99.0	2.3		

表 10 精料补充料准确度及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)							批内/%		批间/%	
										平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	2.05	2.07	2.17	2.07	2.10	2.06	104.3	2.1	103.6	2.9	
		2	2.10	2.06	2.12	2.00	2.18	2.00	103.8	3.4			
		3	2.03	2.01	2.14	2.11	2.09	1.95	102.8	3.5			
	20	1	21.2	21.5	20.7	21.5	21.1	21.1	106.0	1.5	104.3	3.3	
		2	20.6	21.5	20.8	19.4	20.8	21.2	103.6	3.5			
		3	21.3	19.7	21.5	20.5	21.5	19.6	103.4	4.3			
	200	1	212	210	206	206	207	212	104.5	1.4	106.0	2.5	
		2	219	218	214	202	219	218	107.5	3.0			
		3	208	215	204	213	215	216	106.0	2.3			
甲砒霉素	10	1	10.27	10.35	9.55	9.73	9.07	10.08	98.4	5.0	99.6	3.3	
		2	10.34	10.19	10.28	9.95	10.05	10.31	101.9	1.5			
		3	9.81	9.88	9.84	9.91	10.00	9.74	98.6	0.9			
	100	1	101.3	105.7	102.9	102.4	101.3	104.2	103.0	1.7	99.7	4.5	
		2	93.6	92.9	103.1	102.7	93.0	100.8	97.7	5.1			
		3	93.8	103.9	95.4	94.1	102.5	100.5	98.4	4.5			
	1000	1	991	971	1001	999	999	991	99.2	1.1	98.3	2.5	
		2	988	951	994	1023	946	1036	99.0	3.7			
		3	978	966	986	966	977	939	96.9	1.7			
氟苯尼考	10	1	10.25	10.47	10.32	10.60	10.40	10.04	103.5	1.9	101.2	2.9	
		2	10.28	9.59	10.26	9.75	10.29	9.94	100.2	3.0			
		3	10.22	10.31	10.01	9.84	9.95	9.57	99.8	2.7			
	100	1	99.4	97.0	102.9	100.6	101.2	101.0	100.4	2.0	98.8	3.0	
		2	93.5	94.6	101.7	104.0	98.7	97.2	98.3	4.1			
		3	98.0	94.3	96.6	100.8	97.6	98.6	97.7	2.2			

	1000	1	1003	989	1012	969	985	1003	99.4	1.6	98.5	2.9
		2	985	947	993	944	1025	1015	98.5	3.4		
		3	944	1024	995	937	965	998	97.7	3.5		

表 11 水产配合饲料准确度及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	1.73	1.73	1.84	1.99	1.94	1.87	92.6	5.8	98.4	6.0
		2	2.07	1.93	1.99	2.13	2.04	2.11	102.3	3.7		
		3	2.14	1.98	2.03	1.94	1.94	2.01	100.3	3.7		
	20	1	20.7	21.6	21.6	21.3	21.3	21.0	106.3	1.6	101.9	4.7
		2	21.2	19.0	19.4	20.0	19.9	18.8	98.6	4.4		
		3	19.0	21.5	20.4	19.9	19.6	20.6	100.8	4.3		
	200	1	200	201	197	203	204	200	100.3	1.2	101.9	3.8
		2	202	204	203	221	200	195	102.1	4.2		
		3	209	212	207	196	222	196	103.4	4.9		
甲砒霉素	10	1	9.84	9.68	10.31	9.80	9.57	9.75	98.2	2.6	99.6	3.0
		2	9.63	9.72	10.17	10.34	10.16	9.96	100.0	2.8		
		3	10.20	10.34	10.40	10.18	9.61	9.63	100.6	3.5		
	100	1	102.8	103.3	102.0	107.4	107.9	100.2	103.9	3.0	100.3	4.4
		2	102.3	102.1	97.8	94.5	101.8	95.8	99.1	3.5		
		3	92.6	102.7	97.9	97.8	103.4	93.3	98.0	4.6		
	1000	1	969	978	965	962	955	969	96.7	0.8	98.9	3.2
		2	973	1005	1023	929	1020	1016	99.4	3.7		
		3	960	970	1035	1026	1018	1020	100.5	3.1		
氟苯尼考	10	1	10.22	10.35	10.18	10.37	10.10	10.38	102.7	1.1	99.9	3.1
		2	9.52	9.58	9.99	9.73	10.30	9.86	98.3	2.9		
		3	10.19	9.58	9.65	9.69	10.33	9.87	98.9	3.1		
	100	1	101.2	100.6	100.0	101.8	100.3	102.8	101.1	1.0	98.9	3.2
		2	103.5	100.2	99.5	95.4	97.2	93.5	98.2	3.7		
		3	97.2	93.5	97.8	96.1	96.9	103.6	97.5	3.4		
	1000	1	981	996	977	966	957	981	97.6	1.4	97.2	3.4
		2	1029	921	977	1030	933	942	97.2	5.0		
		3	998	932	1017	968	951	945	96.9	3.4		

表 12 混合型饲料添加剂（复配抗氧化剂）准确度及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)					批内/%		批间/%	
								平均值	变异	平均值	变异

										系数		系数
氯霉素	2	1	1.85	1.92	1.84	2.00	1.79	1.95	94.6	4.1	99.9	5.8
		2	2.16	1.99	1.94	2.17	2.18	2.00	103.7	5.2		
		3	1.98	2.07	2.15	2.01	2.05	1.92	101.5	3.9		
	20	1	20.1	20.6	19.5	19.5	20.2	20.3	100.2	2.2	100.7	3.4
		2	19.5	20.3	18.7	20.3	19.5	21.5	99.8	4.8		
		3	20.1	20.9	20.3	20.5	19.5	21.1	102.0	2.8		
	200	1	190	184	196	191	194	198	96.1	2.6	99.9	4.4
		2	200	190	205	197	210	203	100.4	3.4		
		3	207	209	205	215	211	193	103.3	3.6		
甲砒霉素	10	1	10.0	10.1	9.91	10.3	9.08	9.73	98.5	4.3	98.4	3.0
		2	10.1	9.53	9.72	9.61	10.0	9.67	97.7	2.3		
		3	10.0	10.2	10.0	9.79	9.72	9.58	98.8	2.3		
	100	1	101	107	106	99.7	100	103	102.8	3.0	101.4	3.6
		2	102	101	95.9	103	96.5	102	100.1	3.1		
		3	105	92.4	102	103	104	101	101.2	4.5		
	1000	1	938	961	950	984	997	1001	97.2	2.7	98.0	3.7
		2	1023	1030	1039	1030	926	973	100.4	4.5		
		3	1003	974	933	935	950	993	96.5	3.1		
氟苯尼考	10	1	9.52	10.4	9.71	10.8	9.35	9.94	99.5	5.6	99.2	3.4
		2	9.86	10.0	9.72	10.1	9.96	9.78	99.0	1.4		
		3	10.0	9.58	9.82	9.72	10.0	10.3	99.0	2.6		
	100	1	99.2	100	97.8	97.7	100	99.2	99.0	1.0	97.9	3.2
		2	98.0	95.8	97.9	92.3	100	93.6	96.3	3.0		
		3	93.1	104	96.5	95.8	98.2	103.6	98.5	4.5		
	1000	1	999	1004	970	1032	990	1010	100.1	2.1	99.1	2.8
		2	985	940	975	966	1013	1008	98.1	2.8		
		3	1034	962	1009	937	996	1004	99.0	3.5		

表 13 混合型饲料添加剂（富马酸亚铁+硫酸亚铁）准确度及精密度结果

目标物	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	变异系数	平均值	变异系数
氯霉素	2	1	1.90	1.97	1.91	1.98	2.00	2.05	98.4	2.9	100.8	4.1
		2	1.92	1.95	2.15	2.03	2.02	1.93	100.0	4.3		
		3	2.14	2.07	2.04	2.00	2.18	2.05	104.0	3.2		
	20	1	20.1	21.8	20	20.6	21.2	21.8	104.6	3.9	102.7	4.3
		2	20.0	20.5	21.1	20.9	20.4	19.7	102.2	2.6		
		3	20.9	18.8	21.0	21.6	20.4	18.8	101.3	5.9		
	200	1	188	208	205	201	205	204	100.9	3.5	99.3	2.9
		2	191	195	194	196	199	201	98.0	1.8		

		3	199	196	193	204	193	204	99.1	2.5		
甲砒霉素	10	1	9.87	9.38	9.56	9.67	9.44	9.52	95.7	1.8	98.1	2.8
		2	10.0	9.55	10.1	10.0	9.85	9.97	99.1	2.0		
		3	9.64	9.91	9.75	10.0	10.5	9.93	99.6	3.0		
	100	1	102	109	103	98.9	103	99.8	102.6	3.5	98.0	4.6
		2	95.0	93.1	93.2	97.2	99.5	98.0	96.0	2.8		
		3	94.5	99.7	92.7	92.1	99.9	93.5	95.4	3.7		
	1000	1	965	1008	1009	1007	1027	951	99.5	3.0	98.6	3.6
		2	976	1038	987	960	1036	927	98.7	4.4		
		3	930	973	942	980	1012	1027	97.7	3.9		
氟苯尼考	10	1	9.24	9.36	9.12	10.5	9.41	10.1	96.2	5.7	98.6	4.0
		2	9.63	9.66	9.96	10.2	9.97	10.2	99.4	2.5		
		3	10.3	9.87	10.2	10.1	9.68	9.98	100.2	2.3		
	100	1	103	102	102	97.6	104.3	99.1	101.3	2.5	98.3	3.4
		2	100	92.3	96.0	100	93.7	99.8	97.0	3.6		
		3	97.9	97	96.9	96.4	98.6	93.2	96.7	1.9		
	1000	1	1004	1027	993	1057	1017	1001	101.7	2.3	99.4	2.9
		2	1016	991	964	1023	973	968	98.9	2.6		
		3	986	959	971	1011	990	940	97.6	2.6		

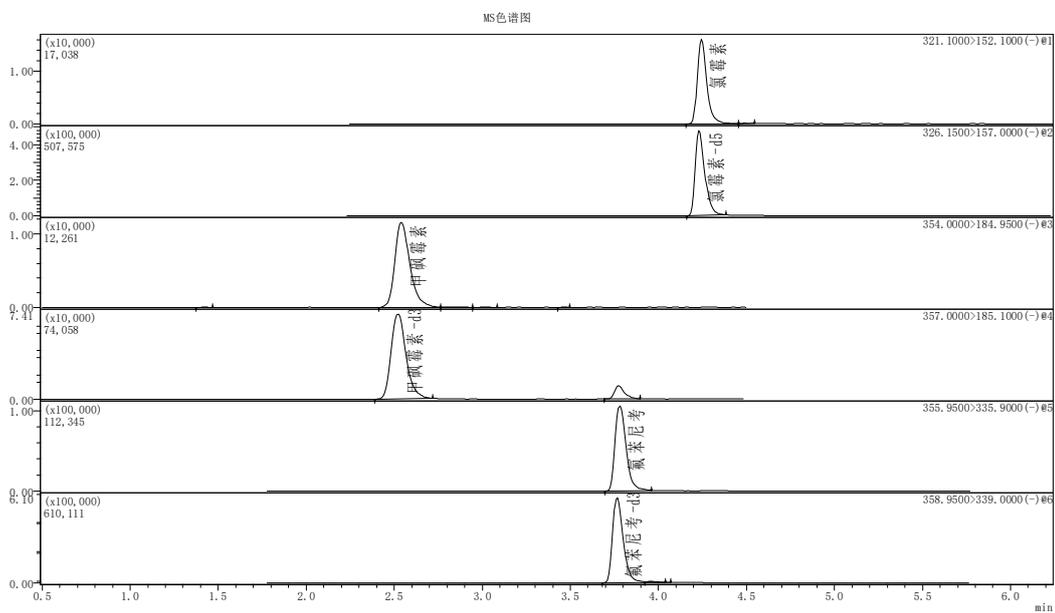


图 18 6 种镇定剂标准溶液 (1 µg/L) 质量色谱图

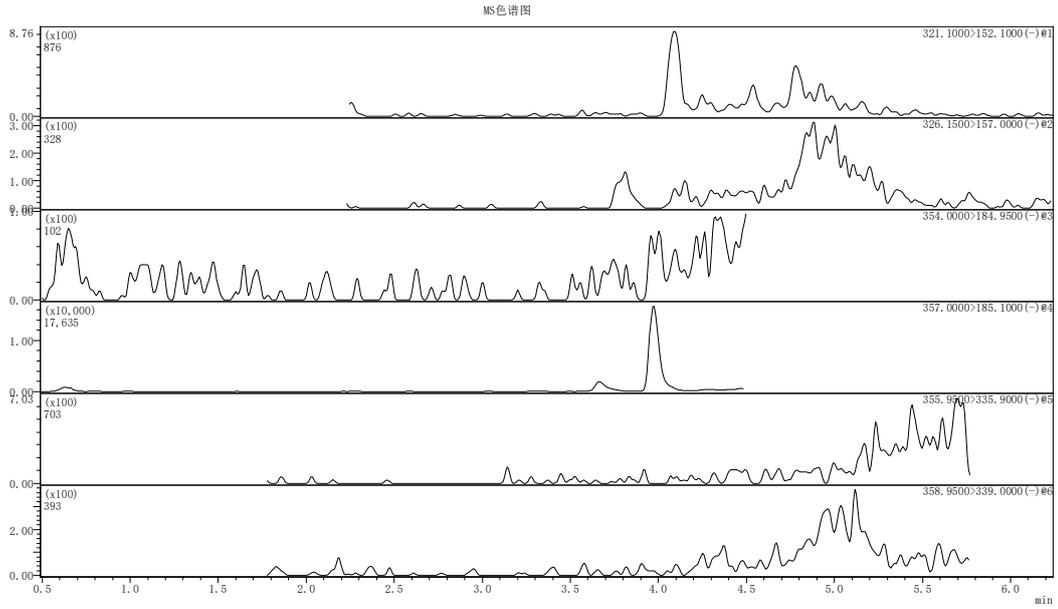


图 19 猪配合饲料空白样品质量色谱图

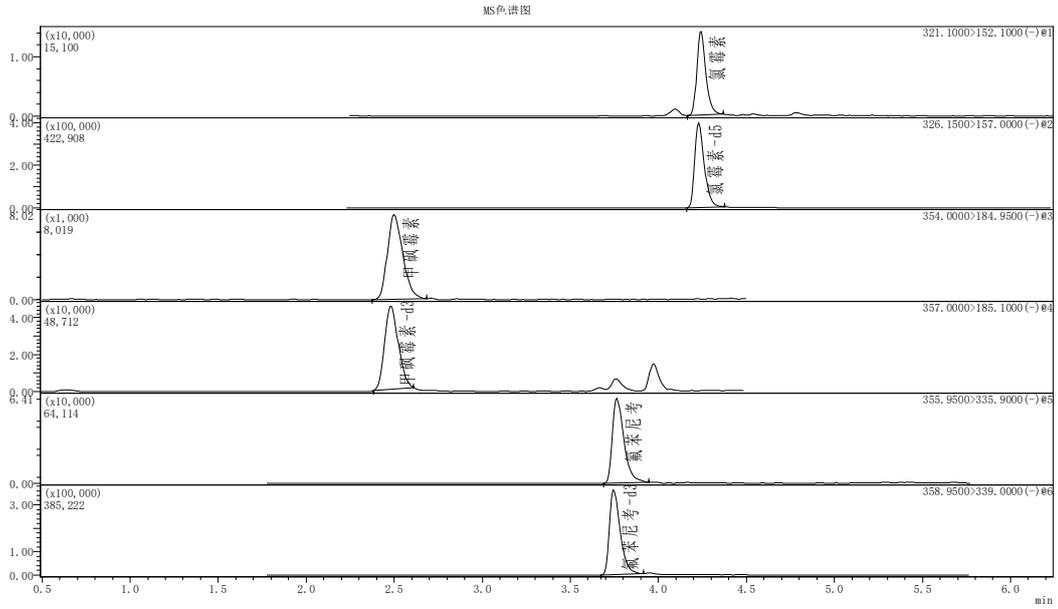


图 20 猪配合饲料添加样品质量色谱图

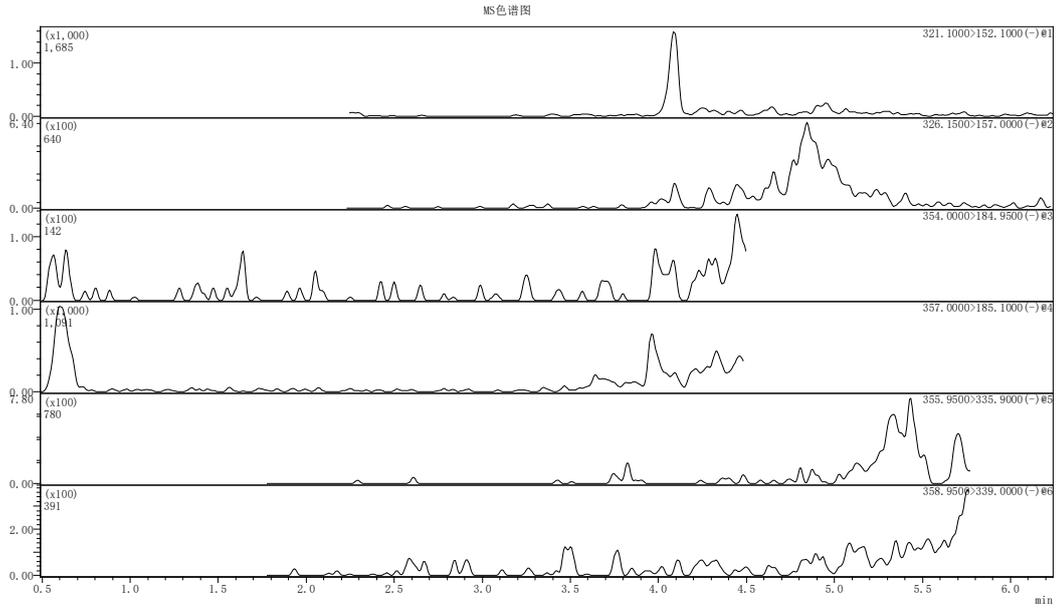


图 21 浓缩饲料空白样品质量色谱图

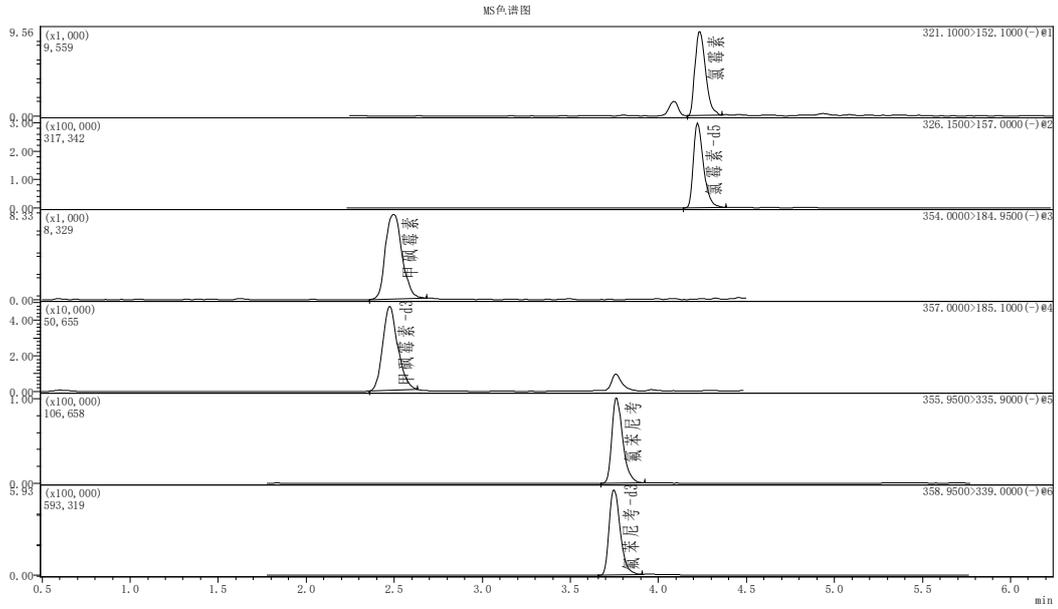


图 22 浓缩饲料添加样品质量色谱图

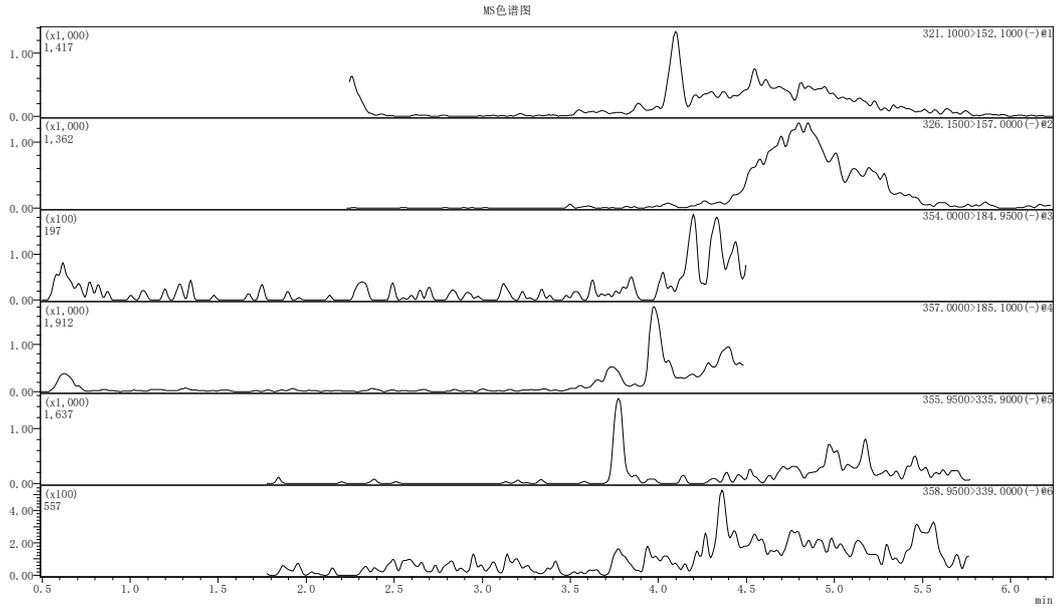


图 23 添加剂预混合饲料空白样品质量色谱图

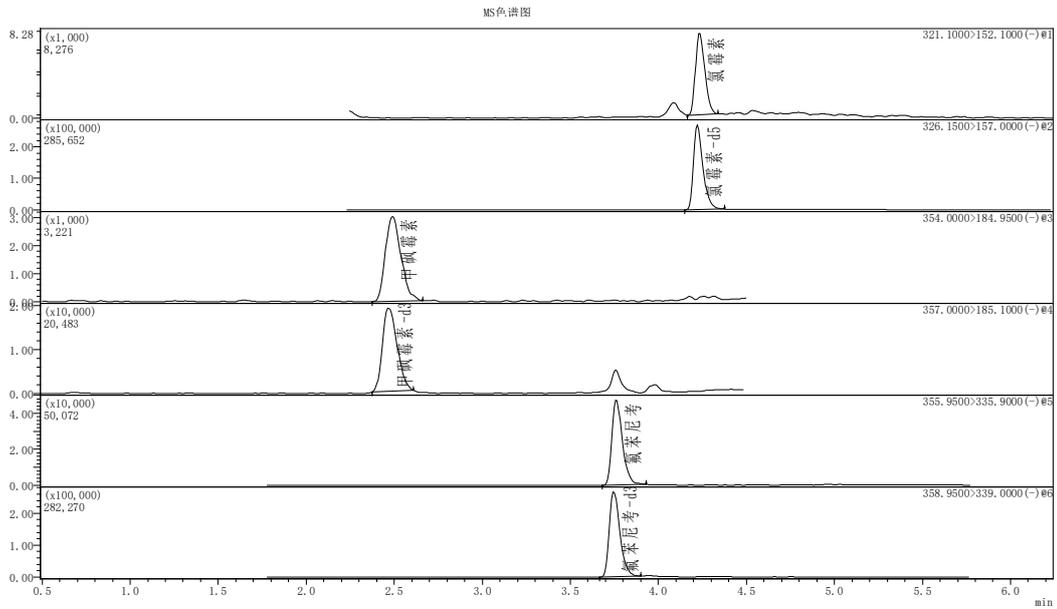


图 24 添加剂预混合饲料添加样品质量色谱图

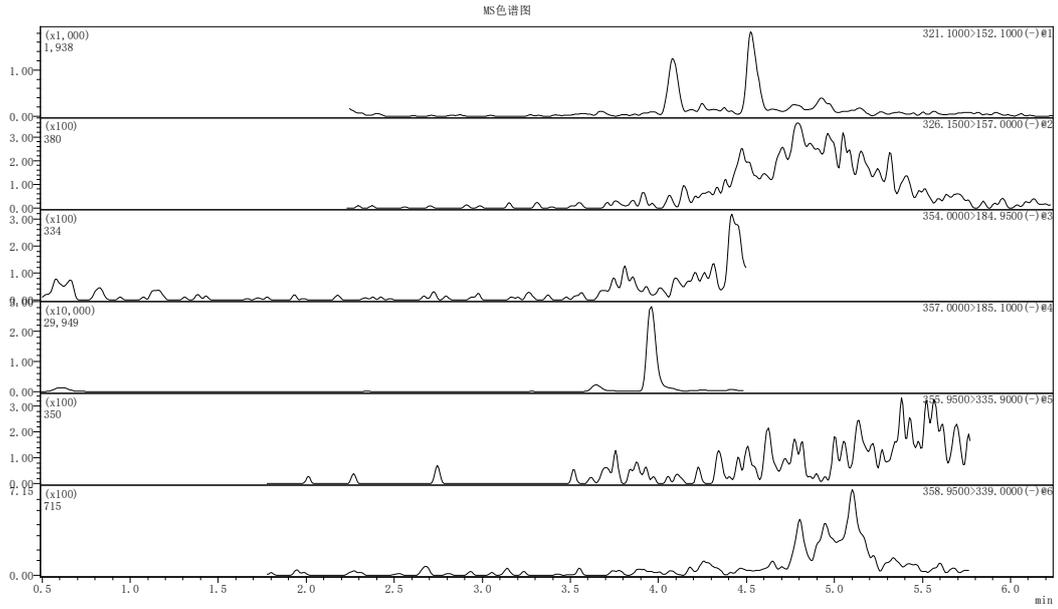


图 25 精料补充料空白样品质量色谱图

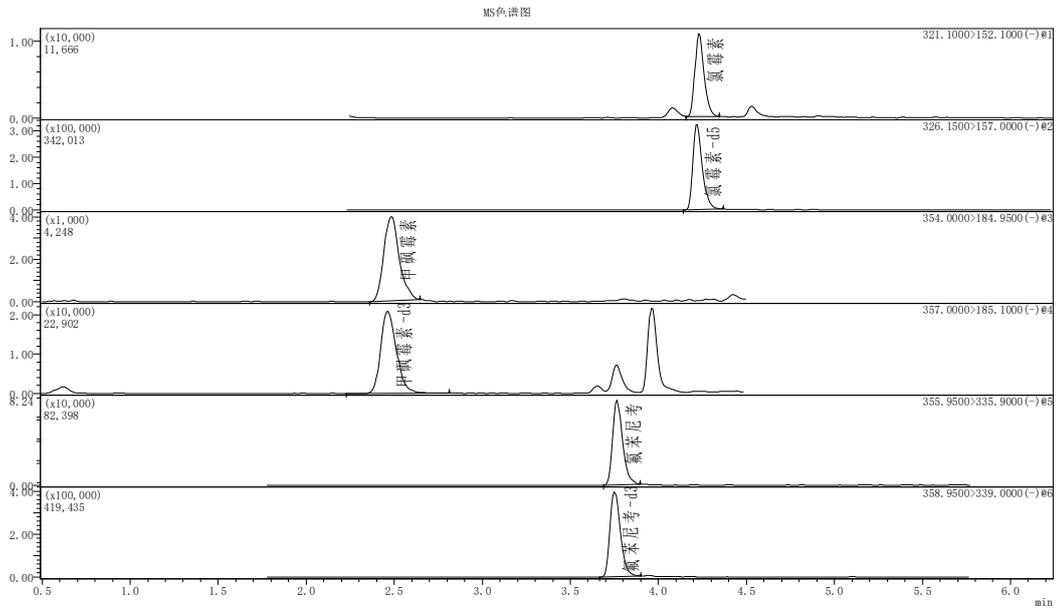


图 26 精料补充料添加样品质量色谱图

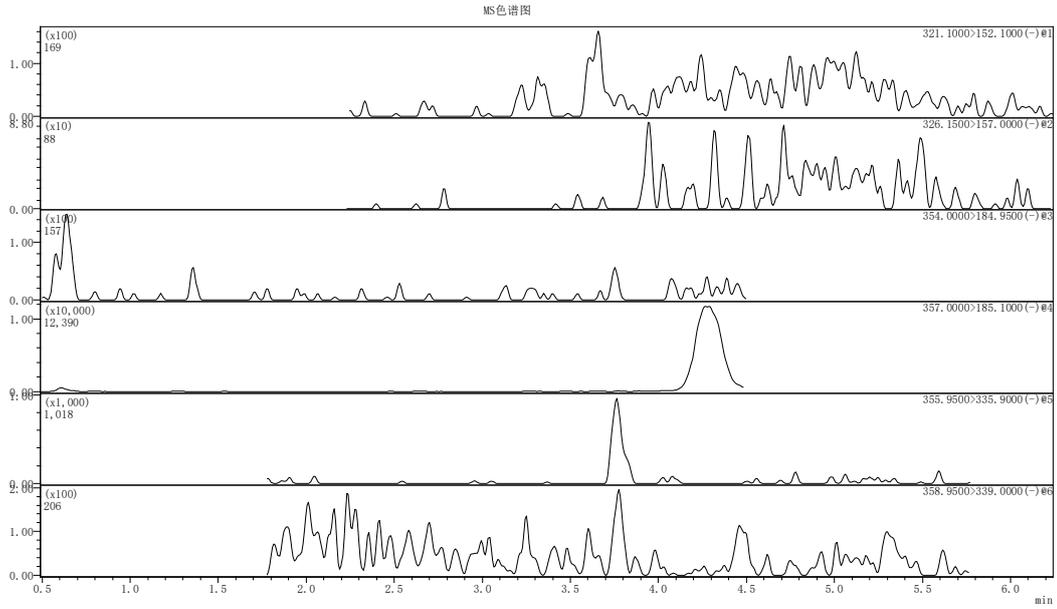


图 27 混合型饲料添加剂（复配抗氧化剂）空白样品质量色谱图

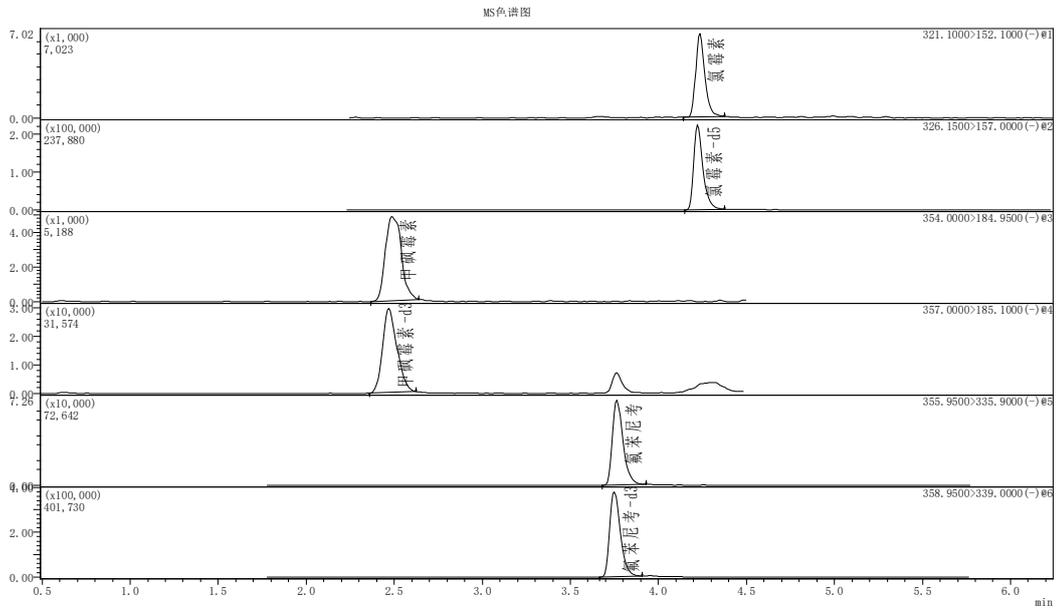


图 28 混合型饲料添加剂（复配抗氧化剂）添加样品质量色谱图

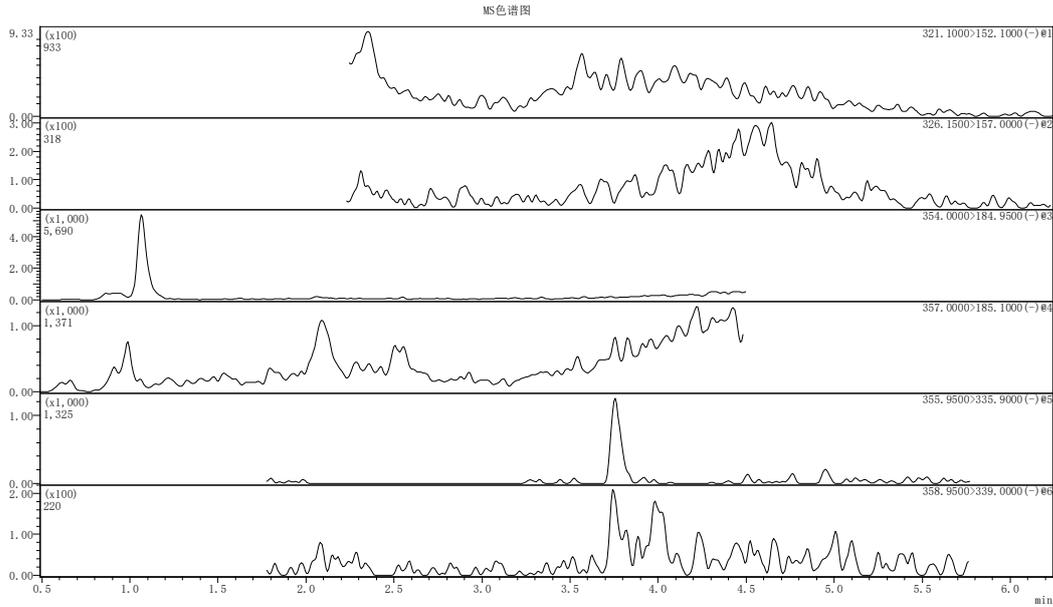


图 29 混合型饲料添加剂（富马酸亚铁+硫酸亚铁）空白样品质量色谱图

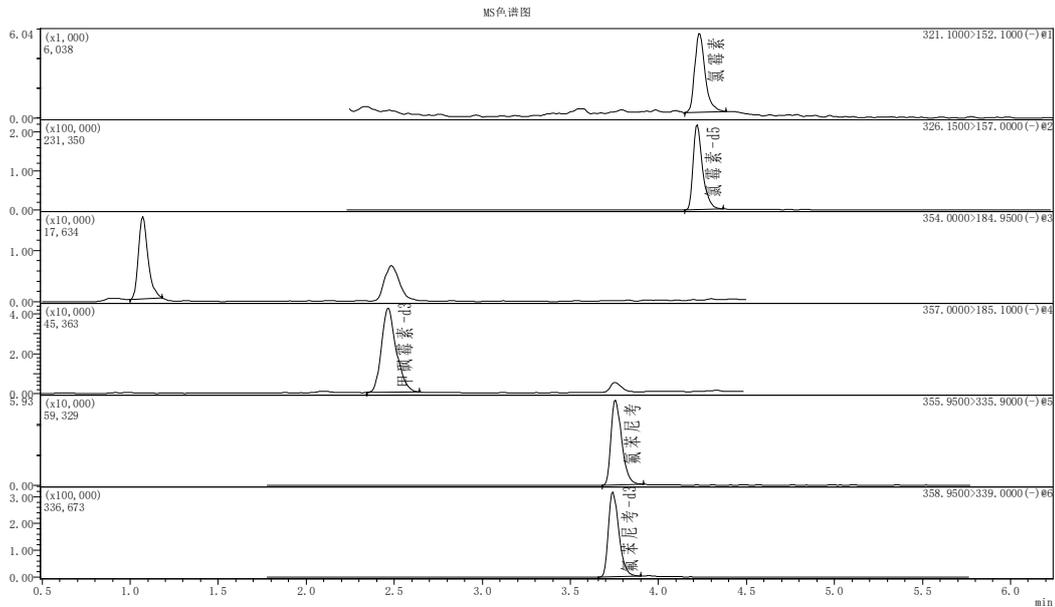


图 30 混合型饲料添加剂（富马酸亚铁+硫酸亚铁）添加样品质量色谱图

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，起草组委托 XXX、XXX、XXX 进行方法验证，验证结果良好，满足对应饲料样品的检验检测需要，能够有效检测 3 种酰胺醇类药物使用情况，确保产品的安全性。

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

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，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作；

(3) 建议本标准正式发布后，设定 6 个月的过渡期，过渡 6 个月后实施。

十、其他应当说明的事项

无。