

ICS 65.120

CCS B 46

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202×

## 饲料中抗生素滤渣的鉴别

Identify of antibiotic fermentation residue in feeds

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 饲料中抗生素滤渣的鉴别

## 1 范围

本文件描述了饲料中抗生素滤渣的显微红外光谱、实时荧光 PCR、液相色谱-高分辨质谱鉴别方法。

本文件中的显微红外光谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料原料和混合型饲料添加剂中 19 种抗生素滤渣（见附录 A）的鉴别。

本文件中的实时荧光 PCR 法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料原料和混合型饲料添加剂中青霉素、土霉素、新霉素和阿维菌素滤渣的鉴别。

本文件中的液相色谱-高分辨质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料原料和混合型饲料添加剂中金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣的鉴别。

## 2 规范性引用文件

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 6041 质谱分析方法通则
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 8322 分子吸收光谱法 术语
- GB/T 13966 分析仪器术语
- GB/T 20195 动物饲料 试样的制备
- SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

## 3 术语和定义

GB/T 6041、GB/T 8322、GB/T 13966 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**抗生素滤渣 antibiotic fermentation residue**  
生物发酵生产抗生素产品过程中产生的废弃物。

### 3.2

**余弦相似度 cosine similarity**  
两个光谱向量的夹角余弦值。

注：用于衡量光谱间的差异大小，余弦相似度值越接近 1，说明两个光谱越相似。

### 3.3

**阈值 threshold**  
根据余弦相似度判断待测光谱是否和目标光谱相似的临界值。

## 4 显微红外光谱法

### 4.1 原理

利用显微红外成像系统采集样品的显微红外光谱,计算样品显微红外光谱与抗生素滤渣显微红外参比光谱中光谱的余弦相似度,根据阈值鉴别样品中抗生素滤渣的存在。

### 4.2 仪器设备

4.2.1 显微红外成像系统:配有光源、分光系统、检测器、样品台、测量附件和配套的数据处理软件等。波数范围应包括  $2\ 000\ \text{cm}^{-1}\sim 800\ \text{cm}^{-1}$ 。

4.2.2 压片机:配有压片模具、压力表、加压系统、保护装置等。可将饲料粉末或固体颗粒压成表面平整光滑且不易损坏的压片。

### 4.3 样品

按 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。

### 4.4 试验步骤

#### 4.4.1 试样压片制备

取适量试样,用压片机在一定压力及压制时间制备试样压片,所用试样质量、压力和压制时间的确定应确保压片表面平整且在分析过程中不易破损。

注 1:应检查试样压片表面平整度,避免出现凹陷、突起、裂痕等影响红外光谱采集的物理缺陷。

注 2:在试样压片制备过程中,应保持压片模具的清洁,避免出现样品污染。试样压片在制备及分析过程中应避免触摸以防污染样品。

#### 4.4.2 显微红外光谱采集

显微红外光谱采集参考条件如下:

- a) 光谱分辨率为  $8\ \text{cm}^{-1}$ 。
- b) 空间分辨率为  $25\ \mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$ 。
- c) 采集不低于 2 万条显微红外光谱。

#### 4.4.3 显微红外光谱预处理

用主成分降噪方法提高显微红外光谱的信噪比,对光谱进行二阶导数处理,剔除  $\text{CO}_2$  在  $2349\ \text{cm}^{-1}$  附近的红外波段。

#### 4.4.4 余弦相似度计算

试样显微红外光谱与抗生素滤渣参比光谱中光谱的余弦相似度按式(1)计算:

$$\text{similarity} = \cos(\theta) = \frac{A \cdot B}{|A| \cdot |B|} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- similarity* ——光谱 A 与光谱 B 的余弦相似度；  
 $\theta$  ——光谱 A 与光谱 B 的夹角；  
*A* ——光谱 A，试样显微红外光谱；  
*B* ——光谱 B，抗生素滤渣参比光谱，抗生素滤渣参比光谱见附录 B 中 B.1。

#### 4.5 结果判定

若余弦相似度大于等于阈值（阈值的确定见附录 B 中 B.2），则判定为含有抗生素滤渣的疑似阳性样品。根据余弦相似度值的大小列出可能含有的 XXX 滤渣。若余弦相似度低于阈值则判定为阴性样品。

### 5 实时荧光 PCR 法

#### 5.1 原理

针对抗生素合成菌种相关特异性基因设计引物、探针，对试样进行实时荧光 PCR 扩增，根据扩增反应中产生的荧光信号强度和 Ct 值鉴别饲料中抗生素滤渣的存在。

#### 5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。所有试剂均使用无 DNA 酶污染的容器存储或分装。

- 5.2.1 水：GB/T 6682，一级。  
 5.2.2 2×实时荧光 PCR 预混液。  
 5.2.3 盐酸溶液（1 mol/L）：移取盐酸 8.33 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。  
 5.2.4 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取氢氧化钠 4.0 g，用水溶解并稀释至 100 mL，混匀。  
 5.2.5 Tris-HCl 溶液（1 mol/L，pH 8.0）：称取 6.06 g 三羟甲基氨基甲烷（Tris），加入 40 mL 水溶解，用 1 mol/L 盐酸溶液（5.2.3）调 pH 至 8.0，定容至 50 mL，混匀。  
 5.2.6 EDTA 溶液（0.5 mol/L，pH 8.0）：称取 9.306 g 二水乙二胺四乙酸二钠（EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ），加入 35 mL 水溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液（5.2.4）调 pH 至 8.0，定容至 50 mL，混匀。  
 5.2.7 Tris-EDTA 缓冲液：移取 10 mL Tris-HCl 溶液（5.2.5），2 mL EDTA 溶液（5.2.6），加水定容至 1 L，混匀。  
 5.2.8 引物和探针溶液：用 Tris-EDTA 缓冲液（5.2.7）将每条引物和探针分别配制成 10  $\mu\text{mol/L}$  溶液。分装， $-18\text{ }^\circ\text{C}$  以下保存。序列见附录 C。  
 5.2.9 阳性对照样品：至少含有 5%（W/W）目标抗生素滤渣的饲料样品。  
 5.2.10 阴性对照样品：不含目标抗生素滤渣的饲料样品。  
 5.2.11 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

#### 5.3 仪器设备

- 5.3.1 实时荧光 PCR 仪。  
 5.3.2 分析天平：精度为 0.1 mg。  
 5.3.3 紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪。  
 5.3.4 pH 计：精度为  $\pm 0.1$ 。  
 5.3.5 离心机：转速不低于 14 000 r/min。

## 5.4 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎或研磨使其全部通过0.25 mm孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

## 5.5 试验步骤

### 5.5.1 DNA 提取

平行做两份试验。称取20~50 mg试样（精确至0.1 mg），按照细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书提取DNA，-18℃以下保存。

阳性对照样品（5.2.9）和阴性对照样品（5.2.10）同步提取。

### 5.5.2 DNA 浓度的测定

DNA溶液（5.5.1）的质量浓度用紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪（5.3.3）测定，浓度应控制在5~50 ng/μL。

### 5.5.3 实时荧光 PCR 检测

#### 5.5.3.1 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表1。用等体积的水替代DNA溶液作为扩增空白对照。

表1 实时荧光 PCR 反应体系

目标基因	2×实时荧光 PCR 预混液	上游引物	下游引物	探针	DNA 模板	无菌水
青霉素滤渣 <i>orf70c</i>	12.5 μL	1.0 μL	1.0 μL	0.25 μL	5.0 μL	5.25 μL
土霉素滤渣 <i>oxyA</i>	12.5 μL	1.0 μL	1.0 μL	0.25 μL	5.0 μL	5.25 μL
新霉素滤渣 <i>neoN</i>	12.5 μL	1.0 μL	1.0 μL	0.25 μL	5.0 μL	5.25 μL
阿维菌素滤渣 <i>aveD</i>	12.5 μL	2.0 μL	2.0 μL	0.5 μL	5.0 μL	3.0 μL

#### 5.5.3.2 反应程序

实时荧光 PCR 反应程序见表2。

表2 反应程序

程序	反应温度	反应时间	荧光信号	循环数
预变性	95 °C	3 min	/	1
热循环	95 °C	15 s	/	40
	60 °C	40 s	采集, FAM通道	

## 5.6 质量控制

符合以下条件，检测结果成立，否则应重新检测：

- 扩增空白对照：Ct值 $\geq$ 40.0或无Ct值；
- 阴性对照：荧光通道无荧光信号检出，Ct值 $\geq$ 40.0或无Ct值；
- 阳性对照：荧光通道有荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct值 $\leq$ 35.0；
- 两份平行检测样品结果一致。

## 5.7 结果判定

在符合5.6的情况下，结果判定如下：

- a) Ct值 $\leq$ 35.0，则判定为被检样品疑似阳性；
- b) Ct值 $\geq$ 40.0或无Ct值，则判定为被检样品阴性；
- c)  $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$ ，则需重新提取DNA后再检测。如再次扩增后Ct值仍为 $<40.0$ ，则判定被检样品疑似阳性；如再次扩增后Ct值 $\geq 40.0$ 或无Ct值，则判定被检样品阴性。

## 5.8 检测过程中防止交叉污染的措施

按SN/T 1193的规定执行。

## 6 液相色谱-高分辨质谱法

### 6.1 原理

试样经提取后，液相色谱—高分辨质谱仪检测，用抗生素滤渣的特征质谱信息进行鉴别。

### 6.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

6.2.1 水：GB/T 6682，一级。

6.2.2 甲酸：色谱纯。

6.2.3 甲醇：色谱纯。

6.2.4 乙腈：色谱纯。

6.2.5 0.1%甲酸溶液：移取1 mL甲酸（6.2.2），用水稀释至1 000 mL，混匀。

6.2.6 0.5%乙二胺四乙酸溶液：称取5 g乙二胺四乙酸，用水溶解并稀释至1 000 mL，混匀。

6.2.7 试样提取溶液：移取50 mL 0.5%乙二胺四乙酸溶液（6.2.6），加入750 mL乙腈、100 mL甲醇、100 mL二甲基亚砷，混匀。

6.2.8 抗生素滤渣标志物的标准品：如相关的标志物能获得，应收集相关中英文名称、CAS号、分子式、配制溶剂、特征碎片离子等信息见附录D。

6.2.9 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取适量标准品（以有效成分计，精确至0.01 mg），采用附录D中对应溶剂配制。新霉素标准品需使用聚丙烯材质容器保存。-18℃以下避光保存，有效期6个月。或使用有证标准。

6.2.10 标准工作溶液（10  $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准储备溶液（6.2.9）0.1 mL，用提取溶液稀释并定容至10 mL，混匀。-18℃以下避光保存，有效期7 d。

6.2.11 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，有机系。

### 6.3 仪器设备

6.3.1 液相色谱-高分辨质谱仪：一级分辨率不小于20 000〔以利血平  $m/z=609.2807$  为基准，按半峰宽（FWHM）计〕，质量准确性相对偏差不大于5 ppm（parts per million， $m/z=609.2807$ ）；二级分辨率不小于10 000。

6.3.2 分析天平：精度为0.1 mg和0.01 mg。

6.3.3 离心机：转速不低于 8 000 r/min。

6.3.4 超声波清洗仪。

#### 6.4 样品

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，充分混匀。装入密闭容器中，备用。

#### 6.5 试验步骤

##### 6.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 5 g（精确至 0.1 mg），置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 试样提取溶液（6.2.7），超声提取 30 min，每 10 min 振摇一次，8 000 r/min 离心 5 min，取上清液，用 0.22 μm 滤膜（6.2.11）过滤，上机检测。

##### 6.5.2 检测

###### 6.5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长100 mm，内径3.0 mm，粒径1.7 μm，或性能相当者；
- b) 柱温：30 °C；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 进样量：5 μL；
- e) 流动相：A相为0.1%甲酸溶液（6.2.5）；B相为乙腈，梯度洗脱，梯度洗脱程序见表3。

表 3 梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.00	90	10
1.50	90	10
4.00	70	30
9.00	5	95
10.00	5	95
10.10	90	10
12.00	90	10

###### 6.5.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 电离模式：正离子扫描（ESI+）；
- c) 采集模式：一级全扫描和子离子二级全扫描（FULL-DD-MS<sup>2</sup>，高灵敏度模式），或效果相当的其他扫描模式；
- d) 扫描质量范围：MS扫描范围：m/z 100~2 000；

- e) 毛细管电压：4.0 kV；
- f) 离子源温度：120 °C；
- j) 去溶剂温度：320 °C。

### 6.5.2.3 标准工作溶液和试样溶液的检测

在仪器的最佳条件下，取标准工作溶液（6.2.10）和试样溶液（6.5.1）上机检测，参考的抗生素滤渣全扫描色谱图见附录E。

### 6.5.3 高分辨特征质谱信息模型的构建及标志物的确定

#### 6.5.3.1 高分辨特征质谱信息模型的构建

高分辨特征质谱信息模型的构建按附录F规定执行。

#### 6.5.3.2 标志物的确定

标志物的确定按附录F规定执行。

## 6.6 抗生素滤渣鉴别

### 6.6.1 标志物的鉴别

如有标志物标准品，应使用参考标准物质进行对照试验，参考标准物质浓度应与样品中目标化合物的浓度接近。如能获得与样品相似的空白基质，应将其添加到基质中进行试验。对于初步鉴别出的标志物，在二级离子扫描（Target MS/MS）下检测其在不同碰撞能下典型的二级碎片离子（见附录F），如果至少有2个及以上丰度较高的碎片离子测定精确质量数与标志物相应碎片离子质量数相对偏差小于或等于 $10 \times 10^{-6}$ ，且上述二级碎片离子与浓度接近的标准工作液中对应的碎片离子的相对丰度一致，即偏差不超过表3规定的范围，且平行试验结果一致的情况下，可判定为试样中存在该标志物。

### 6.6.2 高分辨特征质谱信息模型鉴别

将质量数提取窗口调整至一级母离子为 $10 \times 10^{-6}$ ，二级子离子为 $20 \times 10^{-6}$ ，对试样溶液的全扫描所获得的总离子流图进行提取，选择可辨识的色谱峰，将其与经验证的抗生素滤渣高分辨特征质谱信息（见附录D）进行对比。对比结果同时符合表4中所示条件时，可认为筛查到与特征质谱信息模型一致。

表4 筛查判定条件

判别项	判定条件
采样点数	单个目标物峰不少于5个采样点。
信号响应要求	1) 信噪比（S/N）存在时，应使 $S/N \geq 3$ 。 2) 当S/N不存在时，以95%置信度水平上可准确定性该化合物的最低检测浓度作为检测限。
质量准确性	1) 一级母离子 $m/z \geq 200$ 时，其相对偏差应 $\leq 10 \times 10^{-6}$ 。 2) 一级母离子 $m/z < 200$ 时，其绝对偏差应 $< 1000 \times 10^{-6}$ 。

## 6.7 结果判定

若待测物存在标志物，或与特征质谱信息模型一致，则判定该样品含有 XXX 滤渣，为疑似阳性样品。否则为阴性样品。

## 7 疑似阳性样品确认

综合显微红外光谱法、实时荧光 PCR 法、液相色谱-高分辨质谱法的鉴定结果，若两种或两种以上方法鉴别为疑似阳性样品，则判定其含有 XXX 滤渣；若两种或两种以上方法鉴别为阴性样品，则判定不含有 XXX 滤渣。

## 附录 A

(规范性)

## 19 种抗生素滤渣清单

19 种抗生素滤渣见表 A.1。

表 A.1 抗生素滤渣清单

序号	抗生素滤渣名称	类别
1	单硫酸卡那霉素滤渣	氨基糖苷类
2	硫酸新霉素滤渣	
3	硫酸安普霉素滤渣	
4	吉他霉素滤渣	
5	硫酸庆大霉素滤渣	
6	盐酸大观霉素滤渣	
7	硫酸链霉素滤渣	
8	酒石酸泰万菌素滤渣	大环内酯类
9	酒石酸泰乐菌素滤渣	
10	阿维菌素滤渣	
11	硫氰酸红霉素滤渣	截短侧耳素类
12	沃尼妙林滤渣	
13	泰妙菌素滤渣	四环素类
14	盐酸金霉素滤渣	
15	土霉素滤渣	林可酰胺类
16	盐酸林可霉素滤渣	
17	硫酸粘菌素滤渣	多肽类
18	青霉素滤渣	$\beta$ -内酰胺类
19	黄霉素滤渣	其它类

## 附录 B

(规范性)

### 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取和阈值确定

#### B.1 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取

##### B.1.1 抗生素滤渣样品采集

###### B.1.1.1 采集

用于获取抗生素滤渣显微红外参比光谱的抗生素滤渣样品应保证真实性和代表性。影响因素包括但不限于如下内容：

- a) 菌种和菌株的不同；
- b) 发酵和提取工艺的不同；
- c) 厂家、产地、设备和批次的不同。

样品随机分为两部分，一部分为用于获取参比光谱的抗生素滤渣样品，另一部分为确定阈值的抗生素滤渣样品。

###### B.1.1.2 制备

所有样品须粉碎使其全部过 0.425 mm 试验筛，水分含量较高的样品须先在 60 °C 条件下烘干。

##### B.1.2 压片

抗生素滤渣压片制备见 4.4.1。

##### B.1.3 显微红外光谱采集

见 4.4.2。

##### B.1.4 显微红外光谱预处理

见 4.4.3。

##### B.1.5 抗生素滤渣显微红外参比光谱

选取有代表性和真实的抗生素滤渣建立抗生素滤渣显微红外参比光谱。

#### B.2 阈值的确定

计算确定阈值的抗生素滤渣样品的显微红外光谱与参比光谱的余弦相似度，根据余弦相似度值 2.5% 下百分位数确定阈值。

阈值确定实施例见 B.3。

#### B.3 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取和阈值确定实施例

##### B.3.1 抗生素滤渣样品采集与制备

收集来自不同抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的代表性抗生素滤渣样品 44 个，种类及数量见表 B.1。采集的样品中水分含量较高的样品先在 60 °C 条件下烘干至恒重，后将所有干燥样

品粉碎过 0.425 mm 筛。所有抗生素滤渣样品随机分为两部分，一部分为用于获取参比光谱的抗生素滤渣样品，另一部分为确定阈值的抗生素滤渣样品。

取 200 mg 试样，用压片机在 40 MPa 压力及 2 min 的条件下制备试样压片，确保压片表面平整且在分析过程中不易破损。制备好的压片为厚度约 1 mm、直径 13 mm 的圆形压片。

表 B.1 抗生素滤渣采集信息表

类别	抗生素滤渣名称	数量
氨基糖苷类	单硫酸卡那霉素滤渣	1
	硫酸新霉素滤渣	5
	硫酸安普霉素滤渣	2
	吉他霉素滤渣	1
	硫酸庆大霉素滤渣	1
	盐酸大观霉素滤渣	2
	硫酸链霉素滤渣	2
大环内酯类	酒石酸泰万菌素滤渣	4
	酒石酸泰乐菌素滤渣	4
	阿维菌素滤渣	3
	硫氰酸红霉素滤渣	1
截短侧耳素类	沃尼妙林滤渣	1
	泰妙菌素滤渣	1
四环素类	盐酸金霉素滤渣	3
	土霉素滤渣	4
林可酰胺类	盐酸林可霉素滤渣	1
多肽类	硫酸粘菌素滤渣	4
$\beta$ -内酰胺类	青霉素滤渣	3
其它类	黄霉素滤渣	1
合计		44

### B.3.2 显微红外光谱采集

采用傅里叶变换红外显微成像系统采集抗生素滤渣样品的显微红外图像。根据显微红外成像系统仪器厂商规定的操作指南或使用说明书，采集前，添加液氮对检测器进行制冷，并预热 1 h 之后，进行设备自检，自检成功后采集显微红外图像。

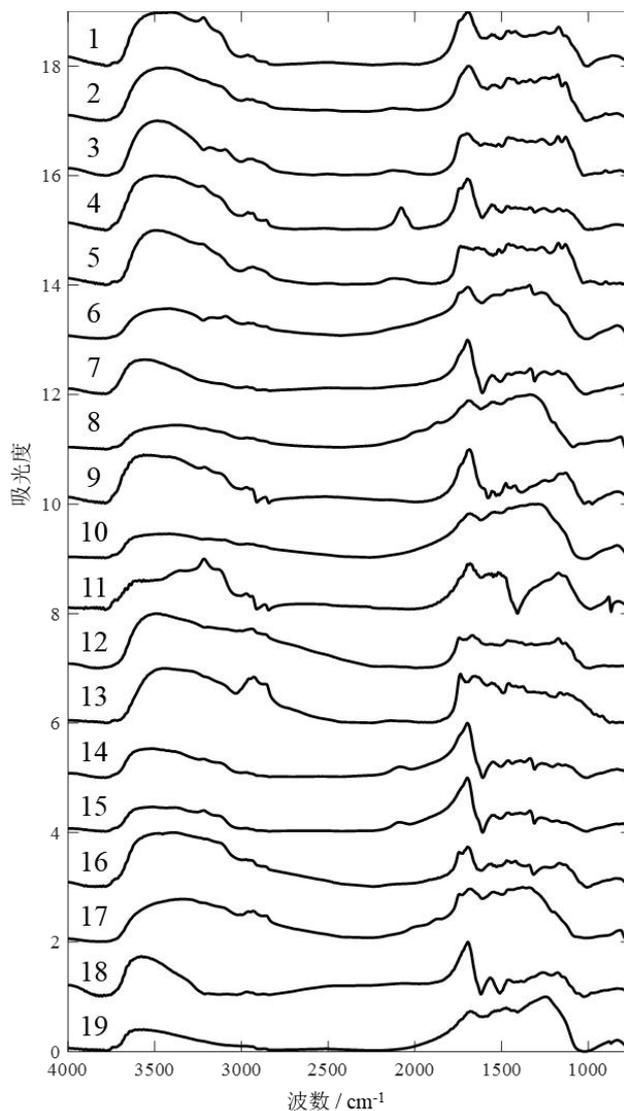
显微红外光谱采集条件如下：波数范围  $4\ 000\text{ cm}^{-1}\sim 750\text{ cm}^{-1}$ ，光谱分辨率为  $8\text{ cm}^{-1}$ ，扫描次数为 16 次，干涉仪动镜移动速度为  $1\text{ cm/s}$ ，空间分辨率为  $25\ \mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$ ，压片分析面积为  $4\ 000\ \mu\text{m}\times 4\ 000\ \mu\text{m}$ ，即每个压片获得 25 600 条光谱。

### B.3.3 显微红外光谱预处理

利用主成分分析进行降噪处理，通过优化选取前 20 个主成分对显微红外图像进行重构，从而实现显微红外光谱的降噪。对降噪后的红外光谱进行二阶导数处理（窗口宽度为 5）提高光谱的分辨率。剔除  $2\ 422\text{ cm}^{-1}\sim 2\ 263\text{ cm}^{-1}$  波段的显微红外光谱以扣除  $\text{CO}_2$  信号对分析的干扰。

### B.3.4 抗生素滤渣显微红外参比光谱

基于光谱欧氏距离从每个抗生素滤渣样品 25 600 条显微红外光谱中选取 4 000 条代表性显微红外参比光谱。不同抗生素滤渣的平均显微红外参比光谱如图 B.1 所示。



标引序号说明:

1——卡那霉素滤渣；2——新霉素滤渣；3——安普霉素滤渣；4——吉他霉素滤渣；5——庆大霉素滤渣；6——大观霉素滤渣；7——链霉素滤渣；8——泰万菌素滤渣；9——泰乐菌素滤渣；10——阿维菌素滤渣；11——红霉素滤渣；12——沃尼妙林滤渣；13——泰妙菌素滤渣；14——金霉素滤渣；15——土霉素滤渣；16——林可霉素滤渣；17——粘菌素滤渣；18——青霉素滤渣；19——黄霉素滤渣。

图 B.1 各类抗生素滤渣的平均显微红外参比光谱

### B.3.5 阈值的确定

对每一类抗生素滤渣样品，按公式（1）计算确定阈值的抗生素滤渣样品的显微红外光谱与参比光谱的余弦相似度，根据余弦相似度值 2.5% 下百分位数确定阈值。抗生素滤渣名称、各类抗生素滤渣显微红外参比光谱数量及阈值如表 B.2 所示。

表 B.2 抗生素滤渣鉴别显微红外光谱余弦相似度阈值

抗生素滤渣名称	显微红外参考光谱数	阈值（2.5%下百分位数）
单硫酸卡那霉素滤渣	4 000	0.94
硫酸新霉素滤渣	20 000	0.92
硫酸安普霉素滤渣	8 000	0.91
吉他霉素滤渣	4 000	0.95
硫酸庆大霉素滤渣	4 000	0.93
盐酸大观霉素滤渣	8 000	0.90
硫酸链霉素滤渣	8 000	0.92
酒石酸泰万菌素滤渣	16 000	0.94
酒石酸泰乐菌素滤渣	16 000	0.92
阿维菌素滤渣	12 000	0.90
硫氰酸红霉素滤渣	4 000	0.94
截短侧耳素滤渣	4 000	0.93
泰妙菌素滤渣	4 000	0.93
盐酸金霉素滤渣	8 000	0.93
土霉素滤渣	16 000	0.96
盐酸林可霉素滤渣	4 000	0.95
硫酸粘菌素滤渣	16 000	0.95
青霉素滤渣	12 000	0.92
黄霉素滤渣	4 000	0.93

注：阈值会随抗生素滤渣显微红外参比光谱的变化而变化，但随着代表性抗生素滤渣样品的丰富，该阈值会逐渐趋于稳定。

## 附录 C

(规范性)

## 抗生素滤渣检测用引物探针序列信息

C.1 抗生素滤渣检测用引物探针序列信息序列见表 C.1。

表 C.1 抗生素滤渣检测用引物探针序列信息

名称	引物/探针名称	引物/探针序列	基因来源	扩展片段长度
青霉素滤渣	Orf70c-F	5'-GAGCCTTCGGATTTTCGCC-3'	<i>orf70c</i>	112 bp
	Orf70c-R	5'-GCCAGCTCGCCTTACTACAA-3'		
	Orf70c-P	5'-FAM-TGGCTCGGACATCCATGCCCT-BHQ1-3'		
土霉素滤渣	OxyA-F	5'-CATGACGATGAGCCTGGACC-3'	<i>oxyA</i>	114 bp
	OxyA-R	5'-GACGAGGGCACGAAGTAGTC-3'		
	OxyA-P	5'-FAM-GGCTGTGGCAGGTGGACGAC-BHQ1-3'		
新霉素滤渣	NeoN-F	5'-TCAACGCCTACATCGACCTG-3'	<i>neoN</i>	181 bp
	NeoN-R	5'-CCGGTCTCGAAGATGTGGTT-3'		
	NeoN-P	5'-FAM-GCTGACCGTGAACCTGCGCT-BHQ1-3'		
阿维菌素滤渣	AveD-F	5'-CGATGAGGAGATCGGTGAGC-3'	<i>aveD</i>	140 bp
	AveD-R	5'-AGTGGGGGACTACTACGACC-3'		
	AveD-P	5'-FAM-TTGCCCGGTGAACTGCCGTC-BHQ1-3'		

## 附录 D

(资料性)

## 抗生素滤渣及部分标志物相关质谱信息

抗生素滤渣及部分标志物相关质谱信息见表 D.1。

表 D.1 抗生素滤渣及部分标志物相关质谱信息

滤渣类型	标志物	溶剂	分子量	一级离子对	二级离子对
金霉素滤渣	金霉素	甲醇	478.12	479.1215	292.1054、307.1287、335.1237、 367.1499
	去甲基金霉素	甲醇	464.1063	465.1065	428.0749、410.0643、358.0921
	四环素四并苯骨架	甲醇	357.10	358.1029	323.0659、308.0428、341.0708
	脱水四环素	甲醇	442.14	443.1448	154.0500、201.0549、426.1186、 226.0712
土霉素滤渣	土霉素	甲醇	460.15	461.1554	154.0500、201.0549、337.0708、 426.1186
	四环素	甲醇	444.16	445.1605	154.0500、201.0549、392.1129、 410.1235
	4-氨基脱水四环素	甲醇	442.14	443.1448	154.0500、201.0549、426.1186、 358.0921
	脱水四环素	甲醇	426.14	427.1453	358.0921、409.1350、392.1085
泰乐菌素滤渣	泰乐菌素、	乙腈	915.52	916.5264	174.1125、158.1176、116.1071、576.3740
	泰万菌素	乙腈	1041.61	1042.5863	174.1125、814.4536、814.1421
	泰乐酮	乙腈	394.54	395.2836	189.1652、207.1842
泰万菌素滤渣	泰乐菌素	乙腈	915.52	916.5264	174.1125、158.1176、116.1071、576.3740
	泰万菌素	乙腈	1041.61	1042.5863	174.1125、814.4536、229.1421
	Methylmalonyl-CoA	乙腈	867.60	868.5124	174.1139、109.0659、640.3743
	泰乐酮	乙腈	394.54	295.28	189.1652、207.1842
新霉素滤渣	帕罗马明	甲醇	337.33	338.1372	295.1313、177.0559
	Ribostamycin	乙腈	466.47	467.2128	338.1375、295.1316
青霉素滤渣	盘尼西林 N	乙腈	359.39	360.2224	201.1257、243.1442
	不明标志物	乙腈		309.1367	174.0603、128.0544、263.1314
	ACV 三肽	乙腈	361.41	3622.2019	144.0672、219.1445、245.12236

附录 E

(资料性)

抗生素滤渣典型全扫描色谱图

抗生素滤渣典型全扫描色谱图见图 E。

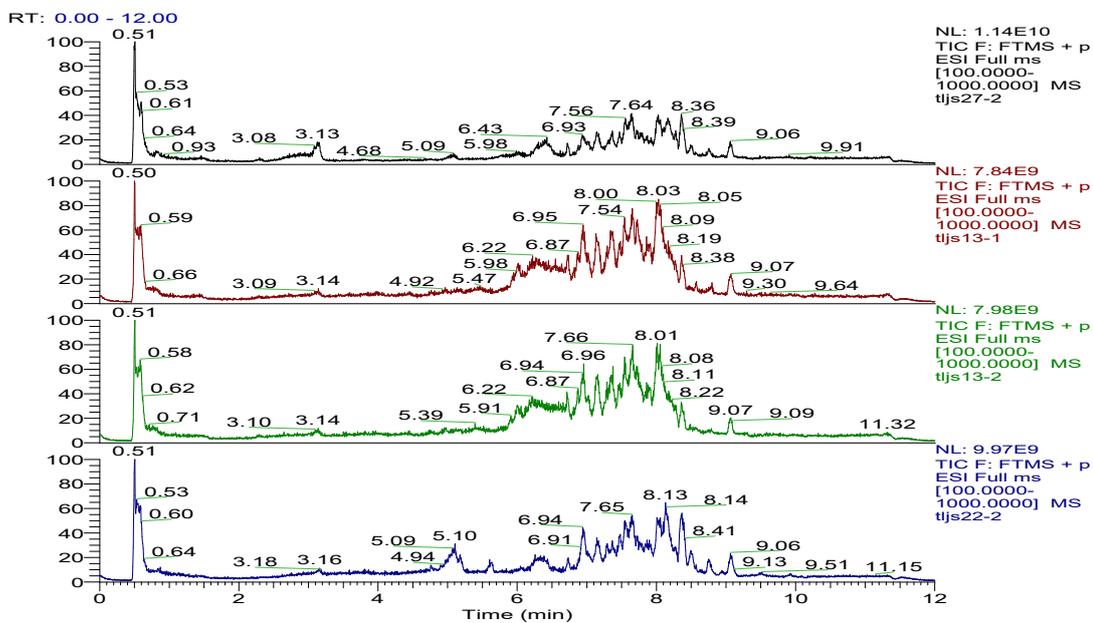


图 E 抗生素滤渣典型全扫描色谱图

## 附录 F

(资料性)

## 抗生素滤渣高分辨质谱信息模型的构建

## F.1 抗生素滤渣要求

用于建立抗生素滤渣液相色谱—高分辨质谱数据库的抗生素滤渣试样应具有代表性,涵盖各种影响因素:

- a) 地域和原料的不同;
- b) 加工技术和工艺的不同;
- c) 储存条件的不同。

## F.2 抗生素滤渣的制备

## F.3 抗生素滤渣的提取

见 6.5.1。

## F.4 液相色谱-高分辨质谱参考条件

见 6.5.2。

## F.5 抗生素滤渣高分辨质谱信息模型的构建

采集代表性抗生素滤渣试样的液相色谱高分辨的质谱数据,利用基于 Duplex 等算法从每个抗生素滤渣质谱数据中选取相关代表性数据(不同抗生素滤渣的液相色谱全扫描高分辨质谱图参见附录 E),建立抗生素滤渣液相色谱—高分辨质谱库及特征标志物质谱数据库。计算未参与质谱库建立的样品与抗生素滤渣液相色谱—高分辨质谱中数据及特征标志物的数值,根据 5%下百分位数来确定判别阈值(阈值的百分位数可由用户根据分析要求自行确定)。

## F.6 可根据采集的代表性滤渣自建相关高分辨质谱信息通用模型。