湖南省市场监督管理局 发布

2022-××-××实施

2022-××-××发布

###### 水产养殖环境中阿维菌素和伊维菌素的测定 液相色谱-串联质谱法

###### Determination of avermectin and ivermectin in Aquaculture environment by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

（征求意见稿）

DB 43/T XXXXX—2020

DB43

湖南省地方标准

ICS 03.120.20

A00

目 次

前言……………………………………………………………………………………Ⅱ

1 范围…………………………………………………………………………………………………………1

2 规范性引用文件……………………………………………………………………………………………1

3 术语与定义……………………………………………………………………………………………………1

4 方法原理……………………………………………………………………………………………………1

5 试剂与材料…………………………………………………………………………………………………1

6 仪器与设备…………………………………………………………………………………………………2

7 样品……………………………………………………………………………………………2

8 测定步骤………………………………………………………………………………………2

9 结果计算和表述………………………………………………………………………………………5

10检测方法的灵敏度、准确度和精密度………………………………………………………………………5

附录A （资料性附录）五氯苯酚选择反应监测（SRM）色谱图………………6

1. 前言

本文件按GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

请注意本文件某些内容可能涉及专利，本文件发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省水产科学研究所、农业农村部渔业产品质量监督检验测试中心（长沙）。

本文件主要起草人：万译文、杨霄、李小玲、曾春芳、谢仲桂、陈湘艺、索纹纹、刘伶俐、雷琴、何咏、黄华伟、肖维、尹升福、黄向荣、谢玉昆。

###### 水产养殖环境中阿维菌素和伊维菌素的测定

###### 液相色谱-串联质谱法

1 范围

###### 本文件规定了水产养殖环境（水体、底泥）中阿维菌素和伊维菌素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于我省水产养殖环境（水体、底泥）中阿维菌素和伊维菌素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析

HJ 494 水质 采样技术指导

SL 187 水质采样技术规程

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

水样中的目标物经HLB固相萃取柱富集和净化，底泥样品中的目标物经氨化乙腈提取，PSA和C18吸附剂净化。净化后的溶液用带有电喷雾离子源的液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1.1 甲醇（CH3OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH3CN）：色谱纯。

5.1.3 乙酸铵（CH3COOHNH4）：色谱纯。

5.1.4 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.5 氯化钠（NaCl）。

5.1.6 氨水（NH3 ▪ H2O）。

5.2 溶液配制

5.2.1 5 mmol/L乙酸铵溶液：取0.19 g乙酸铵，用水溶解并稀释定容至500 mL。

5.2.2 70%乙腈水溶液：取乙腈70 mL，用水溶解并稀释定容至100 mL。

5.3 标准品

5.3.1 阿维菌素B1a（Avermectin B1a, C48H72O14, 65195-55-3），含量≥95.0%。

5.3.2 伊维菌素B1a（aivermectin B1a, C48H74O14, 71827-03-7），含量≥95.0%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液（0.10 mg/mL）：取阿维菌素、伊维菌素标准品各约10 mg，精密称定，用乙腈溶解并稀释定容至100 mL，配制成浓度均为0.10 mg/mL的标准储备液。-18 ℃避光保存。

5.4.2 混合标准中间液（1.0 μg/mL）：分别精密量取阿维菌素、伊维菌素标准储备液各1 mL，于100 mL容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μg/mL的混合标准中间液。4 ℃避光保存。

5.5 材料

5.5.1 HLB固相萃取柱：500 mg/6 mL。

5.2.2 PSA（N-丙基乙二胺）吸附剂：粒径 40～63 μm 或相当者。

5.2.3 C18吸附剂：粒径 40～63 μm 或相当者。

5.5.4 微孔滤膜：0.45 μm 玻璃纤维滤膜。

5.5.5 微孔滤膜：0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪，配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量0.01 g和0.00001 g。

6.3 冷冻干燥机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 高速离心机。

6.6 超声波清洗器。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

6.9 旋转蒸发仪。

7 样品

7.1 样品采集

水样按SL 187规定的方法进行采集。底泥样品按HJ 494-2009规定的方法进行采集。

7.2 试样的制备

采集的水样经0.45 μm微孔滤膜过滤后，置于样品瓶中，在 0～4℃避光保存。采集的底泥样品先-20℃预冷冻24 h，经冷冻干燥机（-50℃，真空度20 Pa，冷冻干燥10 h）冷冻干燥后，剔除石块和植物体等异物，用研钵研磨后过100目网筛，一20℃冷冻保存。

7.3 空白试样的制备

选取不含阿维菌素和伊维菌素的同类样品，按照与试样制备（7.2）相同的步骤进行空白试样的制备。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 水体

量取20 mL（准确至±0.1 mL）水样，置于50 mL离心管中，用甲酸调节pH至4.0（±0.2），混合均匀。无需提取，待净化。

8.1.2 底泥

称取5 g（准确至±0.02 g）底泥样品于50 mL离心管中，加水3 mL水润湿，加0.2%的氨化乙腈12 mL，涡旋混合1 min，超声10 min，加氯化钠2 g，涡旋混合1 min，8000 r/min离心5 min，取上清液转移至25 mL比色管中，残渣用10 mL 0.2%的氨化乙腈重复提取一次，合并上清液，用乙腈定容至25 mL，混匀，备用。

8.2 净化

8.2.1 水体

HLB固相萃取柱依次用5 mL甲醇、5 mL水活化。取水样过柱，控制流速不超过1 mL/min。待水样全部通过小柱后，用5 mL水淋洗，减压抽干，用6 mL甲醇洗脱。收集洗脱液，40 ℃下氮气吹至近干。用1.00 mL 70%乙腈水溶液溶解残渣，过0.22 μm微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.2.2 底泥

移取10.00 mL上述备用液至25 mL茄形瓶中，40 ℃下减压浓缩至近干，用2.00 mL 70%乙腈水溶液溶解残渣，加入PSA吸附剂100 mg，C18吸附剂40 mg，涡旋振荡30 s，10000 r/min离心5 min，取上清液过0.22 μm 微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 底泥含水率测定

称取5 g底泥样品，按照GB17378.5中规定的方法进行含水率测定。

8.4 标准曲线的制备

8.4.1 水体

精密量取混合标准中间液（1.0 μg/mL）适量，用70%乙腈水溶液配制成阿维菌素和伊维菌素浓度为 1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L 和 100 μg/L的系列混合标准工作液，供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子质量色谱峰峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程和相关系数。

8.4.2 底泥

精密量取混合标准中间液（1.0 μg/mL）适量，用7份经提取和净化处理的空白试样基质溶液溶解稀释，配制成阿维菌素和伊维菌素浓度为 1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L 和 100 μg/L的系列基质匹配混合标准工作液，过0.22 μm 微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子质量色谱峰峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求得回归方程和相关系数。

8.5 测定

8.5.1液相色谱参考条件

1. 色谱柱：C18 (100×2.1 mm,粒径2.6 µm)，或相当者；
2. 流动相：A为甲醇，B为5 mmol/L乙酸铵溶液，梯度洗脱条件见表1；
3. 进样量：5 µL；
4. 流速：0.35 mL/min；
5. 柱温：40 ℃。

表1 流动相梯度洗脱条件

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间（min） | A (%) | B (%) |
| 0 | 10 | 90 |
| 0.5 | 10 | 90 |
| 3.0 | 95 | 5 |
| 6.0 | 95 | 5 |
| 6.1 | 10 | 90 |
| 7.5 | 10 | 90 |

8.5.2 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：多反应监测（MRM）；

d) 喷雾电压：5.5 kV；

e) 脱溶剂气温度：400 ℃；

f) 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量见表2。

表 2 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物名称 | 母离子  m/z | 子离子  m/z | 去簇电压  V | 碰撞能量  eV |
| 阿维菌素 | 890.4 | 305.2a | 100 | 35 |
| 567.3 | 100 | 18 |
| 伊维菌素 | 892.4 | 569.3a | 95 | 23 |
| 307.0 | 95 | 36 |
| a 为定量离子。 | | | | |

8.5.3 定性测定

在相同测试条件下，试样中待测物的保留时间与标准工作液中待测物的保留时间一致，偏差在 ± 2.5 %以内，且试样中待测物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液对应的定性离子的相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

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% |
| 允许的相对偏差 | ± 20% | ± 25% | ± 30% | ± 50% |

8.5.4 定量测定

按8.5.1和8.5.2设定仪器条件，取标准工作溶液、试样溶液、空白试样溶液等体积进样测定，外标法定量。标准工作溶液和试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测线性范围内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录A。

8.6 空白实验

按照与上述测定步骤相同的条件进行空白试样（7.3）的测定。

9 结果计算和表述

水体中待测物含量按式（1）计算。计算结果须扣除空白值，保留两位有效数字。

 ………………………………………… (1)

式中：

X1 ——试样中待测物的含量，单位为微克每升（μg/L）；

Ci ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V0 ——试样体积，单位为毫升（mL）。

底泥中待测物含量按式（2）计算。计算结果须扣除空白值，保留两位有效数字。

 ………………………………………… (2)

式中：

X2 ——试样中待测物的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

V1 ——试样提取液体积，单位为毫升（mL）。

V2 ——准确移取的备用液体积，单位为毫升（mL）。

m——试样质量，单位为克（g）。

*w*——试样含水率，单位为质量分数（%）。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在水产养殖环境水体中阿维菌素和伊维菌素的检出限均为0.02 μg/L，定量限均为0.05 μg/L；在水产养殖环境底泥中阿维菌素和伊维菌素的检出限均为0.3 μg/kg，定量限均为1.0 μg/kg。

10.2 准确度

本方法水体在0.05 μg/L～5 μg/L添加浓度水平上的回收率为60～110%；底泥在 1 μg/kg～100 μg/kg添加浓度水平上的回收率为70～110%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤ 10%，批间相对标准偏差≤ 15 %。

附 录 A

（资料性）  
标准溶液特征离子质量色谱图

阿维菌素和伊维菌素标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。

AVMs-D

图A.1 阿维菌素和伊维菌素标准溶液特征离子质量色谱图（10 μg/L ）

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿