

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4840—2025

饲料中7种抗生素滤渣的鉴别

Identification for 7 kinds of antibiotic fermentation residues in feeds

2025-12-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

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

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心(北京)]、中国农业大学、上海市动物疫病预防控制中心、江苏农林职业技术学院、新疆农业大学、新疆维吾尔自治区畜牧科学院、中国农业科学院饲料研究所、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、江苏省农业科学院、布鲁克(北京)科技有限公司、河南全印检测技术有限公司、信阳市农业综合行政执法支队、河南牧业经济学院、河南联牧兽药有限公司。

本文件主要起草人：樊霞、杨增玲、索德成、陈爱亮、吴自军、樊克锋、韩鲁佳、黄士新、郑文新、冯玉超、李守学、曹莹、李阳、宫平、肖志明、常选妞、李俊、沈广辉、刘晓露、赵跃、葛辰俊、樊宇航、陆唯、石创业、张娟、陶亚飞、严凤、黄家莺、栾雪瑶、李润娴。



饲料中 7 种抗生素滤渣的鉴别

1 范围

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

本文件中的显微红外光谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料原料和混合型饲料添加剂中金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素、青霉素和阿维菌素滤渣的鉴别。

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

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

本文件的检出限均为 1%。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

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

3 术语和定义

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

3.1

抗生素滤渣 antibiotic fermentation residue

生物发酵生产抗生素产品过程中产生的固态废弃物。

3.2

余弦相似度 cosine similarity

两个光谱向量的夹角余弦值。

注：用于衡量光谱间的差异大小，余弦相似度值越接近 1，说明两个光谱越相似。

3.3

阈值 threshold

根据余弦相似度判断待测光谱是否和目标光谱相似的临界值。

4 通则

试样应同时选择显微红外光谱法、液相色谱-高分辨质谱法、实时荧光 PCR 法进行检测。

5 显微红外光谱法

5.1 原理

利用显微红外成像系统采集样品的显微红外光谱，计算样品显微红外光谱与抗生素滤渣显微红外参

比光谱的余弦相似度,根据阈值鉴别样品中抗生素滤渣的存在。

5.2 试剂或材料

5.2.1 阳性对照样品:至少含有5%(质量分数)目标抗生素滤渣的饲料样品。

5.2.2 阴性对照样品:不含目标抗生素滤渣的饲料样品。

5.3 仪器设备

5.3.1 显微红外成像系统

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

5.3.2 压片机

配有压片模具、压力表、加压系统和保护装置等。可将饲料粉末压成表面平整光滑且不易损坏的压片。

5.4 样品

按GB/T 20195的规定制备试样,至少200 g,粉碎使其全部过0.425 mm试验筛,混合均匀,装入密闭容器中,备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样压片制备

平行做两份试验。取适量试样,用压片机在一定压力及压制时间制备试样压片,所用试样质量、压力和压制时间的确定应确保压片表面平整且在分析过程中不易破损。

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

在试样压片制备过程中,应保持压片模具的清洁,不应出现样品污染。试样压片在制备及分析过程中不应触摸,以防污染样品。

阳性对照样品(5.2.1)和阴性对照样品(5.2.2)同步制备。

5.5.2 显微红外光谱采集

显微红外光谱采集参考条件如下:

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

5.5.3 显微红外光谱预处理

用主成分降噪方法提高显微红外光谱的信噪比,对光谱进行二阶导数处理。若使用的显微红外成像系统的波数范围包含 CO_2 在 $2\,349\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收信号,应剔除。

5.5.4 抗生素滤渣参比光谱获取

抗生素滤渣参比光谱的获取按附录A中A.1的规定执行。

5.5.5 余弦相似度计算

试样显微红外光谱与抗生素滤渣参比光谱的余弦相似度以S计,按公式(1)计算。

$$S = \frac{A \cdot B}{|A| \cdot |B|} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A —— 试样的显微红外光谱;

B —— 抗生素滤渣的参比光谱。

5.6 质量控制

符合以下条件检测结果成立,否则应重新检测:

- a) 阴性对照:无相似度高于或等于阈值(阈值的确定按A.2的规定执行)的光谱检出;
- b) 阳性对照:有相似度高于或等于阈值的光谱检出,且与添加的目标抗生素滤渣一致;
- c) 两份平行检测样品结果一致。

5.7 结果判定

在符合 5.6 的情况下,若余弦相似度大于或等于阈值,则判定为含有抗生素滤渣的阳性样品。根据余弦相似度列出含有抗生素滤渣的种类。若余弦相似度低于阈值,则判定为阴性样品。

6 液相色谱-高分辨质谱法

6.1 原理

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

6.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

6.2.1 水:GB/T 6682,一级。

6.2.2 甲酸:色谱纯。

6.2.3 甲醇:色谱纯。

6.2.4 乙腈:色谱纯。

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

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

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

6.2.8 抗生素滤渣特征标志物的标准品:如相关的特征能获得,应收集相关名称、分子量、配制溶剂等信息,可以获得相关信息的标准品见附录 B。

6.2.9 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取适量标准品(以有效成分计,精确至 0.01 mg),采用附录 B 中对应溶剂配制。

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

6.2.11 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

6.2.12 阳性对照样品:在阴性对照样品加入至少含有 5%(质量分数)目标抗生素滤渣,混合均匀,制成阳性对照样品。

6.2.13 阴性对照样品:不含抗生素滤渣的饲料样品。

6.3 仪器设备

6.3.1 液相色谱-高分辨质谱仪:一级分辨率不小于 20 000[以利血平 $m/z = 609.2807$ 为基准,按半峰宽(FWHM)计],质量准确性相对偏差不大于 5×10^{-6} (parts per million, $m/z = 609.2807$);二级分辨率不小于 10 000。

6.3.2 分析天平:精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

6.3.4 超声波清洗仪。

6.4 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样,至少 200 g,粉碎使其全部过 0.425 mm 试验筛,充分混匀。装入密闭容器中,备用。选取类型相同,均匀一致且在待测物保留时间处,仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为空白样品。

6.5 试验步骤

6.5.1 提取

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

(6.2.11)过滤,上机检测。

阳性对照样品(6.2.12)和阴性对照样品(6.2.13)同步提取。

6.5.2 测定

6.5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈柱,柱长 100 mm,内径 3.0 mm,粒径 1.7 μm,或性能相当者;
- b) 柱温: 30℃;
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 进样量: 5 μL;
- e) 流动相: A 为 0.1%甲酸溶液(6.2.5), B 为乙腈,梯度洗脱,洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

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

6.5.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源: 电喷雾离子源(ESI);
- b) 电离模式: 正离子扫描(ESI+);
- c) 采集模式: 一级全扫描和子离子二级全扫描(FULL-DD-MS², 高灵敏度模式), 或效果相当的其他扫描模式;
- d) 扫描质量范围: MS 扫描范围: m/z 100~2 000;
- e) 毛细管电压: 4.0 kV;
- f) 离子源温度: 120℃;
- g) 去溶剂温度: 320℃。

6.5.2.3 标准工作溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下,取标准工作溶液(6.2.10)和试样溶液(6.5.1)上机测定。

6.5.3 高分辨特征质谱信息模型的构建及特征标志物的确定

6.5.3.1 高分辨特征质谱信息模型的构建

高分辨特征质谱信息模型的构建按附录 C 的规定执行。

6.5.3.2 特征标志物的确定

特征标志物的确定按附录 C 的规定执行。

6.6 质量控制

符合以下条件检测结果成立,否则应重新检测:

- a) 阴性对照: 没有相应的特征标志物检出或与相应的抗生素滤渣质谱信息模型不一致;
- b) 阳性对照: 特征标志物检出或与相应的抗生素滤渣质谱信息模型一致;
- c) 两份平行检测样品结果一致。

6.7 抗生素滤渣质谱鉴别

6.7.1 质谱鉴别

饲料中抗生素滤渣可以通过特征标示物和自建高分辨特征质谱信息模型进行鉴别。

6.7.2 特征标志物的鉴别

如特征标志物存在商业化标准物质,应使用标准物质进行对照试验,使用空白基质制备基质匹配标准溶液上机测定。基质匹配标准溶液中标准物质浓度应与试样溶液中目标化合物的浓度接近。对于没有标准物质的特征标志物,使用对应的抗生素滤渣提取液(C.3)进样,抗生素滤渣提取液中特征标志物浓度应与样品中目标化合物的浓度接近。

在二级离子扫描(Target MS/MS)下检测其在不同碰撞能下典型的二级碎片离子(见附录D)。如果至少有2个及以上丰度较高的碎片离子测定精确质量数与特征标志物相应碎片离子质量数相对偏差小于或等于 10×10^{-6} ,且上述二级碎片离子与浓度接近的抗生素滤渣提取液中特征标志物中对应的碎片离子的相对丰度一致,即定的范围,且平行试验结果一致的情况下,可判定为试样中存在该特征标志物。

6.7.3 高分辨特征质谱信息模型鉴别

将质量数提取窗口调整至一级母离子为 10×10^{-6} ,二级子离子为 20×10^{-6} 、对试样溶液的全扫描所获得的总离子流图进行提取,选择可辨识的色谱峰,将其与经验证的抗生素滤渣高分辨特征质谱信息进行对比。对比结果同时符合表2中所示条件时,可认为筛查到与特征质谱信息模型一致的抗生素滤渣。

表2 筛查判定条件

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

6.7.4 结果判定

若待测物检测出2种以上特征标志物,或与抗生素滤渣特征质谱信息模型一致,则判定该样品含有某种滤渣,为阳性样品;否则为阴性样品。

7 实时荧光 PCR 法

7.1 原理

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

7.2 试剂或材料

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

7.2.1 水:GB/T 6682,一级。

7.2.2 $2 \times$ 实时荧光PCR预混液。

7.2.3 盐酸溶液(1 mol/L):移取盐酸8.33 mL,用水稀释至100 mL,混匀。

7.2.4 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取氢氧化钠4.0 g,用水溶解并稀释至100 mL,混匀。

7.2.5 Tris-HCl溶液(1 mol/L,pH 8.0):称取6.06 g三羟甲基氨基甲烷(Tris),加入40 mL水溶解,转移至50 mL容量瓶中,用1 mol/L盐酸溶液(7.2.3)调pH至8.0,定容,混匀。

7.2.6 EDTA溶液(0.5 mol/L,pH 8.0):称取9.306 g二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加入35 mL水溶解,转移至50 mL容量瓶中,用1 mol/L氢氧化钠溶液(7.2.4)调pH至8.0,定容,混匀。

7.2.7 Tris-EDTA缓冲液:移取10 mL Tris-HCl溶液(7.2.5)和2 mL EDTA溶液(7.2.6),置于1 L容量瓶中,用水定容,混匀。

7.2.8 引物和探针溶液:用Tris-EDTA缓冲液(7.2.7)将每条引物和探针分别配制成 $10 \mu\text{mol/L}$ 溶液。分装, $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存。序列见附录E。

7.2.9 阳性对照样品:至少含有5%(质量分数)目标抗生素滤渣的饲料样品。

7.2.10 阴性对照样品:不含目标抗生素滤渣的饲料样品。

7.2.11 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

7.3 仪器设备

7.3.1 实时荧光 PCR 仪。

7.3.2 分析天平:精度为 0.01 mg。

7.3.3 紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪。

7.3.4 pH 计:精度为±0.1。

7.3.5 离心机:转速不低于 14 000 r/min。

7.4 样品

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

7.5 试验步骤

7.5.1 DNA 提取

平行做两份试验。称取 20 mg~50 mg 试样(精确至 0.01 mg),按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA,−18℃ 以下保存。

阳性对照样品(7.2.9)和阴性对照样品(7.2.10)同步提取。

7.5.2 DNA 浓度的测定

DNA 溶液(7.5.1)的质量浓度用紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪(7.3.3)测定,浓度应控制在 5 ng/μL~50 ng/μL。

7.5.3 实时荧光 PCR 检测

7.5.3.1 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 3。用等体积的水替代 DNA 溶液作为扩增空白对照。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系

单位为微升

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

7.5.3.2 反应程序

实时荧光 PCR 反应程序见表 4。

表 4 反应程序

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

7.6 质量控制

符合以下条件检测结果成立,否则应重新检测:

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

7.7 结果判定

在符合 7.6 的情况下,结果判定如下:

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

7.8 检测过程中防止交叉污染的措施

按 SN/T 1193 的规定执行。

8 综合判定

综合显微红外光谱法、液相色谱-高分辨质谱法、实时荧光 PCR 法的鉴定结果:

- a) 若两种或两种以上方法鉴别为阳性样品,则判定其含有某种滤渣;
- b) 若两种或两种以上方法鉴别为阴性样品,则判定不含有某种滤渣;
- c) 其他情况不判定。

附录 A

(规范性)

抗生素滤渣显微红外参比光谱获取和阈值确定

A.1 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取

A.1.1 抗生素滤渣样品采集

A.1.1.1 采集

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

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

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

A.1.1.2 制备

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

A.1.2 压片

抗生素滤渣压片制备见 5.5.1。

A.1.3 显微红外光谱采集

见 5.5.2。

A.1.4 显微红外光谱预处理

见 5.5.3。

A.1.5 抗生素滤渣显微红外参比光谱

选取有代表性和真实的抗生素滤渣建立抗生素滤渣显微红外参比光谱。

A.2 阈值的确定

计算确定阈值的抗生素滤渣样品的显微红外光谱与参比光谱的余弦相似度，根据余弦相似度值 2.5% 下百分位数确定阈值。阈值确定示例见 A.3。

A.3 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取和阈值确定示例

A.3.1 抗生素滤渣样品采集与制备

收集来自不同抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的代表性抗生素滤渣样品 26 个，种类及数量见表 A.1。采集的样品中水分含量较高的样品先在 60 °C 条件下烘干至恒重，后将所有干燥样品粉碎过 0.425 mm 试验筛。所有抗生素滤渣样品随机分为两部分：一部分为用于获取参比光谱的抗生素滤渣样品，另一部分为确定阈值的抗生素滤渣样品。

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

表 A.1 抗生素滤渣采集信息表

抗生素滤渣名称	数量,个
金霉素滤渣	3
土霉素滤渣	4
泰乐菌素滤渣	4
泰万菌素滤渣	4
新霉素滤渣	5
青霉素滤渣	3
阿维菌素滤渣	3
合计	26

A.3.2 显微红外光谱采集

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

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

A.3.3 显微红外光谱预处理

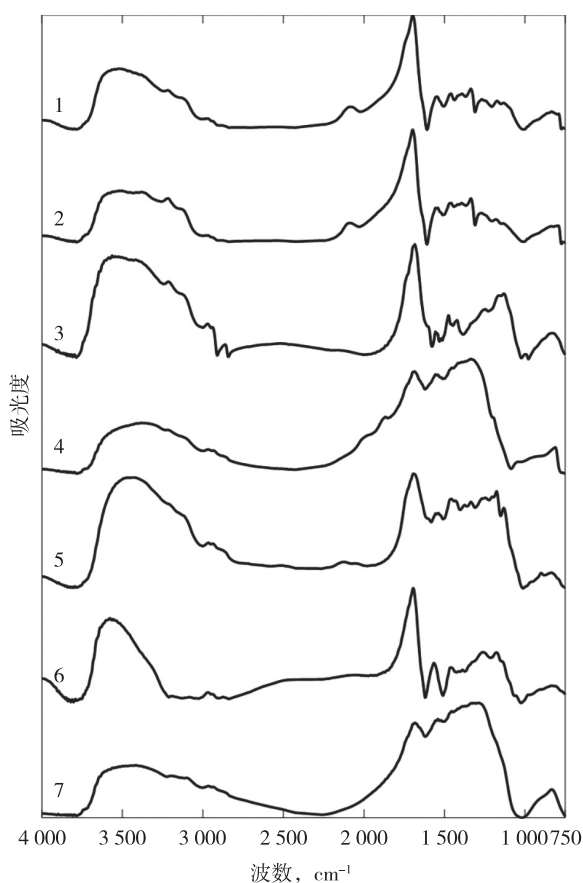
利用主成分分析进行降噪处理,通过优化选取前 20 个主成分对显微红外图像进行重构,从而实现显微红外光谱的降噪。对降噪后的红外光谱进行二阶导数处理(窗口宽度为 5)提高光谱的分辨率。剔除 $2\,263\text{ cm}^{-1}\sim 2\,422\text{ cm}^{-1}$ 波段的显微红外光谱以扣除 CO_2 信号对分析的干扰。

A.3.4 抗生素滤渣显微红外参比光谱

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

A.3.5 阈值的确定

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



标引序号说明:

- | | |
|------------|------------|
| 1——金霉素滤渣; | 5——新霉素滤渣; |
| 2——土霉素滤渣; | 6——青霉素滤渣; |
| 3——泰乐菌素滤渣; | 7——阿维菌素滤渣。 |
| 4——泰万菌素滤渣; | |

图 A.1 各类抗生素滤渣的平均显微红外参比光谱

表 A.2 抗生素滤渣鉴别显微红外光谱余弦相似度阈值

抗生素滤渣名称	显微红外参考光谱数	阈值(2.5%下百分位数)
金霉素滤渣	8 000	0.93
土霉素滤渣	16 000	0.96
泰乐菌素滤渣	16 000	0.92
泰万菌素滤渣	16 000	0.94
新霉素滤渣	20 000	0.92
青霉素滤渣	12 000	0.92
阿维菌素滤渣	12 000	0.90

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

附录 B

(资料性)

抗生素滤渣及部分特征标志物相关信息

抗生素滤渣及部分特征标志物相关信息见表 B.1。

表 B.1 抗生素滤渣及部分特征标志物相关信息

滤渣类型	特征标志物	纯度 %	溶剂	分子量	一级离子对	二级离子对
金霉素滤渣	金霉素	>98	甲醇	478.12	479.1215	292.105 0,307.128 6,335.123 1,367.149 5
	四环素四并苯骨架	N	—	357.10	358.102 9	323.065 8,308.042 7,341.076 0
	脱水四环素	>98	甲醇	442.14	427.145 3	410.130 0,154.052 0
土霉素滤渣	土霉素	>99	甲醇	460.15	461.155 4	154.050 0,201.054 9,337.070 8,426.118 6
	4-氨基脱水四环素	N	—	442.14	443.144 8	154.052 0,201.057 4,426.118 1,410.130 0
	脱水四环素	>98	甲醇	426.14	427.145 3	410.130 0,154.052 0
泰乐菌素滤渣	泰乐菌素	>98	乙腈	915.52	916.526 4	174.115 2,727.460 6
	泰万菌素	>98	乙腈	1 041.61	1 042.586 3	174.115 1,814.470 8,109.066 7
	泰乐酮	>98	乙腈	394.54	395.283 6	189.166 6,207.185 6
泰万菌素滤渣	泰乐菌素	>99	乙腈	915.52	916.526 4	174.115 2,772.460 6
	泰万菌素	>99	乙腈	1 041.61	1 042.586 3	174.115 1,814.470 8,109.066 7
	Methylmalonyl-CoA	>95	乙腈	867.60	868.512 4	174.115 2,109.066 8,640.379 3
	泰乐酮	>98	乙腈	394.54	395.280 0	189.166 6,207.285 6
新霉素滤渣	帕罗马明	N	甲醇	337.33	338.137 2	295.1 313,269.1109
	Ribostamycin	>98	乙腈	466.47	467.2128	338.1 399,295.1 336,130.083 3
青霉素滤渣	盘尼西林 N	N	—	359.39	360.222 4	201.125 6,243.144 1
	ACV 三肽	>98	乙腈	361.41	362.201 9	144.067 2,219.1 445,245.123 6

注：“N”代表目前没有对应的标准品。

附录 C

(规范性)

抗生素滤渣高分辨质谱信息模型的构建

C.1 抗生素滤渣要求

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

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

C.2 抗生素滤渣的采集与制备

C.2.1 抗生素滤渣的采集

收集来自不同抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的代表性抗生素滤渣样品 26 个,种类及数量见表 A.1。采集的样品中水分含量较高的样品先在 60 °C 条件下烘干至恒重。

C.2.2 抗生素滤渣的制备

见 6.4。

C.3 抗生素滤渣的提取

见 6.5.1。

C.4 液相色谱-高分辨质谱参考条件

见 6.5.2。

C.5 抗生素滤渣高分辨质谱信息模型的构建

C.5.1 采集代表性抗生素滤渣试样的液相色谱高分辨的质谱数据,利用基于 Duplex 等算法从每个抗生素滤渣质谱数据中选取相关代表性数据(选取至少 3 000 条抗生素药渣的代表性质谱数据),建立抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱库及特征标志物质谱数据库。计算未参与质谱库建立的样品与抗生素滤渣液相色谱-高分辨质谱中数据及特征标志物的数值,根据 5% 下百分位数来确定判别阈值(阈值的百分位数可由用户根据分析要求自行确定)。

C.5.2 可根据采集的代表性滤渣自建相关高分辨质谱信息通用模型。

附录 D

(资料性)

抗生素滤渣中部分特征标志物的参考质谱图

D.1 抗生素滤渣中金霉素二级离子图见图 D.1。

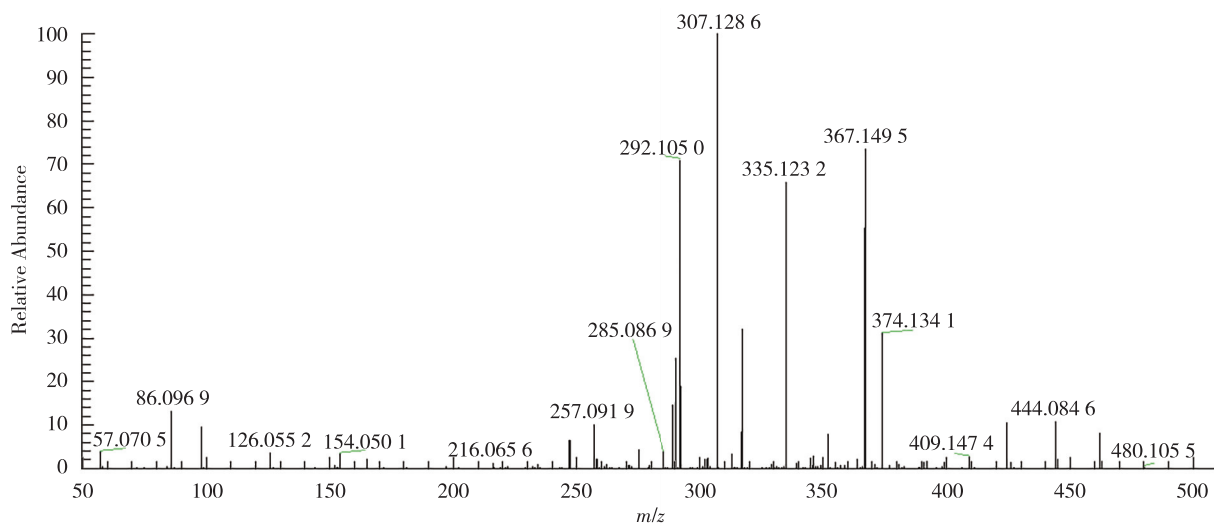


图 D.1 抗生素滤渣中金霉素二级离子图

D.2 抗生素滤渣中四环素四并苯骨架二级离子图见图 D.2。

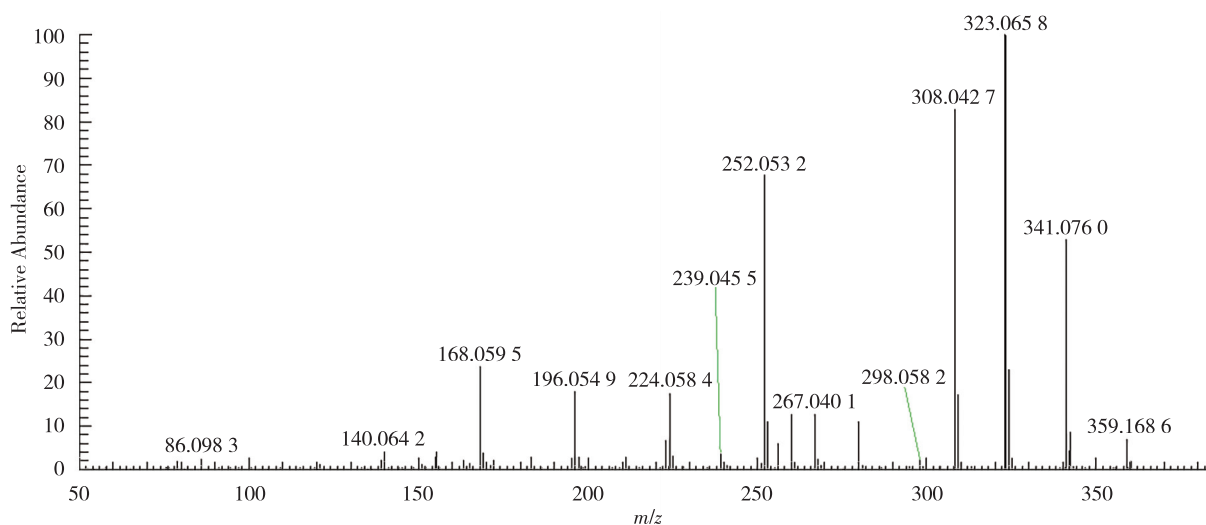


图 D.2 抗生素药渣中四环素四并苯骨架二级离子图

D.3 抗生素滤渣中脱水四环素二级离子图见图 D.3。

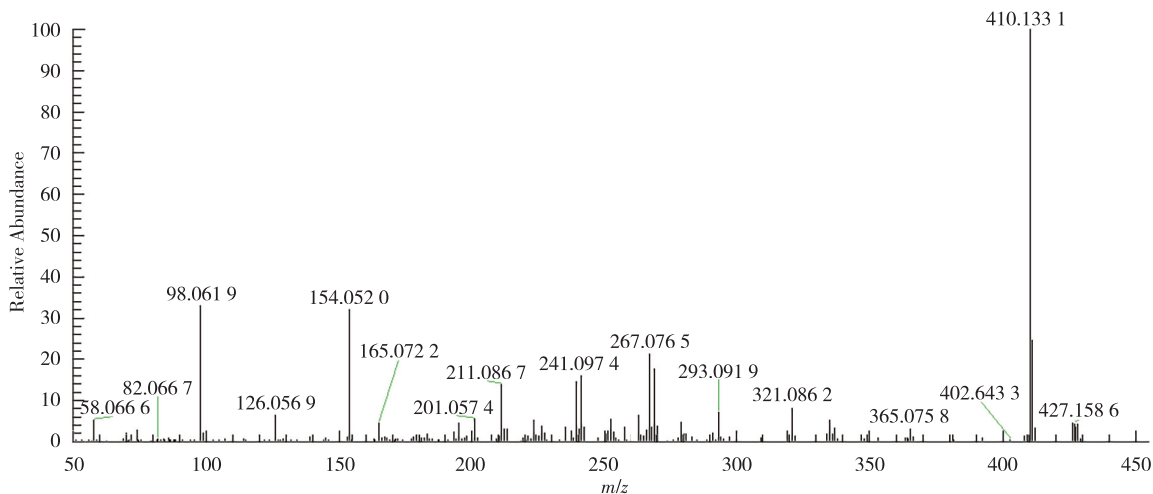


图 D.3 抗生素滤渣中脱水四环素二级离子图

D.4 抗生素滤渣中土霉素二级离子图见图 D.4。

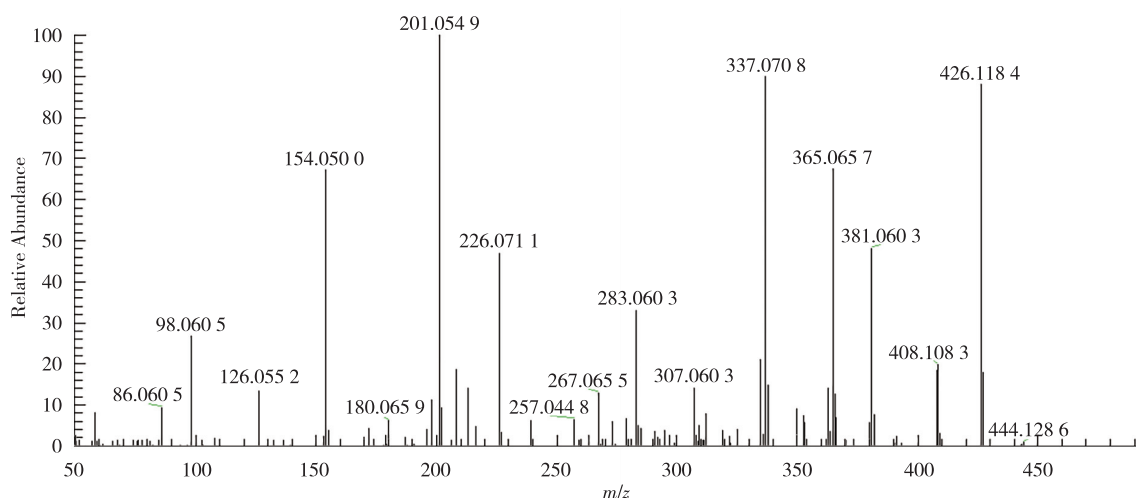


图 D.4 抗生素滤渣中土霉素二级离子图

D.5 抗生素滤渣中4-氨基脱水四环素二级离子图见图 D.5。

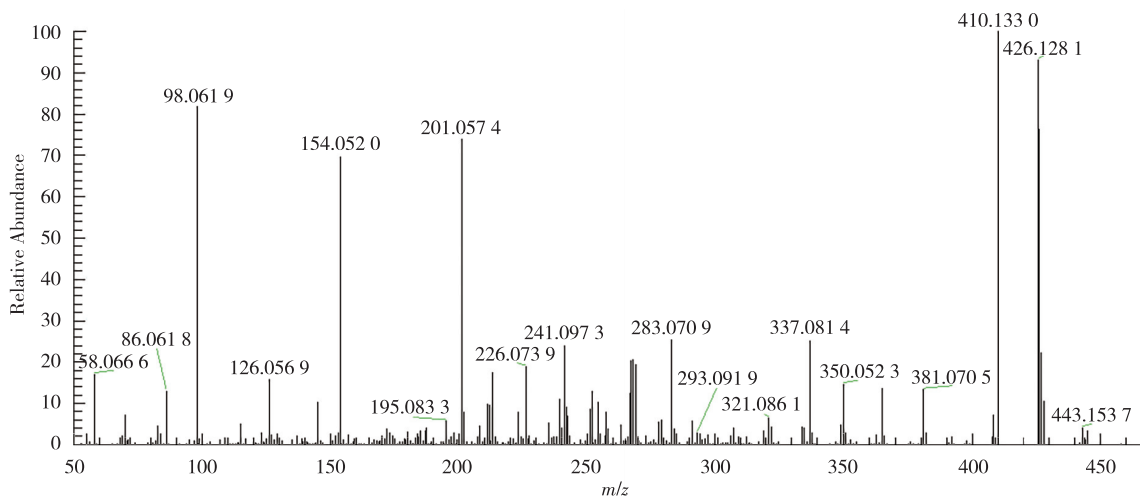


图 D.5 抗生素滤渣中4-氨基脱水四环素二级离子图

D.6 抗生素滤渣中泰乐菌素二级离子图见图 D. 6。

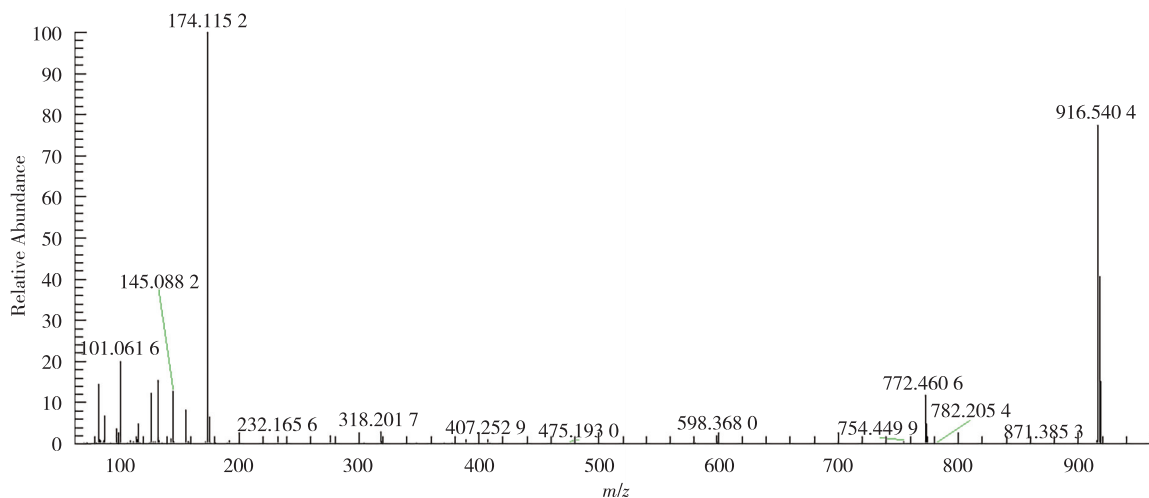


图 D.6 抗生素滤渣中泰乐菌素二级离子图

D.7 抗生素滤渣中泰万菌素二级离子图见图 D. 7。

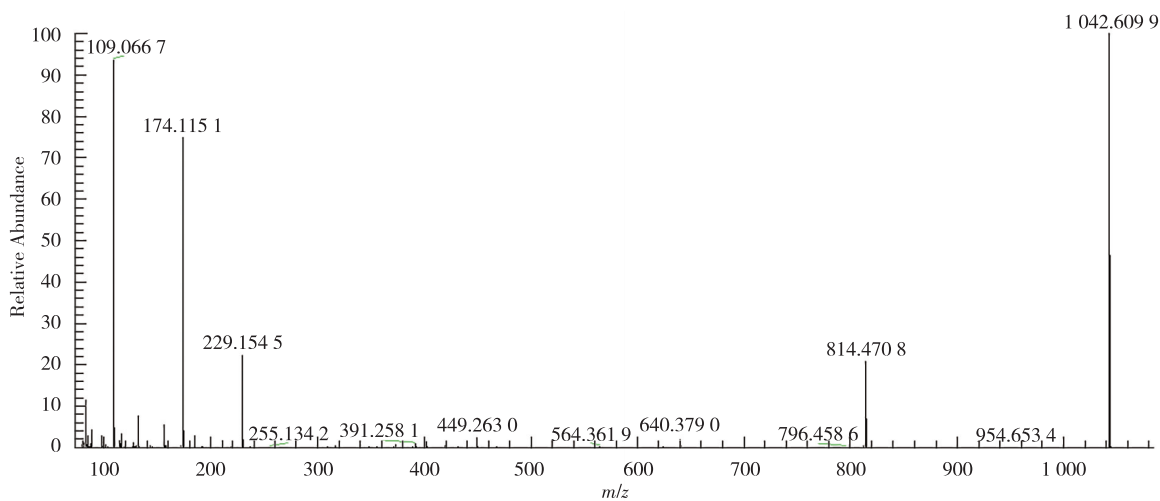


图 D.7 抗生素滤渣中泰万菌素二级离子图

D.8 抗生素滤渣中泰乐酮二级离子图见图 D. 8。

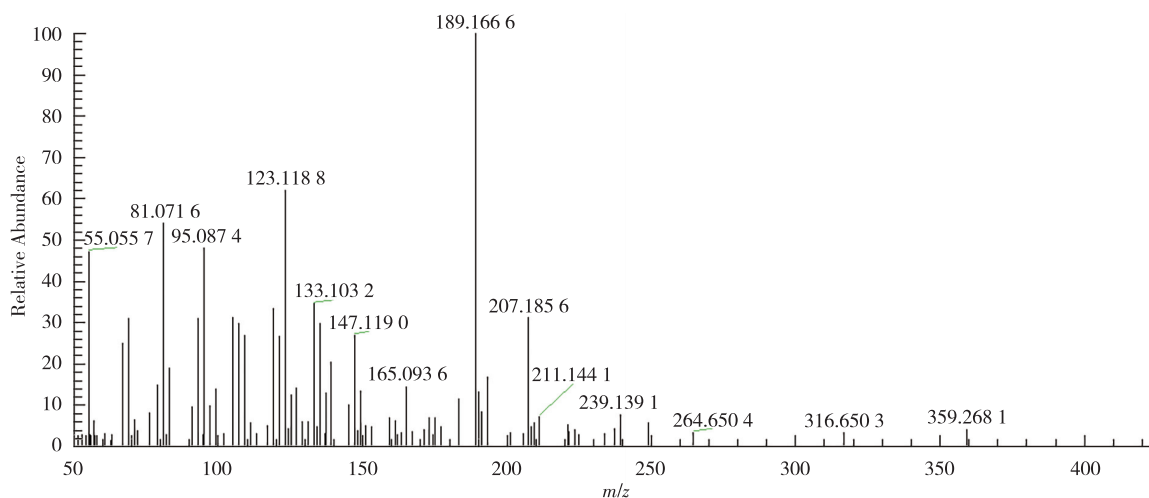


图 D.8 抗生素滤渣中泰乐酮二级离子图

D.9 抗生素滤渣中 Methylmalonyl-CoA 二级离子图见图 D.9。

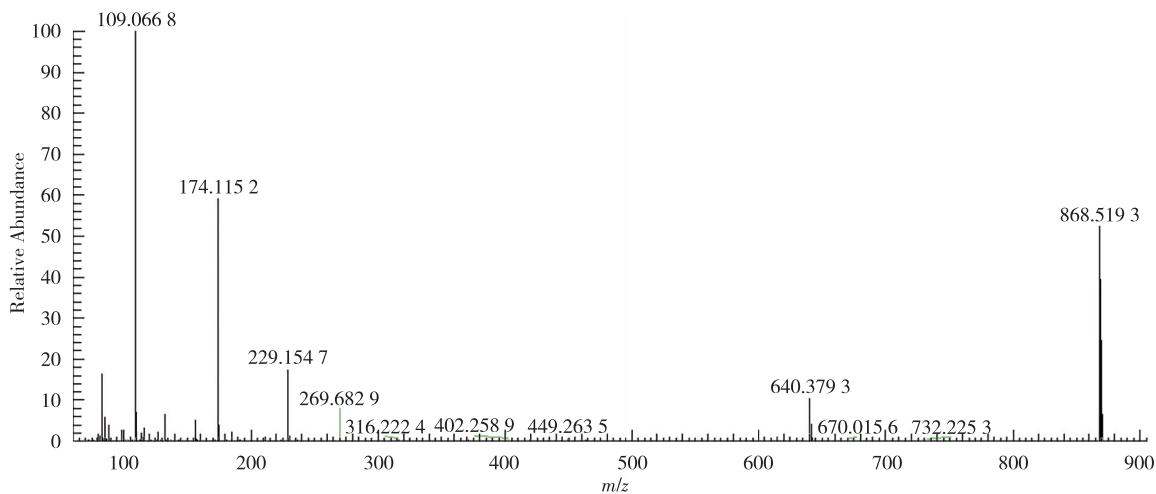


图 D.9 抗生素滤渣中 Methylmalonyl-CoA 二级离子图

D.10 抗生素滤渣中帕罗马明二级离子图见图 D.10。

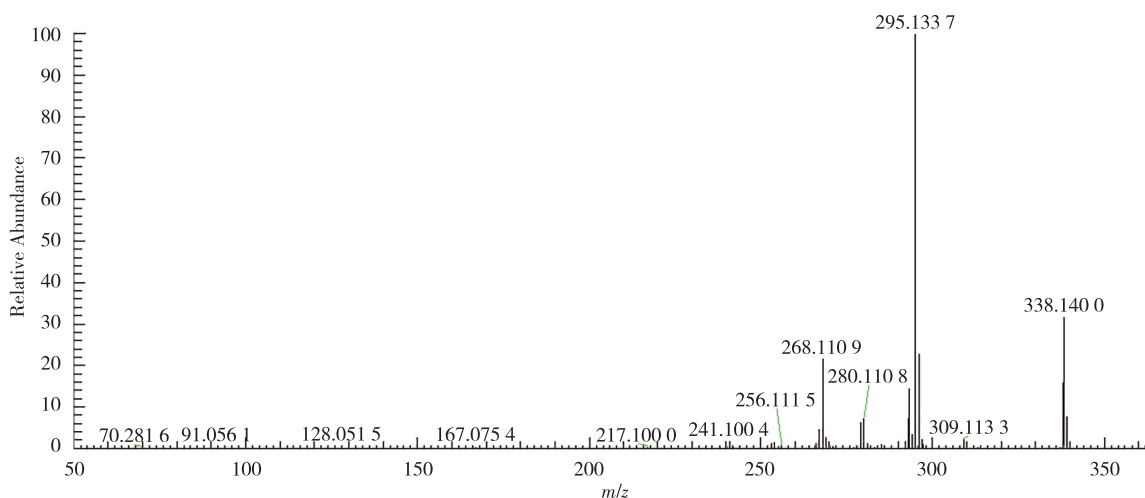


图 D.10 抗生素滤渣中帕罗马明二级离子图

D.11 抗生素滤渣中 Ribostamycin 二级离子图见图 D.11。

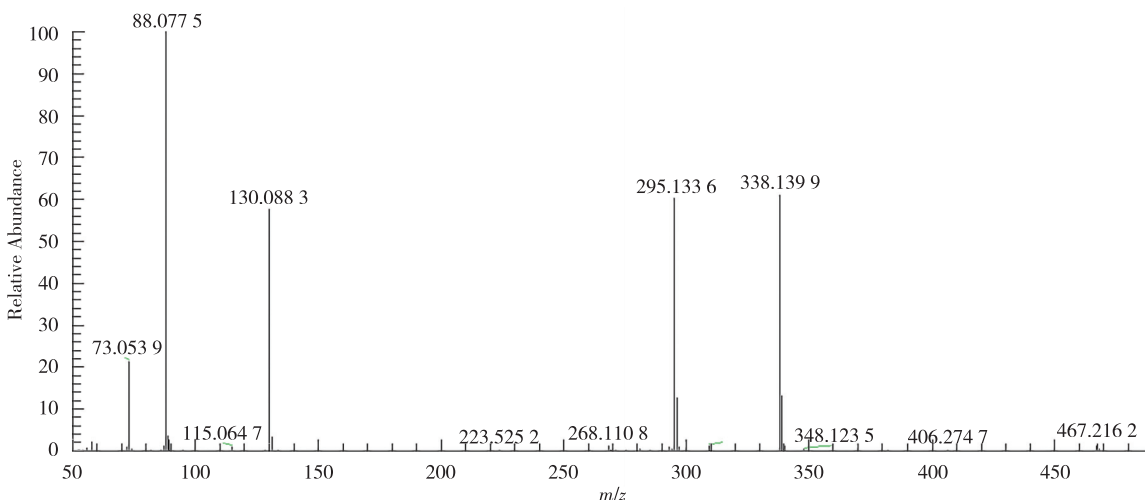


图 D.11 抗生素滤渣中 Ribostamycin 二级离子图

D. 12 抗生素滤渣中盘尼西林 N 二级离子图见图 D. 12。

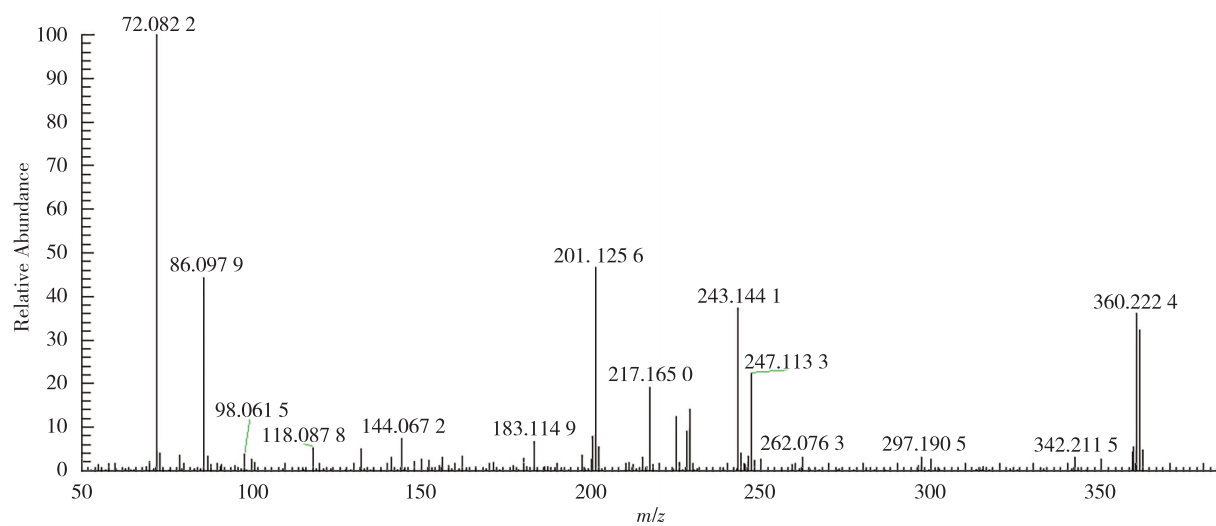


图 D. 12 抗生素滤渣中盘尼西林 N 二级离子图

D. 13 抗生素滤渣中 ACV 三肽二级离子图见图 D. 13。

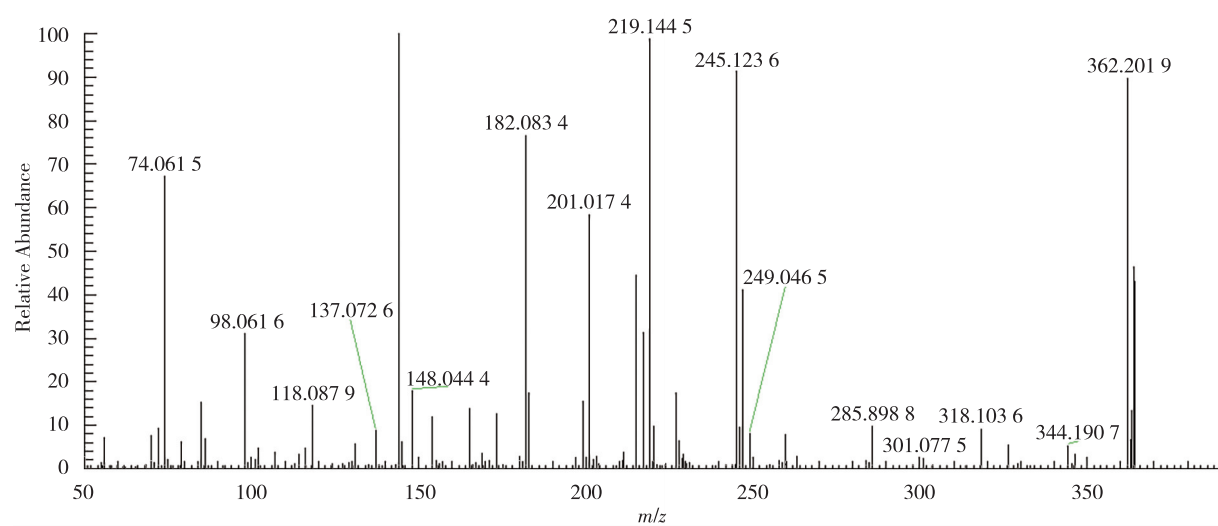


图 D. 13 抗生素滤渣中 ACV 三肽二级离子图

附录 E

(资料性)

抗生素滤渣检测用引物探针序列信息

抗生素滤渣检测用引物探针序列信息见表 E.1。

表 E.1 抗生素滤渣检测用引物探针序列信息

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