

中华人民共和国国家标准

GBxxxx—20xx

食品安全国家标准
动物性食品中莫昔克丁残留量的测定

National food safety standard-

Determination of moxidectin residues in animal derived food

(公开征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 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
国家市场监督管理总局

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。

征求意见稿

食品安全国家标准

动物性食品中莫昔克丁残留量的测定

方法一 液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中莫昔克丁残留量检测的制样和液相色谱测定方法。

本文件适用于牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织及牛羊乳及其乳粉中莫昔克丁残留量的测定，其他类型乳和乳粉可参照执行。

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

试样中的莫昔克丁药物，经乙腈提取，C₁₈固相萃取柱净化，三氟乙酸酐和1-N-甲基咪唑衍生化，高效液相色谱—荧光检测法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.3 三乙胺（C₆H₁₅N）。

5.1.4 三氟乙酸酐（C₄F₆O₃）：色谱纯。

5.1.5 1-N-甲基咪唑（C₄H₆N₂）。

5.1.6 乙酸（CH₃COOH）：色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 30%乙腈溶液：取乙腈 30 mL、水 70 mL，混匀。

5.2.2 衍生化试剂

a) A 液：取 N-甲基咪唑 5 mL、乙腈 5 mL，混匀。现用现配。

b) B 液：取三氟乙酸酐 5 mL、乙腈 10 mL，混匀。现用现配。

5.3 标准品

莫昔克丁 (Moxidectin, $C_{37}H_{53}NO_8$, CAS 号: 113507-06-5), 含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液 (1 mg/mL)：称取莫昔克丁标准品约 10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至 10 mL 棕色容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃ 以下避光保存，有效期 12 个月。

5.4.2 标准工作液 (10 $\mu\text{g/mL}$)：准确量取标准储备液 100 μL 于 10 mL 棕色容量瓶，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

5.5 材料

5.5.1 C_{18} 固相萃取柱：500 mg/ 6 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.45 μm 有机系尼龙滤膜。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器。

6.2 电子天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 组织匀浆机。

6.5 振荡器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 高速离心机：转速 10000r/min 或以上。

6.8 氮吹仪。

6.9 电热箱：65℃ 及以上。

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供试组织或空白，绞碎并使均质或混合混匀。取适量新鲜或冷藏的供试乳或空白，混合均匀。取适量供试乳粉或空白，混合均匀。

- a) 取均质或混匀后的供试样品，作为供试试样；
- b) 取均质或混匀后的空白样品，作为空白试样；
- c) 取均质或混匀后的空白样品，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

牛乳、羊乳和其他组织：冷藏避光或-18℃以下保存。

乳粉：阴凉干燥处保存。

8 测定步骤

8.1 提取

牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织：准确称取试样（ 2 ± 0.05 ）g 于 50 mL 离心管，加乙腈 5 mL，涡旋混匀，250 rpm 振荡 5 min，10000 r/min 离心 5 min，收集上清液于另一 50 mL 离心管中。残渣加乙腈 5 mL，重复提取一次。合并两次提取液，加水 5 mL 和三乙胺 20 μ L（羊肝脏加三乙胺 50 μ L），混匀，备用。

牛乳、羊乳及其乳粉：准确称取牛乳、羊乳试样（ 2 ± 0.05 ）g，乳粉（ 0.50 ± 0.01 ）g 于 50 mL 离心管中，乳粉样品加 2 mL 水溶解，充分混匀。乳及乳粉试样加乙腈 3 mL，涡旋混匀，250 rpm 振荡 5 min，10000 r/min 离心 5 min，收集上清液于另一 50 mL 离心管中。残渣加乙腈 3 mL，重复提取一次。合并两次提取液，加水 3 mL，混匀，备用。

8.2 净化

依次用乙腈 5 mL、30%乙腈溶液 5 mL 活化 C_{18} 固相萃取柱。取备用液过柱，加 30%乙腈溶液 5 mL 洗涤，抽干。用乙腈 5 mL 洗脱，收集洗脱液于 15 mL 玻璃试管中，50℃ 水浴氮气吹干。备用。

8.3 衍生化

向具塞玻璃试管中依次加入衍生化试剂A液 100 μ L 和衍生化试剂B液 150 μ L，密闭，涡旋 10 s，依次加乙酸、三乙胺各 50 μ L，涡旋 10 s，65℃ 避光密闭静置 15 min，取出后放置至室温，加 650 μ L 甲醇，涡旋混匀。经微孔滤膜过滤，供高效液相色谱检测。

8.4 标准曲线的制备

牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织：精密量取莫昔克丁药物标准工作液适量，用乙腈稀释，配制成浓度为 4 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L、500 μ g/L、1000 μ g/L 和 2000 μ g/L 的系列标准溶液。从上述标准溶液中各取 1.0 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中，于 50℃ 氮气吹干，按 8.3

衍生化步骤处理后供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

牛乳、羊乳及其乳粉：精密量取莫昔克丁药物标准工作液适量，用乙腈稀释，配制成浓度为4 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、100 μg/L、200 μg/L和 500 μg/L的系列标准溶液。从上述标准溶液中各取1.0 mL于10 mL具塞玻璃试管中，50℃氮气吹干，按8.3衍生化步骤处理后供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.5 测定

8.5.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm），或相当者；
- b) 流动相：乙腈+水（90+10，v/v）；
- c) 流速：1.8 mL/min；
- d) 检测波长：激发波长：365 nm，发射波长：475 nm；
- e) 柱温：40 ℃；
- f) 进样量：20 μL。

8.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以色谱峰面积定量。标准溶液及试样溶液中莫昔克丁响应值应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中莫昔克丁保留时间与相应标准溶液中莫昔克丁保留时间相比，相差应在±0.1min以内。标准溶液液相色谱图参见附录A中的图A.1。

8.6 空白试验

取空白试样，除不加标准溶液外，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

试样中莫昔克丁的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$\omega = \frac{P_s \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

式中：

ω—试样中莫昔克丁物残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；

P_s—标准溶液中莫昔克丁浓度，单位为微克每升（μg/L）；

A ——试样溶液中莫昔克丁的色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中莫昔克丁的色谱峰面积；

V ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

注：计算结果不小于 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛、羊可食性组织中的检出限为 $2\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

本方法在牛乳、羊乳中的检出限为 $2\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ ；在乳粉中的检出限为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $15\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在牛肌肉样品 $5\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 40\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%；羊肌肉、羊肾脏、牛肾脏样品 $5\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%；牛肝脏、羊肝脏样品 $5\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 200\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%；牛、羊脂肪样品 $5\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 1000\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为60%~100%。

本方法在牛乳、羊乳 $5\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 80\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%；在乳粉 $15\text{ }\mu\text{g/kg}\sim 640\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%。

10.3 精密度

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

方法二 液相色谱-串联质谱法

11 范围

本文件规定了动物性食品中莫昔克丁残留量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、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织及牛羊乳及其乳粉中莫昔克丁残留量的测定，其他类型乳及乳粉可参照执行。

12 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

13 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

14 原理

试样中的莫昔克丁药物，经乙腈提取，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。

15 试剂与材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

15.1 试剂

15.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

15.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

15.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

15.2 溶液配制

15.2.1 洗涤溶液：取乙腈 30 mL 和水 70 mL，混匀。

15.2.2 0.1%甲酸乙腈溶液：取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

15.2.3 0.1%甲酸水溶液：取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，混匀。

15.2.4 50%乙腈水溶液：取 50 mL 乙腈和 50 mL 水，混匀。

15.3 标准品

莫昔克丁（Moxidectin, C₃₇H₅₃NO₈, CAS: 113507-06-5），含量≥98.0%。

15.4 标准溶液制备

15.4.1 标准储备液（1 mg/mL）：取莫昔克丁标准品约 10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃以下避光保存，有效期 12 个月。

15.4.2 标准工作液 (10 $\mu\text{g/mL}$): 准确量取上述标准储备液 100 μL 于 10 mL 容量瓶, 用乙腈稀释至刻度, 配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存, 有效期 6 个月。

15.5 材料

15.5.1 陶瓷均质子。

15.5.2 C_{18} 固相萃取柱: 500 mg/6 mL, 或相当者。

15.5.3 微孔滤膜: 0.22 μm 亲水性聚四氟乙烯滤膜。

16 仪器和设备

16.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)。

16.2 电子天平: 感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

16.3 涡旋混合器。

16.4 振荡器。

16.5 固相萃取装置。

16.6 高速离心机: 转速 10000r/min 或以上。

16.7 氮吹仪。

17 试样的制备与保存

17.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的供试组织或空白, 绞碎并使均质或混合混匀。取适量新鲜或冷藏的供试乳或空白, 混合均匀。取适量供试乳粉或空白, 混合均匀。

a) 取均质或混匀后的供试样品, 作为供试试样;

b) 取均质或混匀后的空白样品, 作为空白试样;

c) 取均质或混匀后的空白样品, 添加适宜浓度的标准工作液, 作为空白添加试样。

17.2 试样的保存

牛乳、羊乳和其他组织: 冷藏避光或-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

乳粉: 阴凉干燥处保存。

18 测定步骤

18.1 提取

牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织: 准确称取试样 (2 \pm 0.05) g 于 50 mL 离心管中, 加乙腈 6 mL, 加入陶瓷均质子, 涡旋后中速水平振荡 5 min, 10000 r/min 离心 5 min, 转移上清液至另一 50 mL 刻度离心管中, 加水稀释至 20 mL, 混匀, 备用。

牛乳、羊乳及其乳粉: 准确称取牛乳、羊乳 (2 \pm 0.05) g, 乳粉 (0.50 \pm 0.01) g 于 50 mL

离心管中，乳粉样品加 2 mL 水溶解，充分混匀。乳及乳粉试样加乙腈 6 mL，涡旋混匀，250 rpm 振荡 5 min，10000 r/min 离心 5 min，收集上清液于另一 50 mL 刻度离心管中，加水稀释至 20 mL，混匀，备用。

18.2 净化与浓缩

依次用乙腈 5 mL、洗涤溶液 5 mL 活化 C₁₈ 固相萃取柱。取备用液 10.0 mL 过柱，用洗涤溶液 5 mL 淋洗，抽干，用乙腈 5.0 mL 洗脱，收集洗脱液于 15 mL 玻璃试管中，50°C 水浴氮气吹干。用 50% 乙腈水溶液 1.0 mL 溶解残余物，充分溶解。经微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪检测。

18.3 基质匹配标准曲线的制备

牛、羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织：精密量取莫昔克丁标准工作液适量，用 50% 乙腈水溶液稀释成浓度为 1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 的系列标准工作液（适用于牛肌肉、肾脏和羊肌肉、肾脏）；或 1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L、100 µg/L 和 200 µg/L 的系列标准工作液（适用于牛肝脏和羊肝脏）；或 1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、20 µg/L、100 µg/L、200 µg/L、500 µg/L 和 1000 µg/L 的系列标准工作液（适用于牛脂肪和羊脂肪），从上述标准溶液中各取 1.0 mL，分别加入到空白试样经提取、净化和吹干后的残余物中，充分溶解，经微孔滤膜过滤后作为基质匹配标准溶液上机检测。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。求回归方程和相关系数。

牛乳、羊乳及其乳粉：精密量取莫昔克丁标准工作液适量，用 50% 乙腈水溶液稀释成浓度为 1 µg/L、2.5 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、40 µg/L 和 80 µg/L 的系列标准工作液（适用于牛乳和羊乳）；或 0.625 µg/L、1.25 µg/L、5 µg/L、25 µg/L、80 µg/L 和 160 µg/L 的系列标准工作液（适用于乳粉），从上述标准溶液中各取 1.0 mL，分别加入到空白试样经提取、净化和吹干后的残余物中，充分溶解，经微孔滤膜过滤后作为基质匹配标准溶液上机检测。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。求回归方程和相关系数。

18.4 测定

18.4.1 色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈（50 mm×2.1 mm，粒径 1.7 µm），或相当者；

b) 流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液，B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液。流动相梯度：0~1 min 保持 75%B；1~3 min，75%B 线性变化到 95%B，3~4.5 min 保持 95%B，4.6~6 min 保持 75%B；

- c) 流速: 0.4 mL/min;
- d) 柱温: 30°C;
- e) 进样量: 5 µL。

18.4.2 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), 质谱参数参见表1;
- d) 电喷雾电压: 5500 V;
- e) 离子源温度: 550 °C;
- f) 辅助气1: 55 psi;
- g) 辅助气2: 55 psi;
- h) 气帘气: 25 psi;
- i) 碰撞气: Medium。

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 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
莫昔克丁	640.4>528.2	640.4>528.2	45	11
	640.4>498.2			16

18.4.3 测定法

18.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中莫昔克丁的保留时间与基质匹配标准溶液中莫昔克丁的保留时间相比, 偏差在±0.1min以内, 且检测到的相对离子比率, 应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子比率一致, 其允许相对偏差不超过±40%。

18.4.3.2 定量测定

按18.4.1和18.4.2设定仪器条件, 以基质匹配标准溶液浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 作单点或多点校准, 按外标法计算试样中药物的残留量, 基质匹配标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均在仪器检测的线性范围内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录A图A.2。对于试料中莫昔克丁残留量超过仪器测定线性范围的, 应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

18.5 空白试验

取空白试样, 除不加标准溶液外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

19 结果计算和表述

试样中莫昔克丁的残留量按标准曲线或公式 (2) 计算,

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots \dots (2)$$

式中：

ω —试样中莫昔克丁残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

ρ_s —标准溶液中莫昔克丁浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A —试样溶液中莫昔克丁的峰面积；

A_s —基质匹配标准溶液中莫昔克丁的峰面积；

V_1 —备用液总体积，单位为毫升（ mL ）；

V_2 —过柱用备用液体积，单位为毫升（ mL ）；

V_3 —残余物溶解用溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试料质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果不小于 $1 \mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1 \mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛、羊可食性组织中的检出限为 $1 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 。

本方法在牛羊乳中的检出限为 $1 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $2 \mu\text{g/kg}$ ；在乳粉中的检出限为 $2 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在牛肌肉样品 $2 \mu\text{g/kg} \sim 40 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ ；牛、羊肝脏样品 $2 \mu\text{g/kg} \sim 200 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ ；牛肾脏，羊肌肉和肾脏样品 $2 \mu\text{g/kg} \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ ；牛、羊脂肪样品 $2 \mu\text{g/kg} \sim 1000 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

本方法在牛乳、羊乳 $2 \mu\text{g/kg} \sim 80 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ ；在乳粉 $5 \mu\text{g/kg} \sim 640 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

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

附录 A

(资料性)

色谱图与特征离子质量色谱图

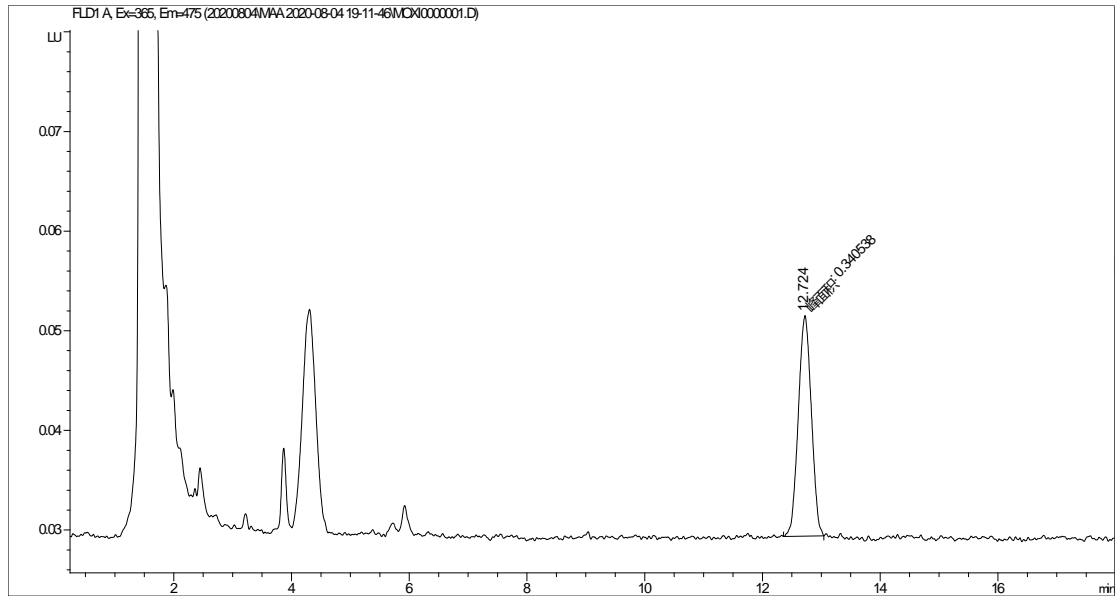


图 A.1 莫昔克丁标准溶液液相色谱图 (10 ng/mL)

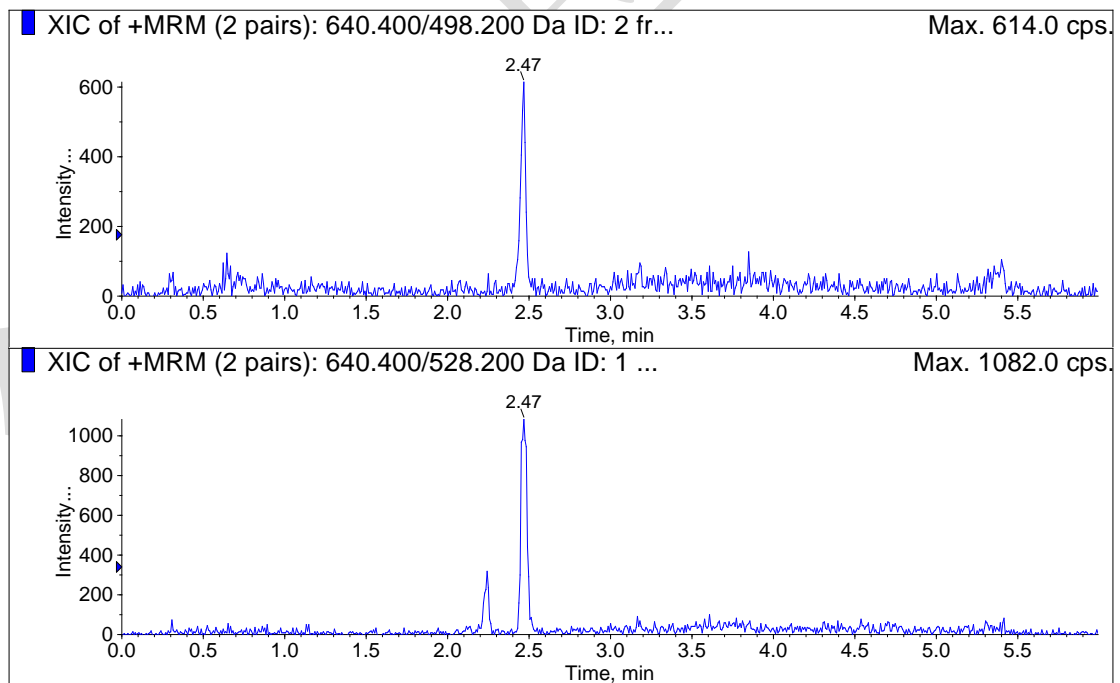


图 A.2 基质匹配标准溶液中莫昔克丁特征离子质量色谱图 (2 ng/mL)

全文意見稿