



中华人民共和国国家标准

GB 31658.16—2021

食品安全国家标准

动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—

Determination of avermectins residues in animal derived food by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2021-09-16 发布

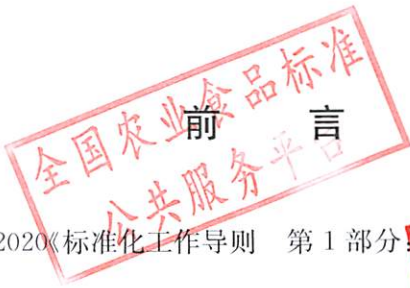
2022-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

国家市场监督管理总局



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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定

高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法

方法一 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的制样和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的阿维菌素类药物经乙腈提取， C_{18} 固相萃取柱净化，荧光衍生化，高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。

5.1.3 正己烷(C_6H_{14}): 色谱纯。

5.1.4 乙酸(CH_3COOH): 色谱纯。

5.1.5 三氟乙酸酐($C_4F_6O_3$): 色谱纯。

5.1.6 三乙胺($C_6H_{15}N$)。

5.1.7 1-N-甲基咪唑($C_4H_6N_2$)。

5.2 溶液配制

5.2.1 衍生化试剂 A 液: 取 1-N-甲基咪唑 5 mL、乙腈 5 mL，混匀。

5.2.2 衍生化试剂 B 液: 取三氟乙酸酐 5 mL、乙腈 10 mL，混匀。

5.2.3 洗涤液: 取乙腈 80 mL、水 120 mL、三乙胺 0.2 mL，混匀。

5.3 标准品

阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素含量均 $\geq 95\%$ ，具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(1 mg/mL):取阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素标准品各适量(相当于各活性成分约 10 mg),精密称定,于 10 mL 容量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。—18 °C 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作液(10 µg/mL):精密量取标准储备液各 0.1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 10 µg/mL 的混合标准工作液。—18 °C 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 混合标准工作液(1 µg/mL):精密量取 10 µg/mL 的混合标准工作液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 1 µg/mL 的混合标准工作液。—18 °C 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱:三键键合 C₁₈, 500 mg/6 mL,或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜:0.2 µm。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 离心机。

6.4 组织匀浆机。

6.5 涡旋混合器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

—18 °C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2 g (准确至 ±0.02 g),于 50 mL 离心管中,加乙腈 8 mL,涡旋 2 min,4 000 r/min 离心 5 min。收集上清液,残渣中加乙腈 8 mL,重复提取 1 次。合并 2 次提取液,混匀。取提取液 4 mL,加水 6 mL 和三乙胺 10 µL,混匀,备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用乙腈、洗涤液各 4 mL 活化,取备用液过柱,依次用洗涤液 5 mL 和水 3 mL 淋洗,抽干,用正己烷 4 mL 淋洗,抽干,用乙腈 8 mL 洗脱。收集洗脱液,40 °C 水浴氮气吹干。

8.3 衍生化

加衍生化试剂 A 液 100 µL、衍生化试剂 B 液 150 µL、乙酸 50 µL、三乙胺 50 µL,涡旋 30 s,20 °C 避光静置 15 min。加甲醇 650 µL,涡旋 10 s,20 °C 避光静置 15 min,过滤后供高效液相色谱仪测定。

8.4 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量,用甲醇稀释,配制成阿维菌素类药物浓度为 2.5 µg/L、5 µg/L、

12.5 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、125 μg/L 和 250 μg/L 的系列标准工作液,40℃水浴氮气吹干,按 8.3 衍生化步骤处理,供高效液相色谱仪测定。以测得峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.5 测定

液相色谱参考条件如下。

- 色谱柱: C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 或相当者;
- 流动相: 乙腈: 水 (90:10, 体积比);
- 流速: 1.0 mL/min;
- 检测波长: 激发波长: 365 nm, 发射波长: 475 nm;
- 柱温: 35℃;
- 进样量: 50 μL。

8.6 测定法

取试样溶液和标准溶液,作单点或多点校准,按外标法以色谱峰面积定量。试样溶液及标准溶液中阿维菌素类药物的峰面积应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液的高效液相色谱图见附录 B。

8.7 空白试验

取空白试料,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中阿维菌素类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \quad (1)$$

式中:

- X —— 试样中阿维菌素类药物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 标准溶液中阿维菌素类药物浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- A —— 试样溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积;
- A_s —— 标准溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积;
- V_1 —— 提取用乙腈总体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 合并后所取提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_3 —— 试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 1.5 μg/kg,定量限为 5 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 5 μg/kg~100 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 60%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%,批间相对标准偏差≤20%。

方法二 液相色谱-串联质谱法

11 范围

本文件规定了动物性食品中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定。

12 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

13 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

14 原理

试样中残留的阿维菌素类药物，用乙腈提取， C_{18} 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

15 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

15.1 试剂

15.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

15.1.2 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

15.1.3 甲酸($HCOOH$):色谱纯。

15.1.4 三乙胺($C_6H_{15}N$)。

15.2 溶液配制

洗涤液:取乙腈 80 mL、水 120 mL、三乙胺 0.2 mL,混匀。

15.3 标准品

阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素含量均 $\geq 95\%$ 。具体见附录 A。

15.4 标准溶液制备

15.4.1 标准储备液(1 mg/mL):取阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素标准品各适量(相当于各活性成分约 10 mg),精密称定,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 6 个月。

15.4.2 混合标准工作液($10\text{ }\mu\text{g/mL}$):精密量取标准储备液各 0.1 mL ,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

15.4.3 混合标准工作液($1\text{ }\mu\text{g/mL}$):精密量取 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液 1 mL ,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

15.4.4 混合标准工作液($0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$):精密量取 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液 0.1 mL ,于 10 mL 容量

瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 -18°C 以下避光保存,有效期 3 个月。

15.5 材料

15.5.1 固相萃取柱:三键键合 C_{18} , $500 \text{ mg}/6 \text{ mL}$,或相当者。

15.5.2 微孔尼龙滤膜: $0.2 \mu\text{m}$ 。

16 仪器和设备

16.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

16.2 分析天平:感量 $0.000\,01 \text{ g}$ 和 0.01 g 。

16.3 离心机。

16.4 组织匀浆机。

16.5 涡旋混合器。

16.6 固相萃取装置。

16.7 氮吹仪。

17 试料的制备与保存

17.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

17.2 试料的保存

-18°C 以下保存。

18 测定步骤

18.1 提取

称取试料 2 g (准确至 $\pm 0.02 \text{ g}$),于 50 mL 离心管中,加乙腈 8 mL ,涡旋 2 min , $4\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min 。收集上清液,残渣中加乙腈 8 mL ,重复提取 1 次。合并 2 次提取液,混匀。取提取液 4 mL ,加水 6 mL 和三乙胺 $10 \mu\text{L}$,混匀,备用。

18.2 净化

固相萃取柱依次用乙腈、洗涤液各 4 mL 活化,取备用液过柱,依次用洗涤液 5 mL 、水 3 mL 淋洗,抽干,用正己烷 4 mL 淋洗,抽干,用乙腈 8 mL 洗脱。收集洗脱液, 40°C 水浴氮气吹干。加入 50% 乙腈水溶液 0.5 mL ,涡旋 1 min 溶解残余物,微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定。

18.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取 $10 \mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液 $5 \mu\text{L}$ 和 $10 \mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液 $5 \mu\text{L}$ 和 $25 \mu\text{L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液 $5 \mu\text{L}$ 和 $25 \mu\text{L}$,分别加入 6 份经提取和净化的空白试样残渣中, 40°C 水浴氮气吹干,加入 50% 乙腈水溶液 0.5 mL 涡旋溶解残余物,配制成浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $50 \mu\text{g/L}$ 、 $100 \mu\text{g/L}$ 、 $200 \mu\text{g/L}$ 的基质匹配系列标准溶液,微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定。以测得特征离子峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

18.4 测定

18.4.1 色谱参考条件

a) 色谱柱: C_{18} ($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$),或相当者;

b) 柱温: 35°C ;

- c) 进样量:10 μL ;
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为 0.1%甲酸乙腈溶液,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	0.1%甲酸水溶液 %	0.1%甲酸乙腈 %
0	10	90
0.2	10	90
1.2	0	100
1.5	0	100
1.6	10	90
3.0	10	90

18.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 离子源温度:100 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 脱溶剂温度:350 $^{\circ}\text{C}$;
- f) 毛细管电压:3.0 kV;
- g) 定性离子对、定量离子对和锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对、定量离子对和锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
乙酰氨基阿维菌素	936.5>352.2	936.5>490.2	96	56
	936.5>490.2			48
阿维菌素	895.5>183.1	895.5>751.4	84	52
	895.5>751.4			40
多拉菌素	921.5>183.1	921.5>777.4	86	52
	921.5>777.4			46
伊维菌素	897.4>183.1	897.4>753.4	86	54
	897.4>753.4			44

18.4.3 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中阿维菌素类药物的保留时间与基质匹配标准工作液中阿维菌素类药物的保留时间,偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

18.4.4 定量测定

按 18.4.1 和 18.4.2 设定仪器条件,作单点或多点校准,按外标法计算试样中药物的残留量。基质匹配标准溶液及试样溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

18.5 空白试验

取空白试料,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

19 结果计算和表述

试样中阿维菌素类药物的残留量按标准曲线或公式(2)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X ——试样中阿维菌素类药物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 C_s ——基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
 A ——试样溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积;
 A_s ——基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物的色谱峰面积;
 V_1 ——提取用乙腈总体积的数值,单位为毫升(mL);
 V_2 ——合并后所取提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
 V_3 ——试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
 m ——供试试样质量的数值,单位为克(g)。

20 方法灵敏度、准确度和精密度

20.1 灵敏度

本方法的检测限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

20.2 准确度

本方法在 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

20.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

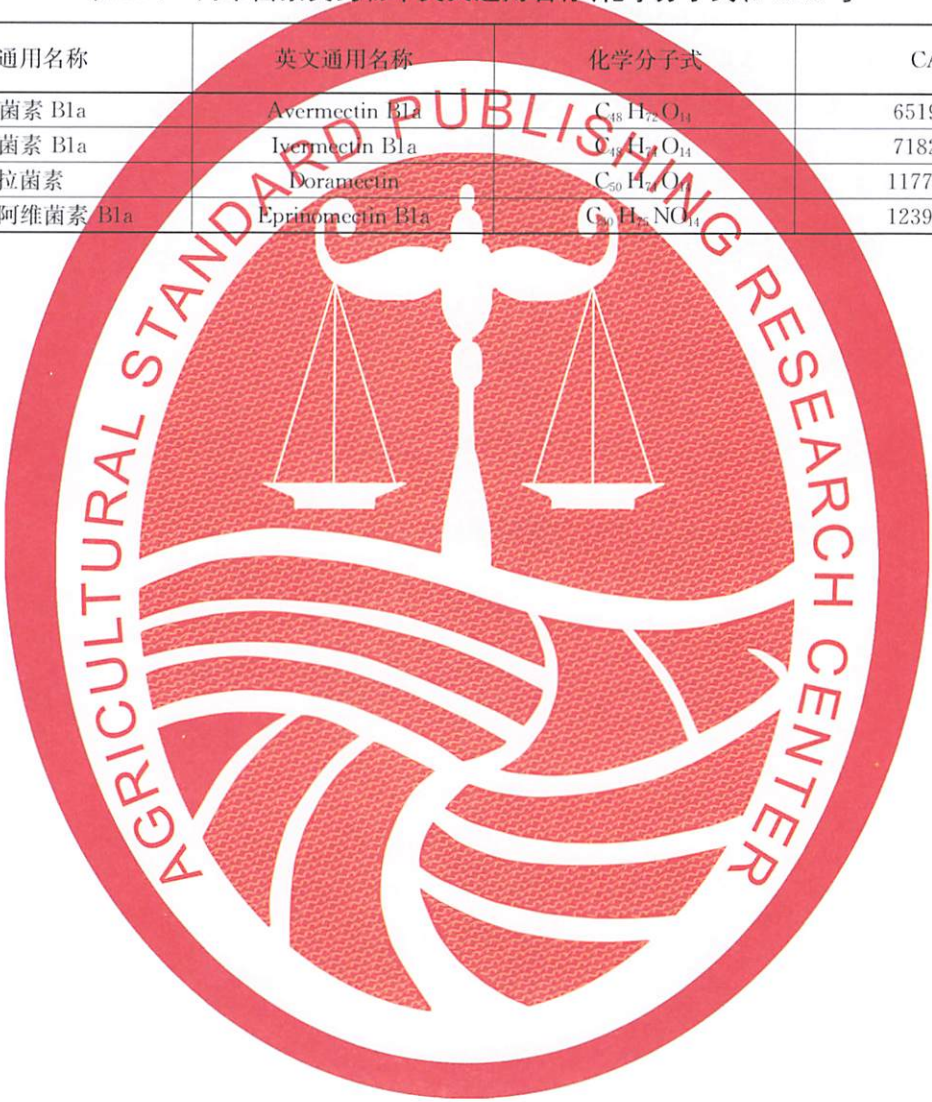
附 录 A
(资料性)

阿维菌素类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

阿维菌素类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 阿维菌素类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
阿维菌素 B1a	Avermectin B1a	$C_{48}H_{72}O_{14}$	65195-55-3
伊维菌素 B1a	Ivermectin B1a	$C_{48}H_{74}O_{14}$	71827-03-7
多拉菌素	Doramectin	$C_{50}H_{78}O_{14}$	117704-25-3
乙酰氨基阿维菌素 B1a	Eprinomectin B1a	$C_{50}H_{78}NO_{14}$	123997-26-2



附录 B
(资料性)
阿维菌素类药物标准溶液色谱图

B.1 阿维菌素类药物标准溶液色谱图

见图 B.1。

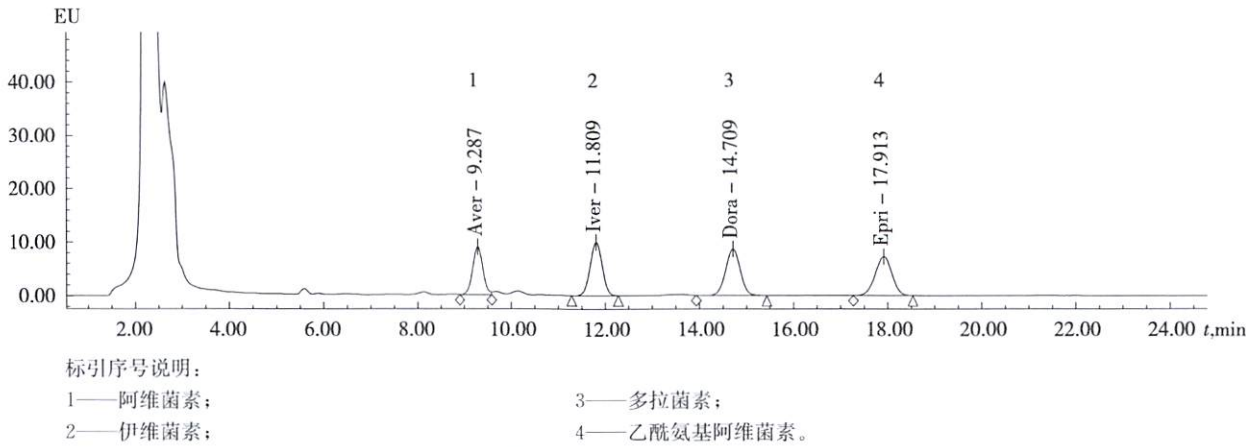
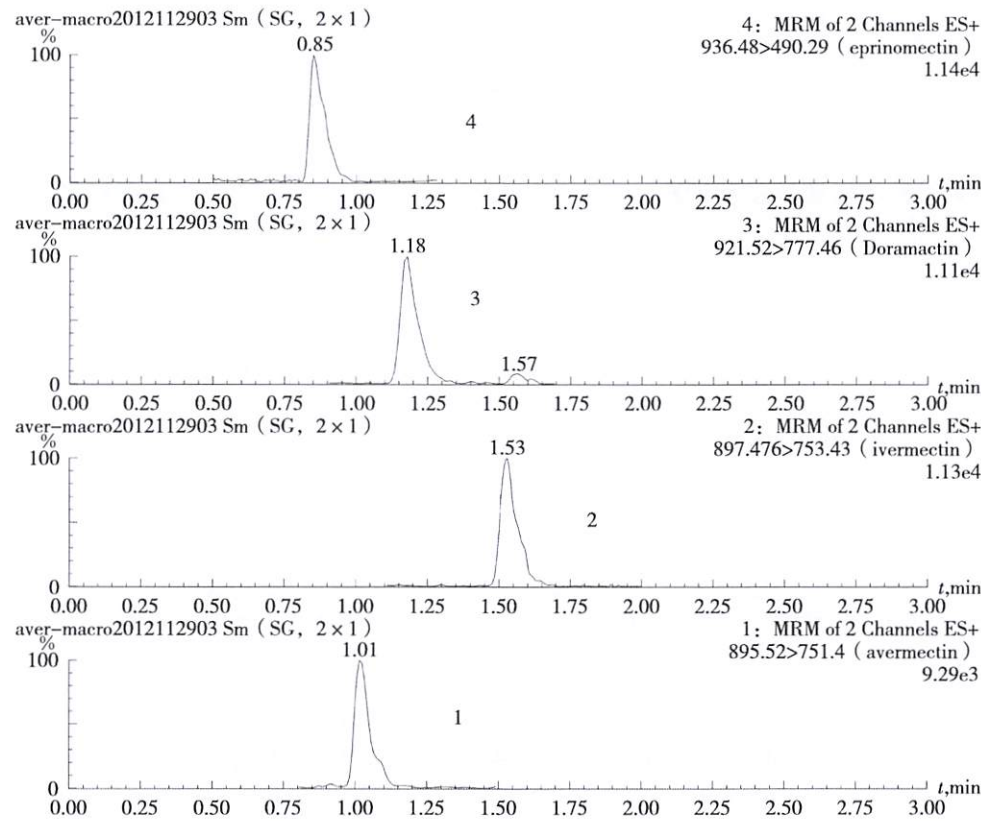


图 B.1 阿维菌素类药物标准溶液色谱图(2.5 μg/L)

B.2 阿维菌素类药物标准溶液特征离子质量色谱图

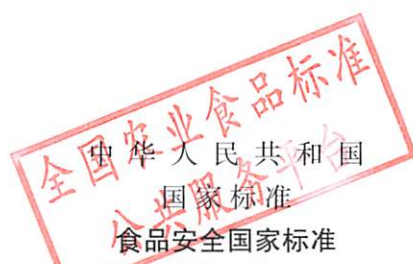
见图 B.2。



标引序号说明:

- 1——阿维菌素特征离子质量色谱图(895.5>751.4);
- 2——伊维菌素特征离子质量色谱图(897.4>753.4);
- 3——多拉菌素特征离子质量色谱图(921.5>777.4);
- 4——乙酰氨基阿维菌素特征离子质量色谱图(936.5>490.2)。

图 B.2 阿维菌素类药物标准溶液特征离子质量色谱图(1 µg/L)



动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定
高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法

GB 31658.16—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8767

定价: 32.00 元



GB 31658.16—2021

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261