

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4680—2025

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 six kinds of Macrolide-like anthelmintics in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2025-01-09 发布

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。

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：

- 增加了药物种类，更改了适用范围（见第 1 章）；
- 更改了提取液与净化方法（见 8.2，2010 年版 7.2）；
- 更改了精密度要求（见第 10 章，2010 年版的第 9 章）
- 更改了液相色谱参考条件（见 8.4.1，2010 年版的 7.3.1）；
- 更改了串联质谱参考条件（见 8.4.2，2010 年版的 7.3.2）。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业大学。

本文件主要起草人：程林丽、沈建忠、陈亚南、秦千禧、赵军杰、雷艳敏、王鑫。

本文件及其所代替文件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。
- 本次为第一次修订。



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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，莫西克丁和米尔贝肟的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，莫西克丁和米尔贝肟的定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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，经正己烷和固相萃取柱净化，用液相色谱-串联质谱仪检测，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 规定的一级水。

5.2 乙腈：色谱级。

5.3 甲醇：色谱级。

5.4 甲酸：色谱级。

5.5 乙腈饱和的正己烷：色谱级。

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(体积分数)：取 900 mL 甲醇(5.3)和 100 mL 水，混匀。

5.9 0.3% 甲酸溶液(体积分数)：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} (纯度不低于 98%)、乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} (纯度不低于 98%)、伊维菌素 H_2B_{1a} (纯度不低于 98%)、多拉菌素(纯度不低于 95%)、莫西克丁(纯度不低于 98%)、米尔贝肟(纯度不低于 98%)各 10 mg(精确到 0.01 mg)，分别用乙腈溶解，定容至 10 mL，混匀。各药物信息见附录 A。标准储备溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 3 个月。

5.11 混合标准溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确移取标准储备溶液(5.10)各 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释并定容。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

5.12 混合标准系列溶液:分别准确移取适量混合标准溶液(5.11)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶液(5.8)稀释定容,配制成质量浓度分别为 5 ng/mL 、10 ng/mL 、50 ng/mL 、100 ng/mL 、500 ng/mL 、1 000 ng/mL 的混合标准系列溶液。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 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 ,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 8 000 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 2 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 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 300 r/min 振荡 40 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于另一离心管中。下层残渣准确加入 10 mL 乙腈(5.2)重复操作一次。合并上清液。

8.2 净化

8.2.1 正己烷净化

8.2.1.1 配合饲料与浓缩饲料

取 2.5 mL 上清液(8.1),加入 1 mL 水和 1.5 mL 用乙腈饱和的正己烷(5.5),涡旋 30 s,8 000 r/min 离心 10 min,除去上层正己烷。下层再加 1.5 mL 乙腈饱和的正己烷(5.5)重复操作一次。下层溶液于 65 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至 2 mL 左右,依次加入 8 mL 水和 10 mL 乙腈饱和的正己烷(5.5),涡旋混合 1 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,8 000 r/min 离心 10 min,弃去下层水相。上层正己烷溶液于 65 $^{\circ}\text{C}$ 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。

8.2.1.2 其它饲料

取 2.5 mL 上清液(8.1),加入 1.5 mL 乙腈饱和的正己烷,涡旋 30 s,8 000 r/min 离心 10 min,除去正己烷。下层再加入 1.5 mL 乙腈饱和的正己烷,重复操作 1 次。下层乙腈溶液 65 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至 1 mL 左右,加入 5 mL 水(5.1),涡旋混匀,待过柱净化。

8.2.2 固相萃取净化

依次用 5 mL 乙腈(5.2)、5 mL 淋洗液 I(5.6)活化 HLB 小柱(5.13)。将试样溶液(8.2.1)全部过 HLB 柱。依次用淋洗液 I(5.6)5 mL 和淋洗液 II(5.7)5 mL 淋洗,抽干;再用 6 mL 甲醇(5.3)以小于 1 mL/min 的流速洗脱;65 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,准确加入 1 mL 的 90% 甲醇溶液(5.8),涡旋混匀,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

称取空白试样，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溶液(5.12)各 1 mL，涡旋混匀，配制成质量浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液，微孔滤膜(5.14)过滤，备用。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱： C_{18} 柱，柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm ，或性能相当者；
- b) 柱温：40 ℃；
- c) 流速：0.2 mL/min；
- d) 进样体积：5 μL ；
- e) 流动相：A 相，0.3% 甲酸溶液(5.9)；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

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式(ESI^+)；
- b) 检测方式：多反应监测(MRM)；
- c) 毛细管电压：2.8 kV；
- d) 离子源温度：100 ℃；
- e) 去溶剂温度：320 ℃；
- f) 脱溶剂气体流量：630 L/h；
- g) 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(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能(eV)
乙酰氨基阿维菌素 B_{1a}	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

表 2 （续）

待测物	监测离子对(m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
伊维菌素 H_2B_{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(8.3)和试样溶液(8.2.2)上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录 B。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液(质量浓度相当)中待测物的保留时间一致,其相对偏差应在±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质量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

以基质匹配标准溶液的质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制曲线,其相关系数应不小于 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,应将试样溶液和基质匹配标准溶液用 90%甲醇溶液(5.8)进行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。

$$w_i = \frac{c_i \times V_1 \times V \times n}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- c_i ——由基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物的数值质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 ——试样提取体积的数值,单位为毫升(mL);
- V ——净化后最终定容体积的数值,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;
- V_2 ——净化时所用提取液体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

$$w_i = \frac{A_i \times c_i \times V_1 \times V \times n}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;
- A_{si} ——标准溶液中待测物的峰面积;
- c_i ——基质匹配标准溶液中待测物质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

注:试样中阿维菌素、伊维菌素、乙酰氨基阿维菌素含量均以其主成分阿维菌素 B_{1a} 、伊维菌素 H_2B_{1a} 、乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 计。

结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,获得的 2 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 15%。

附 录 A
(资料性)

6 种大环内酯类驱虫药中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

6 种大环内酯类驱虫药中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见图 A. 1。

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
阿维菌素 B _{1a}	Avermectin B _{1a}	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	65195-55-3
乙酰氨基阿维菌素 B _{1a}	Eprinomectin	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	123997-26-2
伊维菌素 H ₂ B _{1a}	Ivermectin	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	70288-86-7
多拉菌素	Doramectin	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄	117704-25-3
莫西克丁	Moxidectin	C ₃₇ H ₅₃ NO ₈	113507-06-5
米尔贝肟	Milbemycin oxime	2C ₃₂ H ₄₅ NO ₇ · 2C ₃₁ H ₄₃ NO ₇	129496-10-2

图 A. 1 6 种大环内酯类驱虫药中英文通用名称、化学分子和 CAS 号

附 录 B
(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(10 ng/mL)定量离子色谱图见图 B. 1。

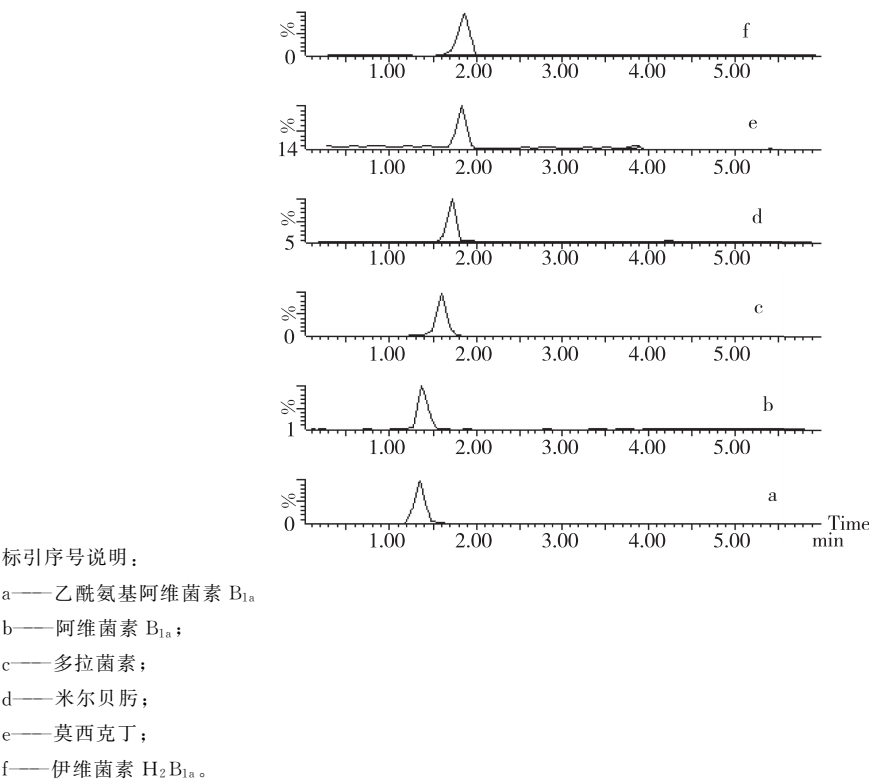


图 B. 1 6 种大环内酯类驱虫药基质匹配标准溶液(10 ng/mL)定量离子色谱图