

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

代替农业部1486号公告-5-2010

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

Determination of 6 macrolide antiscotics in feeds—

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

（公开征求意见稿）

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

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

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件代替农业部1486号公告-5-2010《饲料中阿维菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》。与农业部1486号公告-5-2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了阿维菌素的药物种类，扩大了标准的适用饲料范围（见1，2010年版1）；
- 更改了提取液的净化方法（见8.2，2010年版7.2）；
 - 增加了正己烷去脂和正己烷萃取
 - 修改了样品净化柱的类型
- 更改了液相色谱流动相的组成（见8.4.1，2010版7.3.1）；
- 修改了串联质谱检测条件（见8.4.2，2010版7.3.2）。

本标准由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

- 2010年首次发布为农业部1486号公告-5-2010。

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

1 范围

本文件描述了饲料中 6 种大环内酯类驱虫药的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中阿维菌素、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、莫西克丁和米尔贝肟的测定。

本文件阿维菌素、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素的检出限为 10 µg/kg，莫西克丁和米尔贝肟的检出限为 25 µg/kg；阿维菌素、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素的定量限为 25 µg/kg，莫西克丁和米尔贝肟的定量限为 50 µg/kg。

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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的待测物用乙腈提取，经正己烷脱脂和固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 正己烷：色谱纯。

5.6 淋洗液 I：取 180 mL 乙腈（5.2），加入 820 mL 水，混匀。

5.7 淋洗液 II：取 180 mL 甲醇（5.3），加入 820 mL 水，混匀。

5.8 90%甲醇溶液：取 900 mL 甲醇（5.3）和 100 mL 水，混匀。

5.9 0.3%甲酸溶液：取 3 mL 甲酸（5.4），用水稀释定容至 1.0 L，混匀。

5.10 标准储备溶液（1 mg/mL）：称取阿维菌素 B_{1a}（CAS: 65195-55-3，纯度不低于 98%）、乙酰氨基

阿维菌素 (CAS:123997-26-2, 纯度不低于 98%)、伊维菌素 B_{1a} (CAS: 71827-03-7, 纯度不低于 98%)、多拉菌素 (CAS: 117704-25-3, 纯度不低于 95%)、莫西克丁 (CAS: 113507-06-5, 纯度不低于 98%)、米尔贝肟 (CAS: 129496-10-2, 纯度不低于 98%) 各 10 mg (精确到 0.01 mg), 用乙腈溶解, 并定容至 10 mL, 混匀。—18 ℃ 以下保存, 有效期 3 个月。

5.11 混合标准溶液 (100 μg/mL): 准确移取标准储备溶液 (5.10) 各 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解定容。于 2℃~8℃ 保存, 有效期 1 个月。

5.12 混合标准系列工作溶液: 分别准确移取适量混合标准溶液 (5.11) 于 100 mL 容量瓶中, 用 90% 甲醇 (5.8) 稀释定容, 配制成浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的混合标准系列工作溶液或标准添加液。于 2℃~8℃ 保存, 有效期 1 周。

5.13 亲水亲脂平衡 (HLB) 固相萃取小柱: 500 mg/6mL。

5.14 微孔滤膜: 0.22 μm, 尼龙材质, 有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾电离源。

6.2 分析天平: 精度 0.001 g 和 0.01 mg。

6.3 涡旋混合器。

6.4 振荡器。

6.5 离心机: 转速不低于 8000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

7 样品

按照 GB/T 20195 制备样品, 取样品至少 200 g, 粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛, 充分混匀, 装入密闭容器中, 备用。选取与待测样品类型相同, 均匀一致, 且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品, 作为基质空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确到 0.001 g) 于 50 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 乙腈 (5.2), 涡旋 1 min, 40 ℃ 条件下 300 r/min 振荡 40 min。4 ℃ 条件下 8000 r/min 离心 10 min。取上清液于另一离心管中。下层残渣加 10 mL 乙腈 (5.2) 重复提取一次, 4 ℃ 条件下 8000 r/min 离心 10 min。合并提取液。

8.2 净化

8.2.1 配合饲料与浓缩饲料

取 2.5 mL 提取液 (8.1), 加入 1 mL 水和 1.5 mL 正己烷 (5.5), 涡旋 30 s, 8000 r/min 离心 10 min, 除去上层正己烷。下层再加 1.5 mL 正己烷, 重复除脂一次。弃正己烷, 转移下层提取液至另一管中, 于 65 ℃ 氮气吹至 2 mL 左右, 加入 8 mL 水和 10 mL 正己烷 (5.5), 涡旋混合 1 min。4 ℃ 条件下, 8000

r/min 离心 10 min，弃下层水相。取上层正己烷溶液至 10 mL 离心管中，65 ℃氮吹干。加入 1 mL 乙腈（5.2）复溶，加入 5 mL 水，涡旋均匀，待过柱净化。

依次用 5 mL 乙腈（5.2）、5 mL 淋洗液 I（5.6）活化 HLB 小柱（5.13）。将上述试样溶液全部加载于 HLB 柱上。依次用淋洗液 I（5.6）5 mL 和淋洗液 II（5.7）5 mL 淋洗 HLB 柱，抽干。用流速小于 1 mL/min 的 6 mL 甲醇（5.3）洗脱。65 ℃氮气吹干，准确加入 1 mL 的 90%甲醇溶液（5.8），涡旋混匀，经微孔滤膜（5.14）过滤，作为试样溶液，待测。

8.2.2 其它饲料

取 2.5 mL 提取液（8.1），加入 1.5 mL 正己烷，涡旋 30 s，8000 r/min 离心 10 min，除去正己烷。下层再加入 1.5 mL 正己烷，重复脱脂 1 次。下层乙腈溶液转移至另一管中，65 ℃氮气吹至 1 mL 左右，加入 5 mL 水（5.1），涡旋混匀，待过柱净化。

依次用 5 mL 乙腈（5.2）活化、5 mL 淋洗液 I（5.6）活化取 HLB 小柱（5.13）。将试样溶液全部过柱。依次用 5 mL 淋洗液 I（5.6）和 5 mL 淋洗液 II（5.7）淋洗，抽干。用流速小于 1 mL/min 的 6 mL 甲醇（5.3）洗脱。65 ℃氮气吹干，准确加入 1 mL 的 90%甲醇溶液（5.8），涡旋混匀，经微孔滤膜（5.14）过滤，作为试样溶液，待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取同类基质的空白样品，按 8.1~8.2 步骤处理至 65 ℃氮气吹干，准确移取混合标准系列工作溶液（5.12）各 1 mL，涡旋混匀，经微孔滤膜（5.14）过滤，配制成浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者。

柱温：40 ℃。

流速：0.2 mL/min。

进样体积：5 μL。

流动相：A 相，0.3%甲酸溶液（5.10）；B 相，甲醇（5.3），洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间（min）	A 相（%）	B 相（%）
0	15	85
0.5	15	85
2	3	97
4	3	97
5	15	85
6	15	85

8.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

毛细管电压：2.8 kV。

离子源温度：100 ℃。

去溶剂温度：320 ℃。

脱溶剂气体流量：630 L/h。

碰撞气流量：33 L/h。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值见表 2。

表 2 多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

待测物	监测离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
乙酰氨基阿维 菌素	936.69>352.13 ^a	70	60
	936.69>490.27	70	60
阿维菌素 B _{1a}	895.67>182.92 ^a	70	60
	895.67>327.40	70	60
多拉菌素	921.61>353.33 ^a	70	50
	921.61>777.70	70	50
米尔贝肟	556.60>129.11 ^a	40	40
	556.60>169.33	40	40
莫西克丁	640.30>199.10 ^a	30	25
	640.37>528.30	30	9
伊维菌素 H ₂ B _{1a}	897.52>753.70 ^a	70	45
	897.52>609.35	70	45
^a 为定量离子对			

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液（8.4）和试样溶液（8.2 或 8.3）上机测定。

基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录 A。

8.4.4 定性

待测组分选择 1 个母离子，2 个子离子，在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/（%）	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差/（%）	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

按照 8.4.1 和 8.4.2 设定仪器条件进行样品检测。标准曲线校准时，以基质匹配标准溶液的色谱峰面积（响应值）为纵坐标，浓度为横坐标绘制工作曲线，标准曲线的相关系数应不小于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在基质匹配标准曲线的线性范围内，若超出线性范围时，应将试样溶液和基质匹配标准溶液用 90%甲醇做相应稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 计，单位为毫克每千克（mg/kg）。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V}{m \times 1000} \times n \cdots \cdots (1)$$

式中：

ρ_i ——由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V}{A_{si} \times m \times 1000} \times n \cdots \cdots (2)$$

式中：

A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

ρ_{si} ——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）。

结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

10 精密度

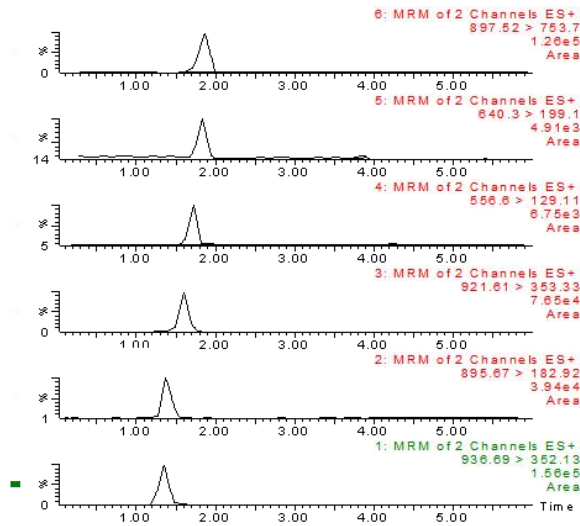
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附录 A

(资料性)

6 种大环内酯类驱虫药基质匹配标准溶液定量离子色谱图

6种大环内酯类驱虫药基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图 A.1。



说明：自上而下依次为伊维菌素H₂B_{1a}、莫西克丁、米尔贝肟、多拉菌素、阿维菌素B1a、乙酰氨基阿维菌素

图A.1 6种大环内酯类驱虫药基质匹配标准溶液（10 ng/mL）定量离子色谱图