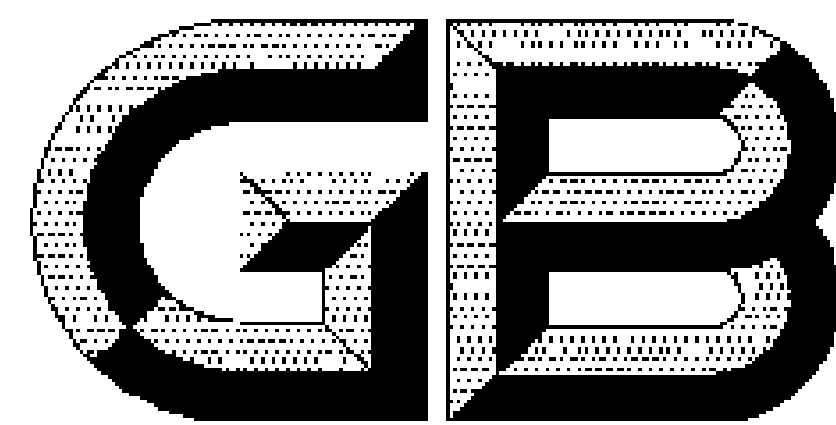




中华人民共和国国家标准

GB/T 20748—2006

牛肝和牛肉中阿维菌素类药物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of avermectins residues
in bovine liver and muscles—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、林峰、林海丹、吴映璇、谢守新。

本标准系首次发布的国家标准。



牛肝和牛肉中阿维菌素类药物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肝和牛肉中伊维菌素(ivermectin)、阿维菌素(abamectin)、多拉菌素(doramectin)和爱普瑞菌素(eprinomectin)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肝和牛肉中伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和爱普瑞菌素残留量的测定。

本标准的方法检出限:伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和爱普瑞菌素均为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

牛肝和牛肉中残留的阿维菌素类药物用乙腈提取后,用中性氧化铝柱净化,液相色谱-串联质谱检测。

4 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 冰乙酸。

4.3 中性氧化铝:Brockmann 活度 1 级或相当者。

4.4 无水硫酸钠:经 650℃灼烧 4 h,置于干燥器中备用。

4.5 中性氧化铝净化柱:取一空的固相萃取柱管,下部填入少量脱脂棉,装入 2 g 中性氧化铝(4.3),上部再填充 4 g 无水硫酸钠,使用前装填。

4.6 三乙胺。

4.7 伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素、爱普瑞菌素标准物质:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.8 标准储备溶液:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。准确称取适量的伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和爱普瑞菌素标准物质,用乙腈分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液,−18℃贮存,爱普瑞菌素标准储备溶液可使用 3 个月,伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素储备溶液可使用 1 年。

4.9 混合标准储备溶液:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。准确吸取 0.5 mL 伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和爱普瑞菌素标准储备溶液至 100 mL 容量瓶中,以乙腈稀释并定容。−18℃贮存,可使用 3 个月。

4.10 基质混合标准工作溶液:根据需要,吸取不同体积的混合标准储备溶液(4.9),用空白样品提取液配成不同浓度的基质混合标准工作溶液。当天配制。

4.11 滤膜:0.45 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪:配有大气压化学电离源(APCI)。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 组织捣碎机。

5.4 匀质机。

5.5 离心机:转速大于 4 000 r/min。

5.6 超声波。

5.7 液体混匀器。

5.8 KD 浓缩瓶:25 mL。

5.9 固相萃取装置。

5.10 旋转蒸发器。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取样品约 500 g 用组织捣碎机捣碎,装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

6.2 试样的保存

将试样于 -18°C 冰箱中保存。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取 2 g 试样,精确至 0.01 g。置于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 乙腈,以 8 000 r/min 均质 20 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 比色管中,另取一 50 mL 离心管加入 8 mL 乙腈,洗涤匀质刀头 10 s,洗涤液移入前一离心管中,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,在液体混匀器上涡旋 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 比色管,离心管中的沉淀再加入 5 mL 乙腈,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,于液体混匀器上涡旋 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 比色管,待净化。

7.2 净化

将中性氧化铝净化柱(4.5)安置在固相萃取装置上,将上清液(7.1)小心倒入中性氧化铝净化柱中,控制流速在 1 mL/min~2 mL/min,待样液完全流出后,再向净化柱中加入 2 mL 乙腈淋洗净化柱,收集全部流出液,流出液转移至 KD 浓缩瓶中,于 40°C 旋转蒸发至干,用 1.0 mL 乙腈溶解残渣,超声 10 min,过 0.45 μm 滤膜(4.11)后,供液相色谱-串联质谱测定。

称取 2 g 阴性样品,按 7.1 和 7.2 步骤制备空白样品提取液,用于配制系列基质混合标准工作溶液。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Intersil C8-3 色谱柱,5 μm ,150 mm $\times$ 4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温: 40°C ;
- c) 流动相:甲醇+水=9+1,每 1 L 该溶液加入 1 mL 三乙胺;
- d) 流速:1.0 mL/min;

e) 进样量:50 μL。

7.3.2 质谱条件

- a) 离子源:大气压化学电离源;
- b) 扫描方式:负离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- e) 喷雾电压、去簇电压、碰撞能等电压值应优化至最佳灵敏度;
- f) 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞气能量见表 1。

表 1 四种阿维菌素类药物的质谱参数

被测物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	采集时间 /ms	去簇电压 /V	碰撞气能量 /V
伊维菌素	873.7/567.2	873.7/567.2	200	-44	-28
	873.7/837.5				-28
阿维菌素	871.7/565.2	871.7/565.2	200	-47	-36
	871.7/853.5				-31
多拉菌素	897.6/591.2	897.6/591.2	200	-44	-38
	897.6/879.4				-28
爱普瑞菌素	912.5/876.6	912.5/876.6	200	-47	-23
	912.5/565.3				-38

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 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
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.3.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对混合标准工作溶液进样(4.10),以峰面积为纵坐标,混合标准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。外标法定量。四种阿维菌素的标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见图 A.1。四种阿维菌素的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B.1。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按 7.1~7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

结果按式(1)计算：

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克(μg/kg)；
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- V——样品溶液最终定容体积，单位为毫升(mL)；
- m——样品溶液所代表最终试样的质量，单位为克(g)。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的，重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r，被测物的含量范围及重复性方程见表 3 和表 4。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程(基质为肌肉)

化合物名称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
伊维菌素	2~16	lg r=0.85lg m-0.506	lg R=0.999lg m-0.511
阿维菌素	2~16	r=0.419m	lg R=0.865lg m-0.306
多拉菌素	2~16	r=0.152m+0.38	lg R=0.813lg m-0.291
爱普瑞菌素	2~16	r=0.471m	lg R=0.826lg m-0.328
注：m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 4 含量范围及重复性和再现性方程(基质为肝脏)

化合物名称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
伊维菌素	2~16	lg r=0.656lg m-0.499	R=0.184m+0.222
阿维菌素	2~16	r=0.056 2m+0.390	R=0.053m+0.726
多拉菌素	2~16	r=0.097 9m+0.236	lg R=0.833lg m-0.492
爱普瑞菌素	2~16	r=0.116m+0.293	R=0.351m
注：m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R，被测物的含量范围及再现性方程见表 3 和表 4。

附录 A
(资料性附录)

四种阿维菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

四种阿维菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A. 1。

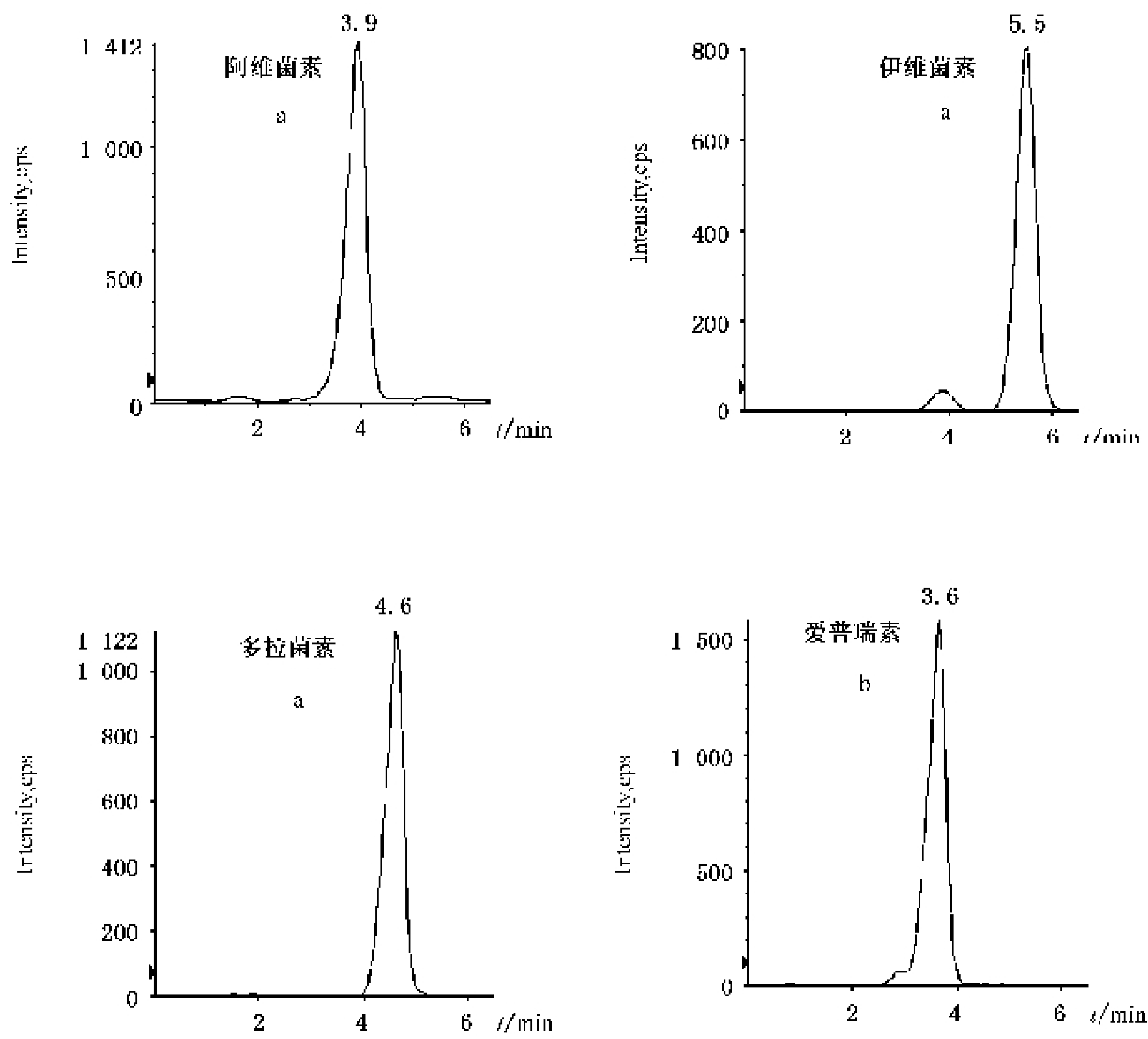


图 A. 1 四种阿维菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

四种阿维菌素的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 四种阿维菌素的添加浓度及其平均回收率的试验数据($n=10$)

样品基质	化合物名称	添加水平/($\mu\text{g/kg}$)	 回收率/(%)
肌肉	伊维菌素	4.0	76.4
		8.0	72.7
		16.0	92.6
	阿维菌素	4.0	80.2
		8.0	96.5
		16.0	96.8
	多拉菌素	4.0	78.9
		8.0	93.5
		16.0	77.6
	爱普瑞菌素	4.0	82.2
		8.0	71.3
		16.0	92.0
牛肝	伊维菌素	4.0	84.2
		8.0	85.5
		16.0	87.9
	阿维菌素	4.0	79.7
		8.0	87.7
		16.0	92.9
	多拉菌素	4.0	79.8
		8.0	80.1
		16.0	84.8
	爱普瑞菌素	4.0	107.0
		8.0	112.0
		16.0	110.0