

中华人民共和国国家标准

GB 31659.4—2022

代替 GB/T 22968—2008

食品安全国家标准 奶及奶粉中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of avermectins residues in milk and milk powder
by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2022-09-20 发布

2023-02-01 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

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。

本文件代替 GB/T 22968—2008《牛奶和奶粉中伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，与 GB/T 22968—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要变化如下：

- 标准文本格式修改为食品安全国家标准文本格式；
- 标准范围中增加了羊奶的检测；
- 标准测定物质改为各药物的残留标志物；
- 标准灵敏度进一步提高。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 22968—2008。

食品安全国家标准

奶及奶粉中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了奶及奶粉中阿维菌素类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛奶、羊奶和奶粉中阿维菌素(以阿维菌素 B1a 计)、伊维菌素(以 22,23-二氢阿维菌素 B1a 计)、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素(以乙酰氨基阿维菌素 B1a 计)单个或多个药物的残留检测。

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

试料中残留的阿维菌素类药物,用乙腈提取,C₁₈固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱测定,基质匹配标准溶液外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

以下所用试剂,除特别注明外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 乙腈(CH₃CN),色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH₃OH),色谱纯。

5.1.3 甲酸(CH₂O₂),色谱纯。

5.1.4 三乙胺(C₆H₁₅N)。

5.1.5 异辛烷(C₈H₁₈)。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸乙腈溶液:取甲酸 1 mL,用乙腈稀释至 1 000 mL。

5.2.2 0.1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,用水稀释至 1 000 mL。

5.2.3 淋洗溶液:取乙腈 30 mL、水 70 mL 和三乙胺 20 μL,混匀。

5.2.4 50%乙腈溶液:取乙腈 50 mL,用水稀释至 100 mL。

5.3 标准品

阿维菌素(Avermectin, C₄₈H₇₂O₁₄ • C₄₇H₇₀O₁₄, CAS 号: 71751-41-2),含量≥98.0%;伊维菌素(Ivermectin, C₄₈H₇₄O₁₄, CAS 号: 70288-86-7),含量≥98.0%;多拉菌素(Doramectin, C₅₀H₇₄O₁₄, CAS 号: 117704-25-3),含量≥94.3%;乙酰氨基阿维菌素(Eprinomectin, C₅₀H₇₅NO₁₄, CAS 号: 123997-26-2),含量≥98.0%。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 阿维菌素类药物标准储备液:精密称取阿维菌素(以阿维菌素 B1a 计)、伊维菌素(以 22,23-二氢

阿维菌素 B1a 计)、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素(以乙酰氨基阿维菌素 B1a 计)标准品各约 10 mg,于不同的 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的阿维菌素 B1a、22,23-二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 B1a 标准储备液。-18 ℃以下保存,有效期 12 个月。

5.4.2 阿维菌素类药物标准工作液:精密量取 1 mg/mL 的阿维菌素 B1a、22,23-二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 B1a 标准储备液 100 μL,于不同的 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成浓度为 10 μg/mL 的阿维菌素 B1a、22,23-二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 B1a 标准工作液。-18 ℃以下保存,有效期 6 个月。

5.5 材料

5.5.1 C₁₈固相萃取柱:500 mg/6 mL,或相当者。

5.5.2 亲水聚四氟乙烯微孔滤膜:0.22 μm。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 高速离心机。

6.5 氮吹仪。

6.6 水平振荡器。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶或羊奶及奶粉,混合均匀。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

牛奶和羊奶:冷藏避光或-18 ℃以下保存。

奶粉:阴凉干燥处保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取牛奶或羊奶 2 g(准确至±0.05 g)或奶粉 0.5 g(准确至±0.01 g)于 50 mL 离心管中,加乙腈 8 mL,涡旋后 200 r/min 水平振荡 5 min,8 000 r/min 离心 8 min,转移上清液至另一 50 mL 离心管中,加水 10 mL、三乙胺 25 μL,混匀,备用。

8.2 净化与浓缩

C₁₈固相萃取柱依次用乙腈 5 mL 和淋洗溶液 5 mL 活化,取备用液过柱,用淋洗溶液 5 mL 淋洗,抽干;再用异辛烷 5 mL 淋洗,抽干;用乙腈 5 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管中,于 50 ℃下氮气吹干。残余物中加入 50%乙腈溶液 1.0 mL,充分溶解。过微孔滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取阿维菌素类标准工作液适量,用 50%乙腈水溶液稀释成含阿维菌素 B1a、22,23-二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 B1a 浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 400 ng/mL 的系列标准工作液(牛奶或羊奶用 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 浓度点,奶粉用 2 ng/mL、

5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 400 ng/mL 浓度点),从中各取 1.0 mL, 分别加入空白试料经提取、净化和吹干后的残余物中,充分溶解,作为基质匹配标准溶液,过微孔滤膜后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C_{18} (50 mm×2.1mm, 1.7 μm),或性能相当者。
- b) 流动相:A 为 0.1% 甲酸溶液,B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。流动相梯度:0 min~1 min 保持 70% B;1 min~3 min,70% B 线性变化到 100% B;3 min~4 min 保持 100% B;4 min~6 min 保持 70% B。
- c) 流速:0.4 mL/min。
- d) 进样量:5 μL 。
- e) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

8.4.2 串联质谱参考条件

- 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:多反应离子监测(MRM);
- d) 电喷雾电压:5 500 V;
- e) 离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$;
- f) 辅助气 1:50 psi;
- g) 辅助气 2:50 psi;
- h) 气帘气:30 psi;
- i) 碰撞气:Medium。
- j) 待测药物定性、定量离子对和对应的去簇电压、碰撞能量参考值见表 1。

表 1 待测药物定性、定量离子对和对应的去簇电压、碰撞能量参考值

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
阿维菌素 Bla	895.5>751.4	895.5>751.4	50	60
	895.5>449.1			60
22,23-二氢阿维菌素 Bla	897.5>753.2	897.5>753.2	50	55
	897.5>329.2			70
多拉菌素	921.5>353.2	921.5>449.1	50	70
	921.5>449.1			60
乙酰氨基阿维菌素 Bla	936.5>490.1	936.5>490.1	55	70
	936.5>352.1			75

8.4.3 测定法

试样溶液的保留时间在基质匹配标准溶液保留时间的±2.5%之内。试样溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比,符合表 2 的要求。

取基质匹配标准溶液和试样溶液,作单点或多点校准,按外标法,以峰面积计算。基质匹配标准溶液及试样溶液中阿维菌素类药物的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内,超出线性范围时进行适当倍数稀释后再进行分析。基质匹配标准溶液中特征离子质量色谱图见附录 A。

表 2 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

单位为百分号

相对丰度	允许偏差
>50	±20

表 2 (续)

相对丰度	允许偏差
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

8.5 空白试验

取空白试料,除不添加药物外,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。

$$X = \frac{C \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \quad (1)$$

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($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C——基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A——试样溶液中阿维菌素类药物的峰面积;

V——溶解残余物所用溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

A_s ——基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物的峰面积;

m——试样质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法对牛奶或羊奶的检测限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$;对奶粉的检测限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法牛奶中阿维菌素 Bla 在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、22,23-二氢阿维菌素 Bla 在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、多拉菌素在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、乙酰氨基阿维菌素 Bla 在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上,羊奶中阿维菌素类药物在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上,以及奶粉中阿维菌素 Bla 在 $4 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、22,23-二氢阿维菌素 Bla 在 $4 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 160 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、多拉菌素在 $4 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 240 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、乙酰氨基阿维菌素 Bla 在 $4 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 320 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率均为 $60\% \sim 120\%$ 。

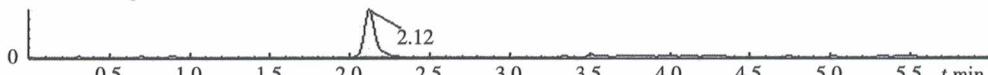
10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性)
阿维菌素类药物特征离子色谱图

空白牛奶基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物特征离子色谱图见图 A. 1。

895.5/751.4 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 23615.719. Height: 4884.374. RT: 2.12 min



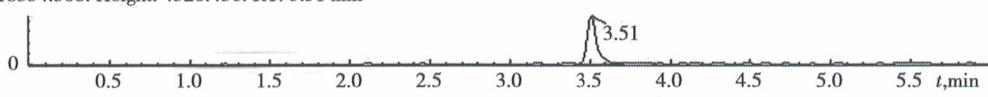
895.5/449.1 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 9774.004. Height: 1914.855. RT: 2.11 min



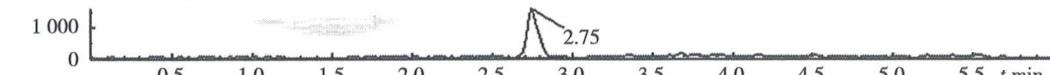
897.5/753.2 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 5.745e4. Height: 13260.280. RT: 3.51 min



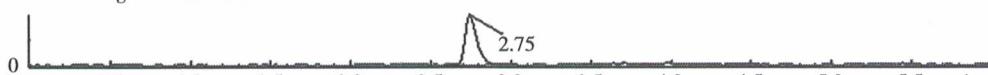
897.5/329.2 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 18334.308. Height: 4320.436. RT: 3.51 min



921.5/353.2 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 7654.671. Height: 1579.995. RT: 2.75 min



921.5/449.1 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 9919.797. Height: 1942.802. RT: 2.75 min



936.5/490.1 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 21999.794. Height: 4848.237. RT: 1.44 min



936.5/352.1 from 0.5ng/g milk matrix(20160323yeni.wiff(sample 61))
Area: 13276.302. Height: 2795.896. RT: 1.44 min

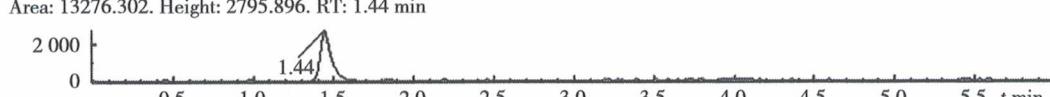


图 A. 1 空白牛奶基质匹配标准溶液中阿维菌素类药物特征离子色谱图 (1.0 ng/mL)

注:阿维菌素 Bla 特征离子(895.5>751.4, 895.5>449.1);22,23-二氢阿维菌素 Bla(897.5>753.2, 897.5>329.2);多拉菌素(921.5>353.2, 921.5>449.1);乙酰氨基阿维菌素 Bla(936.5>490.1, 936.5>352.1)。

中华人民共和国

国家标准

食品安全国家标准 奶及奶粉中阿维菌素类药物残留
量的测定 液相色谱-串联质谱法

GB 31659.4—2022

* * *

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 0.75 字数 15 千字

2022 年 12 月第 1 版 2022 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 9136

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31659.4—2022