

农业行业标准
《饲料中 6 种大环内酯类驱虫药的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

（公开征求意见稿）

中国农业大学动物医学院

2022 年 10 月

饲料中阿维菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

编制说明

（公开征求意见稿）

一、标准修订工作简况

1. 任务来源

本标准项目是中华人民共和国农业部提出并下达的饲料中药物检测方面的农业行业标准项目。任务下达名称为《饲料中阿维菌素类驱虫药（阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、莫西菌素、米尔贝霉素等）的测定 液相色谱-串联质谱法》，完成单位为中国农业大学。在完成标准的全部研究工作后我们形成了相关方法，起草了定向征求意见稿进行广泛征求意见，委托三家同行单位进行了标准方法验证实验，根据征求意见结果和复核实验结果形成了标准预审稿及本编制说明。2022年7月14日，制标单位组织专家进行了标准预审查会议，根据与会专家的意见进一步补充数据和修改，形成了本公开征求意见稿。

2. 制定背景

驱虫药是畜牧养殖中常用的兽药品种，特别是阿维菌素(Avermectin, AVM，主要成份为阿维菌素 b1a)、伊维菌素(Ivermectin, IVM)、莫西菌素(Moxidectin, MOX)、米尔贝肟(米尔贝霉素, Milbemite, Milbemycin oxime, Milbemycin oxime, MIL)、多拉菌素(Doramectin, DOR)、埃普利诺菌素(Eprinomectin, EP，即乙酰阿维菌素)这6种大环内酯类驱虫药物在动物驱虫上发挥了巨大的作用。其中阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃普利诺菌素属于经典阿维菌素类药物(avermectins, AVMs)。莫西菌素(Moxidectin, MOX)和米尔贝肟(米尔贝霉素, Milbemite, Milbemycin oxime, Milbemycin oxime, MIL)经常也被归于阿维菌素类药物一类，但它们的化学结构与传统的阿维菌素类药物差异较大，并不能算严格意义上的阿维菌素类药物，该归类并不科学，它们只能归属于大环内酯类驱虫药。因此，本修订标准在经专家的深入研究和讨论后，将原下达名称《饲料中阿维菌素类驱虫药（阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、莫西菌素、米尔贝霉素等）的测定 液相色谱-串联质谱法》修改成了更科学合理的《饲料中6种大环内酯类驱虫药的测定 液相色谱-串联质谱法》。

大环内酯类是一类化学结构新颖、作用机制独特、高效、低毒、安全、抗虫谱广的新型驱虫药，对绝大多数线虫、体外寄生虫及其它节肢动物都有很强的驱杀效果。它们是目前畜牧业生产上用量最大的抗寄生虫药物，同时也作为杀虫剂大量用于种植业生产中。因此，植物产品(包括饲料)和动物产品中都可能存在大环内酯类驱虫药物残留。同时，大环内酯类驱虫药物可作为饲料添加剂

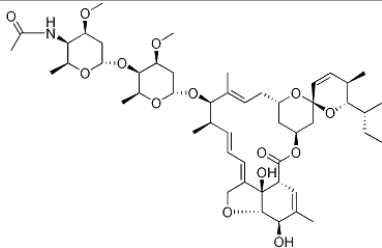
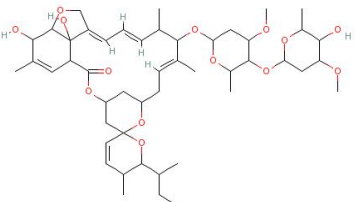
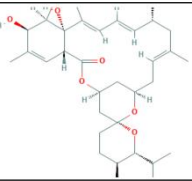
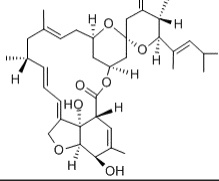
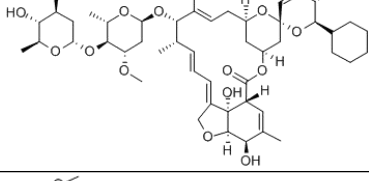
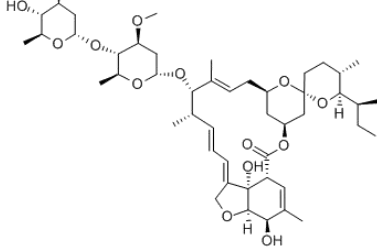
使用，特别是伊维菌素曾经被普遍添加于动物饲料中预防和治疗寄生虫疾病。不合理地使用大环内酯类驱虫药物可能导致饲料中该类物质含量过高而给人类健康带来安全隐患。动物通过从植物源食物(饲料等)本身的残留、饲料中添加、兽药临床使用等途径都可能摄取大环内酯类驱虫药物，导致其体内药物残留问题，通过食物链对人类健康造成威胁。

根据我国相关兽药厂家销售的情况，阿维菌素、伊维菌素和莫西菌素可作为饲料药物添加剂使用，用于猪、牛、羊等动物，配合饲料中添加量一般为 2-10 mg/kg。多拉菌素多作为水剂使用。埃普利诺菌素多作为注射剂使用。米尔贝肟多作为片剂使用。根据 drugs.com 网站发布的兽药数据，伊维菌素用于猪时，饲料中添加量为 2-10 mg/kg；用于羊时采用水剂饲喂。多拉菌素作为水剂使用，用于牛和猪。而米尔贝肟一般作为药片使用，用于猫和狗。阿维菌素和莫西菌素一般作为药片使用，用于狗。根据 Poultrydvm 网站信息，伊维菌素用于鸡和鸭饲料时，使用量为 0.2-0.4 mg/kg。对饲料中大环内酯类驱虫药的检测和监控是控制该类物质残留的重要途径之一。研究建立饲料中大环内酯类药物的检测方法，对于从生产源头上控制其残留具有十分重要的意义。

我国 2020 年 11 月 19 日颁布的农业农村部公告第 363 号《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》中列出，乙酰氨基阿维菌素的主要成份乙酰氨基阿维菌素 B1a 不得少于 90.0%，且乙酰氨基阿维菌素 B1b 的含量不得超过乙酰氨基阿维菌素 B1a+B1b 总量的 5%；伊维菌素的主要成份为 H2B1a+H2B1b，二者的含量应为标示量的 90%-110%；对其它四种物质暂未见相关规定。我国 2019 年 9 月 6 日颁布的 GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量规定：阿维菌素的残留标志物为阿维菌素 B1a，在牛羊组织中的残留限量值为 20-100 µg/kg；多拉菌素的残留标志物为多拉菌素，在猪、牛和羊组织中的残留限量为 10-150 µg/kg；乙酰氨基阿维菌素的残留标志物为乙酰氨基阿维菌素 B1a，在牛组织中的残留限量值为 20-2000 µg/kg。伊维菌素的残留标志物为 22, 23-二氢阿维菌素 B1a，在猪牛羊组织中的残留限量值为 10-100 µg/kg。莫西克丁的残留标示物为莫西克丁，在牛、绵羊、鹿组织中的残留限量为 20-500 µg/kg。米尔贝肟素作为一种应用时间较短的药物，目前尚无相关残留限量的规定。我国 2017 年新发布的《药物饲料添加剂品种目录及使用规范》未对饲料中大环内酯类药物的添加剂量进行规定。

表 1 六种大环内酯类驱虫药的分子结构

	药物名称	分子量	分子式	分子结构

1.	乙酰氨基阿维菌素 CAS:123997-26-2	914.1288	$C_{50}H_{75}NO_{14}$	
2.	阿维菌素 65195-55-3	873.08	$C_{48}H_{72}O_{14}$	
3.	米尔贝肟 CA: 77855-81-3	556.735	$C_{33}H_{48}O_7$	
4.	莫西菌素 CAS:113507-06-5	639.825	$C_{37}H_{53}NO_8$	
5.	多拉菌素 CAS:117704-25-3	899.11	$C_{50}H_{74}O_{14}$	
6.	伊维菌素 CAS: 70288-86-7 (5-O-去甲基 -22,23-双氢阿维菌素 A1a+5-O-去甲基 -22,23-双氢阿维菌素 A1b)	875.09	$C_{48}H_{74}O_{14}$	

根据 WHO 的规定,AVMs 属于高毒化合物,具有神经毒性。体内 AVMs 含量过高的动物可能出现运动失调,呼吸缓慢和震颤等中枢神经系统中毒症状,不同动物具体表现为稍有区别。莫西菌素和米尔贝肟亦具有一定的毒性作用。2022 年 9 月 2 日,我国颁布了新的农产品质量安全法,国家加强农产品质量安全工作,实行源头治理、风险管理,支持农产品质量安全科学技术研究,推行科学的质量安全管理方法。其中第十八条规定,农产品质量安全标准应当根据科学技术发展水平以及农产品质量安全的需要,及时修订。

我国目前有关饲料中阿维菌素类药物、莫西菌素和米尔贝肟的检测方法仅有《农业部 1486 号公告-5-2010 饲料中阿维菌素类药物的测定 液相色谱-质谱法》，该方法仅对阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和埃普利诺菌素四种驱虫药进行检测，而莫西菌素作为饲料药物添加剂使用较多，且米尔贝肟作为新型抗寄生虫药应用越来越多，在实际生产中也有可能会存在作为饲料药物添加剂使用的情况，因此，本研究对原农业部 1486 号公告-5-2010 的检测方法进行了修订，在优化原有方法的基础上，增加了莫西菌素和米尔贝肟的检测。

大环内酯类驱虫药物一般都有较高的分子量和糖链，熔点 155-157℃，极难气化，无法使用气相色谱(gas chromatography, GC)分析，报道的主要有液相色谱-荧光衍生化法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附测定法等。酶联免疫吸附测定法主要用于 AVMs 的快速筛选分析，无法进行准确的定性定量测定。液相色谱-紫外检测法采用 245 nm 左右的紫外吸收峰进行测定，受皮质激素、维生素、脂类、核酸等众多内源性物质干扰太大，难以满足饲料中 AVMs 的分析要求。液相色谱-荧光检测法能满足该类药物的分析需要。岳虹等(2017)建立了乳品与饲料中埃普利诺菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素多残留的液相色谱测定方法。以乙腈为提取剂，tC₁₈固相萃取小柱净化，三氟乙酸酐和 N-甲基咪唑柱前衍生，C₁₈柱分离，甲醇-乙腈的混合溶剂与水梯度洗脱，液相色谱-荧光检测。该方法对液态乳、酸乳、乳粉的定量限为 2 µg/kg，饲料的定量限为 10 µg/kg。张玉洁等(2017)建立了牛奶、羊奶和奶粉中乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素的残留检测方法。采用 20%乙醇乙腈溶液提取，加水 and 微量三乙胺稀释后经 C₁₈固相萃取柱净化，氮气吹干后，65℃避光衍生化反应 15 min 后高效液相色谱—荧光检测。4 种药物的定量限为 0.5-5 µg/kg。Ali 等(2000)采用 C8 柱为净化手段，荧光衍生化后 HPLC 测定。Payne 等(1997)采用氨基柱净化牛肝脏组织中的 EP 残留，荧光衍生化后 HPLC 测定。Degroot 等(1994)用 Bond Elut C₁₈净化，经衍生化后测定，检测限可达 0.25 µg/kg。Doherty 等 1990 年、1998 年对配合饲料进行了 0.50-3 mg/kg 的伊维菌素添加回收实验，用甲醇提取配合饲料中的药物，经固相萃取小柱净化后进行液相色谱测定。这些报道的方法都取得了理想的分析效果，但是，液相色谱方法需要对样品衍生化后进行测定；而且仅能得到样品的光学信息，无法对样品进行确证分析。

液相色谱-质谱联用法是目前进行大环内酯类驱虫药分析的最佳检测方法，而且近年来，得到了长足发展。宓捷波等(2017)利用在线固相萃取系统，通过萃取柱的选择和在线洗脱条件的优化，建立了动物源食品中阿维菌素和伊维菌素残留量的液相色谱—串联质谱法。采用乙腈-0.15%三乙胺溶液(1+1,v/v)提取，C₁₈固相萃取柱在线净化，C₁₈色谱柱分离，乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.2% 甲酸)梯度洗脱。质谱分析采用电喷雾正离子源和多反应监测模式。方法的定量限均为 5.0 µg/kg。赵肖华等(2012)采用分散固相萃取-液相色谱-质谱联用法对 3 种蔬菜和 2 种水果中的 AVM 残留进

行了检测，所用色谱柱为 ZORBAXSB C₁₈。张文娟等(2012)采用超高效液相色谱—串联质谱法测定了 10 种食品中阿维菌素类药物的残留情况，样品用乙腈提取，PEP-C₁₈ 混合固相萃取柱净化，6 种药物的定量限均达 5.0 μg/kg。何红梅等(2013)建立了超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定 3 种谷物中阿维菌素类杀虫剂残留量的方法。样品经乙腈振荡提取后用自制的酸性氧化铝柱净化，采用梯度洗脱程序、BEH C₁₈ 色谱柱分离、MS/MS 正离子扫描测定。Turnipsed 等(1999)采用 HPLC-APCI-MS 方法确证食品中的 AVMs 残留，样品经乙腈提取、C₁₈ 柱和 Envi-carb 柱净化后测定，药物可确证的最低限量为 40 μg/kg。Luca Gianell 等(2000)以电子轰击离子化(EI)/MS 方法检测了 IVM 残留。Yoshii 等(2000)建立了 HPLC/MS 方法检测谷物中的 IVM 和 AVM 残留，检测限达 0.1-0.3 μg/kg。Howells and Saner(2001)用 H³ 标记的多拉菌素做内标，以大气压化学电离(APCI)-离子阱-MS/MS 方法测定了 AVM、IVM、EP、DOR 和莫西菌素(Moxidectin, MOX)的残留，药物经冷冻沉淀杂质，用 C₈ 柱净化后测定。定量限依次为 3.1、3.2、2.2、4.0 和 3.2 μg/kg。这些文献报道的方法表明，建立饲料中阿维菌素类药物的液相色谱—质谱确证方法是切实可行的。

本项目在原标准方法和参考文献的基础上进行优化和改进，采用有机溶剂提取饲料中的药物，经正己烷液液分配除脂和萃取步骤除去部分杂质，再经 HLB 固相萃取小柱进一步净化后分析，建立了饲料中大环内酯类驱虫药物的 LC-MS/MS 检测方法，可用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料及精料补充料中 AVM、IVM、DOR、MOX、MLB 和 EP 单个药物或多个药物含量的检测。

3. 主要工作过程

本标准主要起草单位为中国农业大学，本方法研制过程受疫情影响严重，方法研制的主要工作过程如下：

2018 年 9 月 成立标准编制小组，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案。

2018 年 9 月 查询和收集了国内外相关标准和文献资料，制定了初步的实验方案。

2018 年 10 月-2019 年 7 月 方法建立和条件优化及检测方法技术参数的确定。

2019 年 7 月-2019 年 11 月 形成方法的标准曲线、灵敏度、准确度和精密度检验数据。

2019 年 12 月 形成标准初稿，同时进行标准征求意见。

2020 年 3 月-2020 年 4 月 增加 4 种典型饲料样品，更换实验人员，实验室内部复核方法。

2020 年 9 月-2020 年 11 月 完成农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心(北京)的标准复核实验。

2020 年 3 月-2021 年 5 月 完成农业农村部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)的标准复核实验。

2021 年 7 月 完成四川威尔检测技术股份有限公司的标准复核实验。

2022 年 6 月 扩大范围继续定向征求意见。

2022 年 6 月 30 日 根据专家们返回的意见进行修改，形成标准预审稿。

2022 年 7 月 14 日 标准预审查会议。

2022 年 10 月 25 日 根据预审查会议进行修改，形成了标准公开征求意见稿。

二、标准编制原则、主要技术内容及确定依据

1. 标准编制原则

1.1 执行标准

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：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》规定的要求进行编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

1.2 先进性

对本标准中有关内容的确定，主要借鉴参考本领域国内先进研究技术，以提高本标准中检测技术的准确性和可重复性。

1.3 可操作性

在标准制定过程中，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，广泛征求生产单位和使用单位的意见，使本标准便于实施。

1.4 通用性

本标准制定过程中收集不同种类的产品进行检测并归纳总结出适用范围和方法检出限。

2. 主要技术内容确定依据

本标准的适用范围为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料等常用畜禽饲料。

本标准使用各项液相色谱-串联质谱仪进行检测方法开发。使用仪器型号为普及率较高的美国 Waters 公司的超高效液相色谱-串联四极杆质谱仪、Agilent 公司的超高效液相色谱-串联质谱仪。

本标准方法学考察包括检测限（LOD）和定量限（LOQ）。其中 LOD 拟设定信噪比为 3 时的样品添加浓度，LOQ 拟设定为信噪比为 10 时且回收率结果和相对标准偏差符合要求的样品添加浓度。本标准设低、中、高 3 个添加浓度进行回收率测定，浓度分别为 2 倍方法定量限、5~20 倍定量限浓度和 50 倍~200 倍定量限浓度。定量限以上添加浓度的回收率范围应该在 80%~120%之间，结果的变异系数应在 20%以内。标准曲线则使用经空白饲料样品溶液稀释标准储备溶液得到的系列标准工作溶液，设置 5 个点以上进行测定。

3. 本方法与原标准方法的主要技术区别

本标准方法的研制在原标准方法的基础上优化改进而成，与原农业部 1486 号公告-5-2010 相比，除编辑性修改外，主要技术变化见表 2。

表 2 本标准方法与原标准方法的区别

		原标准方法	新方法
样品前处理	饲料种类	不包括精料补充料	包括精料补充料
	药物种类	不包括莫西菌素和米尔贝菌素	包括莫西菌素和米尔贝菌素
	是否有正己烷 去脂和萃取	无	有
	固相萃取柱	C18	HLB
色谱条件	色谱柱	C18 柱, 150mm*2.1mm*3 μ m	C18 柱, 50mm*2.1mm*1.7 μ m
	流动相组成	乙腈-水-甲酸(70+30+0.1)	0.3%甲酸和甲醇
	洗脱方法	等度洗脱	梯度洗脱
	柱温	常温	40 ℃
质谱条件	检测方法	SIM 法	MRM 法

4. 测试条件的确定

(1) 质谱检测条件

采用原标准方法的正离子电喷雾电离模式，选择离子检测方定性和定量，离子源温度设置为 320℃。我们采用 320℃离子源温度及其它条件进行单一药物高浓度水平的标准溶液质谱全扫描，发现莫西克丁和米尔贝肟很难找到分子离子峰，经过调整离子源温度至 100 ℃后获得了丰度较高的分子离子峰。且在此离子源温度条件下，另四种药物的二级质谱离子获得了较高响应值的目标子离子。因此，将方法的离子源温度调整为 100 ℃。

采用子离子扫描方法对 6 种药物的标准溶液进一步扫描，结果见图 3-图 8。经过改变锥孔电压和碰撞能进一步优化条件，获得各药物尽可能低的母离子峰和尽可能高的两个显著子离子峰作为 MRM 模式下的母离子和子离子对。综合文献报道的各化合物定性定量离子参考条件和本实验中子离子扫描的子离子情况进行选择，尽量采用文献报道的最常见子离子进行分析，在后期的实际样品检测中灵敏度高、选择性好，达到了良好的定性定量分析目的。

avs19062216 30 (3.018)

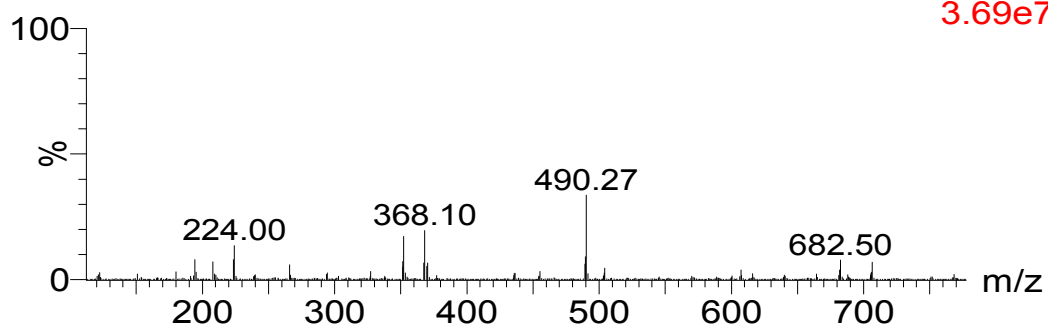
1: Daughters of 937ES+
3.69e7

图1 艾普利诺菌素离子扫描图

avs19062219 24 (3.353)

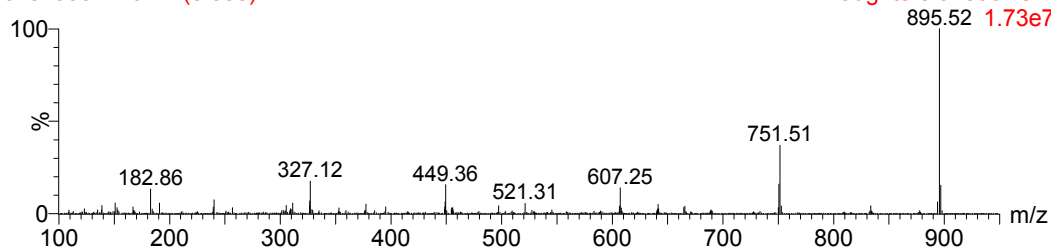
2: Daughters of 896ES+
1.73e7

图2 阿维菌素离子扫描图

avs19062212 21 (4.095)

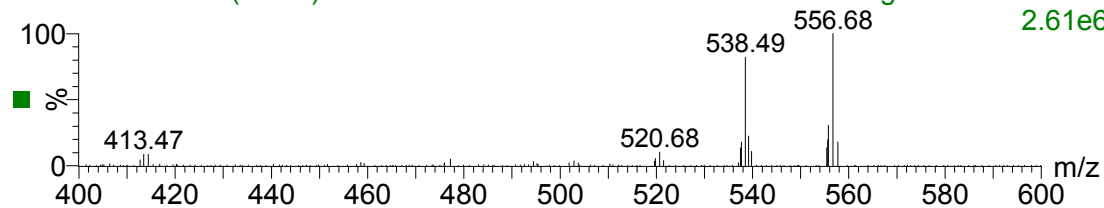
8: Daughters of 557ES+
2.61e6

图3 米尔贝菌素离子扫描图

avs19062219 21 (3.742)

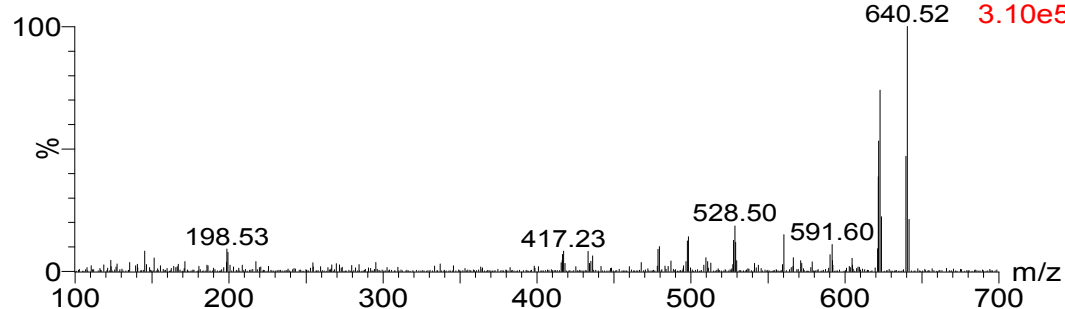
6: Daughters of 641ES+
3.10e5

图4 莫西菌素离子扫描图

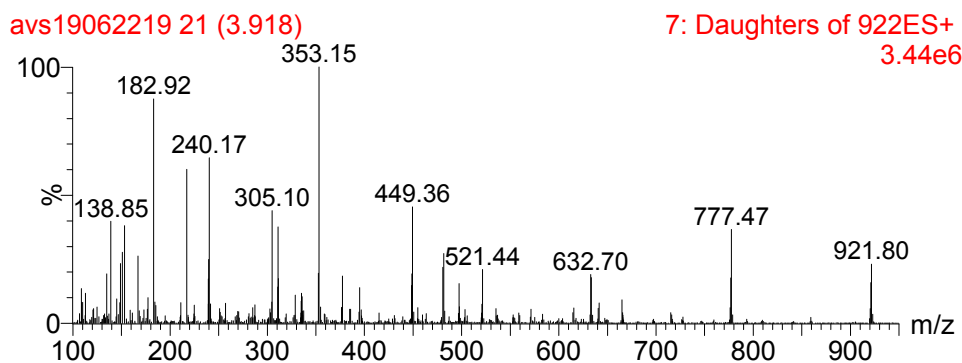


图5 多拉菌素离子扫描图

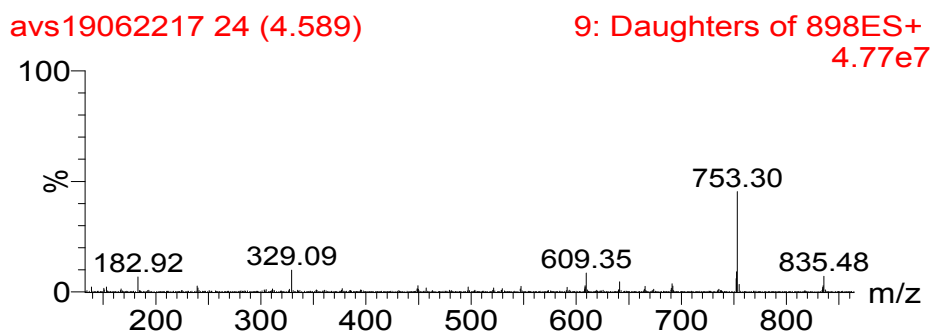


图6 伊维菌素离子扫描图

(2) 色谱柱通用性考察

配制一组标准溶液，采用 6 根超高效液相色谱柱进行检测，记录保留时间的变化。结果表明，各色谱柱条件下，6 种化合物均能通过选择不同的离子通道得到良好的分离，峰形较佳。

表3 供试色谱柱型号

	型号	序列号
1.	ACQUITY UPLC@ BEH Shield RP18, 1.7um, 2.1*50 mm	Part No. 186002853 Serial No. 014632263156 25
2.	ACQUITY UPLC@ BEH Shield RP18, 1.7um, 2.1*50 mm	Part No. 186002853 Serial No. 013230149154 37
3.	ACQUITY UPLC@ BEH Shield RP18, 1.7um, 2.1*50 mm	Part No. 186002350 Serial No. 023434051157 07
4.	CORTECS@UPLC@Shield RP18 1.6, 2.1*50 mm	P/N: 186008692 S/N: 01013622315708
5.	Athena UHPLC C18 Column, 4.6 *50 mm, 1.8 um	CNW 8.4605UA.0001 ANPEL P/N: LAEQ-4605UA LOT: UAD2701
6.	Athena UHPLC C18 Column, 120A, 4.6 *100 mm, 1.8 um	CNW 8.2110UA.0001 ANPEL P/N: LAEQ-2110UA LOT: UA71601

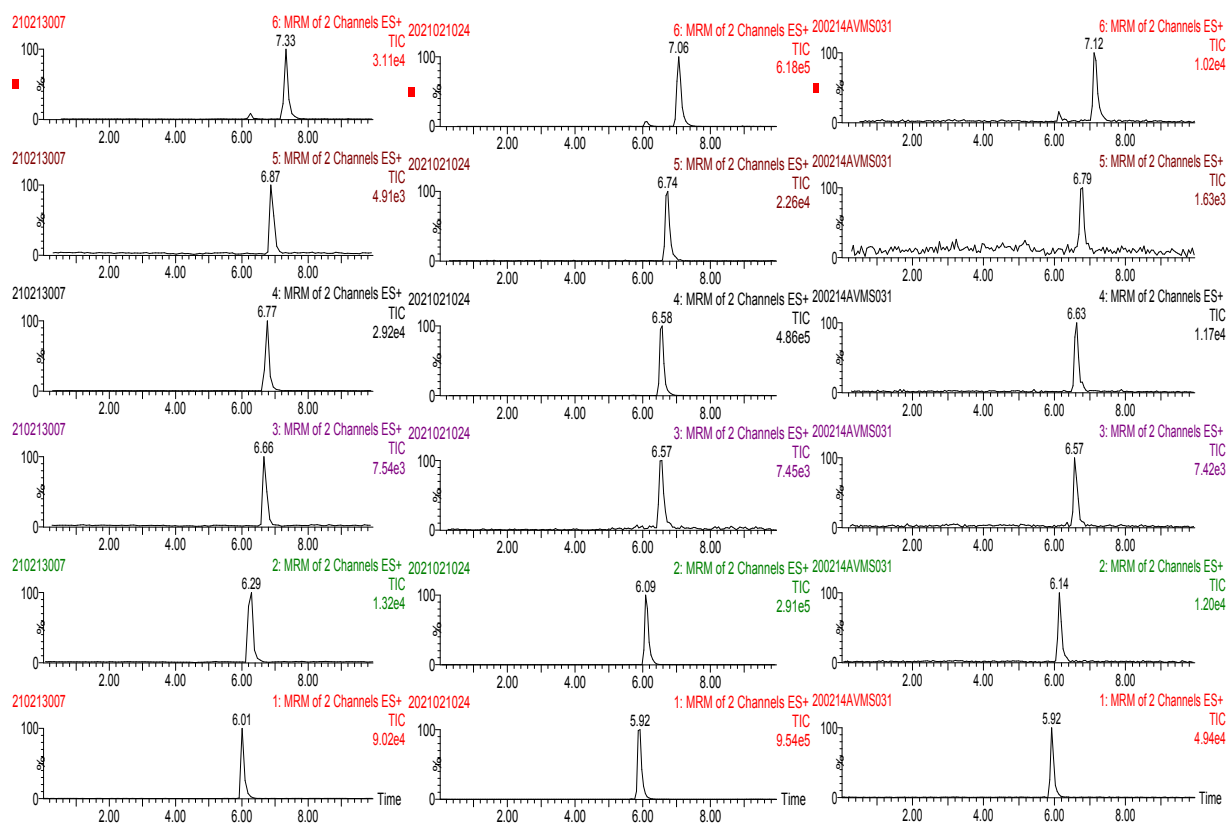


图 2 ACQUITY UPLC@ BEH Shield RP18, 1.7μm, 2.1*50 mm 对 6 种阿维菌素类药物检测的离子色谱图
(左, Serial No. 014632263156 25; 中, Serial No. 013230149154 37; 右, Serial No. 023434051157 07)

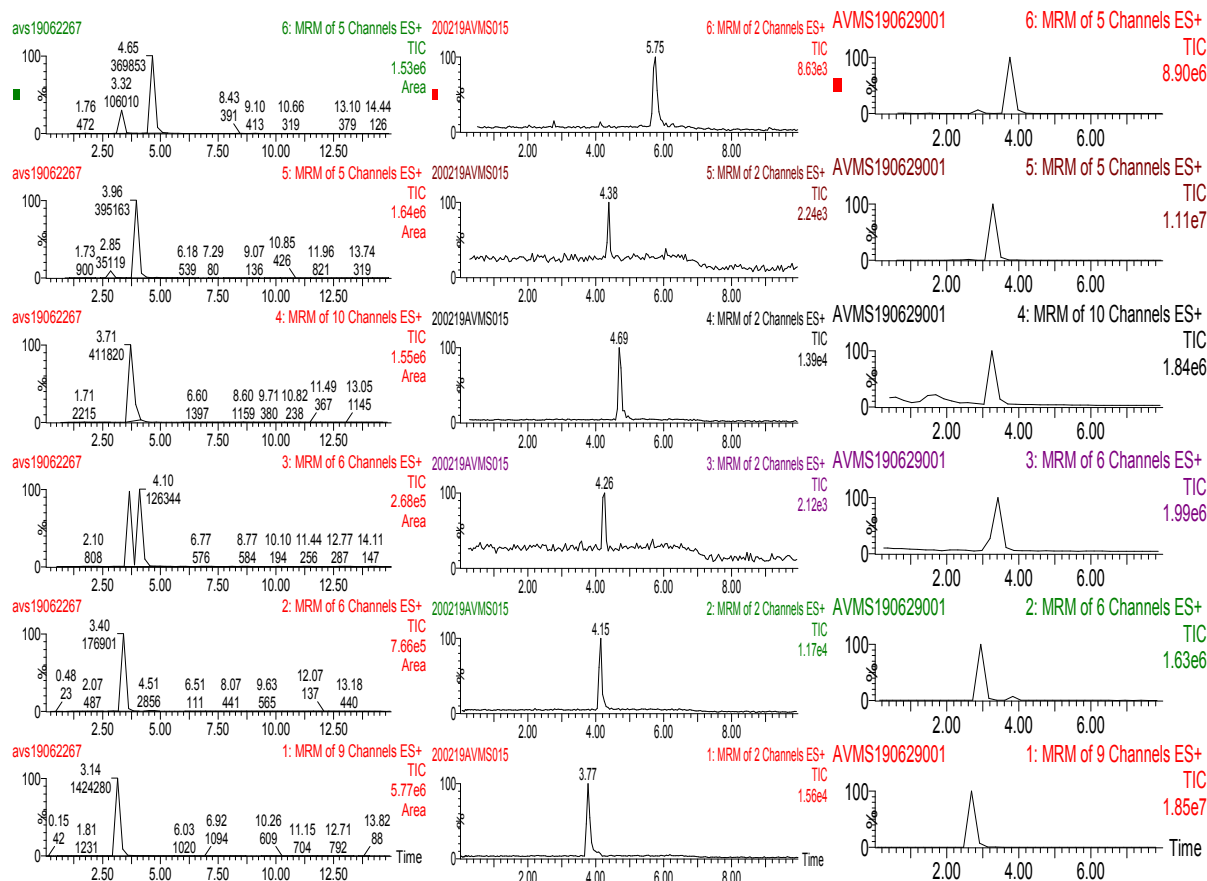


图 2 两种色谱柱对 6 种阿维菌素类药物检测的离子色谱图

（左，CORTECS@UPLC@Shield RP18 1.6, 2.1*50 mm；中，Athena UHPLC C18 Column, 4.6 *50 mm, 1.8 um；右：Athena UHPLC C18 Column, 120A, 4.6 *100 mm, 1.8 um）

（3） 样品提取和净化

3.1 样品提取条件选择

本方法参考了原标准方法的乙腈提取和 C₁₈ 柱净化的样品前处理条件，以此为基础设计了乙腈提取-HLB 柱净化和甲醇提取-HLB 柱净化两种处理条件，分别称取 2 g 饲料样品进行样品前处理和净化，每个样品用 10 mL 溶液提取两次。同时设空白处理和添加回收处理，每个处理 3 个重复，添加浓度为 1000 μg/kg。两种处理方法的实验结果见图 8 以及表 4，由这些图表可知，二者提取结合 HLB 柱净化处理的结果区别不大，都能符合对六种药物的检测要求，但除阿维菌素外，其它药物用乙腈提取-HLB 柱净化的回收率结果略好。原因可能是乙腈提取的杂质干扰更少的缘故。因此选择乙腈作为提取饲料中药物的提取液。

表 4 预混饲料样品中两种样品提取方法的回收率原始数据

		EPR	AVM	MLB	MOX	DOR	IVM
甲醇	T1	67.88	85.40	78.81	66.95	79.79	91.96
	T2	84.74	105.12	85.56	73.50	74.04	67.78
	T3	90.67	96.16	74.79	79.70	79.61	78.19
乙腈	T1	103.13	79.10	87.92	92.60	107.51	73.29
	T2	80.86	80.59	76.18	85.12	95.74	88.26
	T3	104.62	89.42	91.74	107.10	117.02	72.98

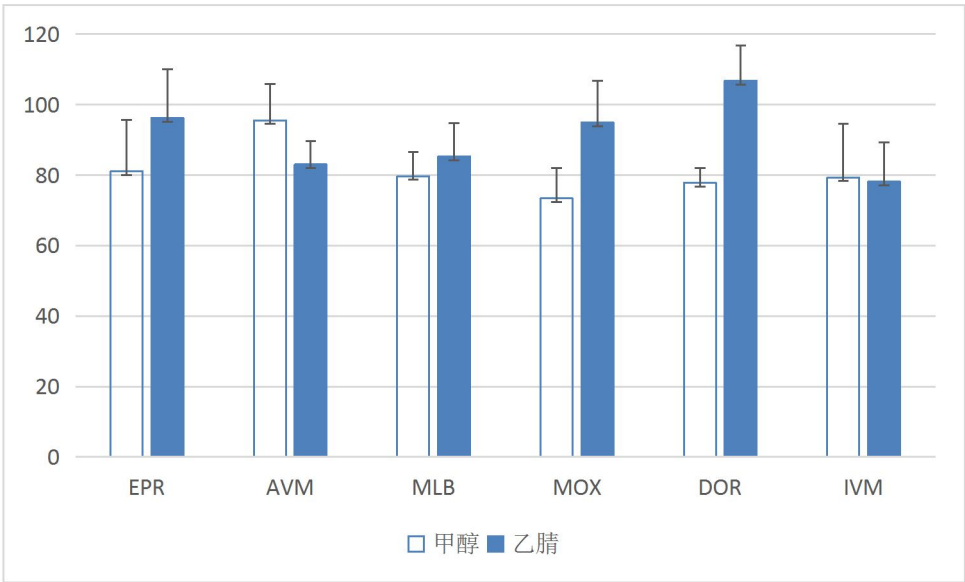


图 7 甲醇和乙腈提取预混饲料中大环内酯类驱虫药的平均回收率和相对标准偏差比较

3.2 样品提取温度的优化

考虑到采用乙腈提取时伊维菌素、米尔贝菌素和阿维菌素的平均提取效率在 80%上下，仍可继续提高，而采用相同的提取液时通过提高提取温度有可能会增加这些药物的提取效果。而且文献报

道的大环内酯类药物提取液氮气吹干温度多设置于 65 ℃，表明此 6 种大环内酯类药物在稍高的温度下性质仍比较稳定。因此，采用乙腈作为提取剂，将恒温振荡器分别采取不设置温度（即常温 25 ℃左右）和设置 40 ℃两种条件进行样品提取。两种提取方式获得的提取液经 HLB 小柱净化后上机检测。每个样品用 10 mL 溶液提取 2 次。每个处理 3 个重复，添加浓度为 1000 μg/kg。两种处理方法的实验结果见表 5，由表可知，40 ℃提取结合 HLB 柱净化处理的回收率结果优于常温提取的结果，除多拉菌素外，另 5 种目标药物的回收率均有所提高。因此确定采用 40 ℃振荡提取的方法。

表 5 不同温度条件提取预混饲料样品中 6 种目标药物的回收率（%）原始数据

处理方法	重复数	EPR	AVM	MLB	MOX	DOR	IVM
常温	T1	92.07	75.56	74.65	88.78	100.01	73.29
	T2	100.64	79.32	71.73	81.29	93.28	88.26
	T3	86.11	83.9	78.49	90.83	99.42	72.98
	平均值	92.94	79.59	74.96	86.97	97.57	78.18
40℃	T1	99.28	90.81	102.44	92.7	99.68	97.29
	T2	94.76	91.76	89.38	94.82	94.52	103.52
	T3	93.53	93.57	94.65	93.66	98.05	99.47
	平均值	95.86	92.05	95.49	93.73	97.42	100.09

3.3 HLB 小柱净化条件的优化

确定采用乙腈 40 ℃提取后，进一步对 HLB 小柱的净化条件进行优化。

保持淋洗条件不变，分别采用乙腈、甲醇和乙酸乙酯 5 mL 进行药物洗脱处理，结果表明，乙酸乙酯的洗脱能力最强，回收率最高，但样品检测过程中的基质干扰和杂峰干扰明显，而乙腈和甲醇洗脱无明显区别，因此，最后采用甲醇洗脱样品，为了充分将药物洗脱下来，采取 6 mL 甲醇洗脱药物。

确定以甲醇为洗脱液后，对淋洗条件进行优化，分别采用纯水、0.1%甲酸、5%甲醇、10%甲醇、15%甲醇和 20%甲醇淋洗 HLB 小柱，结果表明，20%甲醇淋洗的药物平均回收率在 50%-90%之间，个别药物的回收率损失严重，而 15%及低于 15%有机相含量的溶液淋洗后各药物的回收率都在 95%以上，符合痕量分析的要求。

为了保证回收率的前提下达到最好的淋洗效果，本方法继续验证了同时采用 17%甲醇-17%乙腈；18%甲醇-18%乙腈作为淋洗液对饲料中药物回收率和杂质干扰的影响进行研究。两种处理方法的具体操作结果见图 10-图 11 以及表 6-表 7。由表 5 和图 10 可知，在进行 HLB 小柱淋洗时这四种淋洗液对各药物的回收率均无太大影响，但 18%淋洗液组合时伊维菌素的平均回收率有较显著增加。这可能是因为后者淋洗更完全，杂质去除效果更好，造成色谱响应的表现更佳。由表 7 和图 11 可知，18%淋洗液处理的色谱图基质效应低于 17%的淋洗液，样品净化效果更佳。为了达到充分去除杂质的目的，确定采用 18%甲醇-18%乙腈依次淋洗 HLB 小柱。

表 6 预混饲料样品中 HLB 不同淋洗条件的回收率

淋洗液		EPR	AVM	MOX	DOR	MLB	IVM
-----	--	-----	-----	-----	-----	-----	-----

17%甲醇 -17%乙 腈	T1	109.03	79.54	103.44	100.14	89.97	71.03
	T2	78.54	81.04	95.09	89.17	77.96	85.54
	T3	101.62	89.92	110.64	109	93.88	70.73
18%甲醇 -18%乙 腈	T1	83.76	86.7	84.78	96.19	89.42	89.57
	T2	97.38	93.11	88.69	88.85	87	94.03
	T3	102.53	103.63	97.59	102.72	100.72	98.76

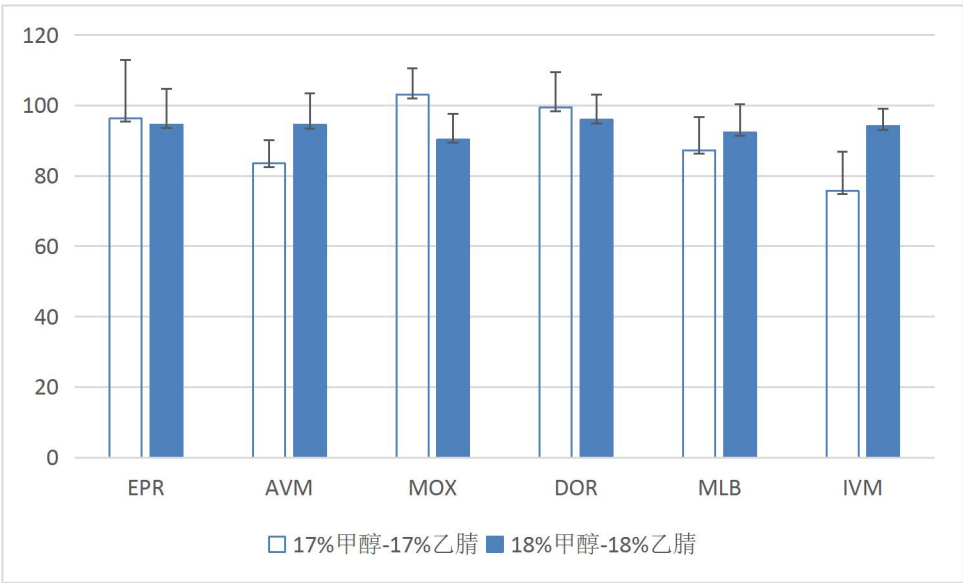


图 8 预混饲料中 HLB 不同淋洗条件的平均回收率及相对标准偏差

表 7 预混饲料中 HLB 不同淋洗条件的基质影响率（实际抑制率）

		EPR	AVM	MOX	DOR	MLB	IVM
17%甲醇 -17%乙 腈	JZt1	64.13	44.94	47.73	59.42	19.64	48.69
	JZt2	62.02	45.55	46.75	53.45	23.31	45.43
18%甲醇 -18%乙 腈	JZt1	47.96	45.47	37.99	40.89	20.82	42.58
	JZt2	44.62	40.61	35.39	40.21	19.16	35.14

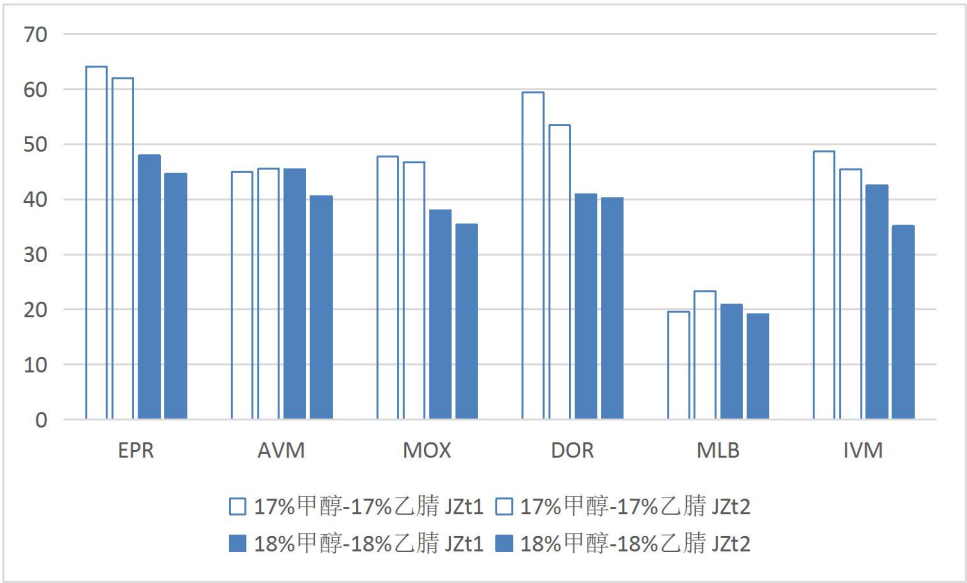


图 9 预混饲料样品中 HLB 不同淋洗条件的基质影响率（实际抑制率）

3.4 样品的进一步净化

采用以上确定的样品前处理方法和仪器检测方法进行多种样品分析的过程中，个别种类的配合饲料色谱图中阿维菌素和莫西菌素色谱峰受干扰明显，定量限添加回收样品的药物峰无法正常积分。另外，个别种类的浓缩饲料样品出现艾普利诺菌素回收率过低的现象。因此，针对配合饲料和浓缩饲料样品，我们增加了正己烷萃取的步骤，配合饲料中两种药物分析干扰的问题得到顺利解决，浓缩饲料样品中各种药物均达到较好的回收。增加正己烷萃取步骤和原方法的实验结果比较见表 8-9 和图 10-11。由表 7 的原始数据和图 12 的平均回收率和标准偏差结果可知，正己烷萃取后样品得到了更好的净化效果。

表 8 正己烷萃取对配合饲料回收率的影响

是否增加萃取步骤		EPR	AVM	DOR	MLB	MOX	IVM
是	T1	98.7	98.06	95.43	109.6	90.66	92.5
	T2	96.68	94.34	96.82	94.97	84.06	95.35
	T3	98.09	97.92	94.36	99.23	101.62	92.3
否	T1	84.37	-	115.89	115.86	-	101.71
	T2	86.94	-	90.79	93.44	-	117.22
	T3	84.8	-	98.3	111.43	-	90.78

表 9 正己烷萃取对配合饲料回收率的影响

是否增加萃取步骤		EPR	AVM	DOR	MLB	MOX	IVM
是	T1	69.33	90.59	69.63	58.43	98.87	60.23
	T2	52.64	79.98	67.62	45.03	83.85	56.08
	T3	111.12	104.68	103.98	69.74	102.13	108.07
否	T1	39.53	70.32	120.07	127.13	133.78	80.78

	T2	21.76	76.98	104.21	80.89	92.65	84.36
	T3	22.23	80.40	83.30	88.28	82.90	92.40

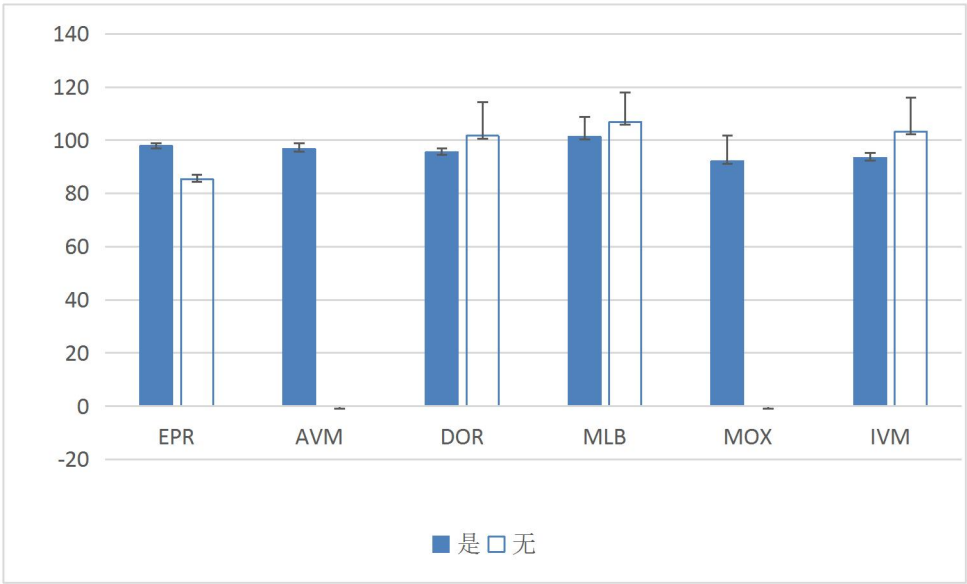


图 10 配合饲料样品正己烷萃取与否对回收率的影响

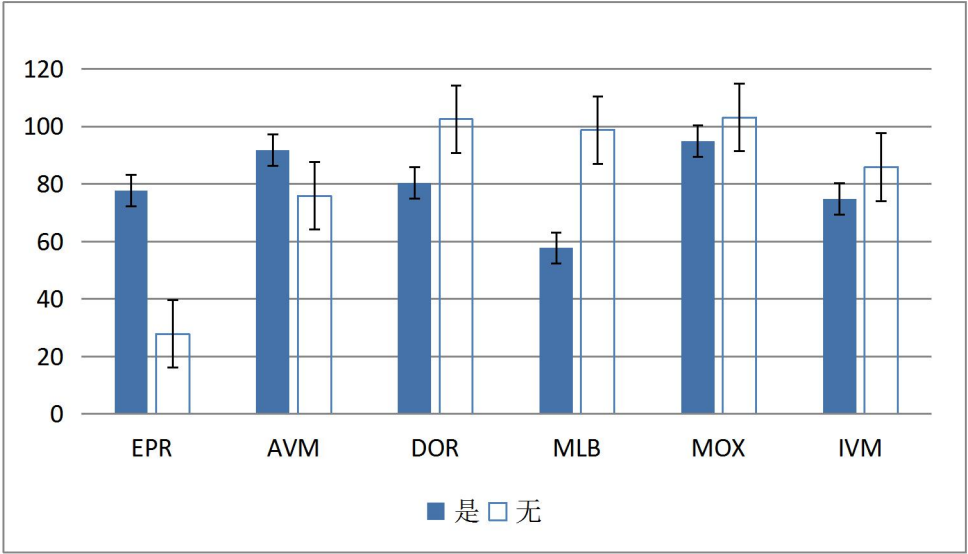


图 11 浓缩饲料样品正己烷萃取与否对回收率的影响

(4) 饲料样品的基质干扰考察

采用确定的前处理方法和检测方法，对配合饲料和预混合饲料的基质干扰情况进行考察。分别采用空白样品溶液和 90%甲醇溶解配制相同浓度的标准溶液进样分析，结果见下表 10-11。由表可知，两种饲料样品基质对检测均有一定的影响。因此确定采用基质加标的计算方法来分析实验结果。

表 10 配合饲料跟浓缩饲料基质添加标准溶液和 90%甲醇溶解标准溶液的峰面积比较

饲料类型		EPR	AVM	MOX	DOR	MLB	IVM
------	--	-----	-----	-----	-----	-----	-----

配合饲料	基质添加标准样品	3211	1706	4680	6118	3052	25236
	普通标准样品	44795	9720	3974	18948	3890	50421
预混合饲料	基质添加标准样品	25569	6978	2478	14766	2715	41007
	普通标准样品	64128	11745	1599	29895	3378	78674

表 11 基于配合饲料跟浓缩饲料基质添加标准溶液和 90%甲醇溶解标准溶液的基质影响比较

计算方法：|（基质添加峰面积-普通标样峰面积）/普通标样峰面积|

饲料类型	EPR	AVM	MOX	DOR	MLB	IVM
配合饲料	92.83%	82.45%	17.76%	67.71%	21.54%	55.27%
预混合饲料	52.76%	40.59%	31.15%	25.78%	19.63%	47.88%

（4）关于标准品有效期的说明

各种储备液和标准工作液的有效期均参照原标准方法设置。

5. 检测方法技术参数的复核

（1）标准曲线的制备

将八个标准工作液 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 依次从低浓度到高浓度进样，每一浓度进样三针，按其所得定量离子峰面积的平均值(Volts)与对应的标准溶液浓度($\mu\text{g/L}$)作标准曲线，并计算标准曲线的回归方程及相关系数。测得 6 种阿维菌素类药物在浓度 10~5000 $\mu\text{g/L}$ 范围内色谱峰面积与浓度呈线性相关，其线性响应数据见表 12-13，线性方程见图 3。分析实际样品时，若分析物的终浓度不在这个线性范围时，则将分析物稀释或浓缩。

表 12 标准溶液峰面积值

药物浓度	EPR	AVM	MLB	MOX	DOR	IVM
10	140184	14043	13234	123738	28630	100995
20	186853	16590	15455	161403	56057	129437
50	485932	46105	35065	302353	99415	316989
100	855252	80154	62426	543510	175765	594028
200	1799029	172376	124289	801070	355130	987016
500	3071726	382532	193361	1089669	808656	1894321
1000	5815465	606129	331196	2033061	1349093	3034107

2000	9871778	1224546	595101	3899080	2460472	5467280
------	---------	---------	--------	---------	---------	---------

表 13 标准曲线方程及线性回归系数

药物	标准曲线方程	R ²
EPR	$y = 4907.6x + 398084$	0.9902
AVM	$y = 601.73x + 25968$	0.9958
MLB	$y = 288.45x + 31365$	0.9899
MOX	$y = 1832x + 230725$	0.9922
DOR	$y = 1222.6x + 73695$	0.9943
IVM	$y = 2665.1x + 272946$	0.9905

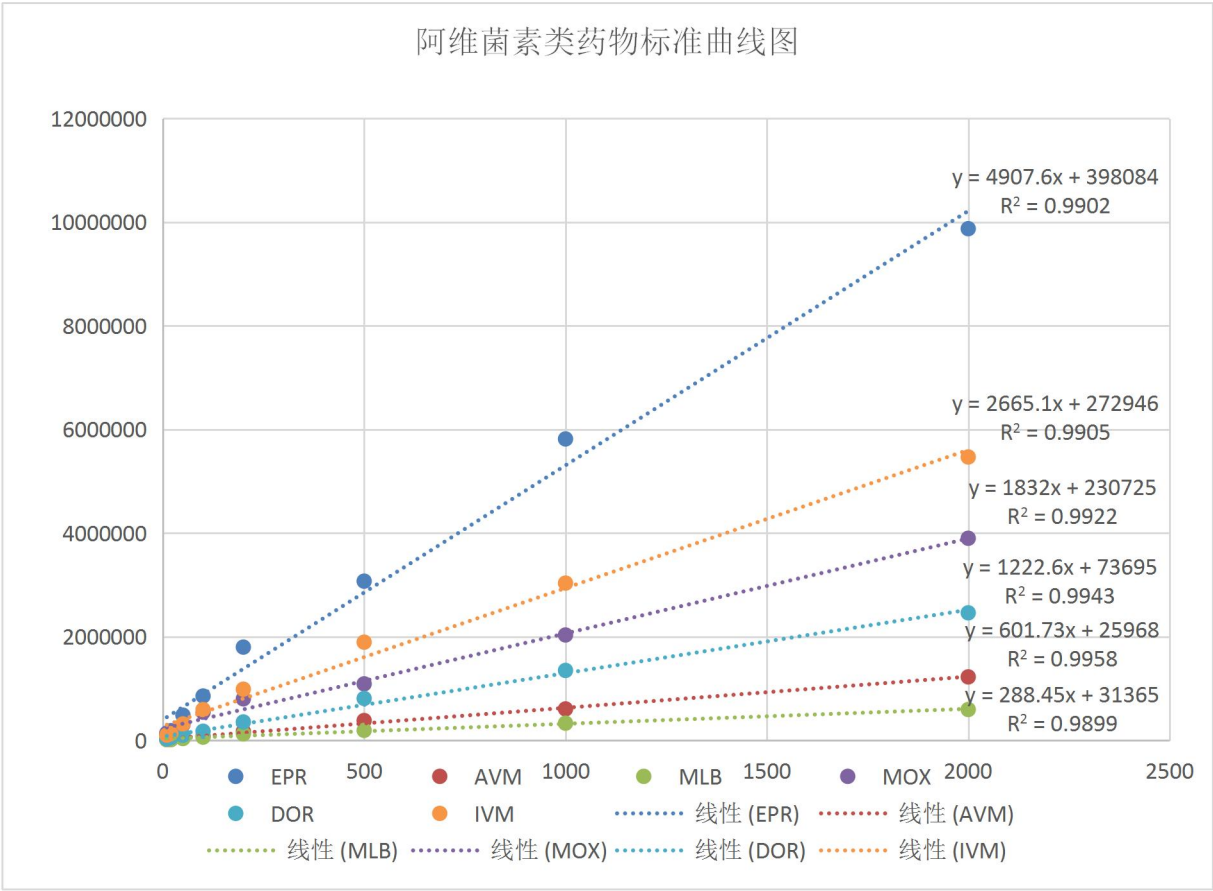


图 11 阿维菌素类驱虫药标准曲线图

(2) 方法的灵敏度

方法的检测限(LOD)和定量限(LOQ)是痕量分析方法的主要技术指标。称取 10 个空白饲料样品，按标准的前处理方法进行提取与净化，同时设 10μg/L 三个基质添加标准工作液作对照，对空白样品和基质标准工作液进行测定。分别计算 6 种药物色谱保留时间处的信噪比，以空白样品 3 倍信噪比计算检测限。每个药物的 LOD 值取 4 个平行测定样品的平均值。结果见表 14，阿维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素和伊维菌素的检出限范围为 4.61-9.03，因此确定该四种药物的检出限为 10μg/kg。莫西菌素和米尔倍菌素的检出限分别为 21.14μg/kg 和 23.32μg/kg，因此确定该两种药物的

检出限为 25 $\mu\text{g/kg}$ 。

取空白配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料，分别添加适量的标准溶液，使饲料中药物浓度为 25 $\mu\text{g/kg}$ 和 50 $\mu\text{g/kg}$ ，每个处理 3-5 个平行。添加样品经涡动，混匀，静置 15 min 以后按样品提取和净化过程进行处理，进 LC/MS/MS 测定。结果表明：三种不同类别的饲料平均回收率在 68.74~105.29 %之间（见表 15-16），符合化合物痕量分析的准确度要求。变异系数在 0.81~12.54%之间，符合化合物痕量分析的精密度的要求。因此通过实际添加的方法确认 25 $\mu\text{g/kg}$ 为阿维菌素、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素和伊维菌素的定量限，50 $\mu\text{g/kg}$ 为莫西菌素和米尔倍菌素的定量限。

表 14 猪配合饲料阿维菌素类药物 LOD 测定

药物名称	LOD(单位: $\mu\text{g/kg}$)				LOD 平均值 (单位: $\mu\text{g/kg}$)	LOD 相对标准偏差(%)
	1	2	3	4		
EPR	5.56	5.92	4.83	4.61	5.23	11.73
AVM	7.77	9.05	9.96	8.33	8.78	10.78
MLB	22.86	24.7	24.78	23.32	23.92	4.06
MOX	23.59	17.72	19.33	21.14	20.45	12.32
DOR	8.05	7.91	6.87	9.03	7.97	11.10
IVM	5.8	6.64	7.46	5.88	6.45	12.03

表 15 阿维菌素类药物 25 $\mu\text{g/kg}$ (LOQ 值) 空白添加实验结果(n=5)

饲料	药物名称	平均回收率(%)	变异系数 (%)
配合饲料	EPR	84.33	5.04
	AVM	80.76	7.45
	MLB	-	-
	MOX	-	-
	DOR	82.92	6.17
	IVM	90.66	3.48
浓缩饲料	EPR	88.72	5.49
	AVM	83.74	6.36
	MLB	-	-
	MOX	-	-
	DOR	81.17	3.75
	IVM	88.20	4.68
预混合饲料	EPR	85.55	5.82
	AVM	81.74	10.67
	MLB	-	-
	MOX	-	-

精料补充料	DOR	80.26	4.79
	IVM	98.27	5.95
	EPR	87.98	4.60
	AVM	86.16	7.11
	MLB	-	-
	MOX	-	-
	DOR	85.44	3.42
	IVM	92.82	6.35

表 16 阿维菌素类药物 50 µg/kg (LOQ 值) 空白添加实验结果(n=5)

饲料	药物名称	回收率(%)			平均回收率(%)	变异系数(%)
		1	2	3		
配合饲料	EPR	94.53	90.18	102.07	95.59	6.29
	AVM	87.11	92.85	78.49	86.15	8.39
	MLB	89.67	88.73	95.04	91.15	3.73
	MOX	86.05	102.38	100.92	96.45	9.37
	DOR	94.45	110.26	112.51	105.74	9.31
	IVM	95.86	105.29	104.34	101.83	5.10
浓缩饲料	EPR	68.74	78.55	79.18	75.49	7.75
	AVM	72.35	84.22	86.41	80.99	9.34
	MLB	75.36	90.75	83.60	83.24	9.25
	MOX	77.28	87.61	82.96	82.62	6.26
	DOR	65.83	83.94	80.56	76.78	12.54
	IVM	73.56	81.45	79.88	78.30	5.33
预混合饲料	EPR	88.35	85.46	87.90	87.24	1.78
	AVM	86.75	83.78	72.05	80.86	9.61
	MLB	80.24	79.66	78.95	79.62	0.81
	MOX	72.87	77.49	80.12	76.83	4.78
	DOR	85.81	80.36	83.68	83.28	3.30
	IVM	87.43	85.29	89.75	87.49	2.55
精料补充料	EPR	101.38	99.65	97.43	99.49	1.99
	AVM	89.76	85.92	90.13	88.60	2.63
	MLB	87.15	88.92	80.60	85.56	5.12
	MOX	78.55	81.09	74.38	78.01	4.34
	DOR	97.62	95.48	93.44	95.51	2.19
	IVM	96.27	91.84	90.36	92.82	3.31

(3) 检测方法的准确度和精密度

为考察方法的准确度和精密度，进行了添加回收试验。根据几类饲料中可能的药物添加含量高，配合饲料，即配合饲料和维生素料设 0.05、0.5 和 5.0 $\mu\text{g/g}$ 三个添加水平。浓缩饲料和牛精料设 0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{g/g}$ 共 3 个药物添加水平。预混合饲料设 0.5、5 和 50 $\mu\text{g/g}$ 三个添加水平。每个添加水平 5 个平行样品，并分别设空白对照，按样品前处理方法分别处理后液相色谱-串联质谱测定。根据各组织峰面积计算其浓度和回收率。添加回收试验结果见表 17 至表 22。由表可看出，在此三个药物添加水平上，几种不同类别的饲料平均回收率范围在 60 %~120 %之间，变异系数范围在 15% 以内，表明该方法符合饲料中药物分析的准确度和精密度要求。

表 17 饲料中爱普利诺添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
鸡配合饲料	0.05	91.27	2.09	2.43
	0.5	90.38	3.51	4.75
	5.0	93.19	3.32	4.70
鸡浓缩饲料	0.1	92.44	7.74	8.03
	1.0	90.06	1.98	3.94
	10.0	95.25	6.08	6.52
鸡预混合饲料	0.5	91.77	5.55	6.18
	5.0	95.26	4.70	5.35
	50.0	97.72	3.80	4.90
猪配合饲料	0.05	87.13	4.95	5.17
	0.5	82.75	4.67	4.85
	5.0	85.48	2.88	4.66
猪浓缩饲料	0.1	81.17	9.97	8.74
	1.0	83.76	4.85	11.76
	10.0	88.45	5.72	9.28
猪预混合饲料	0.5	98.07	10.14	10.59
	5.0	96.82	7.24	8.82
	50.0	95.44	5.08	6.75
维生素料	0.05	90.50	4.37	5.55
	0.5	91.73	6.42	7.12

	5.0	88.42	3.79	4.71
牛精料	0.1	85.78	7.90	10.76
	1.0	83.12	11.26	12.55
	10.0	81.94	9.97	10.87

表 18 饲料中阿维菌素添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度 (μg/g)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
鸡配合饲料	0.05	89.33	3.42	4.57
	0.5	87.36	4.18	5.90
	5.0	86.10	4.07	5.82
鸡浓缩饲料	0.1	91.52	8.46	9.26
	1.0	87.77	3.70	4.51
	10.0	90.45	7.85	7.95
鸡预混合饲料	0.5	89.08	7.17	8.62
	5.0	93.26	5.63	6.38
	50.0	95.36	4.85	6.07
猪配合饲料	0.05	85.37	5.76	8.42
	0.5	80.42	8.02	9.65
	5.0	83.55	3.94	5.74
猪浓缩饲料	0.1	82.73	10.11	11.66
	1.0	80.96	7.05	8.09
	10.0	85.77	7.29	8.75
猪预混合饲料	0.5	96.64	11.33	10.93
	5.0	95.28	5.82	7.80
	50.0	90.78	6.78	9.48
维生素料	0.05	87.72	5.46	6.75
	0.5	86.66	7.39	8.82
	5.0	84.53	4.74	5.46
牛精料	0.1	83.18	8.29	9.73
	1.0	80.07	10.78	11.16

	10.0	80.22	10.32	11.49
--	------	-------	-------	-------

表 19 饲料中米尔贝肟添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度 (μg/g)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
鸡配合饲料	0.05	92.72	5.48	6.68
	0.5	92.99	9.12	10.62
	5.0	95.58	7.06	8.37
鸡浓缩饲料	0.1	94.09	5.55	6.90
	1.0	95.51	8.17	9.54
	10.0	97.76	5.92	6.95
鸡预混合饲料	0.5	93.82	6.34	8.49
	5.0	97.89	7.11	8.82
	10.0	98.80	4.65	5.79
猪配合饲料	0.05	88.48	5.85	7.37
	0.5	85.72	5.90	7.80
	5.0	87.97	5.36	7.72
猪浓缩饲料	0.1	84.79	11.32	10.09
	1.0	85.65	5.76	6.66
	10.0	90.29	6.80	7.82
猪预混合饲料	0.5	97.02	11.27	12.52
	5.0	97.77	8.03	10.00
	50.0	96.64	6.22	8.43
维生素料	0.05	92.70	5.72	6.07
	0.5	90.84	7.94	8.86
	5.0	90.56	5.59	7.54
牛精料	0.1	89.63	8.06	7.98
	1.0	88.45	10.47	11.36
	10.0	83.74	10.12	13.38

表 20 饲料中莫西菌素回收率和变异系数

饲料	添加浓度 (μg/g)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
----	-------------	--------	------------	-----------

鸡配合饲料	0.05	84.52	3.76	4.76
	0.5	80.67	4.87	5.59
	5.0	83.99	5.98	6.80
鸡浓缩饲料	0.1	87.75	9.18	10.03
	1.0	85.08	3.75	5.59
	10.0	91.22	7.72	8.11
鸡预混合饲料	0.5	86.64	7.67	8.76
	5.0	90.90	6.08	7.95
	50.0	95.57	9.92	11.04
猪配合饲料	0.05	85.70	7.67	8.88
	0.5	84.49	7.76	8.92
	5.0	86.19	5.61	6.64
猪浓缩饲料	0.1	85.53	10.85	11.09
	1.0	84.74	6.76	7.80
	10.0	85.07	6.70	7.92
猪预混合饲料	0.5	91.82	11.55	10.61
	5.0	94.76	9.13	10.07
	50.0	93.80	6.60	7.53
维生素料	0.05	88.56	7.34	8.57
	0.5	87.79	7.89	8.86
	5.0	87.47	5.63	7.90
牛精料	0.1	82.80	8.22	9.49
	1.0	81.90	12.84	13.69
	10.0	80.93	11.48	12.25

表 21 饲料中多拉菌素添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度 (μg/g)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
鸡配合饲料	0.05	90.01	3.82	4.09
	0.5	90.42	4.75	6.74
	5.0	95.55	5.78	6.92

鸡浓缩饲料	0.1	90.18	9.07	10.38
	1.0	83.64	5.57	7.72
	10.0	91.16	9.82	10.52
鸡预混合饲料	0.5	89.35	5.46	7.28
	5.0	92.73	7.78	8.95
	50.0	95.00	9.12	10.41
猪配合饲料	0.05	83.96	8.33	9.90
	0.5	81.92	6.78	7.92
	5.0	83.27	5.29	6.67
猪浓缩饲料	0.1	80.18	8.16	9.76
	1.0	82.79	6.54	7.88
	10.0	95.55	6.87	9.04
猪预混合饲料	0.5	99.65	9.95	10.56
	5.0	97.38	8.61	9.90
	50.0	97.01	6.72	8.75
维生素料	0.05	90.22	9.14	10.37
	0.5	89.67	7.60	8.65
	5.0	85.45	6.85	7.74
牛精料	0.1	83.76	6.69	7.80
	1.0	82.39	10.75	11.13
	10.0	82.72	9.17	10.45

表 22 饲料中伊维菌素添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度 (μg/g)	回收率(%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数(%)
鸡配合饲料	0.05	89.90	6.57	7.09
	0.5	89.64	5.32	6.18
	5.0	91.45	5.56	6.65
鸡浓缩饲料	0.1	90.35	8.14	9.53
	1.0	89.56	5.42	6.92
	10.0	91.82	7.73	9.94

鸡预混合饲料	0.5	90.47	6.05	7.36
	5.0	93.25	5.47	7.77
	50.0	95.83	4.43	6.98
猪配合饲料	0.05	85.28	5.96	9.04
	0.5	81.14	5.61	7.82
	5.0	83.07	3.82	7.67
猪浓缩饲料	0.1	82.64	10.04	11.12
	1.0	81.19	7.76	7.85
	10.0	85.75	6.80	7.96
猪预混合饲料	0.5	95.55	11.17	10.99
	5.0	93.42	8.62	9.92
	50.0	94.74	6.87	7.08
维生素料	0.05	87.05	6.65	7.85
	0.5	89.67	7.48	9.74
	5.0	86.83	6.70	9.97
牛精料	0.1	83.48	8.23	9.43
	1.0	80.92	10.96	11.16
	10.0	80.78	10.51	11.82

(4) 色谱图

为了清晰地观察和分析杂质对药物的干扰情况，取 250 µg/kg 饲料添加样品色谱图与空白基质添加标准溶液色谱图进行比较，如下图所示。结果表明，在乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、米尔贝肟、莫西菌素、多拉菌素和伊维菌素出峰位置，配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和牛精料回收率均达到要求。

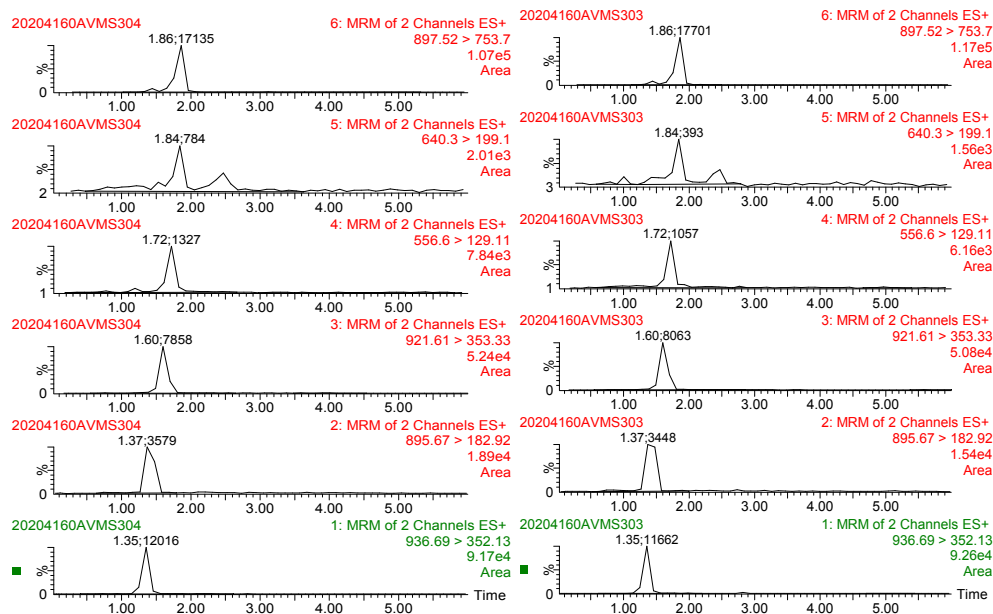


图12 鸡配合饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 $\mu\text{g/kg}$ 饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

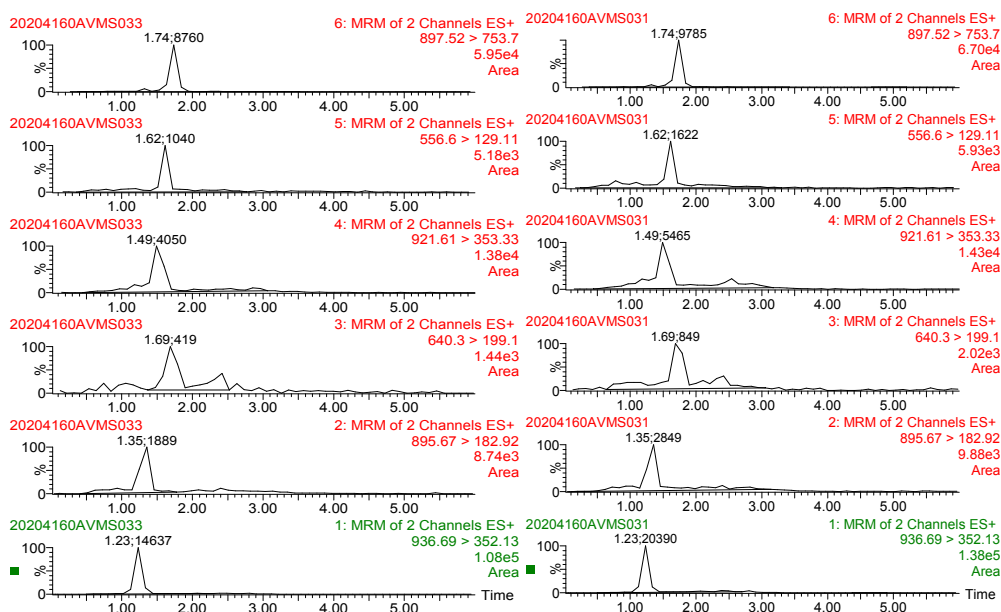


图13 鸡浓缩饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 $\mu\text{g/kg}$ 饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

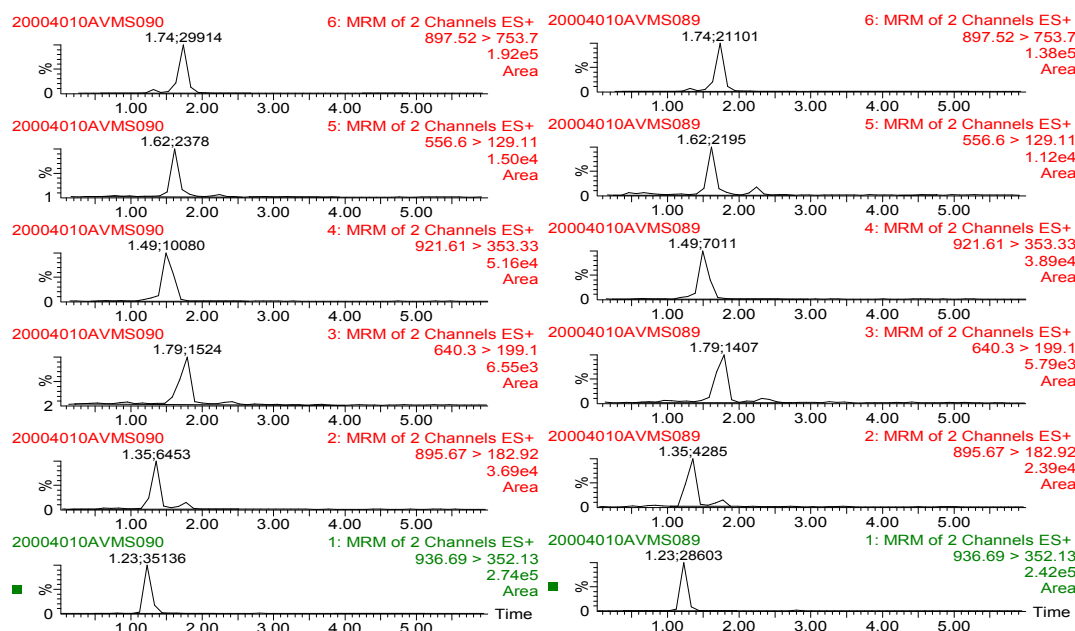


图14 鸡预混合饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 µg/kg饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

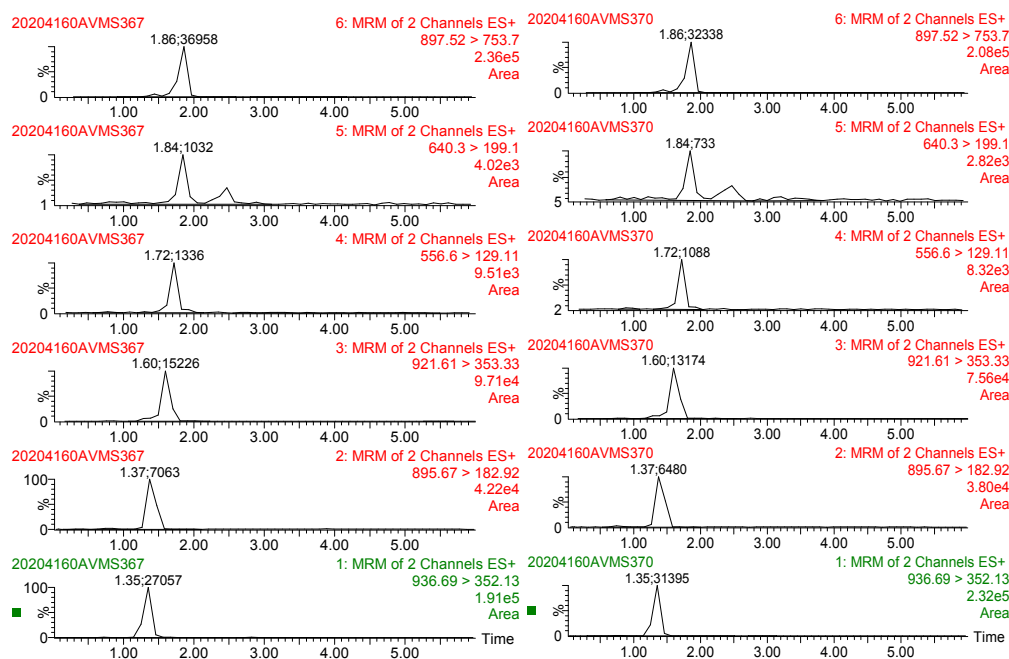


图15 猪预混饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 µg/kg饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

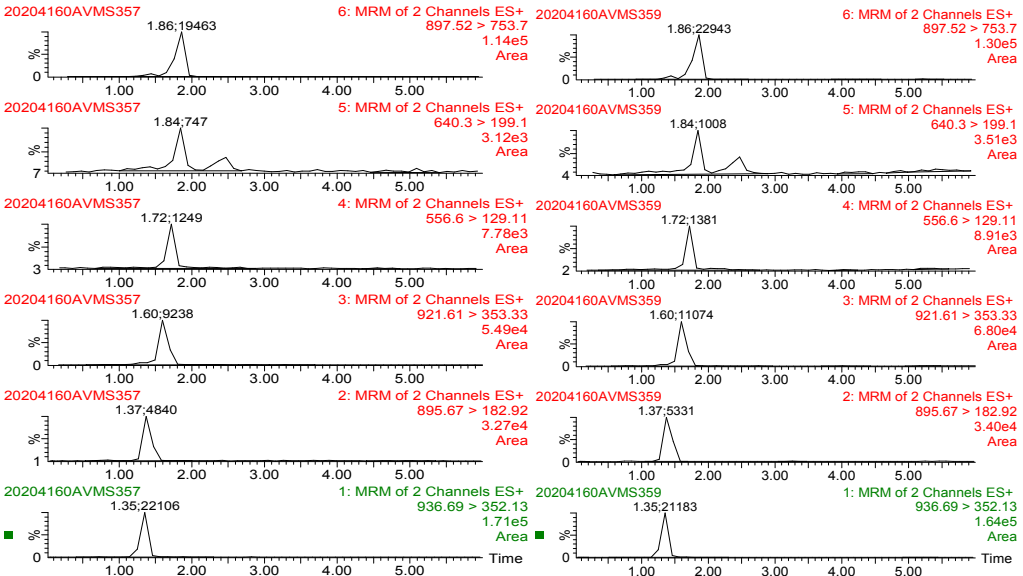


图16 猪浓缩饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 $\mu\text{g/kg}$ 饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

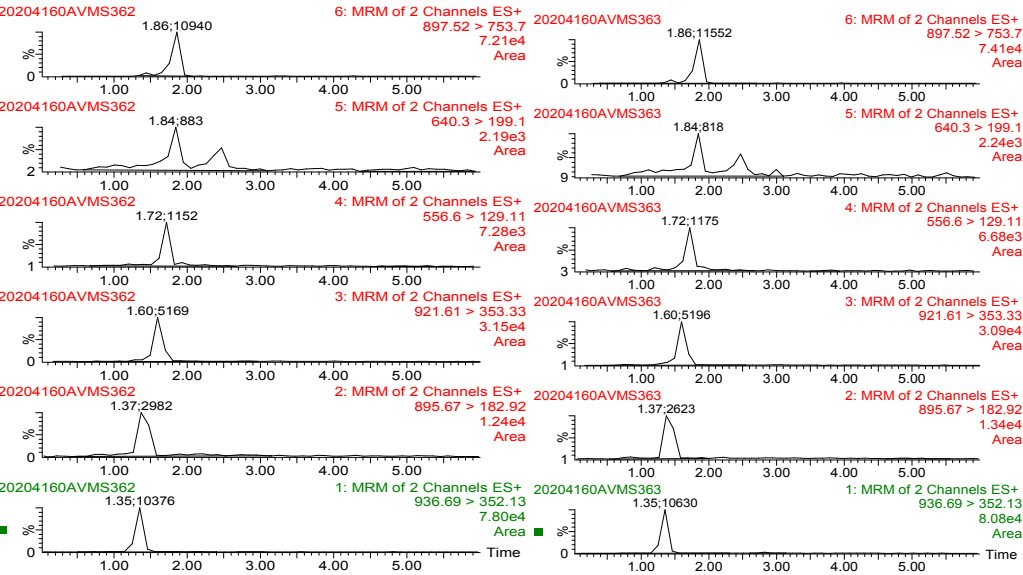


图17 猪配合饲料中阿维菌素类杀虫药色谱图
(左: 250 $\mu\text{g/kg}$ 饲料添加样品色谱图; 右: 空白基质添加标准溶液)

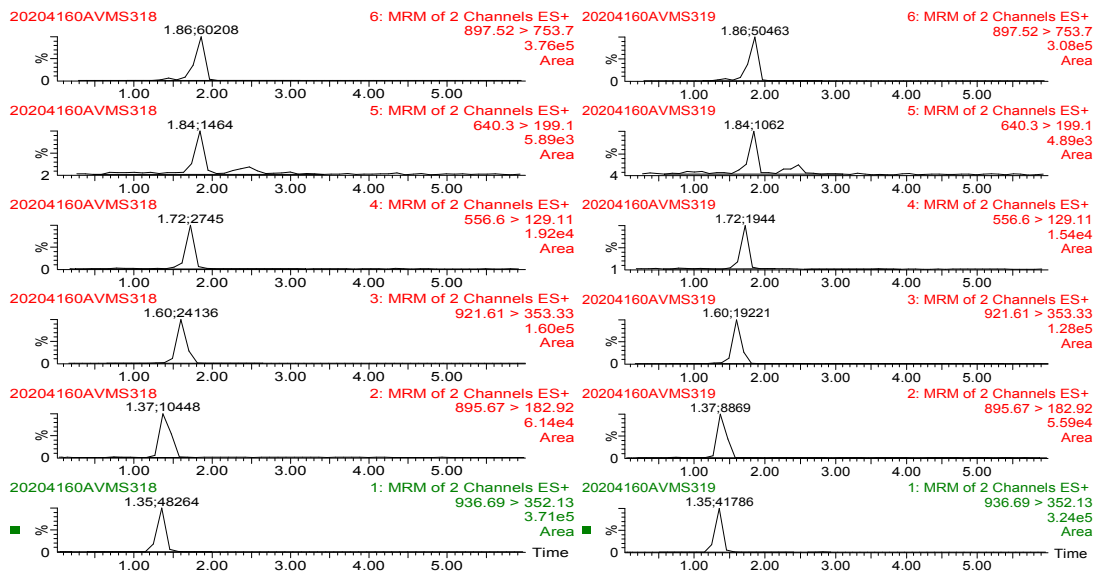


图18 牛精料饲料中阿维菌素类抗虫药色谱图
(左：250 $\mu\text{g/kg}$ 饲料添加样品色谱图；右：空白基质添加标准溶液)

6. 新修订方法与原方法的比较

取猪饲料样品 100 g，人为添加 6 种阿维菌素类药物混合标准溶液适量，使其浓度为 250 $\mu\text{g/kg}$ ，混匀，放置 10 天后，全部粉碎过筛，作为已知浓度的阳性样品检测。分别采取本建立的方法和原标准方法进行检测实验，两种方法各取 3 个重复样，结果见下表。由表可知，本方法对阿维菌素、乙酰基阿维菌素、多拉菌素和尹维菌素的测定结果比原标准方法更接近于实际浓度值，且本方法增加了对米尔贝肟和莫西克汀的检测。

表 23 本方法与修订前标准方法的实验比较

检测方法	药物名称	检测值($\mu\text{g/kg}$)			平均值 (%)	变异系数 (%)
		1	2	3		
本方法	EPR	223.68	249.11	221.04	231.28	6.70
	AVM	211.9	221.05	195.76	209.57	6.11
	MLB	220.81	207.93	227.82	218.85	4.61
	MOX	210.25	249.11	261.83	240.40	11.18
	DOR	233.66	247.38	226.95	236.00	4.41
	IVM	228.76	251.02	255.84	245.21	5.89
农业部 1486 号公告 -5-2010	EPR	199.88	213.74	188.75	200.79	6.24
	AVM	200.56	188.43	199.72	196.24	3.45
	MLB	-	-	-	-	-
	MOX	-	-	-	-	-
	DOR	159.76	203.65	199.84	187.75	12.95

	IVM	179.32	199.45	186.64	188.47	5.41
--	-----	--------	--------	--------	--------	------

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 试验验证的分析

本研究完成后，先后委托农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心(北京)、农业农村部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)和四川威尔检测技术股份有限公司进行了标准复核实验,对建立的《饲料中阿维菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》进行了线性范围、检测限和定量限、添加回收率及添加回收结果的相对标准偏差进行了分析，结果表明，采取本实验方法的前处理条件和参考仪器条件，三家单位的复核结果均表现良好。

2 综述报告

本研究建立了饲料中阿维菌素类药物的液相色谱-串联质谱检测方法。采用乙腈提取饲料中的阿维菌素类药物，样品提取液经过正己烷除脂和 HLB 固相萃取柱净化后，LC-MS/MS 检测。该方法的准确度、精密度和灵敏度均达到我国对饲料中阿维菌素类药物检测的要求。

3 技术经济论证

本研究前处理过程采用饲料中抗生素检测中常用到的乙腈、正己烷等试剂材料，检测成本较低。净化处理所使用的 HLB 性质稳定，还可以回收后重复使用，节省了成本。而且它比原标准方法的 C18 柱在实验操作过程中需要保持液面不流干相比，操作时需要顾虑的细节更少，应用更简便。

4 预期经济效果

本方法完成后能够为饲料中该类药物的检测提供有效的技术手段，将从源头控制、市场监管、事后溯源等多个方面保障饲料的质量安全。

本方法还能进一步规范企业生产行为，加强饲料市场监管。企业在生产过程中可以使用本标准制定的方法进行产品自检及饲料原料的入库检测。市场监管部门可借助本标准中的检测方法增加监管手段，完善监管体系。

本方法还为执法提供有力依据，严控农产品投入品品质。有效的标准检测方法将为不合格产品的溯源提供有力的技术手段，为执法行动提供有效的技术保障。

四、采用国际标准

本标准制定过程中，未采用国际标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与有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。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

七、涉及专利的有关说明

本标准不对涉及专利进行判别，若本单位制定相关专利，将在专利中明确表明该专利为本标准应用提供开放使用。

八、作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准作为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一。因此，建议将本标准作为推荐性部颁标准颁布实施。

九、贯彻标准的要求和措施建议

(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。这是保证新标准贯彻实施的基础。

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

(3) 实施的过渡期宜定为 6 个月。

十、其它应说明的事项

本标准修订方法颁布生效后，原标准方法应废止，启用新修订的标准方法。

参考文献

- [1] 农业农村部公告第 363 号。中华人民共和国兽药典（2020 年版）。2020 年 11 月 19 日。
- [2] GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量。2019 年 9 月 6 日颁布。
- [3] 中华人民共和国主席令第一二〇号。中华人民共和国农产品质量安全法。2022 年 9 月 2 日。
- [4] 扈洪波,朱蓓蕾,李俊锁. 阿维菌素类药物的研究进展[J].畜牧兽医学报,2000,31(6): 520-529.
- [5] 天然药物化学史:阿维菌素和伊维菌素 4.1% (458) 付炎;王于方;李力更;霍长虹;吴一兵;张嫚丽;史清文; - 《中草药》- 2017-09-12
- [6] 农业农村部. 关于征求《关于发布<药物饲料添加剂品种目录及使用规范>的公告（征求意见稿）》意见的通知.2017,10,30. http://www.moa.gov.cn/hd/zqyj/201711/t20171102_5858835.htm
- [7] Advacare pharma Co. Avermectin Premix (AverCare™).

- <https://www.advacarepharma.com/en/veterinary/ivermectin-premix> 1%预混剂作为口服使用。
- [8] Poultrydvm. Ivermectin.<http://www.poultrydvm.com/drugs/ivermectin>. 2021.3.22
- [9] FDA PI. Ivomec Premix for Swine. <https://www.drugs.com/pro/ivomec-premix-for-swine.html>. 2021.3.22
- [10] Zoetis. Dectomax Injectable Solution (Canada). <https://www.drugs.com/vet/dectomax-injectable-solution-can.html>. 2021.3.22
- [11] Ceva Animal Health. MilbeGuard (milbemycin oxime) Flavored Tablets. <https://www.drugs.com/vet/milbeguard-milbemycin-oxime-flavored-tablets.html>. 2021.3.22
- [12] Moxidectin (Oral). <https://www.drugs.com/cons/moxidectin.html>. 2021.3.22
- [13] 农业部 1025 号公告-5-2008 动物性食品中阿维菌素类药物残留检测——酶联免疫吸附法,高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法
- [14] 牛奶和猪肉中阿维菌素类药物的残留分析检测方法的优化.李玉立.中国农业大学本科生学位论文 - 《大学生论文联合比对库》 - 2018-05-30.
- [15] 多拉菌素的研究进展及应用 3.8% (434) 高玉红;郭照成;刘方悦;高玉阁;宋铭忻; - 《东北农业大学学报》 - 2009-04-25 是
- [16] 阿维菌素的发展概况 3.6% (407) 张丽强; - 《科协论坛(下半月)》 - 2009-06-25.
- [17] 莫西菌素在养殖业中的应用与研究综述. 周芷锦,穆琳;罗成江;林仙军; - 《畜禽业》 - 2013-10-15
- [18] <http://www.fjym.gov>.新型兽药—多拉菌素. 2010.
- [19] 张玉洁,李丹,李倩,王鹤佳.奶及奶粉中 4 种阿维菌素类药物残留检测高效液相色谱法[J].中国兽医杂志,2017,53(04):88-91.
- [20] 冒玉娟,邢晓玲,沈小艮,何晋瑶.UPLC-MS/MS 法测定鸡肉中阿维菌素类药物残留检测方法的建立[J].江苏农业科学,2018,46(15):146-150.
- [21] 程茹,吴紫洁,张凯,李平,谢体波.阿维菌素 ELISA 试剂盒在鸡肉、鸡肝中的检测效果研究[J].食品安全导刊,2018(10):68-71.
- [22] 卢琪琪,汤铭欣,刘禹杉,瞿利文,苏江丽,钟国华,刘婕.阿维菌素和高效氯氰菊酯在火龙果中的残留及消解动态[J/OL].食品科学:1-10[2019-05-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190311.1009.008.html>.
- [23] 陈吉香,谢体波,冯才伟.阿维菌素、埃比菌素的残留检测[J].食品研究与开发,2018,39(08):119-124.
- [24] 谭华东,张江杰,武春媛.QuEChERS/UPLC-MS/MS 法快速测定土壤中吡虫啉、啉虫脒与阿维菌素残留[J].农药,2019,58(01):45-49.
- [25] Tengting Ni,Dapeng Peng,Yanxin Wang,Yuanhu Pan,Shuyu Xie,Dongmei Chen,Yulian Wang,Yanfei Tao,Zonghui Yuan. Development of a broad-spectrum monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the multi-residue detection of avermectins in edible animal tissues and milk[J]. Food Chemistry,2019,286.
- [26] Rúbies A, Antkowiak S, Granados M, et al. Determination of avermectins: a QuEChERS approach to the analysis of food samples[J]. Food chemistry, 2015, 181: 57-63.
- [27] Wei Zhang,Ting Huang,Hongmei Li,Xinhua Dai,Can Quan,Yajuan He. Determination of avermectins by the internal standard recovery correction - high performance liquid chromatography - quantitative Nuclear Magnetic Resonance method[J]. Talanta,2017,172.
- [28] 高明远,高悦.HPLC 方法检测牛奶中多拉菌素等 3 种药物残留[J].黑龙江畜牧兽医,2017(05):282-285.
- [29] Guilherme Resende da Silva,Josefa Abucater Lima,Leonardo Francisco de Souza,Flávio Alves Santos,Mary Ane Gonçalves Lana,Débora Cristina Sampaio de Assis,Silvana de Vasconcelos Cançado. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach[J]. Talanta,2017,171.
- [30] Yuhong Qin,Freedom Jatamunua,Jingru Zhang,Yanjie Li,Yongtao Han,Nan Zou,Jihao Shan,Yanbin Jiang,Canping Pan. Analysis of sulfonamides, tilmicosin and avermectins residues in typical animal matrices with multi-plug filtration cleanup by liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection[J]. Journal of Chromatography B,2017,1053.

- [31] 陈京都,胡雅杰.超高效液相色谱-串联质谱法测定稻谷中 11 种农药残留[J].化学分析计量,2018,27(04):11-15.
- [32] Ioulia Ch. Moschou,Marilena E. Dasenaki,Nikolaos S. Thomaidis. Ionization study and simultaneous determination of avermectins and milbemycines in fish tissue by LC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B,2018.
- [33] Tengting Ni,Dapeng Peng,Yanxin Wang,Yuanhu Pan,Shuyu Xie,Dongmei Chen,Yulian Wang,Yanfei Tao,Zonghui Yuan. Development of a broad-spectrum monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the multi-residue detection of avermectins in edible animal tissues and milk[J]. Food Chemistry,2019,286.
- [34] 韩宁宁,于晓辉,戴青,于丽娜,赵晖,杨秀玉.阿维菌素残留溶剂气相色谱检测方法的建立[J].中国兽药杂志,2018,52(09):42-45.
- [35] 陈吉香,谢体波,冯才伟.阿维菌素、埃比菌素的残留检测[J].食品研究与开发,2018,39(08):119-124.
- [36] 潘绮雯,邓秉钊,陈志虹.乙酰氨基阿维菌素产品中残留溶剂检测方法的改进[J].广东畜牧兽医科技,2017,42(03):38-41+47.
- [37] 文莹,张立新.阿维菌素的中国“智”造[J].遗传,2018,40(10):888-899.
- [38] 高玉红,郭照成,刘方悦,高玉阁,宋铭忻.多拉菌素的研究进展及应用[J].东北农业大学学报. 2009(04):147-150.
- [39] 付炎,王于方,李力更,霍长虹,吴一兵,张嫚丽,史清文.天然药物化学史话:阿维菌素和伊维菌素[J].中草药. 2017(17):6-15.
- [40] 朱国军,黄雨锬,曾志华,戴碧余.天然燃香燃烧产物中挥发性有机物分析研究[J].云南化工. 2018(10):113-114.
- [41] 杨霞,赵玉雪,朱佳敏,吴柳燕,黄安香.野核桃青皮中胡桃醌含量测定及抗菌活性研究[J].应用化工. 2019(01):242-245.
- [42] 李玉立,陈可心,唐塔娅,武英豪,沈建忠,程林丽.动物源样品中阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J].中国畜牧兽医. 2018(11):326-334.
- [43] 梁曼,黄增,莫凤萍.石墨炉原子吸收光谱法测定 2 种植物叶中重金属含量[J].广东化工. 2018(23):89-90.
- [44] 余晶晶,蔡君兰,王冰,秦亚琼,赵晓东,刘克建,薛聪,张晓兵,刘绍锋.电子烟烟液中烟碱旋光异构体的手性液相色谱分离及测定[J].化学研究与应用. 2018(12):22-29.
- [45] 马婧好,刘莉,虞冰,吾建祥,杨德毅,刁银军.气相色谱测定海鲜菇中 35 种农药残留[J].农药科学与管理. 2018(12):34-41.
- [46] 顾宇翔,杨晋青,王磊.高效液相色谱法测定化妆品和洗涤剂中 5 种荧光增白剂的含量[J].理化检验(化学分册). 2018(12):42-46.
- [47] 胡艳君,闫美红,石鹏途.气候箱-热脱附-气相色谱法测定家具释放的 19 种挥发性有机化合物[J].理化检验(化学分册). 2018(12):7-12.
- [48] 李城镐,塔娜.生活饮用水中三卤甲烷的测定及其致癌风险评估[J].理化检验(化学分册). 2018(12):18-24.
- [49] 裯开智,梁振陈,陈文慧,陈艺玮. QuEChERS 提取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 5 种麻醉剂的残留量[J].理化检验(化学分册). 2018(12):47-51.
- [50] 魏祯,曹献英,陈健,刘桂华. QuEChERS 方法在软体类海产品兽药多残留检测中的应用[J].热带生物学报. 2018(04):18-28.
- [51] 单春兰,高飞龙,刘超英,刘海峰,高洪,严玉霖,杨伟,王浩.苏丹红 I 对大鼠 CYP 2E1、CYP 3A1 酶活性、CYP 450 含量及血液成分的影响[J].西南农业学报. 2018(12):272-276.
- [52] 黄益茂,刘茶,黄文千.气相色谱法测定蔬菜中多种有机磷农药的残留量[J].中国城乡企业卫生. 2019(01):69-72.
- [53] 张寒梅,王明月,乔君喜,吕瑞.不同生长时期松茸中重金属及微量元素含量的测定[J].广州化工. 2019(01):105-107.
- [54] 金绍明,宁霄,曹进,丁宏.超高效液相色谱串联质谱法测定酒和功能饮料中 3 种西地那非衍生物的含量[J].食品安全质量检测学报. 2019(01):87-91.
- [55] 张佳婵,王昌涛,赵丹,王成涛,孙宝国.沙棘粕醇提物的定性定量分析及其对衰老小鼠肝脏抗氧化指标的影响[J].食品科学. 2019(02):237-246.
- [56] 彭浩原.莫西克汀在猪血浆中高效液相色谱-荧光检测分析方法的建立与确证[A].中国毒理学会兽医毒理学委员会、中国畜牧兽医学学会兽医食品卫生学分会.中国毒理学会兽医毒理学委员会与中国畜牧兽医学学会兽医食品卫

生学分会联合学术研讨会暨中国毒理学会兽医毒理学委员会第 5 次全国会员代表大会会议论文集[C].中国毒理学会兽医毒理学委员会、中国畜牧兽医学会兽医食品卫生学分会:中国畜牧兽医学会,2017:1.

[57] 食品安全国家标准 GB 31650—2019 动物性食品中兽药最大残留限量.中华人民共和国国家标准.2019.