

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中抗生素滤渣的鉴别》

编制说明

(征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所等

2025年9月

目 录

一、工作简况	4
(一) 任务来源	4
(二) 制定背景	4
1. 抗生素滤渣的处理	4
2. 制定行业标准的意义	5
3. 抗生素滤渣检测方法进展	5
(三) 工作过程	6
1. 成立标准编制小组	6
2. 标准修订技术路线和方案制定	7
3. 样品收集、方法学研究和实际样品检测	7
4. 编写编制说明和征求意见稿、定向征求意见和标准验证	8
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	8
(一) 标准编制原则	8
(二) 主要技术内容确定的依据	9
1. 样品的收集	9
2. 显微红外光谱方法建立	10
3. 实时荧光 PCR 方法建立	45
4. 液相色谱-高分辨质谱方法建立	71
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	1
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	1
五、采标情况	1
六、与有关法律、法规的关系	1
七、重大分歧意见的处理经过和依据	1
八、涉及专利的有关说明	1
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
十、其他应当说明的事项	2
参考文献	3

一、工作简况

（一）任务来源

应行业监管需要和农业标准制修订工作安排，农业农村部农产品质量安全监管司下达 2025 年第二批农业国家和行业标准制修订项目计划，制订农业行业标准《饲料中抗生素滤渣的鉴别》，标准编号为 NYB-25235，业务司局为畜牧兽医局，标准技术归口单位为全国饲料工业标准化技术委员会，承担单位为中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、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、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）科技有限公司等。

（二）制定背景

1. 抗生素滤渣的处理

抗生素滤渣是生物发酵生产抗生素产品过程中产生的废弃物，其成分大致包括三部分：一是微生物菌丝体及未完全利用的培养基；二是提取抗生素时加入的絮凝剂、酸化剂、助滤剂等；三是未提取完全的抗生素及未知的发酵过程中间产物。以发酵生产土霉素为例，抗生素滤渣的产生过程为：（1）斜面培养基生长制备微生物孢子，培养基成分由麸皮、水、琼脂等组成；（2）种子培养，培养基成分由水、玉米浆、原辅料、氯化钠、黄豆饼粉、碳酸钙、糊精、淀粉等组成；（3）发酵，培养基成分由氯化钠、硫酸铵、磷酸二氢钾、淀粉、酵母粉、黄豆饼粉、碳酸钙、玉米浆等组成；（4）酸化，该过程需要加入黄血盐、硫酸锌、草酸等；（5）结晶过滤，将滤液分离后剩下的残渣即为土霉素滤渣。

抗生素滤渣营养成分丰富，粗蛋白含量高，很多抗生素滤渣粗蛋白含量高在 40% 以上，加之我国蛋白饲料资源短缺，在畜牧业发展初期，抗生素滤渣曾被作为饲料或饲料添加剂饲喂动物。但抗生素滤渣用作饲料的风险隐患逐渐显现：一是畜禽动物长期食用含有低剂量抗生素的饲料会破坏肠道内的有益微生物，降低动物消化吸收的能力，甚至会使动物的免疫力下降，容易感染疾病；二是长期低剂量的抗生素环境还会使动物体内某些细菌逐渐产生耐药性，耐药性细菌的产生不仅会增加养殖厂家保障动物健康的生产成本，还会增加耐药性细菌通过食物链危害生态环境与人类健康的几率；三是抗生素滤渣种类繁多，成分复杂，含有大量次级代谢产物，这些中间产物的种类、含量是否具有致病性以及动物体内的吸收、转化、蓄积情况不明，安全性尚不明确，将其添加到饲料中，会给动物性

食品乃至人类健康造成诸多的潜在风险。

2002 年我国将抗生素滤渣确定为禁止在饲料和动物饮用水中使用的物质；同年，最高人民法院和人民检察院共同发布了《关于办理非法生产、销售、使用禁止在饲料和动物饮用水中使用药品等刑事案件具体应用法律若干问题的解释》（法释[2002] 26 号），进一步强化了禁止将抗生素滤渣应用到饲料中的管理规定；2008 年我国又将抗生素滤渣按照化学药品原料药生产过程中的培养基废物列入了《国家危废名录》，按规定抗生素滤渣只能被焚烧处置和限制填埋。

2. 制定行业标准的意义

我国是抗生素生产大国，抗生素的产量约占全球的 20 %~30 %。抗生素的生产方法主要是工业发酵法，根据抗生素产量与对应滤渣产量的比例关系取均值后的换算比为 12.8，即生产 1 吨抗生素，会产生 12.8 吨抗生素滤渣。2020 年，我国抗生素的总产量已达 23.14 万吨，计算抗生素滤渣约 300 万吨。我国蛋白资源短缺，抗生素滤渣作为工业废弃物成本低廉，受利益驱使，将抗生素滤渣作为饲料的现象仍可能存在。为了保证饲料安全，促进饲料行业与畜牧业的健康发展，保障消费者能够获得健康安全放心的动物性食品，因此，制订饲料中抗生素滤渣的鉴别方法标准具有重要意义。

3. 抗生素滤渣检测方法进展

抗生素滤渣是一种典型的混合污染物，具有成分复杂、难表征的特点。抗生素滤渣检测的相关研究较少，目前已有的报道多是将抗生素滤渣中残留的抗生素作为检测目标。随着各国政府对抗生素残留实施越来越严格的规定，抗生素滤渣检测方法的研究也取得了显著的进展。近年来研究者们开发了一系列新型抗生素滤渣检测方法。

3.1 基于标志物的鉴别方法

这种方法通常涉及对抗生素滤渣中的特定化学标志物进行检测。通过比对样品中检测到的标志物与已知抗生素滤渣的标志物，可以判断样品中是否含有抗生素滤渣。

3.2 基于光谱成像和模式识别的鉴别方法

利用显微近/中红外成像、光谱重构、模式识别等原理，研制了抗生素滤渣快速识别技术。这种方法通过采集样品的光谱信息，利用机器学习等算法对光谱数据进行处理和分析，实现对抗生素滤渣的快速识别。

3.3 基于生产菌株的鉴别方法

那些能够产生特定抗生素的微生物，如细菌、放线菌等，通过发酵过程，这些菌株在适当的培养基和条件下产生抗生素。在抗生素生产过程中，发酵液经过提取、纯化等步骤后，剩余的抗生素滤渣中含有大量生产菌株菌体，通过设计针对特定抗生素合成相关基因的引物和探针，通过实时荧光 PCR 可以特异性地扩增并检测这些基因的存在，从而间接判断抗生素滤渣中是否含有存在。

3.4 基于微生物降解特性的鉴别方法

这种方法利用某些微生物对特定抗生素的降解能力，通过观察微生物的生长情况或代谢产物来间接判断样品中是否含有抗生素滤渣。然而，这种方法通常不如前几种方法直接和准确，因此在实践中应用较少。

综上所述，抗生素滤渣的鉴别方法多种多样，选择哪种方法取决于具体的应用场景和需求。在实际操作中，应根据样品的性质、检测目的和实验室条件等因素综合考虑，选择最合适的方法进行鉴别。

（三）工作过程

1. 成立标准编制小组

2024 年 5 月，中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所和中国农业大学工学院接到检测方法开发任务后，对检测方法的建立进行技术研讨，并商定了进行检测方法的标准化，特成立标准编制小组，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
樊霞	研究员	项目负责人, 抗生素滤渣样品获取、标准文本和编制说明完善、方法意见、征求意见
杨增玲	教授	显微红外光谱法技术负责人
陈爱亮	研究员	实时荧光 PCR 法技术负责人
索德成	研究员	液相色谱-高分辨质谱法技术负责人
李阳	副研究员	液相色谱-高分辨质谱法方法构建
刘晓露	助理研究员	抗生素滤渣样品和饲料样品采集及整理
冯玉超	研究实习员	方法学研究
樊宇航	研究生	实时荧光 PCR 法研究
张娟	助理研究员	实时荧光 PCR 法方案研究

黄土新	研究员	液相色谱-高分辨质谱法方法学研究
曹莹	正高级畜牧师	液相色谱-高分辨质谱法方法学研究
韩鲁佳	教授	显微红外光谱法实施方案制定
葛辰俊	研究生	显微红外光谱法检测方法研究、样品检测、数据收集分析
李守学	讲师	显微红外光谱法检测方法研究
沈广辉	副研究员	显微红外光谱法检测方法研究
赵跃	/	显微红外光谱设备校准
李俊	研究员	方法实际验证

2. 标准修订技术路线和方案制定

2024年5月-6月，标准编制小组查阅了抗生素滤渣检测方法国内外研究现状，同时调研国内抗生素滤渣生产状况，基于已有的研究基础形成标准制订内容和技术路线草案，草案经制定团队多轮讨论，最终确定了标准制订的主要内容、技术路线（见图1）、分工、完成时限等。

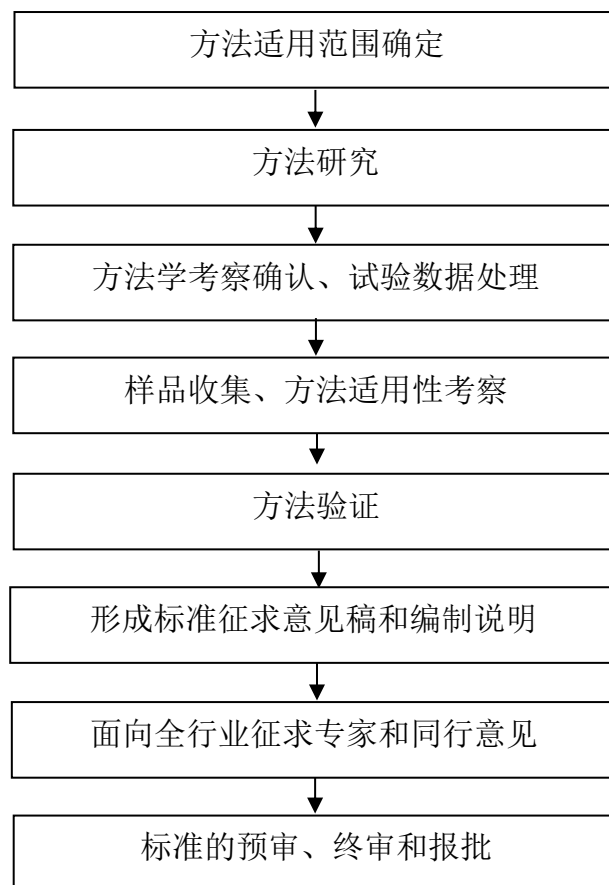


图1 标准制订技术路线图

3. 方法学研究和标准撰写

2024年6月,在前期检测方法研究基础上,工作小组按照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《标准编写规则 第4部分:试验方法标准》等编写规则完成标准草案和编制说明的撰写,形成了标准文本和编制说明的征求意见稿,并邀请专家对标准进行了预审。

4. 编写编制说明和征求意见稿、定向征求意见和标准验证

2024年7月-2025年1月,根据专家意见,进一步收集更多的代表性样品,继续开展方法学研究和实际样品检测。并委托3家实验室验证复核。

5. 定向征求意见、审定会与标准的合并

2025年2-5月,标准编制小组发送给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。根据专家意见修改标准文本和编制说明,形成公开征求意见稿。

2025年2月-5月,全国饲料工业标准化技术委员会组织专家对起草的标准《饲料中抗生素滤渣的鉴别》(送审稿)三个方法进行了认真审查,提出修改意见。工作小组根据修改意见修改了标准文本和编制说明。形成了报批稿。

6. 标准的合并和终审稿的形成

2025年4月,邀请专家进一步对标准进行研讨,会后根据专家和行业领导的意见,将3个方法标准合并成一个标准,并按照修改意见进行了进一步的修改,形成了终审稿。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

(一) 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《标准编写规则 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。

标准制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。

(二) 主要技术内容确定的依据

1. 样品的收集

样品采集：收集来自河北、山东、河南、内蒙古、浙江、湖北、福建等多个省份共 22 家抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的抗生素滤渣样本 44 个，种类及数量见表 2，共 19 类抗生素滤渣。

采集的样品均为湿滤渣，统一将湿滤渣放置在烘箱中在 60℃ 条件下烘干，所有样品使用旋风磨（ZM100，德国 Restsh 公司）粉碎，根据不同检测方法分别过筛。

表 2 抗生素滤渣采集信息表

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

2. 检测方法的选择

根据文献所述，抗生素滤渣的鉴别方法多种多样，选择哪种方法取决于具体的应用场景和需求。根据饲料样品的性质和抗生素滤渣特点，兼顾考虑检测准确度和实验室条件等因素，我们选择显微红外光谱、实时荧光 PCR、液相色谱-高分辨质谱方法进行饲料中抗生素滤渣鉴别。

3. 显微红外光谱方法的建立

3.1 抗生素滤渣显微红外光谱获取

3.1.1 样品处理

采集的样品中水分含量较高的样品先在 60℃ 条件下烘干至恒重，后将所有样品使用旋风磨（ZM100，德国 Restsh 公司）粉碎过 0.425 mm 筛。

3.1.2 试验压片的制备

为获得信噪比较高的显微红外光谱，需预先制备符合要求的试样压片。压片制备过程中，压片直径、试样质量、压力与保压时间等参数的设置需以确保压片表面平整、结构完整且不易破损为原则。本实验采用 BHY-81A 型压片机（AZZOTA Corporation，美国），压片直径为 13 mm。经多次试验优化，最终确定试样质量约为 200 mg，施加压力为 40 MPa，保压时间为 2 min，可制备出厚度约 1 mm、表面平整且不易破损的圆形压片。所制备的试样压片（图 2）在用于显微红外光谱测试前，需对其表面进行仔细检查，确保无凹陷、突起或裂痕等可能影响光谱质量的物理缺陷。制备过程中应始终保持压片模具清洁，以防止样品污染。同时，需避免直接用手接触压片，以保障样品的纯净度。



图 2 试样压片

3.1.3 显微红外光谱获取

本实验采用傅里叶变换显微红外成像系统采集试样的显微红外光谱，显微红外成像系统原理图如图 3 所示。按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，采集光谱前，添加液氮对检测器进行制冷，并预热 1h，然后进行

设备自检，设备自检成功后采集显微红外图像。综合考虑鉴别的准确度和分析效率等，确定的扫描参数如下：波数范围 $4\ 000\ \text{cm}^{-1}\sim 750\ \text{cm}^{-1}$ ，光谱分辨率为 $8\ \text{cm}^{-1}$ ，扫描次数为 16 次，干涉仪动镜移动速度为 $1\ \text{cm/s}$ ，空间分辨率为 $25\ \mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$ 。每个试样压片选取 $4\ 000\ \mu\text{m}\times 4\ 000\ \mu\text{m}$ 的区域进行显微红外光谱成像分析，因此每个压片试样共获得 25 600 ($4000/25\times 4000/25$) 条光谱。

3.1.4 显微红外光谱预处理

对显微红外图像进行降噪处理，具体采用主成分分析（PCA）方法，选取前 20 个主成分对图像进行重构以抑制噪声。为进一步提高光谱分辨率，对重构后的数据进行二阶导数（窗口宽度为 5）处理。此外，为消除环境中 CO_2 的干扰，剔除了显微红外光谱中 $2\ 422\ \text{cm}^{-1}\sim 2\ 263\ \text{cm}^{-1}$ 的波段信息。

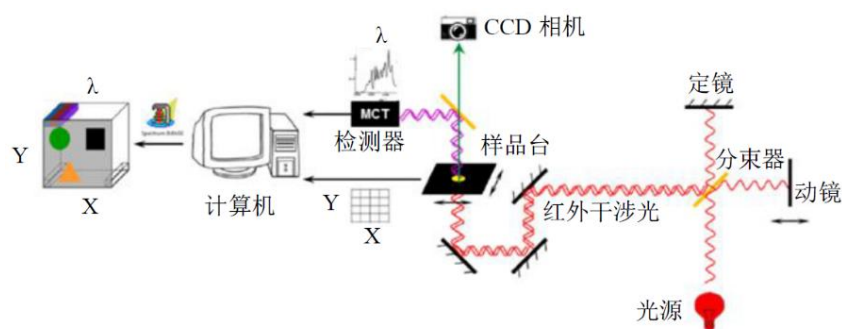


图 3 显微红外成像系统原理图

3.2 抗生素滤渣显微红外参比光谱获取及鉴别阈值确定

对于每个抗生素滤渣的显微红外图像，首先利用主成分分析法（提取前 20 个主成分）对图像进行重构，以实现光谱的降噪处理。降噪后，从每个样品的图像中提取所有像素点对应的红外光谱，每个样品共获得 25 600 条光谱。基于光谱间的欧氏距离，从每个样品的全部光谱中选取代表性光谱，用于构建抗生素滤渣的参比光谱集及确定鉴别阈值。具体步骤如下：

- 1) 计算每一条光谱与其余所有光谱之间的欧氏距离，以欧氏距离内距的 6 倍作为判别界限，剔除异常光谱；
- 2) 在剩余光谱中计算两两之间的欧氏距离，选择距离最远的两条光谱纳入抗生素滤渣显微红外参比光谱集；
- 3) 在剩余光谱中找出与参比光谱集中所有光谱之间最远距离的光谱，将其纳入用于确定鉴别阈值的光谱集；

4) 继续在剩余光谱中找出与参比光谱集中光谱最远距离的光谱, 添加至参比光谱集;

5) 重复步骤 3) 和 4), 交替将光谱分配至参比光谱集和鉴别阈值光谱集, 直至参比光谱数量达到预定值。参比光谱的数量可由用户根据鉴别准确度与效率需求自行设定, 也可通过设置了基于数据集特性的欧氏距离阈值来自动控制。本研究为保障鉴别准确性, 选取了 4 000 条代表性光谱作为参比光谱, 另选 4 000 条用于确定鉴别阈值。

在所构建的抗生素滤渣显微红外参比光谱集中, 不同类别样品的平均光谱如图 4 所示。为便于直观比较, 所有光谱均经过基线校正和最大-最小值归一化处理。从图 4 中可见, 抗生素滤渣的显微红外光谱吸收峰较多、信息丰富, 尤其在 2000 cm^{-1} – 750 cm^{-1} 波段范围内。不同种类抗生素滤渣的光谱之间存在明显差异, 但部分品种如卡那霉素、新霉素、安普霉素和庆大霉素的光谱形态较为相似。

此外, 对比了不同来源的同一类抗生素滤渣的显微红外光谱。从图 5-15 可以看出, 即使是同一种类的抗生素滤渣, 由于加工工艺和处理方式的不同, 其显微红外光谱也存在一定差异。具体而言, 不同来源的安普霉素滤渣和土霉素滤渣的光谱较为相似; 而阿维菌素、大观霉素、金霉素、链霉素、硫酸粘菌素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣的光谱则表现出不同程度的差异, 部分样品间差异尤为显著。

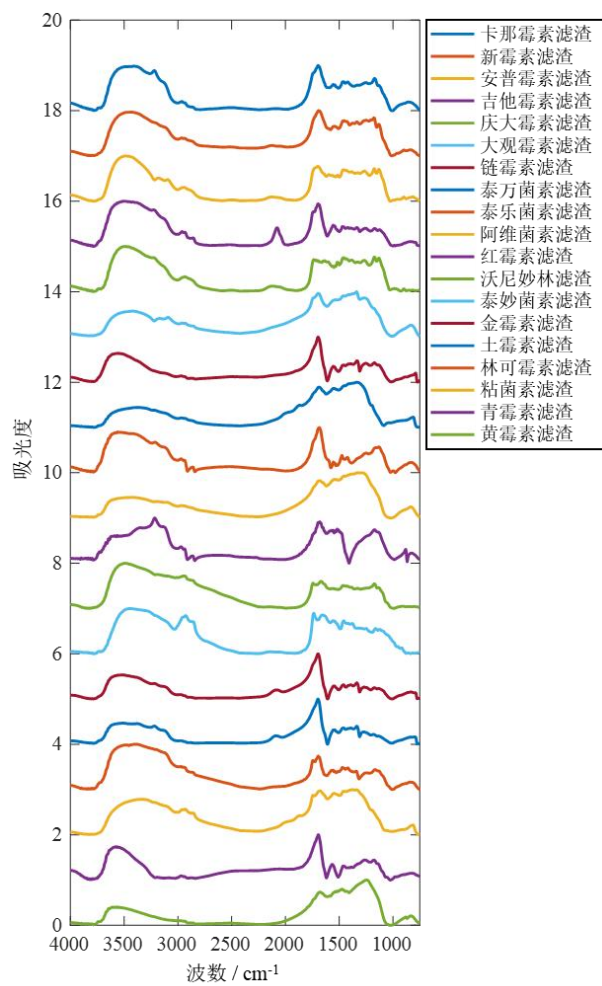


图 4 19 种抗生素滤渣的平均显微红外光谱

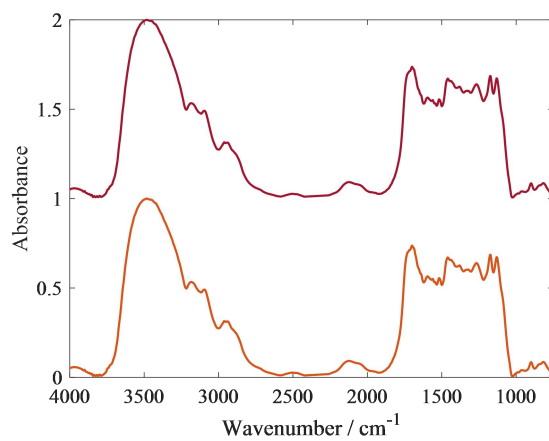


图 5 不同来源安普霉素滤渣的平均显微红外光谱

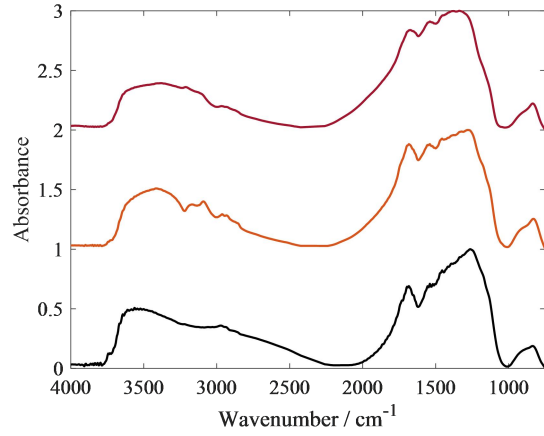


图 6 不同来源阿维菌素滤渣的平均显微红外光谱

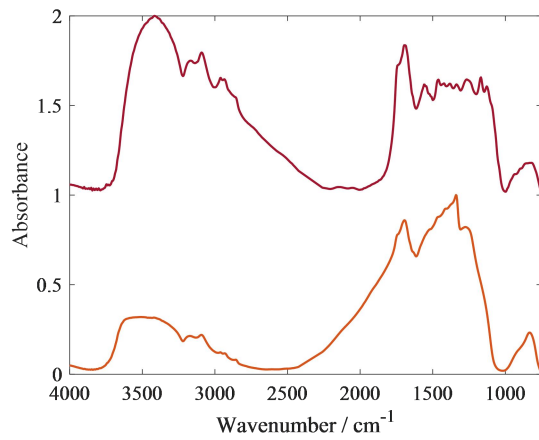


图 7 不同来源大观霉素滤渣的平均显微红外光谱

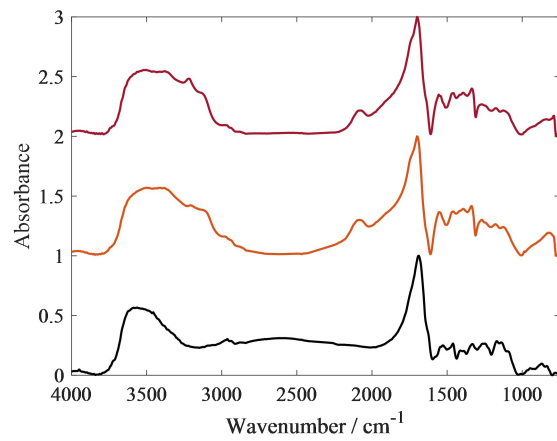


图 8 不同来源金霉素滤渣的平均显微红外光谱

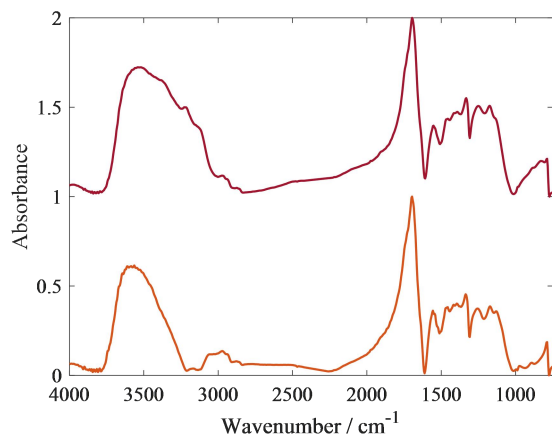


图9 不同来源链霉素滤渣的平均显微红外光谱

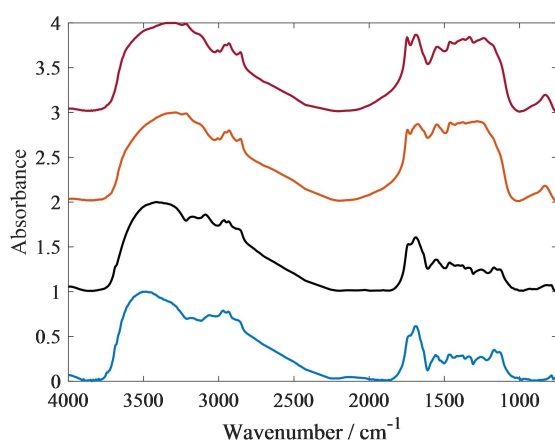


图10 不同来源硫酸粘菌素滤渣的平均显微红外光谱

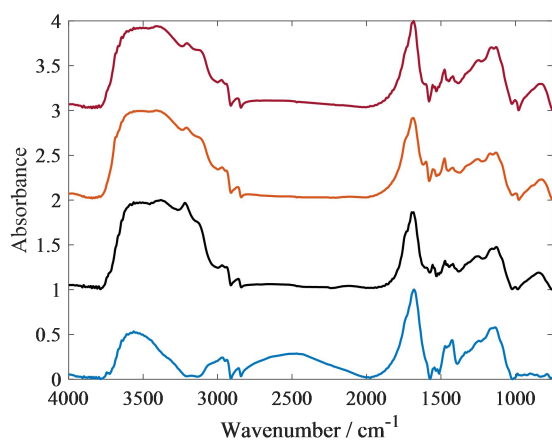


图11 不同来源泰乐菌素滤渣的平均显微红外光谱

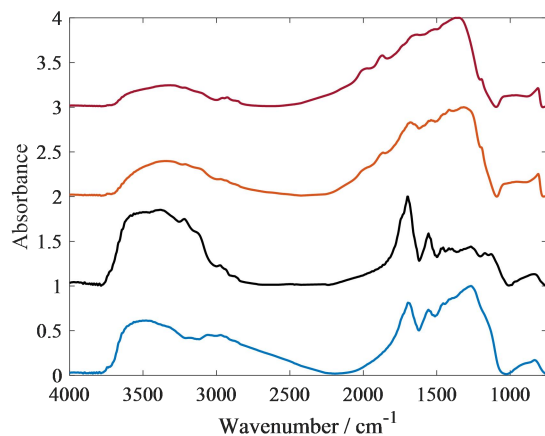


图 12 不同来源泰万菌素滤渣的平均显微红外光谱

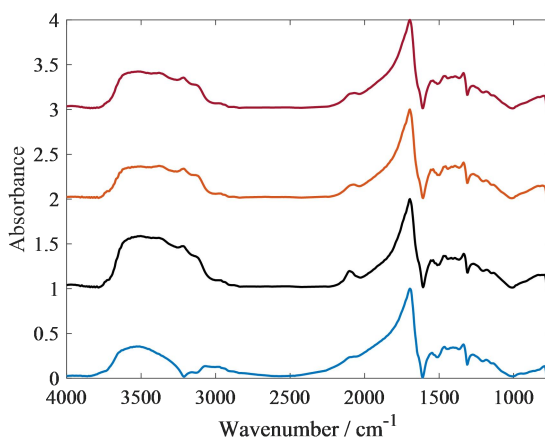


图 13 不同来源土霉素滤渣的平均显微红外光谱

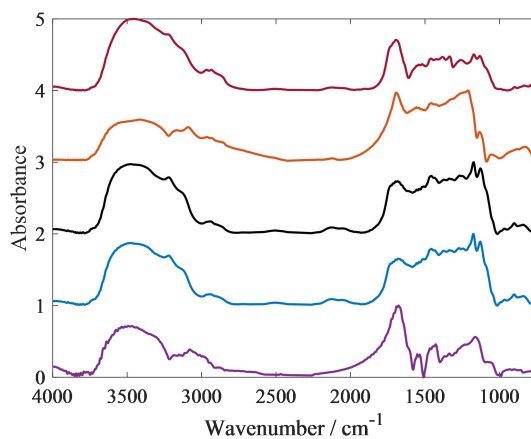


图 14 不同来源新霉素滤渣的平均显微红外光谱

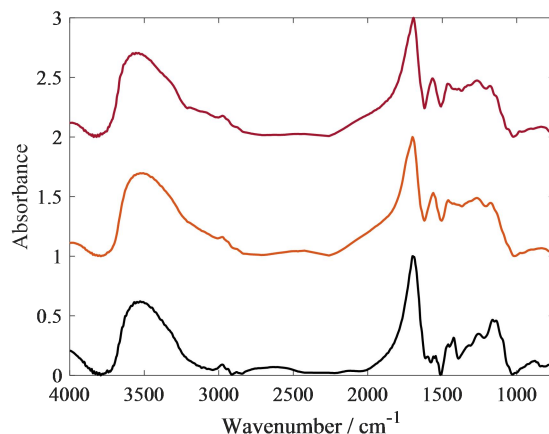


图 15 不同来源青霉素滤渣的平均显微红外光谱

对图 4-图 15 的进一步分析表明：部分抗生素滤渣，如金霉素、大观霉素、土霉素、链霉素和粘杆菌素滤渣，显微红外光谱在 1692 cm^{-1} （C=O 伸缩振动）、 1336 cm^{-1} （O-H 面内弯曲振动）和 828 cm^{-1} （COO⁻变形振动）附近均出现明显吸收峰，如图 16 所示。结合其生产工艺可知，这些抗生素在提取过程中均采用了酸化步骤，目的是将吸附于菌体蛋白中的抗生素释放至发酵液中。由于发酵培养基中常添加碳酸钙，在草酸酸化过程中易形成草酸钙沉淀。

图 17 展示了土霉素发酵的工艺流程示意。进一步地，本文对比了土霉素滤渣与常见蛋白饲料原料（豆粕、棉粕、DDGS 等）的总钙与草酸钙含量，如表 3 所示。结果表明，常规饲料中草酸钙含量极低，而采用草酸酸化工艺的抗生素滤渣中草酸钙含量显著偏高。

图 18 为草酸钙水合物的中红外光谱图（衰减全反射模式，ATR-IR），其特征吸收峰位于 1621 cm^{-1} 、 1317 cm^{-1} 、 781 cm^{-1} 和 521 cm^{-1} 附近。尽管该谱图基于 ATR-IR 技术获取，而抗生素滤渣光谱则采用显微红外成像系统采集，因测量方式差异可能导致吸收峰发生轻微位移。

因此，上述滤渣在 1692 cm^{-1} 、 1336 cm^{-1} 和 828 cm^{-1} 处的吸收峰可归属为草酸钙的特征信号。这一结果证明，基于显微红外光谱法鉴别抗生素滤渣是可行的。

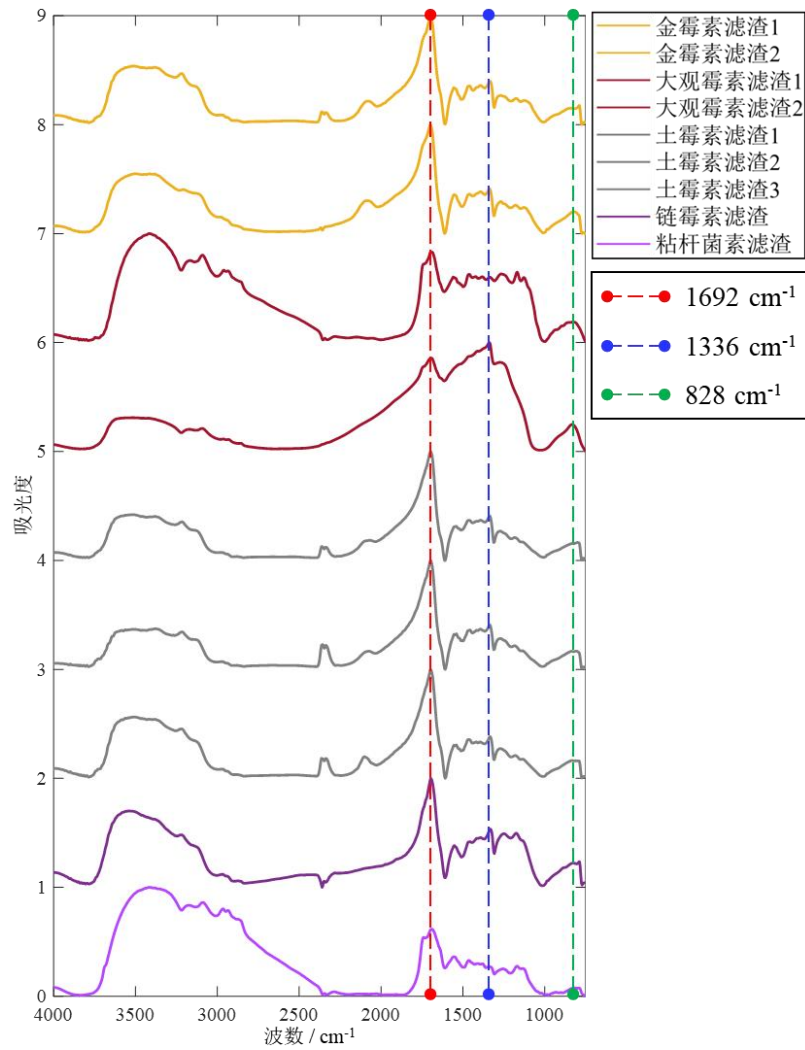


图 16 1 692 cm⁻¹、1 336 cm⁻¹、828 cm⁻¹ 存在明显吸收峰的抗生素滤渣
显微红外光谱

表 3 蛋白质饲料原料与抗生素滤渣中总钙和草酸钙的含量

名称	总钙 (g/100g)	草酸钙 (g/100g)
土霉素滤渣	4.023±1.392 ^a	0.182±0.078 ^a
棉粕	0.190±0.016 ^b	<0.010 ^b
豆粕	0.302±0.004 ^c	<0.010 ^b
DDGS	0.058±0.022 ^d	<0.010 ^b

注：同列数据肩标字母不同者,表示有显著性差异 ($P<0.05$)，字母相同表示无显著性差异 ($P>0.05$)。

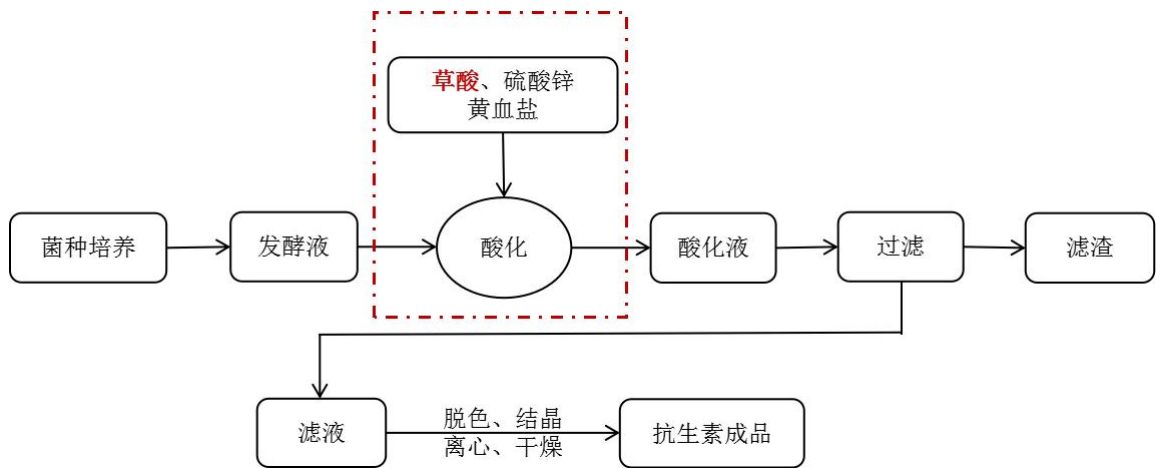


图 17 发酵生产土霉素流程图

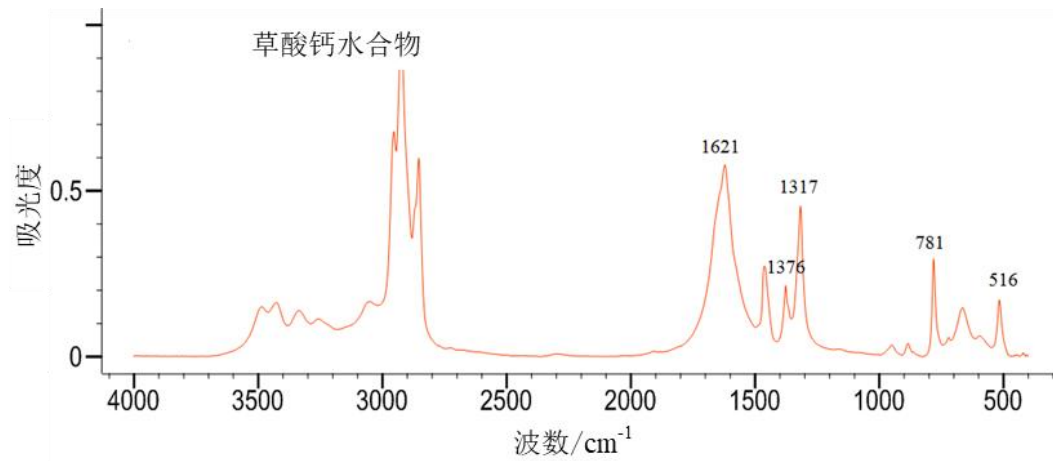


图 18 草酸钙水合物的中红外光谱图（ATR-IR）

通过上述分析发现显微红外光谱对不同的抗生素滤渣具有很好的辨识能力，如果再借助可以利用所有波长信息的多元分析技术则可以很好的实现不同抗生素滤渣的相似性鉴别。

本标准选用余弦相似度来衡量光谱的相似性，余弦相似度计算两个光谱向量的夹角余弦值，计算公式如式（1）所示：

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

式中：

S ——光谱 A、光谱 B 的余弦相似度；

θ ——光谱 A、光谱 B 的夹角；

A——光谱 A;

B——光谱 B。

余弦相似度值越接近 1，说明两个光谱越相似。

对每一类抗生素滤渣样品，按式（1）计算确定鉴别阈值光谱集光谱与同类抗生素滤渣显微红外参比光谱的余弦相似度值，按照余弦相似度值 2.5% 下百分位数确定阈值。抗生素滤渣名称、该类抗生素滤渣显微红外参比光谱数量及阈值如表 4 所示。

表 4 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	显微红外参比光谱数	阈值	最大值	最小值	标准差
卡那霉素滤渣	4 000	0.94	0.99	0.90	0.052
新霉素滤渣	20 000	0.92	0.99	0.87	0.073
安普霉素滤渣	8 000	0.91	0.99	0.87	0.076
吉他霉素滤渣	4 000	0.95	0.99	0.90	0.050
庆大霉素滤渣	4 000	0.93	0.99	0.88	0.065
大观霉素滤渣	8 000	0.90	0.99	0.86	0.084
链霉素滤渣	8 000	0.92	0.99	0.89	0.063
泰万菌素滤渣	16 000	0.94	0.99	0.89	0.057
泰乐菌素滤渣	16 000	0.92	0.99	0.87	0.073
阿维菌素滤渣	12 000	0.90	0.99	0.85	0.088
红霉素滤渣	4 000	0.94	0.99	0.91	0.047
沃尼妙林滤渣	4 000	0.93	0.99	0.89	0.060
泰妙菌素滤渣	4 000	0.93	0.99	0.89	0.061
金霉素滤渣	8 000	0.93	0.99	0.88	0.065
土霉素滤渣	16 000	0.96	0.99	0.90	0.048
林可霉素滤渣	4 000	0.95	0.99	0.89	0.055
粘菌素滤渣	16 000	0.95	0.99	0.92	0.039
青霉素滤渣	12 000	0.92	0.99	0.87	0.073
黄霉素滤渣	4 000	0.93	0.99	0.88	0.065

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。

3.3 抗生素滤渣的鉴别

选取具有代表性的蛋白饲料原料及配合饲料样品，包括植物性蛋白饲料原料豆粕，发酵类蛋白饲料原料（酵母蛋白渣、DDGS 和核苷酸渣），以及鸡配合饲料。按照与抗生素滤渣样品相同的前处理方法（参见 2.1）制备上述饲料样品并获取其显微红外光谱；采用与抗生素滤渣显微红外参比光谱相同的采集方法，获取各饲料样品的显微红外参比光谱。图 19 展示了这些饲料样品的平均显微红外参比光谱。

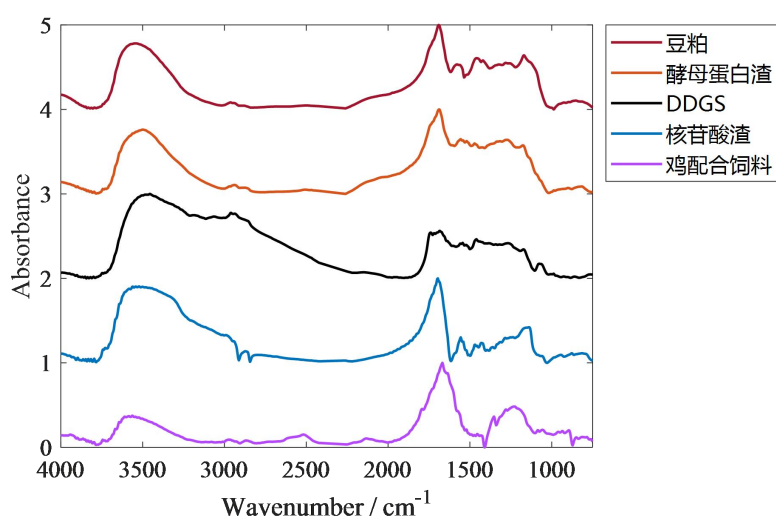
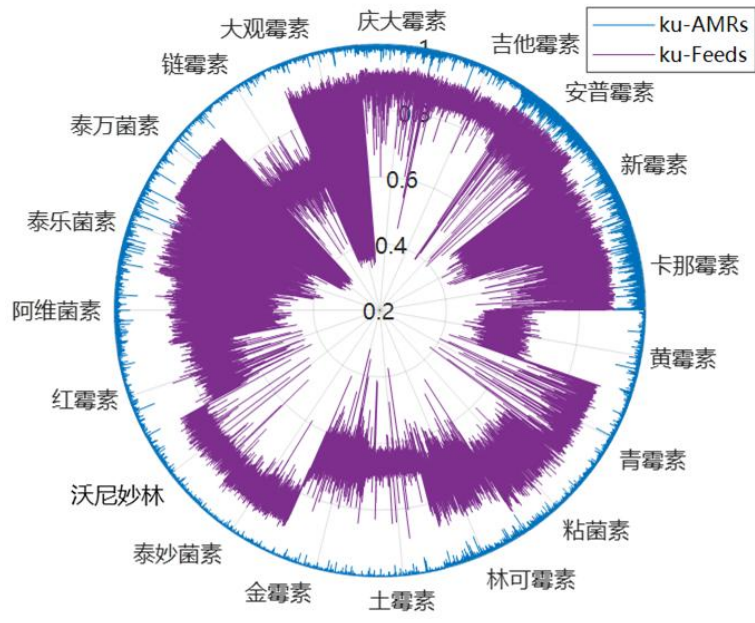


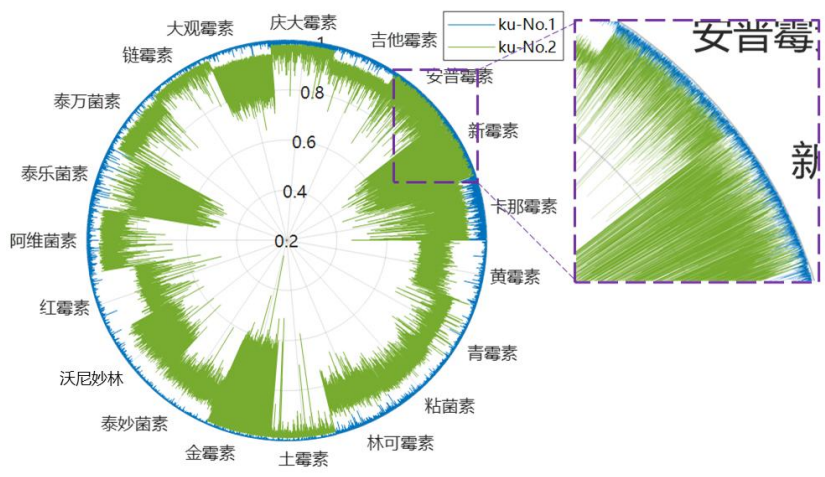
图 19 饲料样品平均显微红外光谱

对比图 4 与图 19 可知，抗生素滤渣与饲料的显微红外光谱在多个波段均呈现出较为相似的特征信号。因此，仅依靠单一波长或主观判读难以实现准确区分，有必要引入能够综合利用全波段光谱信息的多元分析方法，例如余弦相似度计算，以增强对饲料与抗生素滤渣进行鉴别与判定的客观性和可靠性。

从未被选作抗生素滤渣参比光谱的抗生素滤渣光谱中随机选取 50 000 条光谱，分别计算其与饲料显微红外参比光谱及抗生素滤渣显微红外参比光谱的余弦相似度，结果如图 20 所示。可以看出，抗生素滤渣光谱与饲料光谱之间的相似度普遍较低，且均低于其与抗生素滤渣参比光谱的相似度，表明饲料与抗生素滤渣之间存在明显差异，能够通过该方法进行有效区分。基于最高余弦相似度光谱，对 50 000 条抗生素滤渣显微红外光谱所属的抗生素滤渣类型进行判别，结果显示：所有光谱均被正确识别为抗生素滤渣，识别准确率达 100%；其中，正确识别为对应抗生素滤渣类型的光谱准确率为 99.9994%，仅 3 条光谱被误判为其他抗生素滤渣类型。



(a)



(b)

图 20 50 000 条抗生素滤渣光谱与 (a) 饲料显微红外参比光谱； (b) 抗生素滤渣显微红外参比光谱的余弦相似度

注：(a) 蓝色：与抗生素滤渣显微红外参比光谱的最高余弦相似度，紫色：与饲料显微红外参比光谱的最高余弦相似度；

(b) 蓝色：最高余弦相似度，绿色：次高的余弦相似度。

3.4 饲料中抗生素滤渣的鉴别

3.4.1 样品的采集与制备

采集 11 类代表性饲料样品，包括：植物性蛋白饲料原料豆粕、棉粕，动物性蛋白饲料鸡肉粉，发酵类蛋白饲料原料酵母蛋白渣、玉米酒精糟（DDGS）、

核苷酸渣 (NR)、谷氨酸渣, 浓缩饲料猪浓缩饲料, 精料补充料牛羊精料补充料, 配合饲料鸡配合饲料、鸭配合饲料, 上述饲料样品来自于国家饲料质量检验检测中心 (北京)。将干燥的抗生素滤渣以 5% (质量分数) 的掺假量添加到 11 类饲料中, 制备掺有抗生素滤渣的饲料试样。所有样品使用旋风磨 (ZM100, 德国 Restsh 公司) 粉碎过 0.425 mm 筛。每个试样称取 200 mg, 用压片机 (AZZOTA Corporation) 制备压片试样, 压片机压力设定为 40 MPa, 压片时间 2 min, 压片试样的直径是 13 mm、厚度是 1 mm。

3.4.2 显微红外光谱获取

采用傅里叶变换显微红外成像系统采集显微红外光谱。采集光谱前, 添加液氮对检测器进行制冷, 并预热 1h 之后, 进行设备自检, 自检成功后采集光谱。扫描参数: 波数范围 $4\ 000\sim 750\text{ cm}^{-1}$, 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 $25\ \mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$, 压片试样分析面积为 $4\ 000\ \mu\text{m}\times 4\ 000\ \mu\text{m}$ 。每个压片试样获得 25 600 条光谱。

3.4.3 显微红外光谱预处理

首先对显微红外图像用主成分分析 (PCA) 方法进行降噪处理, 选取前 20 个主成分对图像进行重构。采用二阶导数处理 (窗口宽度为 5) 提高光谱的分辨率, 通过剔除 $2\ 422\text{ cm}^{-1}\sim 2\ 263\text{ cm}^{-1}$ 波段的显微红外光谱以扣除 CO_2 信号对分析的干

在此基础上, 计算掺有抗生素滤渣的饲料样品的显微红外光谱与抗生素滤渣参比光谱之间的余弦相似度, 并依据 2.2 节所确定的阈值对饲料中是否含有抗生素滤渣进行鉴别。鉴别结果示于图 21-57。分析表明, 在所有含有抗生素滤渣的饲料试样中均成功检测出相应的抗生素滤渣特征光谱。

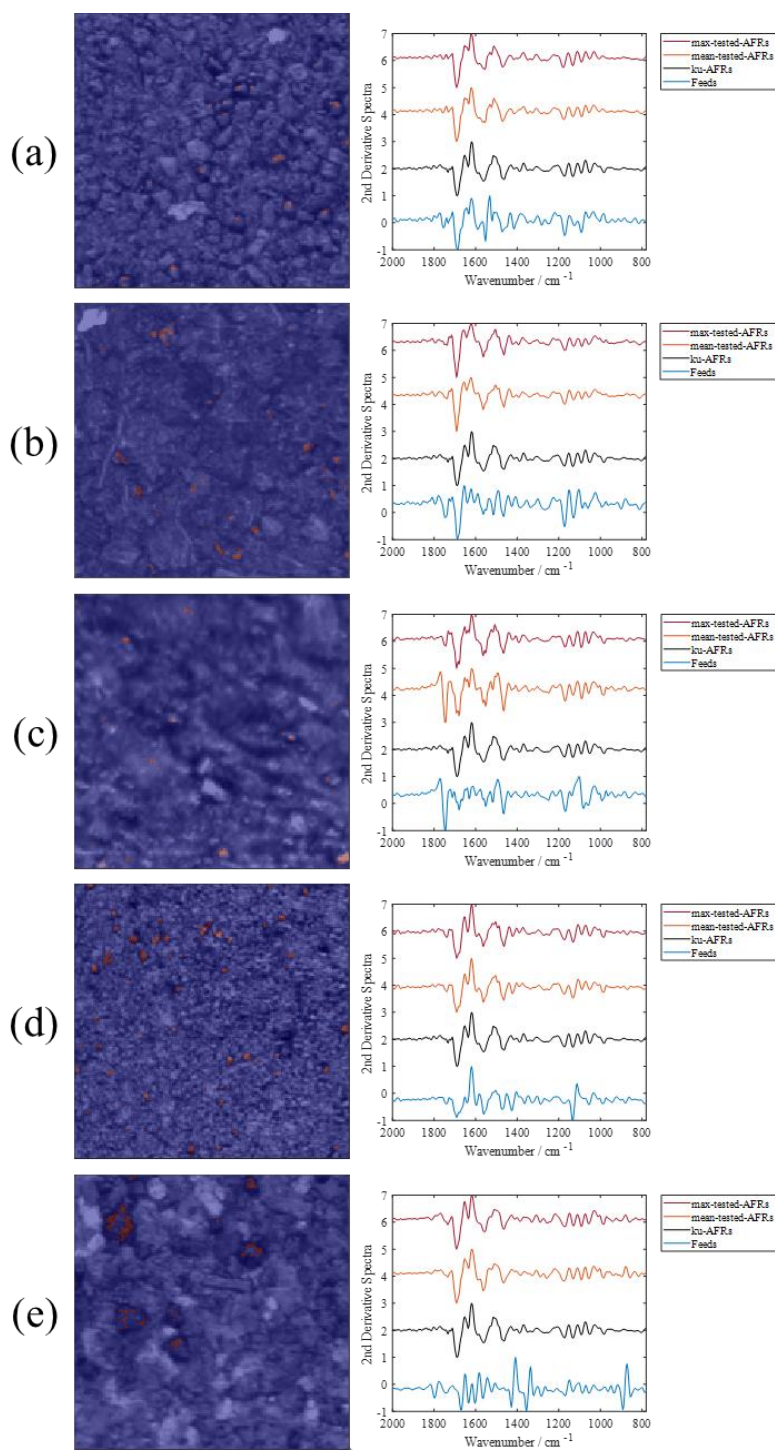


图 21 饲料中青霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.97、0.95、0.96、0.97、0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：0.39%、0.97%、0.50%、1.63%、0.96%。

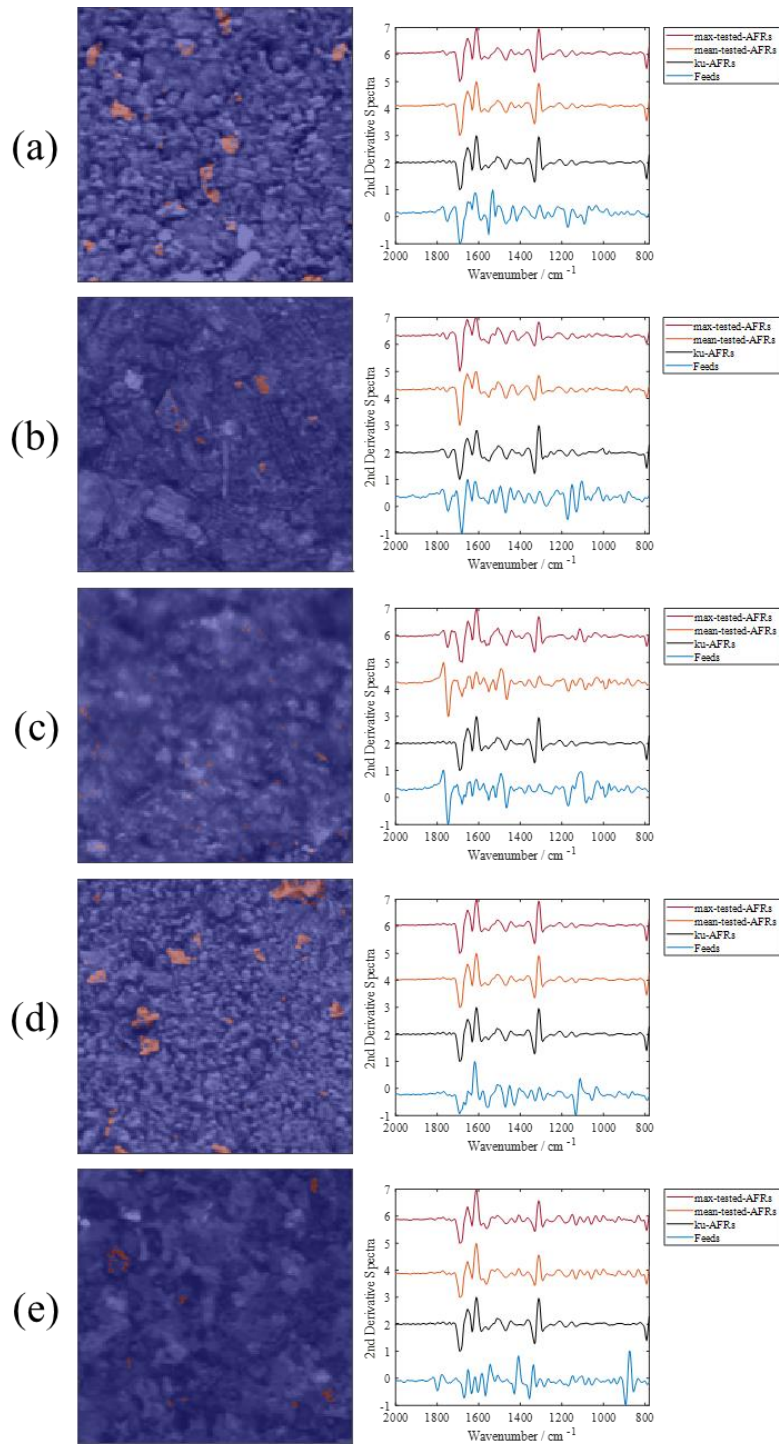


图 22 饲料中土霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，土霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.99、0.98、0.98、0.99、0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：2.64%、0.52%、0.68%、3.50%、0.68%。

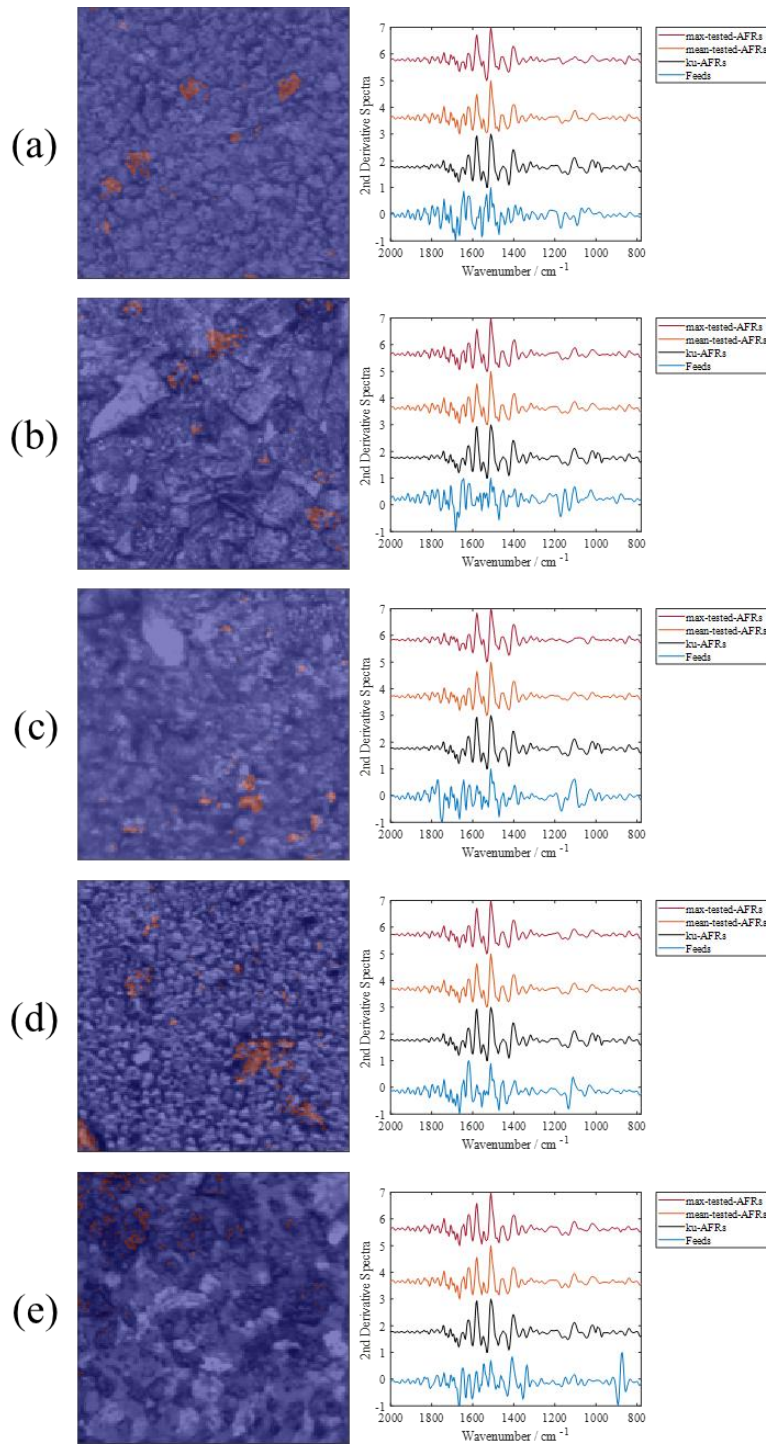


图 23 饲料中新霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，新霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.98、0.98、0.97、0.99、0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：2.12%、2.11%、1.63%、3.65%、2.04%。

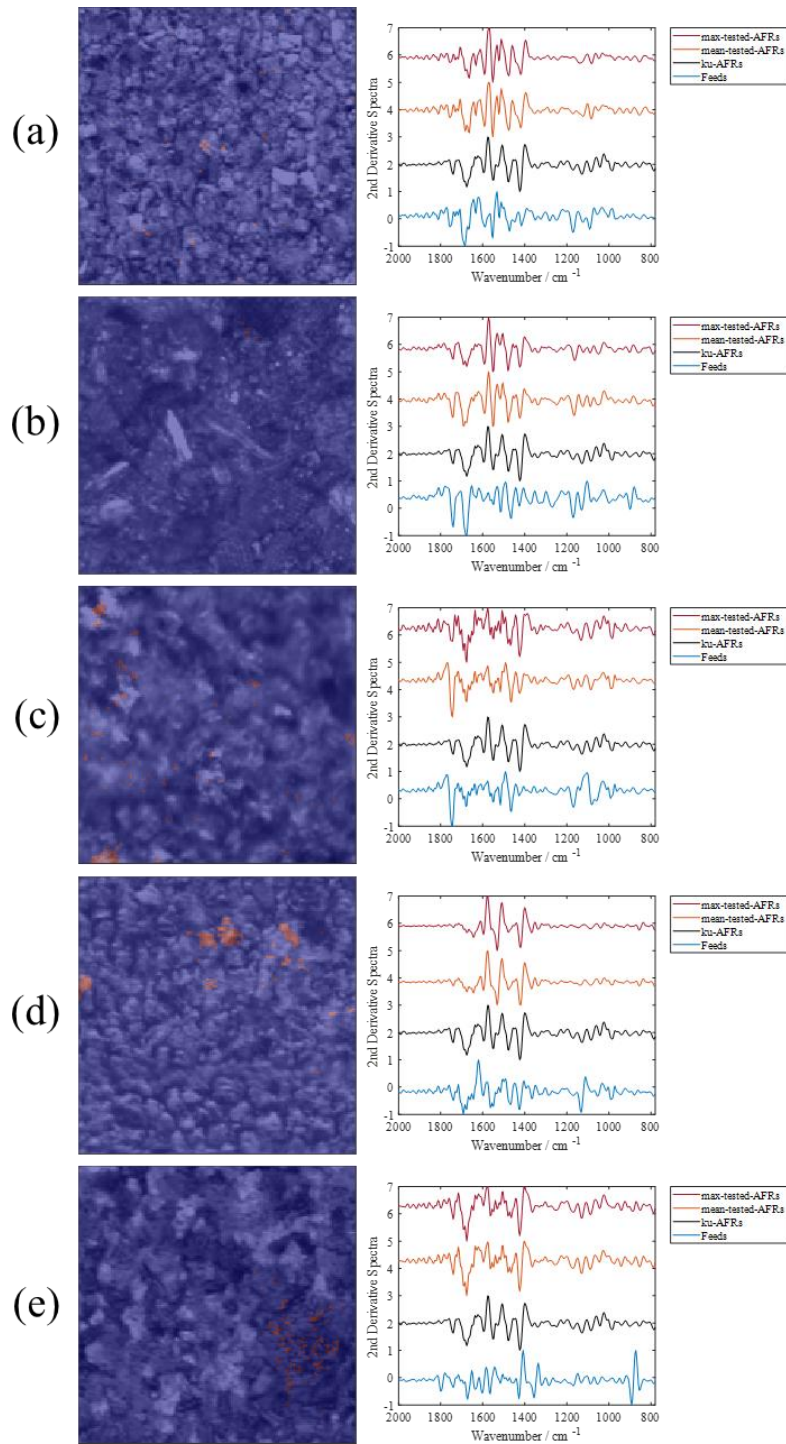


图 24 饲料中泰乐菌素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，泰乐菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.95、0.94、0.93、0.99、0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：0.41%、0.71%、1.42%、1.79%、1.02%。

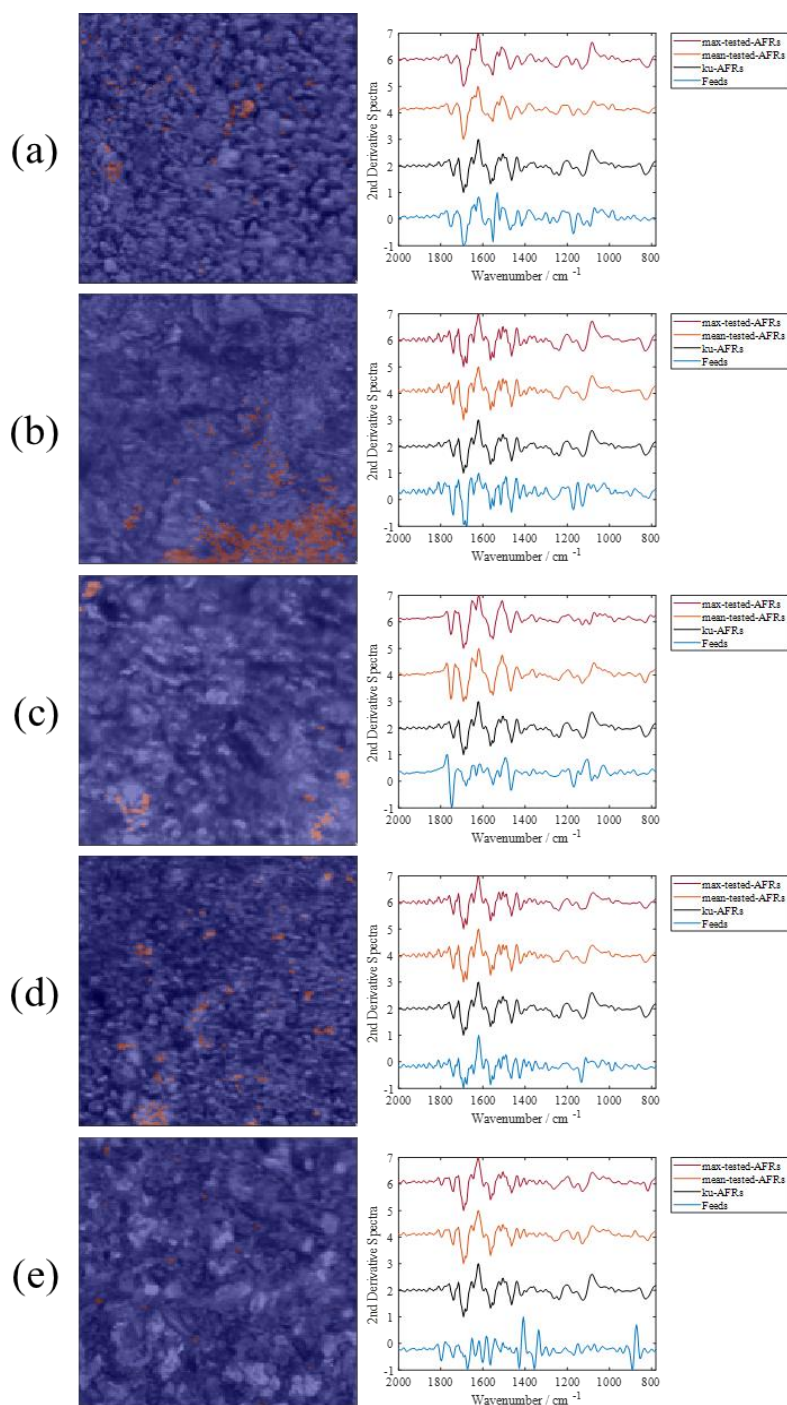


图 25 饲料中泰万菌素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，泰万菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.96、0.98、0.95、0.98、0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：1.85%、3.59%、1.30%、2.28%、

0.75%。

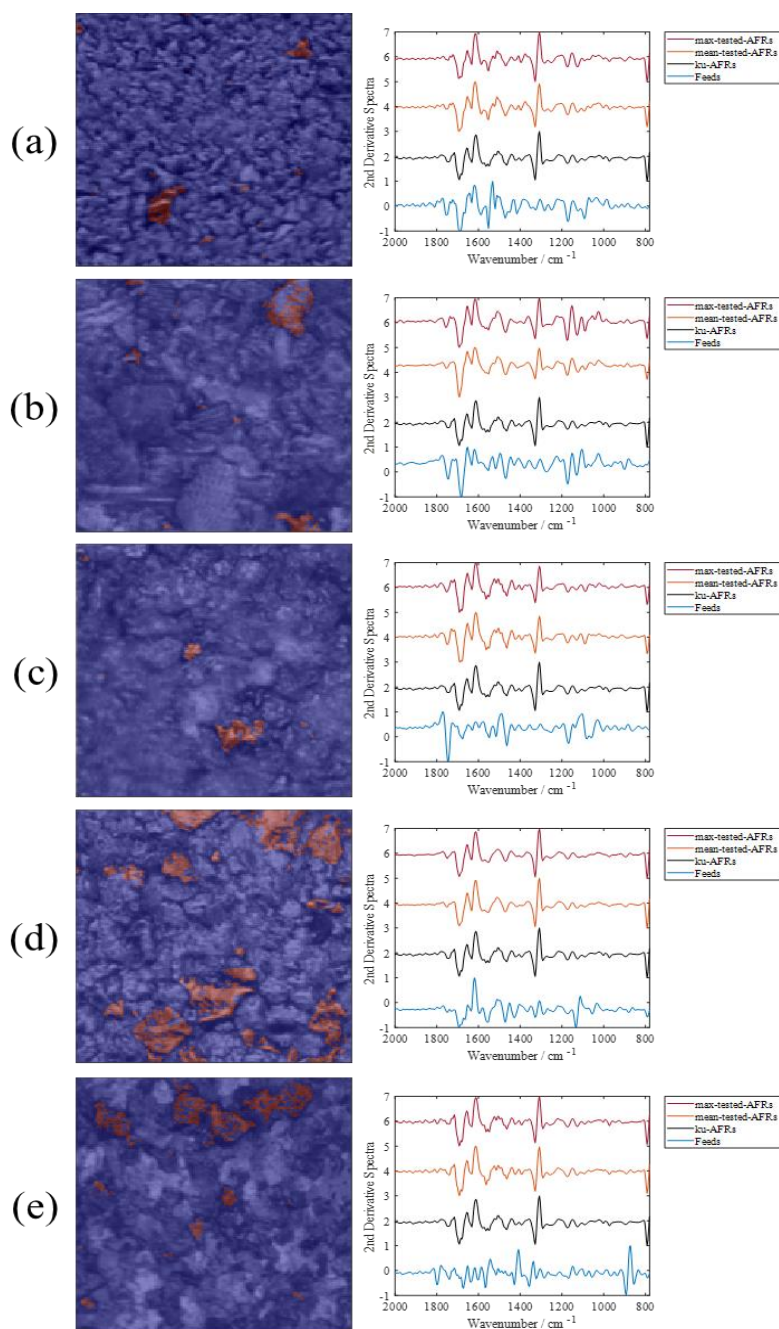


图 26 饲料中链霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，链霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.97、0.95、0.96、0.97、0.99，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：1.69%、2.64%、1.52%、2.03%、1.23%。

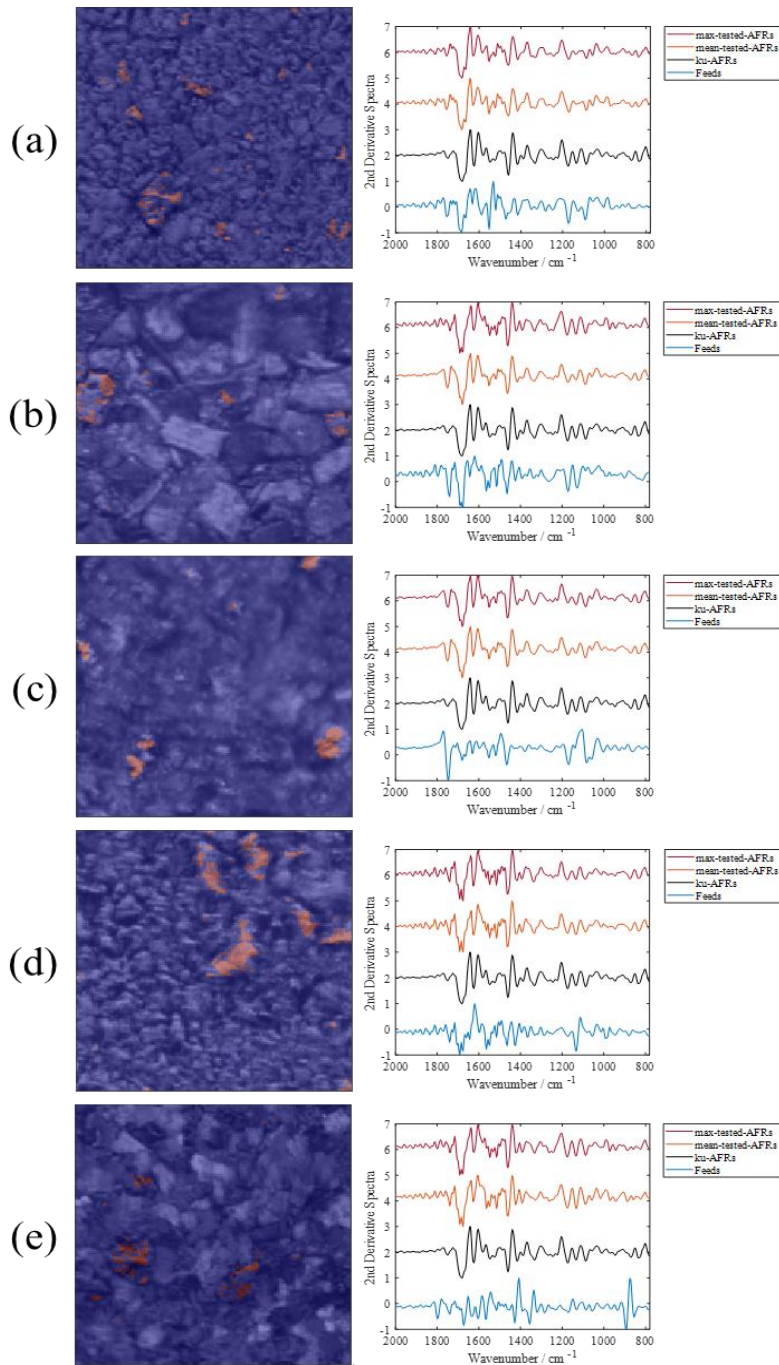


图 27 饲料中金霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，金霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.97、0.94、0.98、0.96、0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：1.98%、1.40%、1.73%、3.80%、1.47%。

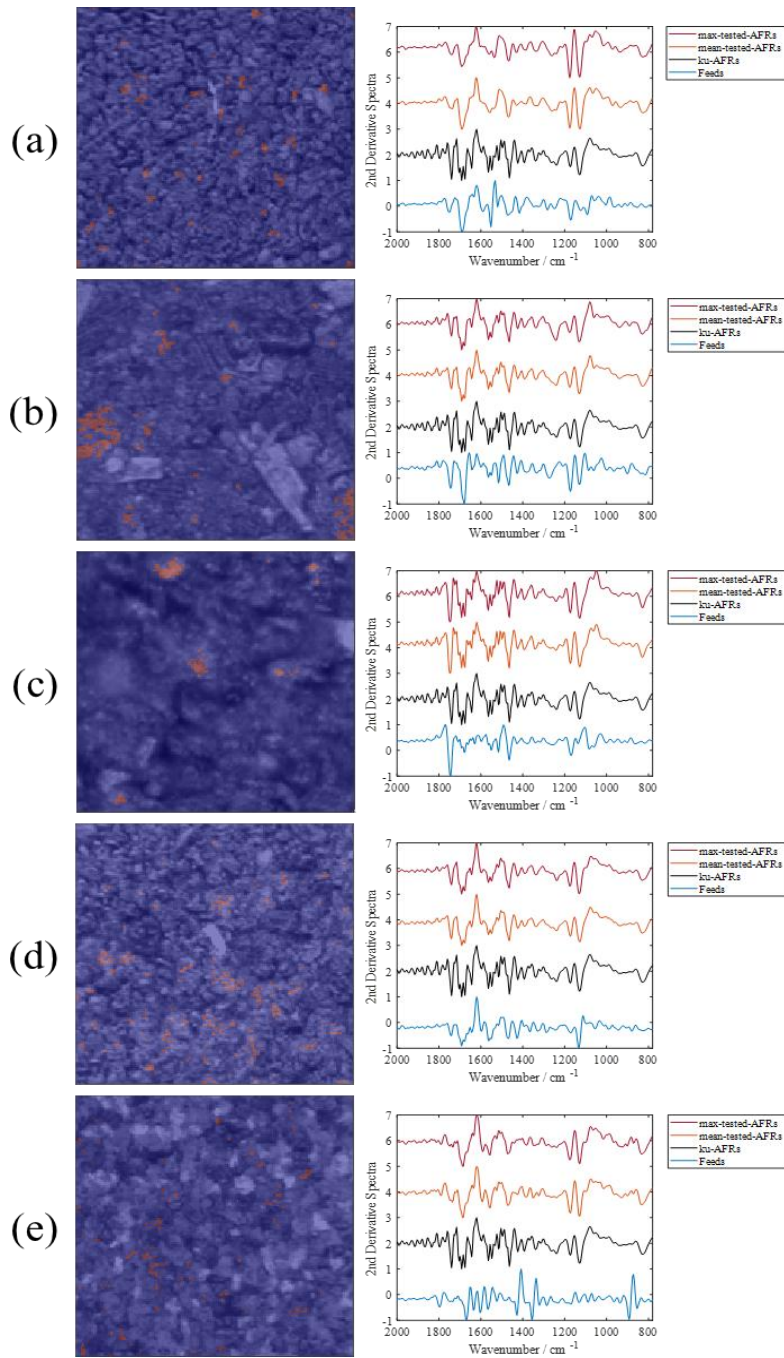


图 28 饲料中阿维菌素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，阿维菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.92、0.97、0.92、0.97、0.92，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：1.76%、2.90%、1.07%、2.70%、0.94%。

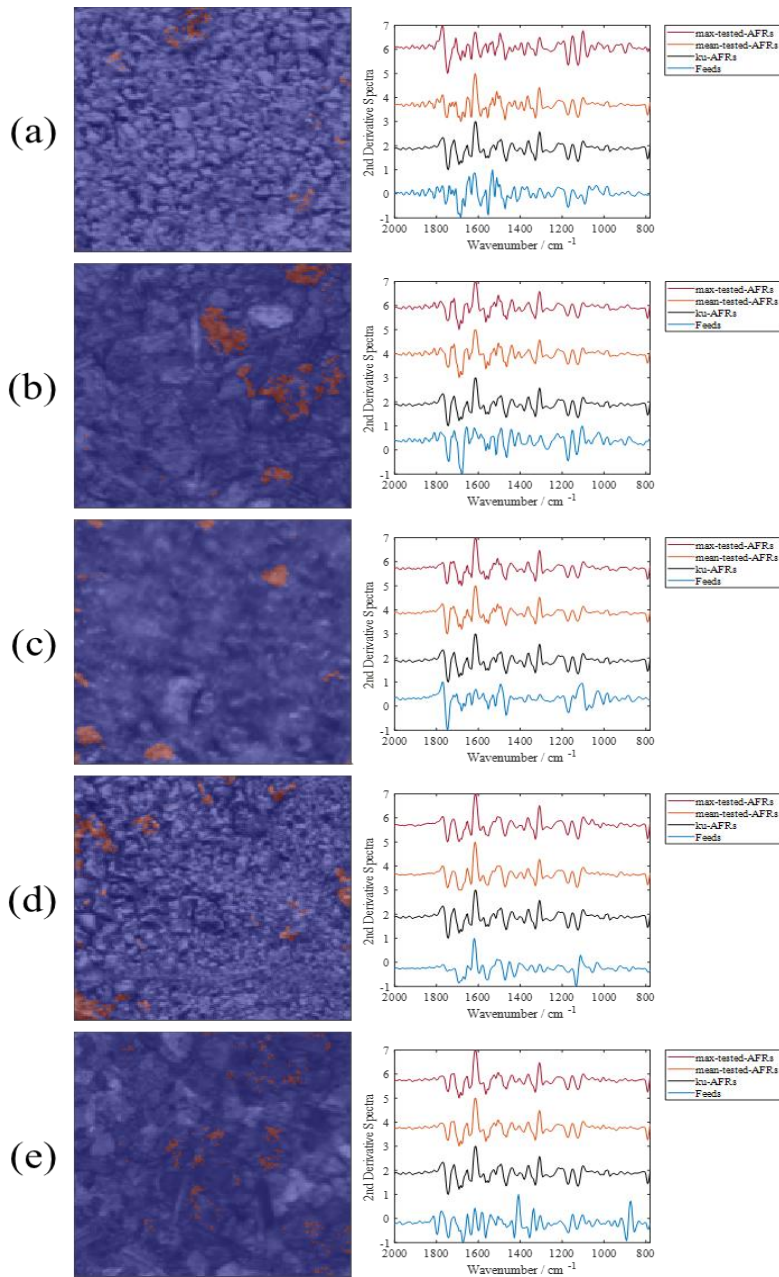


图 29 饲料中粘菌素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，粘菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.97、0.97、0.98、0.98、0.99，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：1.41%、3.16%、2.51%、3.14%、2.37%。

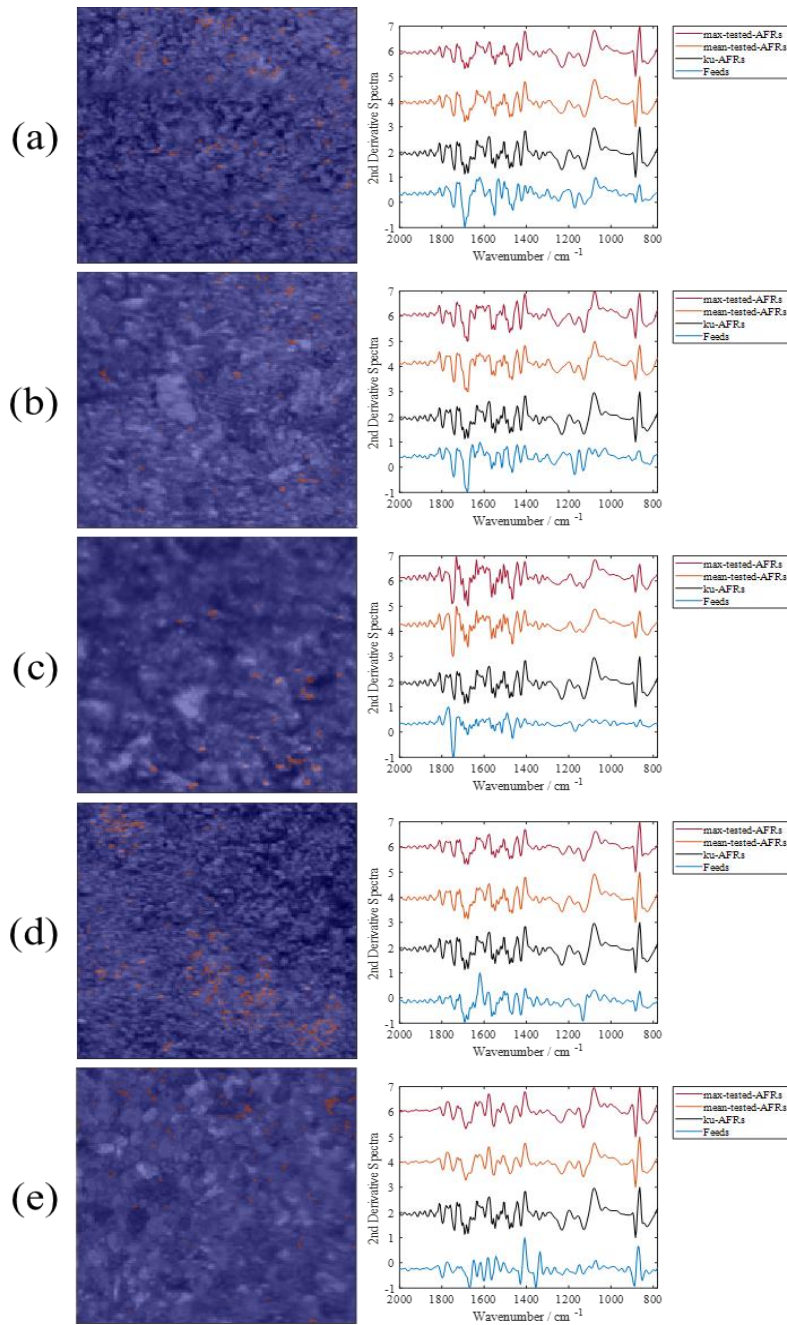


图 30 饲料中黄霉素滤渣鉴别结果

(a-e 分别为豆粕、酵母蛋白渣、DDGS、核苷酸渣和鸡配合饲料)

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，黄霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度分别为：0.99、0.94、0.96、0.99、0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度分别为：2.06%、0.95%、0.92%、3.20%、1.18%。

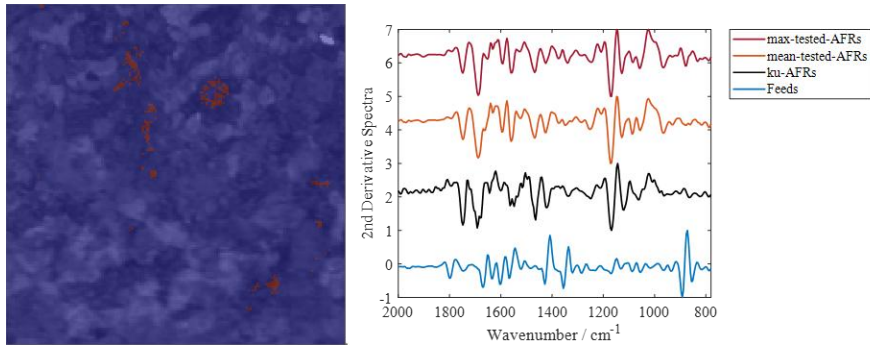


图 31 鸡配合饲料中卡那霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，卡那霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.10%。

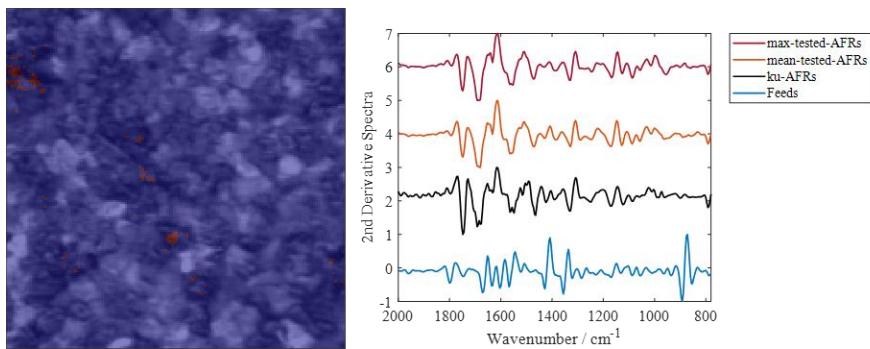


图 32 鸡配合饲料中吉他霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，吉他霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 0.72%。

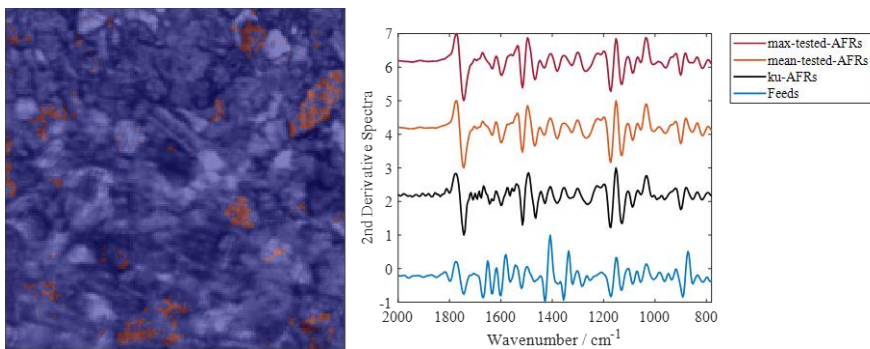


图 33 鸡配合饲料中庆大霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，庆大霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.97%。

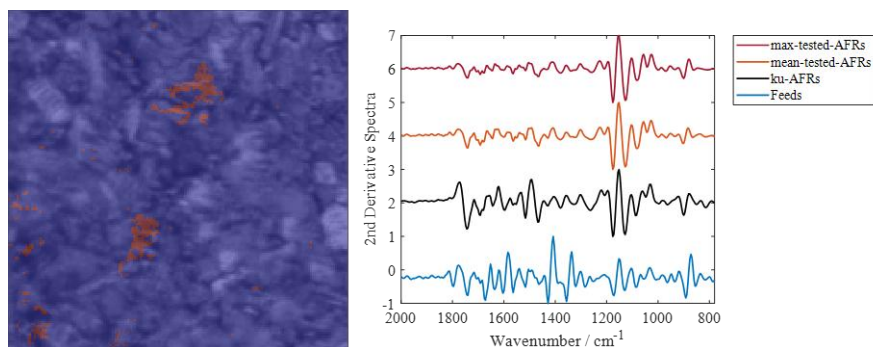


图 34 鸡配合饲料中安普霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，安普霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.39%

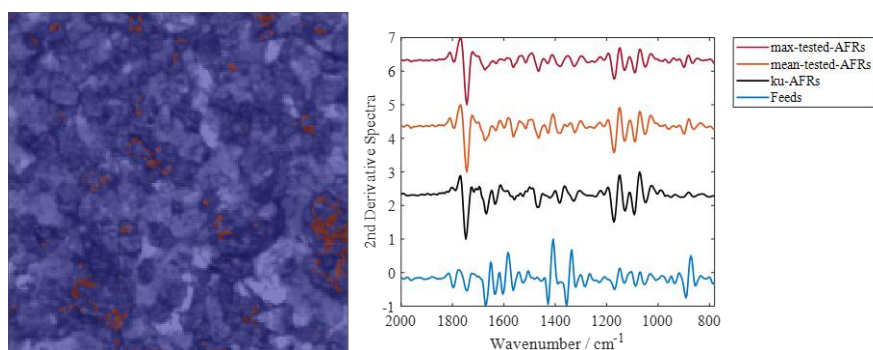


图 35 鸡配合饲料中沃尼妙林滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，沃尼妙林滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.80%。

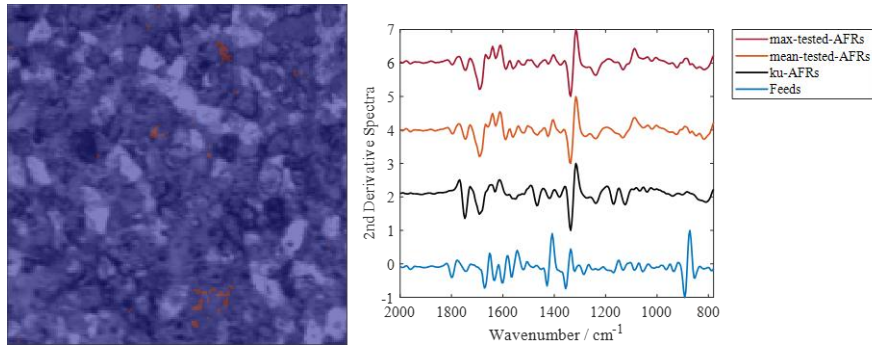


图 36 鸡配合饲料中大观霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，大观霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.21%。

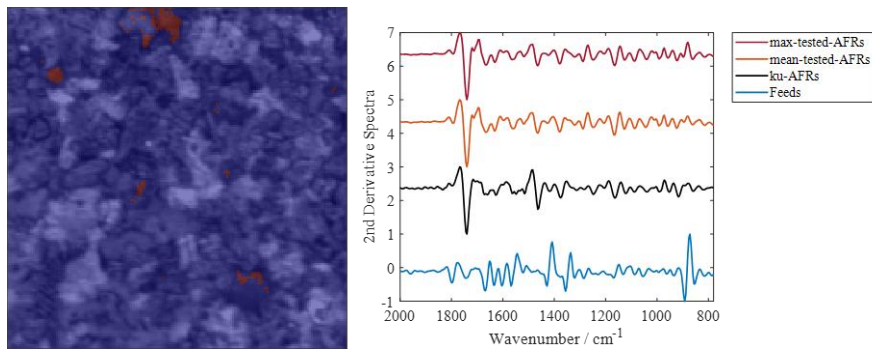


图 37 鸡配合饲料中泰妙菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，泰妙菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.26%。

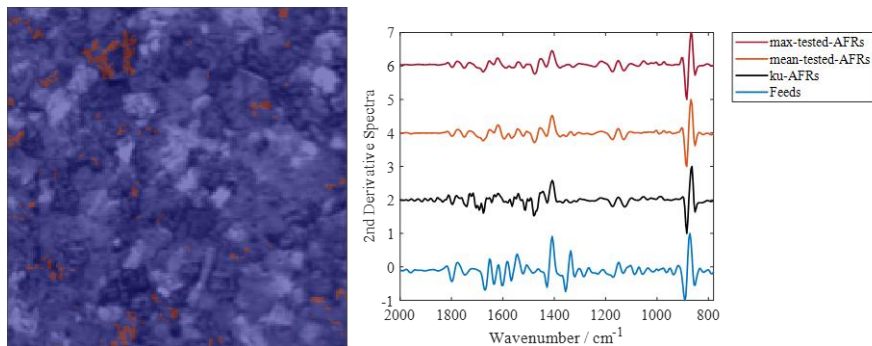


图 38 鸡配合饲料中红霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，红霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.67%。

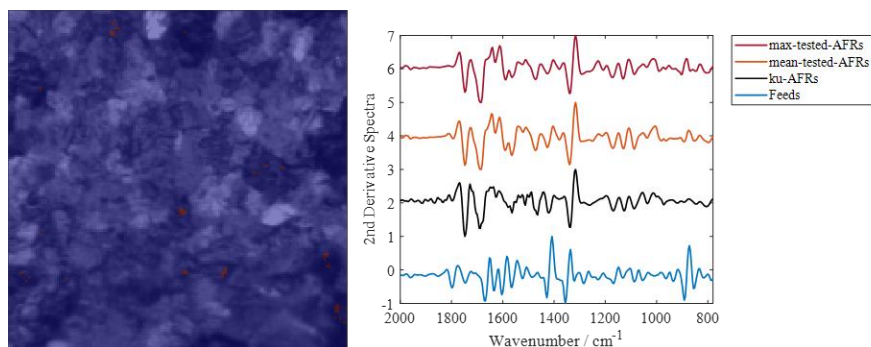


图 39 鸡配合饲料中林可霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱，林可霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 0.54%。

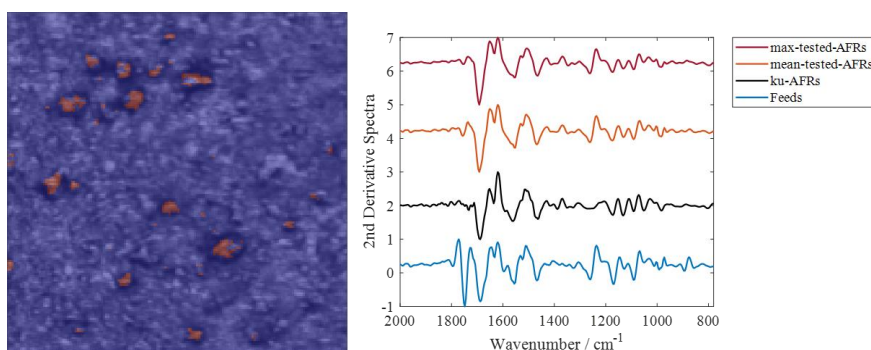


图 40 猪浓缩饲料中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.94，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.00%。

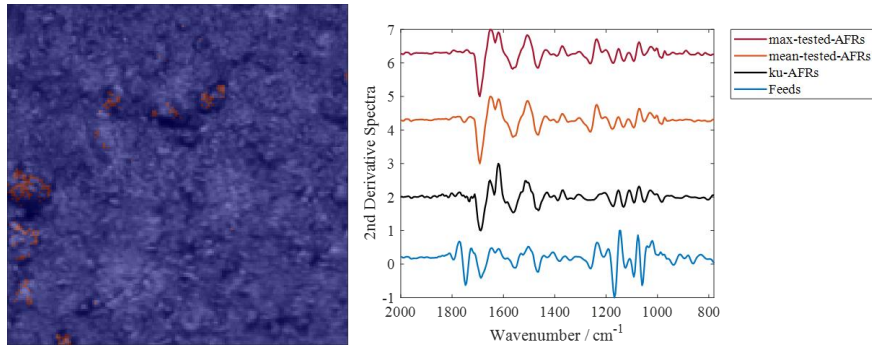


图 41 牛羊精料补充料中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.94，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.27%。

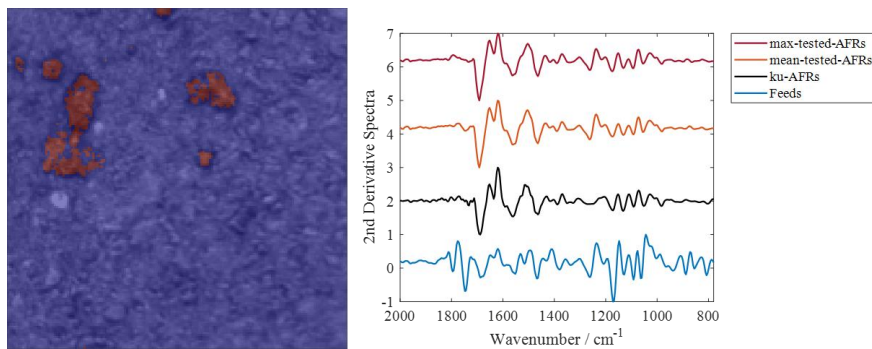


图 42 鸭配合饲料中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 3.55%。

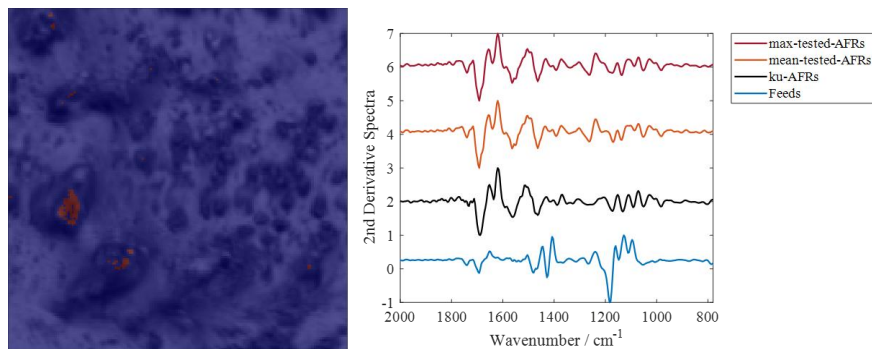


图 43 谷氨酸渣中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.94，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 0.56%。

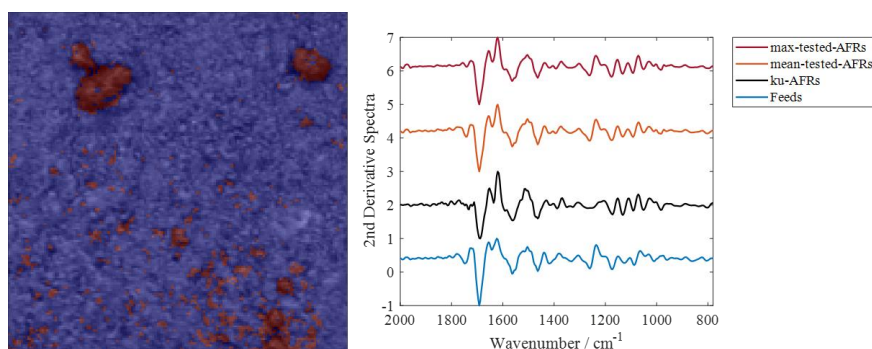


图 44 棉粕中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 3.68%。

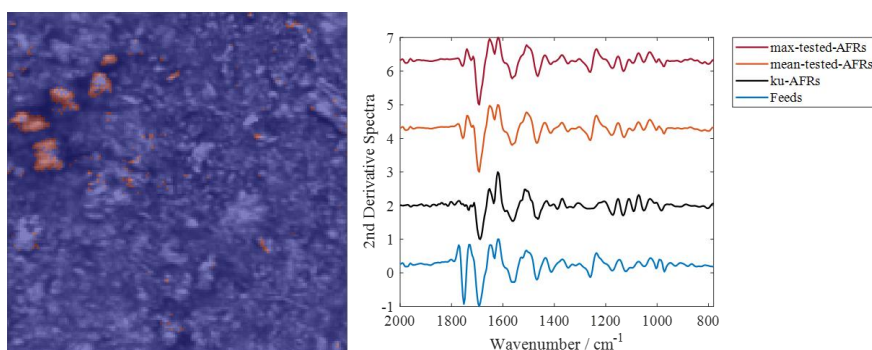


图 45 鸡肉粉中青霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、青霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.93，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.50%。

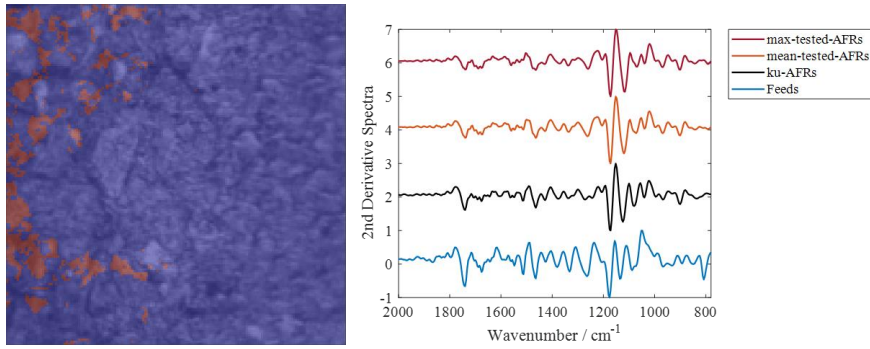


图 46 鸭配合饲料中新霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、新霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 3.02%。

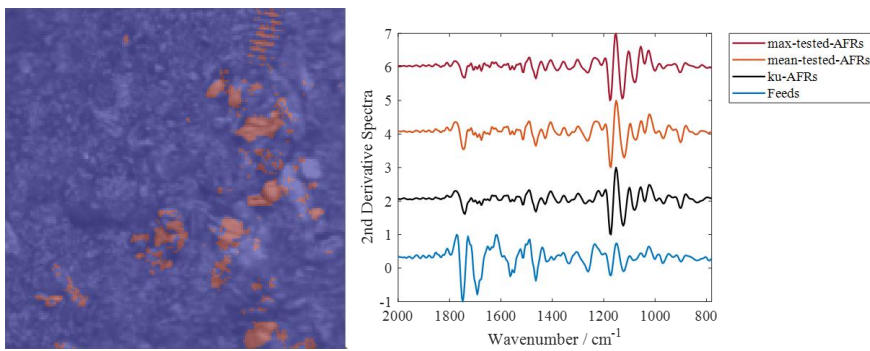


图 47 鸡肉粉中新霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、新霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.95，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.51%。

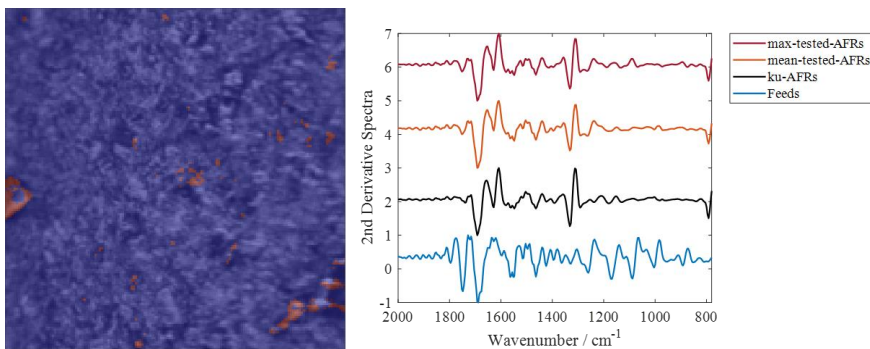


图 48 猪浓缩饲料中土霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、土霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.79%。

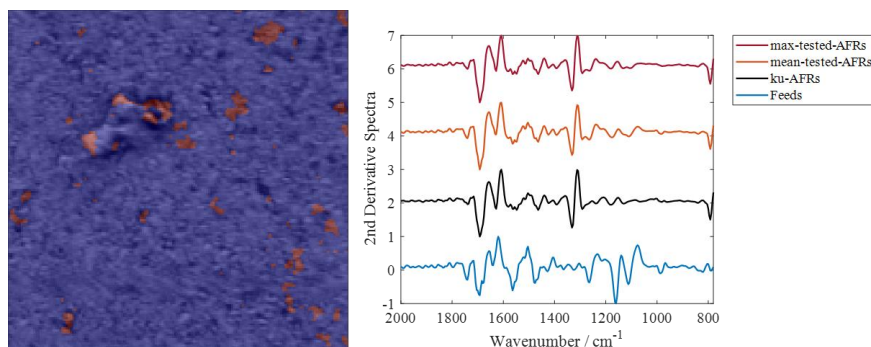


图 49 谷氨酸渣中土霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、土霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.99，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 3.72%

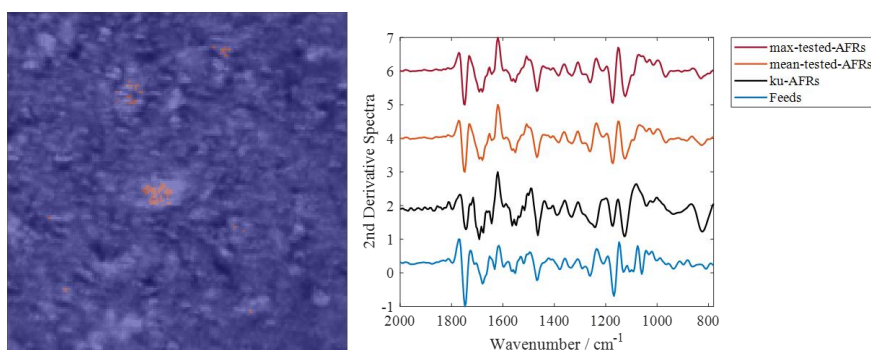


图 50 牛羊精料补充料中阿维菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、阿维菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.93，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 0.48%

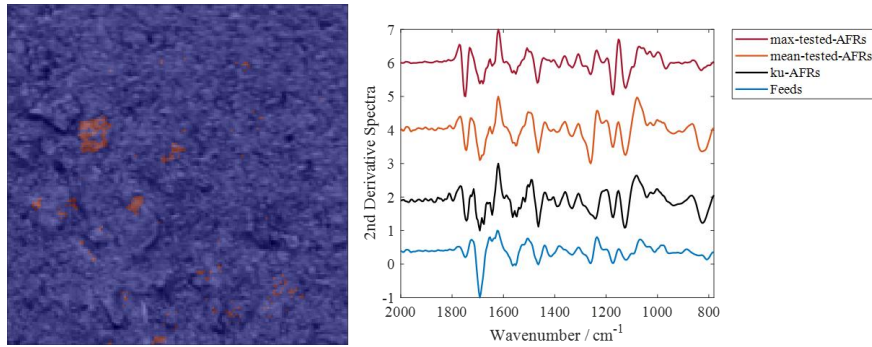


图 51 棉粕中阿维菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、阿维菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.96，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.60%。

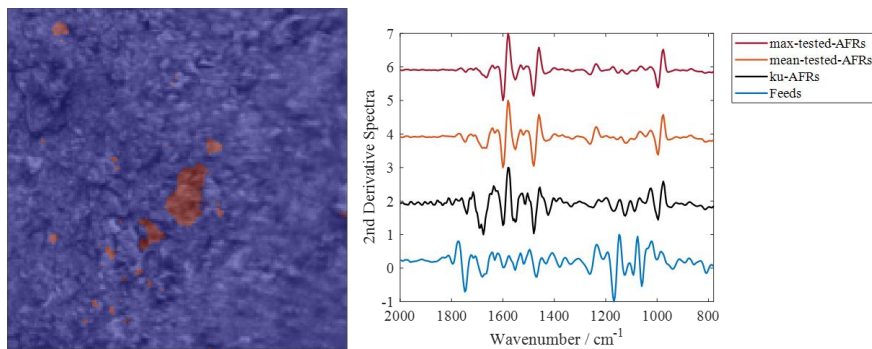


图 52 牛羊精料补充料中泰乐菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、泰乐菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.97，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.62%。

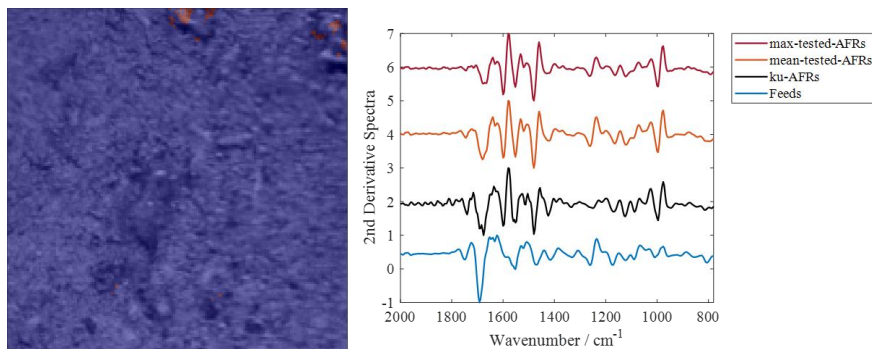


图 53 棉粕中泰乐菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、泰乐菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.94，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 0.49%。

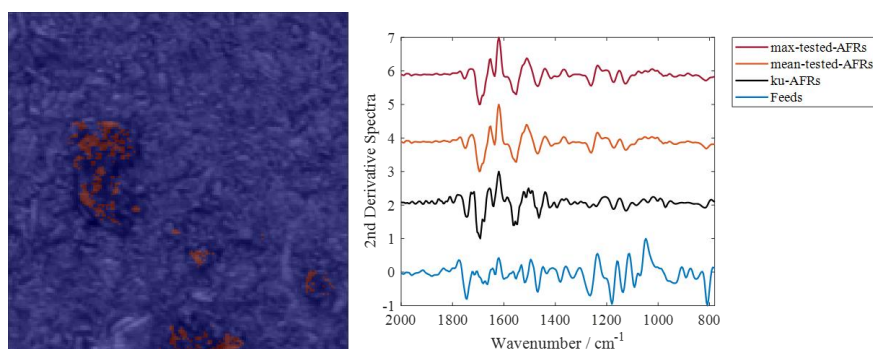


图 54 猪浓缩饲料中泰万菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、泰万菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.93，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.55%。

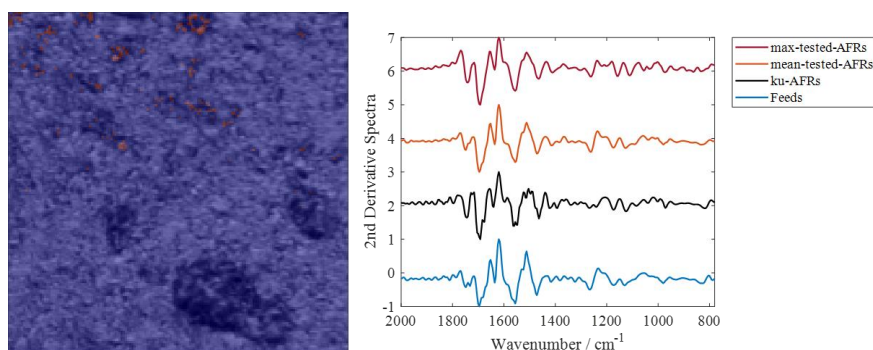


图 55 谷氨酸渣中泰万菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、泰万菌素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.93，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 1.02%。

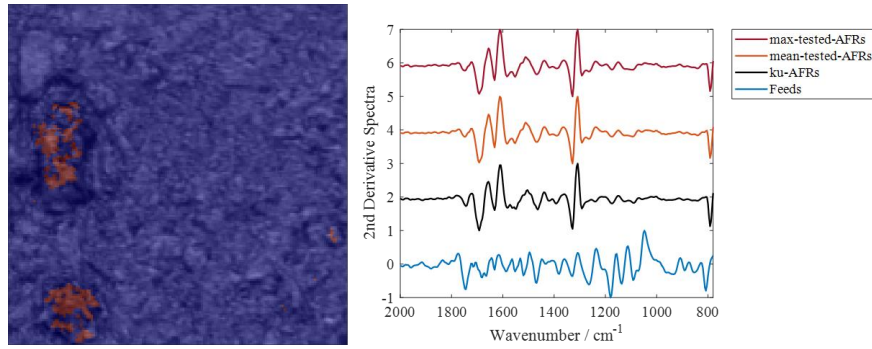


图 56 鸭配合饲料中金霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、金霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.99，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.68%。

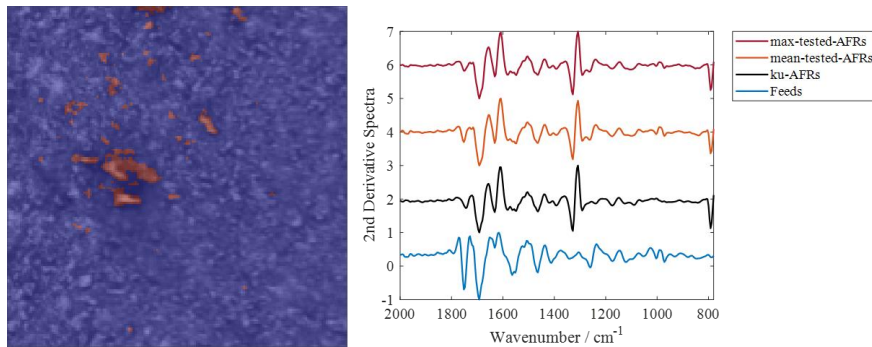


图 57 鸡肉粉中金霉素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中红色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料；右侧光谱从上到下分别为：与抗生素滤渣显微红外参比光谱余弦相似度最大的光谱、鉴别为抗生素滤渣的像素点光谱的平均光谱、金霉素滤渣的平均参比光谱、饲料的平均光谱。最高相似度光谱与参比光谱的相似度为 0.98，鉴别出的抗生素滤渣像素丰度为 2.79%。

4. 实时荧光 PCR 方法建立

4.1 适用范围

适用于饲料中青霉素滤渣、土霉素菌渣、新霉素滤渣、阿维菌素滤渣的鉴别检测。

4.2 DNA 提取方法确定

(1) DNA 提取

称取 20~50 mg 试样，按照商业化细菌基因组 DNA 提取试剂盒的标准步骤进行 DNA 提取。提取出的 DNA 溶液如需保存，应置于-18℃以下。

(2) DNA 浓度的测定

使用紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪对提取的 DNA 浓度进行测定，应将 DNA 浓度控制在 5~50 ng/μL 范围内。

4.3 实时荧光 PCR 检测方法的确定

4.3.1 菌种的确定

在通过实时荧光 PCR 的方法对饲料中抗生素滤渣进行检测时，引物探针的设计至关重要。因此需要针对生产抗生素的发酵菌种的对应特定基因设计引物及探针，才能对饲料中相应抗生素滤渣进行有效检测。由前期的资料调研可知，用于生产青霉素的菌种为产黄青霉菌，生产土霉素的菌种为龟裂链霉菌，生产新霉素的菌种为弗氏链霉菌，生产阿维菌素的菌种为阿氟曼链霉菌。所采集的样品，根据采集厂家提供的信息，生产青霉素的菌种未提供，用于发酵生产土霉素的菌种为龟裂链霉菌（表 4），用于发酵生产新霉素的菌种为弗氏链霉菌（表 4），用于发酵生产阿维菌素的菌种为阿氟曼链霉菌（表 4）。前期资料调研结果与厂家所提供的信息基本相吻合，因此能够进一步针对相应发酵菌中参与生产对应抗生素的特定基因设计引物及探针，从而对饲料中抗生素滤渣进行检测。

表 4 4 种抗生素滤渣采集信息表

省份	抗生素种类	抗生素	生产企业	发酵菌种	滤渣处理工艺	酸化破壁工艺和添加化合物的名称
福建	青霉素	青霉素	/	/	/	/
河北	土霉素	土霉素	河北圣雪大成制药有限责任公司	龟裂链丝菌	板框过滤，烘干	草酸和盐酸，调 pH <2.5
内蒙古	土霉素	土霉素	内蒙古圣雪大成制药有限责任公司	放线菌门链霉菌属	高压过滤，滤饼处理	草酸、盐酸

省份	抗生素种类	抗生素	生产企业	发酵菌种	滤渣处理工艺	酸化破壁工艺和添加化合物的名称
内蒙古	土霉素	土霉素	内蒙古华曙生物科技有限公司	链霉菌属	加腐殖酸和磷酸二氢钾，过滤，破碎干燥	草酸和盐酸，调 pH1.7-2.0
内蒙古	新霉素	新霉素	齐鲁制药（内蒙古）有限公司呼伦贝尔分公司	弗氏链霉菌	板框过滤，浆叶干燥机干燥	无
湖北	新霉素	新霉素	宜昌三峡制药有限公司	弗氏链霉菌	废液环保站处理	自然酸化，或加酸碱调 pH
湖北	新霉素	新霉素	三峡制药（湖北宜昌猗亭）有限公司	弗氏链霉菌	废液环保站处理	自然酸化，或加酸碱调 pH6.4-7.0
湖北	阿维菌素	阿维菌素	内蒙古仁中生物科技有限公司	阿氟曼链霉菌	板框过滤，60℃真空干燥	无酸化处理
湖北	阿维菌素	阿维菌素	华北制药集团爱诺有限公司	链霉菌	过滤后干燥	无

4.3.2 特征性基因的确定

抗生素的生物合成是微生物通过复杂的代谢途径产生具有抗菌活性的次级代谢产物的过程。首先，微生物利用初级代谢生成氨基酸、糖类前体物质，随后在特定酶的催化下，这些前体经过一系列反应，如缩合、环化、氧化和还原，逐步转化为抗生素的中间体。接着，中间体可能通过甲基化、糖基化等修饰反应进一步增强活性或稳定性。最终，合成完成的抗生素通过分泌系统释放到细胞外。因此可以通过检测参与相应抗生素生物合成基因簇中特定的基因从而对产生目标抗生素的菌株进行确定，最终对饲料中的抗生素滤渣进行检测。*orf70c* 基因是青霉素合成途径中的一个重要基因，来源于产黄青霉菌，编码与青霉素生物合成相关的酶。*oxyA* 基因来源于链霉菌属，所编码的酶在土霉素环化反应中起到催化作用，将合成前的线性多酮化合物转化为环状结构，形成土霉素的核心骨架结构。*neoN* 基因来源于弗氏链霉菌，所编码的酶是新霉素合成途径中的糖基转移酶，将特定的糖基添加到新霉素的核心分子结构上，帮助完成新霉素的合成。*aveD* 基因来源于阿氟曼链霉菌，编码的酶在阿维菌素的环化和结构修饰过程中起着催化作用，通过催化特定的酶促反应，将阿维菌素前体分子转化为具有生物活性的化合物。因此可以通过检测 *orf70c*、*oxyA*、*neoN* 及 *aveD* 基因进而分别对青霉素、土霉素、新霉素及阿维菌素的滤渣进行检测。

4.3.3 引物及探针的确定

4.3.3.1 引物探针的设计与筛选

分别选择青霉素、土霉素、新霉素及阿维菌素抗生素合成基因簇中 *orf70c*、

oxyA、*neoN*、*aveD* 基因作为相应的抗生素滤渣检测的菌株特异性基因，分别设计相应的引物及探针。引物和探针的序列如表 5 所示，由上海生工生物技术有限公司合成。

表 5 引物、探针信息表

种类	引物探针	序列	目标基因	产物长度
青霉素	Orf70c-F	5'-GAGCCTTCGGATTTTTTCGCC-3'	<i>orf70c</i>	112 bp
	Orf70c-R	5'-GCCAGCTCGCCTTACTACAA-3'		
	Orf70c-P	5'-FAM-TGGCTCGGACATCCATGCCCT-BHQ1-3'		
土霉素	OxyA-F	5'-CATGACGATGAGCCTGGACC-3'	<i>oxyA</i>	114 bp
	OxyA-R	5'-GACGAGGGCACGAAGTAGTC-3'		
	OxyA-P	5'-FAM-GGCTGTGGCAGGTGGACGAC-BHQ1-3'		
新霉素	NeoN-F	5'-TCAACGCCTACATCGACCTG-3'	<i>neoN</i>	181 bp
	NeoN-R	5'-CCGGTCTCGAAGATGTGGTT-3'		
	NeoN-P	5'-FAM-GCTGACCGTGAACCTGCGCT-BHQ1-3'		
阿维菌素	AveD-F	5'-CGATGAGGAGATCGGTGAGC-3'	<i>aveD</i>	140 bp
	AveD-R	5'-AGTGGGGGACTACTACGACC-3'		
	AveD-P	5'-FAM-TTGCCCGGTGAACTGCCGTC-BHQ1-3'		

4.3.3.2 引物及探针的特异性验证

(1) 环境样本及空白饲料的特异性验证

以青霉素滤渣 DNA 作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、尿肠、酵母饲料、豆粕、棉粕、谷氨酸渣、核苷酸渣、鸡配合饲料、牛精料补充料、猪浓缩饲料、发酵原料（红麻）、酸性基质饲料（发酵酒糟 pH 5.13）、鸡肉粉及混合型饲料添加剂（含酵母）的 DNA 为阴性模板，验证所设计的青霉素滤渣引物的特异性。如图 58，只有青霉素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对青霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

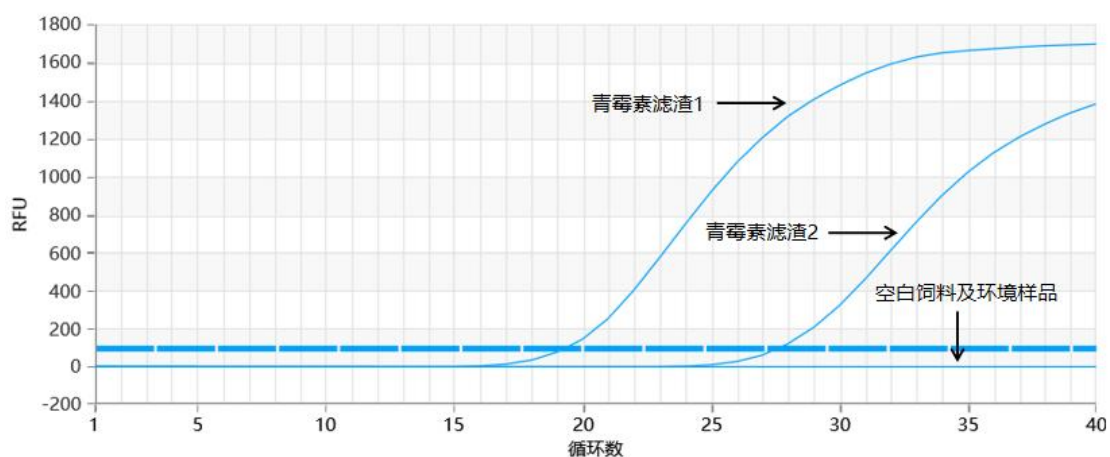


图 58 青霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以土霉素滤渣 DNA 作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、尿肠、酵母饲料、豆粕、棉粕、谷氨酸渣、核苷酸渣、鸡配合饲料、牛精料补充料、猪浓缩饲料、发酵原料（红麻）、酸性基质饲料（发酵酒糟 pH 5.13）、鸡肉粉及混合型饲料添加剂（含酵母）的 DNA 为阴性模板，验证所设计的土霉素滤渣引物的特异性。如图 59，只有土霉素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对土霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

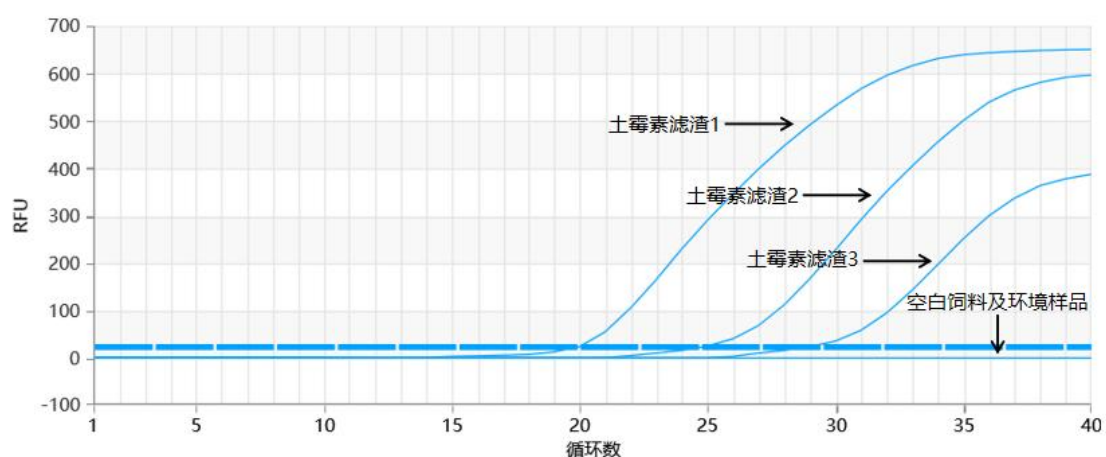


图 59 土霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以新霉素滤渣 DNA 分别作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆

菌、尿肠、酵母饲料、豆粕、棉粕、谷氨酸渣、核苷酸渣、鸡配合饲料、牛精料补充料、猪浓缩饲料、发酵原料（红麻）、酸性基质饲料（发酵酒糟 pH 5.13）、鸡肉粉及混合型饲料添加剂（含酵母）的 DNA 为阴性模板，验证所设计的新霉素滤渣引物的特异性。如图 60，只有新霉素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对新霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

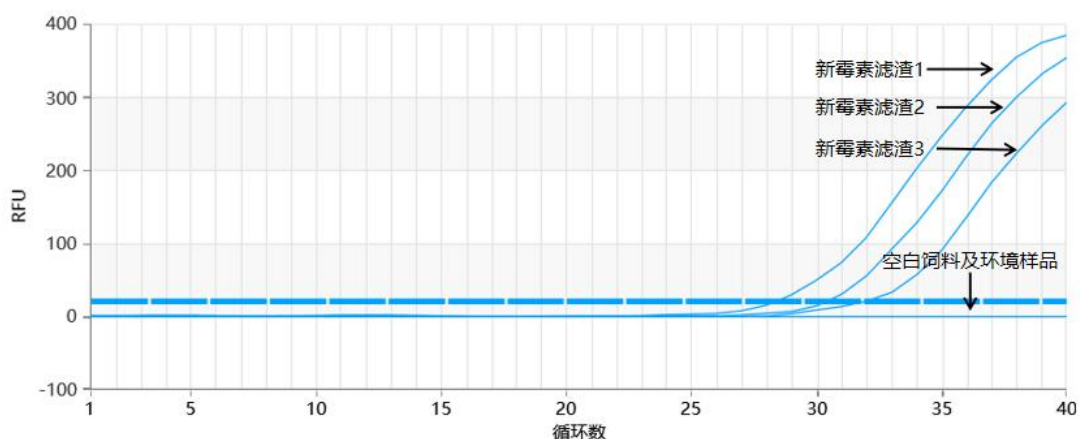


图 60 新霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以阿维菌素滤渣 DNA 分别作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、尿肠、酵母饲料、豆粕、棉粕、谷氨酸渣、核苷酸渣、鸡配合饲料、牛精料补充料、猪浓缩饲料、发酵原料（红麻）、酸性基质饲料（发酵酒糟 pH 5.13）、鸡肉粉及混合型饲料添加剂（含酵母）的 DNA 为阴性模板，验证所设计的阿维菌素滤渣引物的特异性。如图 61，只有阿维菌素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对阿维菌素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

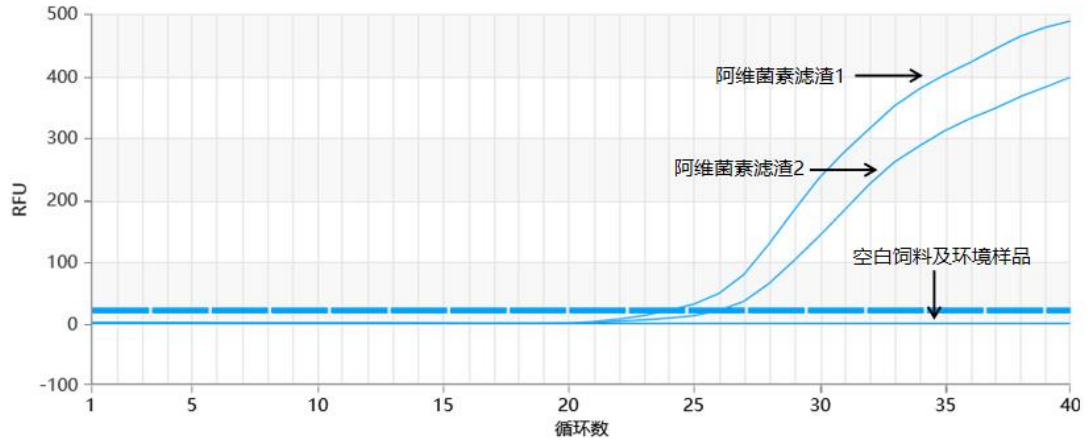


图 61 阿维菌素滤渣的特异性扩增曲线图

(2) 抗生素滤渣的交叉反应性验证

以青霉素、土霉素、新霉素及阿维菌素的滤渣 DNA 分别作为模板，验证所设计的 4 种滤渣引物及探针与目前所采集的所有抗生素滤渣间是否存在交叉反应。如图 62，只有目标引物及探针可以扩增对应滤渣，并且具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明相应引物及探针具有高度特异性，并且与目前所采集的滤渣之间无交叉反应。

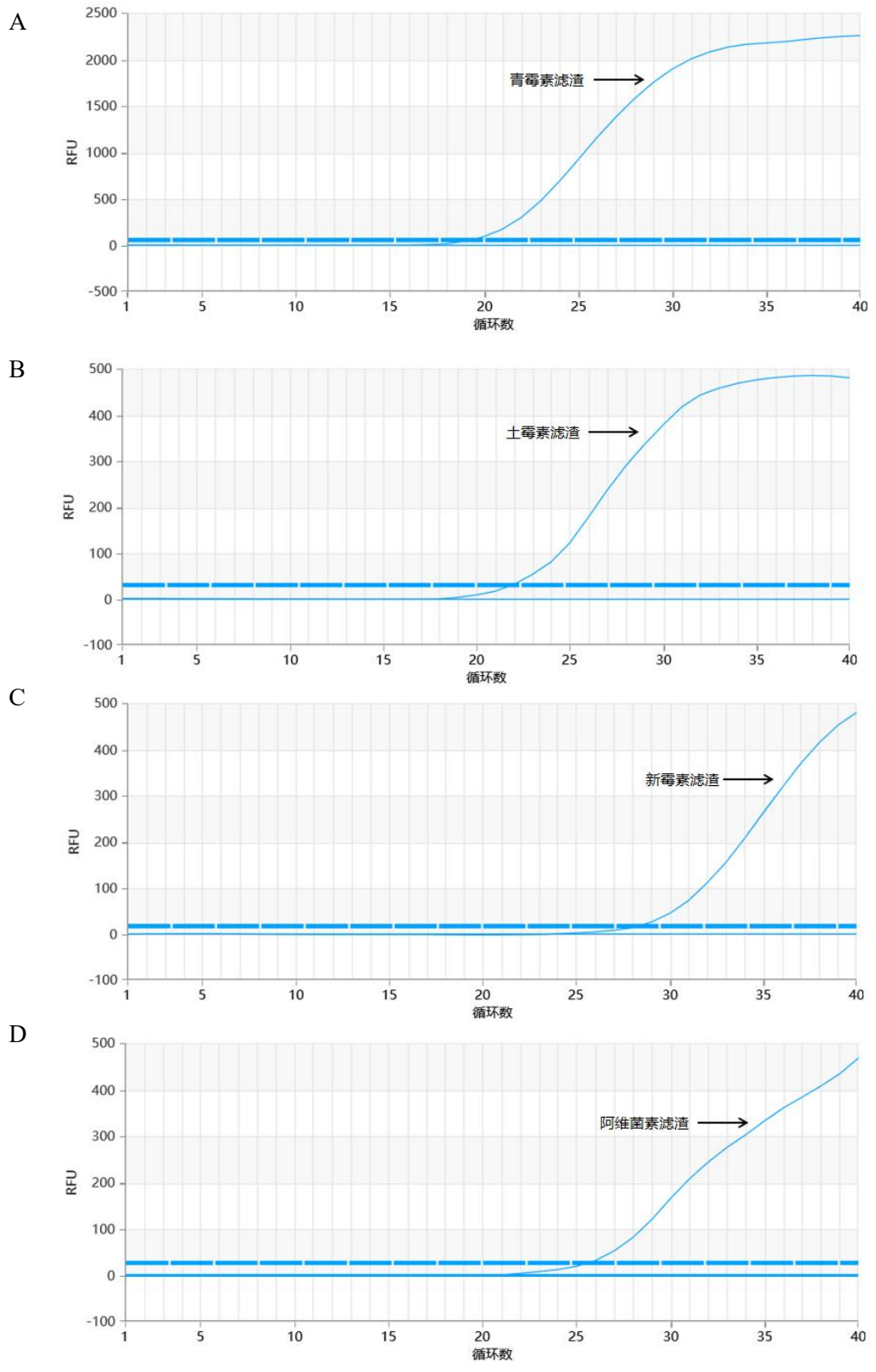


图 62 阳性滤渣间的交叉反应验证结果图

A: 青霉素滤渣; B: 土霉素滤渣; C: 新霉素滤渣; D: 阿维菌素滤渣。

4.3.3.3 引物及探针的优化

引物与探针的浓度比例以及引物的退火温度对 PCR 扩增曲线的质量具有显著影响。因此，需要对上述两个关键参数进行优化，以实现最佳的检测效果。

(1) 青霉素滤渣引物与探针浓度的优化

以提取的青霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板，通过正交试验设计，考察不同引物与探针浓度比例（0.4 μM :0.4 μM ，0.8 μM :0.8 μM ，0.4 μM :0.1 μM ，0.8 μM :0.2 μM ，0.4 μM :0.2 μM ，0.8 μM :0.4 μM ）以及退火温度（58 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ ，62 $^{\circ}\text{C}$ ，64 $^{\circ}\text{C}$ ）对扩增效果的影响。优化结果如图 63 示，综合考虑荧光强度、扩增曲线形状、Ct 值以及试剂成本等多个因素，最终确定引物与探针的浓度比为 0.4 μM :0.1 μM ，引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$ ，并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验，从而确保试验的准确性与稳定性。

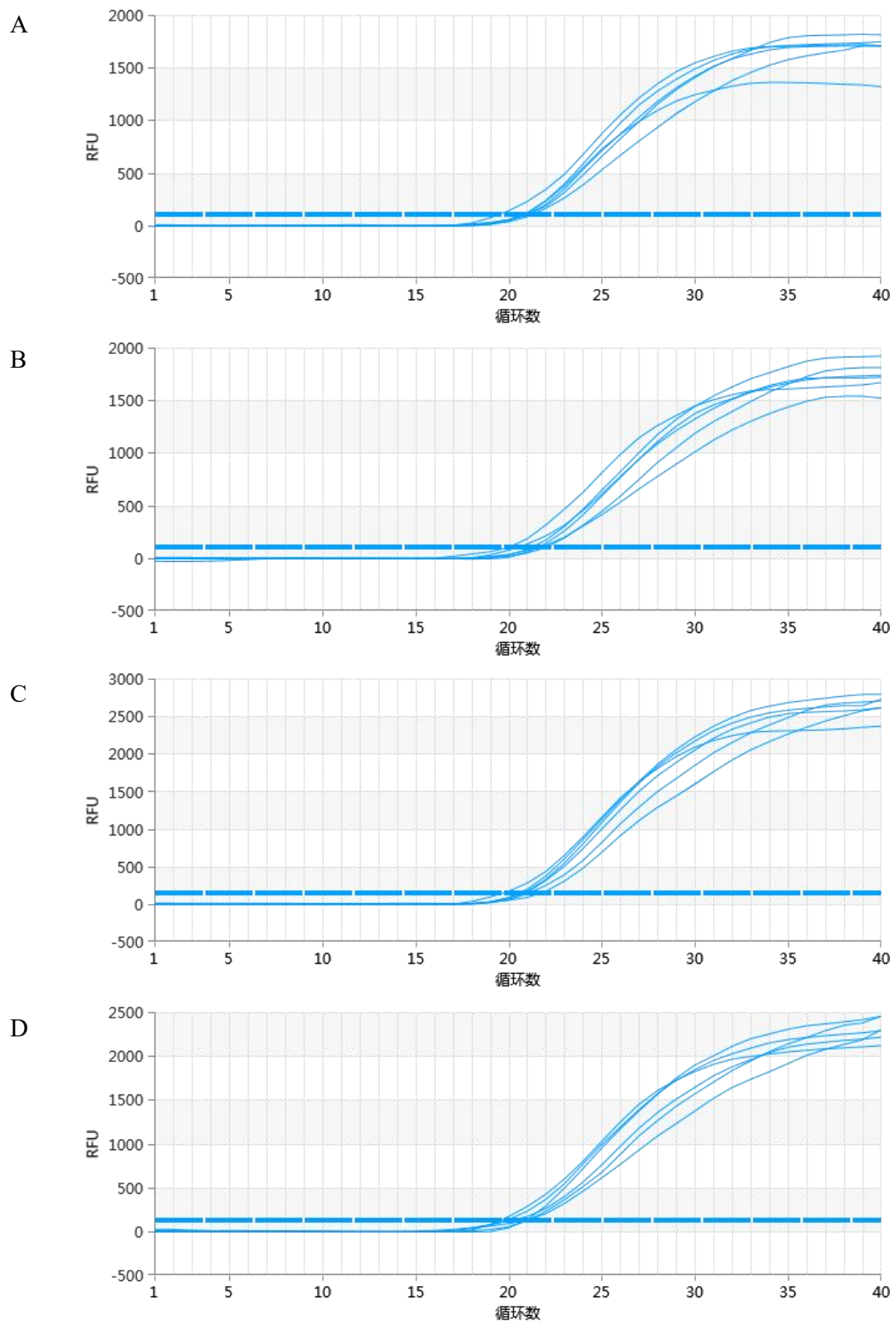


图 63 青霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图
 A——退火温度为 58°C；B——退火温度为 60°C；
 C——退火温度为 62°C；D——退火温度为 64°C。

(2) 土霉素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的土霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板，通过正交试验设计，考察不同引物与探针浓度比例（0.4 μM :0.4 μM ，0.8 μM :0.8 μM ，0.4 μM :0.1 μM ，0.8 μM :0.2 μM ，0.4 μM :0.2 μM ，0.8 μM :0.4 μM ）以及退火温度（58 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ ，62 $^{\circ}\text{C}$ ，64 $^{\circ}\text{C}$ ）对扩增效果的影响。优化结果如图 64 示，综合考虑荧光强度、扩增曲线形状、Ct 值以及试剂成本等多个因素，最终确定引物与探针的浓度比为 0.4 μM :0.1 μM ，引物退火延伸温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ ~64 $^{\circ}\text{C}$ ，并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验，从而确保试验的准确性与稳定性。

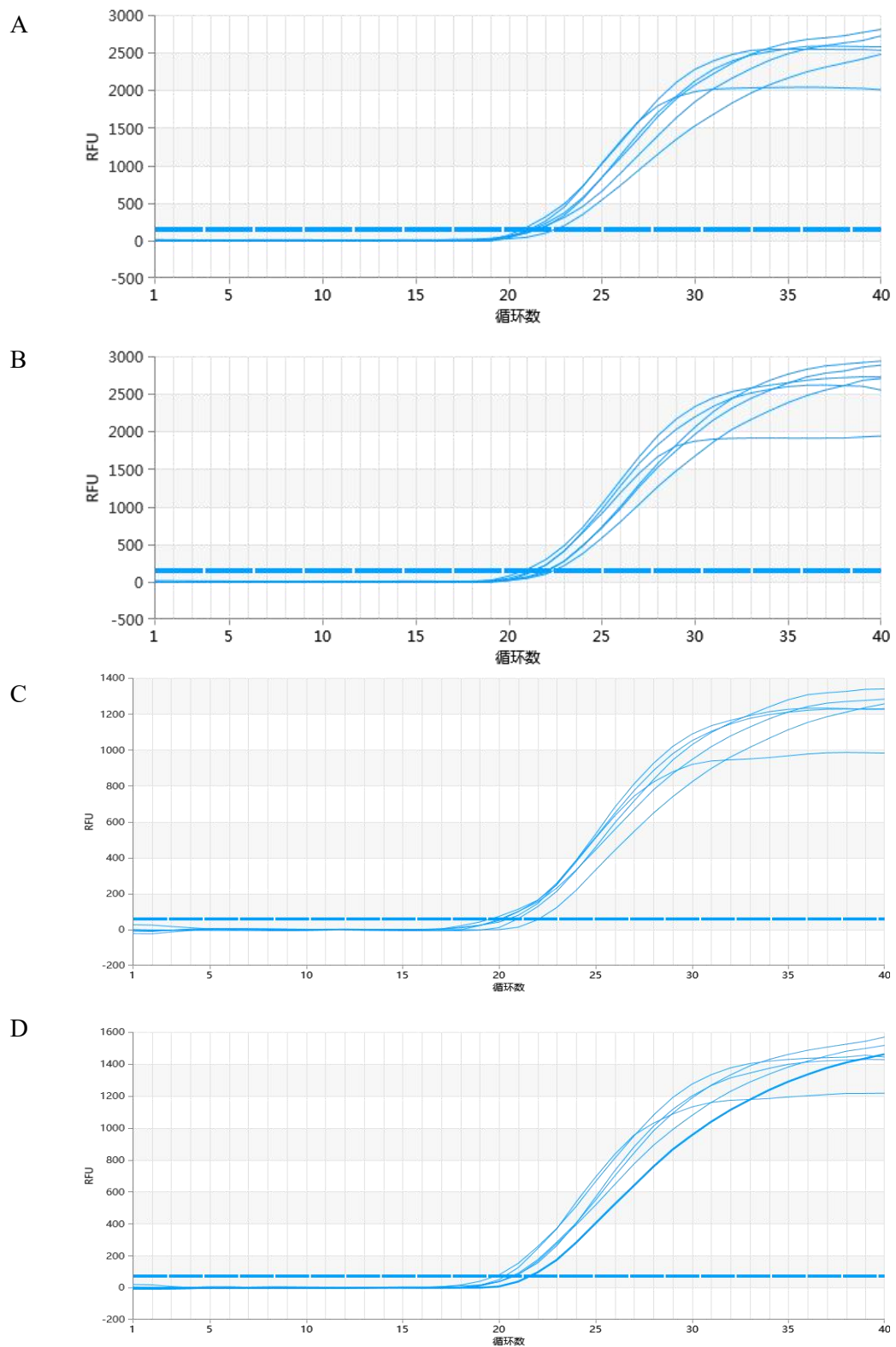


图 64 土霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图
A——退火温度为 58°C；B——退火温度为 60°C；
C——退火温度为 62°C；D——退火温度为 64°C。

(3) 新霉素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的新霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板，通过正交试验设计，考察不同引物与探针浓度比例（0.4 μM :0.4 μM ，0.8 μM :0.8 μM ，0.4 μM :0.1 μM ，0.8 μM :0.2 μM ，0.4 μM :0.2 μM ，0.8 μM :0.4 μM ）以及退火温度（58 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ ，62 $^{\circ}\text{C}$ ，64 $^{\circ}\text{C}$ ）对扩增效果的影响。优化结果如图 65 示，综合考虑荧光强度、扩增曲线形状及 Ct 值等多个因素，最终确定引物与探针的浓度比为 0.4 μM :0.1 μM ，引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$ ，并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验，从而确保试验的准确性与稳定性。

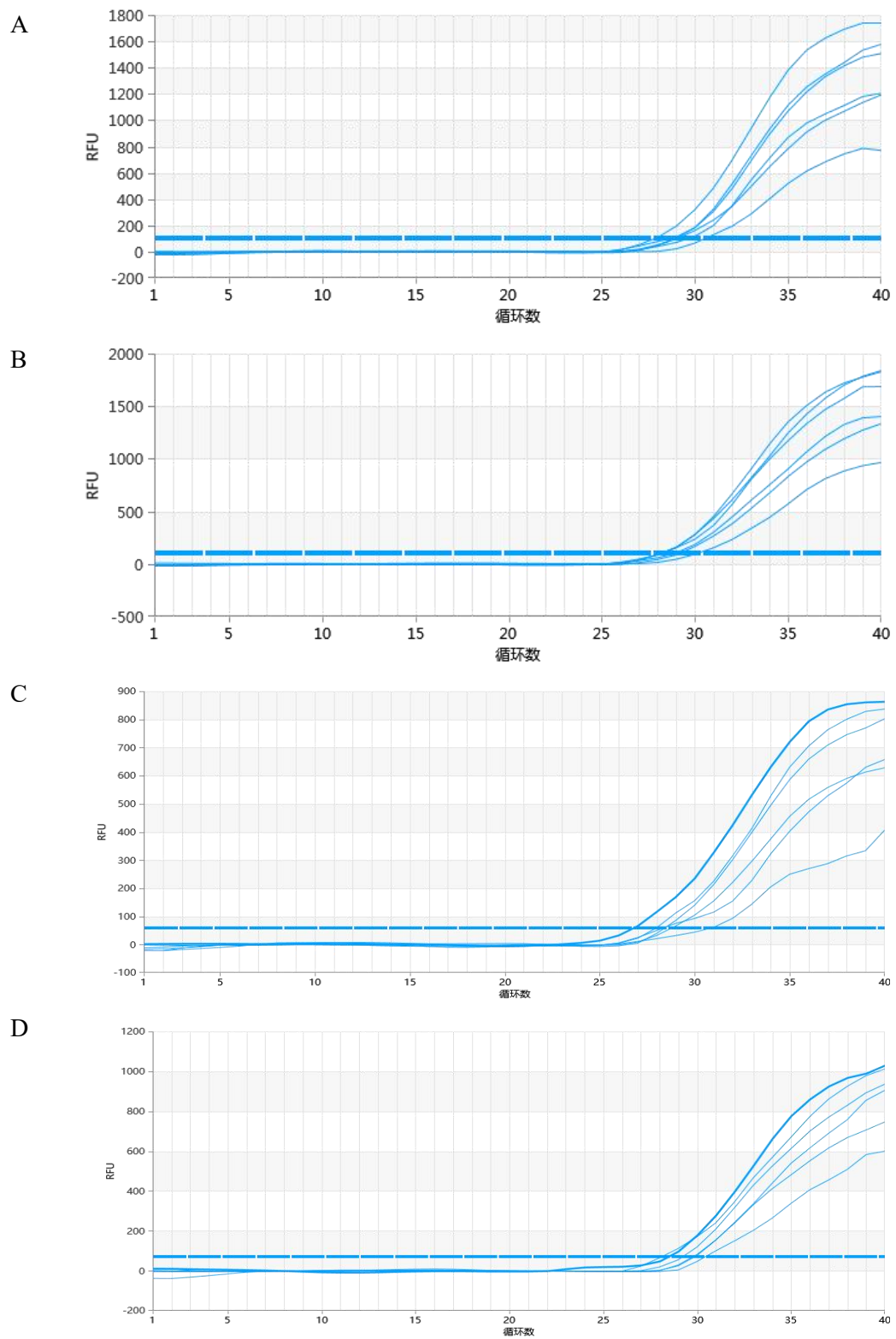


图 65 新霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A——退火温度为 58°C；B——退火温度为 60°C；

C——退火温度为 62°C；D——退火温度为 64°C。

(4) 阿维菌素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的阿维菌素滤渣的核酸样品作为扩增模板，通过正交试验设计，考察不同引物与探针浓度比例（0.4 μM :0.4 μM ，0.8 μM :0.8 μM ，0.4 μM :0.1 μM ，0.8 μM :0.2 μM ，0.4 μM :0.2 μM ，0.8 μM :0.4 μM ）以及退火温度（58 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ ，62 $^{\circ}\text{C}$ ，64 $^{\circ}\text{C}$ ）对扩增效果的影响。优化结果如图 66 示，综合考虑荧光强度、扩增曲线形状及 Ct 值等多个因素，最终确定引物与探针的浓度比为 0.8 μM :0.2 μM ，引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$ ，并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验，从而确保试验的准确性与稳定性。

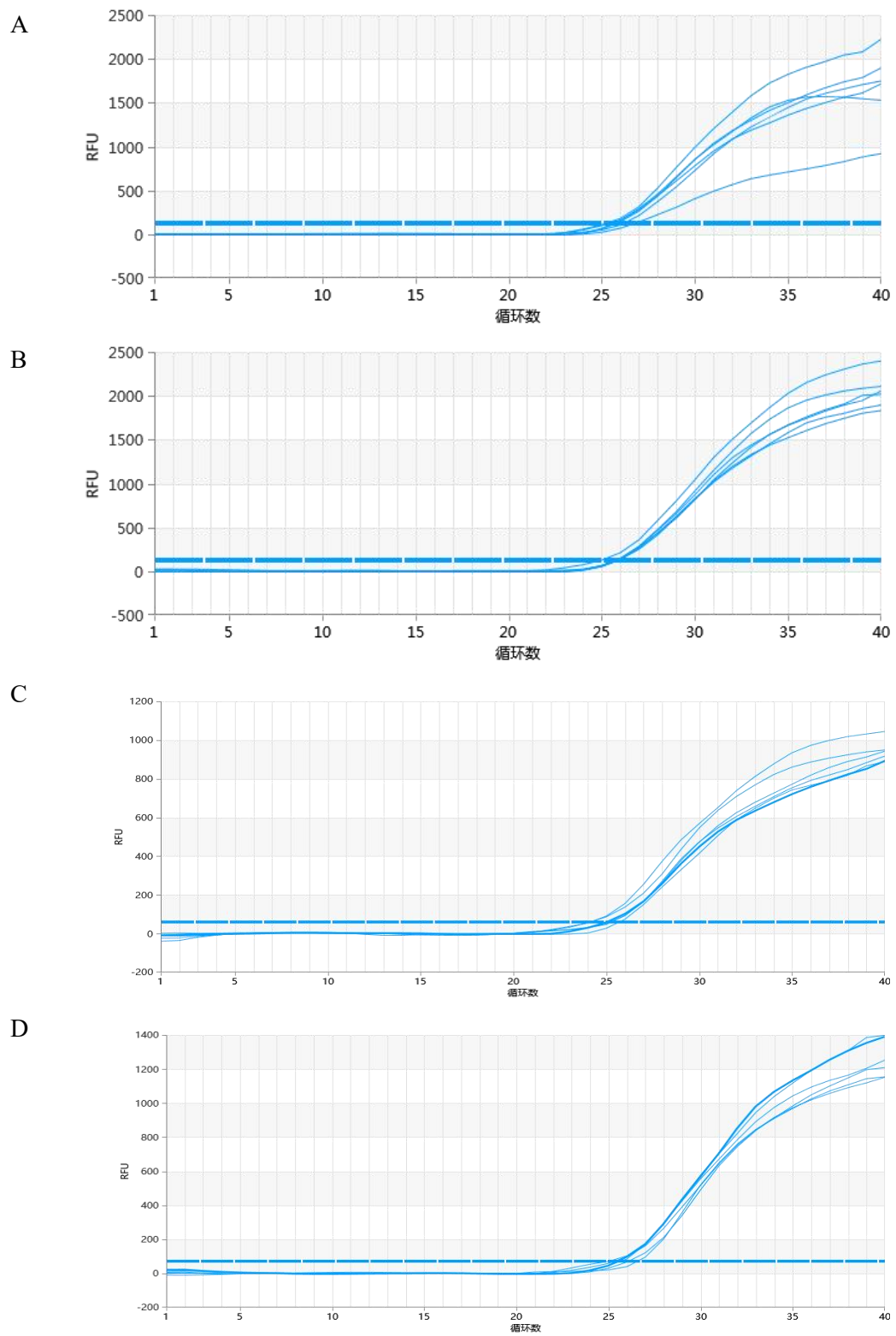


图 66 阿维菌素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A——退火温度为 58°C；B——退火温度为 60°C；

C——退火温度为 62°C；D——退火温度为 64°C。

4.3.4 实时荧光 PCR 反应体系和程序的确定

准确移取 2×实时荧光PCR预混液 12.5 μL，置于PCR反应管中，加入上下游引物（10 μmol/L）和探针（10 μmol/L），添加量见表 6，然后加入模板DNA 5 μL，加水至 25 μL。扩增程序见表 7。

表 6 实时荧光 PCR 参数

目标物	引物添加量	探针添加量
青霉素滤渣	1 μL	0.25 μL
土霉素滤渣	1 μL	0.25 μL
新霉素滤渣	1 μL	0.25 μL
阿维菌素滤渣	2 μL	0.5 μL

表 7 实时荧光 PCR 参数

目标物	反应参数
青霉素滤渣	95°C预变性 3 分钟，95°C变性 15 秒，60°C退火延伸 40 秒，共 40 个循环
土霉素滤渣	95°C预变性 3 分钟，95°C变性 15 秒，60°C退火延伸 40 秒，共 40 个循环
新霉素滤渣	95°C预变性 3 分钟，95°C变性 15 秒，60°C退火延伸 40 秒，共 40 个循环
阿维菌素滤渣	95°C预变性 3 分钟，95°C变性 15 秒，60°C退火延伸 40 秒，共 40 个循环

4.4 方法评价

4.4.1 重复性测试

重复性测试能够检验 PCR 方法的可靠性和稳定性。

4.4.1.1 饲料中青霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将青霉素滤渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV）及标准偏差（SD），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 8 所示，批内 Ct 值的变异系数（CV）在 0.46~0.54%之间，批间 Ct 值的 CV 在 0.37~0.69%。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 8 饲料中青霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

青霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	30.40±0.14	0.46	30.37±0.11	0.37
5 倍稀释	31.19±0.17	0.54	31.24±0.21	0.69

4.4.1.2 饲料中土霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将土霉素滤渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 9 所示，批内 Ct 值的变异系数（CV）在 0.71~1.8% 之间，批间 Ct 值的 CV 在 0.5~0.77%。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 9 饲料中土霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

土霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	23.71±0.43	1.8	22.81±0.12	0.53
5 倍稀释	25.18±0.18	0.71	24.54±0.19	0.77

4.4.1.3 饲料中新霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将新霉素滤渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 10 所示，批内 Ct 值的变异系数（CV）在 0.03%~0.63% 之间，批间 Ct 值的 CV 在 0.11%~0.65%。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 10 饲料中新霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

新霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	31.76±0.01	0.03	30.72±0.34	0.11
5 倍稀释	33.43±0.21	0.63	32.18±0.21	0.65

4.4.1.4 饲料中阿维菌素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将阿维菌素滤渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 11 所示，批内 Ct 值的变异系数（CV）在 0.48%-1.04%之间，批间 Ct 值的 CV 在 0.72%-0.79%。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 11 饲料中阿维菌素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

阿维菌素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	27.78±0.29	1.04	27.77±0.2	0.72
5 倍稀释	29.48±0.14	0.48	29.05±0.23	0.79

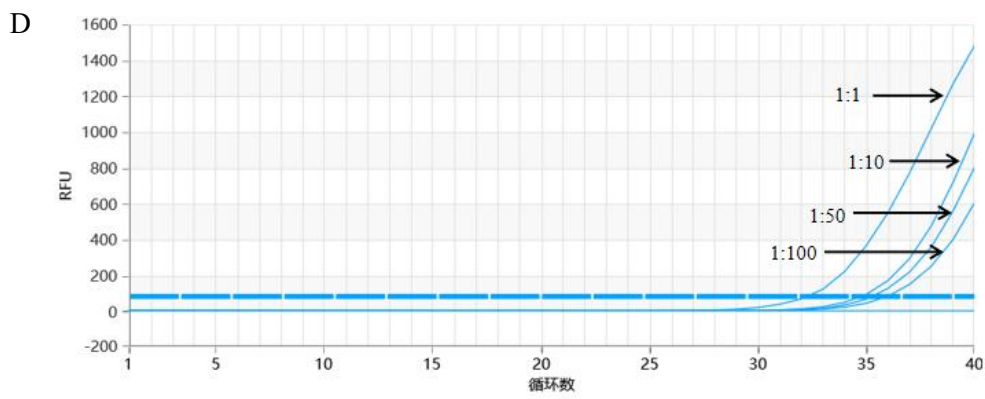
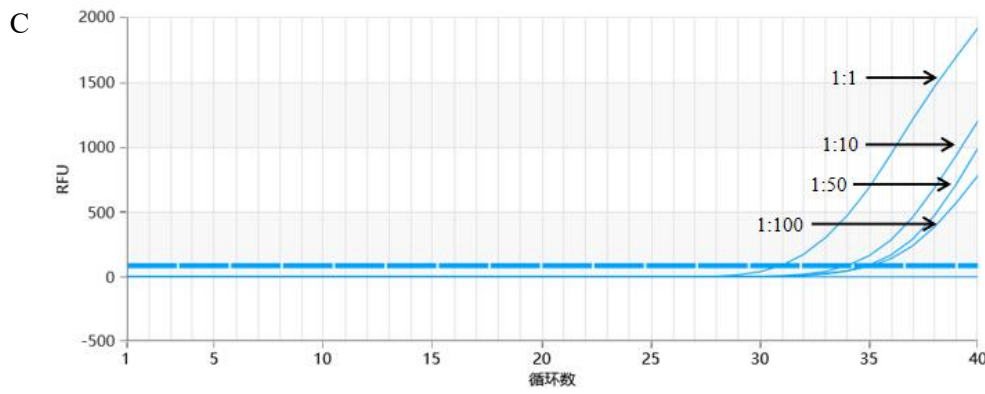
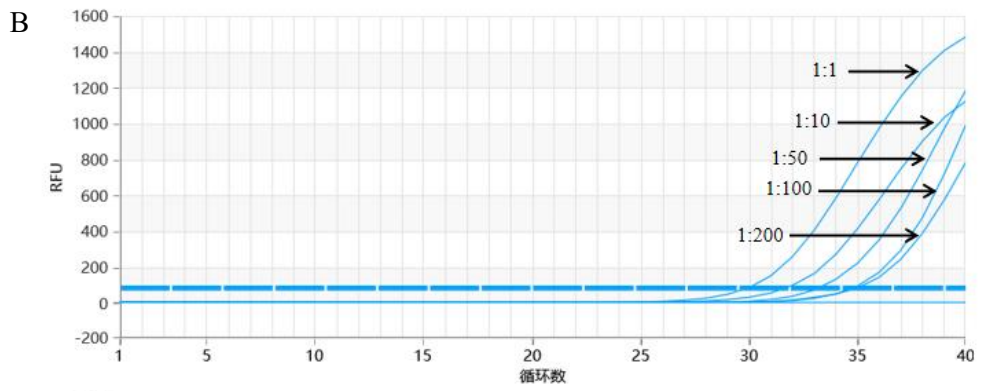
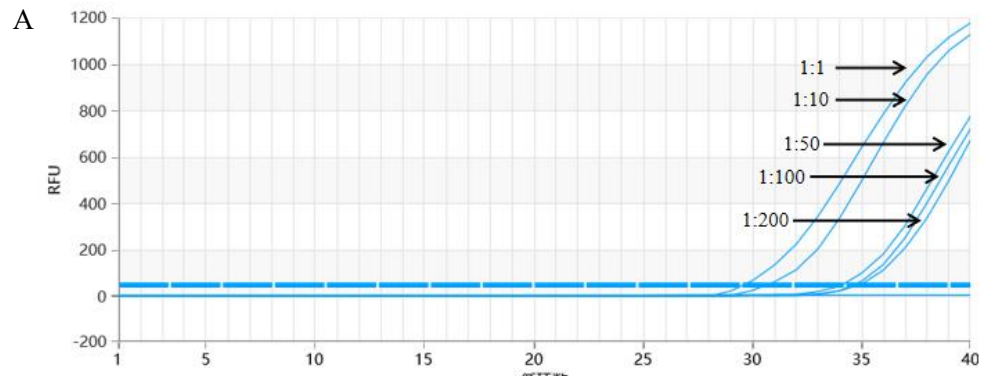
4.4.2 适用范围及灵敏度的确定

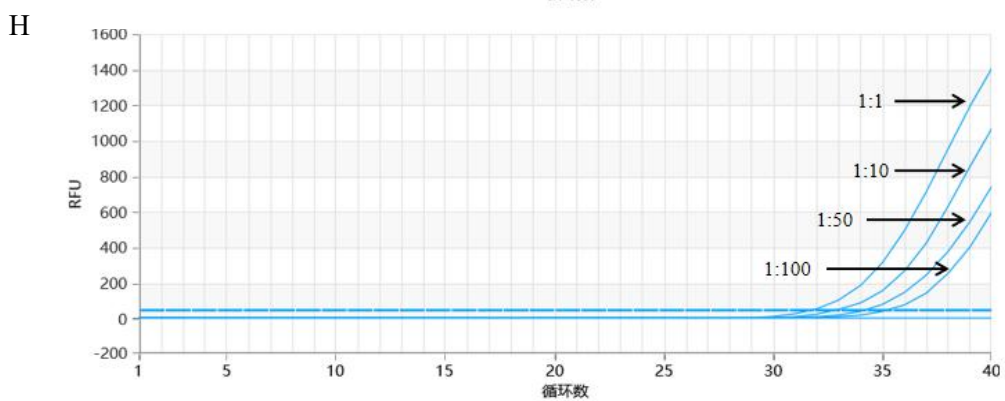
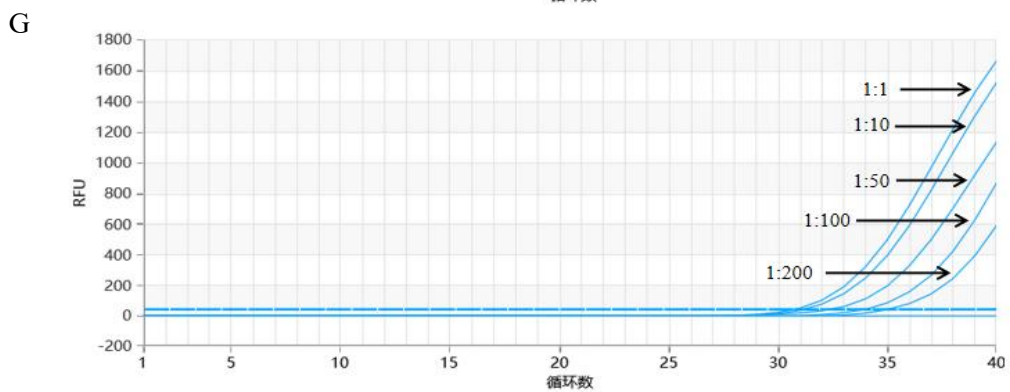
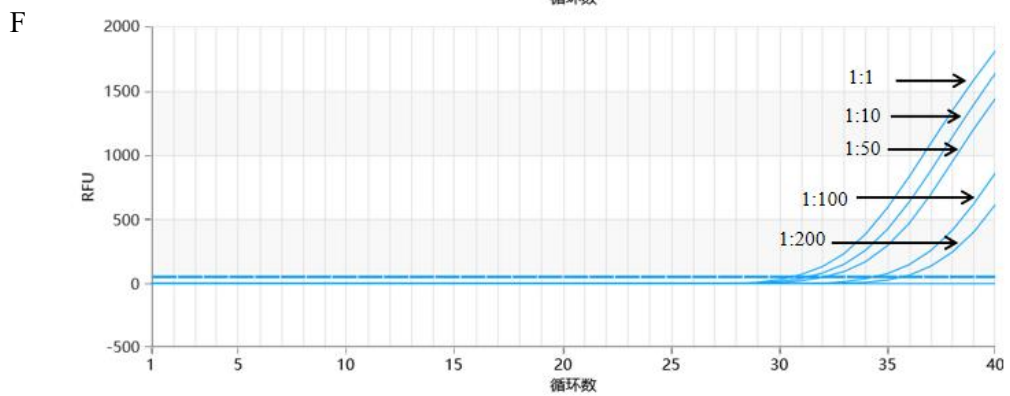
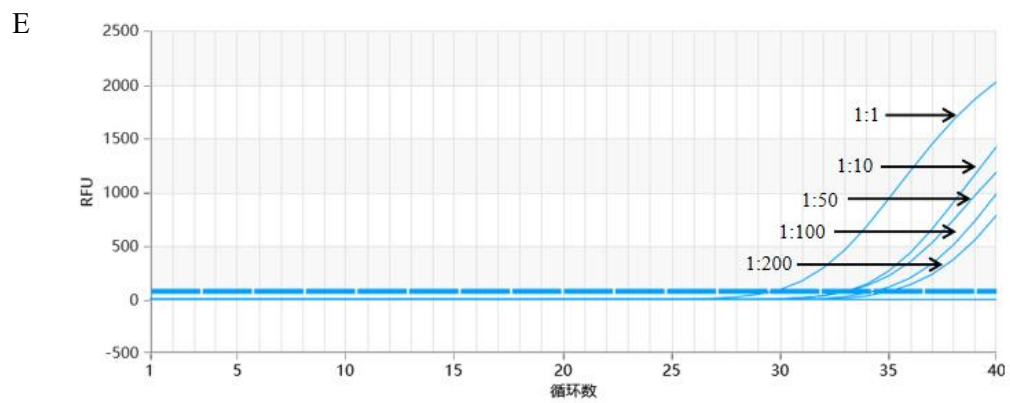
由于本方法的确立旨在针对含有抗生素滤渣的饲料进行检测，因此需模拟制备各种类型的添加抗生素滤渣的饲料样品并进行检测以对其在实际应用时的适用性及适用范围进行评估，同时对本方法检测 4 种抗生素滤渣饲料的灵敏度进行确定。

4.4.2.1 添加青霉素滤渣的真实样品的检测

将青霉素滤渣按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200 的比例分别与鸭配合饲料、牛精料补充料、发酵原料（红麻）、酸性基质饲料（发酵酒糟 pH 5.13）、猪浓缩饲料、谷氨酸渣、棉粕、鸡肉粉、鸡配合饲料及混合型饲料添加剂（含酵母）

充分进行混合，以制备不同比例的含青霉素滤渣的饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，验证所模拟制备的饲料样品能否检测出阳性扩增，从而评估本方法是否适用于多种饲料种类，适用范围是否广泛。同时对本方法检测含青霉素滤渣的各类型饲料样品的灵敏性进行确定。结果如图 67 所示。将青霉素滤渣与鸭配合饲料进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67A)；将青霉素滤渣与牛精料补充料进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67B)；将青霉素滤渣与发酵原料进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67C)；将青霉素滤渣与酸性基质饲料进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67D)；将青霉素滤渣与猪浓缩饲料进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67E)。将青霉素滤渣与谷氨酸渣进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67F)；将青霉素滤渣与棉粕进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67G)。将青霉素滤渣与鸡肉粉进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67H)；将青霉素滤渣与鸡配合饲料进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67I)；将青霉素滤渣与混合型饲料添加剂 (含酵母) 进行混合检测时能够最低检出 0.5% (1:200) 含量的青霉素滤渣添加 (图 67J)。因此表明本方法适用于多种类型的饲料中添加青霉素滤渣的检测，且最低能够检测出 1% 的青霉素滤渣添加的饲料。





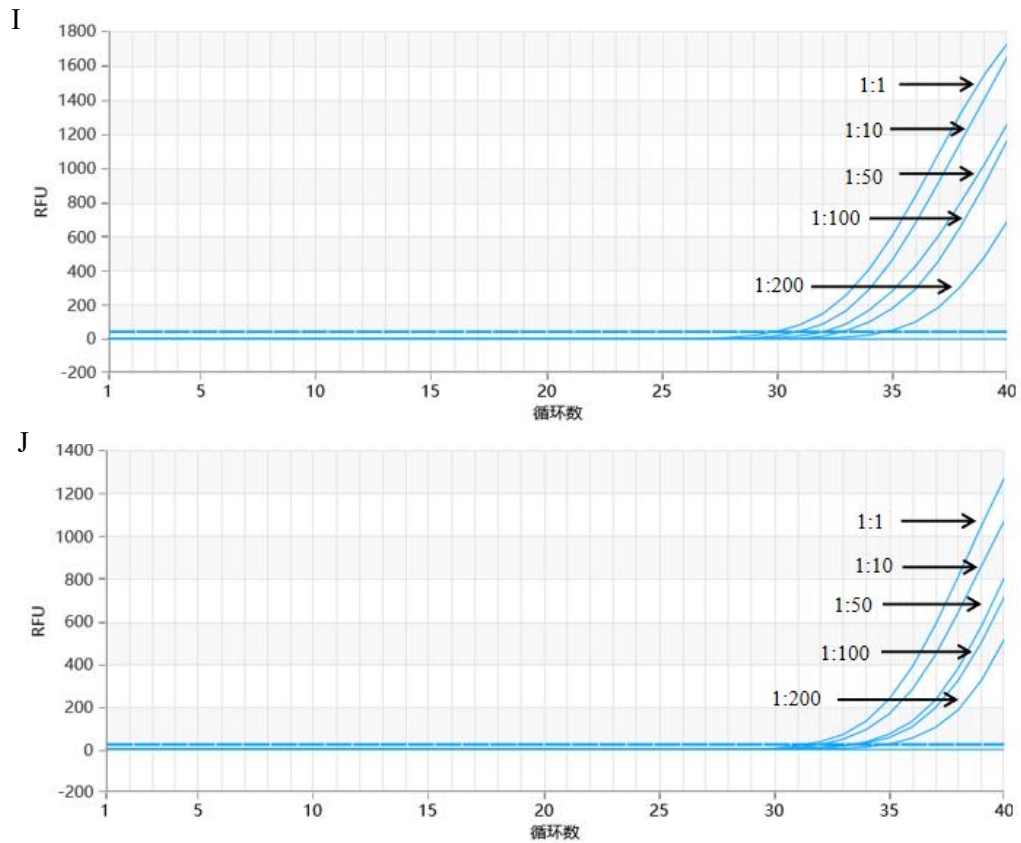


图 67 添加青霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

4.4.2.2 添加土霉素滤渣的真实样品的检测

由于上述四种滤渣对应的引物探针在检测各种类型饲料样品时的特异性已得到验证，均具有较好的特异性。且将青霉素滤渣添加到各种类型的饲料中均可提取出核酸并完成检测，具有良好的灵敏度，最低能够检测出 1% 的青霉素滤渣添加的饲料。由此可以推断出本方法同样适用于添加土霉素滤渣、新霉素滤渣及阿维菌素滤渣的各类型的饲料样品，因此在确定土霉素滤渣、新霉素滤渣及阿维菌素滤渣的灵敏度时只选择饲料原料及配合饲料两种类型的饲料进行添加检测，同样具备代表性。

将土霉素滤渣分别与谷氨酸渣、猪浓缩饲料及混合型饲料添加剂（含酵母）按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200 混合，制备不同比例的含土霉素滤渣的饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，从而对本方法在检测土霉素滤渣饲料时的灵敏度进行确定。结果如图 68 所示。将土霉素滤渣与谷氨酸渣进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的土

霉素滤渣添加（图 68A）；将土霉素滤渣与猪浓缩饲料进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的土霉素滤渣添加（图 68B）；将土霉素滤渣与混合型饲料添加剂（含酵母）进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的土霉素滤渣添加（图 68C）。因此表明本方法适用于多种类型的饲料中添加土霉素滤渣的检测，且最低能够检测出 0.5% 的土霉素滤渣添加的饲料。

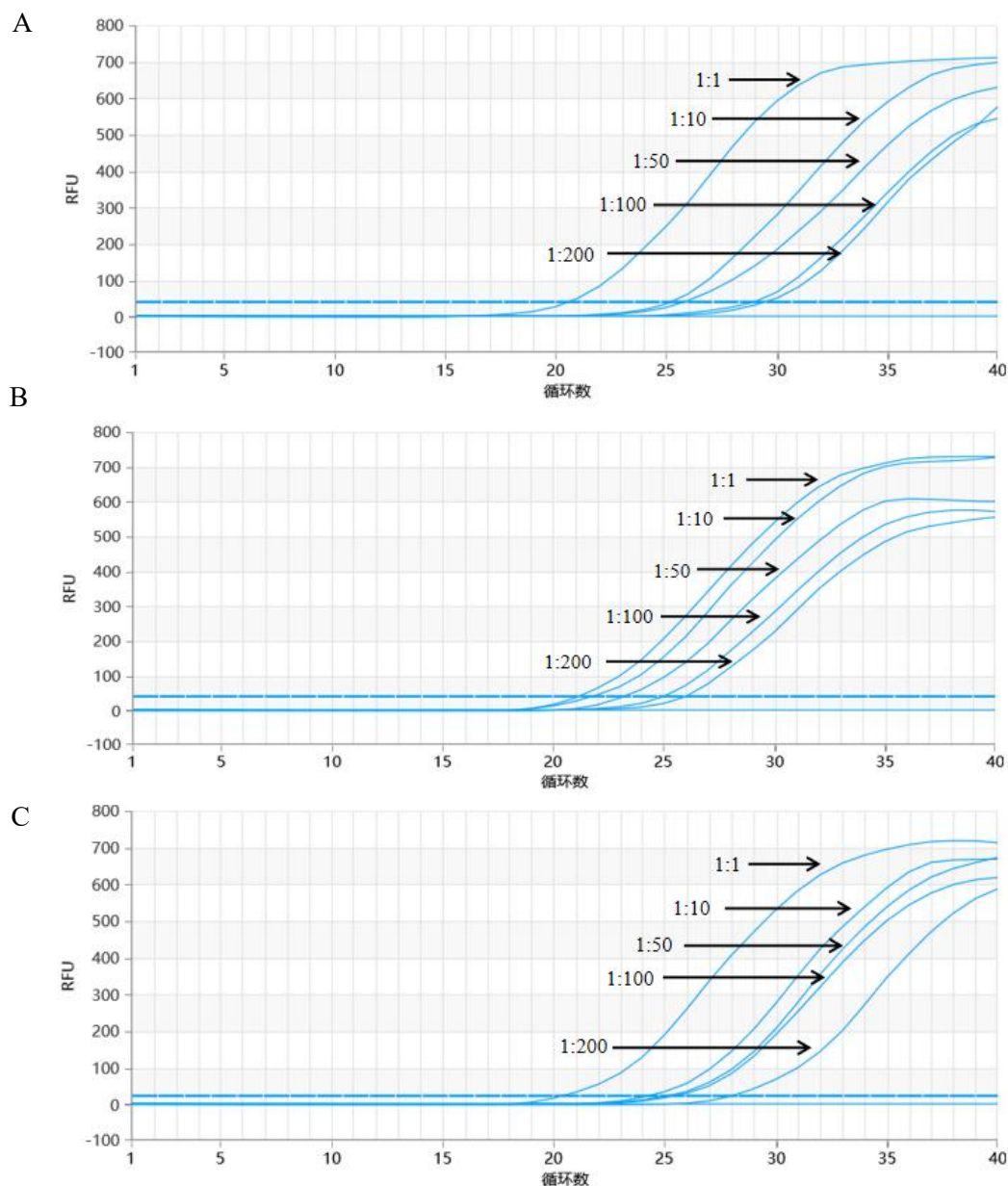


图 68 添加土霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

4.4.2.3 添加新霉素滤渣的真实样品的检测

将新霉素滤渣分别与鸡肉粉、鸭配合饲料及混合型饲料添加剂（含酵母）按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200 混合，制备不同比例的含新霉素滤渣的饲料样

品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，从而对本方法在检测新霉素滤渣饲料时的灵敏度进行确定。结果如图 69 所示。将新霉素滤渣与鸡肉粉进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的新霉素滤渣添加 (图 69A)；将新霉素滤渣与鸭配合饲料进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的新霉素滤渣添加 (图 69B)；将新霉素滤渣与混合型饲料添加剂 (含酵母) 进行混合检测时能够最低检出 1% (1:100) 含量的新霉素滤渣添加 (图 69C)。因此表明本方法适用于多种类型的饲料中添加新霉素滤渣的检测，且最低能够检测出 1% 的新霉素滤渣添加的饲料。

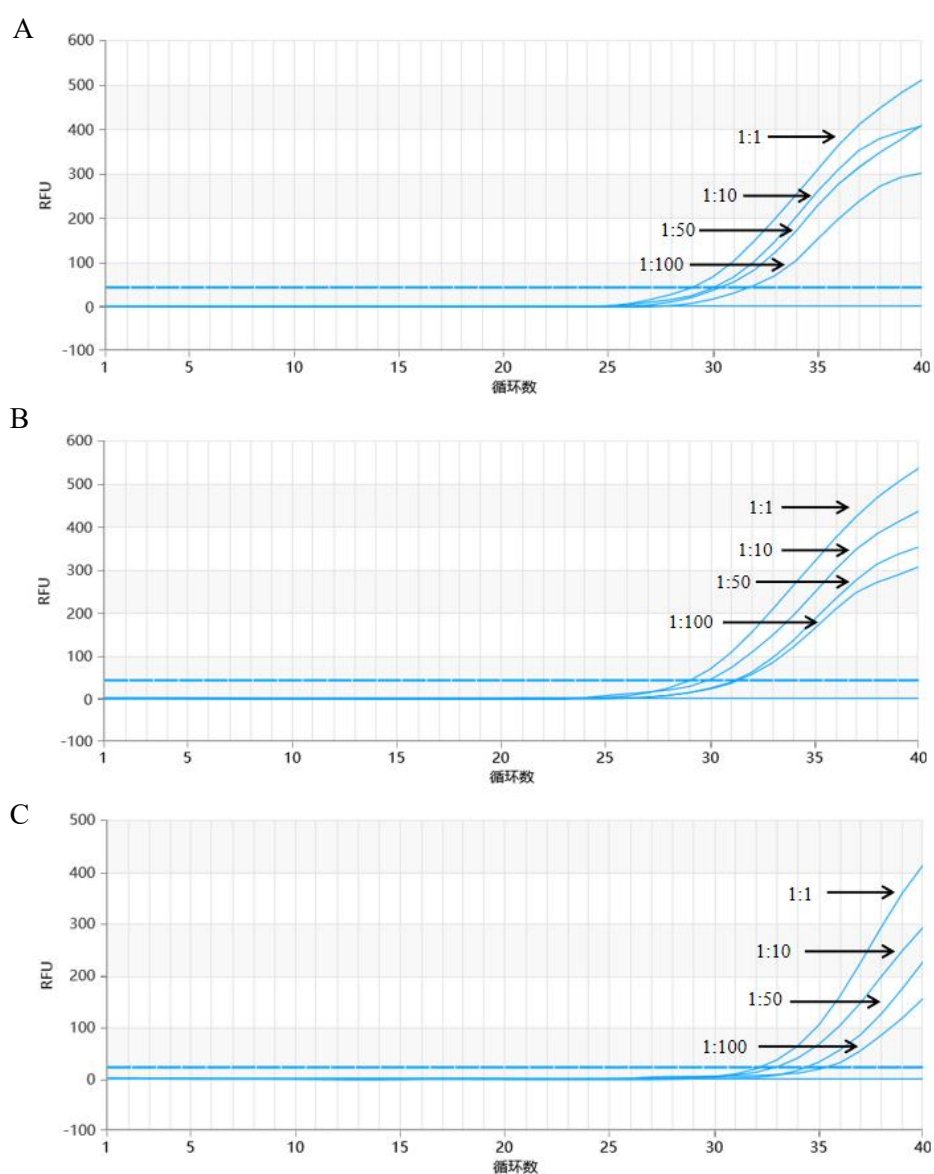


图 69 添加新霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

4.4.2.4 添加阿维菌素滤渣的真实样品的检测

将阿维菌素滤渣分别与鸡肉粉、鸭配合饲料及混合型饲料添加剂（含酵母）按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200 混合，制备不同比例的含阿维菌素滤渣的饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，从而对本方法在检测阿维菌素滤渣饲料时的灵敏度进行确定。结果如图 70 所示。将阿维菌素滤渣与棉粕进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的阿维菌素滤渣添加（图 70A）；将阿维菌素滤渣与牛精料补充料进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的阿维菌素滤渣添加（图 70B）；将阿维菌素滤渣与混合型饲料添加剂（含酵母）进行混合检测时能够最低检出 0.5%（1:200）含量的阿维菌素滤渣添加（图 70C）。因此表明本方法适用于多种类型的饲料中添加阿维菌素滤渣的检测，且最低能够检测出 0.5% 的阿维菌素滤渣添加的饲料。

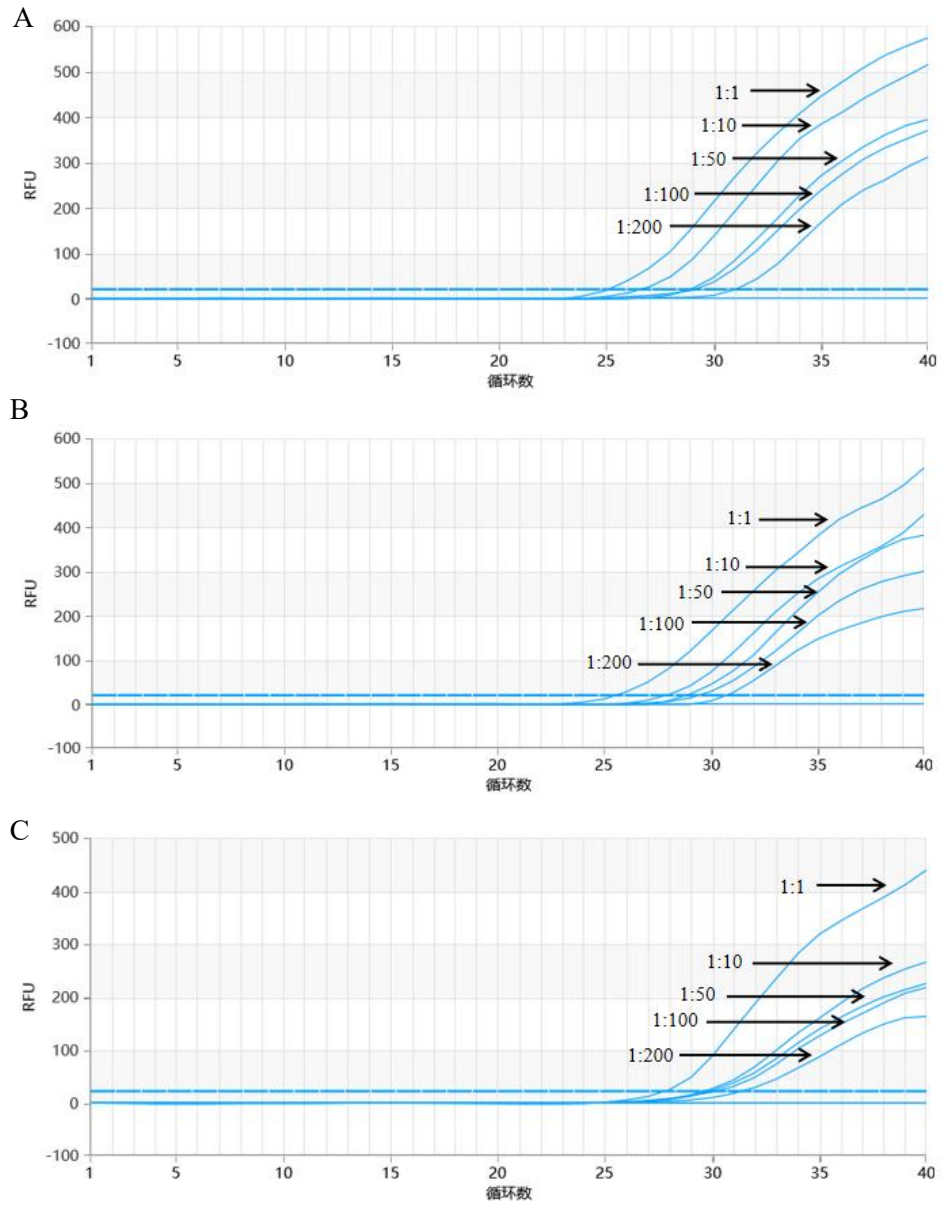


图 70 添加阿维菌素滤渣的模拟真实样品的检测结果

5. 液相色谱-高分辨质谱方法建立

5.1 原理

抗生素的生物合成是一个复杂的过程，涉及多个酶促反应和中间产物的生成。这些中间产物和终产物会残留在抗生素滤渣，且往往具有一定的特异性和稳定性。因此，通过选择性提取技术，可以将特定的中间产物和终产物从复杂的抗生素滤渣中分离出来，然后利用色谱分离技术和高分辨质谱分析技术采集相关数据，通过数据分析软件对质谱数据进行处理和分析，结合化学计量学算法构建模式识别模型。以抗生素生物合成的相关中间产物和终产物为目标化合物，在抗生素滤渣中开展靶向筛选标志物，通过评价标志物特异性、稳定性和含量水平，找出特征标记物。利用质谱识别模型和特征标记物用于鉴别饲料中抗生素滤渣。

5.2 抗生素滤渣的提取

由于所列抗生素滤渣种类繁多且差异较大，因此选择合适的提取溶剂尤为重要。现有的标准与文献中，一般采用甲醇、乙腈、二甲基亚砜，磷酸缓冲盐和 EDTA-McIlvaine 溶液（MC 溶液）等体系单独或混合体系常被用来作为提取饲料中各种抗生素。为此，本研究从 19 类抗生素中每类挑选一种典型药物考察在不同提取溶剂中的提取情况。分别考察了甲醇、乙腈、二甲基亚砜，磷酸缓冲盐和 MC 溶液等提取溶剂对饲料中 18 种化合物的提取情况：取 5 g 空白饲料样品，加入混合标准溶液至配置成抗生素含量 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品，分别用 20 mL 不同的溶剂提取，同时作基质标准曲线进行校正，利用加标回收率来体现提取效率，结果见图 71。

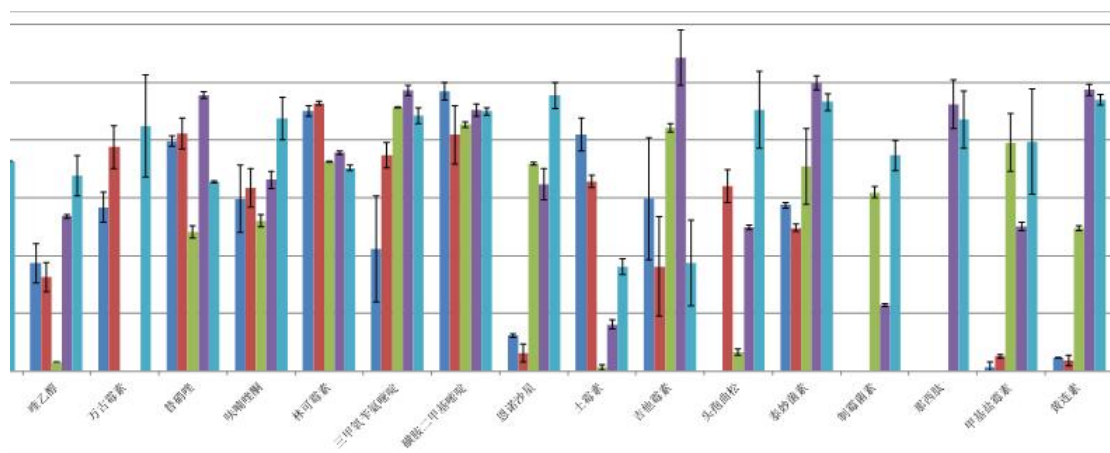


图 71 不同提取溶剂对抗生素提取效果比较

从图 71 可以看出，由于抗生素性质不同，不同溶液对不同类型的抗生素提取效果差异比较显著。MC 溶液对阿莫西林、万古霉素、替硝唑、磺胺二甲基嘧啶、土霉素提取效果较好外，对于水溶性差的喹乙醇、头孢曲松、泰妙菌素、灰黄霉素、制霉菌素、那西肽等化合物提取效果较差。磷酸缓冲溶液对阿莫西林、恩诺沙星和头孢曲松比 MC 溶液提取效果好，可能由于磷酸缓冲溶液 pH 为弱酸性环境。抗生素在弱酸比较稳定。乙腈对多数目标化合物均有较好的溶解性和较高的提取率，但是对土霉素、制霉菌素、头孢曲松、万古霉素提取效果不理想。二甲基亚砜是一种既溶于水又溶于有机溶剂的非质子极性溶剂。能有效提取大部分抗生素（吉他霉素、土霉素和替硝唑回收率低于 50%）。但是极性过强，提取过程中会带出较多的杂质，对一些不稳定的化合物具有较大影响。因此采用乙腈与其混合既可以避免共提出太多的脂溶性杂质，又能去除一些蛋白。另外糖肽类水溶解性较好，需要加入一定比例的水有助提高饲料的提取效果，同时由于四环素类结构含有四个环状结构，容易金属离子配合，加入 EDTA 后会螯合钙、镁等金属离子，提高四环素和部分喹诺酮类化合物提取效率，此外柠檬酸还能调节体系的 pH 值，抑制化合物酸性基团的解离，从而加强聚醚类、青霉素类和头孢菌素等提取效率和稳定性。由于 MC 溶液的配制过程中应用大量的钠盐会对质谱产生不良影响，我们改良了 MC 溶液的配方，去除了钠盐。最终，本方法以乙腈、甲醇二甲基亚砜和改良 MC 溶液的混合溶液作为提取溶剂。

5.3 色谱与质谱条件

色谱与质谱条件参考了《饲料中风险物质的目标物筛查与确认 液相色谱-高分辨质谱法》（中华人民共和国农业农村部公告第 676 号），在设定好的条件下，分别将 1ng/mL 各种抗生素滤渣提取溶液注进 HPLC-Q E 质谱仪进行正负离子扫描。具体条件如下：

色谱柱：Waters BEH C18 柱（100 mm× 3.0 mm, 1.7 μm）；柱温：40°C；进样量：5 μL；流动相流速为 0.4 mL/min，梯度淋洗，流动相组成和梯度见表 12。

表 12 流动相梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%
----------	-------------	----	----

0.00	0.3	90	10
1.50	0.3	90	10
4.00	0.3	70	30
9.00	0.3	5	95
10.00	0.3	5	95
10.01	0.3	90	10
12.00	0.3	90	10

QE 质谱采用电子喷雾离子源，正离子模式，喷雾电压为 3.5 kV，毛细管和碰撞气温度分别为 320 °C 和 300 °C，鞘气和辅助气压力分别设为 40、10 arb，喷雾气和碰撞气均为氮气。快速筛查扫描方式采用 Full-dd MS2 模式。扫描范围：100~1500；全扫描分辨率：120000；扫描 AGC target 设为 5.0e5；maximum IT 设为 100 ms；dd MS2 扫描分辨率为：60000；二级扫描 AGC target 设为 1.0e5；maximum IT 设为 50 ms；碰撞方式为 NCE 模式；碰撞能设 20,40,60 ev；Loop 次数设为 2。

5.4 抗生素滤渣质谱库的构建

使用质谱仪对处理后的样本进行质谱分析，获取了质谱数据。典型的抗生素滤渣全面全扫描质谱图见图 72-77，对采集到的质谱数据进行基线校正、噪声去除等预处理步骤，以提高数据的质量。并利用 Compound Discoverer 3.0 软件识别并分析质谱数据中的特征峰，用于后续的数据库建立。抗生素滤渣质谱 PCA 散点图见图 78，清晰地展示了不同抗生素滤渣间的差异性。不同抗生素滤渣在散点图上倾向于聚集在一起，形成明显的聚类；而不同类抗生素滤渣则分布在相对独立的位置，呈现出明显的分离趋势。这表明利用质谱数据建立识别模型可以进行抗生素滤渣分类和鉴别。

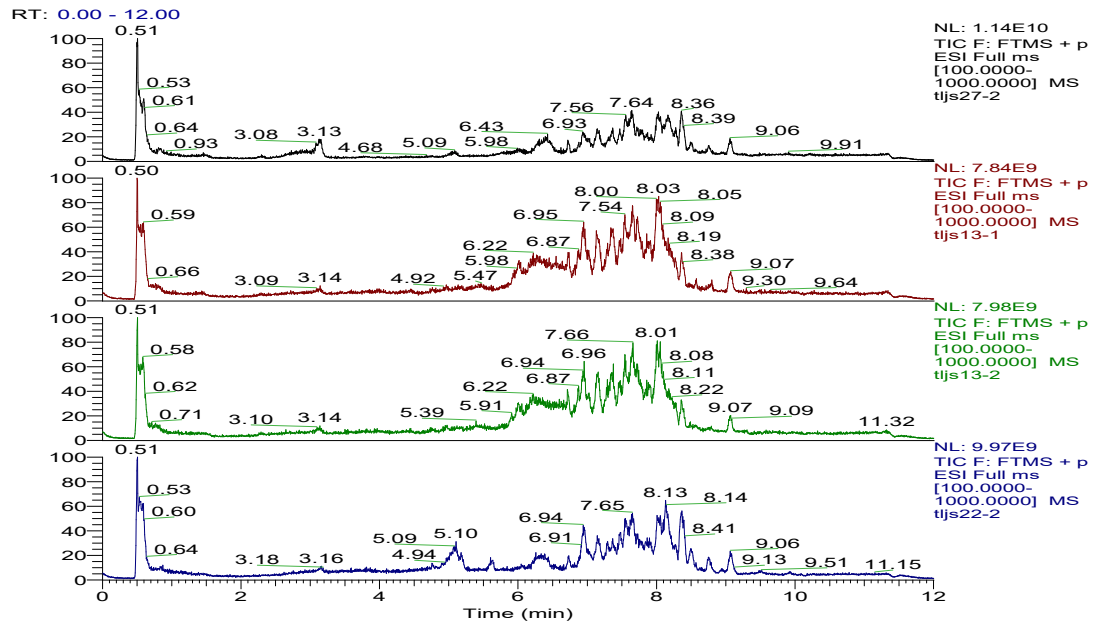


图 72 泰乐菌素滤渣全面全扫描质谱图

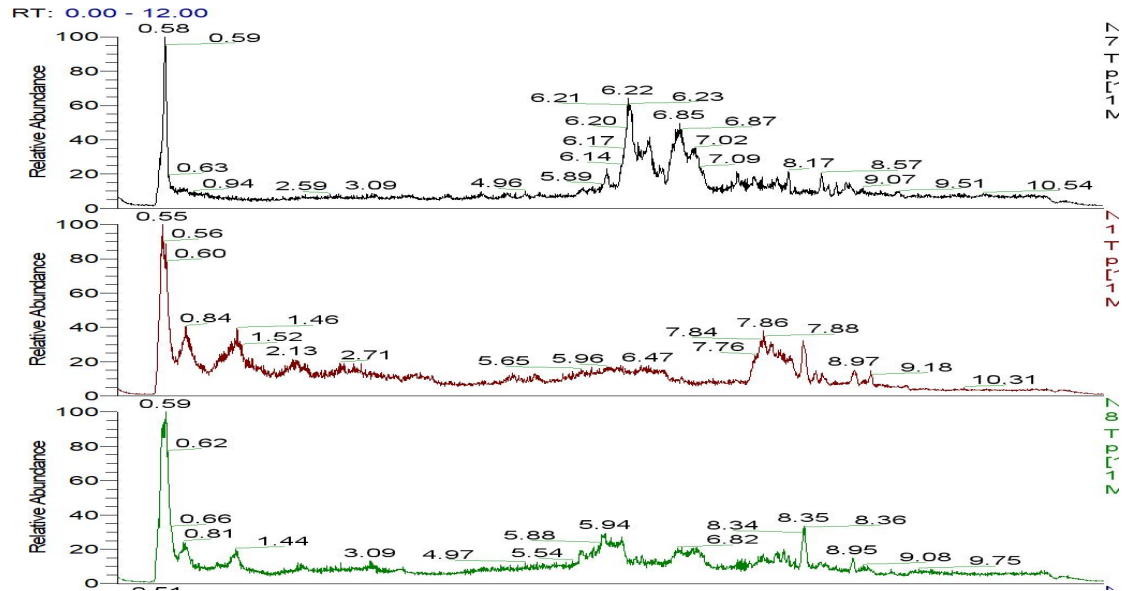


图 73 泰万菌素滤渣全面全扫描质谱图

RI: 0.00 - 12.00

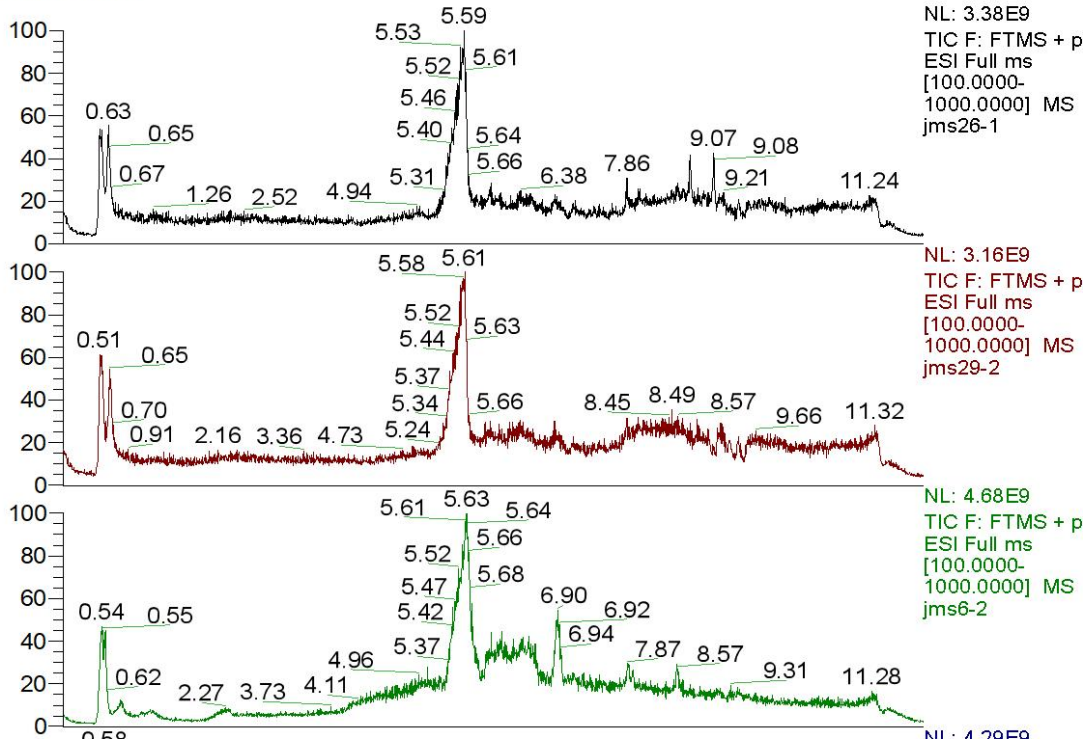


图 74 金霉素滤渣全面全扫描质谱图、

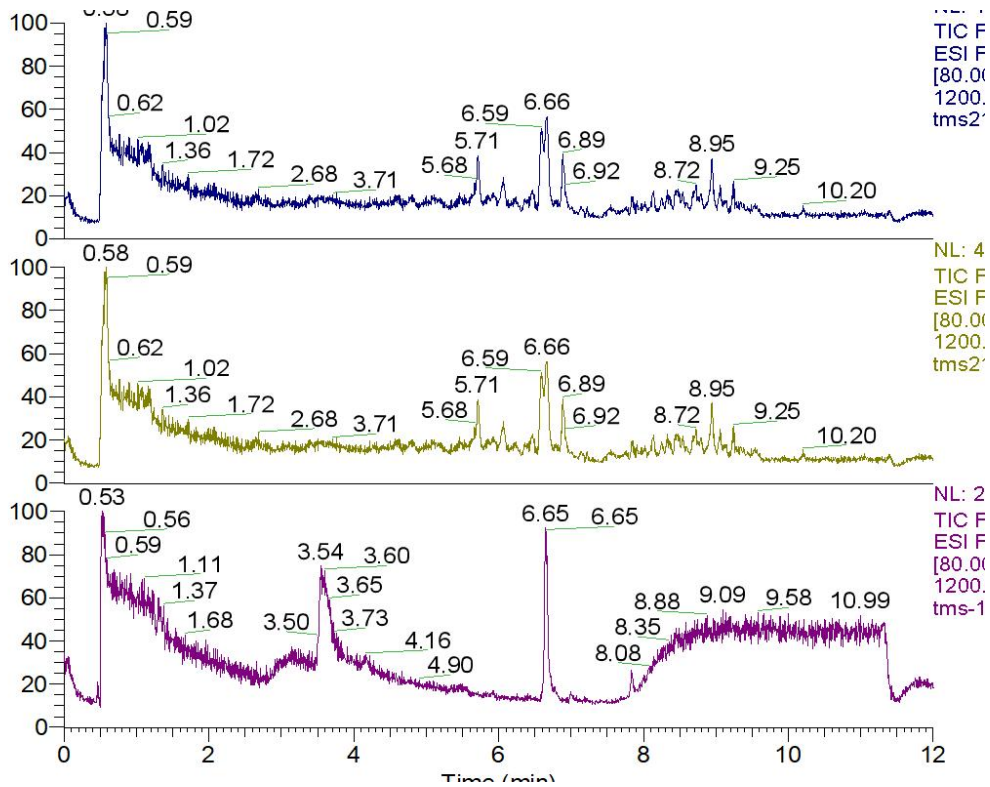


图 75 土霉素滤渣全面全扫描质谱图

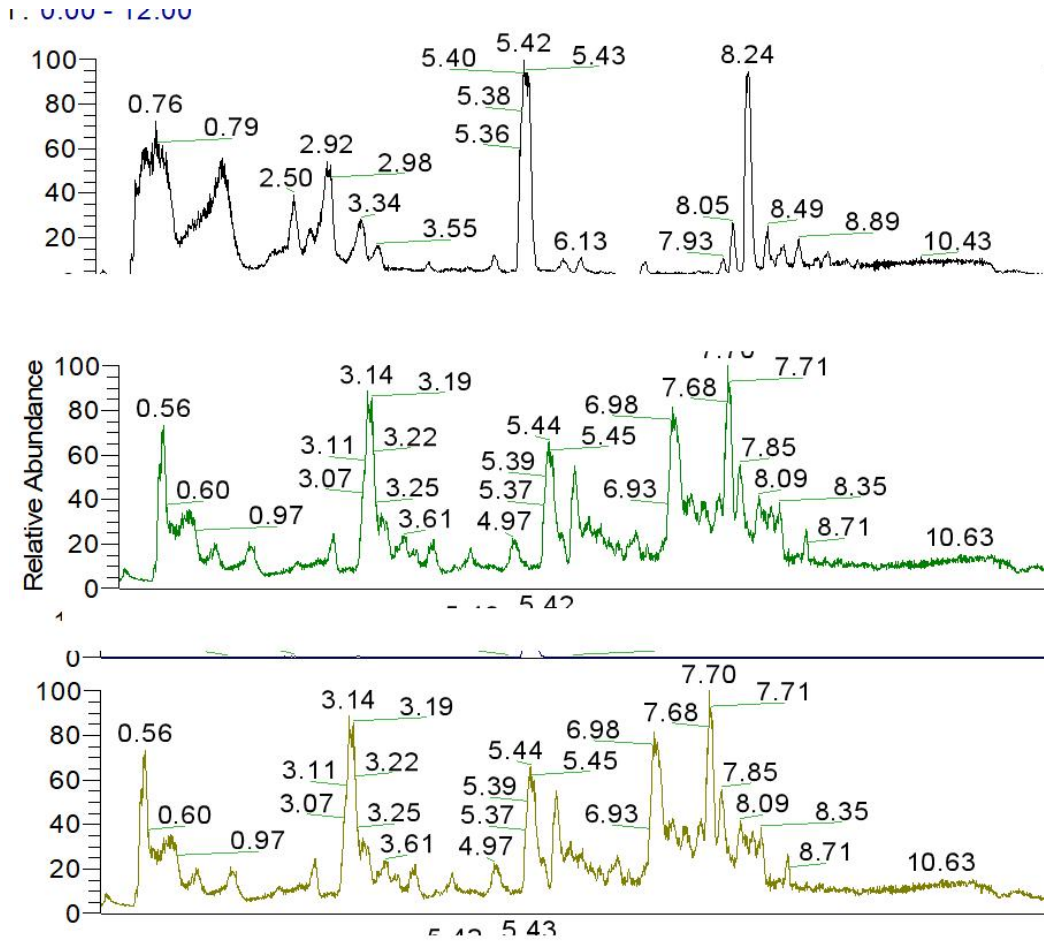


图 76 青霉素滤渣全面全扫描质谱图

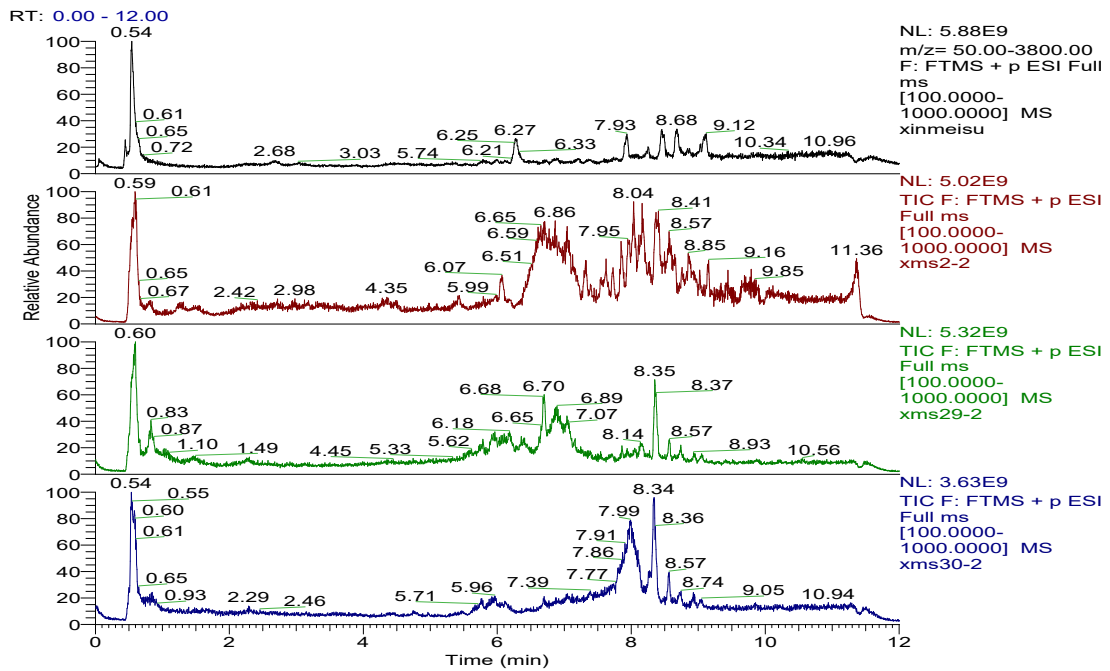


图 77 新霉素滤渣全面全扫描质谱图

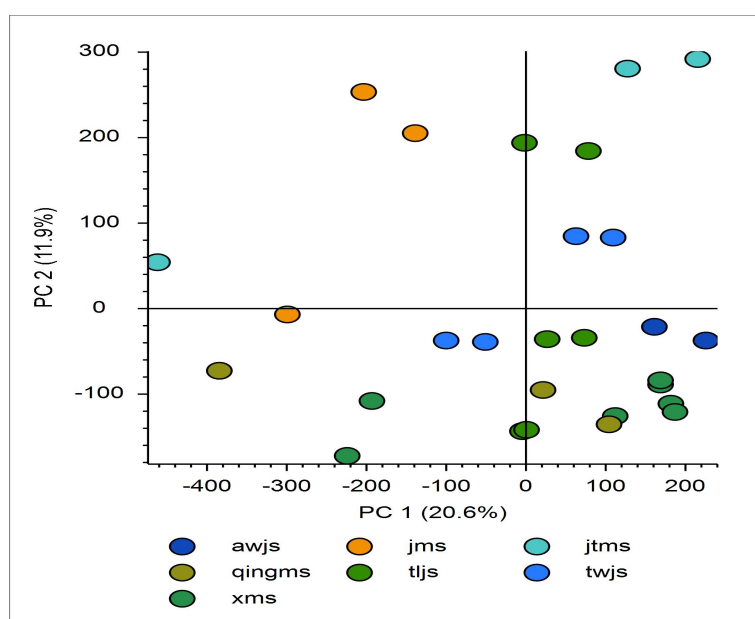


图 78 金霉素滤渣、土霉素滤渣、泰乐菌素滤渣、泰万菌素滤渣、新霉素滤渣、青霉素滤渣和其他滤渣质谱图 PCA 图

同时，本研究对多种抗生素滤渣及饲料样本进行了质谱数据对比分析。图 79-图 84 展示了各类抗生素滤渣与饲料在质谱特征上的差异，结果表明二者之间存在显著区分。上述分析证实，高分辨质谱技术对不同抗生素滤渣具有较强的辨识能力。若进一步结合能够充分利用全谱信息的多元统计分析技术，则可更准确、可靠地实现饲料中抗生素滤渣的鉴别。

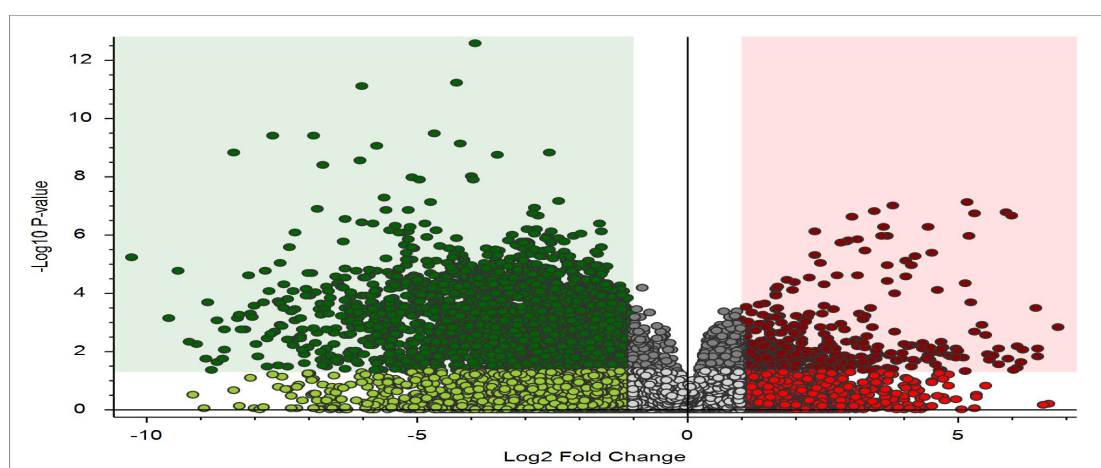


图 79 金霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

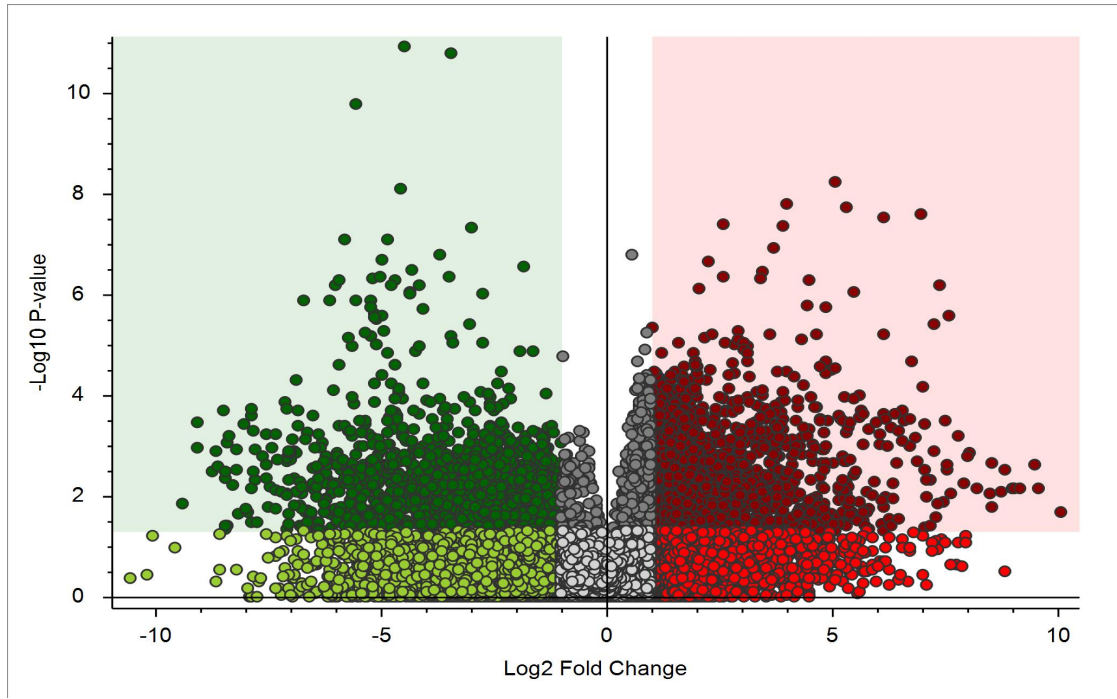


图 80 土霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

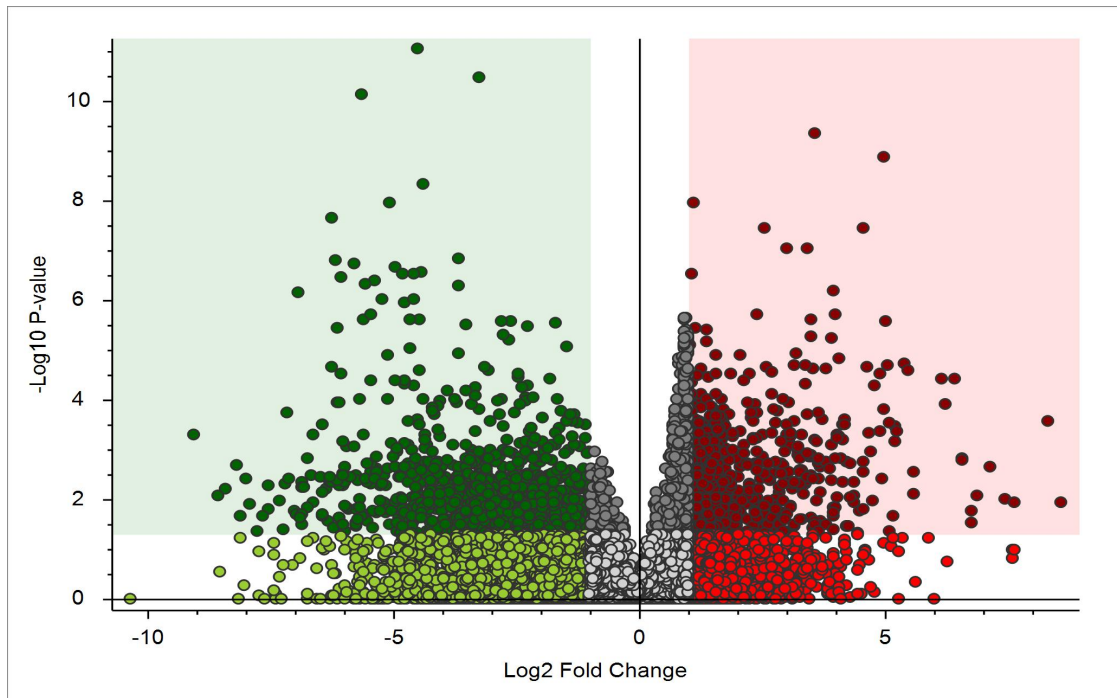


图 81 青霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

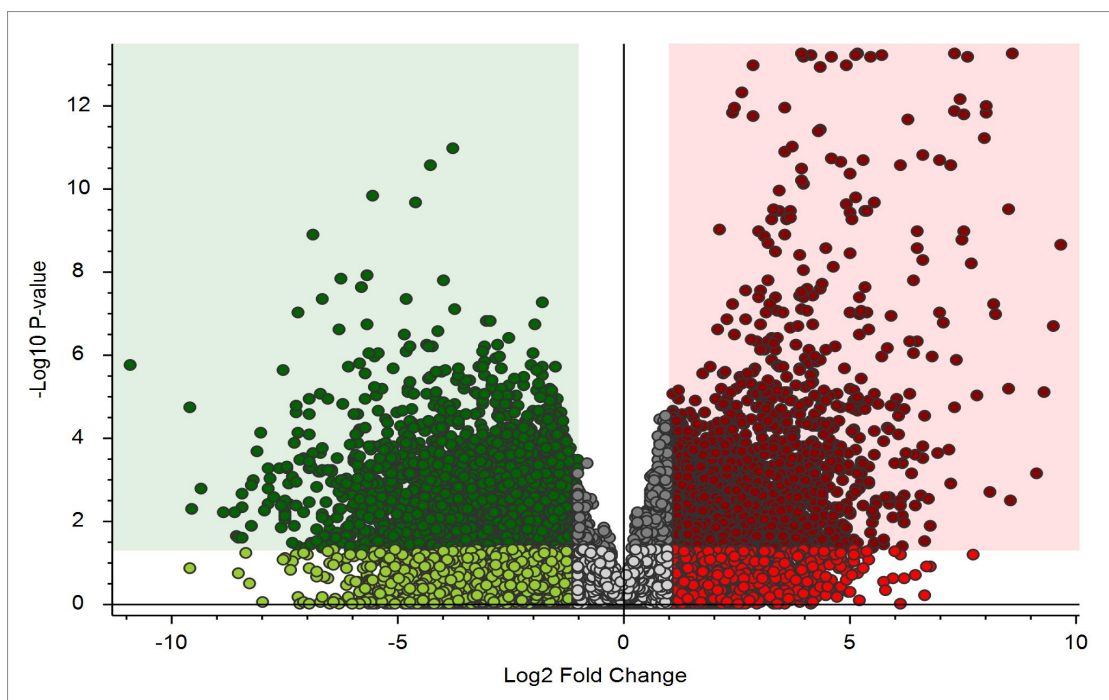


图 82 泰乐霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

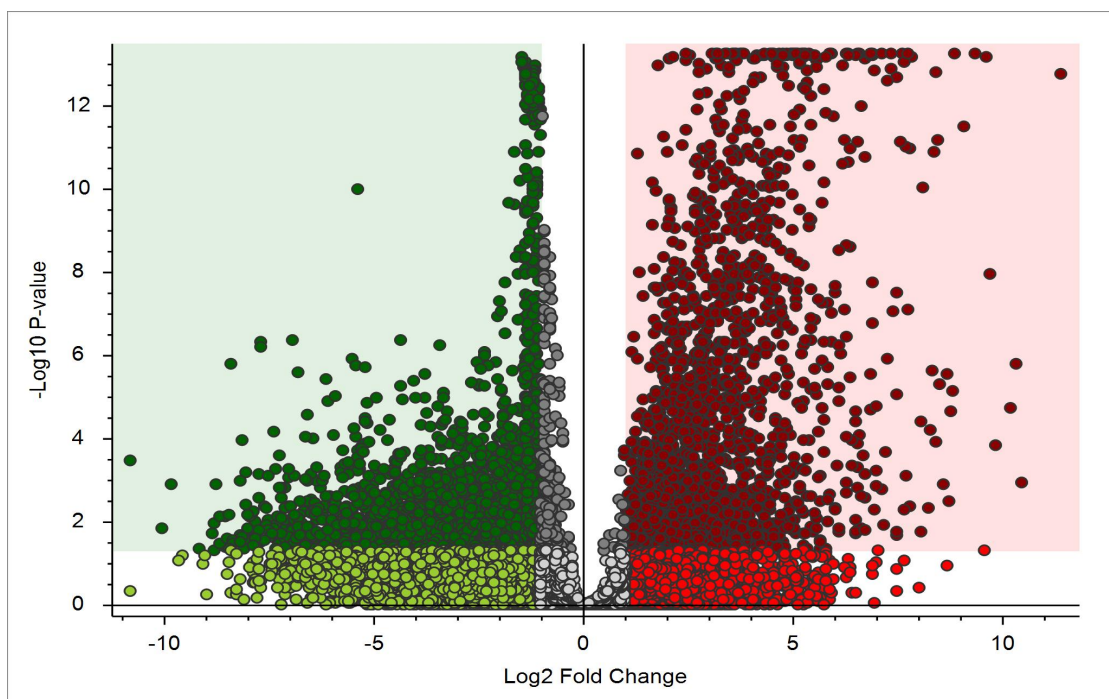


图 83 泰万霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

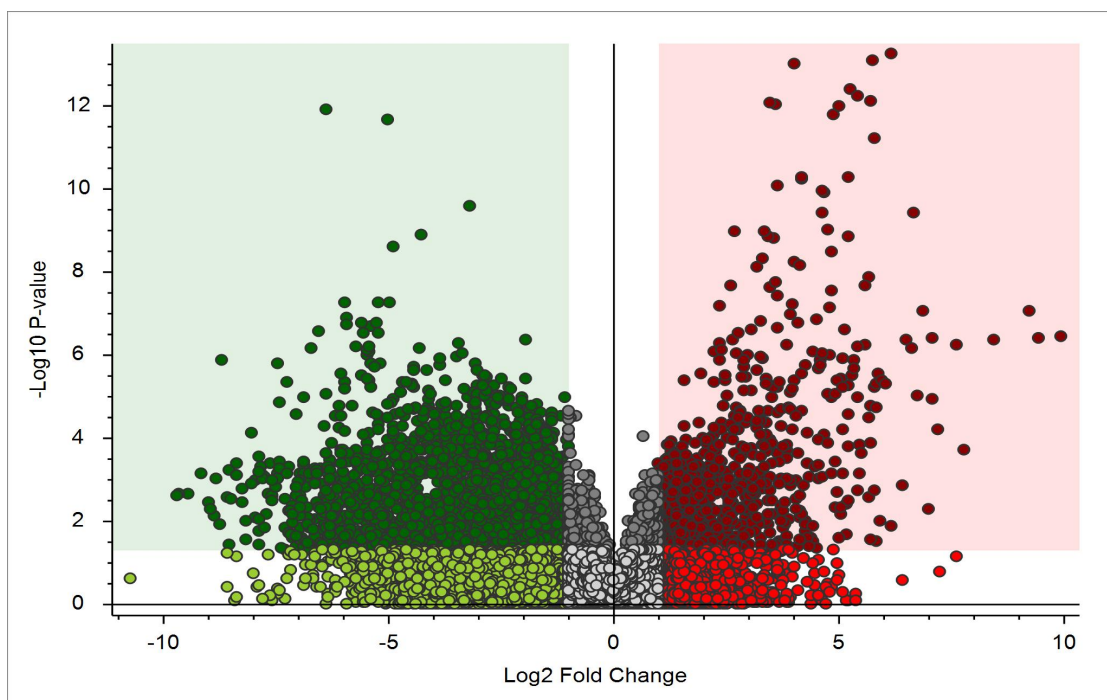


图 84 新霉素滤渣与饲料质谱差异比对图

5.5 抗生素滤渣的合成中间产物和终产物的初选和特征标志物的筛选

5.5.1 四环素类抗生素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

四环素类抗生素由龟裂链霉菌发酵产生，其生物合成途径涉及多个中间产物，由放线菌（如 *Streptomyces rimosus*）通过聚酮合酶（PKS）途径合成。其生物合成过程可分为聚酮链形成→环化→修饰→氨基化四个阶段，由图 85 可知。金霉素与土霉素同属四环素类抗生素，共享聚酮链组装与环化步骤，但通过氯化（C7）或羟基化（C5）修饰可以区分终产物的结构与活性。通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，从最初的 D-Glucose 到最终合成四环素类抗生素，主要中间产物和终产物共涉及 25 个目标物。通过 KEGG Pathway 数据库对这 32 个化合物可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径（>5 种），由于本研究的目的是识别滤渣中特有的因子，并希望将其作为环素类抗生素滤渣的特征标志物，因此这 11 个化合物被确定为高关注度目标物。通过分析 11 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法尽可能将目标化合物从四环素类抗生素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离子扫描模式）以及精确分子量扫描范围（50 Da -1200Da）。

TETRACYCLINE BIOSYNTHESIS

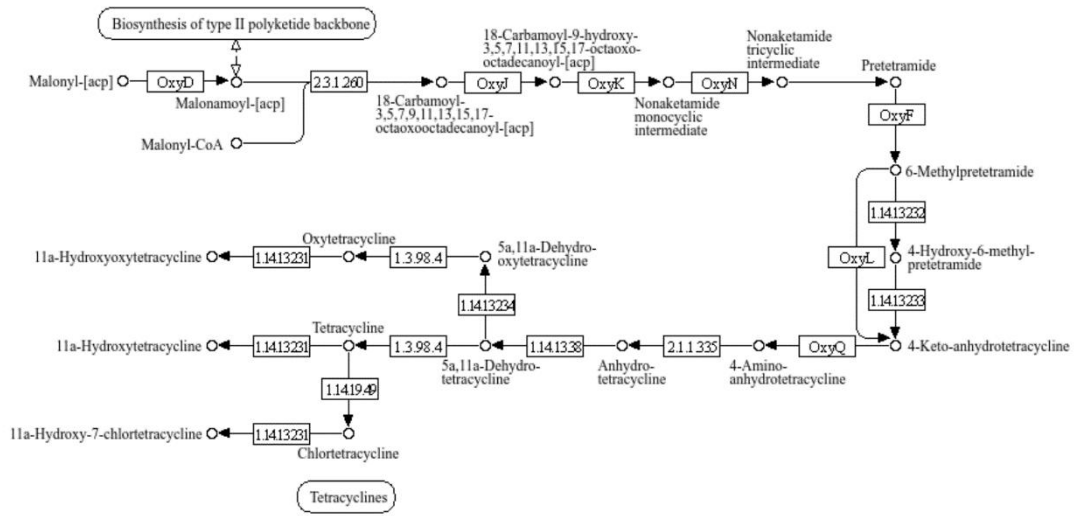
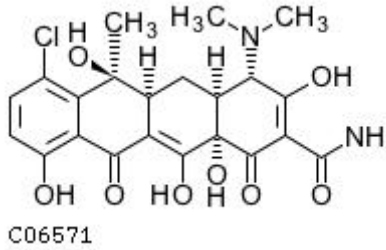
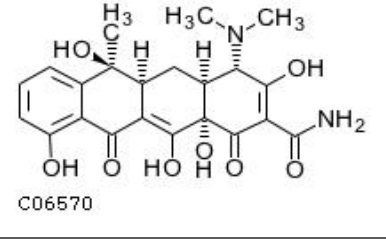
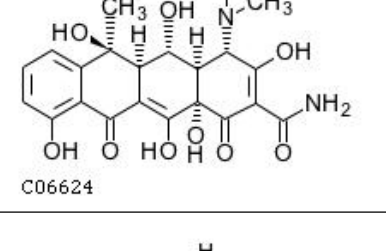
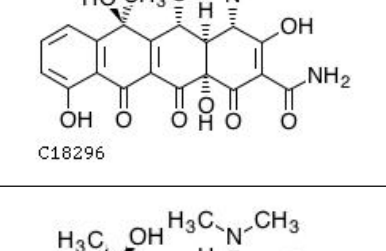
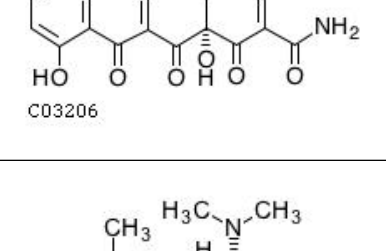
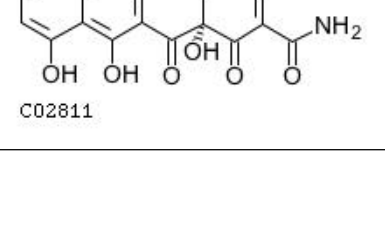
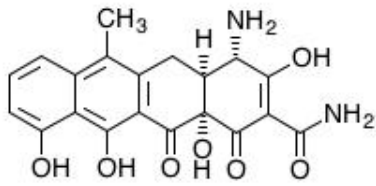
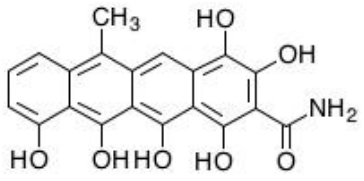
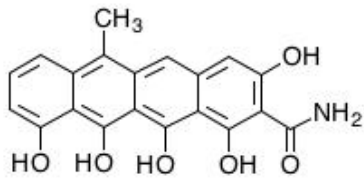
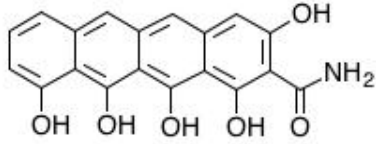
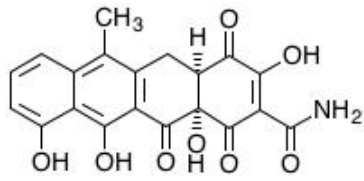


图 85 四环素类抗生素生物合成路径图

表 13 四环素类抗生素合成中间产物

序号	名称	分子量	分子式	结构式
1	Chlortetracycline	478.1143	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	 <p>C06571</p>
2	Tetracycline	444.1533	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	 <p>C06570</p>
3	Oxytetracycline	460.1482	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	 <p>C06624</p>
4	5a,11a-Dehydro-oxytetracycline	458.1325	$C_{22}H_{22}N_2O_9$	 <p>C18296</p>
5	5a,11a-Dehydrotetracycline	442.1376	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	 <p>C03206</p>
6	Anhydrotetracycline	426.1427	$C_{22}H_{22}N_2O_7$	 <p>C02811</p>

序号	名称	分子量	分子式	结构式
7	4-Amino-anhydrotetracycline	398.1114	$C_{20}H_{18}N_2O_7$	 <p>C06654</p>
8	4-Hydroxy-6-methylpretetramide	381.0849	$C_{20}H_{15}NO_7$	 <p>C06628</p>
9	6-Methylpretetramide	365.0899	$C_{20}H_{15}NO_6$	 <p>C06629</p>
10	Pretetramide	351.0743	$C_{19}H_{13}NO_6$	 <p>C18295</p>
11	4-Keto-nhydrotetracycline	397.0798	$C_{20}H_{15}NO_8$	 <p>C06627</p>

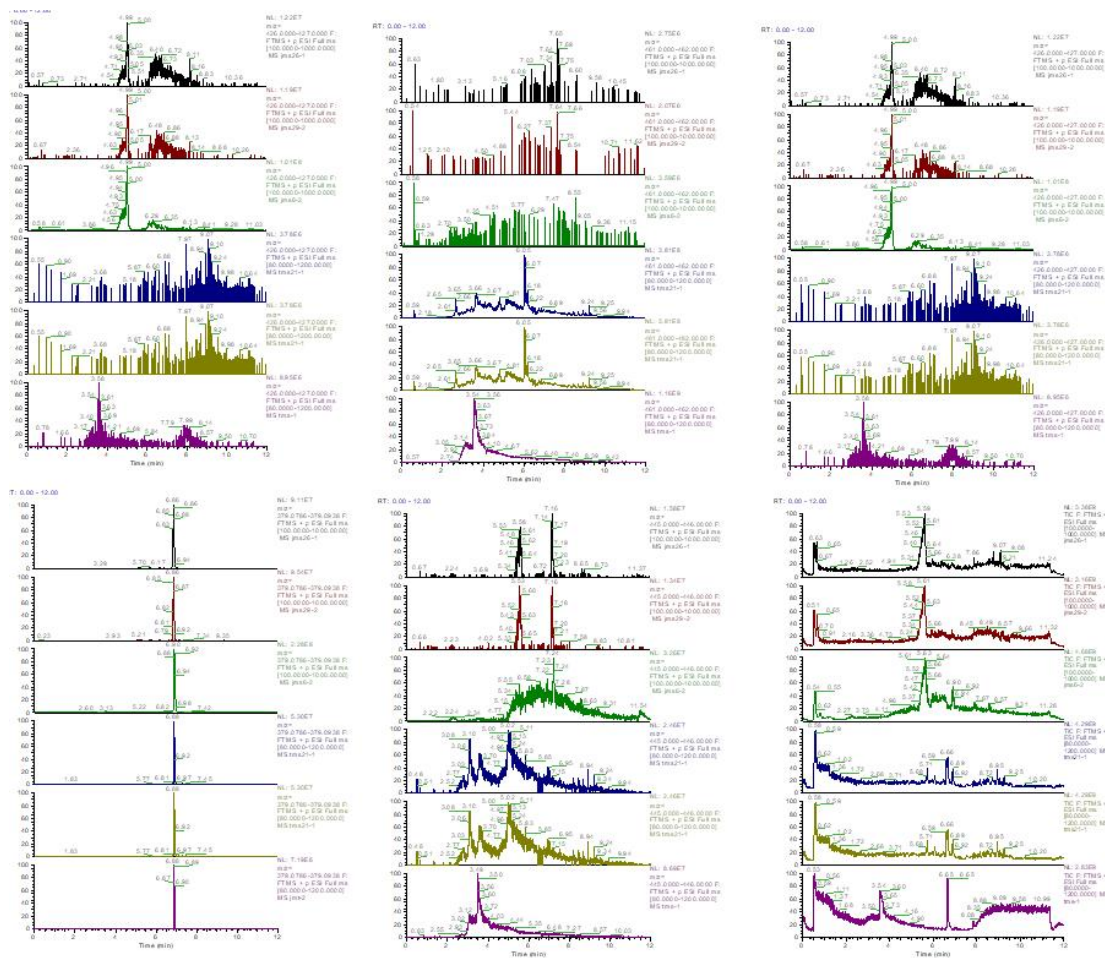


图 86 四环素类抗生素滤渣特征标志物母离子色谱图

从上述次级代谢产物与完全提取的四环素类抗生素滤渣进行对比中，经过大量的筛选、组合，在液相色谱-高分辨质谱图中，通过特征碎片提取。通过碎片离子分析，根据结果确定了土霉素和金霉素的特征标志物。如表 14 所示。

表 14 土霉素和金霉素的特征标志物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
金霉素药渣	金霉素	478.12	479.1215	292.1054,307.1287,335.1237,367.1499
	去甲基金霉素	464.1063	465.1065	428.0749、410.0643、358.0921
	四环素四并苯骨架	357.10	358.1029	323.0659,308.0428,341.0708
	脱水四环素	442.14	443.1448	154.0500,201.0549,426.1186,226.0712
土霉素药渣	土霉素	460.15	461.1554	154.0500,201.0549,337.0708,426.1186
	四环素	444.16	445.1605	154.0500,201.0549,392.1129,410.1235

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
	4-氨基脱水四环素	442.14	443.1448	201.0549, 426.1186, 358.0921
	脱水四环素	426.14	427.1453	358.0921, 409.1350, 392.1085

5.5.2 青霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

青霉素的生物合成途径还涉及到复杂的化学反应和酶促反应。青霉素的生物合成起始于非核糖体多肽合成酶（NRPS）的活化。NRPS 首先被泛酰巯基乙胺化，成为有催化活性的全酶。NRPS 包含多个结构域，其中 A 结构域负责特异性地选择特定的氨基酸参与肽链合成。这些氨基酸包括 L-半胱氨酸、L-缬氨酸和非蛋白氨基酸 L- α -氨基己二酸。这些氨基酸在酶的催化下，通过非核糖体多肽合成途径形成 ACV 三肽（氨基己二酰基-半胱氨酰基-缬氨酸）。ACV 三肽随后在异青霉素 N 合成酶的催化下环化合成出异青霉素 N（IPN），再经酰基转移酶的作用，通过侧链转换得到青霉素 G。通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 7 个化合物参与多种代谢途径（>5 种，表 15）因此这 11 个化合物被确定为高关注度目标物。通过分析 11 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法尽可能将目标化合物从四环素类抗生素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离子扫描模式）以及精确分子量扫描范围（50-1200Da）。

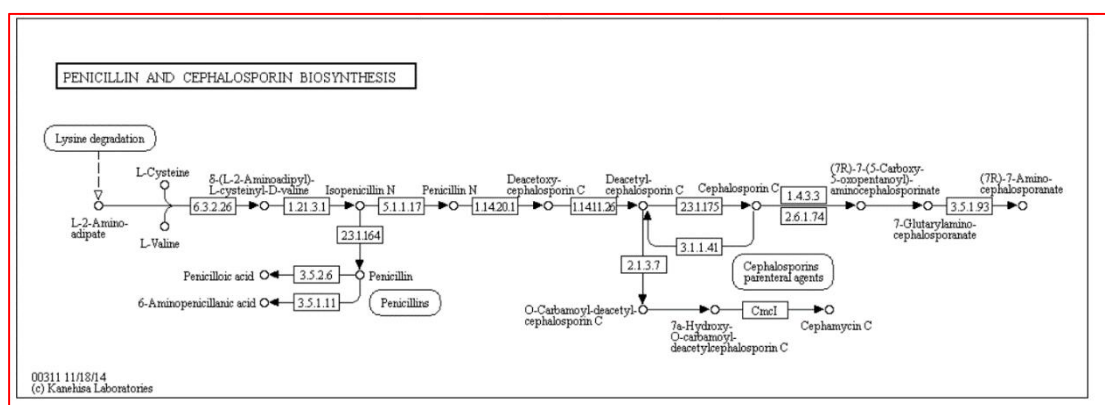
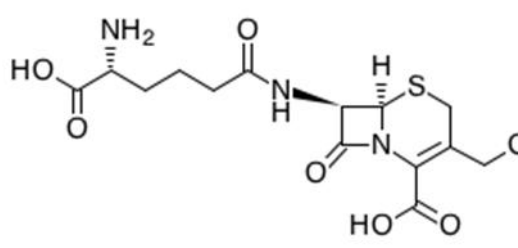
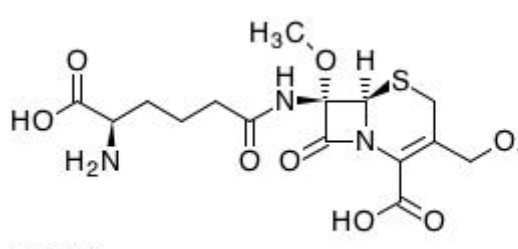
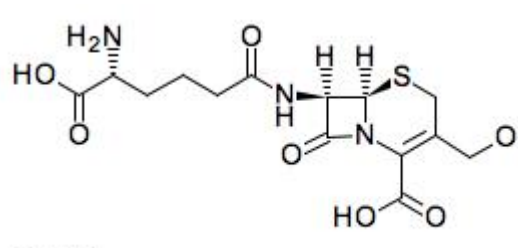
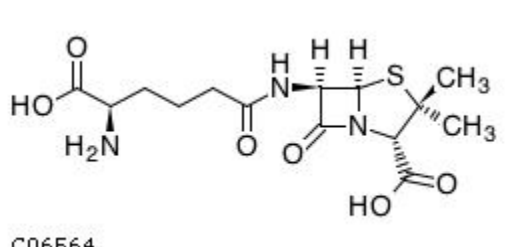
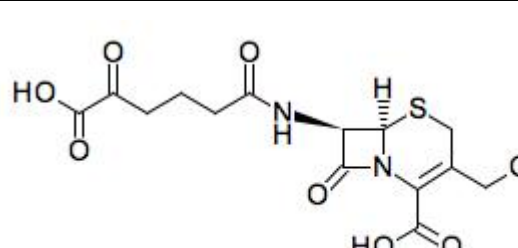
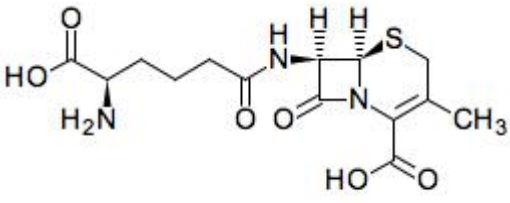
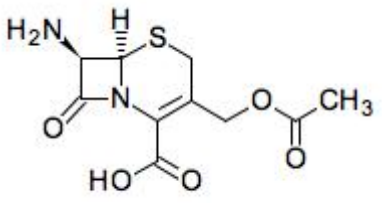


图 87 青霉素生物合成途径图

表 15 青霉素合成中间产物

序号	名称	分子式	结构式
1	Cephalosporin C	$C_{16}H_{21}N_3O_8S$	 <p>C00916</p>
2	Cephamycin C	$C_{16}H_{22}N_4O_9S$	 <p>C06566</p>
3	O-Carbamoyl-deacetylcephalosporin C	$C_{15}H_{20}N_4O_8S$	 <p>C06568</p>
4	Penicillin N (Adicillin)	$C_{14}H_{21}N_3O_6S$	 <p>C06564</p>
5	(7R)-7-(5-Carboxy-5-oxopentanoyl)aminocephalosporinate	$C_{16}H_{18}N_2O_9S$	 <p>C04712</p>

序号	名称	分子式	结构式
6	Deacetoxycephalosporin C	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	 C06565
7	7-Aminocephalosporanic acid	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	 C07756

从上述次级代谢产物与完全提取的青霉素滤渣进行对比中,经过大量的筛选、组合,在液相色谱-高分辨质谱图中,通过特征碎片提取。通过碎片离子分析,根据结果确定了青霉素的特征标志物,如表 15 所示。

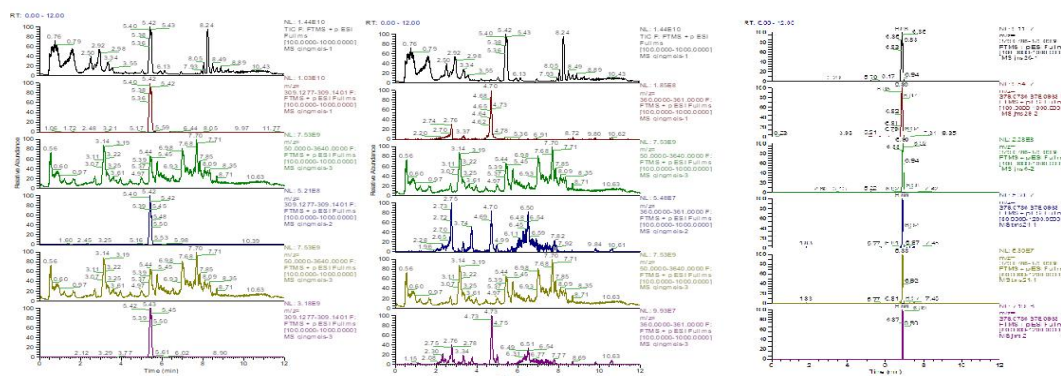


图 88 青霉素抗生素滤渣特征标志物母离子色谱图

表 16 青霉素类特征标记物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
青霉素药渣	盘尼西林 N	359.39	360.2224	201.1257,243.1442
	Cephameycin C	308.05	309.1367	174.0603,128.0544,263.1314
	ACV 三肽	361.41	362.2019	144.0672,219.1445,245.12236

5.5.3 泰乐霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

泰乐菌素，是美国于 1959 年从弗氏链霉菌（*Streptomyces fradiae*）的培养液中获得的一种大环内酯类抗生素。泰乐菌素的生物合成途径主要是在大环内酯的基础上，接上了三个糖基：泰内酯在碳霉胺糖基转移酶的作用下生成碳霉胺糖-泰内酯，碳霉胺糖-泰内酯在阿洛糖基转移酶的作用下生成碳霉胺糖-阿洛糖-泰内酯，碳霉胺糖-阿洛糖-泰内酯最终在碳霉糖基转移酶的作用下生成泰乐菌素 A，即泰乐菌素。泰乐菌素属于大环内酯类抗生素，由弗氏链霉菌产生。大环内酯类的合成通常涉及聚酮合酶（PKS）。泰万菌素是泰乐菌素的衍生物，泰乐菌素经酰化反应制的，以增强其抗菌活性或药代动力学特性。具体途径如下：

聚酮前体 → PKS 催化延伸 → 16 元大环内酯 → 羟基化 → 糖基化
 (Mycaminose/Mycarose/Mycinose) → 甲基化 → 泰乐菌素 A → 化学酰化 (C3 乙酰基 + C4 异戊酰基) → 纯化 → 泰万菌素

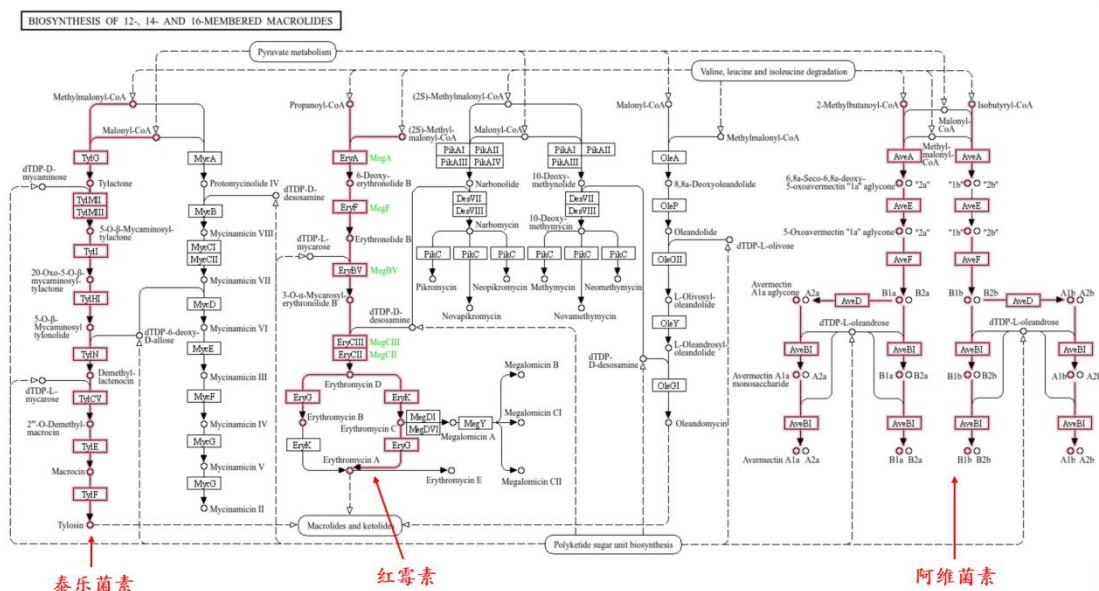
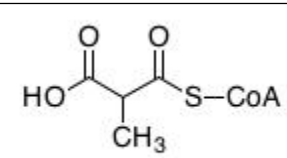
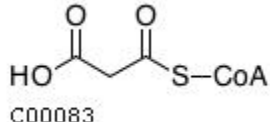
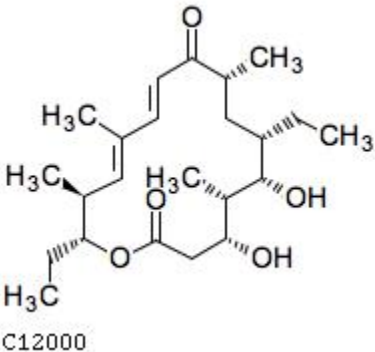
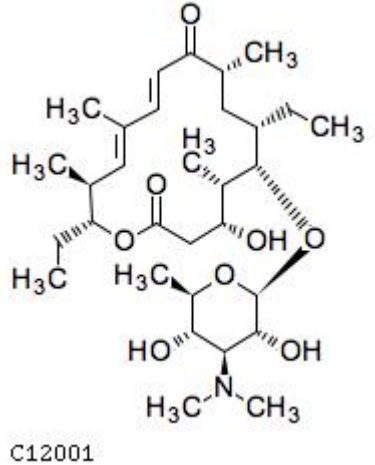
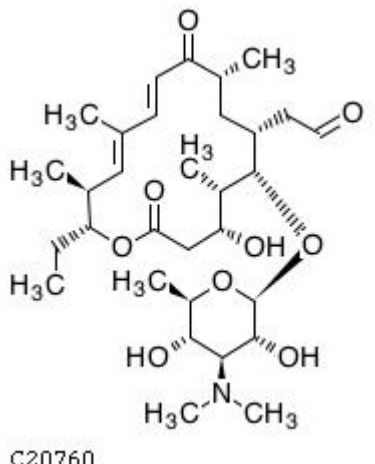
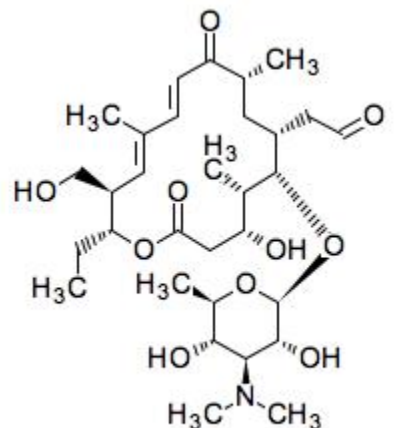
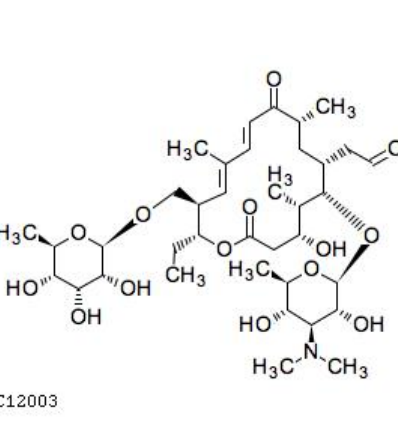
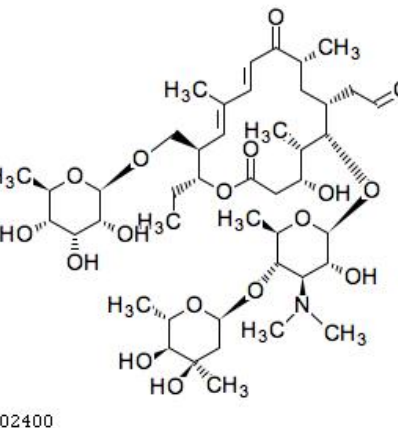


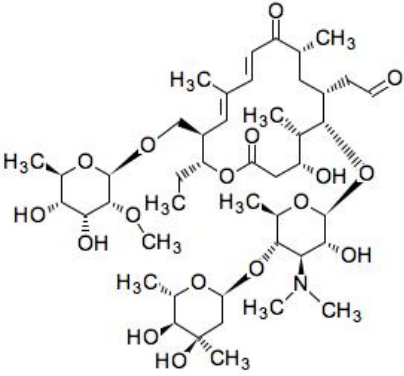
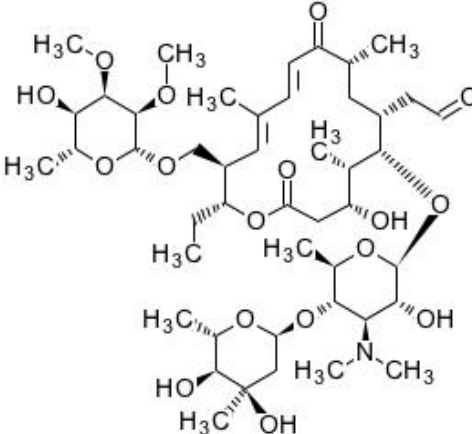
图 89 泰乐菌素合成路径图、

表 17 泰乐菌素的中间产物

序号	名称	分子量	分子式	结构式
1	Methylmalonyl-CoA	867.6069	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	 <p>C02557</p>

2	Malonyl-CoA	853.5803	$C_{24}H_{38}N_7O_{19}P_3S$	 <p>HO-C(=O)-CH₂-C(=O)-S-CoA C00083</p>
3	Tylactone	394.5448	$C_{23}H_{38}O_5$	 <p>C12000</p>
4	5-O-beta-D-Mycaminosyltylactone	567.7544	$C_{31}H_{53}NO_8$	 <p>C12001</p>
5	20-Oxo-5-O-beta-mycaminosyltylactone; 23-Deoxy-5-O-beta-mycaminosyltylonol	581.7379	$C_{31}H_{51}NO_9$	 <p>C20760</p>

6	5-O-beta-D-Mycaminosyltylonolide	597.7373	$C_{31}H_{51}NO_{10}$	 <p>C12002</p>
7	Demethylactenocin	743.8785	$C_{37}H_{61}NO_{14}$	 <p>C12003</p>
8	Demethylmacrocin	888.0469	$C_{44}H_{73}NO_{17}$	 <p>C02400</p>

9	Macrocin	902.0735	$C_{45}H_{75}NO_{17}$	 <p>C00744</p>
10	Tylosin	916.1001	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	 <p>C01457</p>

由图 89 可知，从最初的 D-Glucose 到最终合成泰乐菌素，主要中间产物和终产物共涉及 32 个目标物。通过 KEGG Pathway 数据库对这 32 个化合物可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径（>5 种），由于本研究的目的是识别滤渣中特有的危害因子，并希望将其作为泰乐菌素滤渣的特征标志物，因此这 10 个化合物被确定为低关注度目标物。通过分析 19 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，确定了不同提取方法（高水相、高有机相和低 pH），目的是尽可能将目标化合物从泰乐菌素滤渣中提取出来。此外，根据目标化合物特征官能基团选择了不同色谱分离模式（反相色谱为主）、高分辨质谱电离模式（正离子扫描模式）以及精确分子量扫描范围（50 Da -1200 Da）。

采用提取溶剂提取泰乐菌素滤渣，并应用高分辨质谱进行测定，在测得的数据中提取 10 种目标化合物分子量。筛查结果表明，泰乐菌素滤渣中含泰乐菌素色谱峰如图 90 所示；在 5.620min 处提取出脱甲基大菌素色谱峰；通过碎片离子分析，检测出泰乐菌素特征碎片离子 916.5264m/z 和 772.4478m/z，并且检出脱甲基大菌素特征碎片离子

888.4951m/z 和 596.3429m/z 如。其他目标化合物未检出。这两种目标化合物在 3 种提取溶剂中均有发现，其在亲水色谱柱上能够有效保留和分离，在正离子模式（ESI+）下被电离。为此选择泰乐菌素、做为泰乐菌素滤渣的特征标记物。

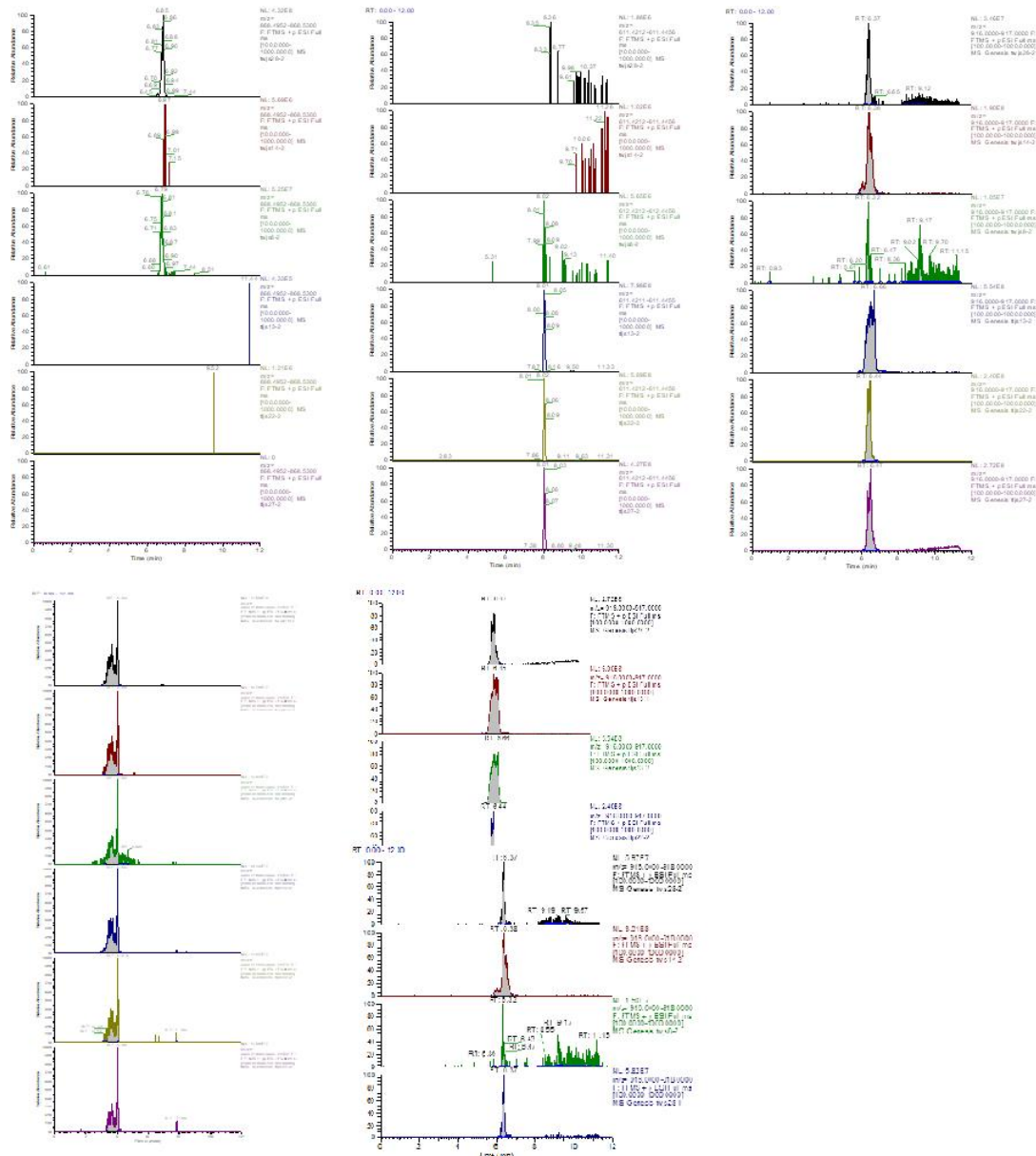


图 90 泰乐菌素和泰万菌素抗生素滤渣的特征标记物母离子色谱图

表 18 泰乐菌素和泰万菌素抗生素滤渣的特征标记物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
泰乐菌素药渣	泰乐菌素	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,814.1421
	泰乐酮	394.54	395.2836	189.1652,207.1842
	3-乙酰泰乐菌素		611.4335	317.2169,295.2354
泰万菌素药渣	泰乐菌素	915.52	916.5264	174.1125,158.1176,116.1071,576.3740
	泰万菌素	1041.61	1042.5863	174.1125,814.4536,229.1421
	Methylmalonyl-CoA	867.60	868.5124	174.1139,109.0659,640.3743
	泰乐酮	394.54	295.28	189.1652,207.1842

5.5.4 新霉素滤渣的生物合成途径及重要中间产物筛选范围的确定

新霉素属于氨基糖苷类抗生素，由弗氏链霉菌（*Streptomyces fradiae*）等放线菌通过次级代谢途径合成。其结构由两个氨基环醇（2-deoxystreptamine, 2-DOS）与多个氨基糖（如新霉胺、新霉二糖胺）通过糖苷键连接而成。新霉素主要包括新霉素 B 和新霉素 C 两种组分，差异在于糖基取代的位置。新霉素的合成可分为以下关键步骤：1. 2-Deoxystreptamine (2-DOS) 的合成, D-葡萄糖通过磷酸化生成 D-葡萄糖-6-磷酸, D-葡萄糖-6-磷酸经脱氢酶（如 NeoB）转化为 2-deoxy-scylo-inosose (DOI)。DOI 在氨基转移酶（如 NeoC）催化下引入氨基，生成 2-deoxystreptamine (2-DOS)，这是新霉素的核心氨基环醇骨架。2-DOS 与第一个氨基糖（如新霉胺）通过糖基转移酶（如 NeoD）连接，形成 paromamine。Paromamine 进一步与第二个氨基糖（如核糖胺）连接，生成 neamine（新霉胺二糖苷）。Neamine 与第三个氨基糖（L-新霉二糖胺）通过糖基转移酶（如 NeoH）连接，形成新霉素 B。在部分菌株中，糖基取代位置不同（如 C5 羟基取代），形成新霉素 C。

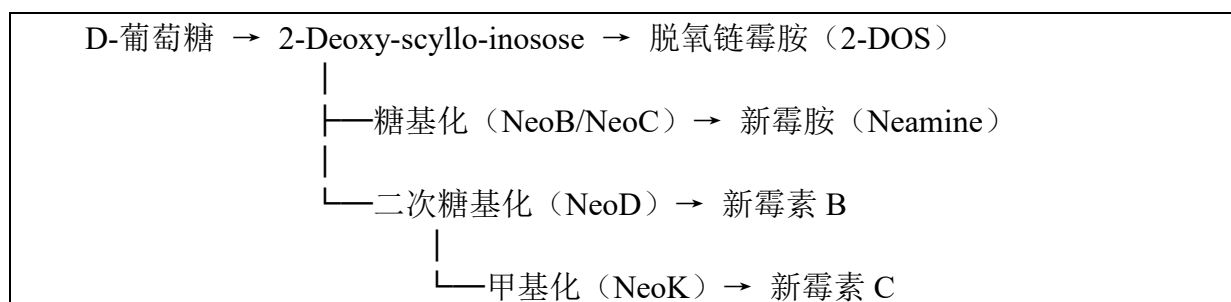


图 91 新霉素的合成路径图

通过 KEGG Pathway 数据库对可能参与的代谢途径进行查询，发现其中有 10 个化合物参与多种代谢途径 (>5 种)，由于本研究的目的是识别新霉素滤渣中特有的因子，并希望将其作为新霉素滤渣的特征标志物，因此这 10 个化合物被确定为高关注度目标物。通过分析 10 个高关注度目标物的化学结构推断其理化特性，目的是尽可能将目标化合物从新霉素滤渣中提取出来。

表 19 新霉素滤渣的中间产物

序号	中间产物名称	分子式	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构特征
1	D-葡萄糖-6-磷酸	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	260.14	56-73-5	葡萄糖的磷酸化形式，C6 位磷酸基团，为 2-DOS 合成的起始前体。
2	2-Deoxy-scylo-inosose (DOI)	C ₆ H ₁₀ O ₅	162.14	未收录	环己酮衍生物，C2 位脱氧，通过葡萄糖脱氢和环化生成，为 2-DOS 的直接前体。
3	2-Deoxystreptamine (2-DOS)	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	162.18	2037-48-1	氨基环醇核心骨架，含 C1 和 C3 位氨基，C4、C5、C6 位羟基，为新霉素的中央结构。
4	Neosamine C	C ₅ H ₁₁ NO ₄	161.14	未收录	氨基糖单体，由葡萄糖经脱氧、氨基化生成，后续连接到 2-DOS 的 C4 位。
5	Paromamine	C ₁₂ H ₂₃ N ₃ O ₈	337.33	7542-51-2	2-DOS 与 Neosamine C 通过 β-1,4 糖苷键连接，C4 位糖基化初步产物。
6	Ribostamycin	C ₁₇ H ₃₄ N ₄ O ₁₀	466.47	25546-65-0	Paromamine 与核糖胺 (Ribosamine) 在 C5 位连接，含三个糖单元 (假设中间体)。
7	Neamine	C ₁₂ H ₂₆ N ₄ O ₆	322.36	3947-65-7	Paromamine 进一步添加核糖胺，形成二糖胺结构，C5 位糖基化。
8	Neomycin B 前体 (含 L-新霉二糖胺)	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	614.65	未收录	Neamine 与 L-新霉二糖胺 (L-neobiosamine) 在 C6 位连接，形成完整四糖链。
9	Neomycin C 前体 (异构体)	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	614.65	未收录	与 Neomycin B 差异在于糖基取代位置 (如 C5 羟基取代)，具体结构依赖菌株修饰。
10	磷酸化中间体 (如 Neomycin 磷酸酯)	C ₂₃ H ₄₇ N ₆ O ₁₆ P	694.62	未收录	生物合成中可能的磷酸化形式，用于糖基转移前的活化步骤。

采用提取溶剂提取新霉素滤渣，并应用高分辨质谱进行测定，在测得的数据中提取 10 种目标化合物分子量。筛查结果表明，新霉素滤渣中含泰帕罗马明，Ribostamycin。

这二种目标化合物为此选择做为新霉素滤渣的特征标记物。

表 20 新霉素特征标志物

药渣类型	标志物	分子量	一级离子对	二级离子对
新霉素 药渣	帕罗马明	337.33	338.1372	295.1313,177.0559
	Ribostamycin	466.47	467.2128	338.1375,295.1316

5.5.5 饲料原料中抗生素滤渣的鉴别

样品的采集与制备：采集 5 类代表性饲料样品，包括：植物性蛋白饲料原料豆粕，发酵类蛋白饲料原料酵母蛋白渣、玉米酒精糟（DDGS）、核苷酸渣（NR）和配合饲料鸡配合饲料。所有样品使用旋风磨（ZM100，德国 Restsh 公司）粉碎过 0.425 mm 筛。将抗生素滤渣以 5%（质量分数）的掺假量添加到 5 类饲料中，制备掺有抗生素滤渣的饲料试样。

饲料样品按上述方法处理，具体做法是利用主成分分析（PCA）方法选取质谱的前 100 个主成分对数据进行对比。计算掺有抗生素滤渣的饲料样品的质谱数据与抗生素滤渣质谱库中相似度，根据确定的鉴别阈值，进行饲料中抗生素滤渣的鉴别，鉴别结果如图 92-图 95 所示。从结果可以看出含有抗生素滤渣的饲料试样中均检测出了对应的抗生素滤渣。

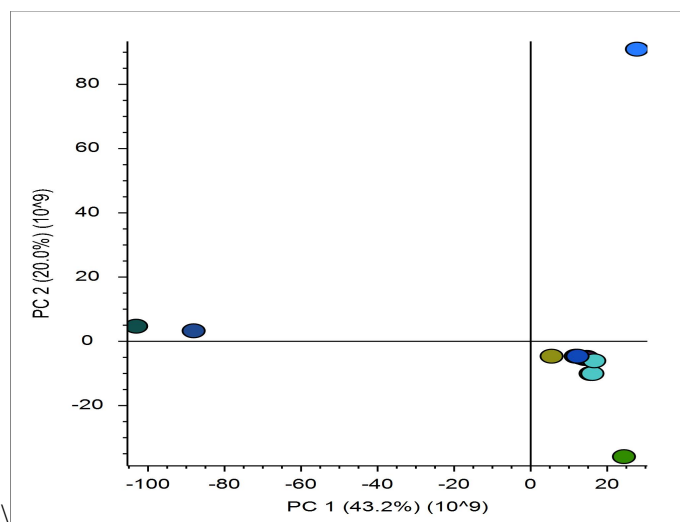


图 92 饲料中添加 3%金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素滤渣鉴别结果

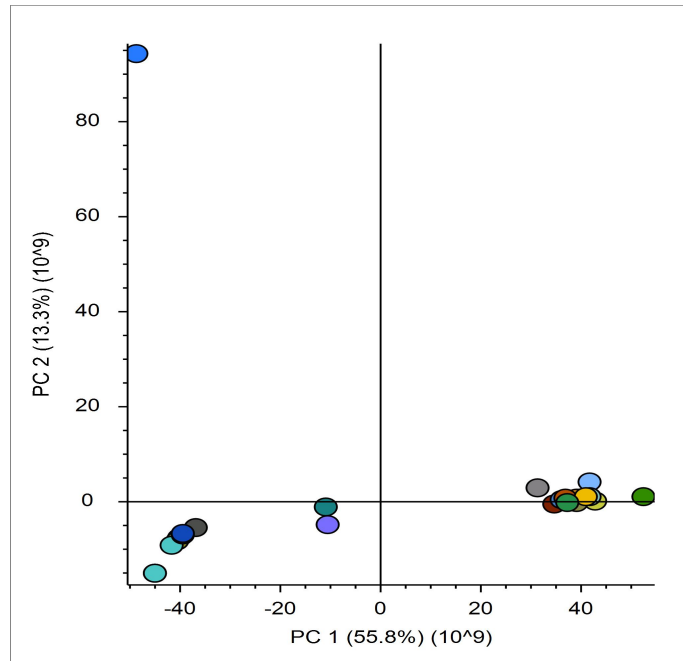


图 93 饲料中添加 5%金霉素、土霉素、泰乐菌素、泰万菌素、新霉素和青霉素
滤渣鉴别结果

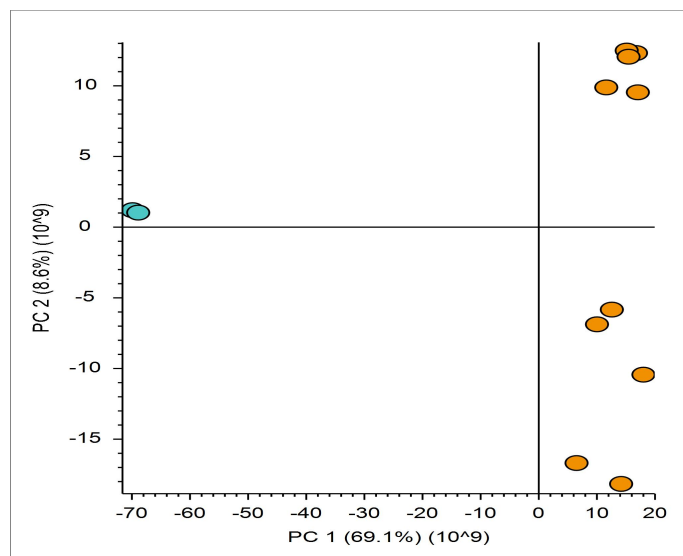


图 94 饲料中添加不同浓度（2%-50%）的土霉素滤渣鉴别结果
注：左侧图像中橙色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料

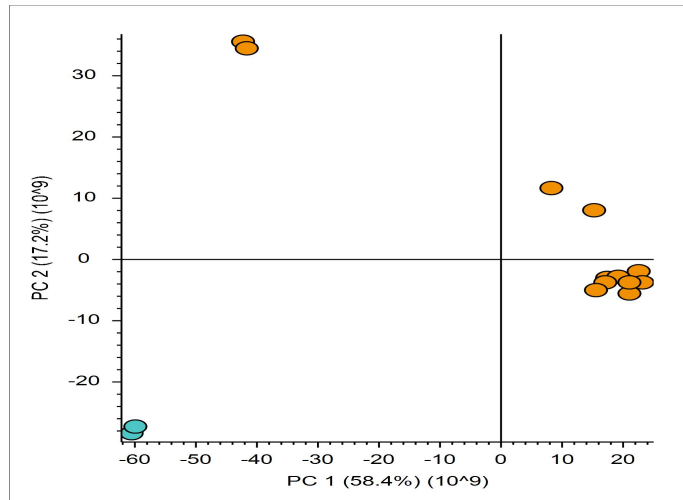


图 95 饲料中添加不同浓度（2%-50%）的泰乐菌素滤渣鉴别结果

注：左侧图像中橙色像素点是鉴别出的抗生素滤渣、蓝色像素点是饲料

6. 方法对比

根据评审会专家的意见，编制说明中需要补充本标准提出的 3 种方法结果一致性相关内容。我们选取了 7 种空白饲料原料、浓缩饲料、精料补充料、配合饲料等及 6 种抗生素滤渣。进行相关添加，共制备掺有抗生素滤渣的饲料原料、浓缩饲料、精料补充料、配合饲料试样 23 个。饲料和抗生素滤渣种类及掺混比例见下表 21。并采用三种方法进行鉴别，鉴别结果见表 22。除去相关方法没有的抗生素滤渣外，液相色谱-高分辨质谱法、显微红外光谱法和荧光 PCR 法的结果具有很好的一致性。

表 21 饲料和抗生素滤渣种类及掺混比例

样品信息		抗生素滤渣					
		青霉素滤渣	土霉素滤渣	金霉素滤渣	新霉素滤渣	泰乐菌素滤渣	泰万菌素滤渣
饲料	鸡配合饲料	5%	/	/	/	5%	/
	猪浓缩饲料	5%	5%	/	/	/	5%
	牛羊精料补充料	5%	/	/	/	5%	/
	鸭配合饲料	5%	/	5%	5%	/	/
	谷氨酸渣	5%	5%	/	/	/	5%
	棉粕	5%	/	/	/	5%	/
	鸡肉粉	5%	/	5%	5%	/	/

表 22 添加抗生素滤渣的饲料试样检出结果

编号	样品	添加药物	高分辨质谱法		红外光谱法		荧光 PCR	
			目标抗生素 检出	其他抗生素 结果	目标抗生素 检出	其他抗生素 结果	目标抗生素 检出	其他抗生素 结果
1	鸡配合饲料	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
2	猪浓缩饲料	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
3	牛羊精料补充料	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
4	鸭配合饲料	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
5	谷氨酸渣	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
6	棉粕	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
7	鸡肉粉	青霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
8	鸡配合饲料	泰乐菌素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
9	猪浓缩饲料	土霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
10	牛羊精料补充料	泰乐菌素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
11	鸭配合饲料	金霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
12	谷氨酸渣	土霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
13	棉粕	泰乐菌素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM

编号	样品	添加药物	高分辨质谱法		红外光谱法		荧光 PCR	
			目标抗生素 检出	其他抗生素 结果	目标抗生素 检出	其他抗生素 结果	目标抗生素 检出	其他抗生素 结果
14	鸡肉粉	金霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
15	猪浓缩饲料	泰万菌素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
16	鸭配合饲料	新霉素	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
17	谷氨酸渣	泰万菌素	阳性	阴性	阳性	阴性	NM	NM
18	棉粕、	阿维菌素	NM	NM	阳性	阴性	阳性	阴性
19	牛羊精料补充料	阿维菌素	NM	NM	阳性	阴性	阳性	阴性

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

2025年1月~2月，标准编制小组分别委托北京市农林科学院质量标准与检测技术研究所、西安交通大学大型仪器设备共享实验中心、青岛农业大学分析测试中心、中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心、江苏省兽药饲料质量检验所、北京兽药饲料监测中心、广西兽药监察所、浙江兽药饲料监察所、江苏兽药饲料质量检验所完成本标准的三个检测方法的复核验证工作。上述检测机构对本标准的复核验证结论为：经试验验证，采用该方法能满足饲料中抗生素滤渣的鉴别，故该方法通过验证，可作为饲料中抗生素滤渣的鉴别标准方法。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

五、采标情况

本标准未采用国际国外标准。

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

无。

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] 谢玉荣. 畜禽养殖中饲料安全影响因素及解决措施[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(10):98-99.
- [2] 陈立文, 方森海, 王明兹. 抗生素发酵废菌渣的无害化及资源再利用研究进展[J]. 生物技术通报, 2015,31(5):13-19.
- [3] 邹书娟, 王一迪, 张均雅, 杨萍, 王伟. 抗生素菌渣理化性质分析[J]. 环境科学与技术, 2018,41(S1):47-52.
- [4] 白净, 张娇娇, 常春, 陈俊英. 抗生素菌渣的综合处理研究进展: 中国环境科学学会 2019 年科学技术年会[C]——环境工程技术创新与应用分论坛, 中国陕西西安, 2019.
- [5] 邓良斌. 固体菌渣处理技术与装置研究[J]. 中国设备工程, 2020(8):73-74.
- [6] 朱培, 张建斌, 陈代杰. 抗生素菌渣处理的研究现状和建议[J]. 中国抗生素杂志, 2013,38(09):647-651.
- [7] 石鹏, 艾晗, 王辉, 孙德智. 抗生素制药菌渣的处理处置技术进展与分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015,40(07):486-494.
- [8] 苑丽梅, 王梦梦, 王璞, 刘惠玲. 头孢菌渣理化性质研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015,31(06):691-693.
- [9] 任士明. 土霉素滤渣作为饲料蛋白添加剂的应用研究[D]. 河北大学, 2016.
- [10] 肖艳春, 黄婧, 林香信, 陈彪. 抗生素菌渣饲料化工艺技术[J]. 能源与环境, 2016(05):25-26.
- [11]Chen B, Hao L, Guo X, Wang N, Ye B. Prevalence of antibiotic resistance genes of wastewater and surface water in livestock farms of Jiangsu Province, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015,22(18):13950-13959.
- [12] Cheng W, Chen H, Su C, Yan S. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China[J]. Environment International, 2013,61:1-7.
- [13] 李阳. 链霉素滤渣危害因子确证及其诱导细菌耐药机制研究[D]. 中国农业科学院, 2017.
- [14] 李再兴, 田宝阔, 左剑恶, 余忻, 沈洪艳, 王勇军, 赵秀梅. 抗生素菌渣处理

处置技术进展[J]. 环境工程, 2012,30(02):72-75.

[15] 杨帆, 张莲. 我国抗生素菌渣处置现状及建议[J]. 科技与创新, 2017(15):86-87.

[16] 霍然, 李再兴, 钟为章, 李贵霞. 菌渣中土霉素残留的高效液相检测法[J]. 煤炭与化工, 2019,42(12):120-124.

[17] 郑景娇. 食品中抗生素残留常用检测技术应用浅析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020,11(21):7884-7889.

[18] 林嫚婷, 苏亚霞, 胡汉昆. 食品中抗生素残留的预处理及检测方法研究进展[J]. 食品与药品, 2020,22(04):304-309.

[19] 李阳, 樊霞, 肖志明, 等. 一种检测菜籽粕中是否掺杂抗生素滤渣的方法. CN201810510072.9[2025-02-15].

[20] ang C , Gao X , Tang G ,et al.Thermogravimetric study on oxy-fuel co-combustion characteristics of semi-coke and antibiotic filter residue[J].Journal of thermal analysis and calorimetry, 2022(17):147.DOI:10.1007/s10973-022-11220-y.

[21] Zhao X , Zhu G , Liu J ,et al.Efficient Removal of Tetracycline from Water by One-Step Pyrolytic Porous Biochar Derived from Antibiotic Fermentation Residue[J].Nanomaterials (2079-4991), 2024, 14(17).DOI:10.3390/nano14171377.

[22] Yang G , Xu Y , Wang J .Antibiotic fermentation residue for biohydrogen production: Inhibitory mechanisms of the inherent antibiotic[J].Science of the Total Environment, 2024, 944.DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.173986

[23] Dhakal S, Schmidt W F, Kim M, Tang X, Peng Y, Chao K. Detection of Additives and Chemical Contaminants in Turmeric Powder Using FT-IR Spectroscopy[J]. Foods, 2019,8(5):143.

[24] Song S Y, Kim C H, Im S J, Kim I. Discrimination of citrus fruits using FT-IR fingerprinting by quantitative prediction of bioactive compounds[J]. Food Science and Biotechnology, 2017,27(3):1-8.

[25] Hammoudeh A Y, Obeidat S M, Abboushi E K, Mahmoud A M. FT-IR Spectroscopy for the Detection of Diethylene Glycol (DEG) Contaminant in Glycerin-Based Pharmaceutical Products and Food Supplements[J]. Acta Chimica

Slovenica, 2020,67(2):530-536.

[26] Gao B, Xu S, Han L, Liu X. FT-IR-based quantitative analysis strategy for target adulterant in fish oil multiply adulterated with terrestrial animal lipid[J]. Food Chemistry, 2021,343:128420.

[27] 叶树彬. 傅里叶变换红外光谱定性识别分析方法研究[D]. 中国科学技术大学, 2017.

[28] 邹小波, 崔雪平, 石吉勇, 胡雪桃, 徐艺伟, 薛瑾. 基于近红外与中红外光谱技术的淀粉回生度检测[J]. 农业机械学报, 2018,49(3):341-346.

[29] Vollmer M, Möllmann K. Advanced Methods in IR Imaging[M]. Infrared Thermal Imaging: Fundamentals, Research and Applications, Second Edition, 2017

[30] Li Y, Gao H, Wang R, et al. Deoxynivalenol in food and feed: Recent advances in decontamination strategies[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1141378.

[31] Gao J, Yang Z, Zhao C, et al. A comprehensive review on natural phenolic compounds as alternatives to in-feed antibiotics[J]. Sci China Life Sci, 2023, 66(7): 1518-1534.

[32] Ayalew H, Zhang H, Wang J, et al. Potential Feed Additives as Antibiotic Alternatives in Broiler Production[J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 916473.

[33] Mantovani A, Aquilina G, Cubadda F, et al. Risk-Benefit Assessment of Feed Additives in the One Health Perspective[J]. Front Nutr, 2022, 9: 843124.

[34] Li Z H, Hu X J, Lu Y F, et al. [Determination of sixteen antibiotics and four β -agonists in human urine samples using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on high-throughput automatic solid-phase extraction][J]. Se Pu, 2023, 41(5): 397-408.

[35] Feng M, Liu Y, Yang L, et al. Antibiotics and antibiotic resistance gene dynamics in the composting of antibiotic fermentation waste - A review[J]. Bioresour Technol, 2023, 390: 129861.

[36] Yin Y, Wang J. Production of medium-chain fatty acids by co-fermentation of antibiotic fermentation residue with fallen Ginkgo leaves[J]. Bioresour Technol, 2022, 360: 127607.

- [37] Wang Y, Wang Y, Zhang Z, et al. Combined hydrothermal treatment, pyrolysis, and anaerobic digestion for removal of antibiotic resistance genes and energy recovery from antibiotic fermentation residues[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 337: 125413.
- [38] Ghimpețeanu O M, Pogurschi E N, Popa D C, et al. Antibiotic Use in Livestock and Residues in Food-A Public Health Threat: A Review[J]. *Foods*, 2022, 11(10).
- [39] Cazer C L, Eldermire E R B, Lhermie G, et al. The effect of tylosin on antimicrobial resistance in beef cattle enteric bacteria: A systematic review and meta-analysis[J]. *Prev Vet Med*, 2020, 176: 104934.
- [40] Song X, Xie J, Zhang M, et al. Simultaneous determination of eight cyclopolypeptide antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled with evaporation light scattering detection[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1076: 103-109.
- [41] Qian M, Zhang X, Zhao H, et al. A high-throughput screening method for determination of multi-antibiotics in animal feed[J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(18): 2968-2976.
- [42] Megoulas N C, Koupparis M A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057(1-2): 125-31.
- [43] Zhgun A a J F. *Pharmaceutical Fermentation: Antibiotic Production and Processing*[J], 2024, 10.
- [44] Li X S, Zheng X H, Chen F, et al. A new secondary metabolite from the fermented mycelia of *Streptomyces* antibiotic H41-55[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(8): 807-814.
- [45] Li Y, Su X, Peng Q, et al. Method for determination of streptomycin and streptidine as markers for streptomycin industrial dregs monitoring in pig and poultry compound feeds[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1035: 84-90.
- [46] De Souza M R, Araújo I P, Da Costa Arruda W, et al. RGeasy: a reference gene analysis tool for gene expression studies via RT-qPCR[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1):

907.

[47] Della Terra P P, Gonsales F F, De Carvalho J A, et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4): e704-e716.

[48] Karaca B, Karakaya A, Ozcan B, et al. Rapid detection of *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species by quantitative qPCR (qPCR) in commercial dairy products[J], 2022.

[49] Banerji A, Deshpande R, Elk M, et al. Highlighting the promise of qPCR-based environmental monitoring: response of the ribosomal RNA:DNA ratio of calanoid copepods to toxic cyanobacteria[J]. *Ecotoxicology*, 2021, 30(3): 411-420.

[50] van den Berg, M. A.; Westerlaken, I.; Leeftang, C.; Kerkman, R.; Bovenberg, R. A., Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255. *Fungal genetics and biology : FG & B* 2007, 44 (9), 830-44.

[51] Yu, L.; Cao, N.; Wang, L.; Xiao, C.; Guo, M.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S., Oxytetracycline biosynthesis improvement in *Streptomyces rimosus* following duplication of minimal PKS genes. *Enzyme and microbial technology* 2012, 50 (6-7), 318-24.

[52] Shi, Y.; Zhang, J.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Bechthold, A.; Yu, X., Double-reporter-guided targeted activation of the oxytetracycline silent gene cluster in *Streptomyces rimosus* M527. *Biotechnology and bioengineering* 2023, 120 (5), 1411-1422.

[53] Kudo, F.; Hoshi, S.; Kawashima, T.; Kamachi, T.; Eguchi, T., Characterization of a radical S-adenosyl-L-methionine epimerase, NeoN, in the last step of neomycin B biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136 (39), 13909-15.

[54] Li, X.; Yu, F.; Wang, F.; Wang, S.; Han, R.; Cheng, Y.; Zhao, M.; Sun, J.; Xue, Z., Point mutation of V252 in neomycin C epimerase enlarges substrate-binding pocket and improves neomycin B accumulation in *Streptomyces fradiae*. *Bioresources and bioprocessing* 2022, 9 (1), 123.

[55] Ikeda, H.; Wang, L. R.; Ohta, T.; Inokoshi, J.; Omura, S., Cloning of the gene encoding avermectin B 5-O-methyltransferase in avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *Gene* 1998, 206 (2), 175-80.

[56] Chen, Z.; Song, Y.; Wen, Y.; Li, J., [Effect of gene disruption of *aveD* on avermectins production in *Streptomyces avermitilis*]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 2001, 41 (4), 440-6.