

中华人民共和国国家标准

农业部 2483 号公告—6—2016

饲料中金刚烷胺和金刚乙胺的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of amantadine and rimantadine in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2016-12-23 发布

2017-04-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本标准主要起草人:邱静、李丹、贾琪、范理。

饲料中金刚烷胺和金刚乙胺的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中金刚烷胺和金刚乙胺含量测定的液相色谱—串联质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中金刚烷胺和金刚乙胺的测定。

本标准方法的检出限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 603 化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 方法原理

饲料中的金刚烷胺和金刚乙胺用酸化乙腈提取，固相萃取净化，液相色谱—串联质谱正离子模式测定，同位素内标法定量。

4 试剂与材料

除另有说明，所有试剂均为分析纯和符合 GB/T 6682 中规定的一级水。试验中所用制剂按 GB/T 603 的规定制备。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 冰乙酸。

4.4 甲酸：色谱纯。

4.5 盐酸。

4.6 氨水。

4.7 1%乙酸乙腈溶液：取冰乙酸(4.3)10 mL，用乙腈(4.2)溶解并稀释至 1 000 mL。

4.8 0.1%甲酸水溶液：取 1 000 mL 水，加入 1 mL 甲酸(4.4)。

4.9 2%盐酸水溶液：取 2 mL 盐酸(4.5)，用水溶解并稀释至 100 mL。

4.10 5%氨水甲醇溶液：取 5 mL 氨水(4.6)，用甲醇(4.1)溶解并稀释至 100 mL。

4.11 50%乙腈水溶液：取 50 mL 乙腈(4.2)，用水溶解并稀释至 100 mL。

4.12 金刚烷胺标准品：含量 \geq 98.0%。

4.13 D_{15} -金刚烷胺标准品：含量 \geq 99.0%。

4.14 金刚乙胺标准品：含量 \geq 98.0%。

4.15 D_4 -金刚乙胺标准品：含量 \geq 99.0%。

4.16 金刚烷胺、 D_{15} -金刚烷胺、金刚乙胺、 D_4 -金刚乙胺标准储备溶液：分别称取 10.00 mg 金刚烷胺

(4.12)、D₁₅-金刚烷胺(4.13)、金刚乙胺(4.14)和 D₄-金刚乙胺(4.15)标准品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1)溶解并稀释至刻度,分别配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。-20℃ 以下保存,有效期为 3 个月。

4.17 金刚烷胺和金刚乙胺混合标准工作溶液:分别量取 1.0 mg/mL 的金刚烷胺、金刚乙胺标准储备溶液(4.16)适量,于 100 mL 容量瓶中用甲醇(4.1)稀释至刻度,配制成金刚烷胺、金刚乙胺浓度为 10.0 μg/mL 的混合标准工作溶液。2℃~8℃ 保存,有效期为 14 d。

4.18 D₁₅-金刚烷胺和 D₄-金刚乙胺混合内标工作溶液:分别量取 1.0 mg/mL 的 D₁₅-金刚烷胺和 D₄-金刚乙胺标准储备溶液(4.16)适量,于 100 mL 容量瓶中用甲醇(4.1)稀释至刻度,配制成 D₁₅-金刚烷胺和 D₄-金刚乙胺浓度为 1.0 μg/mL 的混合内标工作溶液。2℃~8℃ 保存,有效期为 14 d。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱—串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 天平:感量 0.01 g。
- 5.3 分析天平:感量 0.01 mg。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 固相萃取仪。
- 5.7 高速离心机:转速≥10 000 r/min。
- 5.8 氮吹仪。
- 5.9 固相萃取柱:混合型阳离子交换固相萃取柱(60 mg, 3 mL),或性能相当者。
- 5.10 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

6 采样和试样制备

采样按照 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的样品,四分法缩减取样。按 GB/T 20195 的规定制备试样,将饲料样品磨碎,通过 0.45 mm 空筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

准确称取 2 g(精确至 0.01 g)试样至 50 mL 离心管中,加入 20 μL 1.0 μg/mL 的混合内标工作溶液(4.18),然后加入 10 mL 1%乙酸乙腈溶液(4.7),涡旋 1 min,于振荡器中室温振荡 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至 50 mL 离心管中,残渣用 10 mL 1%乙酸乙腈溶液(4.7)涡旋 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,上清液合并至 50 mL 离心管中,待净化[若样品中目标物浓度过高,可从提取液中分取 1 mL~2 mL,用 1%乙酸乙腈溶液(4.7)定容至 10 mL,混匀后待净化]。

7.2 净化

混合阳离子固相萃取柱先用 3 mL 甲醇(4.1)活化,3 mL 水平衡,然后将上清液上柱,流速控制在 2 滴/s~3 滴/s,依次用 3 mL 2%盐酸水溶液(4.9)、3 mL 甲醇(4.1)淋洗,抽干 3 min,用 5 mL 5%氨水甲醇(4.10)洗脱,收集洗脱液于 15 mL 离心管中,50℃ 条件下氮气吹干,1.00 mL 50%乙腈水溶液(4.11)复溶,涡旋 30 s 后过 0.22 μm 滤膜到样品瓶中,上机测定。

7.3 标准曲线绘制

准确量取适量金刚烷胺和金刚乙胺混合标准工作溶液(4.17)、D₁₅-金刚烷胺和 D₄-金刚乙胺混合内标工作溶液(4.18),用 50%乙腈水溶液(4.11)稀释配制成金刚烷胺和金刚乙胺浓度为 2.00 μg/L、

4.00 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 、100.0 $\mu\text{g/L}$ 、200.0 $\mu\text{g/L}$ 、1000.0 $\mu\text{g/L}$ 、 D_{15} -金刚烷胺和 D_4 -金刚乙胺浓度均为 20.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液,供液相色谱—串联质谱测定。分别以金刚烷胺和 D_{15} -金刚烷胺、金刚乙胺和 D_4 -金刚乙胺的定量离子质量色谱峰面积之比为纵坐标,对应的标准溶液浓度比为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} ,柱长 150 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.5 μm ;或性能相当者。

流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液(4.8),B 为甲醇(4.1)。

流速:0.30 mL/min。

进样量:10 μL 。

流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	90	10
1.5	90	10
2.0	10	90
5.0	10	90
5.1	90	10
10.0	90	10

7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子扫描。

检测方式:多反应离子监测(MRM)。

脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体。

喷雾电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度。

监测离子参数情况见表 2。

表 2 金刚烷胺、 D_{15} -金刚烷胺、金刚乙胺和 D_4 -金刚乙胺特征离子参考质谱条件

化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压(DP) V	碰撞能(CE) eV
金刚烷胺	152.0/135.0	152.0/135.0	45	18
	152.0/93.0		48	35
D_{15} -金刚烷胺	167.3/150.3	167.3/150.3	48	15
金刚乙胺	180.2/163.2	180.2/163.2	40	15
	180.2/81.0		45	32
D_4 -金刚乙胺	184.2/167.0	184.2/167.0	48	15

7.4.3 定性测定

在相同试验条件下,待测物在样品中的保留时间与标准工作溶液中的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,并且色谱图中各组分定性离子对的相对丰度,与浓度接近标准工作液中相应定性离子对的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判断为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度, %	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的相对偏差, %	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.4 定量测定

取试样溶液和标准溶液上机测定,以色谱峰保留时间和离子对定性,分别以金刚烷胺和 D₁₅-金刚烷胺、金刚乙胺和 D₄-金刚乙胺的色谱峰面积比做单点或标准曲线校准,用内标法定量。试样溶液中目标物与内标的峰面积比均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱—质谱条件下,金刚烷胺和金刚乙胺标准溶液特征离子的质量色谱图参见附录 A。按以上步骤对同一试样进行平行测定。

8 结果计算

试样中金刚烷胺或金刚乙胺的含量 X,以质量分数表示,单位为微克每千克(μg/kg),按式(1)或式(2)计算。

$$\text{单点校准: } X = \frac{C_s \times A_i \times A'_{is} \times C_{is} \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_{is} \times A_s \times m \times 1000} \times \rho \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{或标准曲线校准: } X = \frac{C_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \times \rho \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- C_i ——由标准曲线得出的试样溶液中相应的金刚烷胺或金刚乙胺浓度,单位为微克每升(μg/L);
- C_{is} ——试样溶液中相应的 D₁₅-金刚烷胺或 D₄-金刚乙胺浓度,单位为微克每升(μg/L);
- C_s ——标准溶液中相应的金刚烷胺或金刚乙胺浓度,单位为微克每升(μg/L);
- C'_{is} ——标准溶液中相应的 D₁₅-金刚烷胺或 D₄-金刚乙胺浓度,单位为微克每升(μg/L);
- A_i ——试样溶液中相应的金刚烷胺或金刚乙胺峰面积;
- A_{is} ——试样溶液中相应的 D₁₅-金刚烷胺或 D₄-金刚乙胺峰面积;
- A_s ——标准溶液中相应的金刚烷胺或金刚乙胺峰面积;
- A'_{is} ——标准溶液中相应的 D₁₅-金刚烷胺或 D₄-金刚乙胺峰面积;
- V ——残余物定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——供试试样的质量,单位为克(g);
- ρ ——提取液稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

金刚烷胺和金刚乙胺标准溶液特征离子质量色谱图

金刚烷胺和金刚乙胺标准溶液特征离子质量色谱图参见图 A.1。

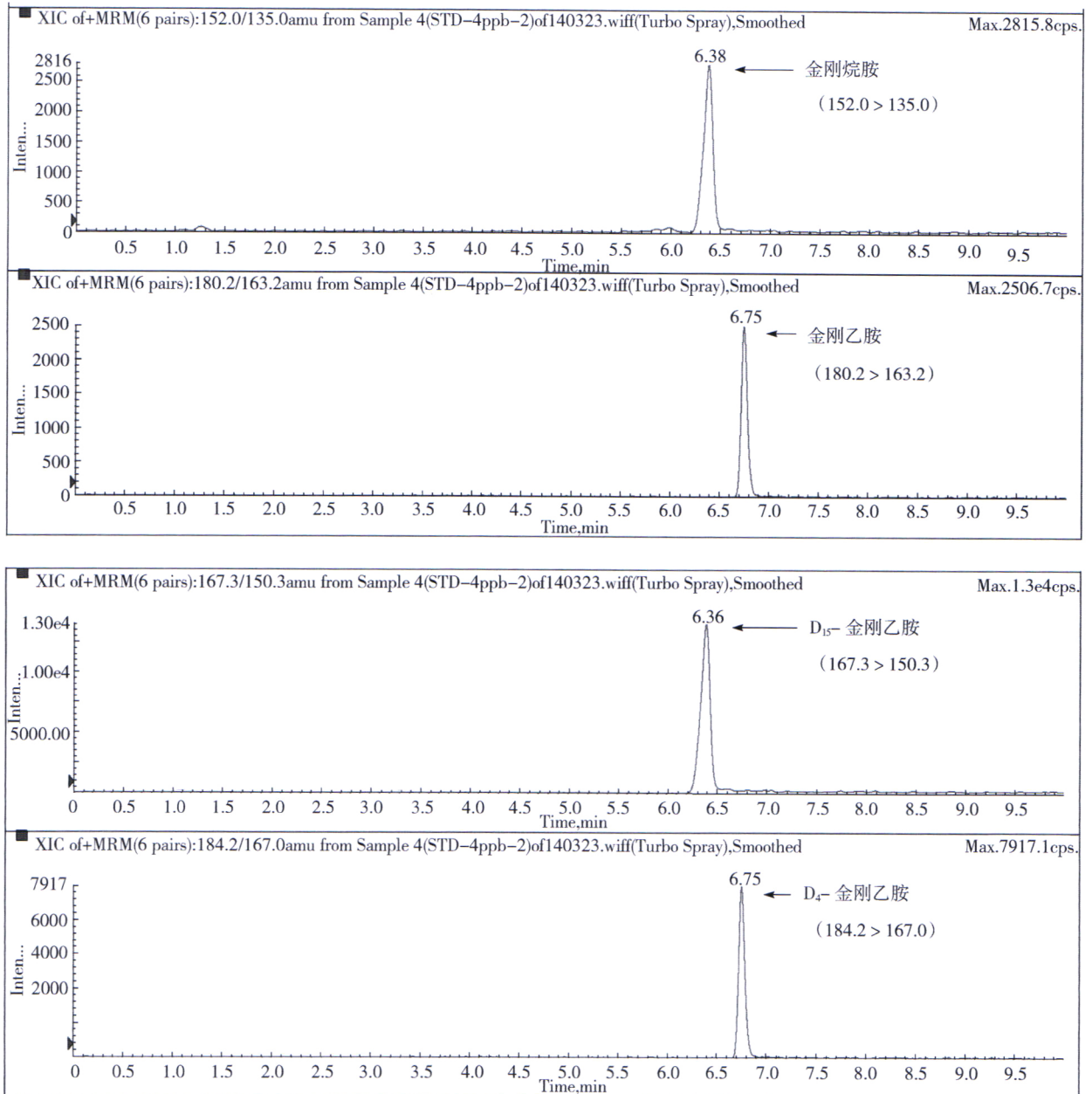


图 A.1 金刚烷胺和金刚乙胺标准溶液(金刚烷胺和金刚乙胺浓度为 4.0 $\mu\text{g/L}$, D₁₅-金刚烷胺和 D₄-金刚乙胺浓度为 20.0 $\mu\text{g/L}$) 特征离子质量色谱图