

中华人民共和国国家标准

《饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶
和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定》

编制说明

(公开征求意见稿)

四川威尔检测技术股份有限公司
山东省畜产品质量安全中心

2023年5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 工作过程	4
2.1 标准编制原则	8
2.2 标准修订主要内容	8
2.3 液相色谱-串联质谱法	9
2.3.1 仪器分析条件确定	9
2.3.2 提取方法选择	17
2.3.3 样品净化条件选择	21
2.3.4 不同厂家固相萃取柱效果比较	23
2.3.6 固相萃取柱柱容量考察	23
2.3.6 样品复溶溶液的确定	25
2.3.7 样品基质效应考察	26
2.3.8 标准溶液有效期的确定	29
2.3.9 方法学考察	30
2.3.10 方法适用性考察	60
2.3.11 精密度	62
2.4 高效液相色谱法	63
2.4.1 液相色谱条件确定	63
2.4.2 样品提取和净化方法和条件确定	74
2.4.3 标准储备溶液有效期的确定	75
2.4.4 方法学考察	76
2.4.5 干扰试验	101
2.4.6 方法适用性考察	102
2.4.7 精密度	103

2.5 液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法比较	104
2.6 不同检测标准方法比较	105
2.7 修订前后技术内容的对比	106
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	109
四、与国内、国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	109
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	109
六、与有关法律、法规的关系	109
七、重大分歧意见的处理经过和依据	109
八、涉及专利的有关说明	109
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	109
十、其他应当说明的事项	110
参考文献	111

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 2020 年第三批推荐性国家标准计划的通知》（国标委发[2020] 48 号），本标准修订项目编号为 20203890-T-469，项目名称为《饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定》，项目承担单位为四川威尔检测技术股份有限公司、山东省饲料质量检验所、通威股份有限公司。2021 年 3 月，《中共山东省委机构编制委员会办公室关于印发省畜牧兽医局所属事业单位机构职能编制规定的通知》（鲁编办[2021]69 号），整合山东省饲料质量检验所畜牧环境监测职责、山东省兽药质量检验所畜产品质量检测职责，组建山东省畜产品质量安全中心，撤销山东省饲料质量检验所和山东省兽药质量检验所事业单位建制。因通威股份有限公司内部组织架构变革，对公司板块业务进行细分，新成立通威农业发展有限公司，承担原通威股份有限公司农牧板块全部业务，计划未来单独拆分上市，使后续业务更聚焦。因此，主要起草单位现变更为四川威尔检测技术股份有限公司、山东省畜产品质量安全中心、通威农业发展有限公司。

1.2 标准修订背景

磺胺类药物是一类以对氨基苯磺酰胺为基本结构的衍生物，对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有抑制作用。磺胺类药物具有抗菌谱广、性质稳定、产量大、品种多、使用便利、供应充足、价格低廉等优点，被广泛的应用在医学和畜牧业中。随着学者对磺胺类的药动学深入研究发现，磺胺类药物在抗菌方面起到巨大作用的同时，不良反应、药物残留问题、病

原体耐药问题等缺点也极大的限制了磺胺类药物的应用和发展。为了解决上述问题，人们采用磺胺增效剂与磺胺类药物联合使用的方法，在增强了磺胺类药物效果的同时降低了磺胺类药物的用药量，使药物副作用降低、动物体内药物残留减少、具有耐药性的病原体出现机率大大降低。

磺胺增效剂是人工合成的二氨基嘧啶类药物，自 1969 年发现了三甲氧苄氨嘧啶后，磺胺增效剂便受到了广泛的应用。在我国常用的有二甲氧苄氨嘧啶（Diaveridine, DVD）、三甲氧苄氨嘧啶（Trimethoprim, TMP）及二甲氧甲基苄氨嘧啶（Ormetoprim, OMP）。磺胺增效剂本身具有较弱的抗菌作用，与磺胺类药物联用具有协同作用，能数倍甚至数十倍增强磺胺类药物的疗效。不仅增强了磺胺类药物的抗菌谱和抗菌性，甚至可以将磺胺类药物的抑菌作用转变成杀菌作用，广泛用于畜禽细菌性疾病和球虫病的治疗。对磺胺药敏感的细菌在生长繁殖过程中，不能直接从生长环境中利用外源性叶酸，而是利用对氨基苯甲酸、喋啶和谷氨酸，在二氢叶酸合成酶的催化下合成二氢叶酸，再由二氢叶酸还原酶的催化，还原成四氢叶酸。四氢叶酸是一碳基团转移酶的辅酶，参与嘌呤、嘧啶、核苷酸的生物合成，如果细菌缺乏四氢叶酸，则核酸的合成就会受到阻碍，其生长繁殖就会受到抑制。DVD、TMP 及 OMP 的抗菌机理相似，均可逆性抑制二氢叶酸还原酶，使二氢叶酸不能还原为四氢叶酸，干扰叶酸的代谢和利用，从而妨碍菌体核酸和蛋白质的合成。磺胺类药物的化学结构与对氨基苯甲酸结构极为相似，能和对氨基苯甲酸相互竞争二氢叶酸合成酶，从而抑制二氢叶酸的合成，最终使核酸合成受阻，抑制细菌的繁殖。DVD、TMP 及 OMP 与磺胺类药物联用时，可同时从叶酸代谢前后两个不同环节起双重阻

断作用，展现出协同作用，使磺胺药抗菌活性增强数倍至数十倍，可使抑菌作用变为杀菌作用，减少耐药菌株的出现，对革兰氏阳性、阴性菌及球虫等均有杀灭作用，并能扩大磺胺药的抗菌范围，对耐磺胺药的大肠杆菌、变形杆菌、化脓链球菌等亦有作用。近年来研究表明，DVD 和 TMP 也能抑制虫体叶酸代谢，干扰虫体蛋白质的合成，故对一些寄生虫病也有很好的防治效果。随着对磺胺增效剂深入研究发现，磺胺增效剂不仅能增强磺胺类药物的抗菌效果，而且也能增强其他多种抗生素的疗效，如对四环素抗流感杆菌、抗肺炎双球菌的作用可增强 4~46 倍、对庆大霉素抗流感杆菌、抗肺炎双球菌的作用可增强 4~8 倍。

目前食品安全问题已成为消费者重点关注的问题，也是畜牧业、食品业研究的热点之一。但养殖中常存在不合理使用药物的情况，且其在动物体内代谢缓慢、残留在肌肉组织和器官中时间较长，并可通过食物链传递，人食用后会致抗药性甚至毒副作用。饲料作为畜禽食物链的第一关键环节，其质量关系到畜禽产品的质量和人体的健康，人们长期食用含有抗菌增效剂残留物的畜禽产品会造成对泌尿、神经等不良反应，因此必须从饲料源头上严格控制该药物的使用。

我国于 2007 年发布实施的《饲料中三甲氧苄氨嘧啶的测定 高效液相色谱法》（GB/T 21037-2007）标准，该标准在企业 and 质检机构日常检测，农业部和地方监督抽查、风险评估和预警监测中发挥了重要作用。但该方法实施已十多年，亟需对该标准进行修订，一是由于该方法灵敏度较低，对于痕量检测常常低于噪声基线，并且无法准确定性，特别是农业农村部公告 194 号明确提出，自 2020 年 7 月 1 日起，饲料生产企业停止生产含有

促生长类药物添加剂饲料添加剂（中药类除外）的商品饲料，亟需根据当前我国饲料行业发展现状，开展方法学研究，研究建立简便、快速、灵敏度高、定性准确的液相色谱-串联质谱确证方法，满足饲料禁抗需要；二是农业部 2349 号公告-8-2015《饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定 液相色谱-串联质谱法》与本标准有交叉重复，建议将同种类的二甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶并入本国标，修订成为可对 3 种增效剂既能准确定性又能准确定量标准方法，提高标准的适用性。

1.3 工作过程

1.3.1 成立标准编制小组

2020 年 11 月，四川威尔检测技术股份有限公司、山东省饲料质量检验所、通威股份有限公司接到国家标准修订任务后，成立了标准编制小组，落实了人员分工，详见表 1。

表 1 标准主要起草人员和任务分工

人 员	职 称	任务分工
张凤枰	教授级高工	项目主持人，负责项目的全面工作
王 鑫	工程师	检测方法研究，标准文本和编制说明编写和完善、方法验证
李俊玲	研究员	实施方案制定，标准文本和编制说明编写和完善、征求意见
唐华英	助理工程师	样品检测、数据收集分析
孙延军	副研究员	样品采集、数据收集分析
杜雪莉	高级工程师	标准文本和编制说明编写和完善、征求意见
杨发树	高级工程师	样品采集、标准文本和编制说明编写和完善
张 璐	研究员	标准文本和编制说明编写和完善

1.3.2 标准修订技术路线和方案制定

2020年12月，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，同时调研国内主要饲料质检机构、饲料生产企业等标准方法采用情况，制定了标准修订内容和技术路线草案，确定标准修订的主要内容、技术路线（见图1）、分工、完成时限等。

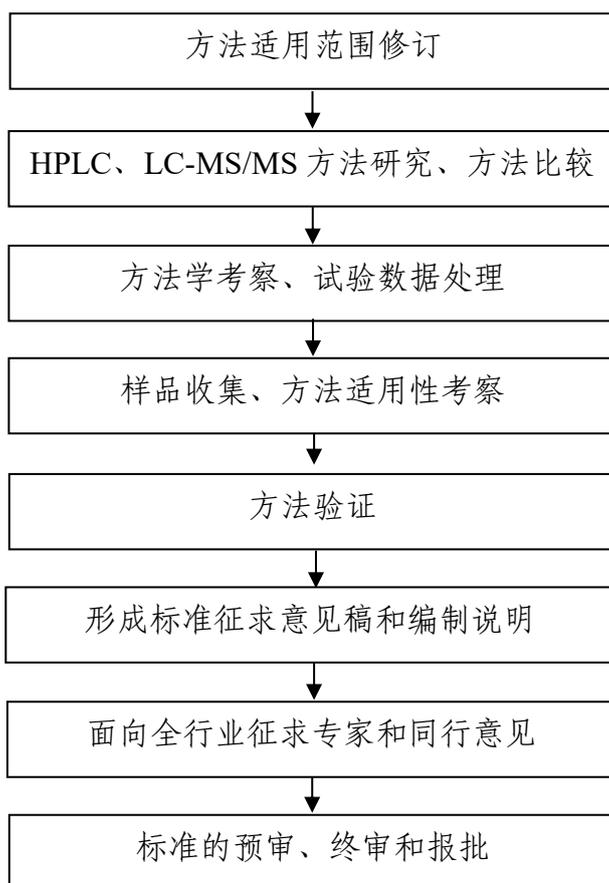


图1 标准修订技术路线图

1.3.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2021年1月~2022年7月，开展样品收集、方法学研究和实际样品检测。

1.3.4 编写编制说明和征求意见稿、定向征求意见和标准验证

2022年9月，标准编制小组完成标准文本、编制说明定向征求意见稿

编制工作。2022年10月~11月，标准编制小组发送给国家饲料质检中心、省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见。

2022年12月~2023年3月，标准编制小组根据定向征求意见，补充了相关试验和数据，修改、完善标准文本和编制说明，委托农业农村部饲料及畜禽产品质量安全检验检测中心（成都）、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（南昌）和青岛市华测检测技术有限公司完成本标准的复核验证工作，2023年4月形成标准文本和编制说明预审稿。

1.3.5 标准预审

2023年5月8日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对四川威尔检测技术股份有限公司等单位修订的国家标准《饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定》（预审稿）进行了认真审查。专家组由常碧影、柏凡、杨秀玉、曹莹、任玉琴、宋荣、吴银良、李宏、岳秀英、吴宁鹏、杨青组成。在听取修订专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：

（1）建议将适用范围中“饲料原料”修改为“动物源性饲料原料”。

（2）进一步考察液相色谱-串联质谱法内标法和外标法定量的差异，并根据补充试验数据决定是否采用内标法定量。

（3）根据试验数据进一步确认液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法的精密度要求。

(4) 编制说明中补充与原标准 GB/T 21037—2007 数据比较。

(5) 按照 GB/T 1.1—2020、GB/T 20001.4—2015 的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

本标准的结构、技术要素及表述方法是按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》以及 GB/T 20001.4—2015《标准编制规则 第4部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。编制依据如下：

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

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

2.2 标准修订主要内容

经查阅相关标准和文献，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶残留的提取溶剂主要包括甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷等色谱领域常见的有机试剂，净化方法主要包括液液萃取法、固相萃取法、QuEChERS快速提取净化法等，检测仪器主要为分光光度仪、高效液相色谱仪、高效液相色谱-串联质谱仪等。因二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶禁止在饲料产品中使用，本次修订主要增加液相色谱-串联质谱确证方法，修订高效液相色谱法，主要从样品提取、净化和测定三方面开展标准方法研究工作，对具体试验条件进行优化，开展方法学

考察和适用性考察，确保修订后的标准方法定性定量分析准确可靠。

2.3 液相色谱-串联质谱法

2.3.1 仪器分析条件确定

2.3.1.1 色谱条件的选择

由于二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶均为极性化合物，本方法采用实验室反相色谱中最常用的 C₁₈ 色谱柱进行分析。试验分别选用柱长 100 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.8 μm 和柱长 50 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.8 μm 的 2 种最为常见的超高效液相色谱柱进行考察。在三种目标化合物分离度满足试验要求的前提下，为降低检测成本、减轻长柱压力高对仪器的损伤，最终确定柱长 50 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.8 μm 超高效液相色谱柱为分析柱。同时，本试验考察了三种目标化合物在不同品牌色谱柱上的色谱行为。结果表明，三种目标化合物在不同品牌色谱柱上均有很好的分离度。3 种目标化合物的总离子流图见图 2~图 4。

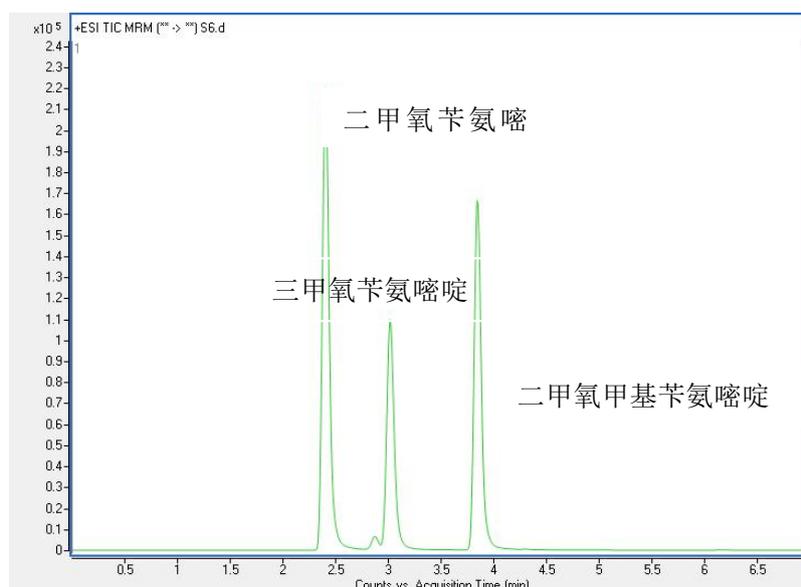


图 2 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶总离子流图
(Agilent C₁₈ 2.1mm*100mm, 1.8 μm)

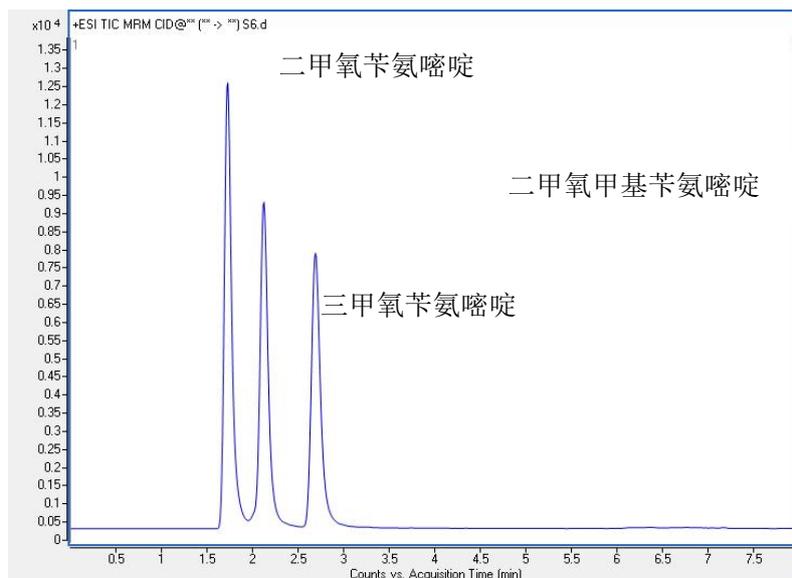


图 3 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶总离子流图
(Agilent C₁₈ 2.1mm*50mm, 1.8 μm)

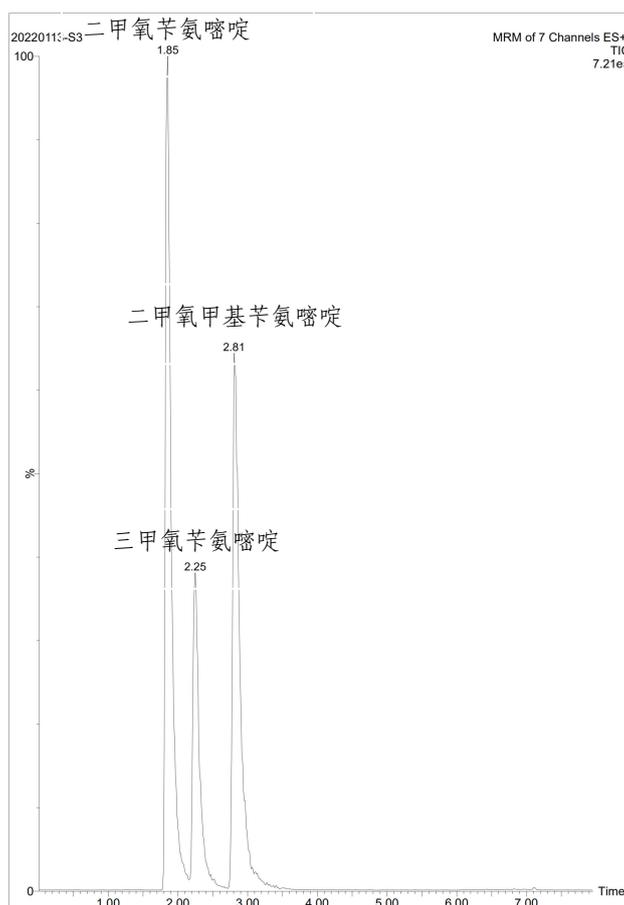


图 4 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶总离子流图
(Waters C₁₈ 2.1mm*100mm, 1.9μm)

为了提高色谱分析效率，提高目标化合物的灵敏度，本试验流动相采用洗脱能力较强的乙腈作为有机相，采用 0.2%甲酸水溶液作为水相。为了确保得到的色谱峰对称性好，消除峰拖尾现象，本检测标准方法在 0.2%甲酸水溶液中加入 2 mmol/L 乙酸铵，使流动相形成缓冲体系，有利于检测结果的重现性。另外，选用梯度洗脱方式，在提高检测灵敏度的同时，能够将样品中的绝大多数杂质从色谱柱洗脱下来，延长色谱柱的使用寿命。本标准方法研究试验使用 Agilent 1290-6470 液相色谱-串联质谱仪，该仪器购于 2019 年，仪器检测灵敏度非常高，我们最终将进样量确定为 3 μ L。在保证仪器性能的前提下，为降低柱温对色谱柱使用寿命的影响，本试验将柱温设定为 35 $^{\circ}$ C。

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.8 μ m，或性能相当者；

b) 柱温：35 $^{\circ}$ C；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 进样量：3 μ L；

e) 流动相：A 相为乙腈（4.2.4）；B 相为乙酸铵-甲酸溶液（4.2.16），梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

时间 (min)	A相 (%)	B相 (%)
0.00	15	85
2.00	15	85
5.00	30	70
5.10	100	0
6.00	100	0
6.10	15	85
7.00	15	85

2.3.1.2 质谱参考条件确定

由于仪器厂家不同，质谱设置参数也不同。因此不同厂家和型号的液相色谱串联质谱仪应优化关键参数，使其达到最佳灵敏度。本标准方法研究试验使用 Agilent 1290-6470 液相色谱-串联质谱仪，经各参数优化后其条件如下：

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

毛细管电压：4000 V；

鞘气温度：350 °C；

鞘气流速：11 L/min；

喷嘴电压：45 psi；

干燥气温度：300 °C；

干燥气流速：7 L/min。

定性、定量离子对及碰撞能量等参数见表3。

表 3 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶定性定量离子对及碰撞能量参考值

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 V
二甲氧苄氨嘧啶	261.2 > 245.0	261.2 > 245.0	30
	261.2 > 123.3		25
三甲氧苄氨嘧啶	291.3 > 230.2	291.3 > 230.2	25
	291.3 > 261.0		30
二甲氧甲基苄氨嘧啶	275.4 > 259.3	275.4 > 259.3	30
	275.4 > 123.3		25
d ₉ -三甲氧苄氨嘧啶	300.2 > 234.0	300.2 > 234.0	25

图 5~图 12 分别是浓度为 100 ng/mL 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶和 d₉-三甲氧苄氨嘧啶标准溶液的一级全扫描质谱图和二级质谱图。

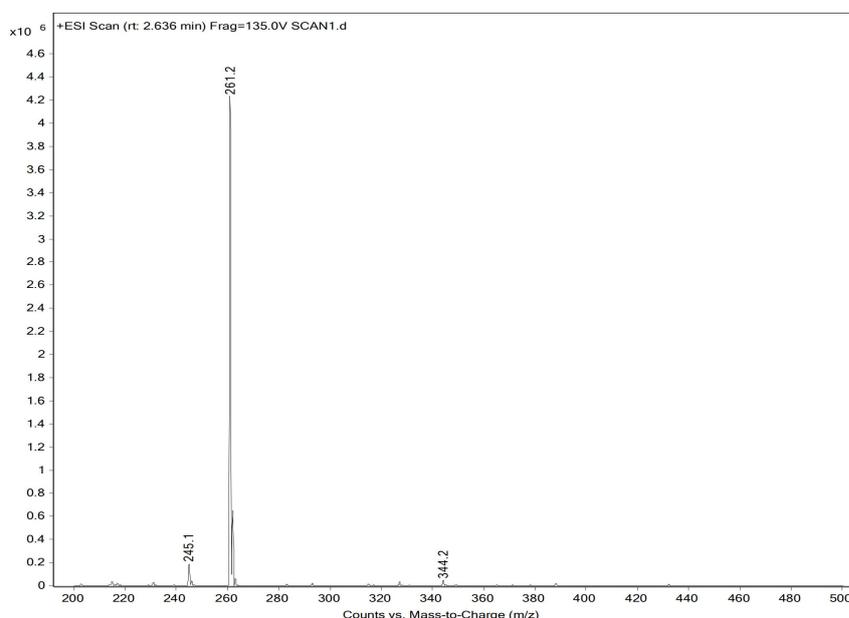


图 5 二甲氧苄氨嘧啶一级全扫描质谱图

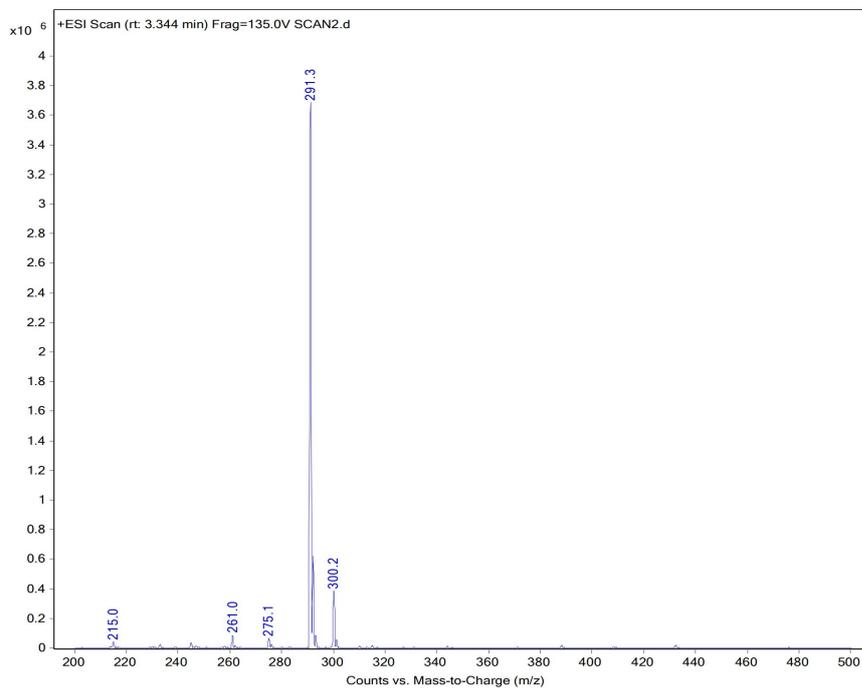


图 6 三甲氧苄氨啉一级全扫描质谱图

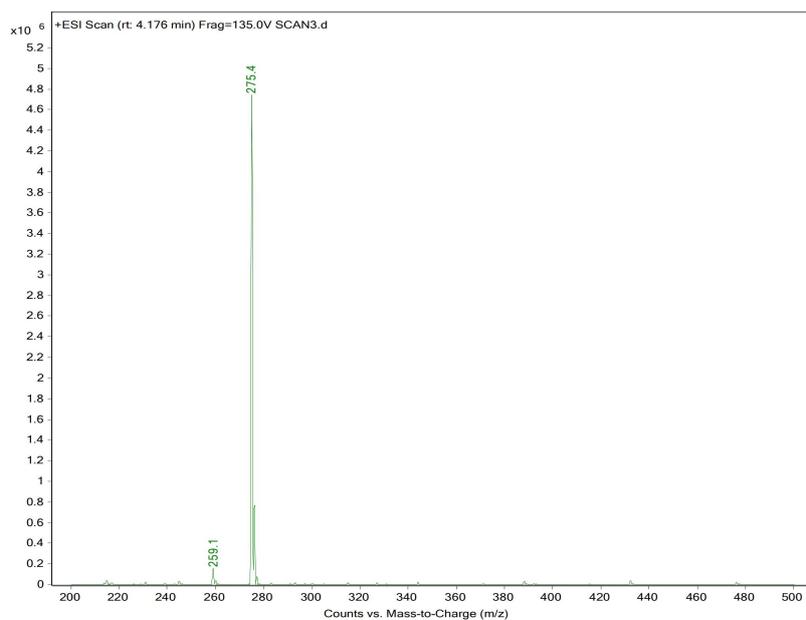


图 7 二甲氧甲基苄氨啉一级全扫描质谱图

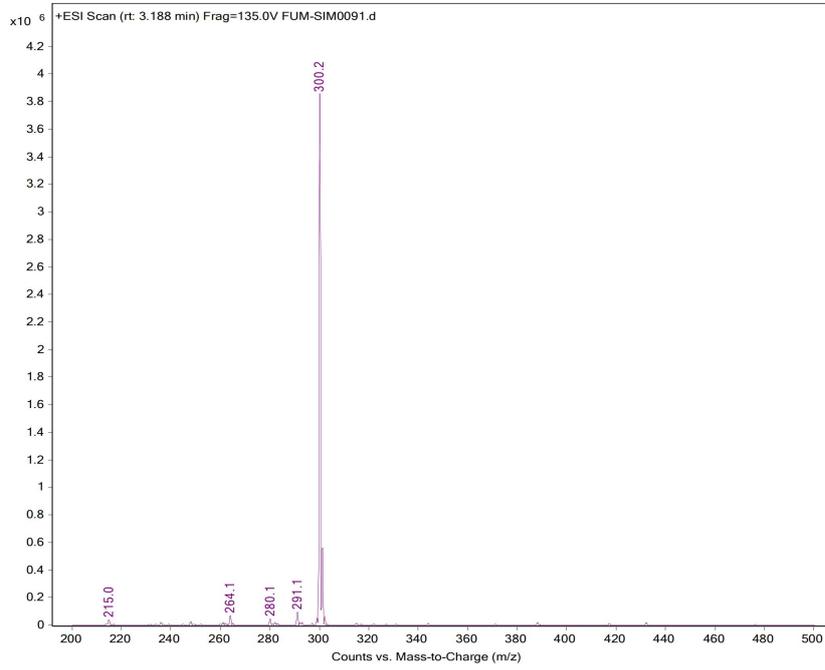


图 8 d9-三甲氧甲基苄胺嘧啶一级全扫描质谱图

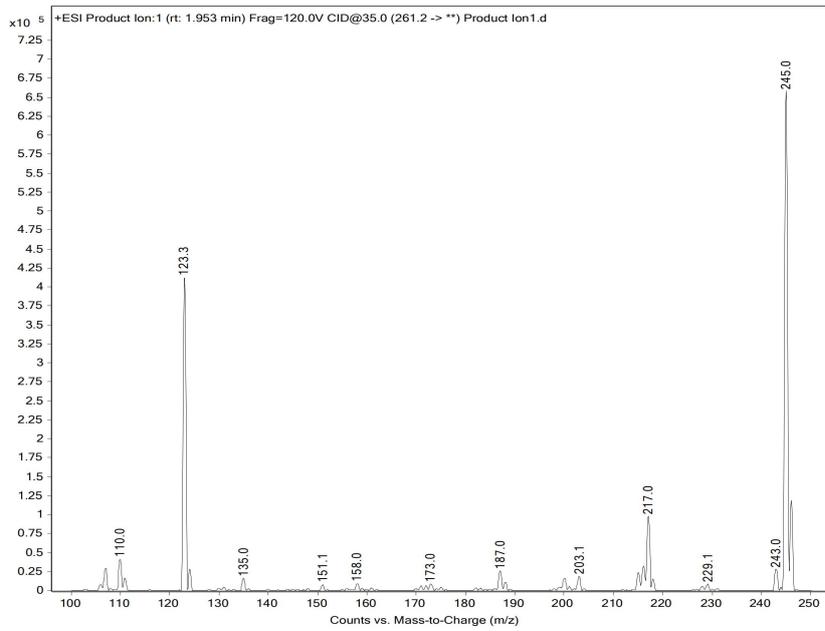


图 9 二甲氧苄胺嘧啶二级质谱图

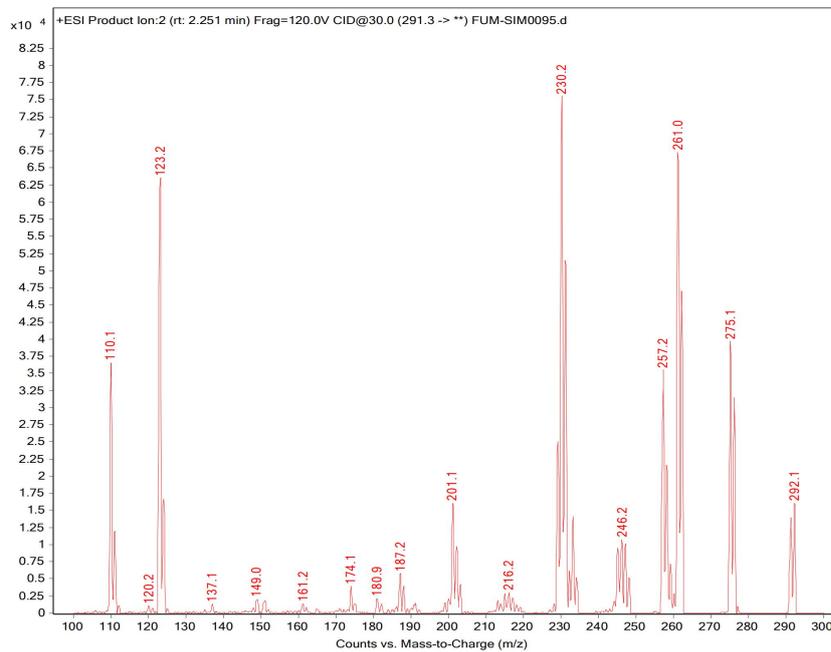


图 10 三甲氧苄氨啉二级质谱图

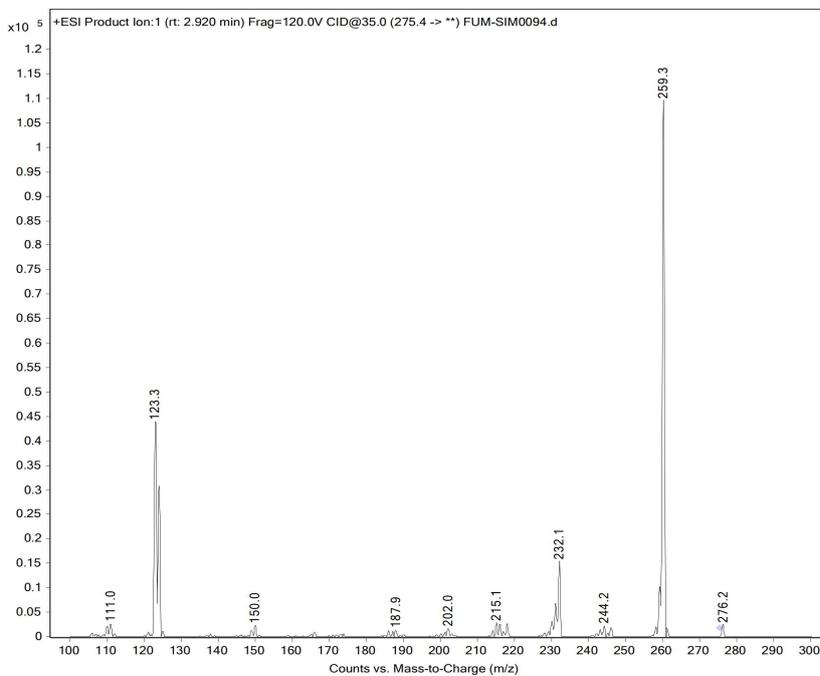


图 11 二甲氧甲基苄氨啉二级质谱图

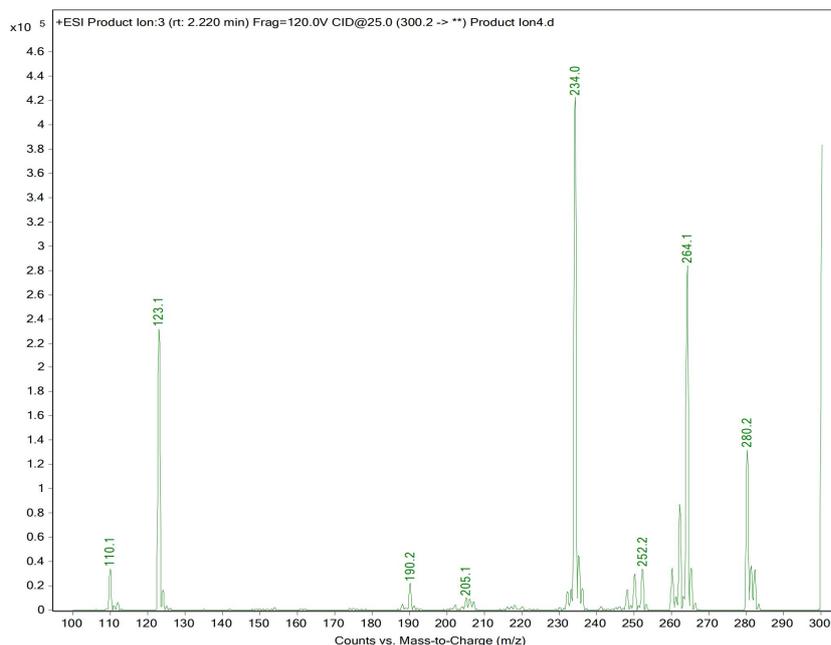


图 12 d₉-三甲氧苄氨基嘧啶二级质谱图

2.3.2 提取方法选择

二甲氧苄氨基嘧啶又名二甲氧苄啶、敌菌净，化学名为 2,4-二氨基-5-(3',4'-二甲氧基苄基)嘧啶，分子式为 C₁₃H₁₆N₄O₂，分子量 260.29，化学结构式如图 13 所示。二甲氧苄氨基嘧啶为白色或淡黄色结晶性粉末，味微苦，几乎无臭，熔点 231 °C~236 °C，溶于浓盐酸，微溶于稀盐酸，极微溶于氯仿，不溶于乙醇、乙醚、水、稀碱溶液。

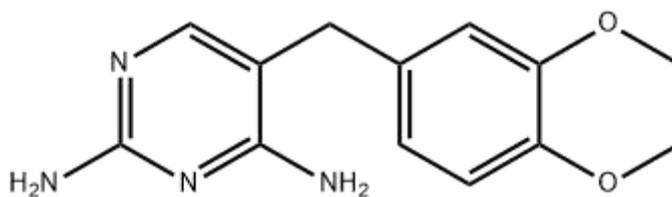


图 13 二甲氧苄氨基嘧啶化学结构式

三甲氧苄氨基嘧啶又名甲氧苄氨基嘧啶、甲氧苄啶，化学名为 5-[(3,4,5-三甲氧基苄基)-甲基]-2,4-嘧啶二胺，分子式为 C₁₄H₁₈N₄O₃，分子量 290.32，

化学结构式如图 14 所示。三甲氧苄氨嘧啶为白色或淡黄色结晶性粉末，味微苦，熔点 199 °C~203 °C，在乙醇中微溶，水中几乎不溶，在冰醋酸中易溶。

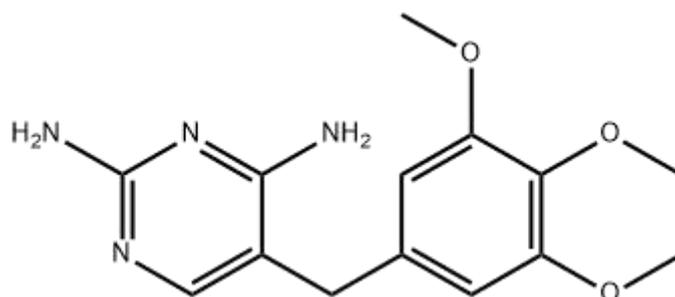


图 14 三甲氧苄氨嘧啶化学结构式

二甲氧甲基苄氨嘧啶又名奥美普林，化学名为 5-(4,5-二甲氧基-2-甲基苄基)-2,4-二氨嘧啶，分子式为 $C_{14}H_{18}N_4O_2$ ，分子量为 274.324。化学结构如图 15 所示。二甲氧甲基苄氨嘧啶为白色或淡黄色结晶粉末，熔点为 231 °C~235 °C。不溶于水，易溶于有机溶剂。

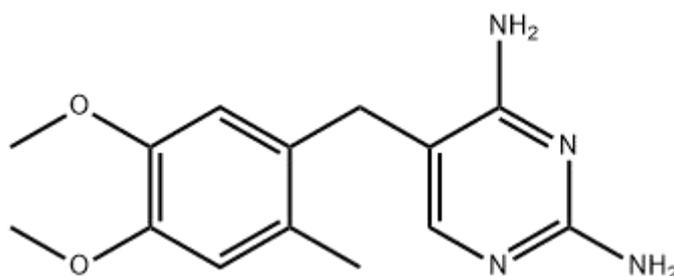


图 15 二甲氧甲基苄氨嘧啶化学结构式

从图 13~图 15 可以看出，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶均属于极性化合物。结合相关文献和标准，我们选取基质较为复杂的仔猪配合饲料 2 g，空白基质加标量约为 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分别使用乙腈、5%甲酸乙腈、5%氨水乙腈、甲醇、5%甲酸甲醇、5%氨水甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯溶液作为溶剂进行提取，上机测定，计算其回收率，结果见下表 4。

表 4 仔猪配合饲料各种提取溶剂回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)							
		乙腈	5%甲酸乙腈	5%氨水乙腈	甲醇	5%甲酸甲醇	5%氨水甲醇	二氯甲烷	乙酸乙酯
1	二甲氧苄胺嘧啶	43.72	38.41	36.10	13.37	14.06	10.69	61.95	70.84
2	三甲氧苄氨嘧啶	49.57	42.10	43.93	26.30	35.42	18.31	65.97	75.84
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	50.57	65.64	60.85	38.08	59.03	34.50	70.88	81.61

由表 4 中回收率结果可知，乙酸乙酯溶液回收率最高，乙酸乙酯绿色环保、成本低廉，且其毒性低于甲醇、乙腈、二氯甲烷。因此本试验考虑采用乙酸乙酯作为提取液。

另外，从图 13~图 15 可以看出，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶均属于碱性化合物。为了提高目标化合物的提取效率，参考《GBT 21037-2007 饲料中三甲氧苄胺嘧啶的测定 高效液相色谱法》和《农业部 2349 号公告-8-2015 饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定 液相色谱串-联质谱法》前处理方法，本实验在提取过程加入弱碱性的乙酸钠溶液在分散固体样品基质的同时抑制二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的电离，使目标化合物处于分子状态。考虑到本标准的适用范围广，我们在乙酸钠溶液中加入 0.5 mL 氨水以确保发酵型等酸性样品基质的适用性，然后使用乙酸乙酯作为提取试剂进行液液萃取。

试验分别选用仔猪配合饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、畜禽用复合预混合饲料各 2 g，添加成浓度约为 250 µg/kg，考察乙酸乙酯溶液对其提取效率，结果见表 5。结果表明，仔猪配合饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、畜禽用复合预混合饲料采用乙酸乙酯溶液提取效率较高，

因此最终选择乙酸乙酯作为饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的提取溶剂。

表 5 乙酸乙酯提取回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)			
		仔猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	肉牛精料补充料	畜禽用复合预混合饲料
1	二甲氧苄氨嘧啶	70.81	68.54	69.54	104.58
2	三甲氧苄氨嘧啶	78.34	79.04	78.58	105.04
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	82.68	80.61	81.17	98.80

为了验证提取次数对测定结果的影响，试验考察了采用 20 mL 乙酸乙酯溶液 1 次提取、10 mL 乙酸乙酯溶液 2 次提取回收率情况，结果表明，提取溶液总体积一致的情况下，2 次提取效率明显高于 1 次提取效率，且 2 次提取回收率较高。结果见表 6。

表 6 不同提取次数回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)	
		1次提取	2次提取
1	二甲氧苄氨嘧啶	65.32	84.81
2	三甲氧苄氨嘧啶	70.64	88.55
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	76.28	90.24

选择 2 次提取，考察了提取液体积分别为 10 mL、20 mL、30 mL 回收率情况，试验结果见表 7。结果表明，不同提取液体积，回收率无明显增加。当提取液体积为 10 mL 时，虽然回收率较高，但对于油脂含量较高的样品，离心后乳化情况严重，上清液较少，不利于转移。提取体积为 30 mL 回收率与 20 mL 接近，考虑试剂成本，最终选择乙酸乙酯提取液总体积为 20 mL、分 2 次提取。

表 7 不同提取液体积回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)		
		10 mL	20 mL	30 mL
1	二甲氧苄氨嘧啶	79.87	84.35	82.15
2	三甲氧苄氨嘧啶	83.55	91.65	102.68
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	89.36	92.35	91.32

为了进一步考察提取时间对测定结果的影响, 固定乙酸乙酯提取液体积为 20 mL、2 次提取, 考察了每次提取时间分别为 5 min、10 min、15 min 时样品回收率, 试验结果表明, 随着提取时间增加, 回收率无明显增加。为保证不同类型样品的提取效率, 且综合考虑时间成本, 最终将样品分 2 次提取、分次提取 10 min。结果见表 8。

表 8 不同提取时间回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)		
		5 min/次、提取2次	10 min/次、提取2次	15 min/次、提取2次
1	二甲氧苄氨嘧啶	100.53	102.23	103.58
2	三甲氧苄氨嘧啶	100.86	99.39	103.57
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	104.73	104.14	108.32

2.3.3 样品净化条件选择

饲料产品基质非常复杂, 除含有大量蛋白质、脂肪、含氮浸出物外, 生产时为了保证动物营养的全面性, 往往还会添加各类维生素、矿物质、氨基酸、酶制剂、微生物制剂等。如果不对样品提取液加以净化处理, 试样提取溶液含有太多的杂质, 这将极大影响色谱分离效果, 降低检测结果的准确性、灵敏度, 且对仪器产生极大的负荷, 降低液相色谱-串联质谱联用仪使用寿命。因此试验中选择适当的净化方法是十分必要的。

目前对于磺胺类及磺胺增效剂类药物，国内外实验室主流净化方法是固相萃取技术。利用固相萃取柱对待测物或样品中杂质选择性吸收，从而达到净化的目的。本方法基于二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的理化性质，参考相关文献和标准，选用市面上常见的碱性氧化铝柱、中性氧化铝柱、SCX小柱、HLB小柱和MCX小柱开展净化条件的选择和优化。

选取空白仔猪配合饲料 2 g，添加浓度为 250 µg/kg 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准物质，用乙酸乙酯提取，分别经碱性氧化铝柱、中性氧化铝柱、SCX小柱、HLB小柱和MCX小柱净化，收集洗脱液，氮吹干后复溶，过 0.22 µm 微孔滤膜后上机测定，计算其回收率，结果见表 9。

表 9 不同固相萃取小柱回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)				
		碱性氧化铝柱	中性氧化铝柱	SCX柱	HLB柱	MCX柱
1	二甲氧苄氨嘧啶	47.28	未检出	73.59	3.60	75.19
2	三甲氧苄氨嘧啶	50.10	未检出	73.68	5.45	74.75
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	52.50	未检出	78.02	6.09	79.04

结果表明，中性氧化铝柱不保留目标化合物，HLB柱效果极差，碱性氧化铝柱效果较差，SCX柱和MCX柱净化效果较好。MCX柱作为SCX柱的升级版，在保留了SCX柱的净化特点外，还具有反相保留作用，对碱性化合物具有较高的选择性和灵敏度。综合考虑后，最终选择MCX柱作为净化柱。该试验结果与大多数文献采用的净化方式结论一致。考虑到MCX柱的普及性和经济性，我们最终选取 60 mg/3 mL 规格的小柱进行试

验，并对其淋洗、洗脱条件进行摸索。经反复试验比较，最终将净化条件确定为“将固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 乙腈-5%乙酸水溶液（10:90，V/V）活化；移取全部复溶液过柱；用 3 mL 乙腈-5%乙酸水溶液（10:90，V/V）、3 mL 甲醇淋洗；用 5 mL 8%氨水甲醇洗脱并收集洗脱液，于 50 °C 氮吹至干，准确加入 1.0 mL 复溶液溶解残渣，涡旋混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜后上机测定。

2.3.4 不同厂家固相萃取柱效果比较

为了考察不同厂家混合型强阳离子固相萃取柱的通用性，称取仔猪配合饲料 2 g，添加浓度为 250 μg/kg 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准物质，考察 3 个不同厂家的 MCX 小柱净化效果，结果见表 10。

表 10 不同厂家混合型阳离子固相萃取柱回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)		
		厂家1	厂家2	厂家3
1	二甲氧苄氨嘧啶	85.49	90.10	87.66
2	三甲氧苄氨嘧啶	83.77	88.36	85.24
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	87.77	88.35	85.98

结果表明，样品提取液经 3 个厂家 MCX 固相萃取小柱净化后得到的回收率和重现性普遍较好，说明不同厂家的固相萃取柱对二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的净化效果差异不大，均适用于本方法。

2.3.6 固相萃取柱柱容量考察

本标准净化方法中采用了规格为 200 mg/3mLMCX 小柱。为了考察该

小柱的容量，防止出现目标化合物过载情况，我们用空白基质样品添加高浓度水平的二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶，按上述提取方法和净化方法处理后上 HPLC 测定。回收率结果见表 11~表 13。

表 11 固相萃取柱容量考察结果（三甲氧苄氨嘧啶）

样品类型	三甲氧苄氨嘧啶平均回收率（%）				
	500 mg/kg	800 mg/kg	1000 mg/kg	1500 mg/kg	2000 mg/kg
配合饲料	92.5	96.7	87.7	87.6	91.8
浓缩饲料	101.4	97.2	89.7	90.4	88.7
精料补充料	101.9	95.2	90.8	90.4	89.5
复合预混合饲料	101.4	94.9	91.0	91.7	88.9

表 12 固相萃取柱容量考察结果（二甲氧甲基苄氨嘧啶）

样品类型	二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率（%）				
	500 mg/kg	800 mg/kg	1000 mg/kg	1500 mg/kg	2000 mg/kg
配合饲料	89.1	103.8	96.0	95.7	99.3
浓缩饲料	100.8	101.1	98.6	99.2	96.9
精料补充料	100.4	98.1	99.5	98.8	98.2
复合预混合饲料	99.4	99.1	100.7	100.6	97.5

表 13 固相萃取柱容量考察结果（二甲氧苄氨嘧啶）

样品类型	二甲氧苄氨嘧啶平均回收率（%）				
	500 mg/kg	800 mg/kg	1000 mg/kg	1500 mg/kg	2000 mg/kg
配合饲料	96.0	96.1	90.3	90.3	93.7
浓缩饲料	105.5	95.4	92.4	93.7	91.4
精料补充料	102.3	91.5	93.7	93.5	92.8
复合预混合饲料	104.6	91.3	94.1	94.4	92.0

结果表明，样品中目标化合物含量至少在 2000 mg/kg 以内，不会出现小柱过载情况。

2.3.6 样品复溶溶液的确定

样品经乙酸乙酯提取后，准确移取 2.0 mL 提取液在 50 °C 下氮气吹至干，加入复溶液溶解残渣后采用 MCX 小柱净化处理。由于二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶在提取液中处于分子状态，因此需要酸性复溶液溶解残渣，提高目标化合物离子化效率，才能使用离子交换小柱净化样品，保留目标化合物。根据前期查阅的相关标准和文献发现，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶易溶于乙酸。因此我们考察了不同浓度的乙酸溶液对于回收率的影响，回收率结果见表 14。

表 14 不同浓度乙酸溶液回收率试验结果 (n=3)

No.	化合物	平均回收率 (%)						
		1%乙酸水溶液	2%乙酸水溶液	3%乙酸水溶液	4%乙酸水溶液	5%乙酸水溶液	8%乙酸水溶液	10%乙酸水溶液
1	二甲氧苄氨嘧啶	62.45	77.88	80.36	74.14	83.99	69.12	74.93
2	三甲氧苄氨嘧啶	63.23	78.83	81.16	75.01	86.05	70.03	76.36
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	65.53	82.69	86.31	78.98	87.24	72.00	78.12

结果表明，5%乙酸溶液溶解残渣后，经 MCX 固相萃取小柱净化，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶回收率最高，分别达 83.99%、86.05%、87.24%，因此，初步采用 5%乙酸溶液作为样品复溶溶液。

本试验使用乙酸乙酯作为提取液，对于脂肪含量较高的样品，如果加入 5%乙酸水溶液复溶，经涡旋振荡后复溶溶液会出现严重的乳化现象。为了降低乳化，我们考察了不同比例的乙腈-5%乙酸水复溶液对于回收率的影响。

响，结果见表 15。结果表明，乙腈-5%乙酸水溶液（10:90，V/V）作为复溶溶液，既能保证较高的回收率，又能够有效减少乳化现象。

表 15 不同复溶溶液回收率试验结果（n=3）

No.	化合物	平均回收率（%）				
		5%乙酸水溶液	乙腈-5%乙酸水溶液（5:95，V/V）	乙腈-5%乙酸水溶液（10:90，V/V）	乙腈-5%乙酸水溶液（20:80，V/V）	乙腈-5%乙酸水溶液（30:70，V/V）
1	二甲氧苄胺嘧啶	79.00	72.73	81.77	78.06	75.59
2	三甲氧苄胺嘧啶	80.71	75.25	81.93	79.87	76.93
3	二甲氧甲基苄胺嘧啶	82.62	76.99	86.85	81.73	78.83

MCX 小柱采用酸性复溶液过柱净化，洗脱时需要使用碱性溶液破坏小柱与目标化合物的离子键。对于 MCX 小柱，实验室一般使用氨化甲醇作为洗脱液。不同浓度的氨化甲醇对于洗脱效果会产生较大的影响，回收率结果见表 16。结果表明，8%氨水甲醇平均回收率最高。

表 16 不同浓度氨水甲醇回收率试验结果（n=3）

No.	化合物	平均回收率（%）				
		1%氨水甲醇	3%氨水甲醇	5%氨水甲醇	8%氨水甲醇	10%氨水甲醇
1	二甲氧苄胺嘧啶	59.07	57.00	66.76	71.29	68.28
2	三甲氧苄胺嘧啶	61.37	59.08	68.60	72.98	70.31
3	二甲氧甲基苄胺嘧啶	62.43	59.85	70.43	74.36	71.00

2.3.7 样品基质效应考察

在使用液相色谱-串联质谱仪分析样品时，样品的一些共同提取物可能会对目标化合物的离子化效率产生影响，进而影响目标化合物的准确定量。

对于液相色谱-串联质谱法，一般会出现目标化合物抑制的情况。饲料产品种类繁多，基质复杂，各种共同提取物会极大的影响液相色谱-串联质谱仪的灵敏性和精密度，降低检测结果的可靠性。因此需要考察方法的基质效应，确定是否需要采用基质匹配标准工作溶液。目前最常采用的评价方法为相对响应值法，即在不考虑回收率的情况下，比较目标化合物在空白基质和纯溶液中的响应。基质效应因子（MF）=提取后的空白基质加入目标化合物的响应/纯溶液中目标化合物的响应。一般认为 MF 在 0.8~1.2 之间认为弱基质效应，MF 高于 1.2 或者低于 0.8 认为强基质效应。

我们选取仔猪配合饲料、蛋鸡浓缩饲料、畜禽用复合预混合饲料、肉牛精料补充料，分别添加成浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶，每种样品做 5 个平行样进行上机测定后计算基质效应因子，结果见表 17。

表 17 不同类型样品的基质效应因子（n=5）

No.	化合物	基质效应因子			
		仔猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	畜禽用复合预混合饲料	肉牛精料补充料
1	二甲氧苄氨嘧啶	0.912	0.905	0.909	0.902
2	三甲氧苄氨嘧啶	1.000	0.961	0.949	0.934
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	0.929	0.913	0.923	0.944

结果表明，不同类型样品通过上机测定后计算得到的基质效应因子均在 0.902~1.000 之间，属于弱基质效应。本方法采用乙酸钠溶液加入一定量的氨水，使目标化合物处于完全分子状态，再加入一定量的乙酸乙酯进行液液萃取，提取液经过氮吹复溶后加入正己烷除脂，经 MCX 小柱净化，洗脱液氮吹至干后加入复溶液溶解残渣，复溶液过滤膜后上机测定。液液

萃取将大部分的极性基质干扰物留在乙酸钠溶液中，正己烷除脂后大多数的非极性化合物被净化干净。从而整个上机待测物中的干扰物大大降低，计算得到的基质效应因子在 0.9~1.0 之间。因此，本试验使用初始流动相配制标准工作溶液。虽然目标化合物的共同提取物没有影响检测结果的准确性，但是考虑到饲料产品的多样性、复杂性、降低液质仪器的维护成本、提高检测效率、延长仪器使用寿命，我们仍然采用固相萃取小柱净化的方式进一步提高待测液的洁净程度。本研究考虑到油脂含量高样品在检测过程中会有较为严重的乳化现象、添加有吸附剂等特殊样品对于目标化合物的吸附以及检测人员在实际操作过程中的误差，我们采用内标法进行目标化合物的定量。

同位素内标，通常是指化合物结构中部分元素被其同位素取代多形成的同位素产品，与待测化合物具有极为相近的理化性质，出峰时间基本一致。采用同位素内标对目标化合物进行定量能够真实、客观的反应目标化合物的色谱行为，补偿人员操作、固相萃取小柱净化带来的误差。目前市场上三甲氧苄氨嘧啶同位素生产厂商多，价格低廉、二甲氧苄氨嘧啶同位素内标和二甲氧甲基苄氨嘧啶同位素内标只有一家国外厂商供货，价格昂贵、货期不定。从目标化合物总离子流图可以看出，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶出峰时间接近，说明具有相似的色谱行为。综合考虑，本试验采用 d_9 -三甲氧苄氨嘧啶作为内标对二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶进行定量分析。

2.3.8 标准溶液有效期的确定

2.3.8.1 标准储备溶液有效期的确定

为确保检测方法的准确性，依据目标化合物理化性质，对其标准溶液稳定性进行验证。分别在 0 天、1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、7 个月和 8 个月将目标化合物配制成 1.00 mg/mL 标准储备溶液，放入 -18℃ 以下冰箱冷冻保存。在第 8 个月的时间段，用初始流动相将不同时间段配制的标准储备溶液逐级稀释成 50 ng/mL 标准工作液，以新配制的标准储备溶液配制系列标准工作液，用液相色谱质谱联用仪测定浓度。对各工作液连续进样 6 次考察其稳定性，结果见表 18。

表 18 标准储备溶液稳定性试验结果 (n=6)

测试时间	二甲氧苄氨嘧啶 (mg/mL)	三甲氧苄氨嘧啶 (mg/mL)	二甲氧甲基苄氨嘧啶 (mg/mL)	d ₉ -三甲氧苄氨嘧啶 (mg/mL)
0 天	1.00	1.00	1.00	1.00
1 个月	1.00	1.00	1.00	1.00
2 个月	0.99	1.00	0.99	0.99
3 个月	0.99	0.99	0.99	0.98
4 个月	0.98	0.98	0.98	0.98
5 个月	0.98	0.98	0.99	0.98
6 个月	0.97	0.98	0.98	0.98
7 个月	0.97	0.97	0.97	0.97
8 个月	0.94	0.96	0.94	0.95

结果表明，当测定时间距离标准储备溶液配制时间为 8 个月的时候，标准储备溶液的浓度与新配制的标准储备溶液浓度相比降低超过了 5%，因此为保证标准储备溶液稳定性，减少试验误差，并参照 GB/T 27404—2008

中的“标准溶液参考有效期”的要求，同时考虑到实际检测过程中标准储备溶液反复冻融次数的频率较高，最终确定在-18℃以下冷冻保存条件下，1.00 mg/mL 标准储备溶液有效期确定为 6 个月。

2.3.8.2 标准中间储备溶液有效期的确定

二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶和 d₉-三甲氧苄氨嘧啶的标准中间储备溶液（10 μg/mL）在-18℃以下保存 3 个月，分别在 0 天、14 天、1 个月、2 个月、3 个月测定浓度。检测数据表明标准中间储备溶液在-18℃以下保存 3 个月后性质稳定，无明显的降解和变化，结果见表 19。

表 19 标准中间储备溶液稳定性试验结果 (n=6)

测试时间	二甲氧苄氨嘧啶 (μg/mL)	三甲氧苄氨嘧啶 (μg/mL)	二甲氧甲基苄氨嘧啶 (μg/mL)	d ₉ -三甲氧苄氨嘧啶 (μg/mL)
0 天	10.0	10.0	10.0	10.0
14 天	10.0	10.0	10.0	10.0
1 个月	10.0	10.0	9.99	10.0
2 个月	9.99	9.99	9.99	9.99
3 个月	9.99	9.99	9.99	9.99

2.3.9 方法学考察

2.3.9.1 线性范围

准确移取二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准中间储备溶液适量，用初始流动相逐级稀释成浓度为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL 的标准系列溶液，内标浓度均为 10.0 ng/mL，供液相色谱-串联质谱仪测定，临用现配。以标准系

列溶液中待测组分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浓度和内标浓度的比值为横坐标，绘制标准曲线，结果表明，待测物在 0.5 ng/mL ~ 100.0 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，各目标化合物回归方程及相关系数 (r^2) 见表 20。

表20 标准工作曲线线性范围、回归方程及相关系数 (r^2)

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	回归方程	r^2
1	二甲氧苄氨嘧啶	0.5 ~ 100	$y = 0.234274x + 0.022008$	0.9996
2	三甲氧苄氨嘧啶	0.5 ~ 100	$y = 0.106357x + 0.007880$	0.9998
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	0.5 ~ 100	$y = 0.153222x + 0.011130$	0.9998

2.3.9.2 定性和定量测定

定性测定 在相同试验条件下，试样中待测物的保留时间与标准溶液中待测物的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内，且试样中各组分的两个定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液的相应定性离子相对丰度一致，偏差不超过表21规定的范围，则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 21 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度	> 50%	20% ~ 50%	10% ~ 20%	$\leq 10\%$
允许的最大偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

定量测定 在仪器最佳工作条件下，混合标准工作液与试样交替进样，采用内标法定量。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浓度和内标浓度的比值为横坐标绘制，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。当试样的上机浓度超过线性范围时，需根据测定浓度稀释后进行重新测定。在上述色谱和质谱条

件下，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶和 d₉-三甲氧苄氨嘧啶的标准溶液特征离子色谱图见图 16~图 19。

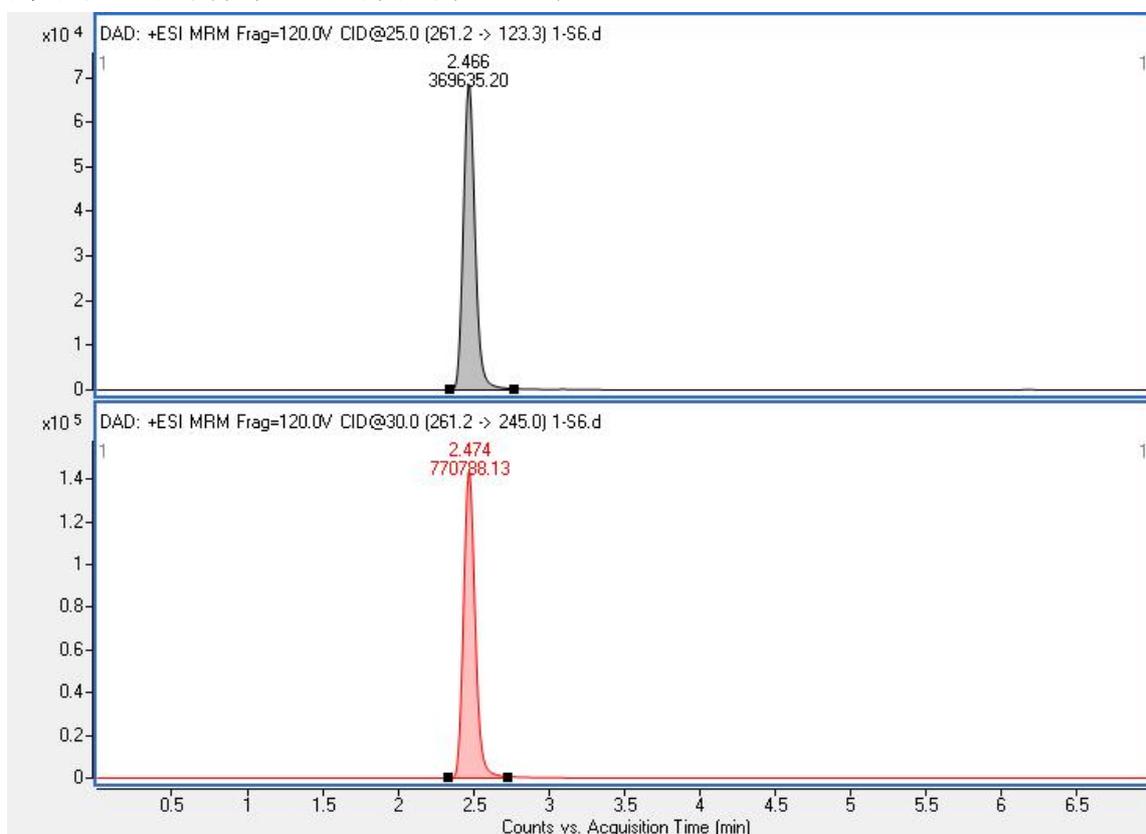


图 16 二甲氧苄氨嘧啶标准溶液色谱图

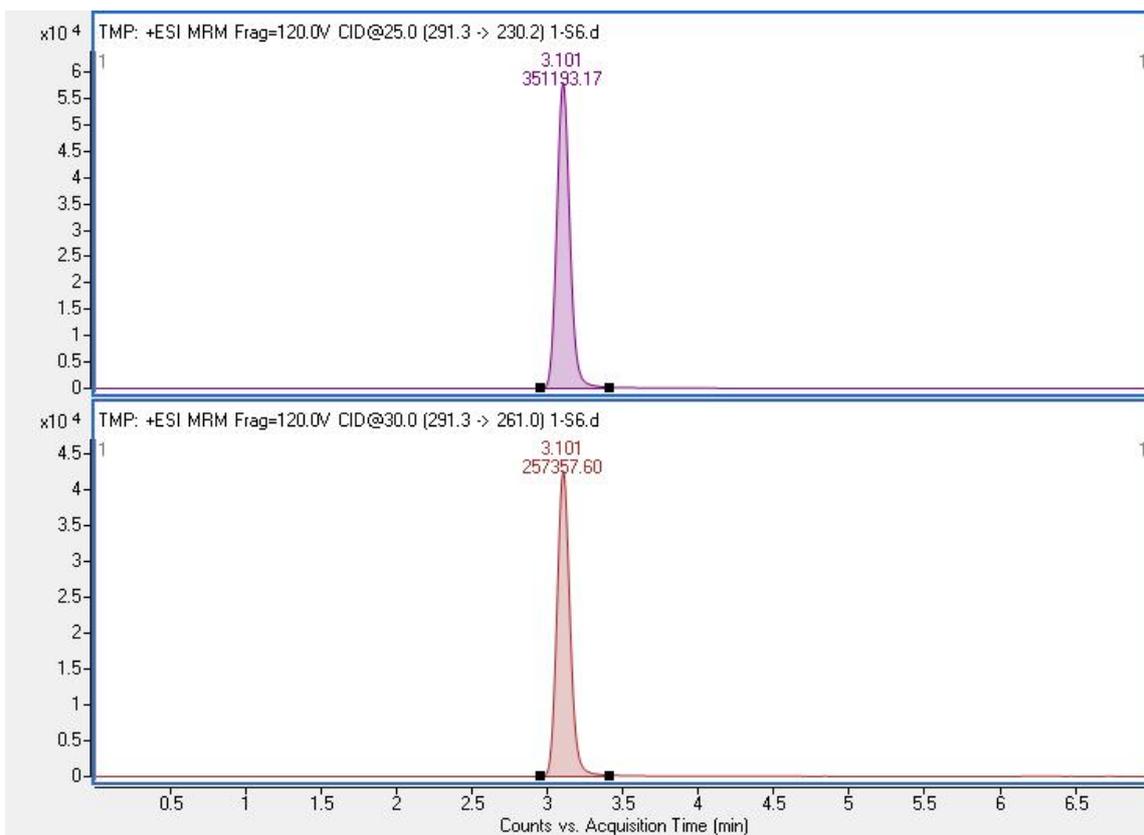


图 17 三甲氧苄氨啉标准溶液色谱图

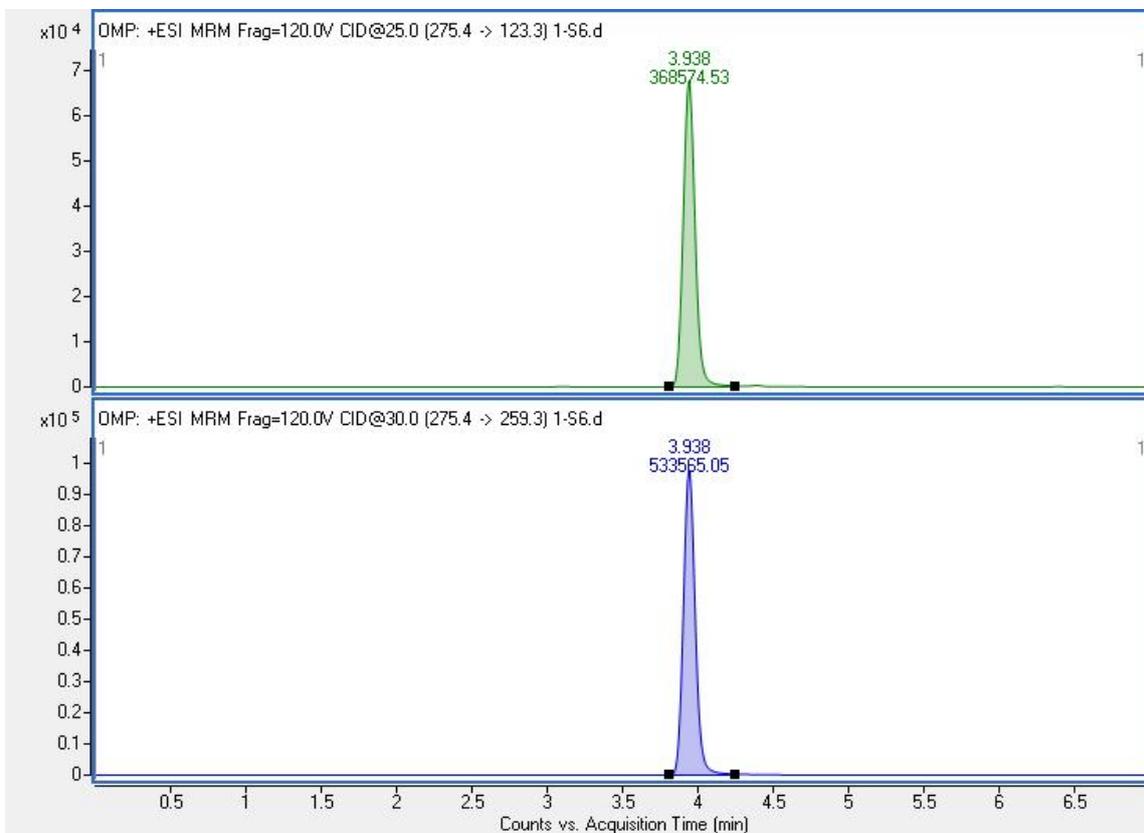


图 18 二甲氧甲基苄氨啉标准溶液色谱图

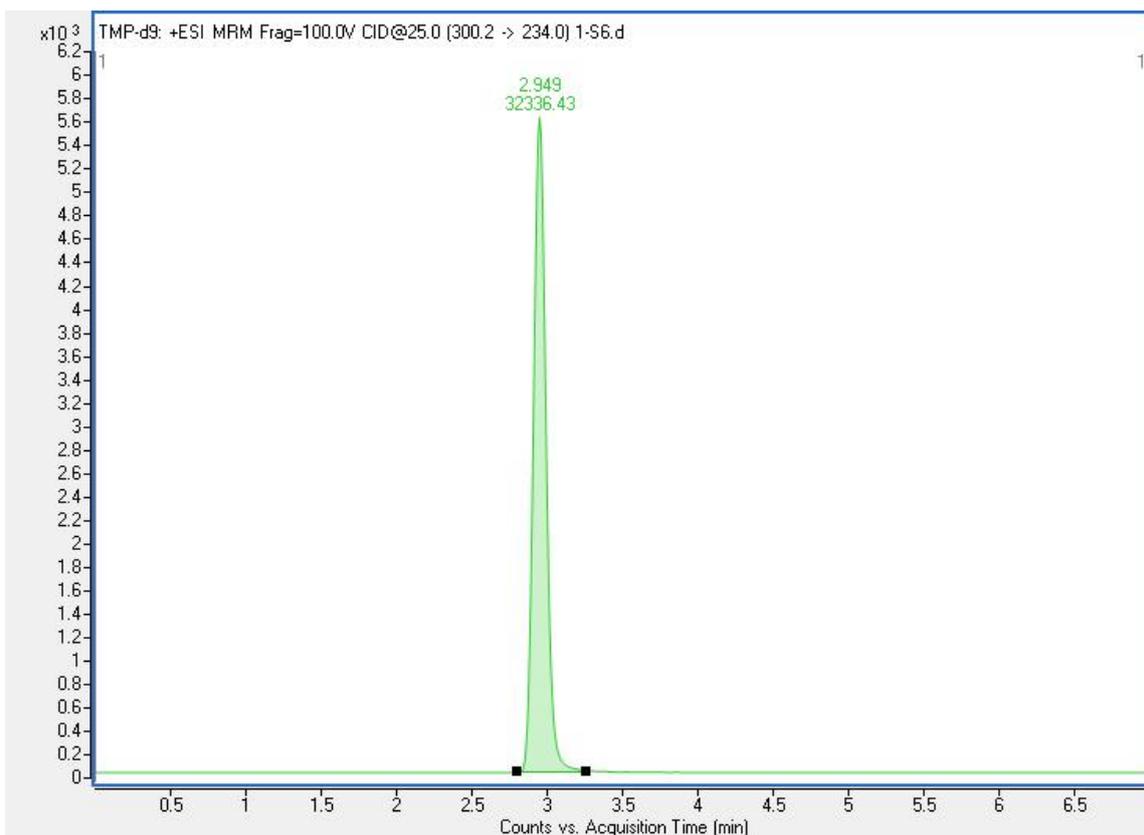


图 19 d₉-三甲氧苄氨嘧啶标准溶液色谱图

2.3.9.3 方法检出限和定量限

将仪器条件优化至最佳后，确定方法的检出限和定量限，具体操作如下。

检出限（LOD）：添加适量标准溶液于空白样品中，经提取净化处理后供液相色谱-串联质谱仪检测，依据分析物信噪比 $S/N > 3$ ，确定方法检出限为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于空白样品中，经提取净化处理后供液相色谱-串联质谱仪检测，依据分析物信噪比 $S/N > 10$ ，确定方法定量限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本试验根据信噪比计算得到的定量限进行空白基质加标试验，加标回收试验结果见表 22~表 28。

表 22 黄颡鱼配合饲料定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	99.9	106.2	98.1	107.4	104.4	106.4	103.7	3.68	5.34
		II	97.6	96.3	99.2	94.6	91.7	92.4	95.3	3.09	
		III	93.7	95.4	80.3	92.5	93.0	95.0	91.6	6.20	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	103.4	105.0	106.7	100.0	102.2	99.4	102.8	2.76	6.18
		II	104.3	101.3	97.2	93.3	92.7	98.5	97.9	4.59	
		III	98.0	115.1	86.1	100.7	104.7	100.4	100.8	9.33	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	90.6	92.4	93.5	99.1	83.3	92.3	91.8	5.59	5.04
		II	98.6	98.1	100.3	95.9	97.8	94.7	97.6	2.03	
		III	97.0	99.9	85.7	98.2	96.3	98.7	96.0	5.40	

表 23 仔猪配合饲料定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	104.6	92.8	97.0	96.3	93.7	95.6	96.7	4.33	3.97
		II	90.7	100.1	97.6	93.3	92.5	94.9	94.8	3.67	
		III	99.1	97.6	95.4	95.9	96.5	95.5	96.7	1.49	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.8	94.4	90.2	90.4	101.9	108.5	97.4	7.35	7.03
		II	95.9	99.9	99.9	94.3	94.5	93.8	96.4	2.90	
		III	103.5	117.7	102.0	104.8	108.6	100.9	106.2	5.83	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	92.1	84.8	93.4	88.9	87.8	104.4	91.9	7.48	5.70
		II	96.7	99.2	100.3	98.1	97.5	97.3	98.2	1.33	
		III	102.3	102.1	101.2	102.2	99.8	99.2	101.1	1.35	

表 24 乳猪浓缩饲料定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.6	95.1	91.2	93.4	103.4	96.5	95.7	4.37	3.74
		II	93.7	93.1	92.2	92.5	92.5	93.1	92.8	0.59	
		III	94.4	95.4	93.6	95.5	94.2	85.8	93.1	3.93	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.8	99.8	102.8	98.5	97.0	108.5	101.1	4.07	3.66
		II	96.6	95.0	96.1	92.7	96.1	96.6	95.5	1.58	
		III	95.3	96.4	95.6	96.8	96.8	94.4	95.9	1.01	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	104.0	100.3	98.6	100.9	100.8	120.8	104.2	7.98	5.24
		II	98.9	97.4	98.2	97.5	96.9	100.9	98.3	1.48	
		III	102.7	101.5	101.8	103.0	98.7	99.4	101.2	1.70	

表 25 肉牛精料补充料定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.7	96.3	96.5	93.1	100.6	97.9	96.5	2.67	2.61
		II	100.9	94.9	99.1	98.0	95.0	96.4	97.4	2.46	
		III	95.7	96.3	95.1	97.3	96.0	95.9	96.0	0.74	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	94.1	98.0	95.9	99.6	100.4	97.5	97.6	2.40	4.76
		II	109.5	105.2	107.0	107.4	105.1	104.7	106.5	1.74	
		III	94.1	98.0	95.9	99.6	100.4	97.5	97.6	2.40	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	99.0	100.8	99.9	100.6	101.6	100.9	100.5	0.89	1.20
		II	103.5	100.5	103.0	102.3	101.9	100.4	101.9	1.24	
		III	99.0	100.8	99.9	100.6	101.6	100.9	100.5	0.89	

表 26 畜禽用复合预混合饲料定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.8	94.8	97.1	98.5	99.3	106.4	98.8	4.08	1.40
		II	98.8	98.1	101.8	99.0	98.2	99.4	99.2	1.35	
		III	94.1	96.2	97.0	94.6	95.2	95.3	95.4	1.12	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.7	98.5	95.9	97.2	98.2	116.2	100.8	7.55	5.96
		II	109.0	108.0	108.1	110.5	108.7	114.1	109.7	2.11	
		III	102.5	104.6	108.1	101.9	111.3	98.5	104.5	4.42	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	100.6	107.6	100.0	106.9	93.6	106.2	102.5	5.30	3.28
		II	102.3	98.4	102.3	102.7	101.3	99.9	101.2	1.67	
		III	98.3	101.9	100.2	102.5	101.0	99.0	100.5	1.63	

表 27 鱼粉定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.5	924.0	94.4	95.2	94.9	91.0	93.7	1.83	3.27
		II	98.9	96.6	102.9	102.0	94.5	99.3	99.0	3.19	
		III	96.3	97.0	95.9	95.6	92.2	96.9	95.6	1.87	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.1	101.1	100.0	99.2	102.8	99.5	100.3	1.42	3.68
		II	101.0	102.5	101.8	95.7	107.7	99.3	101.3	3.89	
		III	108.3	108.0	107.7	105.1	103.4	106.9	106.6	1.83	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	106.9	106.0	105.4	105.9	108.2	102.7	105.8	1.73	5.00
		II	116.2	112.7	108.7	118.3	109.2	114.6	113.3	3.39	
		III	103.2	102.5	103.5	102.6	98.2	104.1	102.3	2.90	

表 28 鸡肉粉定量限加标回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.8	94.9	97.5	99.3	95.7	94.8	96.2	1.94	4.80
		II	97.3	99.7	97.2	101.4	110.8	98.7	100.9	5.06	
		III	94.3	93.9	95.0	93.1	95.9	98.2	95.1	1.88	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	95.5	95.2	103.2	103.2	99.0	93.2	98.2	4.35	5.53
		II	96.2	100.2	95.2	103.7	114.2	95.1	100.8	7.35	
		III	98.3	93.2	93.9	95.4	91.5	97.5	95.0	2.74	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	103.0	102.7	105.6	108.0	106.3	102.4	104.7	2.20	4.36
		II	101.3	103.3	100.4	102.4	112.9	98.2	103.1	4.97	
		III	98.2	99.2	98.0	94.7	96.3	100.0	97.8	1.98	

结果表明，二甲氧苄氨嘧啶定量限加标平均回收率为 92.8 % ~ 96.7 %，批内 RSD 为 0.59 % ~ 6.20 %，批间 RSD 为 1.40 % ~ 5.34 %；三甲氧苄氨嘧啶定量限加标平均回收率为 95.0 % ~ 109.7 %，批内 RSD 为 1.01 % ~ 9.33 %，批间 RSD 为 3.66 % ~ 7.03 %；二甲氧甲基苄氨嘧啶定量限加标平均回收率为 91.8 % ~ 113.3 %，批内 RSD 为 0.89 % ~ 7.98 %，批间 RSD 为 1.20 % ~ 5.70 %，完全满足饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶测定需要。

图 19 ~ 图 39 分别列出了黄颡鱼配合饲料、仔猪配合饲料、乳猪浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼粉、鸡肉粉在空白和定量限浓度时的特征离子色谱图。

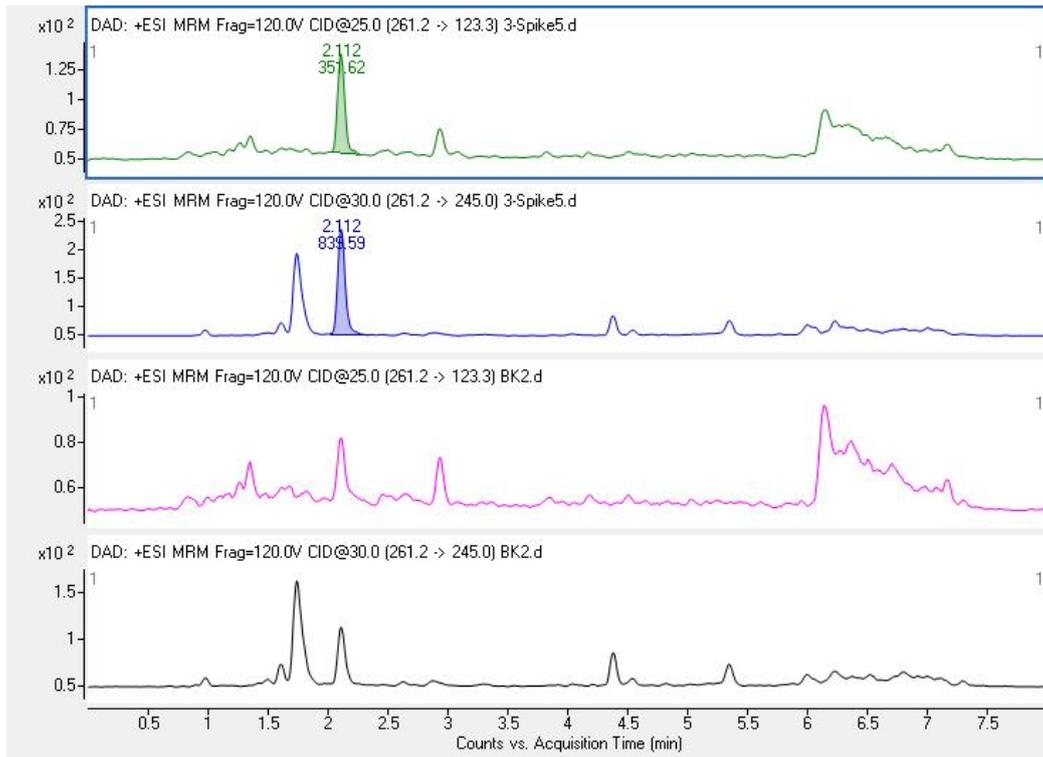


图19 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 黄颡鱼配合饲料及空白黄颡鱼配合饲料二甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

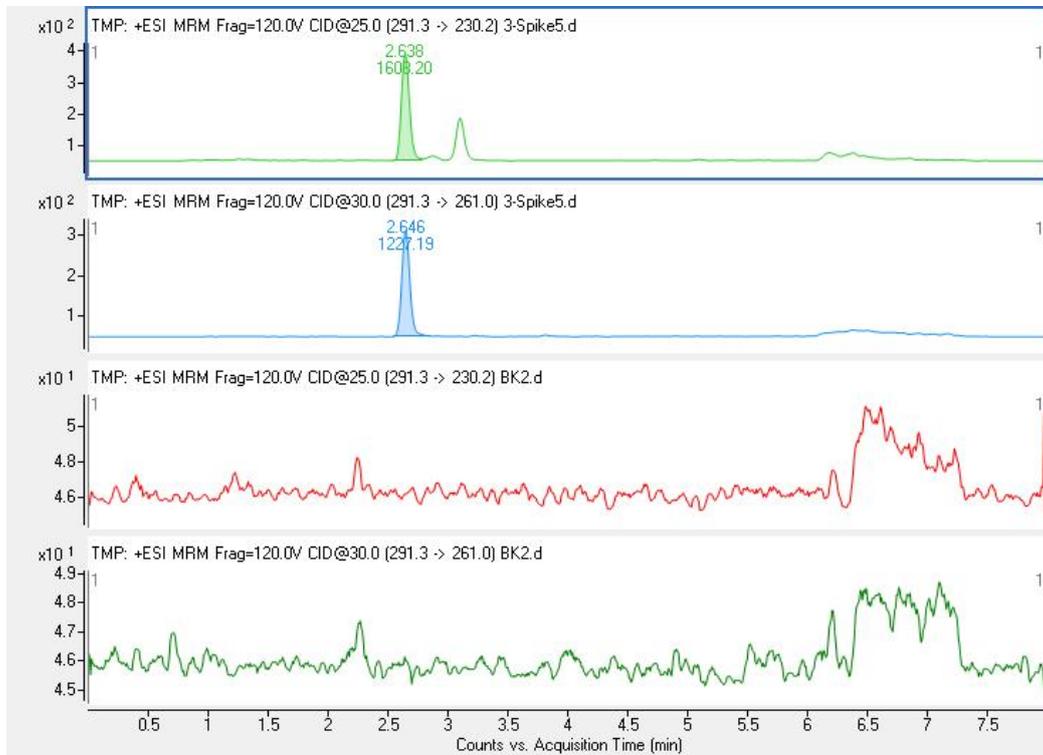


图20 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 黄颡鱼配合饲料及空白黄颡鱼配合饲料三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

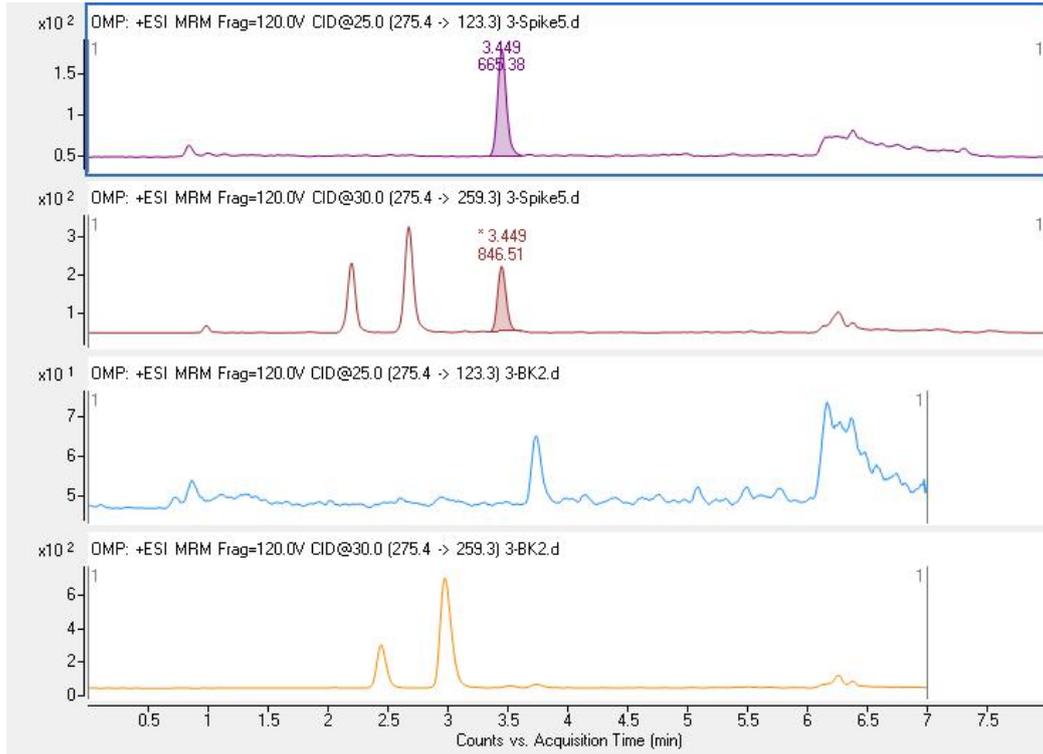


图21 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 黄颡鱼配合饲料及黄颡空白鱼配合饲料二甲氧甲基苄氨基嘧啶特征离子色谱图

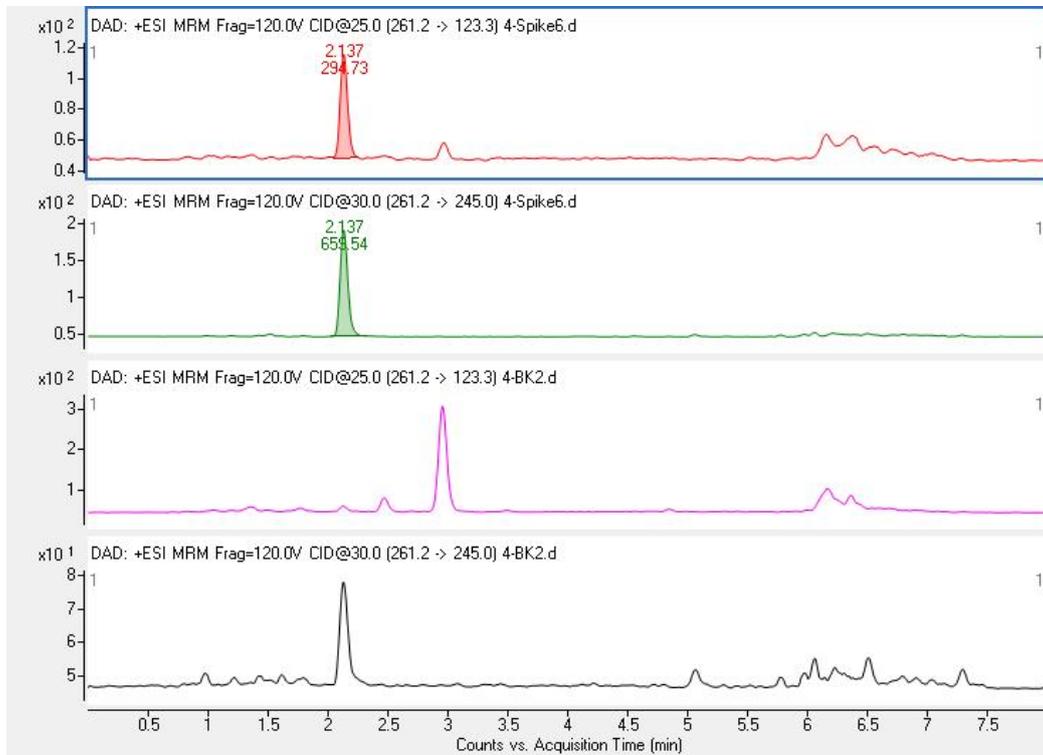


图22 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 仔猪配合饲料及空白仔猪配合饲料二甲氧苄氨基嘧啶特征离子色谱图

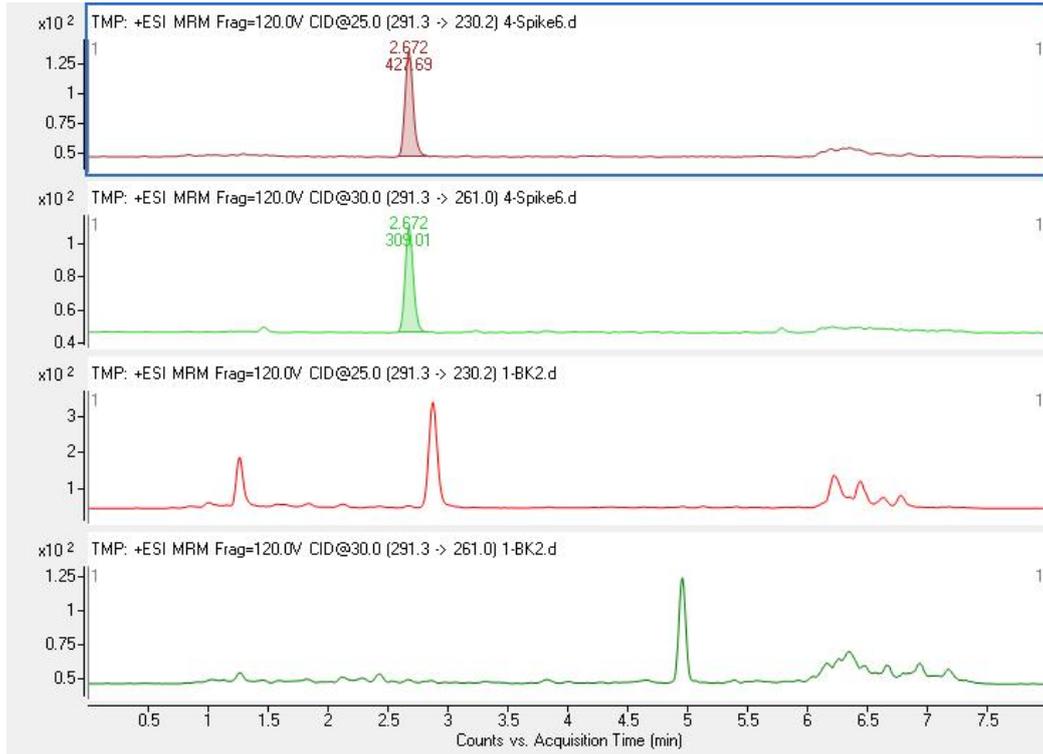


图23 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 仔猪配合饲料及空白仔猪配合饲料三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

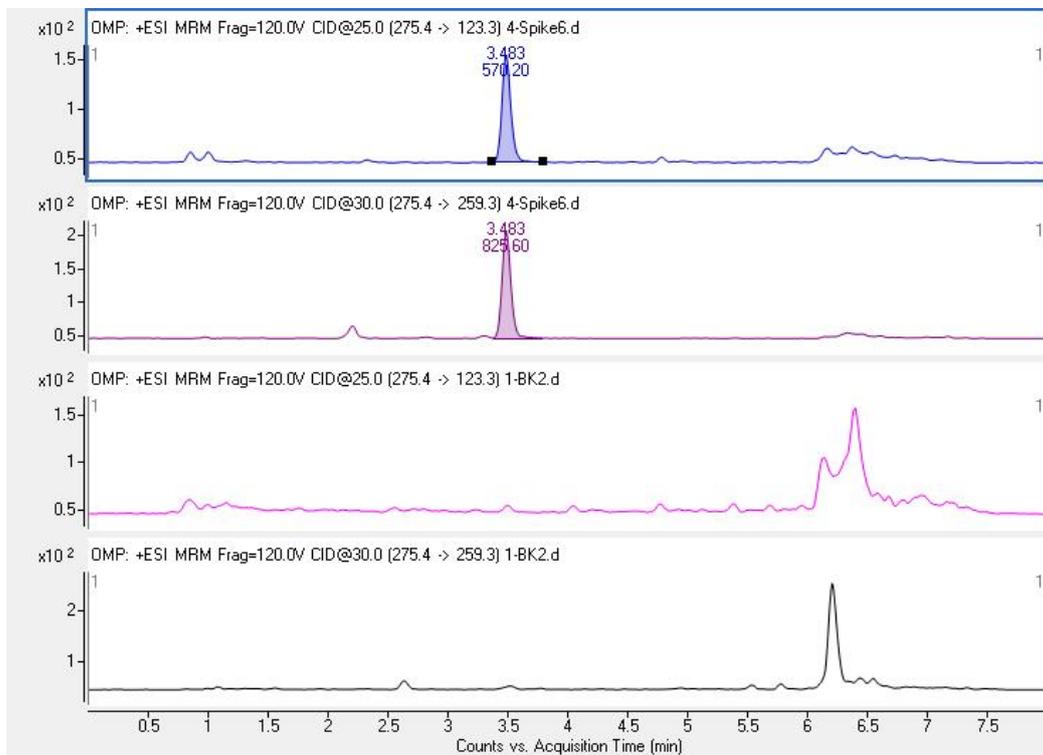


图24 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 仔猪配合饲料及空白仔猪配合饲料二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

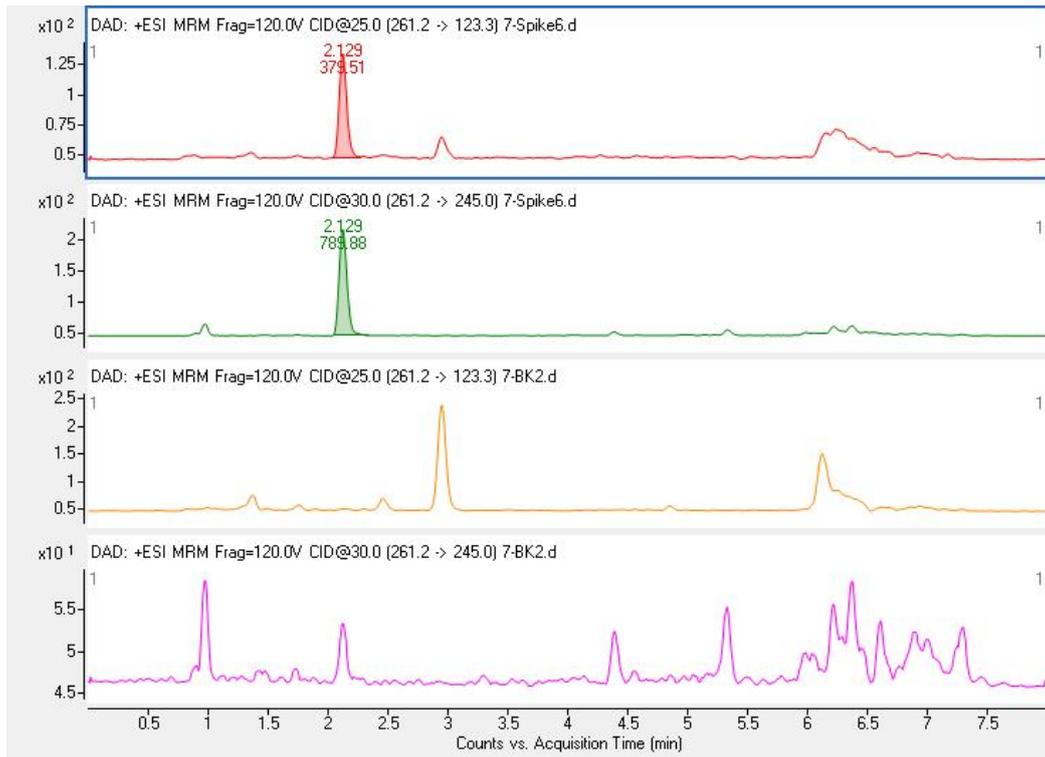


图25 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乳猪浓缩饲料及空白乳猪浓缩饲料二甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

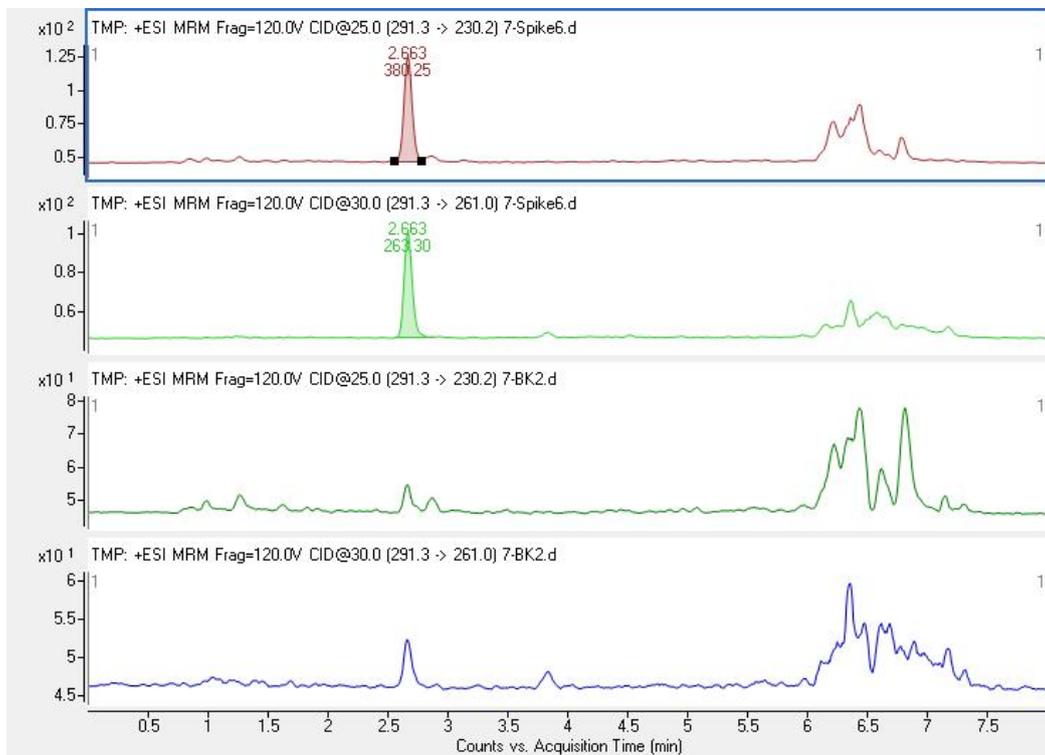


图26 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乳猪浓缩饲料及空白乳猪浓缩饲料三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

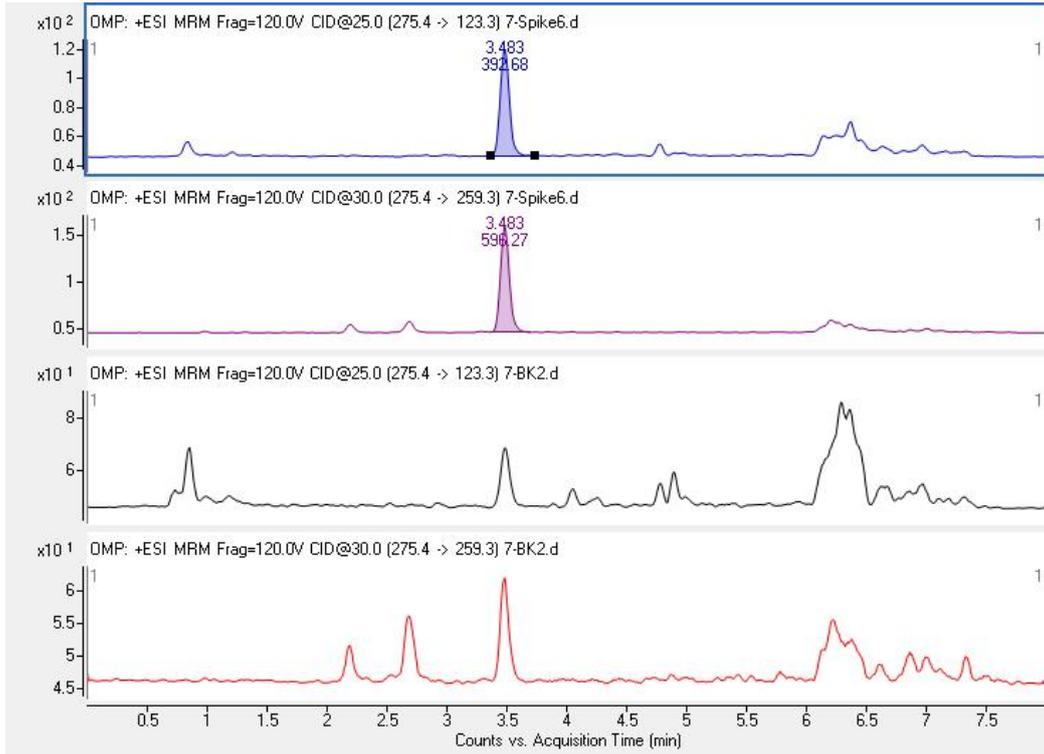


图27 添加浓度为5.0 μg/kg乳猪浓缩饲料及空白乳猪浓缩饲料二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

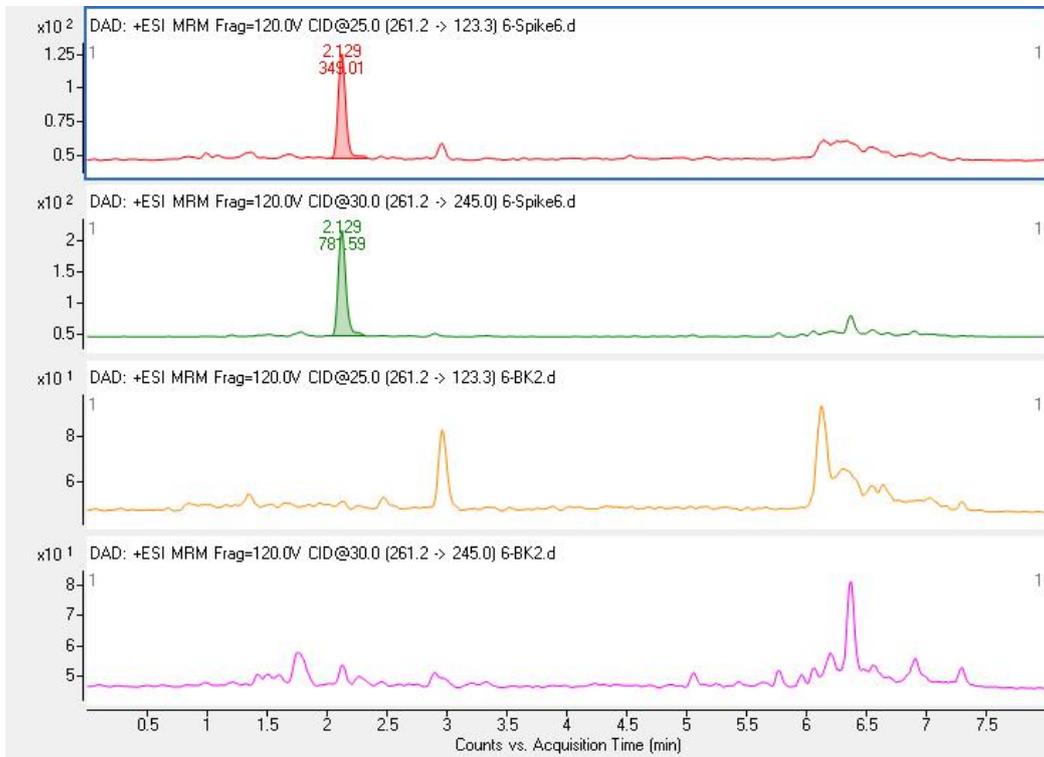


图28 添加浓度为5.0 μg/kg肉牛精料补充料及肉牛精料补充料二甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

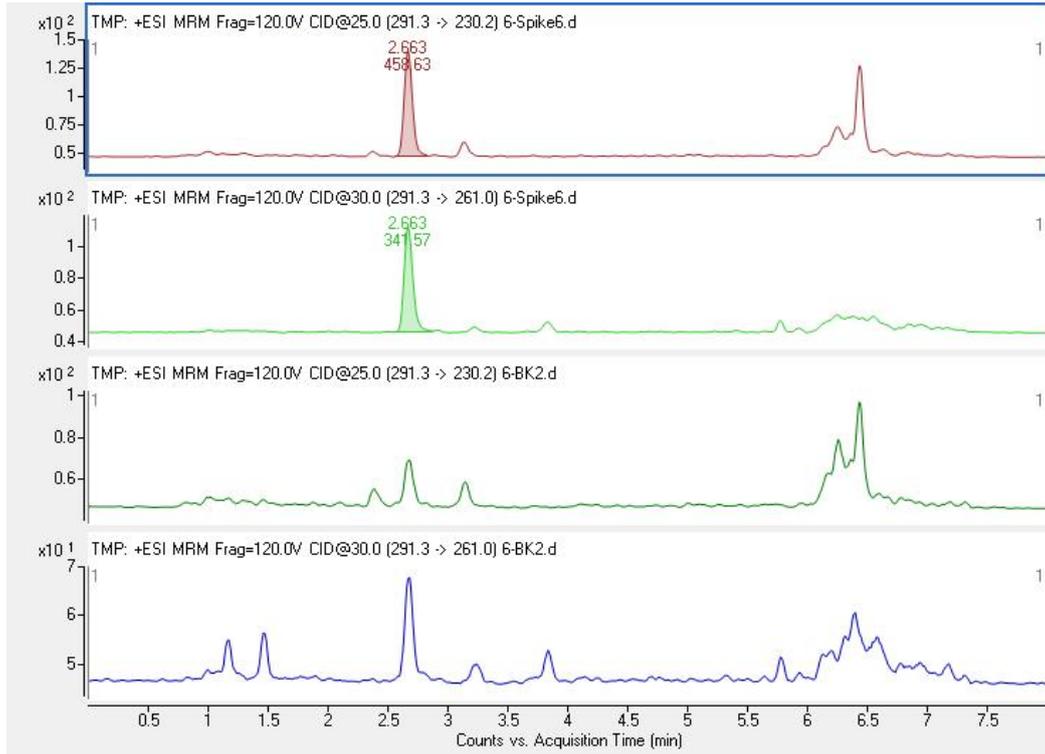


图29 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 肉牛精料补充料及肉牛精料补充料三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

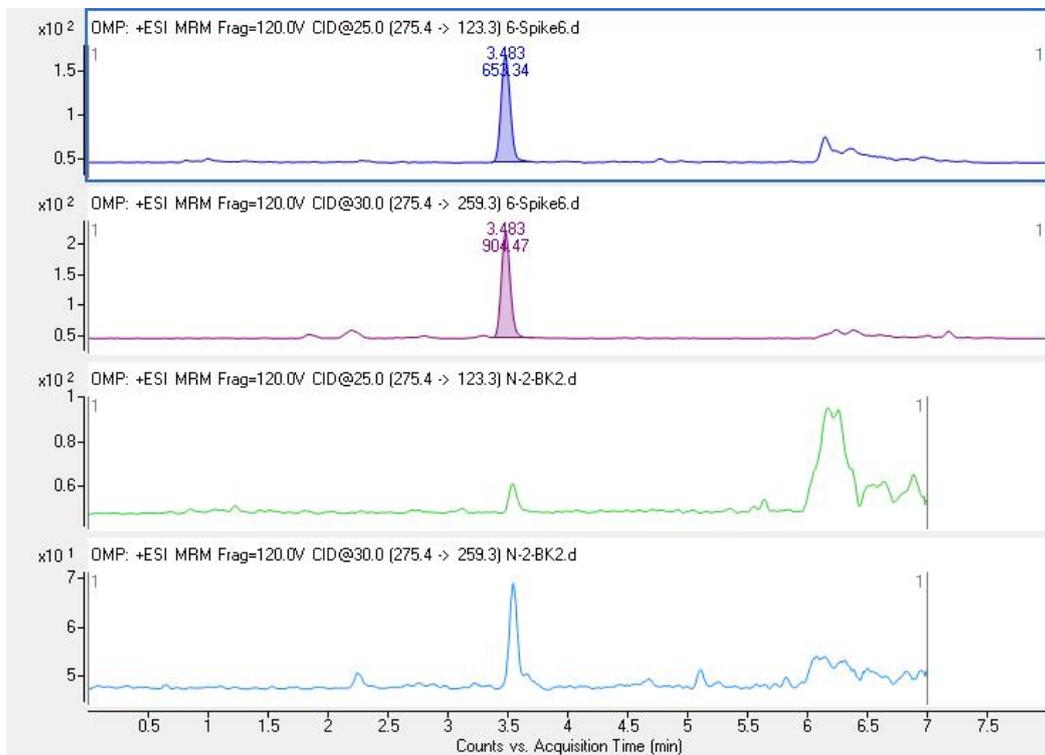


图30 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 肉牛精料补充料及肉牛精料补充料二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

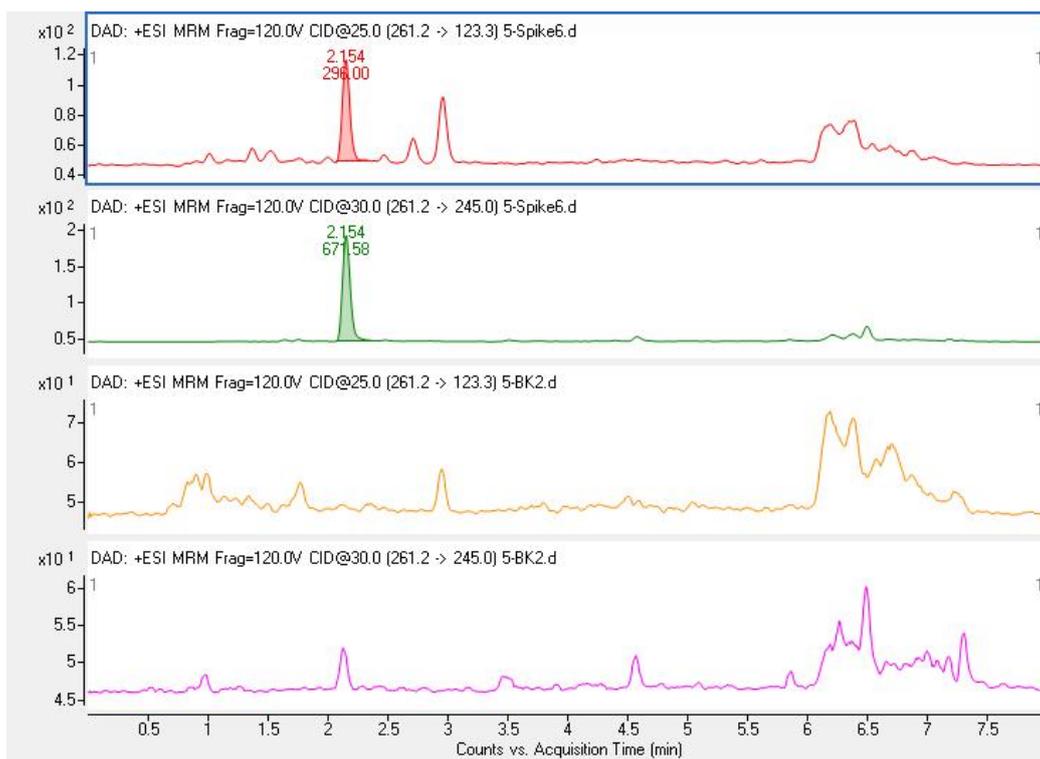


图31 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 禽用复合预混合饲料及空白禽用复合预混合饲料二甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

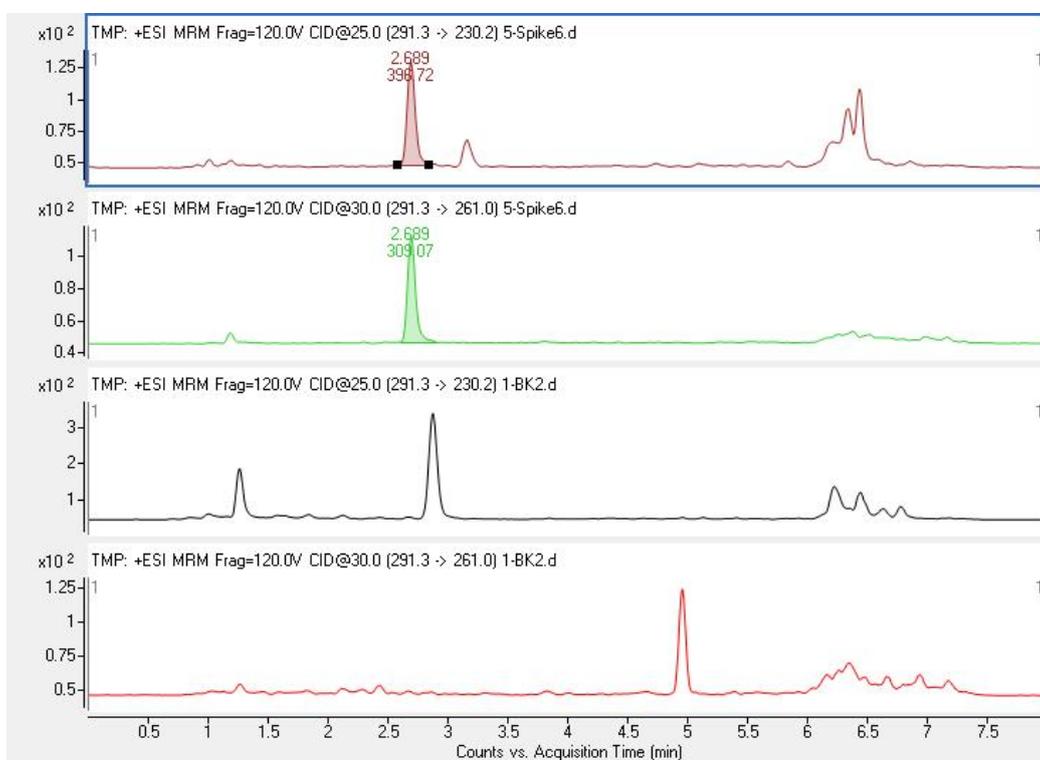


图32 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 禽用复合预混合饲料及空白禽用复合预混合饲料三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

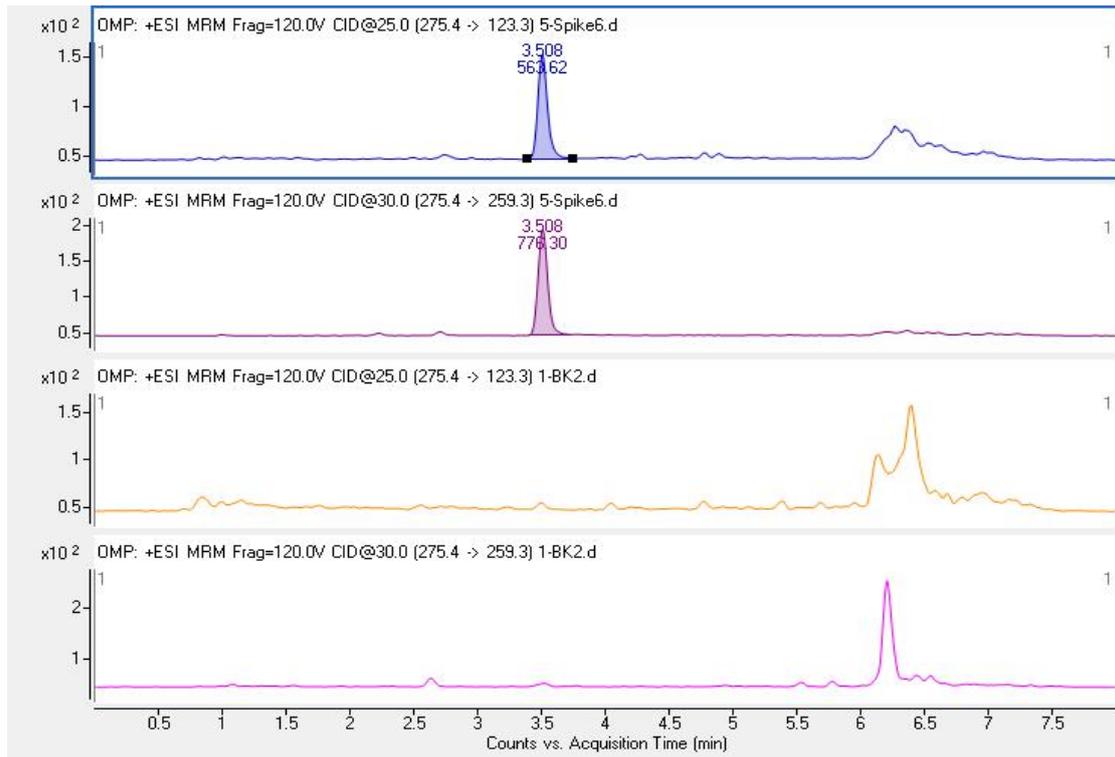


图33 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 禽用复合预混合饲料及空白禽用复合预混合饲料二甲氧甲基苄氨啉特征离子色谱图

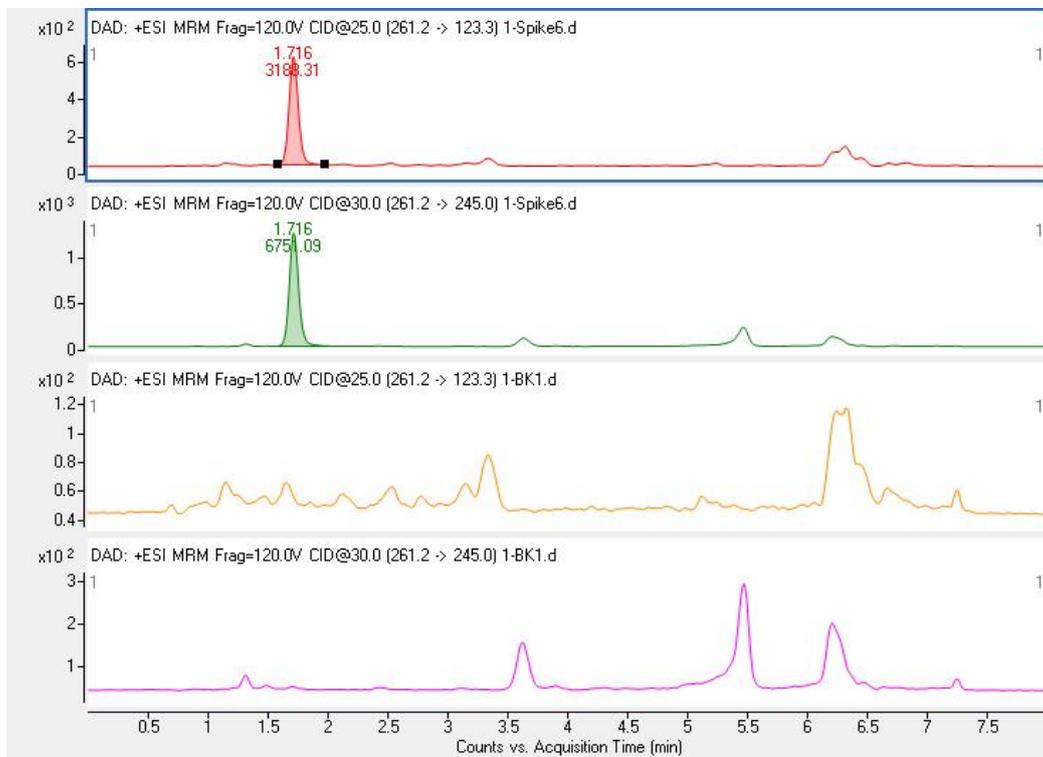


图34 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼粉及空白鱼粉二甲氧苄氨啉特征离子色谱图

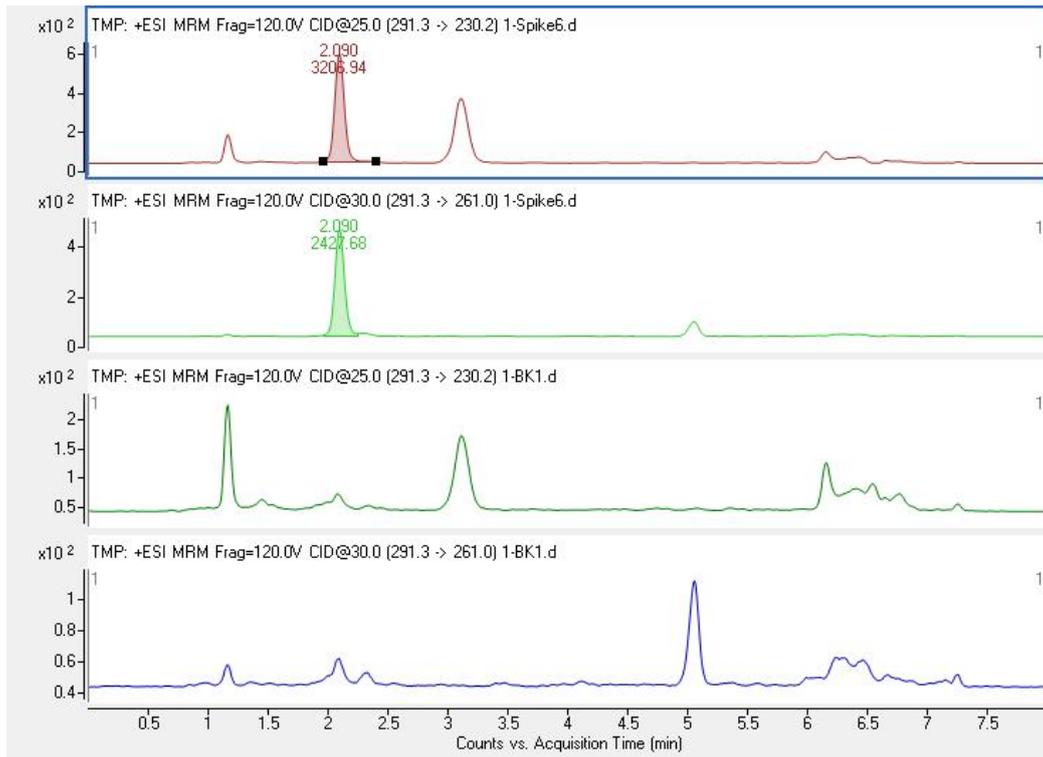


图35 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼粉及空白鱼粉三甲氧苄氨啉特征离子色谱图

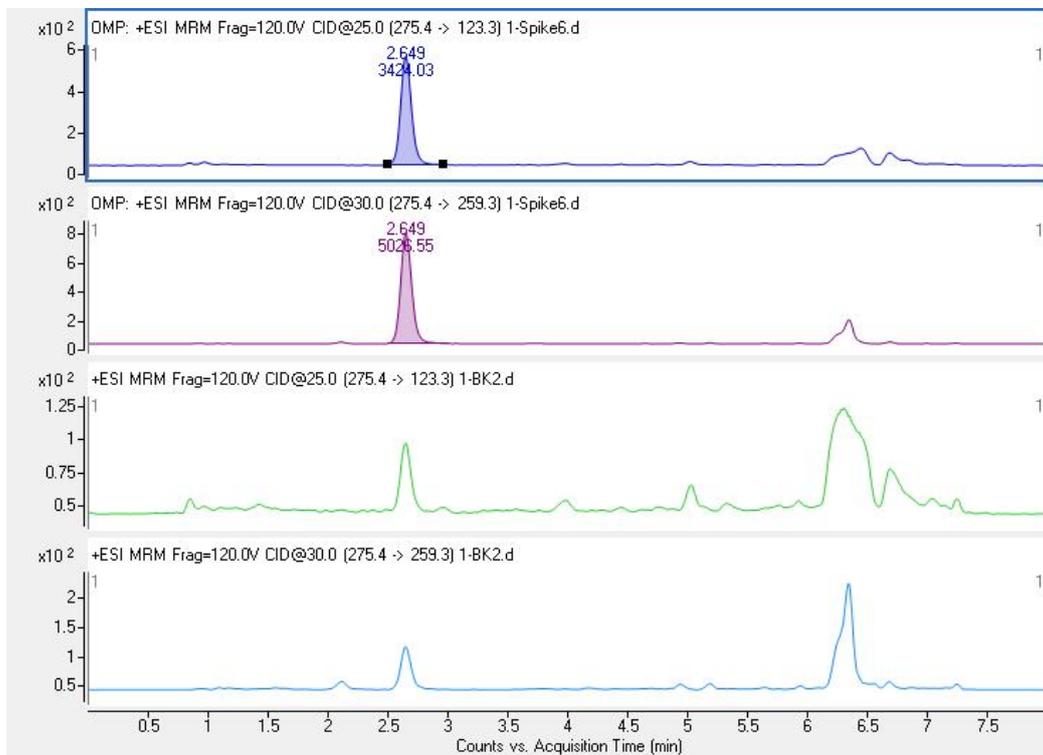


图36 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼粉及空白鱼粉二甲氧甲基苄氨啉特征离子色谱图

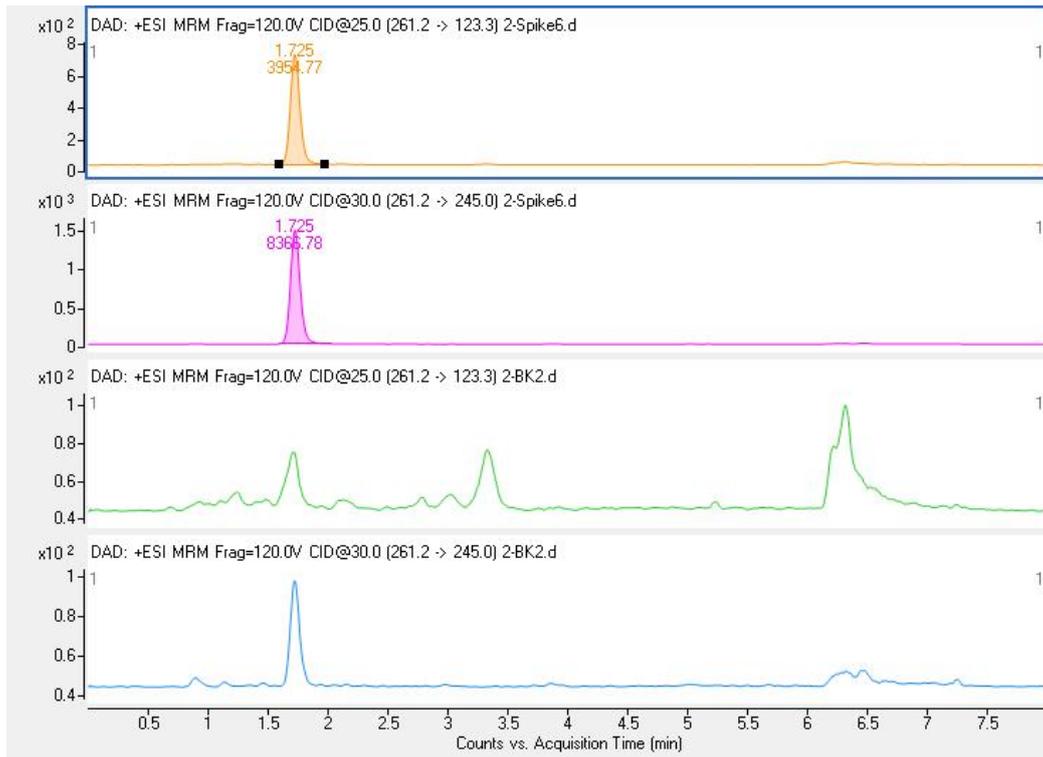


图37 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鸡肉粉及空白鸡肉粉二甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

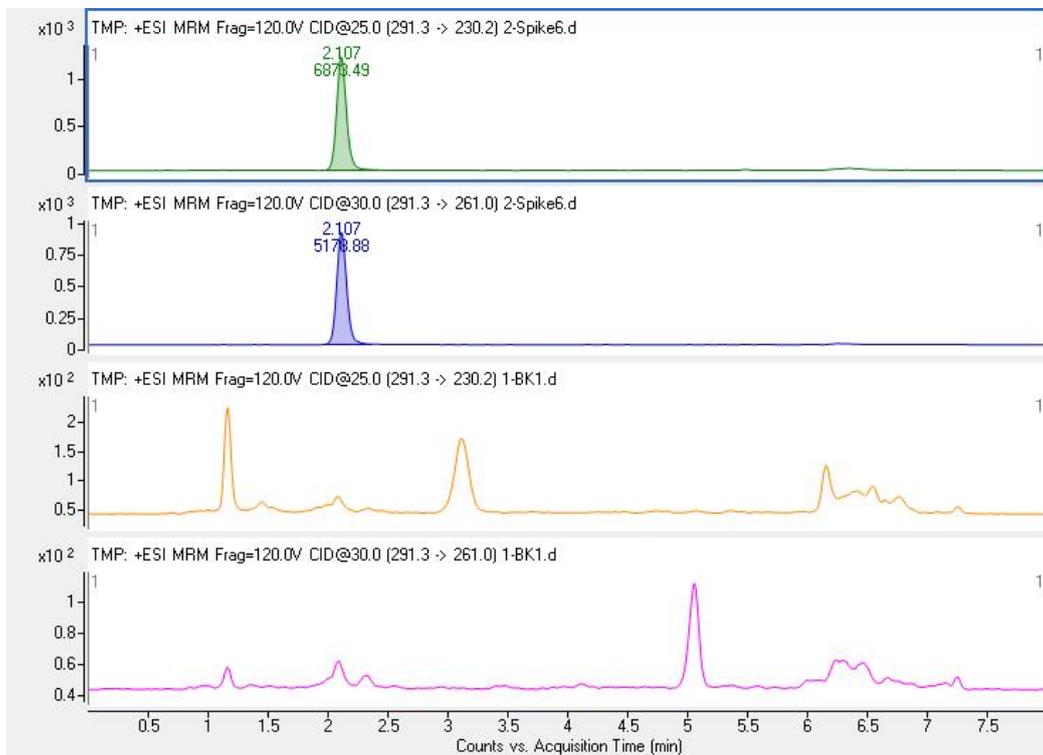


图38 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鸡肉粉及空白鸡肉粉三甲氧苄氨嘧啶特征离子色谱图

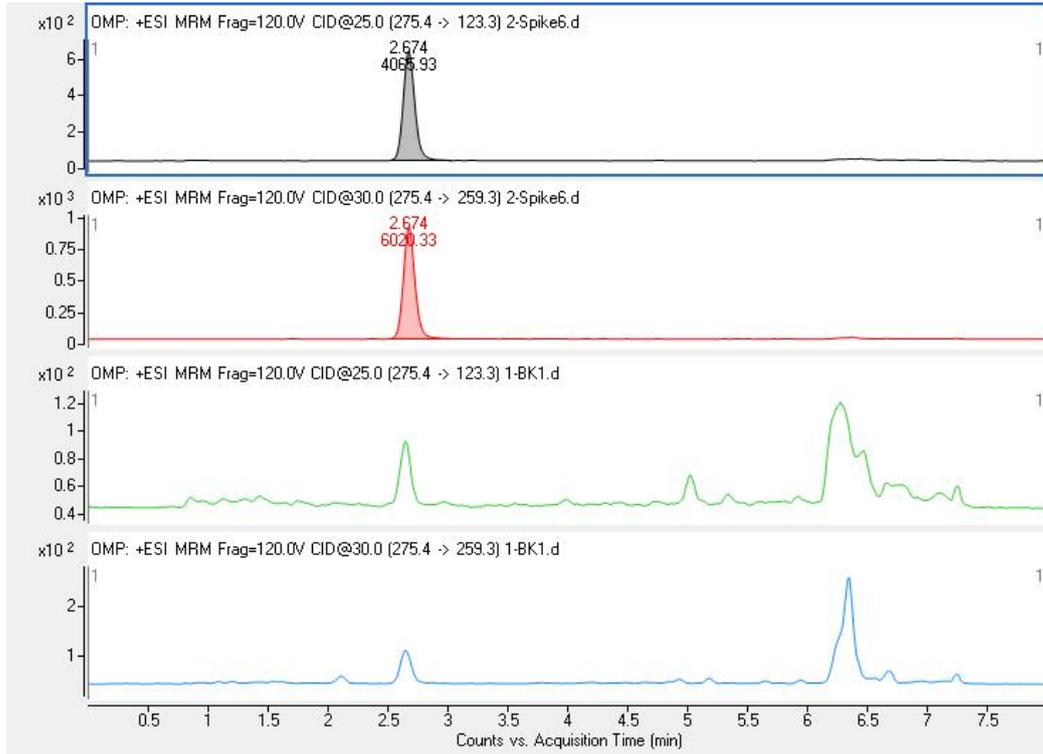


图39 添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 鸡肉粉及空白鸡肉粉二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

2.3.9.4 方法准确度和精密度

为进一步考察方法准确度和精密度，选用黄颡鱼配合饲料、仔猪配合饲料、乳猪浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼粉、鸡肉粉分别进行加标回收试验。对于禁用药物，分别在定量限、两倍定量限、二十倍定量限和线性范围最高浓度点进行加标回收实验。每种试样采用不同的添加浓度，每个添加浓度制备6个平行样品，重复3个批次，结果见表29~表35。

表 29 黄颡鱼配合饲料回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	99.9	106.2	98.1	107.4	104.4	106.4	103.7	3.68	5.34
		II	97.6	96.3	99.2	94.6	91.7	92.4	95.3	3.09	
		III	93.7	95.4	80.3	925.0	93.0	95.0	91.6	6.20	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	103.4	105.0	106.7	100.0	102.2	99.4	102.8	2.76	6.18
		II	104.3	101.3	97.2	93.3	92.7	98.5	97.9	4.59	
		III	98.0	115.1	86.1	100.7	104.7	100.4	100.8	9.33	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	90.6	92.4	93.5	99.1	83.3	923.0	91.8	5.59	5.04
		II	98.6	98.1	100.3	95.9	97.8	94.7	97.6	1.87	
		III	97.0	99.9	85.7	98.2	96.3	98.7	96.0	5.40	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	101.4	104.1	94.1	104.6	96.3	104.3	100.8	4.50	5.53
		II	93.1	96.5	98.0	96.1	99.7	95.6	96.5	2.30	
		III	84.8	96.0	95.3	92.6	92.6	87.8	91.5	4.76	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	106.8	103.8	107.9	108.5	104.2	103.7	105.8	1.89	6.15
		II	97.9	101.5	99.0	99.8	102.4	98.6	99.9	1.75	
		III	88.1	111.6	109.9	95.4	101.1	91.0	99.5	9.81	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	91.2	100.6	90.7	110.3	93.4	104.0	98.4	8.04	5.61
		II	97.2	98.5	100.8	100.6	99.9	99.1	99.3	1.38	
		III	87.7	101.4	98.0	98.4	98.2	90.3	95.6	5.64	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	98.3	97.1	97.2	95.5	97.4	97.6	97.2	0.95	1.53
		II	95.2	96.3	94.7	96.4	96.6	94.3	95.6	1.00	
		III	93.1	96.9	94.2	97.6	96.2	98.3	96.0	2.10	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	103.0	100.5	100.5	99.3	100.7	102.6	101.1	1.39	2.44
		II	98.1	99.5	95.6	99.7	97.0	96.7	97.8	1.66	
		III	95.5	98.2	93.9	98.1	97.4	99.6	97.1	2.14	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	103.7	103.2	101.0	100.0	101.7	100.2	101.6	1.51	2.59
		II	97.7	98.7	98.1	99.2	96.8	97.9	98.1	0.85	
		III	95.0	98.6	93.6	99.8	100.7	100.4	98.0	3.08	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.1	101.5	100.3	100.9	102.5	95.8	99.5	2.86	3.23
		II	95.1	98.6	103.0	100.1	103.6	95.6	99.3	3.62	
		III	96.3	95.9	101.2	102.5	104.6	96.6	99.5	3.74	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	90.1	92.6	93.9	97.8	97.0	87.5	93.2	4.26	5.09
		II	94.5	97.1	104.5	99.4	102.0	89.9	97.9	5.41	
		III	96.0	94.6	101.0	101.9	104.2	95.5	98.9	4.06	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	101.0	103.1	102.2	103.5	105.7	98.8	102.4	2.30	3.33
		II	100.0	102.1	104.6	105.3	106.7	99.2	103.0	2.97	
		III	97.3	94.5	100.9	103.3	106.0	97.7	100.0	4.25	

表 30 仔猪配合饲料回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	104.6	92.8	97.0	96.3	93.7	95.6	96.7	4.33	3.97
		II	90.7	100.1	97.6	93.3	92.5	94.9	94.8	3.67	
		III	99.1	97.6	95.4	95.9	96.5	95.5	96.7	1.49	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.8	94.4	90.2	90.4	101.9	108.5	97.4	7.35	7.03
		II	95.9	99.9	99.9	94.3	94.5	93.8	96.4	2.90	
		III	103.5	117.7	102.0	104.8	108.6	100.9	106.2	5.83	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	92.1	84.8	93.4	88.9	87.8	104.4	91.9	7.48	5.70
		II	96.7	99.2	100.3	98.1	97.5	97.3	98.2	1.33	
		III	102.3	102.1	101.2	102.2	99.8	99.2	101.1	1.35	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.6	92.0	98.9	97.1	98.5	97.3	96.7	2.58	1.84
		II	94.5	98.0	96.1	96.9	99.4	97.0	97.0	1.69	
		III	97.6	97.7	99.8	98.0	98.1	97.5	98.1	0.87	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	89.6	102.8	97.1	99.5	97.3	96.0	97.0	4.52	6.14
		II	98.3	97.6	98.0	99.4	98.8	95.3	97.9	1.46	
		III	101.2	113.5	115.1	100.9	107.1	101.0	106.5	6.13	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	95.0	101.0	98.8	95.8	93.6	98.4	97.1	2.83	3.33
		II	97.0	98.6	96.3	103.5	102.5	97.0	99.1	3.13	
		III	100.6	103.1	102.6	104.1	104.0	100.1	102.4	1.66	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	100.4	96.4	99.7	96.6	96.1	98.2	97.9	1.88	1.96
		II	99.0	97.4	100.7	100.6	96.0	100.4	99.0	1.99	
		III	99.4	99.2	101.2	100.9	100.4	102.3	100.5	1.16	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	100.9	97.8	101.1	97.0	100.9	100.3	99.7	1.78	1.86
		II	99.4	100.6	100.2	100.0	97.7	104.4	100.4	2.21	
		III	101.9	100.6	100.7	101.4	101.7	103.7	101.7	1.11	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	100.2	98.4	100.3	97.6	101.0	100.2	99.6	1.31	2.30
		II	95.6	102.2	103.1	102.2	100.8	102.2	101.0	2.71	
		III	101.3	101.0	100.5	103.1	105.1	104.5	102.6	1.91	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.7	97.1	96.8	93.9	97.7	95.8	96.3	1.41	2.80
		II	98.9	100.2	97.0	102.9	97.2	97.9	99.0	2.25	
		III	98.3	102.2	97.8	102.1	97.6	104.7	100.4	2.92	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	95.2	99.3	97.4	94.0	94.0	93.3	95.5	2.48	3.45
		II	99.4	101.8	97.0	104.4	99.3	97.8	99.9	2.74	
		III	93.5	96.3	91.9	96.0	92.5	97.8	94.7	2.49	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	102.2	100.0	101.0	97.8	98.0	99.2	99.7	1.74	3.33
		II	103.5	104.7	101.0	107.9	97.8	102.1	102.8	3.32	
		III	102.7	105.7	100.8	106.9	98.0	107.7	103.6	3.64	

表 31 乳猪浓缩饲料回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.6	95.1	91.2	93.4	103.4	96.5	95.7	4.37	3.74
		II	93.7	93.1	92.2	92.5	92.5	93.1	92.8	0.59	
		III	94.4	95.4	93.6	95.5	94.2	85.8	93.1	3.93	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.8	99.8	102.8	98.5	97.0	108.5	101.1	4.07	3.66
		II	96.6	95.0	96.1	92.7	96.1	96.6	95.5	1.58	
		III	95.3	96.4	95.6	96.8	96.8	94.4	95.9	1.01	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	104.0	100.3	98.6	100.9	100.8	120.8	104.2	7.98	5.24
		II	98.9	97.4	98.2	97.5	96.9	100.9	98.3	1.48	
		III	102.7	101.5	101.8	103.0	98.7	99.4	101.2	1.70	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	101.2	100.9	98.7	100.2	100.9	99.3	100.2	1.01	2.68
		II	95.9	97.8	98.4	97.1	97.5	97.4	97.4	0.87	
		III	106.8	104.0	101.5	98.2	100.1	98.0	101.4	3.41	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	102.2	106.3	100.4	108.5	99.4	100.2	102.8	3.60	4.45
		II	100.1	98.4	100.2	98.1	99.2	98.4	99.1	0.94	
		III	113.8	108.9	99.3	99.6	97.9	99.6	103.2	6.32	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	104.9	107.0	105.7	102.7	107.5	105.1	105.5	1.64	4.38
		II	103.0	99.9	102.6	101.0	101.8	100.9	101.5	1.14	
		III	118.3	113.5	104.6	103.5	104.8	101.7	107.7	6.13	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	101.1	103.3	103.9	102.9	102.6	101.1	102.5	1.15	1.46
		II	101.9	101.5	100.4	100.9	100.9	97.5	100.5	1.56	
		III	103.1	101.8	101.9	103.8	101.7	101.4	102.3	0.90	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	105.4	104.8	104.8	105.5	103.8	104.0	104.7	0.67	1.94
		II	101.4	100.8	100.1	100.8	99.7	101.2	100.7	0.63	
		III	101.7	101.3	99.8	101.6	100.8	100.9	101.0	0.70	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	105.9	106.5	104.9	106.8	106.9	107.1	106.4	0.78	1.41
		II	105.1	103.4	103.5	103.2	102.7	103.1	103.5	0.82	
		III	106.5	105.8	106.1	106.8	105.2	105.6	106.0	0.57	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	91.4	91.1	98.8	96.0	96.2	94.4	94.7	3.17	4.04
		II	97.6	99.8	96.7	96.6	95.8	97.1	97.3	1.42	
		III	97.5	101.8	105.8	103.8	99.9	103.4	102.0	2.93	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	106.0	101.7	110.1	109.4	114.1	110.4	108.6	3.93	7.62
		II	100.2	100.5	97.9	97.5	97.4	98.4	98.7	1.41	
		III	89.1	91.8	94.6	92.5	89.8	92.8	91.8	2.19	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	96.3	95.1	102.3	100.4	99.2	98.5	98.6	2.67	2.86
		II	102.4	102.8	99.4	100.3	98.7	101.0	100.8	1.64	
		III	97.9	98.2	98.2	94.5	92.2	98.6	96.6	2.71	

表 32 肉牛精料补充料回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.7	96.3	96.5	93.1	100.6	97.9	96.5	2.67	2.61
		II	100.9	94.9	99.1	98.0	95.0	96.4	97.4	2.46	
		III	95.7	96.3	95.1	97.3	96.0	95.9	96.0	0.74	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	94.1	98.0	95.9	99.6	100.4	97.5	97.6	2.40	4.76
		II	109.5	105.2	107.0	107.4	105.1	104.7	106.5	1.74	
		III	94.1	98.0	95.9	99.6	100.4	97.5	97.6	2.40	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	99.0	100.8	99.9	100.6	101.6	100.9	100.5	0.89	1.20
		II	103.5	100.5	103.0	102.3	101.9	100.4	101.9	1.24	
		III	99.0	100.8	99.9	100.6	101.6	100.9	100.5	0.89	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	98.8	97.1	115.2	99.9	100.4	101.4	102.1	6.42	3.94
		II	98.4	98.1	96.6	98.9	98.9	99.4	98.4	0.98	
		III	99.4	99.7	99.4	100.3	100.7	100.1	99.9	0.53	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.5	100.3	100.9	99.0	101.0	101.4	100.4	0.92	4.56
		II	105.4	104.3	119.5	103.5	103.8	104.8	106.9	5.81	
		III	99.5	100.3	100.9	99.0	101.0	101.4	100.4	0.92	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	103.8	104.2	103.3	102.9	102.4	104.4	103.5	0.75	0.84
		II	104.4	102.7	102.6	102.5	102.9	101.8	102.7	0.88	
		III	103.8	104.2	103.3	102.9	102.4	104.4	103.5	0.75	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	100.1	99.8	99.4	102.2	101.4	101.4	100.7	1.12	1.37
		II	98.4	98.7	99.2	97.8	100.2	98.4	98.8	0.86	
		III	100.0	101.2	100.9	101.7	102.0	101.6	101.2	0.70	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.3	101.8	100.4	101.8	101.2	100.1	100.6	1.30	1.32
		II	98.4	101.3	97.9	100.6	101.5	100.6	100.0	1.53	
		III	98.3	101.8	100.4	101.8	101.2	100.1	100.6	1.30	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	101.5	104.2	103.3	104.5	104.1	103.7	103.6	1.05	2.77
		II	100.5	101.6	103.3	92.8	103.9	99.4	100.2	4.00	
		III	101.5	104.2	103.3	104.5	104.1	103.7	103.6	1.05	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	95.0	92.7	96.1	98.7	96.8	94.9	95.7	2.10	2.05
		II	101.2	95.4	98.0	96.7	96.4	100.0	97.9	2.29	
		III	98.2	95.3	96.5	96.3	97.6	97.9	97.0	1.14	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.9	98.0	101.8	105.8	103.3	106.1	102.3	3.35	4.11
		II	103.5	99.4	99.7	97.0	100.2	97.6	99.6	2.33	
		III	96.0	92.7	94.0	95.2	94.6	94.6	94.5	1.17	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	97.3	94.6	99.2	100.5	99.5	97.2	98.0	2.18	4.32
		II	103.4	95.6	99.3	98.5	96.9	101.1	99.1	2.82	
		III	96.0	90.8	94.5	90.6	89.3	89.2	91.7	3.10	

表 33 禽用复合预混合饲料回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.8	94.8	97.1	98.5	99.3	106.4	98.8	4.08	1.40
		II	98.8	98.1	101.8	99.0	98.2	99.4	99.2	1.35	
		III	94.1	96.2	97.0	94.6	95.2	95.3	95.4	1.12	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	98.7	98.5	95.9	97.2	98.2	116.2	100.8	7.55	5.96
		II	109.0	108.0	108.1	110.5	108.7	114.1	109.7	2.11	
		III	102.5	104.6	108.1	101.9	111.3	98.5	104.5	4.42	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	100.6	107.6	100.0	106.9	93.6	106.2	102.5	5.30	3.28
		II	102.3	98.4	102.3	102.7	101.3	99.9	101.2	1.67	
		III	98.3	101.9	100.2	102.5	101.0	99.0	100.5	1.63	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	98.8	102.7	101.2	100.9	101.6	101.5	101.1	1.25	2.13
		II	104.2	104.1	103.3	102.1	103.3	102.9	103.3	0.76	
		III	97.6	99.6	99.3	98.3	103.6	98.4	99.5	2.15	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	105.6	95.2	104.2	101.9	99.0	107.4	102.2	4.43	4.39
		II	106.8	107.6	106.0	105.8	107.3	106.7	106.7	0.65	
		III	100.2	103.6	110.5	101.0	102.3	103.5	106.8	5.56	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	99.3	100.7	100.0	104.6	98.3	106.5	101.5	3.19	2.42
		II	104.1	104.8	103.5	101.8	103.5	103.7	103.6	0.97	
		III	101.3	102.7	99.8	99.8	106.8	101.7	1023.0	2.55	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	100.6	101.7	98.1	98.3	102.6	102.9	100.7	29	2.50
		II	106.8	102.4	104.4	104.7	104.1	104.5	104.5	1.35	
		III	101.0	98.9	99.9	103.1	99.1	99.2	100.2	1.60	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	100.6	101.3	98.3	98.5	101.2	101.5	100.2	1.45	27
		II	105.8	103.6	103.6	104.3	104.0	103.9	104.2	0.79	
		III	102.3	101.2	103.6	104.6	100.6	100.3	1029.0	1.70	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	98.1	102.6	99.6	97.2	101.1	100.0	99.7	1.83	2.44
		II	106.7	102.8	104.1	104.3	103.5	103.2	104.1	1.34	
		III	101.1	102.9	103.9	102.5	99.6	98.9	101.5	1.93	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	95.2	98.6	91.8	95.6	97.9	95.2	95.7	2.54	3.69
		II	101.1	96.7	96.8	99.6	102.1	97.5	99.0	2.33	
		III	100.6	103.5	104.5	106.1	98.3	97.3	101.7	3.46	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	96.3	100.5	94.5	96.0	101.7	96.6	97.6	2.92	3.32
		II	103.9	102.3	98.9	99.4	105.0	97.4	101.2	3.00	
		III	98.6	101.0	102.7	102.8	95.5	94.9	99.3	3.49	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	98.7	101.0	95.1	98.4	100.1	97.8	98.5	2.08	3.48
		II	103.3	96.7	99.3	101.8	104.0	98.7	100.6	2.86	
		III	101.1	101.2	103.9	100.2	92.1	92.6	98.5	5.01	

表 34 鱼粉回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.5	924.0	94.4	95.2	94.9	91.0	93.7	1.83	3.27
		II	98.9	96.6	102.9	102.0	94.5	99.3	99.0	3.19	
		III	96.3	97.0	95.9	95.6	92.2	96.9	95.6	1.87	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.1	101.1	100.0	99.2	102.8	99.5	100.3	1.42	3.68
		II	101.0	102.5	101.8	95.7	107.7	99.3	101.3	3.89	
		III	108.3	108.0	107.7	105.1	103.4	106.9	106.6	1.83	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	106.9	106.0	105.4	105.9	108.2	102.7	105.8	1.73	5.00
		II	116.2	112.7	108.7	118.3	109.2	114.6	113.3	3.39	
		III	103.2	102.5	103.5	102.6	98.2	104.1	102.3	1.89	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	97.8	95.6	101.7	96.1	96.2	95.5	97.2	2.42	1.99
		II	98.4	101.3	98.0	100.4	101.7	98.4	99.7	1.65	
		III	99.2	97.5	97.9	96.9	98.7	97.7	98.0	0.85	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	102.4	103.4	109.1	100.1	101.2	100.4	102.8	3.24	2.99
		II	102.1	101.5	106.5	95.9	103.1	98.2	101.2	3.68	
		III	106.1	105.3	103.7	102.4	103.5	103.8	104.1	1.31	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	106.7	105.7	94.0	106.0	104.4	96.8	102.3	5.30	4.38
		II	110.6	112.1	109.8	106.3	107.5	111.3	109.6	1.88	
		III	106.3	102.8	103.9	103.3	104.0	102.4	103.8	1.33	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	100.5	99.8	98.7	98.6	99.8	98.0	99.2	0.95	1.81
		II	102.9	101.1	104.4	102.9	99.2	100.1	101.8	1.92	
		III	101.2	102.5	100.7	100.0	99.6	103.5	101.2	1.48	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	102.5	100.9	101.4	100.5	100.9	99.8	101.0	0.89	2.22
		II	103.7	101.7	104.6	102.3	94.2	101.9	101.4	3.64	
		III	103.0	103.9	101.8	102.4	102.2	103.6	102.8	0.82	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	106.4	105.5	105.6	104.5	104.9	103.4	105.0	1.01	1.67
		II	108.7	106.7	108.7	108.7	105.5	109.2	107.9	1.38	
		III	106.8	108.6	104.9	105.5	105.5	108.1	106.6	1.45	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.9	101.6	97.2	100.1	93.4	94.9	97.0	3.35	3.35
		II	94.0	101.5	98.2	100.3	92.9	95.6	97.1	3.58	
		III	97.9	101.7	97.7	100.9	94.4	96.2	98.1	2.82	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	95.6	101.3	95.4	101.9	90.9	91.5	96.2	4.83	5.18
		II	97.3	107.9	106.5	105.2	94.1	97.2	101.4	5.77	
		III	100.7	105.3	100.9	106.3	98.5	98.7	101.7	3.26	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	99.4	107.4	103.3	104.8	98.7	99.3	102.1	3.51	3.34
		II	98.1	107.9	103.2	106.0	98.4	100.6	102.4	3.96	
		III	102.0	106.5	100.1	105.3	98.0	101.0	102.2	3.14	

表 35 鸡肉粉回收率试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
5	二甲氧苄氨嘧啶	I	94.8	94.9	97.5	99.3	95.7	94.8	96.2	1.94	4.80
		II	97.3	99.7	97.2	101.4	110.8	98.7	100.9	5.06	
		III	94.3	93.9	95.0	93.1	95.9	98.2	95.1	1.88	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	95.5	95.2	103.2	103.2	99.0	93.2	98.2	4.35	5.53
		II	96.2	100.2	95.2	103.7	114.2	95.1	100.8	7.35	
		III	98.3	93.2	93.9	95.4	91.5	97.5	95.0	2.74	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	103.0	102.7	105.6	108.0	106.3	102.4	104.7	2.20	4.36
		II	101.3	103.3	100.4	102.4	112.9	98.2	103.1	4.97	
		III	98.2	99.2	98.0	94.7	96.3	100.0	97.8	1.98	
10	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.4	98.6	96.5	95.9	95.7	98.9	97.0	1.43	4.81
		II	98.7	104.2	114.5	103.0	99.7	101.1	103.5	5.54	
		III	97.6	97.5	98.6	95.4	93.6	94.7	96.2	1.85	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	100.0	100.1	100.4	97.0	101.5	101.3	100.1	1.61	3.26
		II	98.5	106.6	108.4	105.0	99.8	101.9	103.4	3.81	
		III	100.1	97.7	95.3	99.6	98.0	100.6	98.5	1.98	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	102.5	104.1	101.5	99.6	100.0	102.9	101.8	1.70	7.45
		II	101.7	106.1	132.5	107.1	102.4	102.5	108.6	10.96	
		III	102.5	98.3	100.7	100.9	95.5	102.0	99.9	2.55	
100	二甲氧苄氨嘧啶	I	99.3	98.5	99.3	99.7	99.8	97.7	99.1	0.80	1.36
		II	99.5	101.9	101.3	100.5	101.2	101.6	101.0	0.87	
		III	99.2	99.7	97.2	100.3	101.2	101.9	99.9	1.63	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	100.2	99.3	98.4	99.5	100.8	98.3	99.4	1.00	1.46
		II	100.4	101.6	102.6	99.3	100.1	100.3	100.7	1.16	
		III	98.4	97.5	99.1	97.2	100.2	101.6	99.0	1.71	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	102.7	100.9	102.2	104.1	103.3	101.3	102.4	1.20	1.06
		II	102.1	104.3	102.4	102.9	103.9	103.0	103.1	0.83	
		III	101.1	101.9	101.6	102.3	103.5	104.2	102.5	1.17	
500	二甲氧苄氨嘧啶	I	101.7	103.1	97.4	98.8	97.8	101.3	100.0	2.32	2.58
		II	95.6	103.0	98.2	97.5	99.7	101.3	99.2	2.70	
		III	94.8	104.3	100.1	99.6	100.6	101.2	100.1	3.09	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	93.9	96.7	87.2	90.1	88.8	92.2	91.5	3.80	6.11
		II	95.4	101.4	97.3	94.9	102.1	102.7	99.0	3.54	
		III	96.7	104.8	104.2	102.5	104.5	106.7	103.2	3.36	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	106.3	107.5	100.8	102.2	101.8	105.7	104.1	2.66	2.85
		II	98.2	106.7	101.1	101.3	103.7	104.6	102.6	2.96	
		III	98.8	108.6	104.0	103.7	105.5	106.0	104.4	3.12	

按已确定的样品提取净化方法和检测条件完成黄颡鱼配合饲料、仔猪配合饲料、乳猪浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼粉、鸡肉粉加标回收试验，加标水平为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果表明：二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 91.5 % ~ 104.5 %，批内变异系数为 0.53 % ~ 6.42 %，批间变异系数为 1.36 % ~ 5.53 %；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 91.5 % ~ 109.7 %，批内变异系数为 0.63 % ~ 9.81 %，批间变异系数为 1.32 % ~ 7.62 %；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为 91.7 % ~ 113.3 %，批内变异系数为 0.57 % ~ 10.96 %，批间变异系数为 0.84 % ~ 7.45 %。上述数据证明本方法准确度和精密度良好，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饲料原料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定。不同空白基质加标试验色谱图详见图 40~图 46。

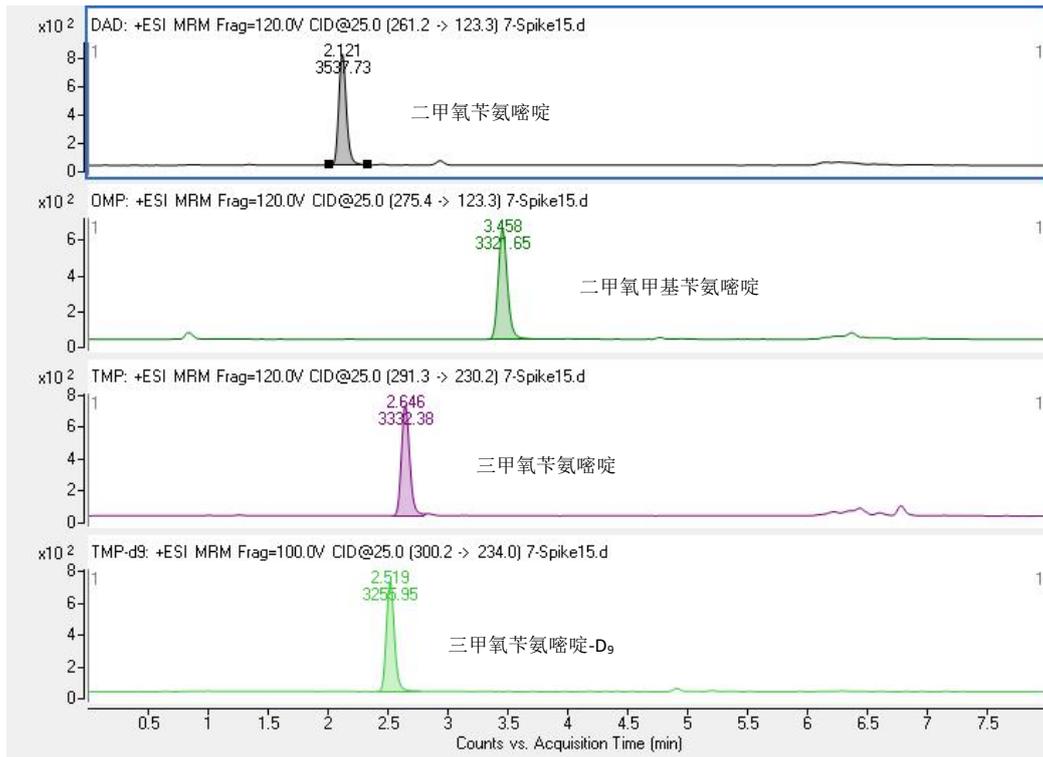


图40 黄颡鱼配合饲料添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

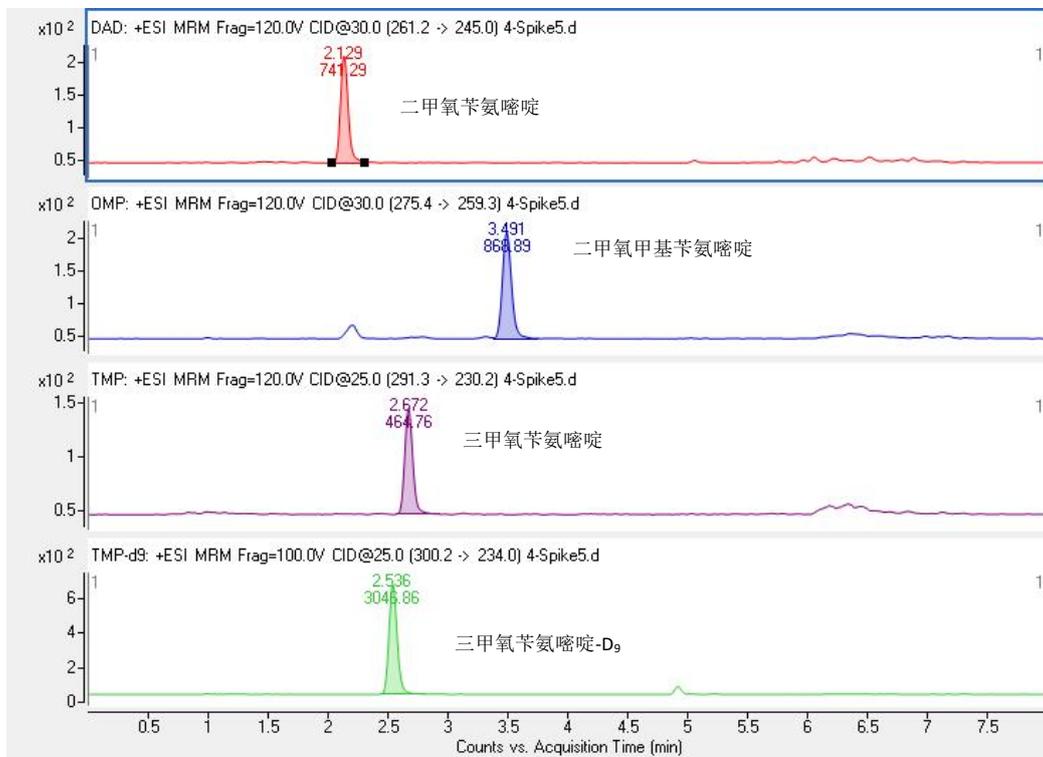


图41 仔猪配合饲料添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

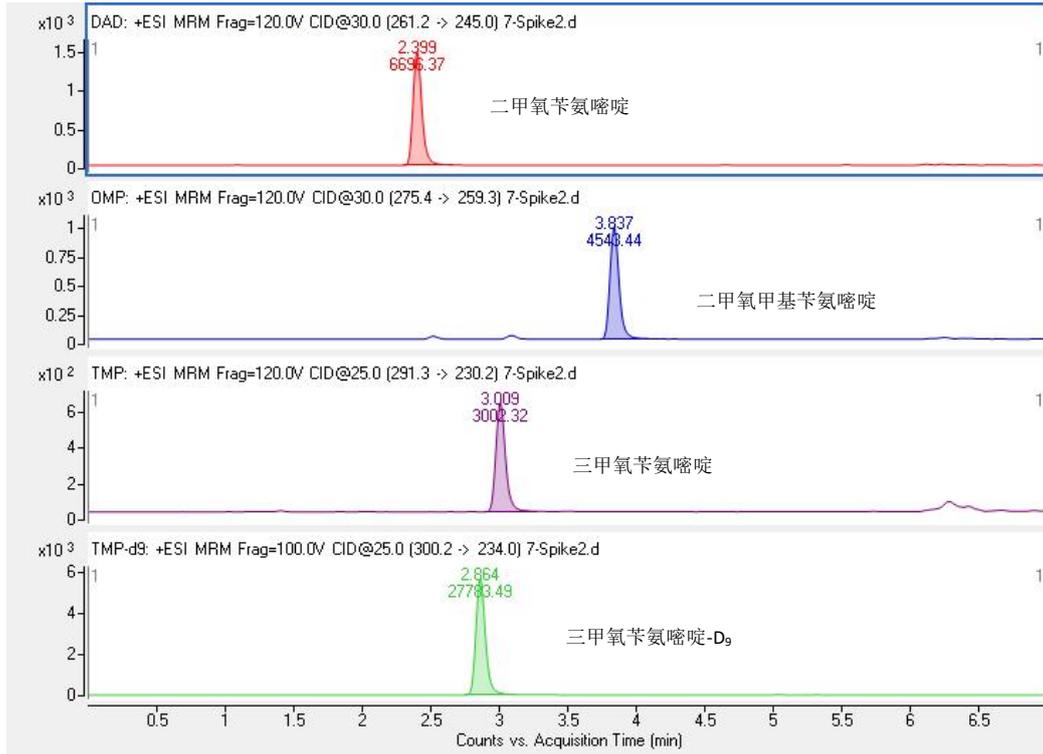


图42 乳猪浓缩饲料添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

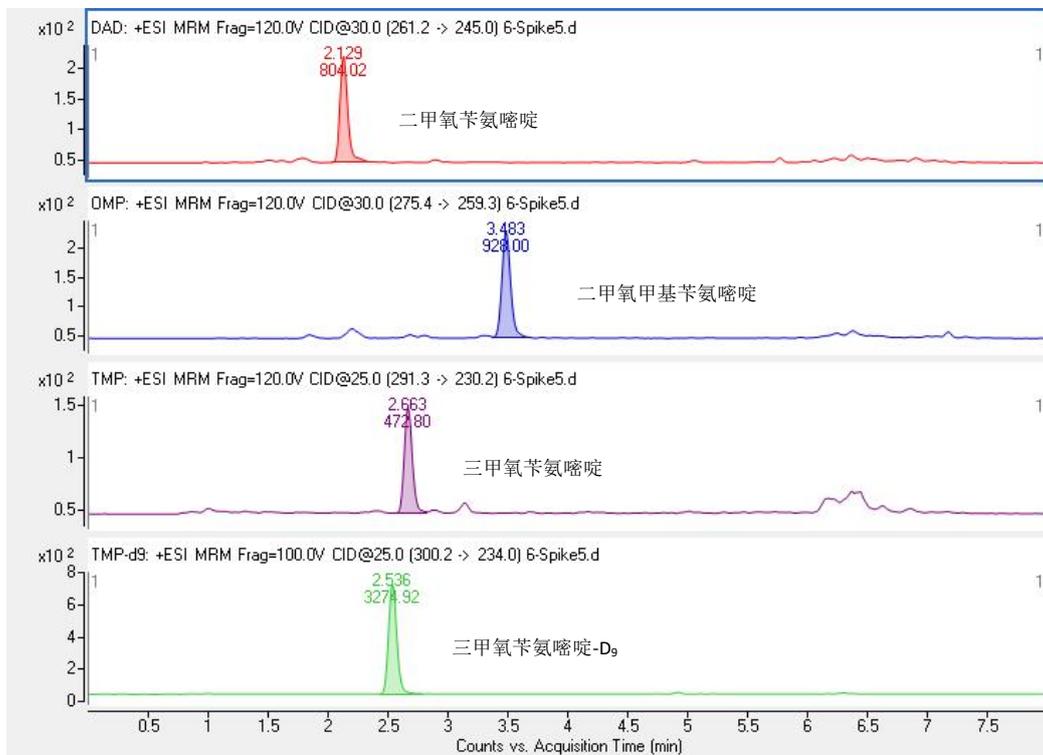


图43 肉牛精料补充料添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

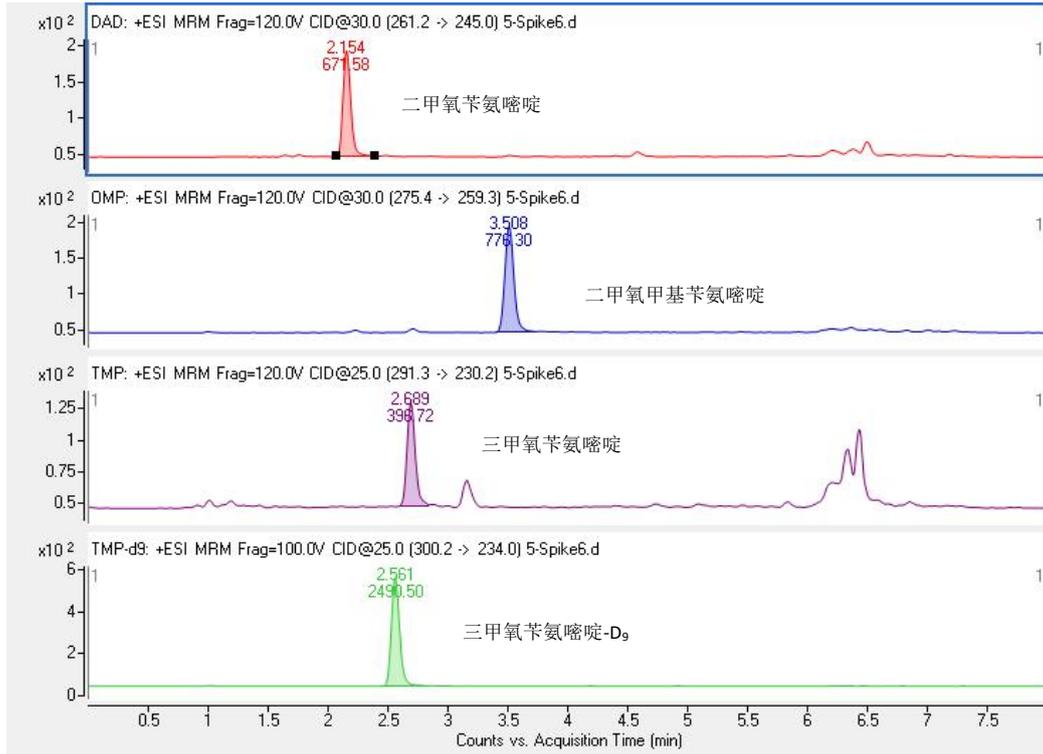


图44 禽用复合预混合饲料添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

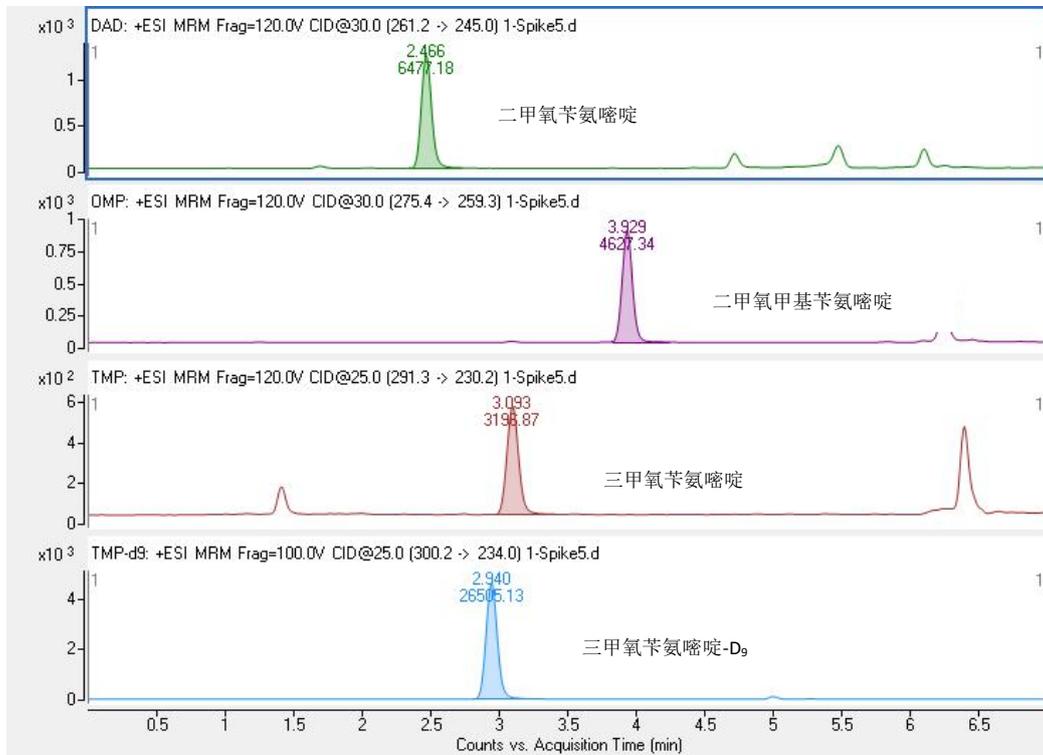


图45 鱼粉添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

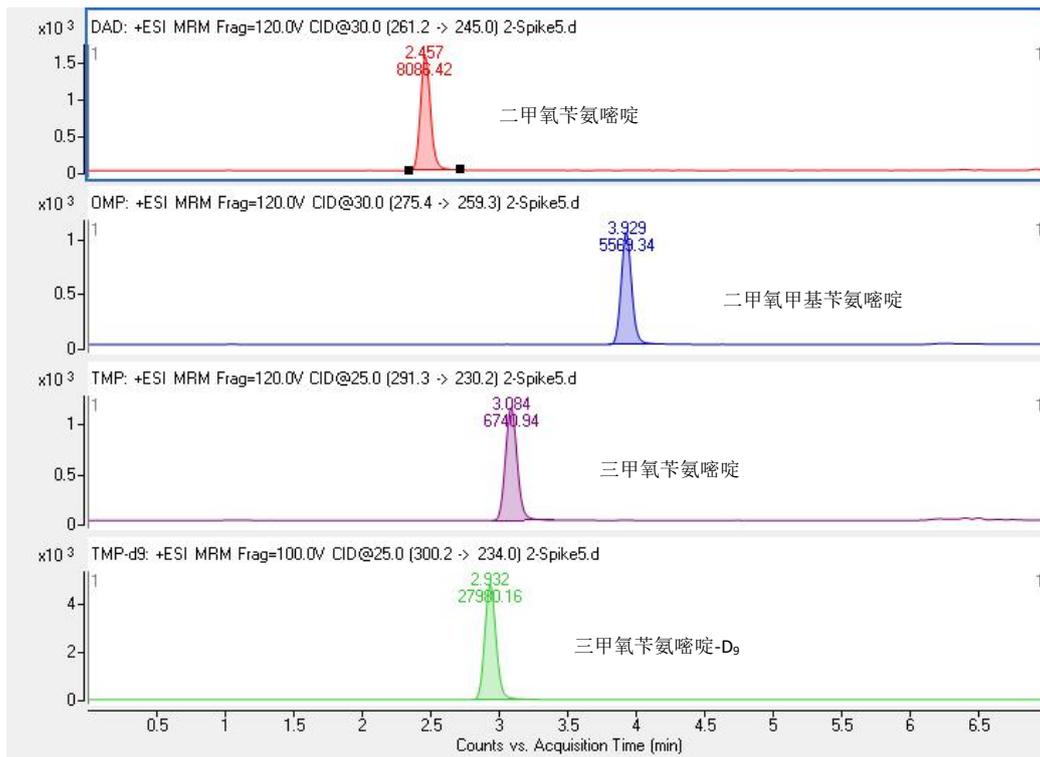


图46 鸡肉粉添加二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶特征离子色谱图

2.3.10 方法适用性考察

收集肉鸭配合饲料、肉鸡配合饲料、仔猪配合饲料、妊娠母猪配合饲料、黄颡鱼配合饲料、猫粮、乳猪浓缩饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼用复合预混合饲料等 11 种饲料产品，以及鸡肉粉、猪肉粉、鱼粉、大豆粕、DDGS 一级、麸皮、面粉、菜粕、玉米等 9 种饲料原料，按上述确定的样品提取和净化方法、色谱质谱条件，完成上述样品中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶方法适用性考察，结果见表 36~表 38。结果表明，三甲氧苄氨嘧啶在蛋鸡浓缩饲料、猫粮、鸡肉粉、猪肉粉中检出，且含量都在微克每千克水平。作为使用最为广泛的磺胺增效剂药物，动物体内普遍存在三甲氧苄氨嘧啶药物。液相色谱-串联质谱法属于高灵敏度检测方法，能够准确的测量出低含量的违禁药物，保障饲料原料及饲料产品的质量安全。菜粕属于植物性原

料，检出三甲氧苄氨嘧啶残留量表明不同原料间存在交叉污染的可能。因此有必要建立适用范围广的检测方法全面推进绿色饲料产业的发展。通过数据分析验证，本标准建立的液相色谱-串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和饲料原料中二甲氧苄氨嘧啶、二甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定。

表 36 饲料产品实际样品测定结果 (µg/kg)

No.	化合物	肉鸭配合饲料	肉鸡配合饲料	小猪配合饲料	妊娠母猪配合饲料	鱼配合饲料	猫粮
1	二甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	4.63
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

表 37 饲料产品实际样品测定结果 (µg/kg)

No.	化合物	蛋鸡浓缩饲料	乳猪浓缩饲料	肉牛精料补充料	禽用复合预混合饲料	鱼用复合预混合饲料
1	二甲氧苄氨嘧啶	3.65	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	53.7	未检出	未检出	未检出	未检出
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

表 38 饲料原料实际样品测定结果 (µg/kg)

No.	化合物	鸡肉粉	猪肉粉	鱼粉	大豆粕	DDGS一级	麸皮	面粉	菜粕	玉米
1	二甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	19.2	76.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	12.1	未检出
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

2.3.11 精密度

液相色谱-串联质谱仪具有高效、高灵敏度、高选择性等特点，但受基质效应干扰明显等缺陷也还需解决。饲料样品种类繁多，添加的各种化学物质范围广，本试验部分仅对常见的饲料原料及饲料产品进行了验证。因此不同基质样品类型的检测会出现不同程度的偏差。依据本试验测定的回收率、精密度，并参照国内外相关液相色谱串联质谱仪检测标准，最终将本标准精密度规定如下：

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%。

2.4 高效液相色谱法

2.4.1 液相色谱条件确定

2.4.1.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器在 190 nm ~ 400 nm 波长扫描得到二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶色谱峰的光谱图，如图 47。结果表明，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶在波长 230 nm 均有较大吸收峰，因此，确定检测波长为 230 nm。

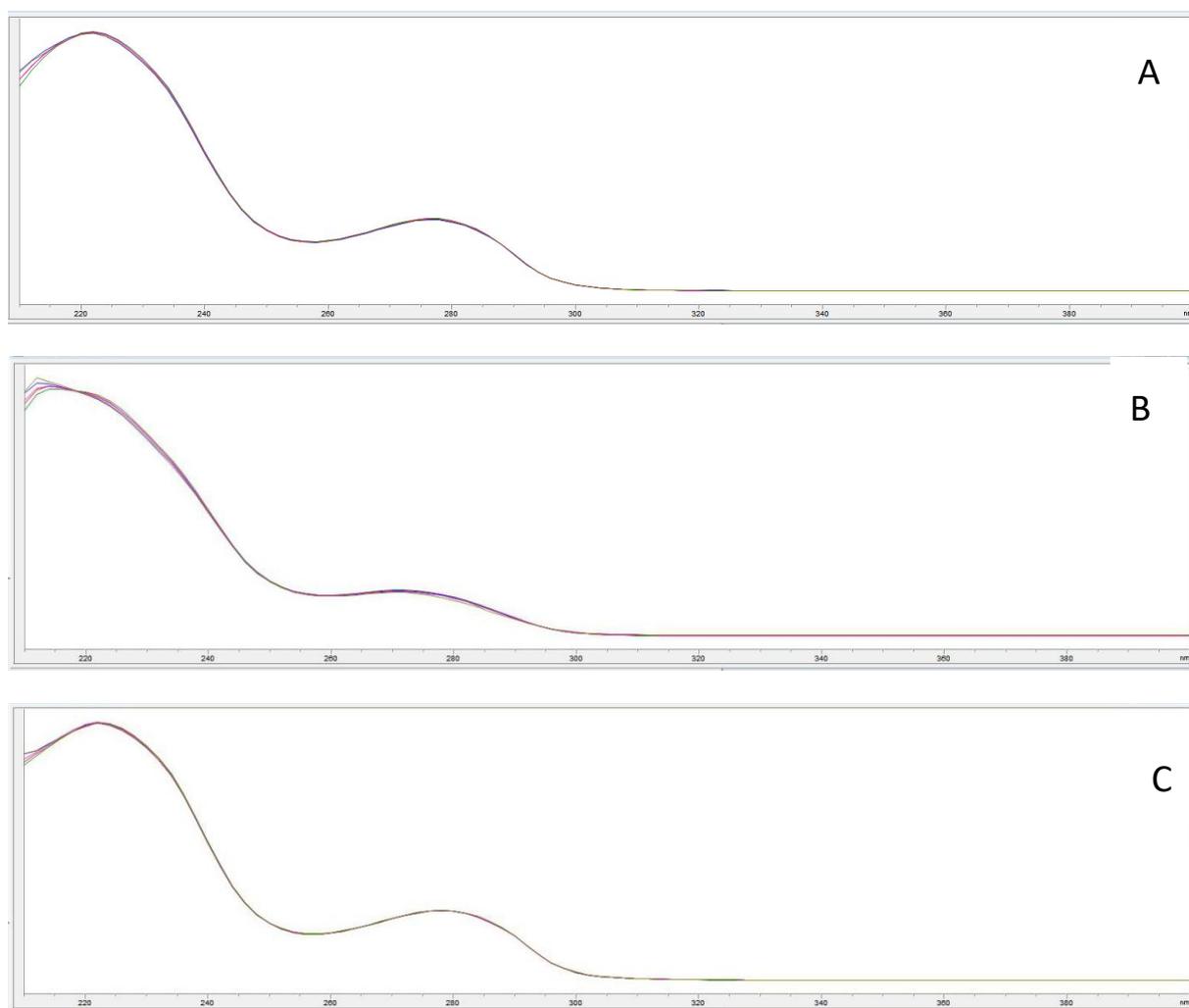


图47 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准溶液光谱图

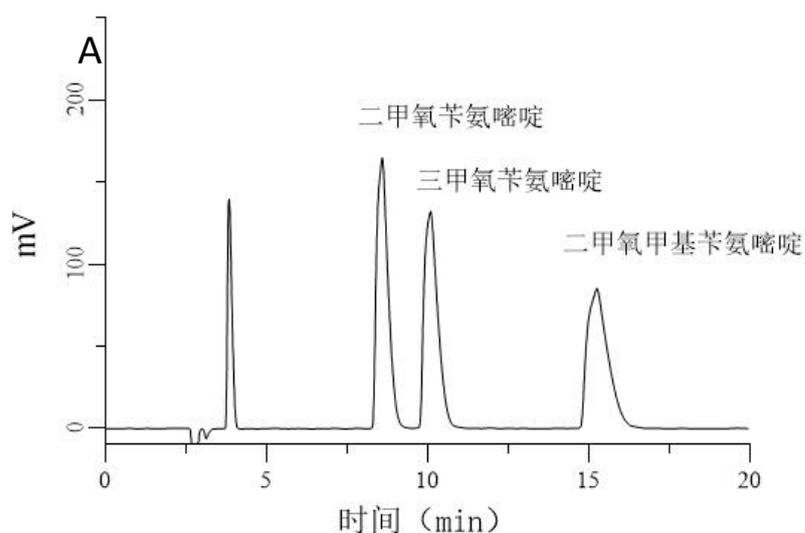
注：A. 二甲氧苄氨嘧啶；B. 三甲氧苄氨嘧啶；C. 二甲氧甲基苄氨嘧啶

2.4.1.2 流动相的考察

分别考察了三种流动相对二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶峰形的影响，结果见表 39 和图 48。结果表明，0.1%甲酸水溶液和 0.5%乙酸水溶液作为流动相使用时目标峰拖尾，峰展宽。0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液作为水相时，基线平稳，峰形对称，分离良好，可排除杂质的干扰。因此，选择甲醇：0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液=25:75 作为流动相。

表 39 流动相考察条件

色谱条件	流动相成分	流动相体积比	流速 (mL/min)
流动相 1	甲醇：0.1%甲酸水溶液	25:75	1.0
流动相 2	甲醇：0.5%乙酸水溶液	25:75	1.0
流动相 3	甲醇：0.05mol/L 磷酸二氢钾水溶液	25:75	1.0



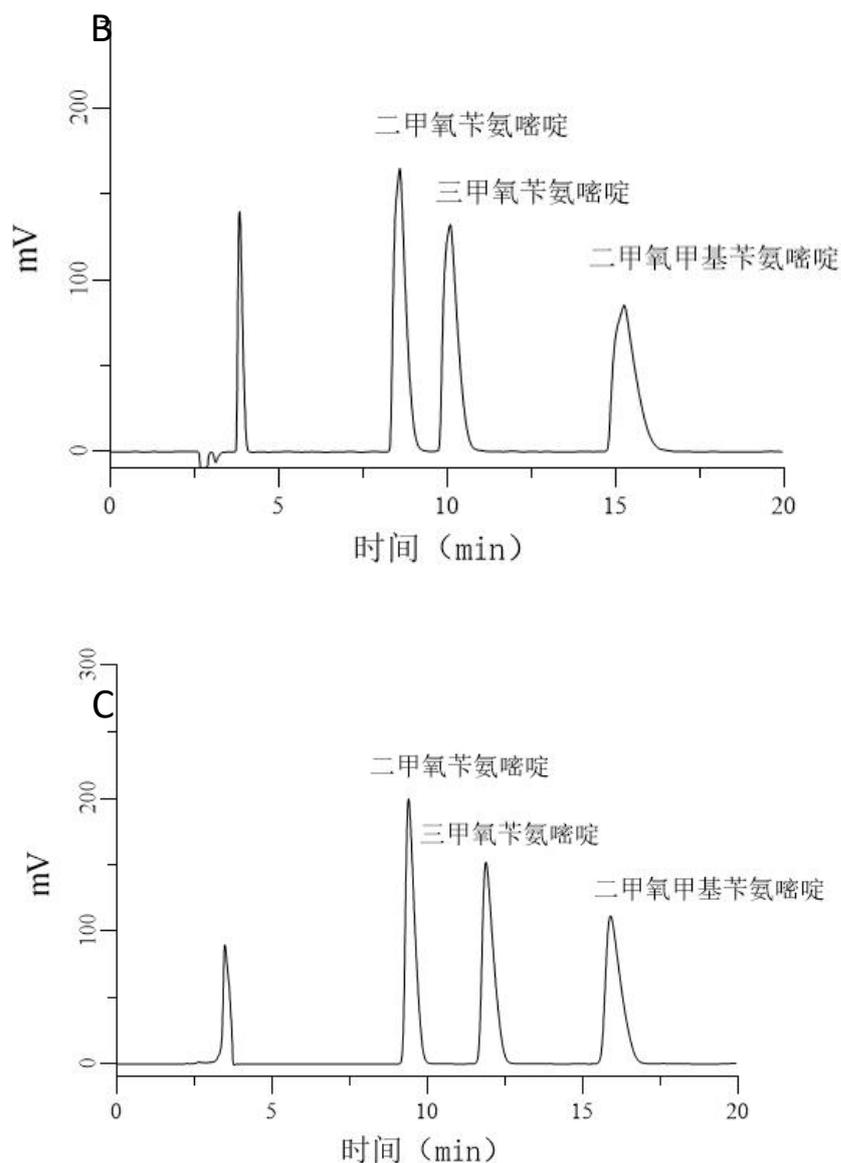
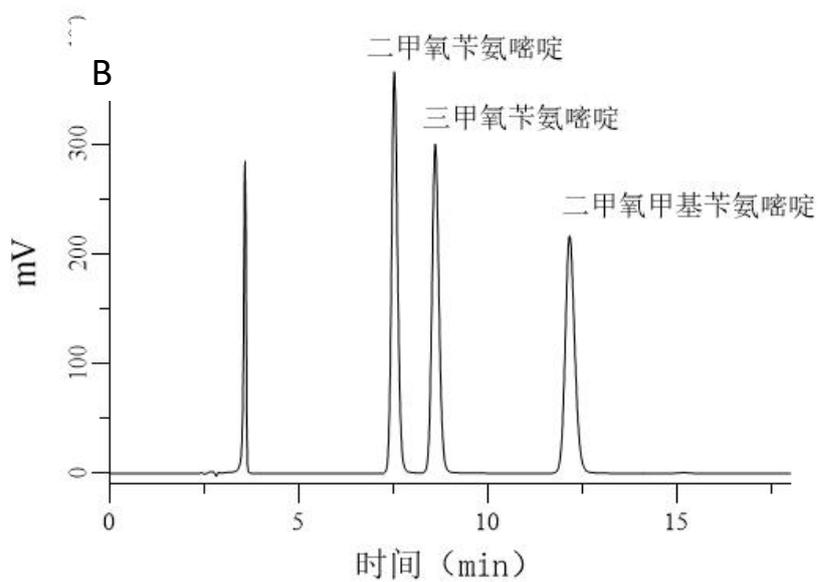
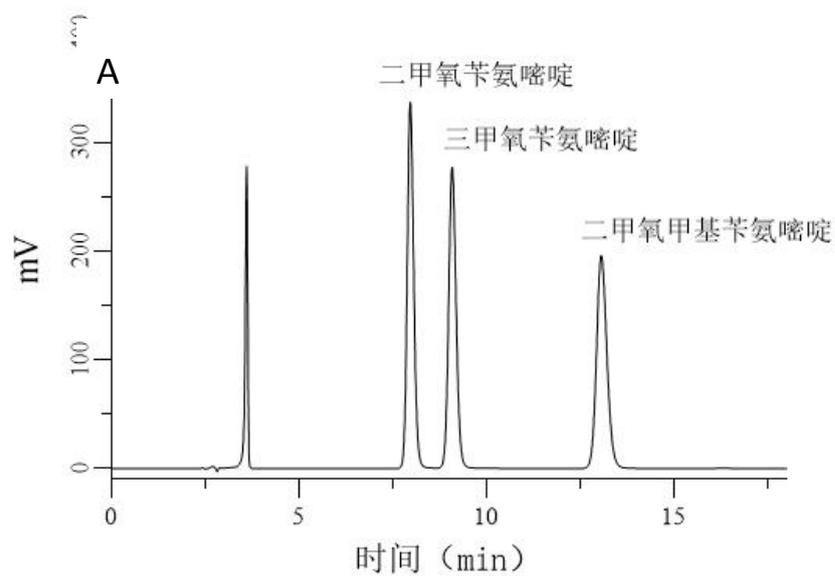


图48 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准溶液不同流动相色谱图
注：A. 流动相 1；B. 流动相 2；C. 流动相 3

2.4.1.3 色谱柱温度的考察

色谱柱温度对溶剂的溶解能力、色谱柱的性能、流动相的粘度都有一定的影响。分别考察色谱柱温度为 25 °C、30 °C、35 °C和 40 °C时二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶液相色谱峰形和分离情况，结果见图 49。考察结果表明，随着色谱柱温度的升高，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的保留时间缩短。在以上条件中，

目标化合物均峰形对称，满足试验要求，低温有利于延长色谱柱使用寿命，考虑夏天时不易把温度控制 25 °C，因此，色谱柱温度确定为 30°C。



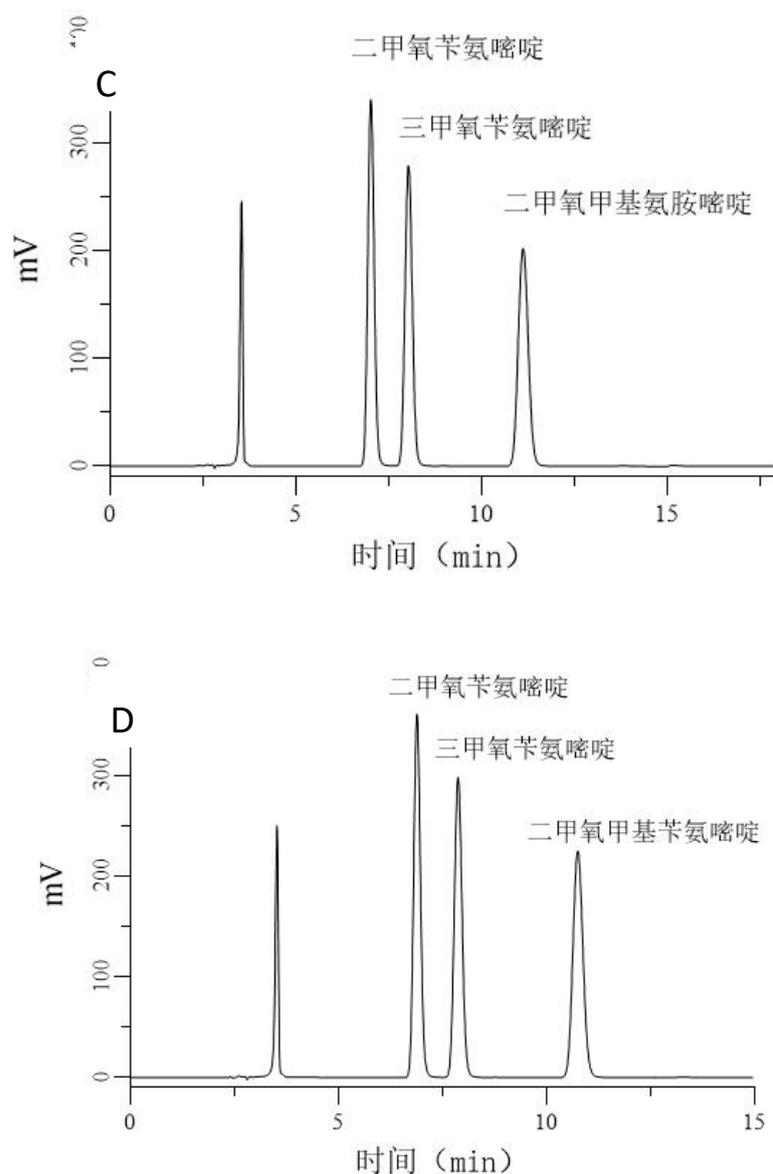


图49 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准溶液不同柱温色谱图
注：A. 25°C；B. 30°C；C. 35°C；D. 40°C

2.4.1.4 色谱柱的选择

由于二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶均为极性化合物，本方法采用实验室反相色谱中最为常用的柱长 250 mm、内径 4.6 mm、粒径 5 μm 规格 C_{18} 色谱柱进行色谱柱考察。流动相为“甲醇+0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液=25+75”，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 230 nm，柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时，分别考察 Agilent、Shimadzu、Waters、Thermo 等厂家 C_{18}

柱对目标化合物的保留情况，结果见图 50~图 53。

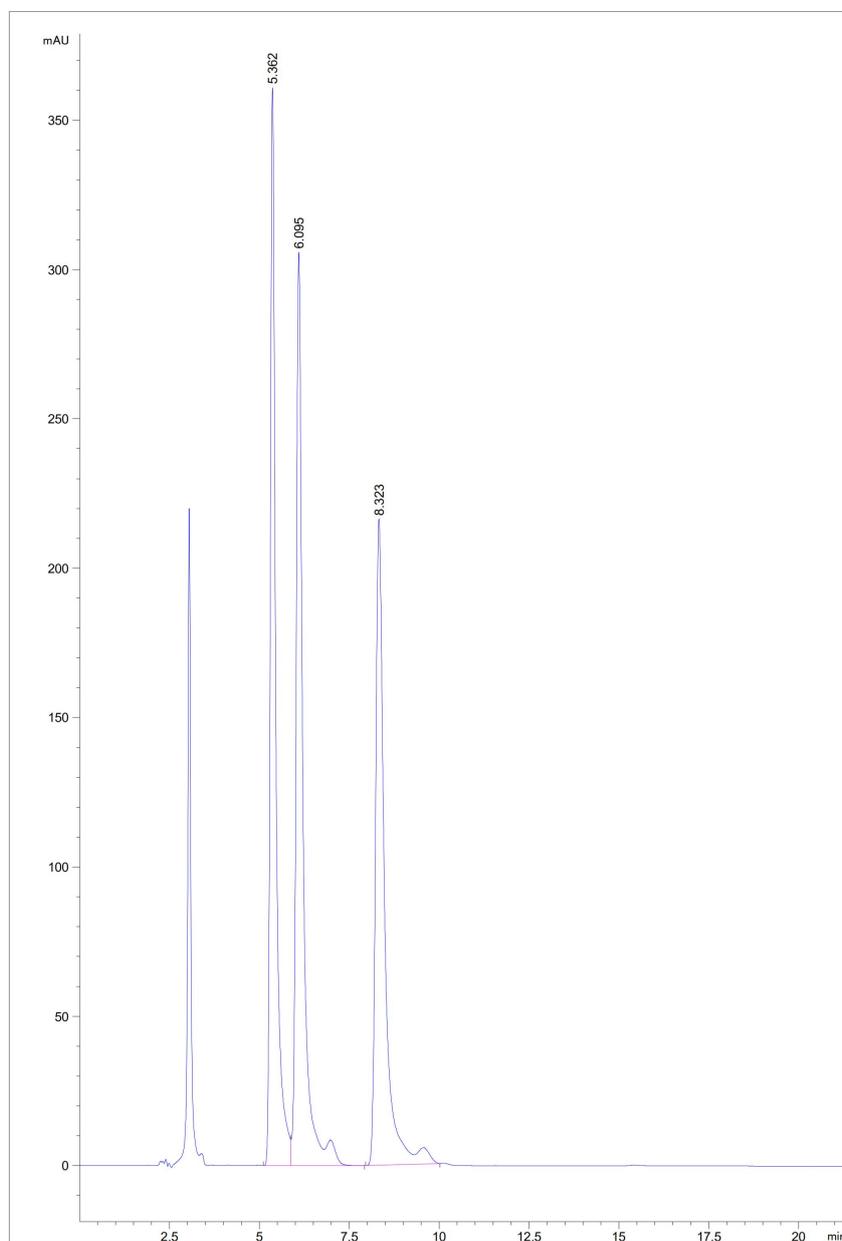


图 50 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶色谱图 (Agilent C₁₈)

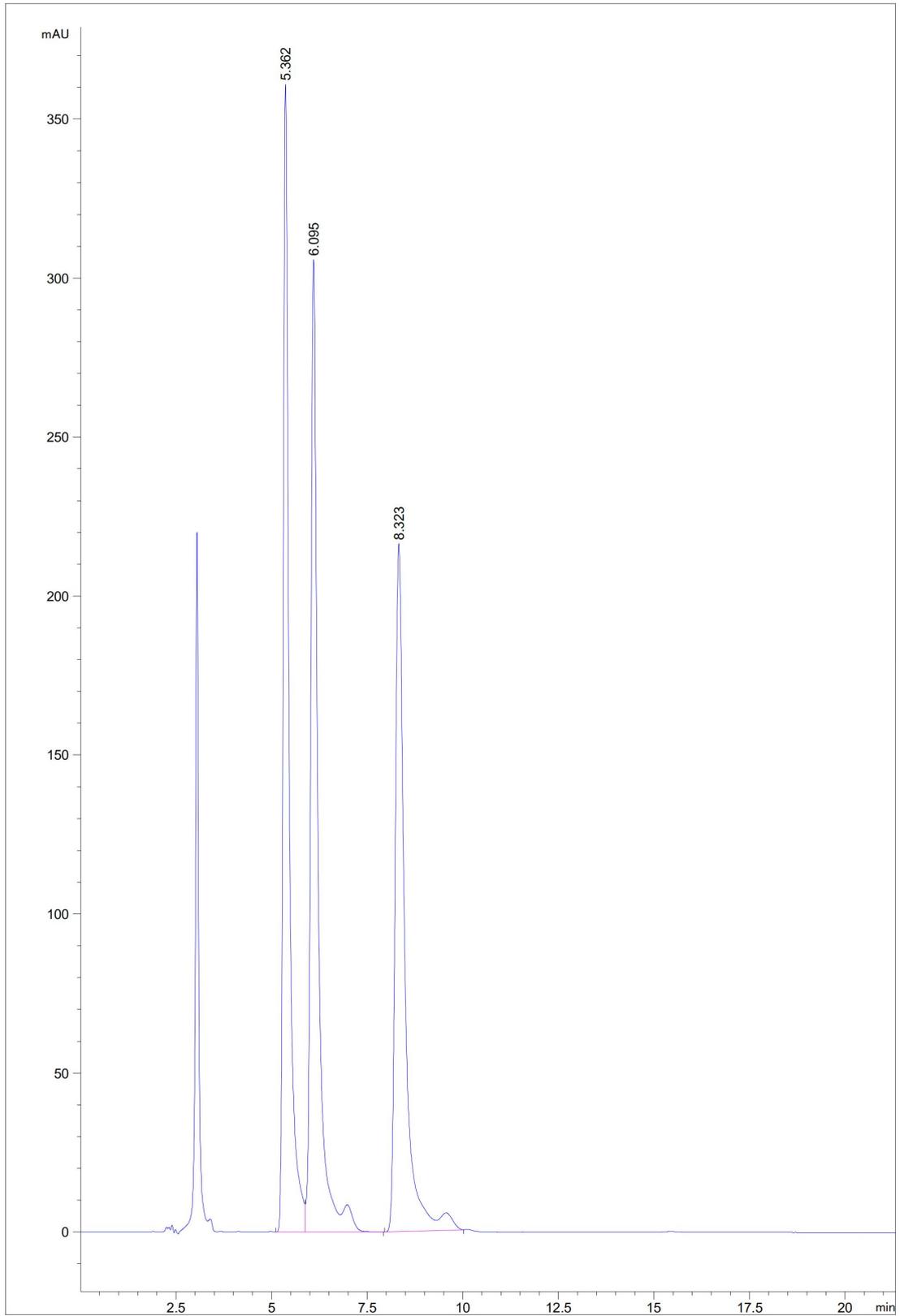


图 51 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶色谱图 (Shimadzu C₁₈)

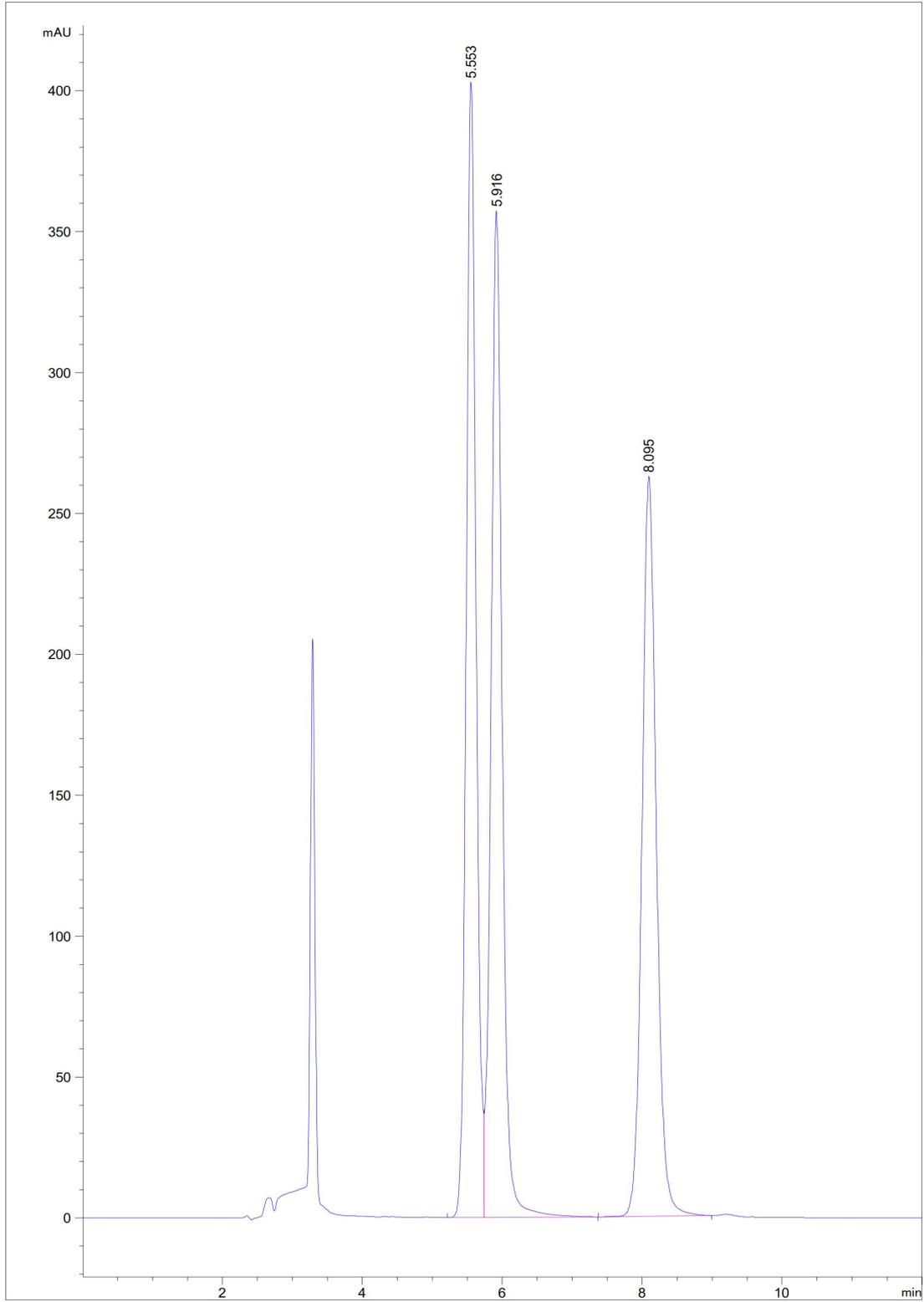


图 52 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶色谱图 (Waters C₁₈)

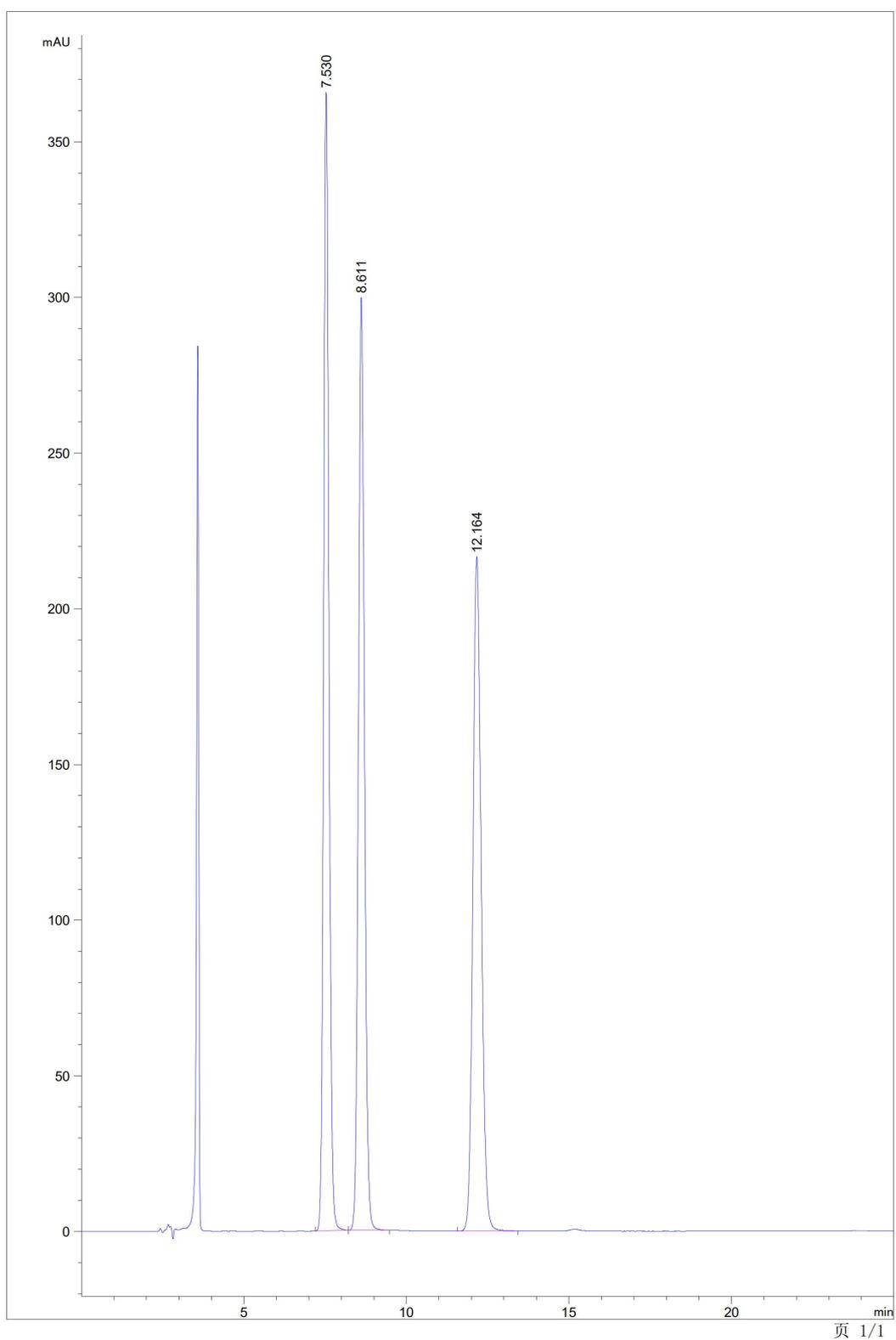


图 53 二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶色谱图 (Thermo C₁₈)

结果表明，四个厂家 C₁₈ 色谱柱得到的目标化合物色谱峰均峰形对称，满足试验要求。因此，方法选择 C₁₈ 柱（柱长 250mm，内径 4.6mm，粒径 5 μ m）或等效色谱柱。

液相色谱参考条件为：

a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μ m，或性能相当者；

b) 流动相：A 相为甲醇（4.2.3），B 相为磷酸二氢钾溶液（4.2.16），A+B=25+75。

c) 柱温：30 °C；

d) 流速：1.0 mL/min；

e) 检测波长：230 nm；

f) 进样体积：20 μ L。

2.4.1.5 色谱条件的选择性、专属性和稳定性考察

在上述色谱条件下，考察不同浓度二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶标准工作溶液的保留时间、峰面积的精密度和稳定性，结果见表40~表42。结果表明，不同浓度二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶标准工作溶液保留时间的RSD值均小于1.88%，峰面积的RSD值均小于0.85%。结果表明，在所选择的色谱条件下，实际样品中的色谱图无其他杂质峰干扰，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的分离度、稳定性和专属性满足定性和定量测定要求，该方法选择性、专属性和稳定性高。

表40 二甲氧苄氨嘧啶标准溶液精密度试验

浓度 (µg/mL)	保留时间 (min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.13	12.683	12.504	12.358	12.267	12.196	12.150	1.64
0.26	12.108	12.079	12.063	12.042	12.008	11.988	0.37
0.53	11.963	11.95	11.933	11.921	11.917	11.908	0.18
1.06	11.896	11.896	11.883	11.883	11.883	11.888	0.05
2.13	11.883	11.888	11.892	11.888	11.892	11.888	0.03
4.26	13.138	12.879	12.846	12.821	12.825	12.800	0.98
浓度 (mg/mL)	峰面积 (mAU*min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.13	0.2238	0.2245	0.227	0.2281	0.2241	0.2239	0.82
0.26	0.4155	0.4151	0.415	0.4148	0.418	0.4177	0.35
0.53	0.8732	0.896	0.8845	0.8877	0.8874	0.8893	0.85
1.06	1.7283	1.7453	1.7373	1.7452	1.7344	1.7503	0.47
2.13	3.526	3.5378	3.5286	3.5337	3.5346	3.5373	0.13
4.26	7.1418	7.1243	7.1306	7.1310	7.1247	7.145	0.12

表41 三甲氧苄氨嘧啶标准溶液精密度试验

浓度 (µg/mL)	保留时间 (min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.15	15.188	15.008	14.846	14.733	14.667	14.617	1.48
0.30	14.571	14.533	14.521	14.496	14.454	14.433	0.35
0.60	14.408	14.383	14.368	14.358	14.35	14.342	0.17
1.20	14.329	14.325	14.317	14.313	14.317	14.313	0.05
2.40	14.313	14.317	14.321	14.313	14.321	14.313	0.03
4.80	15.754	15.413	15.375	15.358	15.358	15.329	1.04
浓度 (mg/mL)	峰面积 (mAU*min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.15	0.2023	0.2017	0.2026	0.2016	0.2027	0.203	0.28
0.30	0.3839	0.3853	0.3845	0.3809	0.3784	0.3837	0.68
0.60	0.8026	0.7912	0.7934	0.7987	0.7919	0.7894	0.64
1.20	1.5669	1.5636	1.562	1.5657	1.5662	1.5687	0.15
2.40	3.1633	3.1652	3.1661	3.1647	3.1637	3.1605	0.06
4.80	6.3978	6.3832	6.3775	6.3891	6.3888	6.3949	0.12

表42 二甲氧甲基苄氨嘧啶标准溶液精密度试验

浓度 (μg/mL)	保留时间 (min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.14	23.246	22.854	22.583	22.342	22.233	22.129	1.88
0.28	22.054	21.988	21.963	21.908	21.838	21.796	0.44
0.56	21.75	21.704	21.683	21.663	21.646	21.633	0.20
1.12	21.608	21.592	21.579	21.575	21.588	21.579	0.06
2.24	21.583	21.583	21.596	21.588	21.600	21.588	0.03
4.48	24.238	23.692	23.65	23.625	23.608	23.563	1.07
浓度 (mg/mL)	峰面积 (mAU*min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.14	0.2235	0.2236	0.2251	0.2238	0.2215	0.2262	0.71
0.28	0.4027	0.4067	0.4059	0.4056	0.4107	0.4082	0.66
0.56	0.8751	0.8823	0.8775	0.8623	0.869	0.8731	0.80
1.12	1.7188	1.7218	1.7219	1.7262	1.7221	1.7193	0.15
2.24	3.5091	3.5213	3.518	3.5091	3.5181	3.5216	0.16
4.48	7.1769	7.146	7.1611	7.1784	7.1535	7.162	0.18

2.4.2 样品提取和净化方法和条件确定

样品提取和净化条件的选择和优化同“液相色谱-串联质谱法”，最终确定的样品提取和净化方法和条件如下：

(1) 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确至 0.000 1 g)，置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙酸钠溶液、0.5 mL 氨水，涡旋混合 2 min，准确加入 10 mL 乙酸乙酯，涡旋混合 2 min 后超声提取 10 min，每隔 5 min 混合样品 1 次，于 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min，上清液移至另一 50 mL 离心管中，残渣用 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次，合并上清液。准确移取上清液 10 mL，于 50 °C 下氮气吹干，准确加入 6 mL 乙腈-5% 乙酸溶液溶解残渣，涡旋混合 30 s，再加入 6 mL 乙腈饱和正己烷溶液，涡旋混合 30 s 后于 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min，弃去上层乙腈饱和正己烷，下层溶液备用。

注：若提取液乳化严重，可弃去上层乙腈饱和正己烷溶液后，再次用 3 mL 乙腈-正己烷饱和溶液重复除脂。

(2) 净化

MCX 小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 乙腈-5%乙酸溶液活化，准确加入 3 mL 备用液全部过柱。用 3 mL 乙腈-5%乙酸溶液、3 mL 甲醇淋洗，抽干后加入 5 mL 8%氨水甲醇溶液洗脱，收集洗脱液于 10 mL 氮吹管中，于 50 °C 下氮气吹干，准确加入 1 mL 1%乙酸溶液溶解残渣，用微孔滤膜过滤，待测。

2.4.3 标准储备溶液有效期的确定

为确保检测方法的准确性，依据目标化合物理化性质，对其标准储备溶液稳定性进行验证。分别在 0 天、1 个月、2 个月、3 个月将目标化合物配制成 1.00 mg/mL 标准储备溶液，于 2 °C~8 °C 贮存。于 1 个月、2 个月、3 个月取出标准储备溶液稀释至 10.0 µg/mL，同时新配标准储备溶液，配制系列标准溶液，用液相色谱仪测定浓度，连续进样 6 次，考察其稳定性，结果见表 43。

表 43 标准储备溶液稳定性试验结果

测试时间	二甲氧苄氨嘧啶 (mg/mL)	三甲氧苄氨嘧啶 (mg/mL)	二甲氧甲基苄氨嘧啶 (mg/mL)
0 天	1.00	1.00	1.00
1 个月	1.00	0.99	1.00
2 个月	0.99	0.99	0.98
3 个月	0.98	0.98	0.97

结果表明，当测试时间为 3 个月时，待测物峰面积稳定，无明显降解

和变化。因此为保证标准溶液稳定性，减少测试误差，并参照 GB/T 27404—2008 中的“标准溶液参考有效期”的要求，最终确定：1.00 mg/mL 标准储备溶液 2 °C ~ 8 °C 贮存，有效期 3 个月。

2.4.4 方法学考察

2.4.4.1 线性范围

准确移取二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶标准储备溶液适量，用 1%冰乙酸溶液逐级稀释成浓度为 0.1 µg/mL、0.2 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg/mL、10.0 µg/mL 混合标准系列溶液，供高效液相色谱仪测定，临用现配。以标准溶液中待测组分的色谱峰面积为纵坐标，以待测组分的浓度为横坐标，绘制标准曲线，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶线性范围、回归方程及相关系数 (r^2) 结果见表 44。结果表明，待测物在 0.1 µg/mL ~ 10.0 µg/mL 浓度范围内线性关系良好。

表44 标准曲线线性范围、回归方程及相关系数 (r^2)

No.	化合物	线性范围 (µg/mL)	回归方程	r^2
1	二甲氧苄氨嘧啶	0.1 ~ 10.0	$y = 108330x - 4135.72$	0.9999
2	三甲氧苄氨嘧啶	0.1 ~ 10.0	$y = 104822x - 5611.86$	0.9999
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	0.1 ~ 10.0	$y = 112716x - 5441.25$	0.9999

2.4.4.2 定性和定量测定

在仪器的最佳条件下，分别取二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶混合标准系列溶液和试样溶液上机测定。

定性测定 以保留时间定性，试样溶液中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中二

甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

定量测定 以二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用1%乙酸溶液稀释后，重新测定。

在上述色谱条件下，二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的标准溶液液相色谱图见图 54。

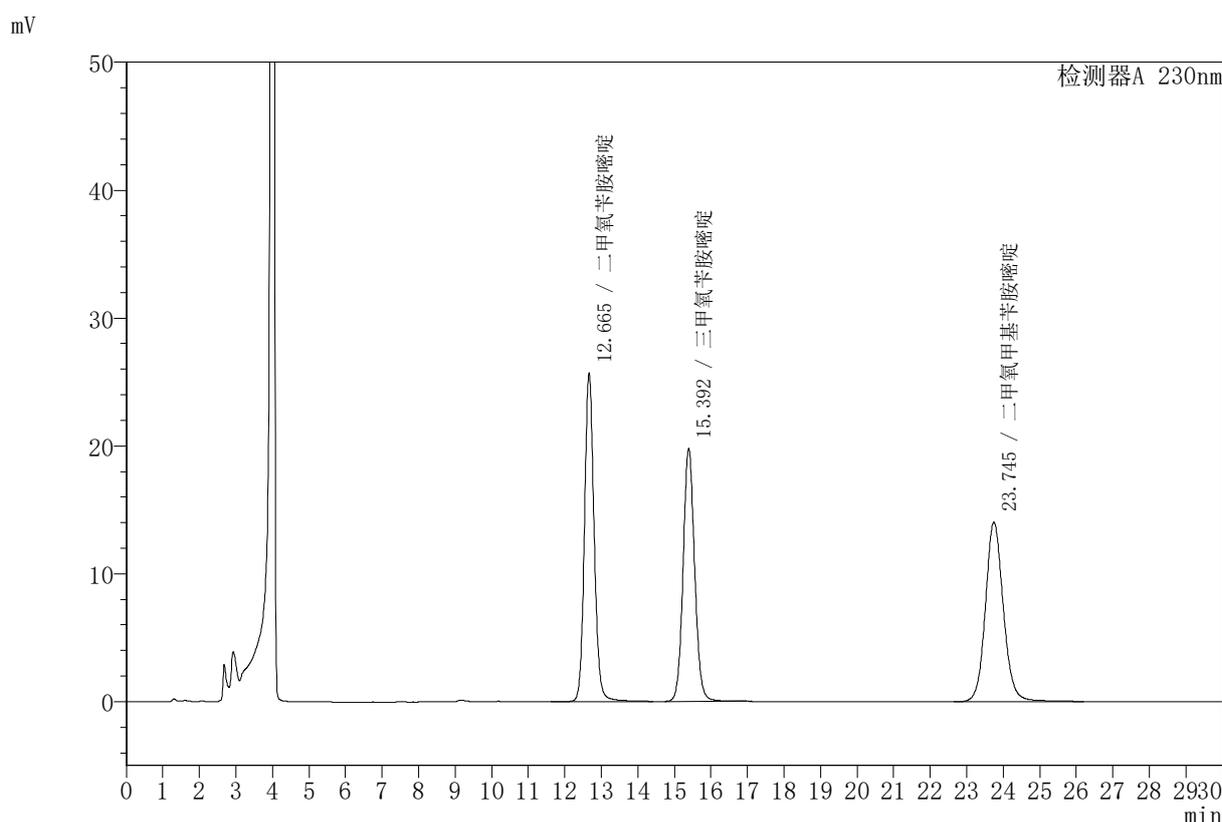


图 54 目标化合物标准溶液液相色谱图

2.4.4.3 方法检出限和灵敏度

将仪器条件优化至最佳，确定方法的检出限和定量限，具体操作如下：
添加适量标准溶液于空白样品中，按照上述确定的方法和条件处理后

供高效液相色谱仪测定，目标化合物峰高为 0.730mAU，信噪比为 0.075。
依据分析物信噪比 $S/N > 3$ ，确定方法检出限为 0.25 mg/kg，依据分析物信噪比 $S/N > 10$ ，确定方法定量限为 0.5 mg/kg。

根据信噪比计算得到的定量限进行空白基质加标试验，结果见表 45~
表 51。

表 45 黄颡鱼配合饲料定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	98.7	101.0	101.7	99.3	103.2	100.7	100.8	1.61	6.22
		II	91.7	99.9	101.6	104.5	98.5	106.7	100.5	5.21	
		III	96.6	109.3	106.2	119.5	113.8	102.7	108.0	7.53	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	85.3	94.7	94.8	94.3	97.4	94.3	93.5	4.46	5.73
		II	101.5	104.0	107.1	103.6	104.5	109.0	105.0	2.53	
		III	98.9	95.8	97.5	100.1	102.3	101.7	99.4	2.52	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	111.0	112.1	108.5	106.6	115.2	109.0	110.4	2.75	7.58
		II	93.9	92.7	95.9	92.3	94.6	91.0	93.4	1.86	
		III	98.9	101.5	102.1	104.9	103.0	110.9	103.5	3.98	

表 46 仔猪配合饲料定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	91.3	92.1	102.2	105.8	98.3	97.4	97.9	5.75	7.16
		II	86.1	97.6	97.4	97.6	97.7	101.4	96.3	5.44	
		III	112.8	98.7	109.4	104.1	108.8	111.6	107.6	4.90	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	93.2	95.3	100.4	105.7	99.7	96.8	98.5	4.50	10.94
		II	97.9	105.2	106.3	110.4	104.9	107.2	105.3	3.94	
		III	87.3	78.9	82.7	78.1	85.3	84.3	82.8	4.40	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	102.8	97.5	103.8	107.9	100.0	100.0	102.0	3.59	11.19
		II	88.6	103.0	105.3	98.8	100.4	109.1	100.9	6.97	
		III	82.5	78.7	81.9	80.4	81.4	84.6	81.6	2.42	

表 47 乳猪浓缩饲料定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.5	92.8	104.6	94.9	95.0	96.1	96.7	4.24	10.16
		II	79.7	76.3	77.7	84.6	91.4	70.8	80.1	8.89	
		III	84.1	87.5	92.4	96.0	97.9	81.8	89.9	7.24	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.6	96.9	106.1	99.1	99.7	100.7	100.3	3.06	8.20
		II	90.8	89.3	85.6	82.2	88.8	76.5	85.5	6.33	
		III	91.7	98.5	93.6	99.1	94.2	84.7	93.7	5.60	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	109.7	107.3	118.0	109.0	109.6	111.8	110.9	3.38	11.54
		II	88.2	88.2	92.0	84.2	92.8	77.7	87.2	6.44	
		III	101.9	103.6	97.9	88.4	98.2	87.3	96.2	7.12	

表 48 肉牛精料补充料定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	90.6	94.0	93.6	91.3	86.3	101.8	92.9	5.53	10.87
		II	98.7	99.8	95.3	87.8	86.6	94.5	93.8	5.85	
		III	68.6	88.3	77.8	70.2	79.2	80.5	77.5	9.34	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	96.9	104.0	99.8	95.5	94.3	101.0	98.6	3.73	13.06
		II	85.5	76.8	78.8	76.4	74.8	78.2	78.4	4.78	
		III	77.8	74.0	82.5	76.1	74.6	71.0	76.0	5.12	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	114.3	110.7	100.5	106.8	105.6	100.3	106.3	5.21	13.76
		II	93.7	78.5	86.7	85.5	77.4	93.5	85.9	8.15	
		III	86.8	86.3	87.3	75.6	80.9	73.1	81.6	7.55	

表 49 禽用复合预混合饲料定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	95.3	102.7	104.9	101.4	98.9	98.6	100.3	3.39	12.24
		II	82.5	82.8	76.5	78.2	82.2	79.9	80.3	3.23	
		III	78.4	79.7	73.3	79.2	82.3	77.2	78.4	3.81	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	96.0	95.9	88.9	94.6	87.2	82.2	90.8	6.17	11.39
		II	82.6	90.0	80.9	80.2	80.8	79.2	82.3	4.81	
		III	72.0	74.3	64.1	75.4	70.8	71.1	71.3	5.57	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	89.9	89.1	89.7	88.0	76.1	79.5	85.4	7.04	9.64
		II	74.8	73.6	68.0	69.0	83.0	72.7	73.5	7.28	
		III	76.2	86.7	77.6	76.3	69.4	71.1	76.2	7.96	

表 50 鱼粉定量限加标回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	97.5	92.4	92.0	94.2	90.0	86.6	92.1	4.04	8.43
		II	107.8	85.7	92.5	101.8	98.5	92.3	96.4	8.18	
		III	83.2	84.9	75.3	87.4	88.1	82.8	83.6	5.51	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	97.0	95.1	89.8	91.1	89.6	93.7	92.7	3.27	10.88
		II	88.2	90.0	86.5	95.5	100.7	87.3	91.4	6.10	
		III	70.7	72.3	70.2	74.6	84.1	78.6	75.1	7.15	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	95.5	86.6	85.2	85.5	89.8	89.3	88.6	4.37	6.00
		II	81.2	88.3	96.5	94.9	92.4	89.7	90.5	6.07	
		III	82.3	77.7	91.7	87.9	92.1	81.4	85.5	6.91	

表 51 鸡肉粉定量限加标回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	97.5	92.4	92.0	94.2	90.0	86.6	92.1	4.04	5.68
		II	107.8	85.7	92.5	101.8	98.5	92.3	96.4	8.18	
		III	83.2	84.9	75.3	87.4	88.1	82.8	83.6	5.51	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	90.2	87.6	93.0	97.0	99.3	88.8	92.7	5.05	6.49
		II	95.1	90.0	91.4	91.9	89.1	87.1	90.8	3.01	
		III	84.5	81.3	77.7	81.8	82.4	85.0	82.1	3.19	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	88.3	87.3	92.2	94.0	84.3	85.9	88.7	4.20	5.89
		II	101.1	96.8	97.1	97.1	94.9	93.2	96.7	2.72	
		III	82.8	93.8	91.6	92.4	102.5	89.6	92.1	6.94	

结果表明，二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 77.5 % ~ 108.0 %，批内变异系数为 1.61 % ~ 9.34 %，批间变异系数为 5.68 % ~ 12.24 %；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 71.3 % ~ 105.3 %，批内变异系数为 2.52 % ~ 7.15 %，批间变异系数为 5.73 % ~ 13.06 %；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为 73.5 % ~ 110.9 %，批内变异系数为 1.86 % ~ 8.15 %，批间变异系数为 5.89 % ~ 13.76 %，满足二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶含量的测定。

图 55 ~ 图 68 列出了黄颡鱼配合饲料、仔猪配合饲料、乳猪浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼粉、鸡肉粉在空白和定量限加标时的液相色谱图。

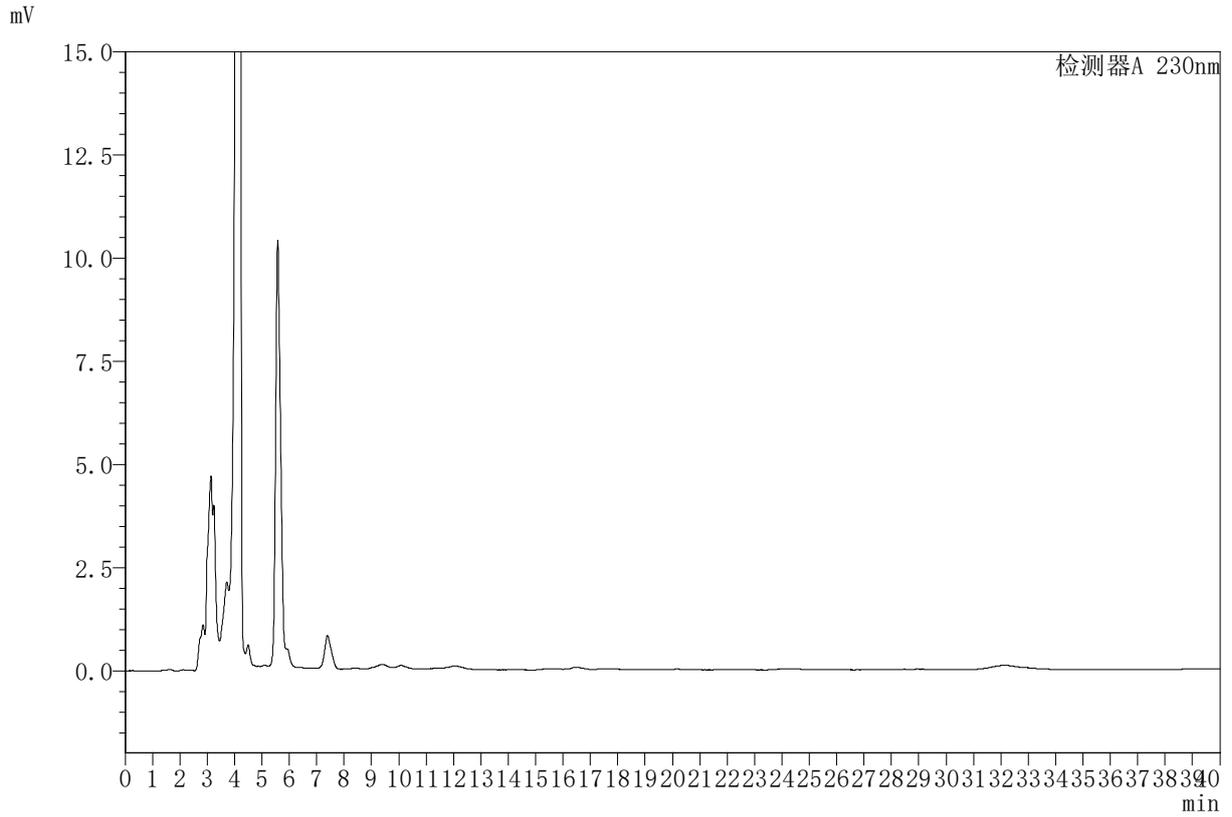


图55 空白黄颡鱼配合饲料目标化合物液相色谱图

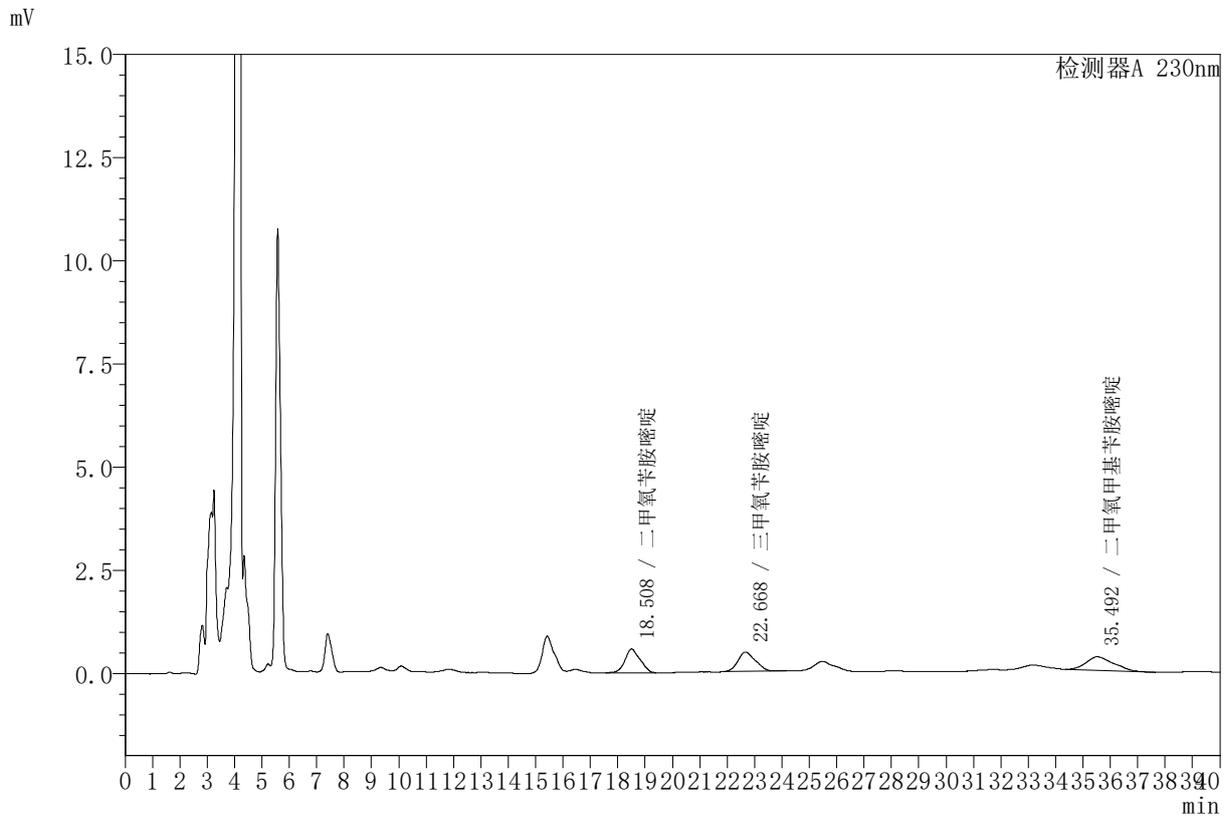


图56 添加浓度为0.5 mg/kg黄颡鱼配合饲料目标化合物液相色谱图

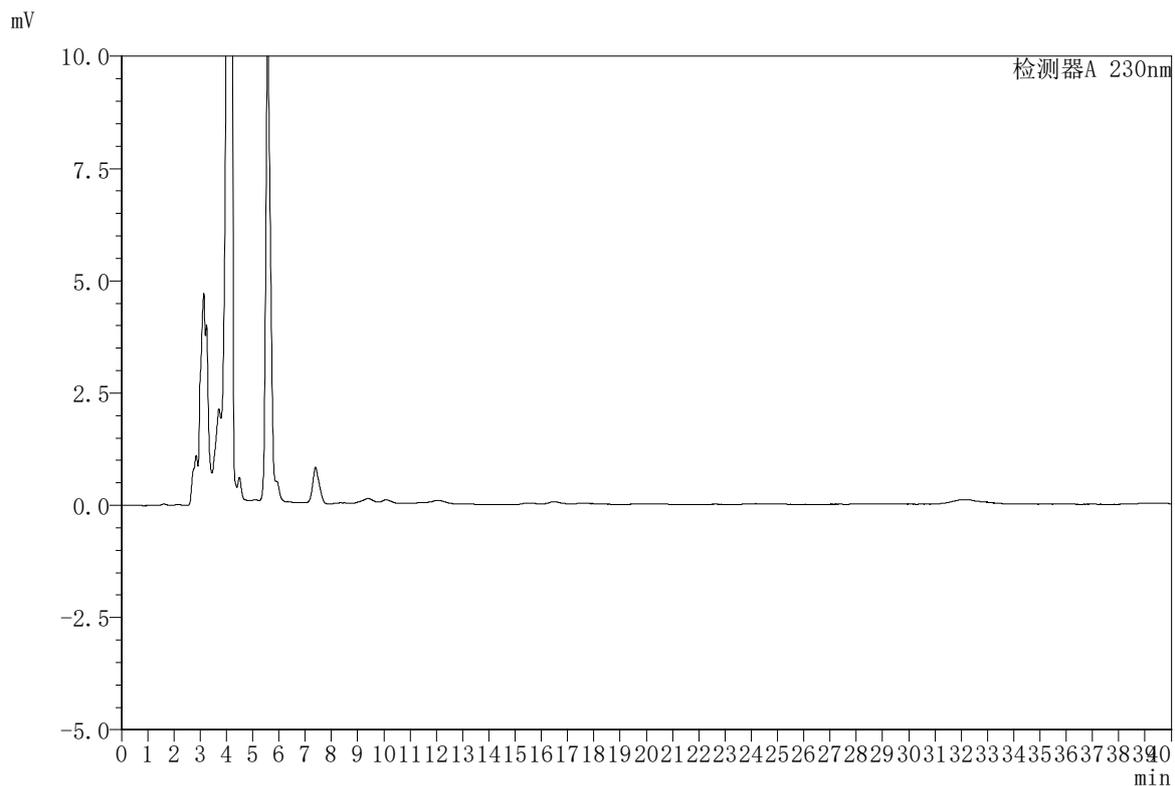


图57 空白仔猪配合饲料目标化合物液相色谱图

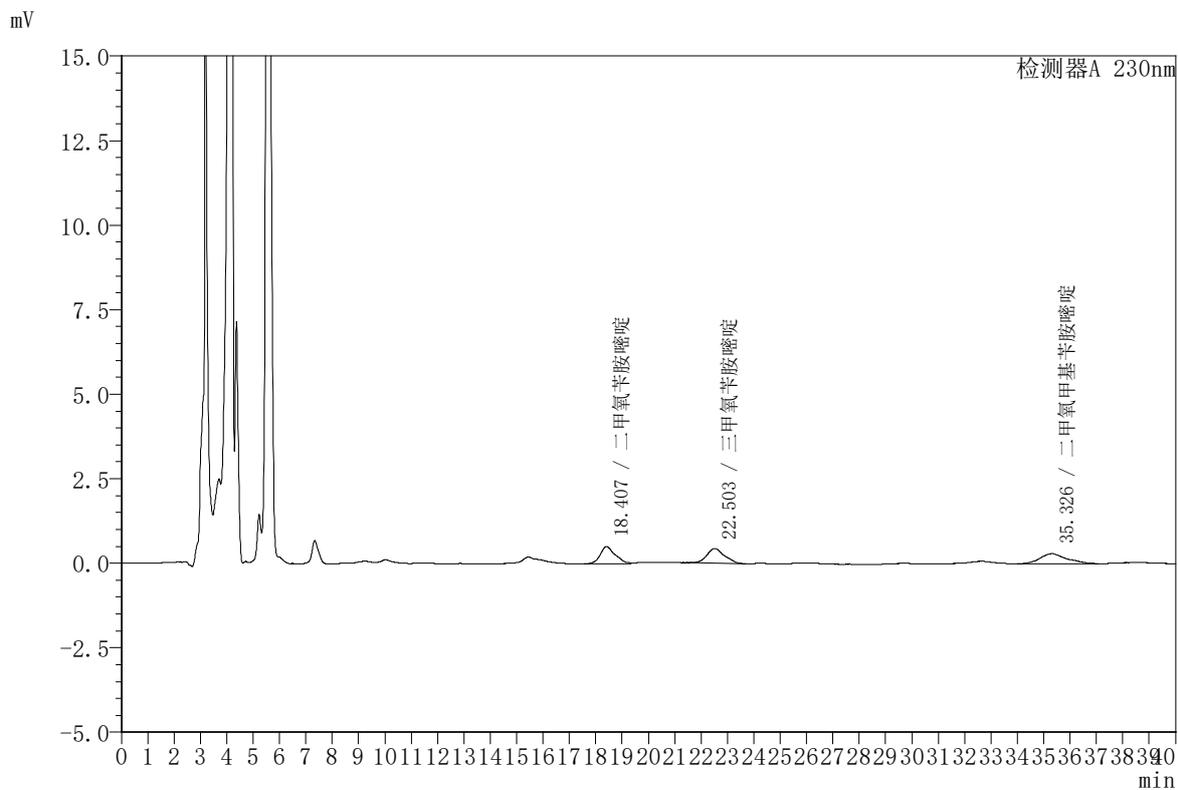


图58 添加浓度为0.5 mg/kg仔猪配合饲料目标化合物液相色谱图

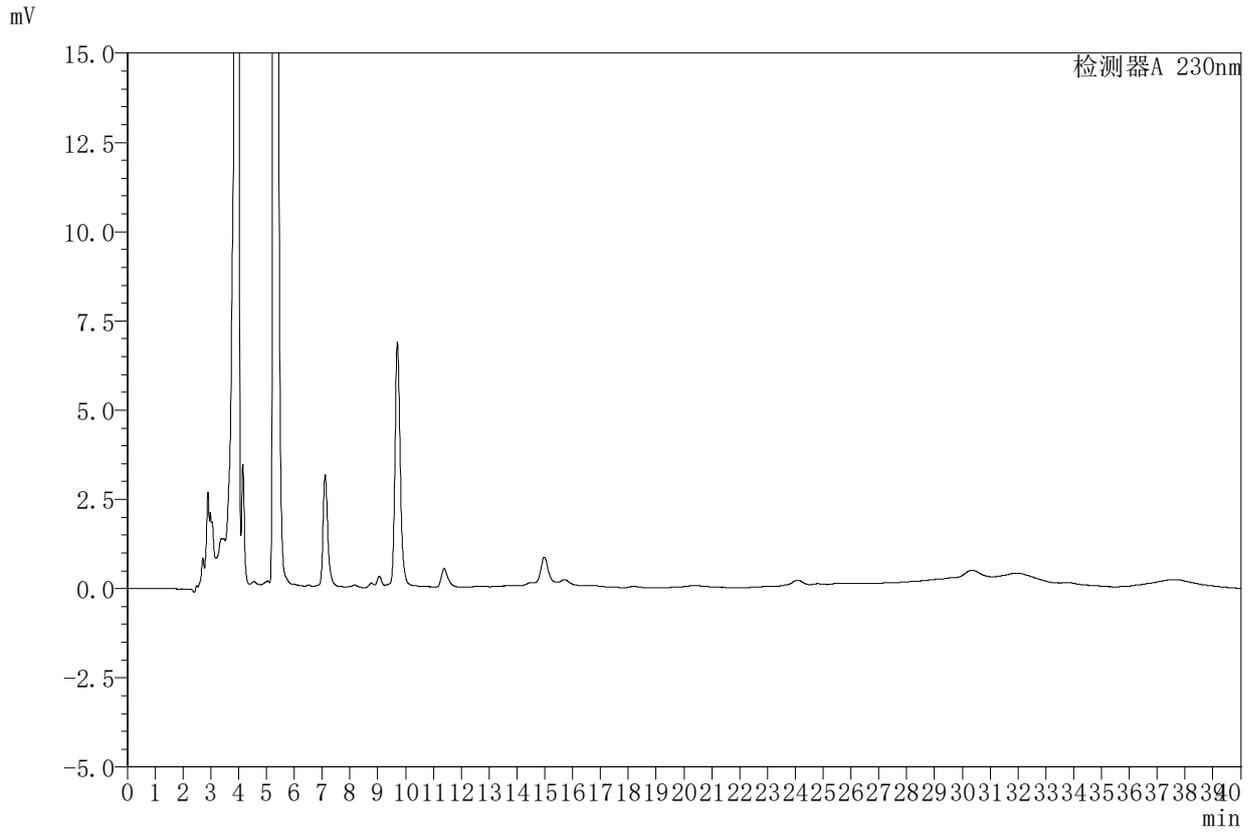


图59 空白乳猪浓缩饲料目标化合物液相色谱图

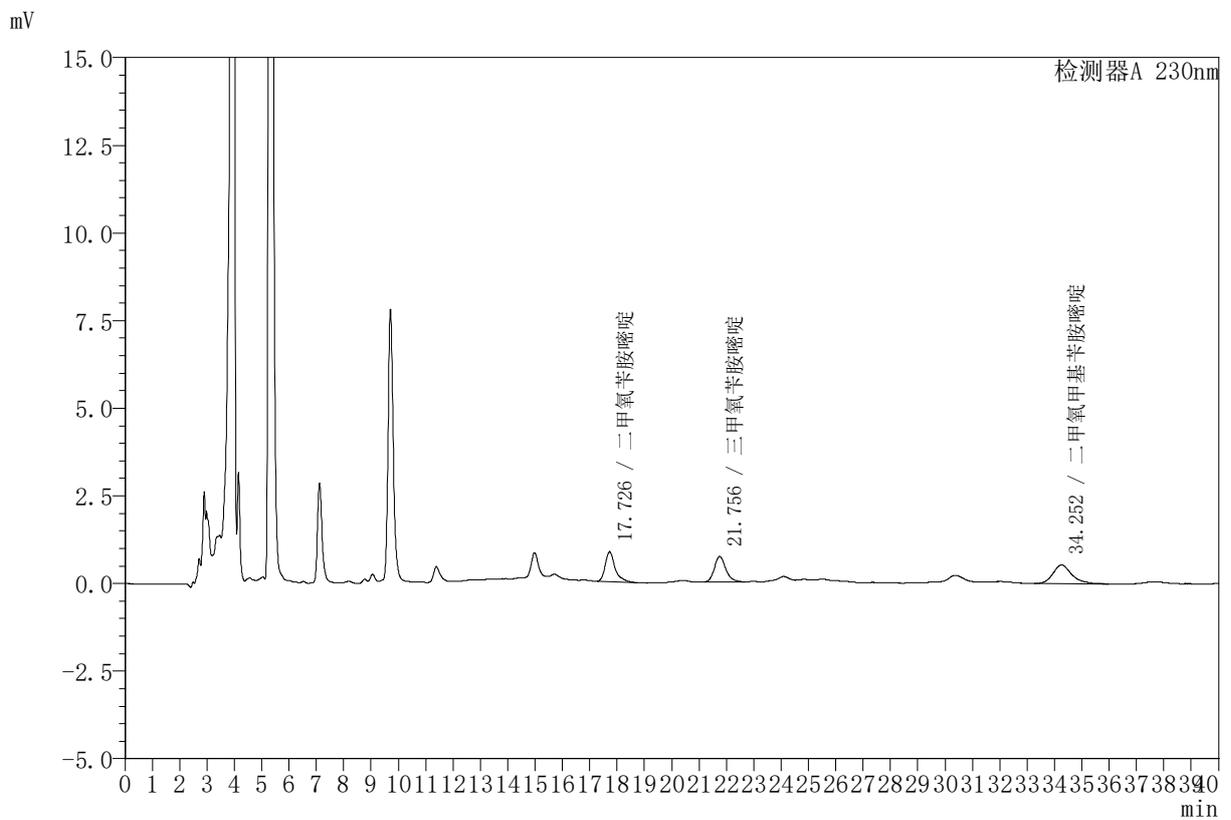


图60 添加浓度为0.5 mg/kg乳猪浓缩饲料目标化合物液相色谱图

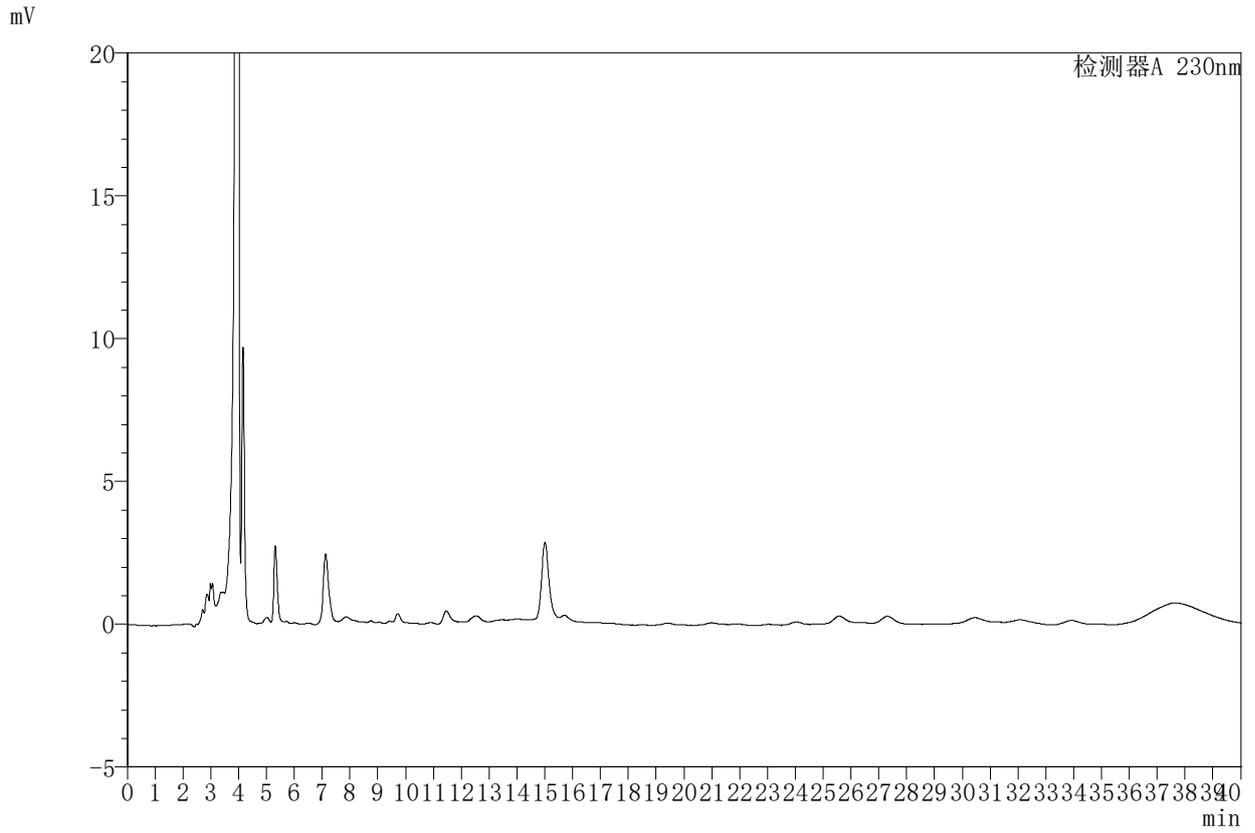


图61 空白肉牛精料补充料目标化合物液相色谱图

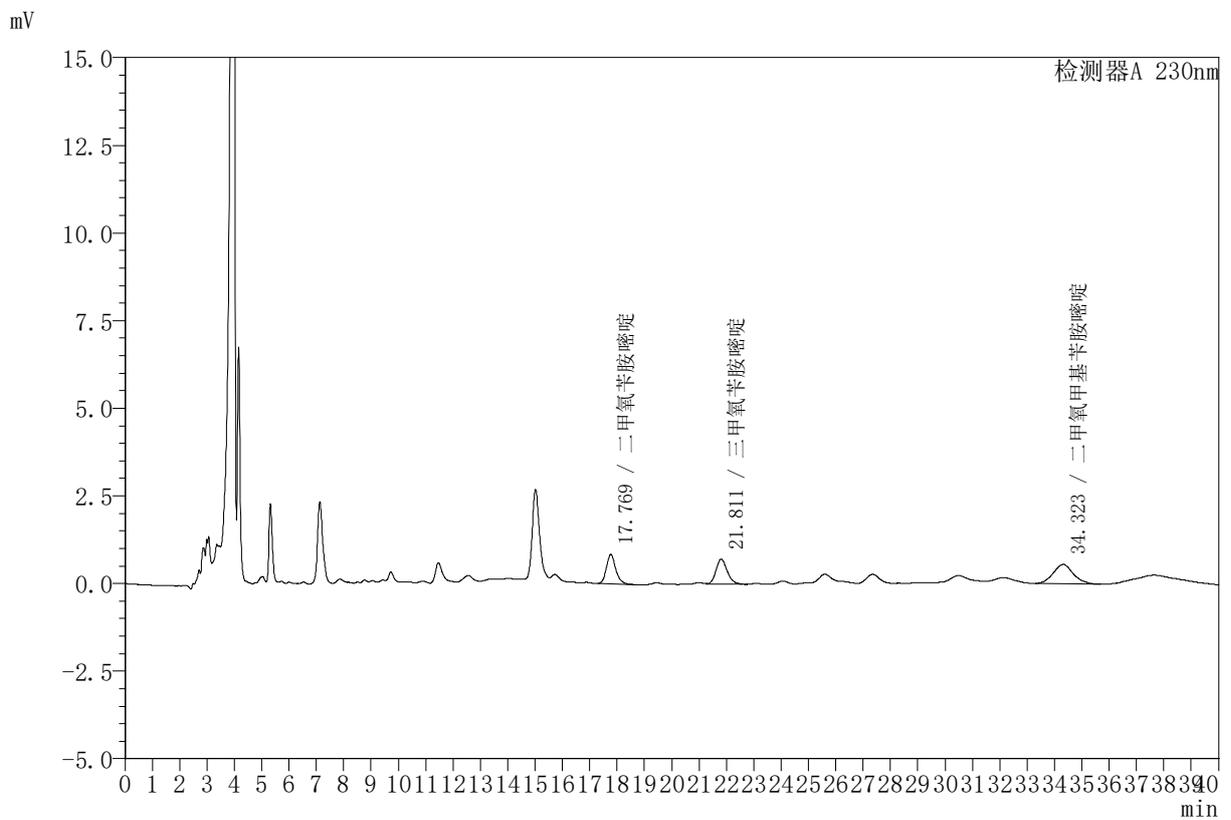


图62 添加浓度为0.5 mg/kg肉牛精料补充料目标化合物液相色谱图

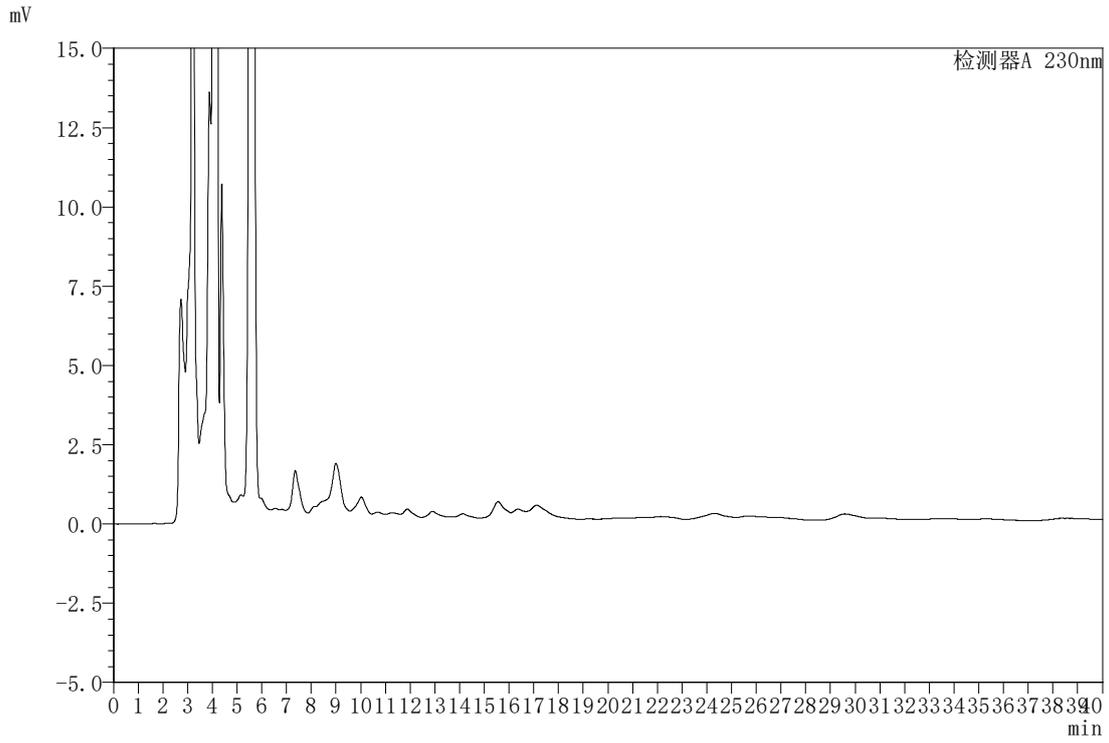


图63 空白禽用复合预混合饲料目标化合物液相色谱图

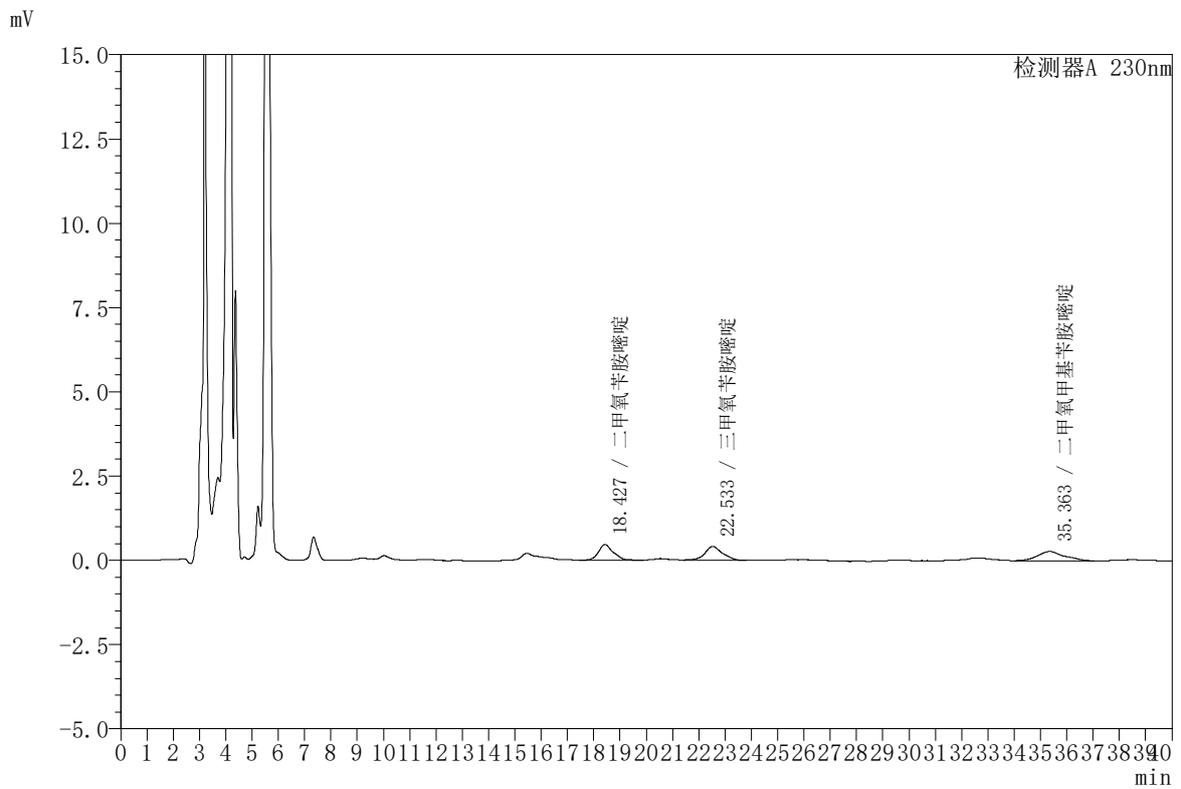


图64 添加浓度为0.5 mg/kg禽用复合预混合饲料目标化合物液相色谱图

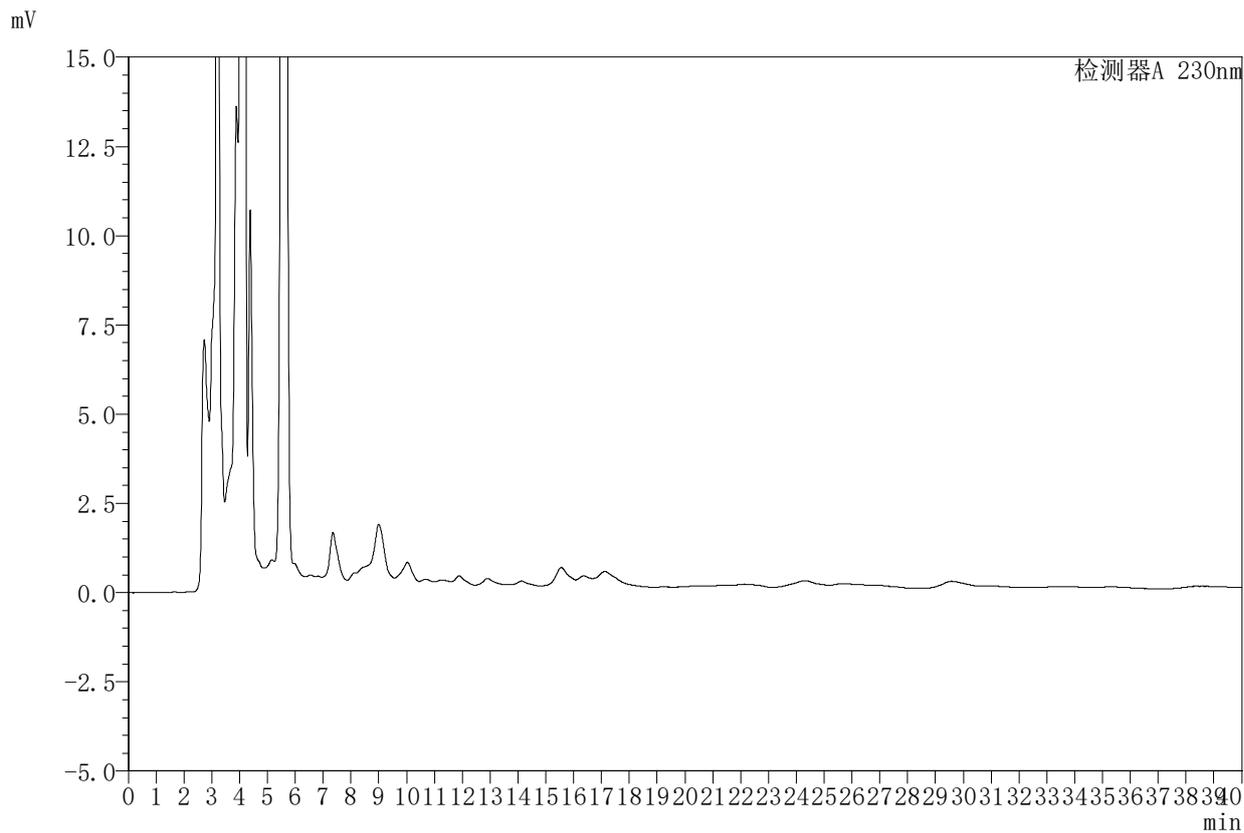


图65 空白鱼粉目标化合物液相色谱图

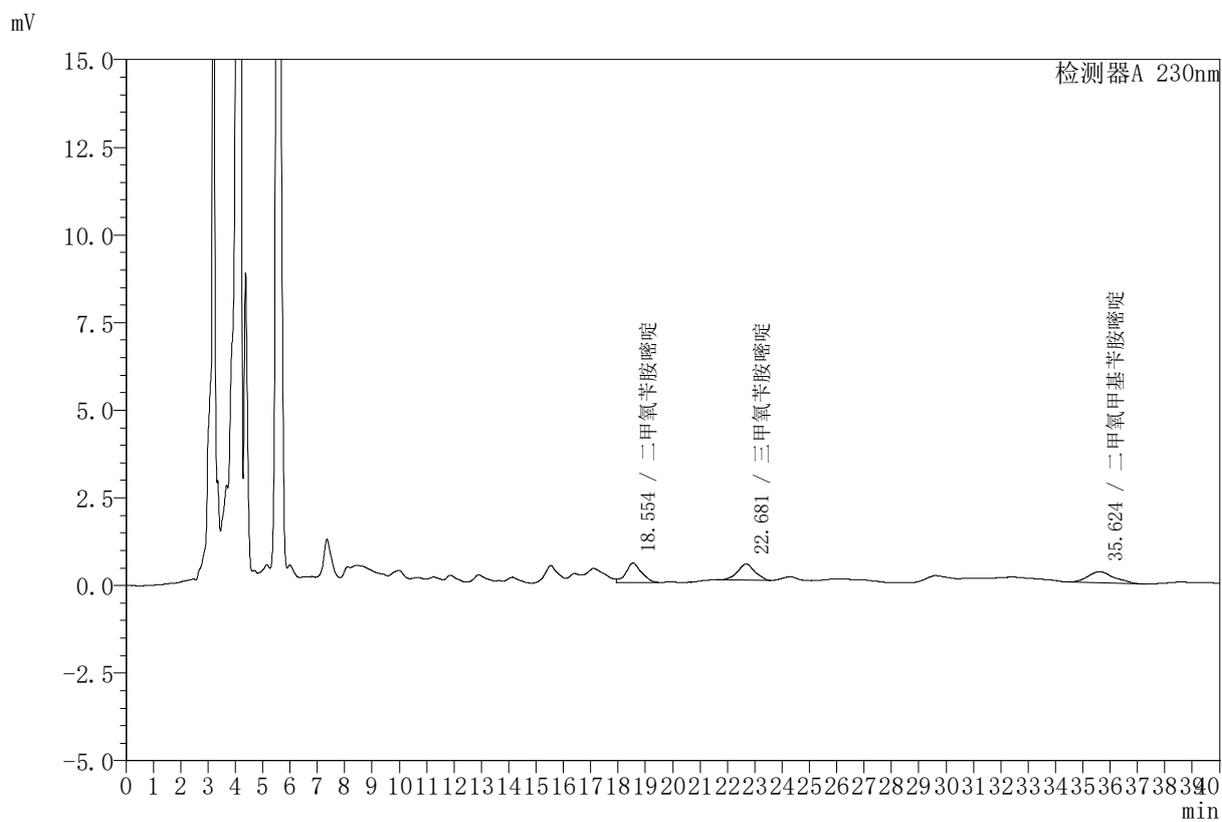


图66 添加浓度为0.5 mg/kg鱼粉目标化合物液相色谱图

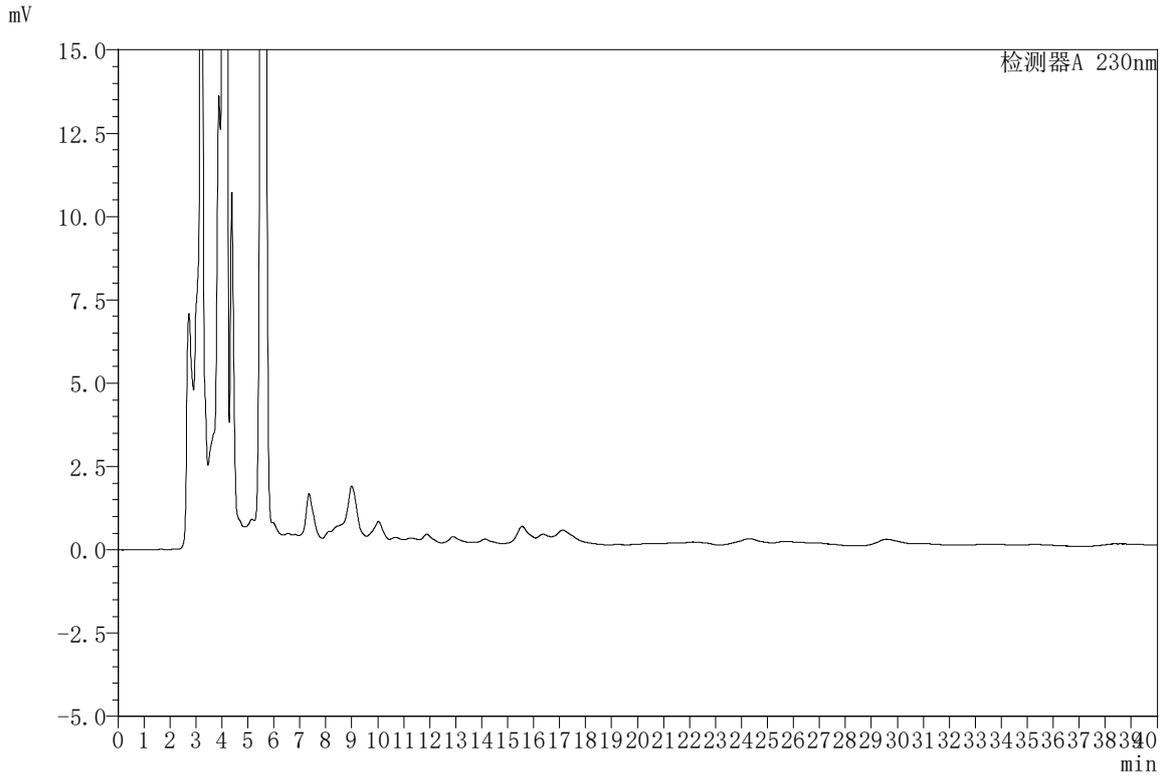


图67 空白鸡肉粉目标化合物液相色谱图

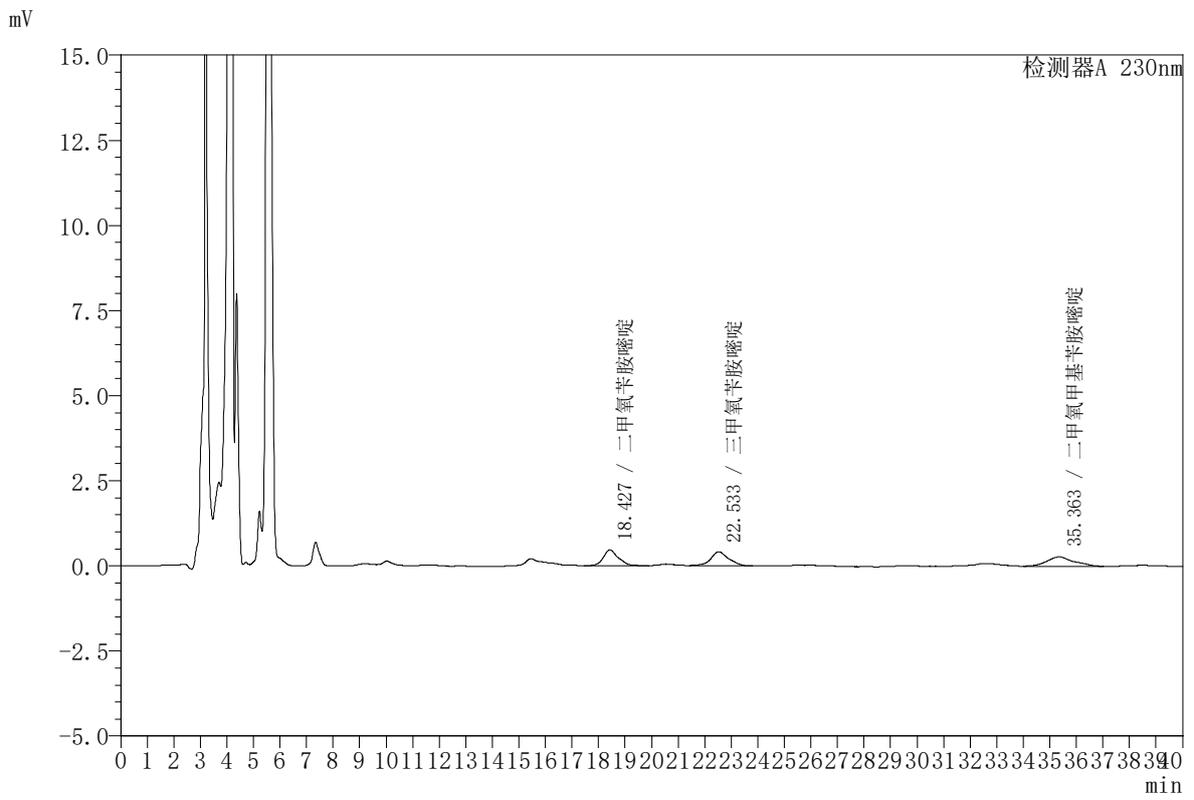


图68 添加浓度为0.5 mg/kg鸡肉粉目标化合物液相色谱图

2.4.4.4 方法准确度和精密度

为进一步考察方法准确度和精密度，选用黄颡鱼配合饲料、仔猪配合饲料、乳猪浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼粉、鸡肉粉分别进行加标回收试验。对于禁用药物，分别在定量限、两倍定量限和十倍定量限进行加标回收实验。每种试样采用不同的添加浓度，每个添加浓度制备 6 个平行样品，重复 3 个批次，结果见表 52 ~ 表 58。

表 52 黄颡鱼配合饲料回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	98.7	101.0	101.7	99.3	103.2	100.7	100.8	1.61	6.22
		II	91.7	99.9	101.6	104.5	98.5	106.7	100.5	5.21	
		III	96.6	109.3	106.2	119.5	113.8	102.7	108.0	7.53	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	85.3	94.7	94.8	94.3	97.4	94.3	93.5	4.46	5.73
		II	101.5	104.0	107.1	103.6	104.5	109.0	105.0	2.53	
		III	98.9	95.8	97.5	100.1	102.3	101.7	99.4	2.52	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	111.0	112.1	108.5	106.6	115.2	109.0	110.4	2.75	7.58
		II	93.9	92.7	95.9	92.3	94.6	91.0	93.4	1.86	
		III	98.9	101.5	102.1	104.9	103.0	110.9	103.5	3.98	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	88.8	91.3	86.8	90.6	90.1	90.6	89.7	1.83	7.14
		II	82.2	98.5	78.4	96.2	86.1	84.9	87.7	9.08	
		III	82.8	99.8	83.4	97.4	80.0	89.1	88.8	9.30	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	88.8	92.2	90.6	95.2	91.2	89.1	91.2	2.58	4.55
		II	100.9	99.0	97.1	98.8	92.6	104.2	98.8	3.91	
		III	94.9	97.4	94.2	101.3	94.9	94.0	96.1	2.92	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	94.1	100.4	97.2	100.8	96.8	98.0	97.9	2.50	3.92
		II	104.4	102.1	92.2	99.9	96.4	99.1	99.0	4.33	
		III	97.4	101.0	94.6	102.9	89.4	95.6	96.8	4.95	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	80.7	82.1	77.5	83.5	82.1	82.0	81.3	2.55	8.69
		II	94.7	92.5	95.0	96.0	83.7	88.2	91.7	5.25	
		III	99.2	97.6	96.5	100.8	78.8	89.1	93.7	8.88	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	81.7	83.8	78.5	84.5	82.9	82.9	82.4	2.59	9.14
		II	100.5	97.6	99.7	101.4	84.4	98.0	96.9	6.52	
		III	98.9	97.6	98.8	99.8	83.3	95.6	95.7	6.50	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	83.3	87.6	80.0	88.5	86.6	87.0	85.5	3.74	8.62
		II	99.3	97.7	98.1	102.3	81.7	100.5	96.6	7.77	
		III	100.0	98.0	99.1	100.1	79.9	94.5	95.3	8.18	

表 53 仔猪配合饲料回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	91.3	92.1	102.2	105.8	98.3	97.4	97.9	5.75	7.16
		II	86.1	97.6	97.4	97.6	97.7	101.4	96.3	5.44	
		III	112.8	98.7	109.4	104.1	108.8	111.6	107.6	4.90	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	93.2	95.3	100.4	105.7	99.7	96.8	98.5	4.50	10.94
		II	97.9	105.2	106.3	110.4	104.9	107.2	105.3	3.94	
		III	87.3	78.9	82.7	78.1	85.3	84.3	82.8	4.40	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	102.8	97.5	103.8	107.9	100.0	100.0	102.0	3.59	11.19
		II	88.6	103.0	105.3	98.8	100.4	109.1	100.9	6.97	
		III	82.5	78.7	81.9	80.4	81.4	84.6	81.6	2.42	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	90.5	94.4	80.4	82.8	88.6	82.6	86.5	6.31	12.33
		II	88.6	83.7	89.7	86.6	85.3	90.7	87.4	3.08	
		III	110.9	111.0	108.4	112.4	102.2	112.7	109.6	3.59	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	91.5	95.5	84.6	82.6	92.4	86.1	88.8	5.73	5.71
		II	96.2	95.6	99.1	94.5	94.6	96.7	96.1	1.74	
		III	92.2	88.7	82.2	87.5	88.2	86.3	87.5	3.76	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	92.3	97.7	88.3	81.5	89.9	81.8	88.6	7.04	5.97
		II	95.0	88.5	95.5	94.0	94.5	97.8	94.2	3.26	
		III	93.8	91.7	81.6	84.7	91.3	85.8	88.2	5.44	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	80.9	74.3	85.2	83.0	77.0	85.2	80.9	5.52	9.87
		II	83.6	77.9	71.8	84.8	86.1	85.6	81.7	6.93	
		III	101.3	98.9	97.2	97.2	93.0	87.3	95.8	5.21	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	83.6	76.7	87.7	86.5	80.6	87.0	83.7	5.15	7.22
		II	86.9	81.5	76.0	87.9	89.3	88.6	85.0	6.14	
		III	98.8	96.6	95.3	93.0	92.0	86.6	93.7	4.56	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	83.4	75.2	87.6	86.5	77.1	87.9	82.9	6.69	8.48
		II	90.8	82.1	74.0	89.8	92.1	91.8	86.8	8.38	
		III	100.0	98.2	94.1	95.6	91.6	85.1	94.1	5.67	

表 54 乳猪浓缩饲料回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.55	二甲氧苄氨嘧啶	I	96.5	92.8	104.6	94.9	95.0	96.1	96.7	4.24	10.16
		II	79.7	76.3	77.7	84.6	91.4	70.8	80.1	8.89	
		III	84.1	87.5	92.4	96.0	97.9	81.8	89.9	7.24	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	99.6	96.9	106.1	99.1	99.7	100.7	100.3	3.06	8.20
		II	90.8	89.3	85.6	82.2	88.8	76.5	85.5	6.33	
		III	91.7	98.5	93.6	99.1	94.2	84.7	93.7	5.60	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	109.7	107.3	118.0	109.0	109.6	111.8	110.9	3.38	11.54
		II	88.2	88.2	92.0	84.2	92.8	77.7	87.2	6.44	
		III	101.9	103.6	97.9	88.4	98.2	87.3	96.2	7.12	
1.040	二甲氧苄氨嘧啶	I	89.4	87.4	90.2	84.8	81.9	86.8	86.8	3.50	7.37
		II	91.1	90.6	82.1	83.2	76.2	80.3	83.9	6.99	
		III	103.7	91.6	87.8	90.9	88.2	99.1	93.5	6.87	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	91.9	89.2	94.4	89.2	85.8	88.9	89.9	3.24	6.01
		II	92.2	93.2	87.6	88.3	82.6	85.0	88.2	4.59	
		III	88.7	81.7	82.7	78.9	77.0	78.8	81.3	5.16	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	98.8	95.7	99.7	94.1	90.0	95.0	95.6	3.62	5.19
		II	92.8	95.2	87.6	89.1	88.3	89.8	90.5	3.23	
		III	102.6	101.1	99.8	100.4	92.4	100.9	99.5	3.63	
5.0400	二甲氧苄氨嘧啶	I	85.6	79.3	85.2	82.2	77.8	85.3	82.6	4.06	5.36
		II	90.0	93.4	86.4	92.6	90.3	91.5	90.7	2.76	
		III	83.3	84.6	82.0	85.6	93.0	85.0	85.6	4.50	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	86.7	82.3	86.4	84.3	80.0	86.9	84.4	3.33	6.25
		II	91.0	94.3	88.7	92.7	91.4	93.1	91.9	2.12	
		III	80.0	76.5	77.1	84.8	87.3	88.5	82.4	6.32	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	89.7	83.0	89.3	86.5	81.9	90.5	86.8	4.22	5.15
		II	91.0	96.6	90.0	96.7	95.7	93.7	93.9	3.07	
		III	93.3	98.5	90.8	97.8	93.5	94.6	94.8	3.08	

表 55 肉牛精料补充料回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	90.6	94.0	93.6	91.3	86.3	101.8	92.9	5.53	10.87
		II	98.7	99.8	95.3	87.8	86.6	94.5	93.8	5.85	
		III	68.6	88.3	77.8	70.2	79.2	80.5	77.5	9.34	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	96.9	104.0	99.8	95.5	94.3	101.0	98.6	3.73	13.06
		II	85.5	76.8	78.8	76.4	74.8	78.2	78.4	4.78	
		III	77.8	74.0	82.5	76.1	74.6	71.0	76.0	5.12	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	114.3	110.7	100.5	106.8	105.6	100.3	106.3	5.21	13.76
		II	93.7	78.5	86.7	85.5	77.4	93.5	85.9	8.15	
		III	86.8	86.3	87.3	75.6	80.9	73.1	81.6	7.55	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	88.1	86.3	82.9	85.6	84.9	86.4	85.7	2.03	6.99
		II	86.0	80.5	80.4	100.4	89.7	82.2	86.5	8.86	
		III	83.9	80.5	81.3	79.4	75.7	73.6	79.1	4.79	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	92.9	90.1	86.4	88.5	88.4	91.3	89.6	2.59	8.71
		II	77.1	80.5	72.0	88.5	87.0	77.0	80.3	7.92	
		III	73.2	73.9	75.9	85.5	76.0	74.9	76.6	5.87	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	101.1	99.5	95.4	98.4	96.1	100.3	98.5	2.31	13.76
		II	86.5	89.9	77.4	100.1	91.2	85.3	88.4	8.48	
		III	77.0	71.5	70.9	72.7	70.3	72.2	72.4	3.33	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	76.6	82.4	80.0	84.1	77.1	87.2	81.2	5.06	6.58
		II	75.7	83.6	73.6	88.9	79.7	86.1	81.3	7.38	
		III	71.8	85.0	72.4	83.3	75.7	77.1	77.5	7.10	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	79.7	83.6	81.8	84.5	78.5	88.0	82.7	4.17	7.07
		II	74.6	79.6	68.9	85.1	76.8	83.8	78.1	7.72	
		III	73.8	75.1	68.5	82.3	72.9	79.4	75.3	6.50	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	83.2	87.1	83.9	90.9	87.0	92.5	87.4	4.22	8.65
		II	75.5	80.8	75.0	88.2	73.8	86.4	80.0	7.74	
		III	75.0	77.3	69.2	86.2	73.3	74.3	75.9	7.53	

表 56 禽用复合预混合饲料回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批 次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	95.3	102.7	104.9	101.4	98.9	98.6	100.3	3.39	12.24
		II	82.5	82.8	76.5	78.2	82.2	79.9	80.3	3.23	
		III	78.4	79.7	73.3	79.2	82.3	77.2	78.4	3.81	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	96.0	95.9	88.9	94.6	87.2	82.2	90.8	6.17	11.39
		II	82.6	90.0	80.9	80.2	80.8	79.2	82.3	4.81	
		III	72.0	74.3	64.1	75.4	70.8	71.1	71.3	5.57	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	89.9	89.1	89.7	88.0	76.1	79.5	85.4	7.04	9.64
		II	74.8	73.6	68.0	69.0	83.0	72.7	73.5	7.28	
		III	76.2	86.7	77.6	76.3	69.4	71.1	76.2	7.96	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	90.6	86.1	81.2	85.2	84.7	78.1	84.3	5.08	8.56
		II	77.4	76.9	76.5	79.8	69.3	74.1	75.7	4.79	
		III	70.8	70.8	83.0	69.6	67.6	82.8	74.1	9.32	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	66.4	75.0	70.8	82.5	78.7	74.6	74.7	7.58	9.64
		II	72.2	74.6	83.3	70.8	71.0	70.3	73.5	6.86	
		III	76.0	75.3	76.4	70.7	75.3	67.5	73.5	4.92	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	87.6	86.4	79.5	67.0	72.5	81.8	79.1	10.17	12.70
		II	73.3	72.9	66.0	85.9	74.2	82.5	75.8	9.52	
		III	65.9	66.3	68.6	60.6	59.5	60.8	63.6	5.94	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	67.0	73.9	77.6	76.8	74.2	70.4	73.3	5.45	6.78
		II	78.7	74.9	74.5	76.4	65.2	79.9	74.9	6.96	
		III	81.0	73.5	74.8	69.5	62.7	76.1	72.9	8.59	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	73.0	72.8	77.2	72.8	70.0	69.5	72.5	3.82	5.14
		II	76.8	73.1	72.3	72.9	61.7	76.6	72.2	7.65	
		III	73.9	71.1	73.6	75.5	68.8	76.8	73.3	4.00	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	70.8	72.8	80.5	75.5	73.7	71.7	74.2	4.72	8.25
		II	76.3	73.1	78.5	73.4	64.8	85.4	75.2	9.06	
		III	67.7	65.1	64.8	72.0	62.1	70.3	67.0	5.53	

表 57 鱼粉回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	测定 批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	97.5	92.4	92.0	94.2	90.0	86.6	92.1	4.04	8.43
		II	107.8	85.7	92.5	101.8	98.5	92.3	96.4	8.18	
		III	83.2	84.9	75.3	87.4	88.1	82.8	83.6	5.51	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	97.0	95.1	89.8	91.1	89.6	93.7	92.7	3.27	10.88
		II	88.2	90.0	86.5	95.5	100.7	87.3	91.4	6.10	
		III	70.7	72.3	70.2	74.6	84.1	78.6	75.1	7.15	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	95.5	86.6	85.2	85.5	89.8	89.3	88.6	4.37	6.00
		II	81.2	88.3	96.5	94.9	92.4	89.7	90.5	6.07	
		III	82.3	77.7	91.7	87.9	92.1	81.4	85.5	6.91	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	79.1	92.6	88.3	96.1	97.4	83.3	89.5	8.14	11.36
		II	101.5	91.7	105.4	99.3	107.1	94.0	99.9	6.13	
		III	84.8	76.5	78.0	75.6	78.4	84.2	79.6	4.99	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	70.9	85.0	81.2	87.3	88.9	81.5	82.5	7.80	6.41
		II	86.6	81.8	80.2	78.4	83.6	89.0	83.3	4.76	
		III	88.5	84.5	86.9	85.8	74.6	92.3	85.4	6.96	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	73.5	84.2	92.4	84.7	85.8	86.3	84.5	7.26	5.76
		II	81.6	77.9	79.5	77.5	79.7	81.5	79.6	2.14	
		III	84.9	85.1	84.6	83.6	85.6	92.6	86.1	3.79	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	84.1	81.2	81.1	79.6	82.2	80.5	81.5	1.90	6.35
		II	79.3	86.3	92.7	91.7	92.7	86.2	88.1	5.99	
		III	74.3	79.1	84.2	79.2	81.4	76.9	79.2	4.33	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	84.2	80.7	80.8	79.5	82.9	80.3	81.4	2.16	4.51
		II	73.0	80.2	85.4	81.5	86.0	79.3	80.9	5.88	
		III	75.9	79.0	86.9	83.2	83.5	76.4	80.8	5.46	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	83.9	80.9	82.4	81.2	83.2	82.4	82.3	1.42	6.46
		II	73.0	82.2	86.3	83.9	96.5	90.6	85.4	9.34	
		III	75.6	82.7	86.8	80.2	89.9	80.0	82.5	6.24	

表 58 鸡肉粉回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	待测组分	批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.5	二甲氧苄氨嘧啶	I	83.9	85.2	86.8	93.0	91.2	84.5	87.4	4.36	5.68
		II	94.0	91.9	93.7	94.7	90.7	87.9	92.1	2.78	
		III	84.1	96.6	81.6	80.8	84.4	83.1	85.1	6.81	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	90.2	87.6	93.0	97.0	99.3	88.8	92.7	5.05	6.49
		II	95.1	90.0	91.4	91.9	89.1	87.1	90.8	3.01	
		III	84.5	81.3	77.7	81.8	82.4	85.0	82.1	3.19	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	88.3	87.3	92.2	94.0	84.3	85.9	88.7	4.20	5.89
		II	101.1	96.8	97.1	97.1	94.9	93.2	96.7	2.72	
		III	82.8	93.8	91.6	92.4	102.5	89.6	92.1	6.94	
1.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	88.9	85.2	83.2	81.5	86.3	81.8	84.5	3.40	5.72
		II	82.4	86.8	84.8	81.2	83.5	83.0	83.6	2.36	
		III	89.7	92.2	89.4	96.8	87.1	97.7	92.2	4.65	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	92.0	89.8	84.8	86.1	89.8	86.8	88.2	3.11	3.21
		II	81.4	86.5	86.4	83.9	84.2	84.6	84.5	2.25	
		III	86.8	85.2	88.6	89.8	88.8	90.6	88.3	2.27	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	93.2	84.3	85.1	84.4	89.6	84.9	86.9	4.23	4.48
		II	82.7	89.3	86.8	85.8	86.1	88.7	86.6	2.72	
		III	95.2	94.6	89.4	93.8	88.3	93.4	92.5	3.10	
5.0	二甲氧苄氨嘧啶	I	77.3	79.3	78.3	73.8	72.2	78.5	76.5	3.75	14.26
		II	74.6	69.4	78.6	74.6	75.3	67.1	73.3	5.73	
		III	97.8	103.4	92.7	96.4	98.1	99.6	98.0	3.60	
	三甲氧苄氨嘧啶	I	79.6	81.8	80.1	75.8	74.2	80.3	78.6	3.76	9.51
		II	76.9	80.3	80.1	76.5	77.4	68.5	74.9	6.02	
		III	91.7	95.2	87.2	93.3	94.0	92.3	92.3	3.02	
	二甲氧甲基苄氨嘧啶	I	81.3	82.3	82.8	75.0	75.2	82.4	79.8	4.63	10.76
		II	78.3	71.2	83.0	77.8	79.3	69.7	76.6	6.66	
		III	93.6	99.1	88.1	94.7	96.5	95.7	94.6	3.92	

结果表明：二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 72.9 % ~ 109.6 %，批内变异系数为 1.61 % ~ 9.34 %，批间变异系数为 5.36 % ~ 14.26 %；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为 71.3 % ~ 105.3 %，批内变异系数为 1.74 % ~ 7.92 %，批间变异系数为 3.21 % ~ 13.06 %；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为 63.6 % ~ 110.9 %，批内变异系数为 1.42 % ~ 10.17 %，批间变异系数为 3.92 % ~ 13.76 %。本方法准确度和精密度良好。不同空白基质加标试验色谱图详见图 68~图 74。

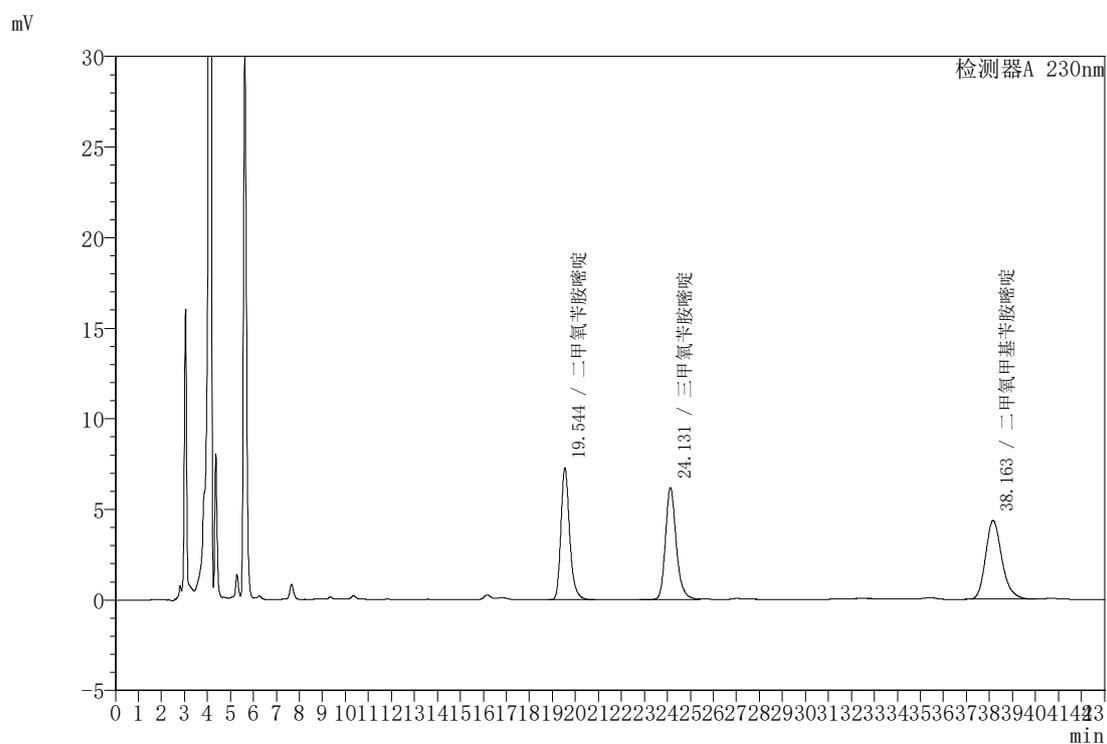


图 68 黄颡鱼配合饲料添加目标化合物液相色谱图

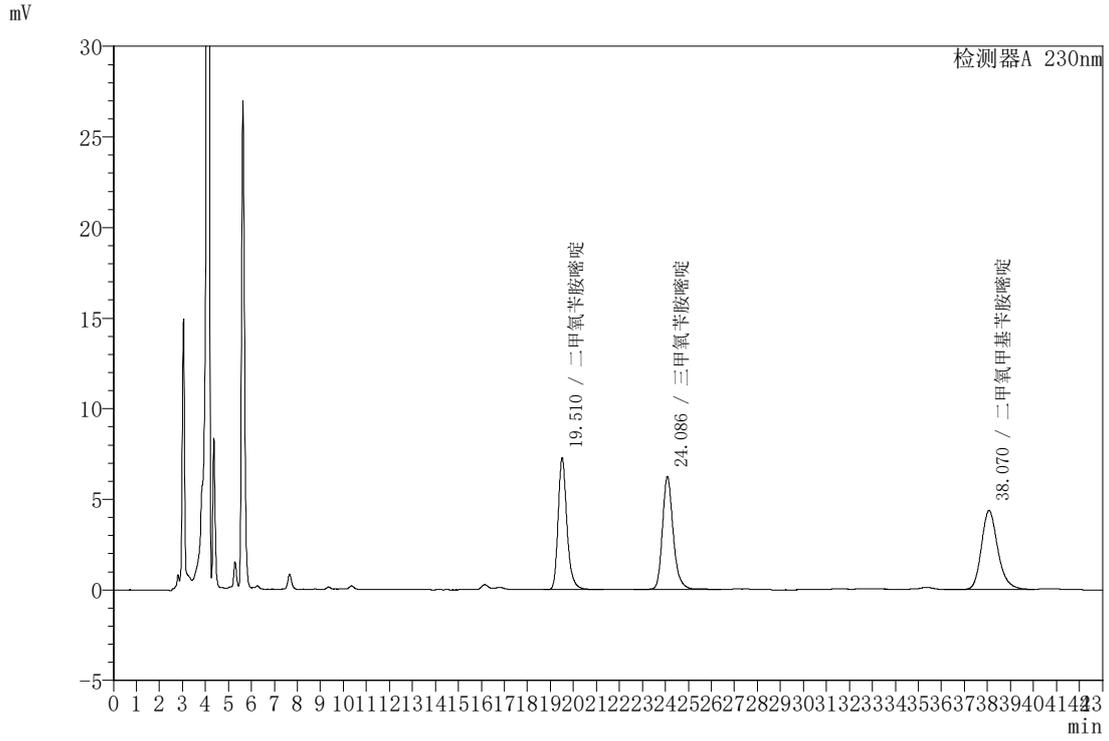


图 69 仔猪配合饲料添加目标化合物液相色谱图

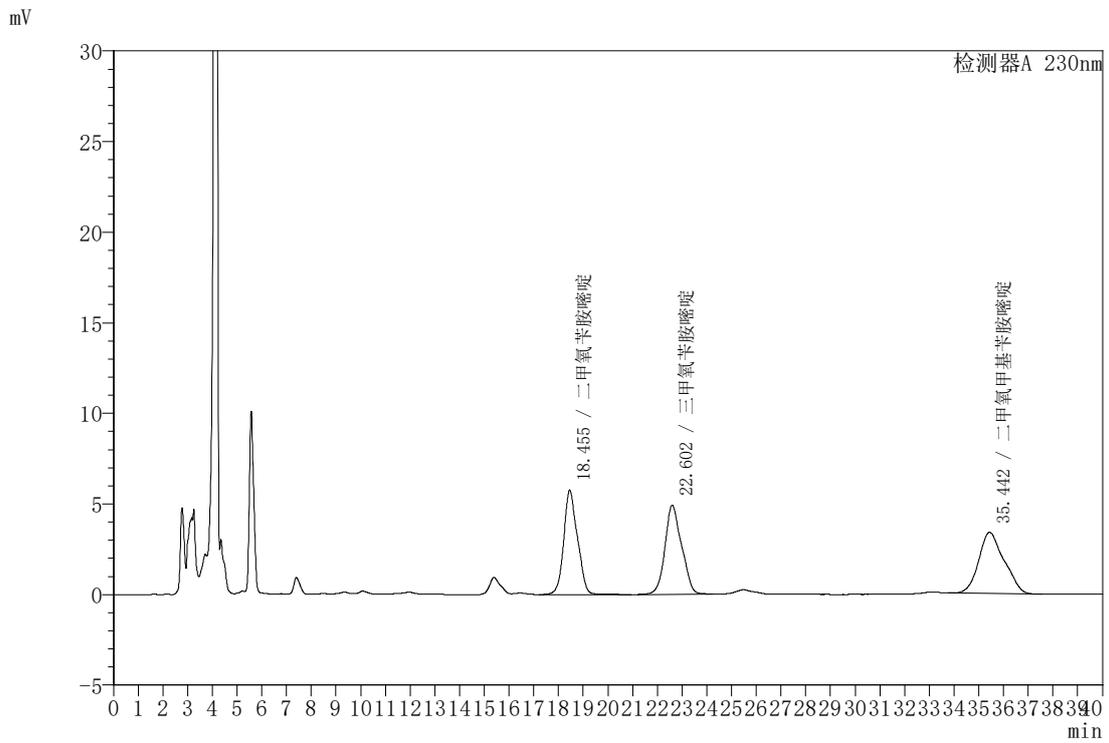


图 70 乳猪浓缩饲料添加目标化合物液相色谱图

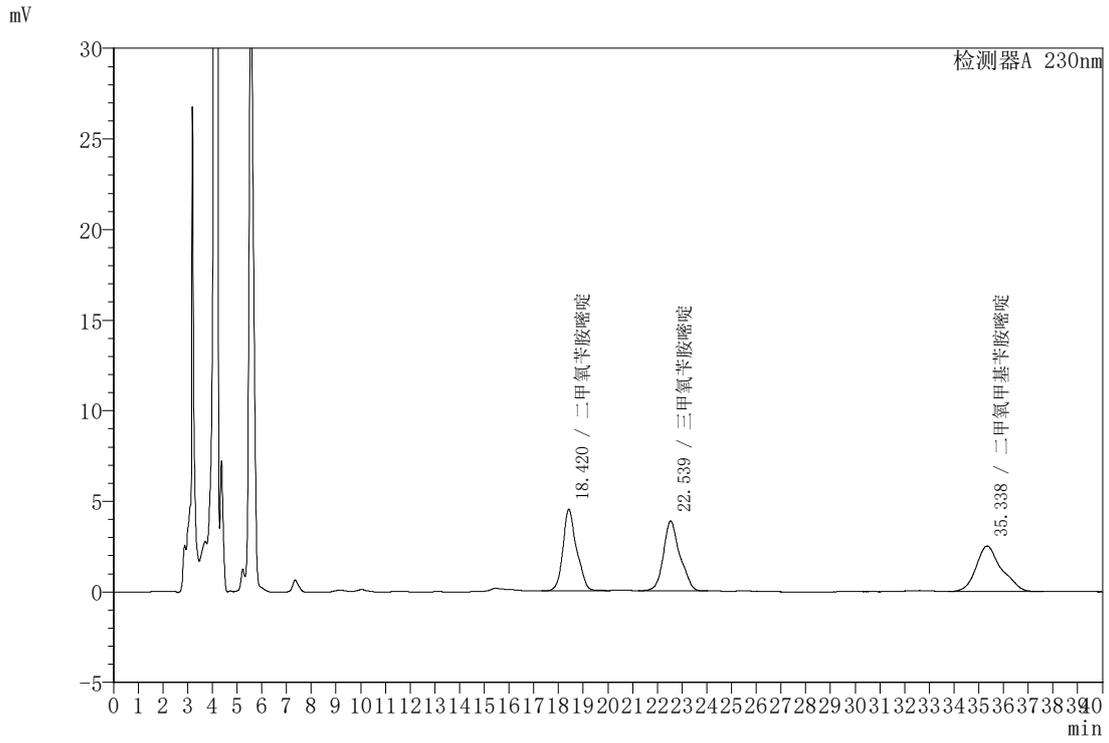


图 71 肉牛精料补充料添加目标化合物液相色谱图

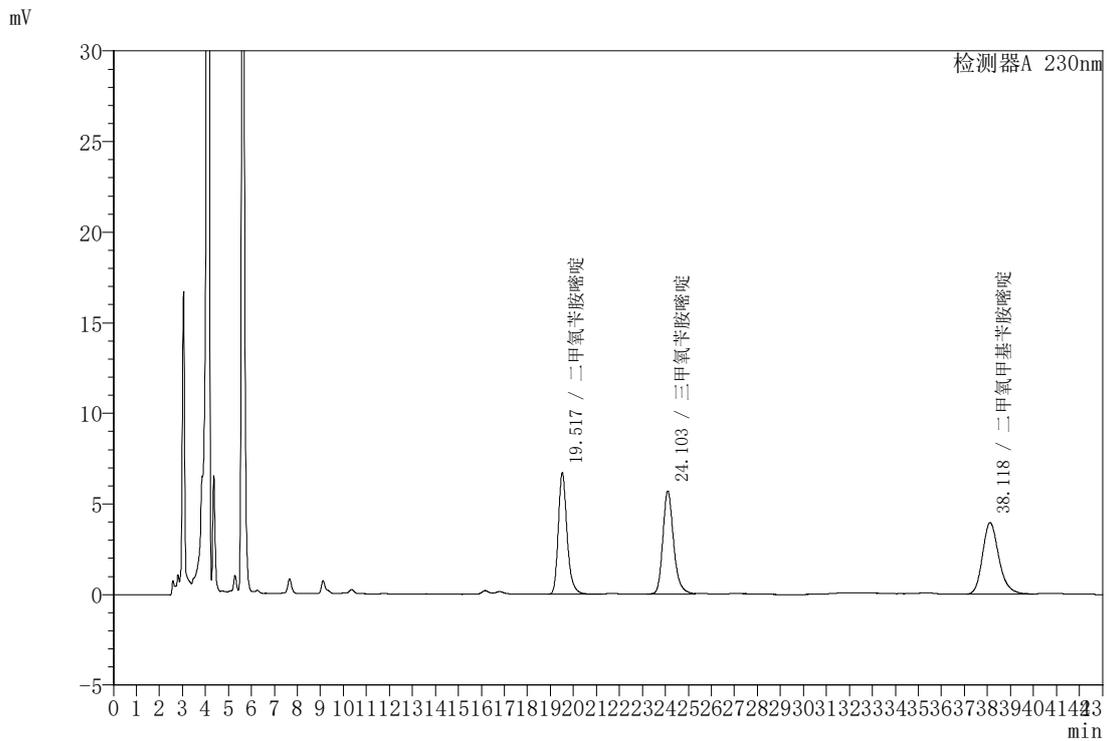


图 72 禽用复合预混合饲料添加目标化合物液相色谱图

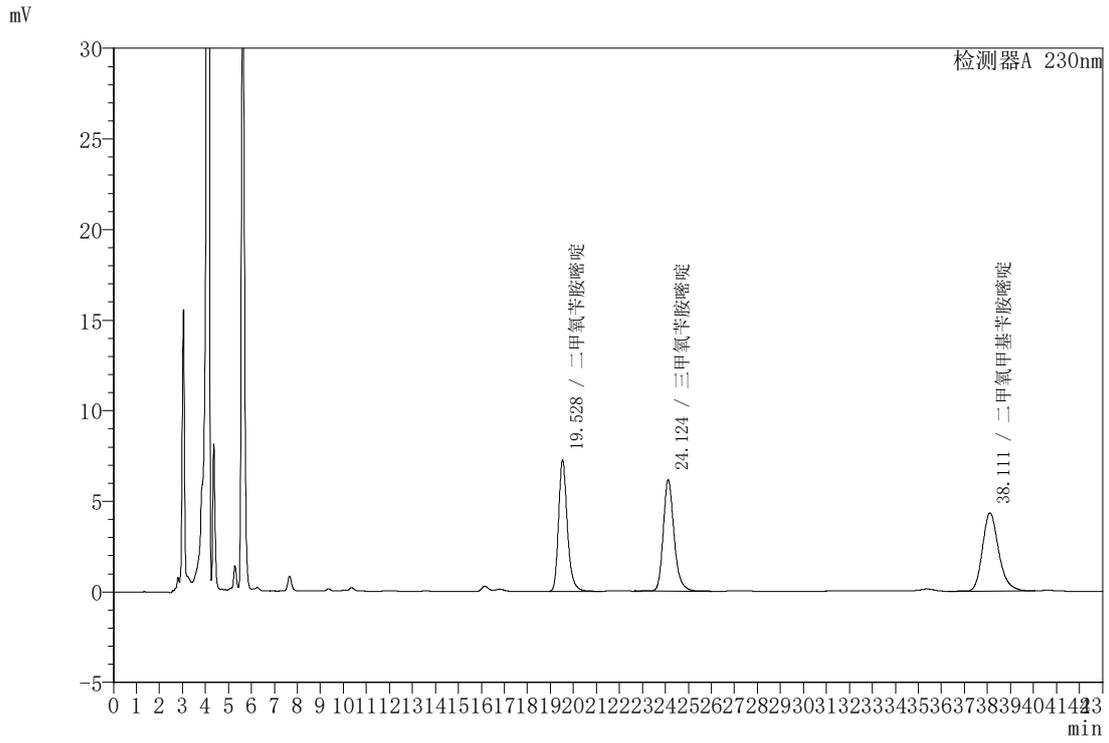


图 73 鱼粉添加目标化合物液相色谱图

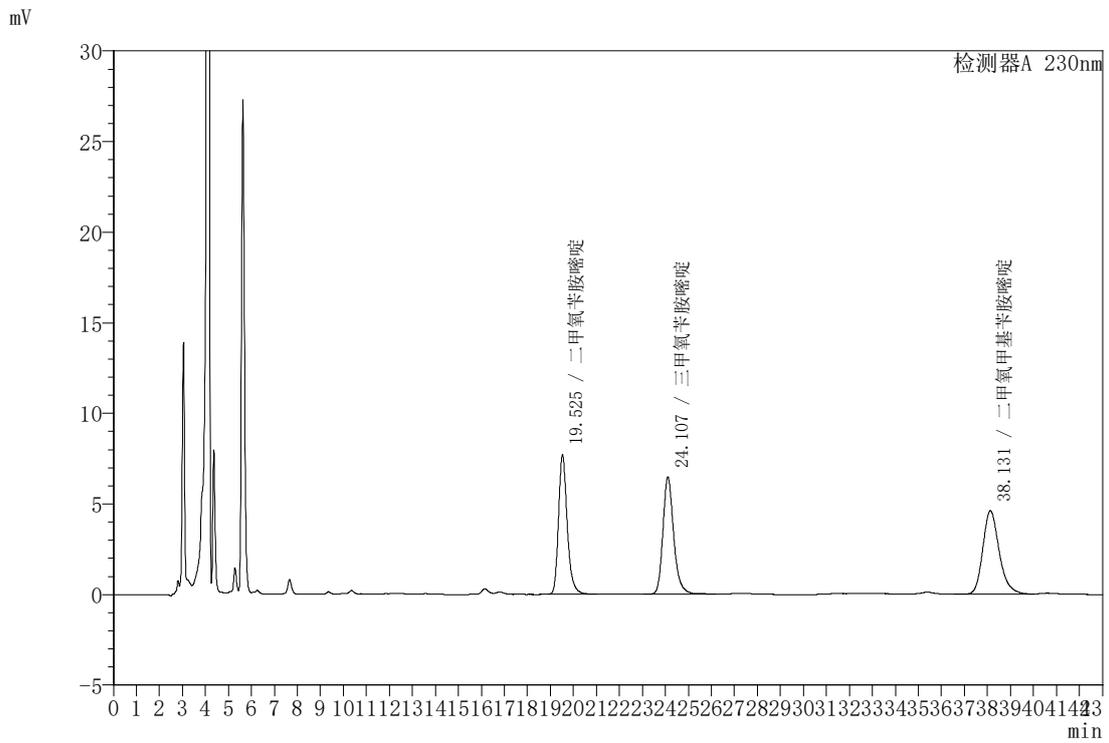


图 74 鸡肉粉添加目标化合物液相色谱图

2.4.5 干扰试验

在上述色谱条件下，考察其他药物对二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶分析干扰情况。二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶属于磺胺增效剂类药物，因此，试验选择 23 种磺胺类药物、19 种喹诺酮类药物、16 种 β 受体激动剂类药物、4 种四环素类药物对目标化合物进行干扰试验。在上述液相色谱条件下，其他药物的出峰时间均对二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的检测不产生干扰。二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶和其他药物的液相色谱图见图 75。在使用高效液相色谱法进行未知样品检测时，如果对检测结果存疑，应采用液相色谱-串联质谱法对检测结果进行确证。

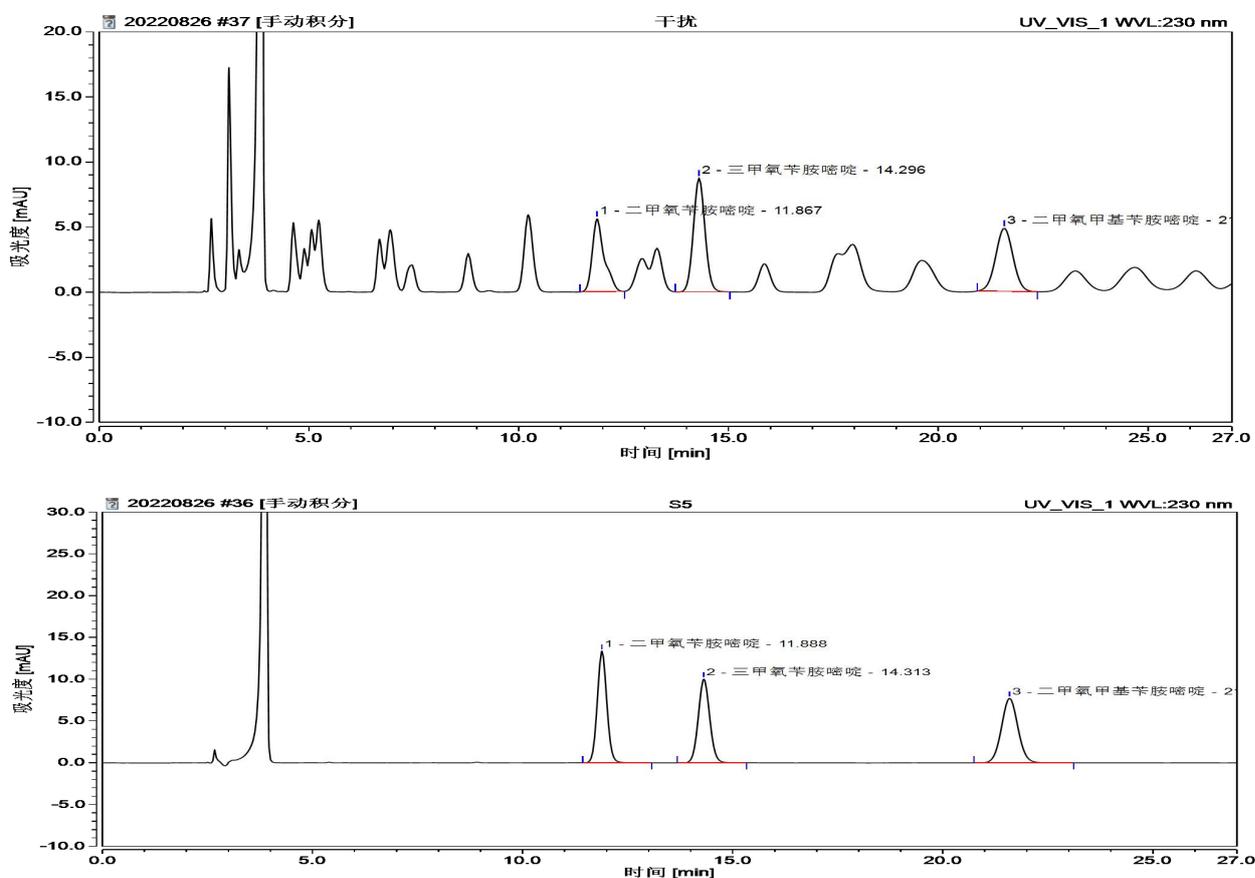


图 75 干扰试验液相色谱图

2.4.6 方法适用性考察

试验收集肉鸭配合饲料、肉鸡配合饲料、仔猪配合饲料、黄颡鱼配合饲料、草虾配合饲料、犬粮、乳猪浓缩饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料、鱼用复合预混合饲料等 11 种饲料产品，以及鸡肉粉、猪肉粉、鱼粉、花生粕、喷浆玉米皮、菜粕、玉米等 7 种饲料原料，按上述确定的样品提取和净化方法和条件、色谱条件测定试样中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶含量，结果见表 59~表 61。

表 59 饲料产品实际品测定结果 (mg/kg)

No.	化合物	肉鸭配合饲料	肉鸡配合饲料	仔猪配合饲料	草虾配合饲料	黄颡鱼配合饲料	犬粮
1	二甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	48.8	49.38	未检出	未检出	未检出	未检出
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

表 60 饲料产品实际品测定结果 (mg/kg)

No.	化合物	蛋鸡浓缩饲料	乳猪浓缩饲料	肉牛精料补充料	禽用复合预混合饲料	鱼用复合预混合饲料
1	二甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

表 61 饲料原料实际品测定结果 (mg/kg)

No.	化合物	鸡肉粉	猪肉粉	鱼粉	花生粕	喷浆玉米皮	菜粕	玉米
1	二甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	三甲氧苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

2.4.7 精密度

饲料样品种类繁多，添加的各种化学物质范围广，本试验部分仅对常见的饲料原料及饲料产品进行了验证。因此不同基质样品类型的检测会出现不同程度的偏差。依据本试验测定的回收率、精密度，并参照国内外相关液相色谱法检测标准，最终将本方法精密度规定如下：

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超过该算术平均值的20%。

2.5 液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法比较

方法由本标准的液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法进行比对验证，对方法进行了乳猪配合饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、畜禽用复合预混合饲料和鱼粉5种空白基质在添加浓度为2.0 mg/kg的水平上的回收实验，结果见表62~表63。结果表明：液相色谱-串联质谱法检测二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为86.29%~93.66%；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为84.08%~93.03%；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为83.10%~94.36%。高效液相色谱法检测二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为91.07%~98.10%；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为95.15%~100.11%；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为93.68%~107.41%。数据分析表明，本标准的两种检测方法空白基质加标回收实验满足要求，两种检测方法的检测结果一致。

表 62 液相色谱-串联质谱法回收率试验结果

No.	化合物	平均回收率 (%)				
		乳猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	肉牛精料补充料	畜禽用复合预混合饲料	鱼粉
1	二甲氧苄氨嘧啶	90.16	93.66	86.56	87.58	86.29
2	三甲氧苄氨嘧啶	91.06	93.03	87.30	91.60	84.08
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	90.42	94.36	87.95	87.85	83.10

表 63 高效液相色谱法回收率试验结果

No.	化合物	平均回收率 (%)				
		乳猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	肉牛精料补充料	畜禽用复合预混合饲料	鱼粉
1	二甲氧苄氨嘧啶	98.10	91.07	95.69	91.49	93.50
2	三甲氧苄氨嘧啶	95.22	98.46	95.15	95.25	100.11
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	102.68	107.41	97.15	93.68	99.43

2.6 不同检测标准方法比较

方法由本标准的液相色谱-串联质谱法和农业部2349号公告-8-2015《饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定 液相色谱-串联质谱法》比对验证，对方法进行了乳猪配合饲料、蛋鸡浓缩饲料、肉牛精料补充料、禽用复合预混合饲料和鱼粉5种空白基质在添加浓度为0.04 mg/kg的水平上的回收实验，结果见表64~表65。结果表明：本标准的液相色谱-串联质谱法检测二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为94.77%~112.60%；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为96.46%~111.57%；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为99.80%~110.72%。农业部2349号公告-8-2015液相色谱-串联质谱法检测二甲氧苄氨嘧啶平均回收率为62.70%~72.20%；三甲氧苄氨嘧啶平均回收率为64.61%~72.15%；二甲氧甲基苄氨嘧啶平均回收率为60.89%~68.38%。数据分析表明，本标准的检测方法回收率明显高于农业部2349号公告-8-2015。本标准采用固相萃取小柱净化、内标法定量在降低基质效应的同时用内标校正人员操作、仪器误差导致的结果偏差，能够准确、高效的完成检测。

表 64 本标准液相色谱-串联质谱法回收率试验结果

No.	化合物	平均回收率 (%)				
		乳猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	肉牛精料补充料	畜禽用复合预混合饲料	鱼粉
1	二甲氧苄胺嘧啶	103.60	102.04	112.60	102.99	94.77
2	三甲氧苄氨嘧啶	101.13	99.89	111.57	96.46	104.75
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	99.99	101.14	110.72	99.80	102.57

表 65 农业部 2349 号公告-8-2015 液相色谱-串联质谱法回收率试验结果

No.	化合物	平均回收率 (%)				
		乳猪配合饲料	蛋鸡浓缩饲料	肉牛精料补充料	畜禽用复合预混合饲料	鱼粉
1	二甲氧苄胺嘧啶	69.06	62.70	66.85	72.20	64.64
2	三甲氧苄氨嘧啶	69.43	64.61	69.54	72.15	65.42
3	二甲氧甲基苄氨嘧啶	67.56	64.66	60.89	66.24	68.38

2.7 修订前后技术内容的对比

本标准修订前后技术内容的对比详见表 66。

表 66 标准修订前后技术内容对比

No.	章条编号	修订前	修订后	主要技术差异
1	1 范围	<p>本标准规定了饲料中三甲氧苄胺嘧啶的高效液相色谱法。</p> <p>本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中三甲氧苄胺嘧啶含量的测定。</p> <p>本方法的最低检出限为 1.0 mg/kg，最低定量限为 2.0 mg/kg。</p>	<p>本文件描述了饲料中二甲氧苄胺嘧啶、三甲氧苄胺嘧啶和二甲氧甲基苄胺嘧啶的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。</p> <p>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饲料原料中二甲氧苄胺嘧啶、三甲氧苄胺嘧啶和二甲氧甲基苄胺嘧啶的测定。</p> <p>本文件液相色谱-串联质谱法的检出限为 2.5 µg/kg、定量限为 5.0 µg/kg，高效液相色谱法的检出限为 0.25 mg/kg、定量限为 0.50 mg/kg。</p>	<p>(1) “三甲氧苄胺嘧啶”更改为“三甲氧苄胺嘧啶”，增加了二甲氧苄胺嘧啶和二甲氧甲基苄胺嘧啶。</p> <p>(2) 适用范围更改为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和饲料原料。</p> <p>(3) 增加了液相色谱-串联质谱法。</p> <p>(4) 高效液相色谱法的检出限更改为 0.25 mg/kg，定量限更改为 0.5 mg/kg；增加了液相色谱-串联质谱法的检出限和定量限。</p>
2	4	无	液相色谱-串联质谱法（仲裁法）	增加了液相色谱-串联质谱法，并作为仲裁方法。
3	5.1 原理	<p>用二氯甲烷-乙酸钠溶液提取饲料中的三甲氧苄胺嘧啶，经离心除去固体物及部分杂质后，取下层有机相适量，氮气吹干后用 1%冰乙酸溶液复溶，正己烷除脂，下层水相经滤膜过滤后用高效液相色谱紫外检测器检测。</p>	<p>试样中的二甲氧苄胺嘧啶、三甲氧苄胺嘧啶和二甲氧甲基苄胺嘧啶在碱性条件下用乙酸乙酯提取，经混合型强阳离子交换小柱净化，高效液相色谱仪测定，外标法定量。</p>	<p>样品提取溶剂更改为用乙酸乙酯，样品净化方法更改为混合型强阳离子交换小柱净化。</p>

No.	章条编号	修订前	修订后	主要技术差异
4	试验步骤	试验步骤为称样、提取、净化、氮吹浓缩、复溶后上机测定。	试验步骤为称样、提取、净化、氮吹浓缩、复溶后上机测定。	更改了样品称样量、样品提取和净化方法。
5	上机测定条件	7.3.1 液相色谱条件 柱温：35°C； 流动相：0.5% 乙酸溶液+甲醇，75+25（V1+V2） 检测波长：270nm； 进样体积：50 μL。	5.5.3 高效液相色谱参考条件柱温：30°C； 流动相：磷酸二氢钾溶液+甲醇=75+25（V:V） 检测波长：230 nm； 进样体积：20 μL。	更改了高效液相色谱法的柱温、流动相、检测波长和进样体积。
6	精密度	同一实验室由同一操作人员使用同一台仪器完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于15%。	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超过该算术平均值的20%。	

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

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

与国内、国际、国外同类标准技术内容的对比详见表 67。

表 67 与国内外同类标准技术内容对比

No.	标准号和标准名称	国内、国际、国外同类标准	GB/T 21037 - 202×
1	农业部 2349 号公告-8-2015 饲料中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶的测定 液相色谱-串联质谱法	液相色谱-串联质谱法（外标法定量）	液相色谱-串联质谱法（内标法定量）、高效液相色谱法（外标法定量）

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准未合规引用或采用国际国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等、严格执行国家强制性标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

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

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到

文本；

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

(3) 建议本标准正式发布后，设定6个月的过渡期，过渡6个月后实施。

十、其他应当说明的事项

无。

参考文献

- [1]李文辉,李建,孙志文.高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡脂肪中磺胺嘧啶、甲氧苄啶的残留量[J].食品安全质量检测学报,2020,11(02):562-566.
- [2]杨华生.酶联免疫法测定畜产品及牛奶中磺胺类药物残留[J].今日畜牧兽医,2019,35(05):5-7.
- [3]郭京超,孙亚奇,刘振利,王旭,袁宗辉.兽用二氨基嘧啶类抗菌增效剂毒理学研究进展[J].中国兽药杂志,2019,53(01):77-84.
- [4]孙玉慧,李天宝,范志超,李文斌.固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中甲氧苄啶残留量[J].中国测试,2016,42(02):56-58.
- [5]Wang Xu,Tan Ziqiang,Cheng Guyue,Awais Ihsan,Huang Lingli,Chen Dongmei,Pan Yuanhu,Liu Zhenli,Yuan Zonghui. Two-generation reproduction and teratology studies of feeding aditoprim in Wistar rats.[J]. Journal of applied toxicology : JAT,2015,35(12).
- [6]Wang Xu,Su Shijia,Ihsan Awais,Huang Qin,Chen Dongmei,Cheng Guyue,Liu Zhenli,Wang Yulian,Yuan Zonghui. Acute and sub-chronic toxicity study of diaveridine in Wistar rats.[J]. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP,2015,73(1).
- [7]吴梅梅,常明向.甲氧苄啶与 58 种中药联用抗菌增效作用的研究[J].中国医药导报,2015,12(13):27-31+35.
- [8]韩冰,杨洪波,王荻,卢彤岩.复方磺胺甲噁唑在鲫鱼体内的药代动力学研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(03):13-19.
- [9]董杰.细菌获得性抗生素耐药基因研究进展[J].中国预防医学杂志,2015,16(01):71-74.
- [10]周红霞,杜丹丹,王颖,李慧素,吴宁鹏.12 种兽药中非法添加甲氧苄啶的 HPLC-PDA 检查方法的建立[J].中国兽药杂志,2014,48(11):43-48.
- [11]刘灿.嗜麦芽窄食单胞菌对磺胺类抗菌药物耐药机制的研究进展[J].安徽医药,2014,18(05):961-963.
- [12]高洋洋,张朝晖,刘鑫,卢晓宇,严华,何悦,杨大进,云环.超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中的磺胺增效剂[J].色谱,2014,32(05):524-528.
- [13]孙波,周洪英,吴洪丽,叶建美,许淑琼.甲氧苄啶在家蚕体内的药代动力学研究[J].蚕业科学,2014,40(01):59-63.
- [14]元波,郭红燕,高又文,曾振灵.猪粪便和尿液中二甲氧苄啶的液相色谱串联质谱检测方法

研究[J].广东农业科学,2013,40(17):101-103.

[15]汪建国.我国渔药研究与应用综述(14)[J].渔业致富指南,2013(14):68-72.

[16]万宇平,冯才伟,赵正苗,张禹,韩京朋.三甲氧苄氨嘧啶胶体金免疫层析检测试纸条的研制[J].中国乳品工业,2013,41(02):24-27.

[17]郑重莺,张海琪,周燕,周凡,林静.液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲氧苄啶的残留[J].中国渔业质量与标准,2012,2(02):89-93.

[18]邵耀东,胡彬,赵小华,谢纪兰,郑贵超.高效液相色谱法测定甲氧苄啶含量[J].动物医学进展,2012,33(05):81-84.

[19]孙玮.一种测定水产品中残留甲氧苄啶的方法探讨[J].吉林农业,2011(07):91+93.

[20]刘振伟,姜兆兴,曹旭,王智亮.固相萃取-高效液相色谱法测定动物组织中甲氧苄氨嘧啶及磺胺类药物残留[J].中国动物检疫,2010,27(05):36-38.

[21]张桂枝,靳双星,焦喜兰.双波长分光光度法测定复方磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中两主药的含量[J].西北农业学报,2010,19(04):21-23.

[22]杜玥,杨慧元,徐伟东.液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 23 种磺胺及其增效剂残留[J].药物分析杂志,2010,30(03):471-478.

[23]梅光明,陈雪昌,张小军,朱婧睿,李铁军,郑斌.高效液相色谱法测定水产品中残留的甲氧苄啶[J].食品科学,2010,31(06):248-251.

[24]蒋原,沈崇钰,姚义刚,丁涛,贾涛,赵厚民,徐锦忠.动物源性食品中磺胺类药物增效剂残留的高效液相色谱-串联质谱法测定[J].分析测试学报,2009,28(07):834-837+841.

[25]程林丽,张素霞,沈建忠,刘金凤,闻人乐群.饲料中三甲氧苄氨嘧啶的 HPLC 检测[J].分析测试学报,2008(01):88-90.

[26]吴银良,赵莉,刘勇军,姜艳彬,刘兴国,沈建忠.固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中残留的 9 种磺胺类药物[J].色谱,2007(05):728-731.

[27]孙晶玮,赵新淮.微生物法检验乳中抗生素残留的局限性[J].东北农业大学学报,2007(04):507-510.

[28]邓旭明.耐药突变选择窗与抗菌药物防突变浓度[A].中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会.中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第九次学术讨论会论文与摘要集[C].中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会:中国畜牧兽医学会,2006:9.

[29]林海丹,林峰,吴映璇.高效液相色谱法测定动物源性食品中甲氧苄氨嘧啶药物残留[J].检验检疫科学,2003(05):5-6.

[30]刘建晖,刘佩玉.双波长分光光度法检测二甲氧苄啶的含量[J].兽药与饲料添加

剂,2003(03):34-35.

[31]陈杖榴,肖田安.人工合成抗菌药——磺胺类及二氢嘧啶类[J].中国家禽,2002(12):36-37.

[32]Tomoko Ono-Ogata,Tomoe Ogino,Michiko Nishikawa,Toshihiro Ohta,Hideo Yamagata. Mutagenic activity and mutational specificity of antiprotozoal drugs with and without nitrite treatment[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis,2002,39(1).

[33]高建华,林鹏,陈彬.荧光分光光度法直接测定炎痢停片中的甲氧苄氨嘧啶和氟哌酸[J].分析实验室,1999(06):37-41.

[34]Tomoko Ono,Tatsuro Sekiya,Yoshiyuki Takahashi,Yu F Sasaki,Fusako Izumiyama,Emi Nishidate,Shuji Tsuda,Toshihiro Ohta. The genotoxicity of diaveridine and trimethoprim[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology,1997,3(4).

[35]李华玉,伏光华.差示分光光度法测定增效黄连素片中甲氧苄氨嘧啶含量[J].山东医药工业,1996(03):21.

[36]Harold C. Neu. The Crisis in Antibiotic Resistance[J]. Science,1992,257(5073).

[37]Yoshimura H. Mutagenicity of the coccidiostat diaveridine in the Salmonella/mammalian microsome assay.[J]. Mutation research,1991,261(2).

[38]孙英.磺胺类药临床合并用药的若干问题[J].中国医院药学杂志,1984(10):12-14.

[39]田友道.抗菌增效剂:甲氧苄氨嘧啶[J].医学资料选编,1974(01):40.

[40]R. Schulz. Distribution and elimination of trimethoprim in pregnant and newborn rats[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,1972,272(4).

[41]Trimethoprim, a sulphonamide potentiator.[J]. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy,1968,33(1).

[42]宋占腾,肖志明,王石,樊霞,索德成.液相色谱-串联质谱同步检测饲料中 26 种磺胺和 3 种磺胺增效剂[J].饲料工业,2021,42(06):52-59.

[43]宋梓豪,石会娟,王鹏,赵文,张金振,黄京平,金玥.蜂蜜中 26 种磺胺及其增效剂类药物残留检测方法研究[J].农产品质量与安全,2021(01):60-66.

[44]李文辉,孙志文.超高效液相色谱-串联质谱法同时检测鸡蛋中 5 种磺胺类药物和甲氧苄啶残留量[J].中国兽药杂志,2020,54(08):34-40.

[45]刘永涛,韩刚,宋金龙,董靖,胥宁,杨移斌,杨秋红,艾晓辉.改良的 QuEChERS/UPLC 法测定鱼组织中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑与甲氧苄啶[J].分析测试学报,2019,38(08):973-978.

[46]李晓娜,李君秀,付辉,杨星星,李细清,汪凤林,杨中,朱海,严义勇.牛奶中甲氧苄啶胶体金快速检测装置的研制[J].安徽农业科学,2016,44(07):63-65+78.

- [47]Wang Jian,Leung Daniel,Chow Willis,Chang James,Wong Jon W. Development and Validation of a Multiclass Method for Analysis of Veterinary Drug Residues in Milk Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry.[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2015,63(41).
- [48]钱琛,李静,陈桂良.动物源性食品兽药残留分析中样品前处理方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2015,6(05):1666-1674.
- [49]Oscar Núñez,Héctor Gallart-Ayala,Claudia P.B. Martins,Paolo Lucci. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis[J]. Journal of Chromatography A,2012,1228.
- [50]汪洋. 超高压液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查养殖水产品及其渔用投入品中多种类药物的研究[D].上海海洋大学,2018.