

饲料中金刚烷胺的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of amantadine in feeds —HPLC-MS/MS method

地方标准信息服务平台

2015 - 02 - 01 发布

2015 - 03 - 01 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林出入境检验检疫局提出并归口。

本标准起草单位：吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

本标准主要起草人：康明芹、胡婷婷、杨璐、宋清莲、赵韞慧、刘洋。

地方标准信息服务平台

料中金刚烷胺的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了配合饲料中金刚烷胺的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于配合饲料中金刚烷胺的定量测定和定性分析。

本方法的定量限为20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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，仅所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/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测

3 原理

试料用甲醇-1%三氯乙酸提取，提取液经混合型阳离子交换柱（MCX）净化，液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 三氯乙酸(CCl_3COOH)。
- 4.2 金刚烷胺($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}$)标准物质：CAS号768-94-5，纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。
- 4.4 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。
- 4.5 甲酸(HCOOH)：色谱纯，纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.6 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 4.7 异丙醇($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)。
- 4.8 盐酸(HCl)。
- 4.9 0.1%三氯乙酸溶液：称取1.00g三氯乙酸，用1000 mL水稀释并定容。
- 4.10 甲醇-0.1%三氯乙酸混合溶液(50+50)：取等体积的甲醇和0.1%三氯乙酸溶液(4.9)混匀。
- 4.11 2%盐酸：取20 mL盐酸，用水稀释并定容至1000 mL。
- 4.12 0.1%甲酸溶液：取1.0 mL甲酸(4.5)用1000 mL水稀释并定容。
- 4.13 氨水-甲醇-异丙醇混合溶液(5+80+15)：5 mL氨水，80 mL甲醇，15 mL异丙醇混合均匀。
- 4.14 乙腈-0.1%甲酸混合溶液(40+60)：量取40 mL乙腈与60 mL的0.1%甲酸溶液(4.12)，混匀。
- 4.15 金刚烷胺标准储备液：100.0 mg/L。准确称取适量金刚烷胺标准物质(4.2)用甲醇溶解并全部转移至50 mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。

4.16 金刚烷胺标准工作溶液：从标准储备溶液（4.15）中准确吸取 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释成 1.0 mg/L 标准中间溶液。使用时再根据需要用空白基质液（4.17）稀释配制成适当浓度的标准工作溶液，现用现配。

4.17 空白基质液：选择不含金刚烷胺且与待测样品同种类的试剂，按照测定步骤 7.1 和 7.2 处理得到空白基质液。

4.18 混合型阳离子交换固相萃取柱（MCX）：150 mg/6 mL。

4.19 滤膜：0.22 μm ，有机相。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪：配备电喷雾离子源（ESI）。

5.2 固相萃取仪。

5.3 离心机：10 000 r/min。

5.4 高速匀浆机：不低于 10 000 r/min。

5.5 超声波清洗器：40 kHz。

5.6 天平：感量 0.0001 g 和 0.01 g。

5.7 涡旋混合器。

5.8 氮吹仪。

5.9 标准筛：0.28 mm。

6 试样制备与保存

应按照 GB/T 27404-2008 附录 E 的规定对样品进行制备，过 0.28 mm 标准筛，装入干净的容器内混匀备用。在抽样及制样的操作过程中，应防止样品受到污染或待测物发生含量的变化。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2 g 试样（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 甲醇-0.1% 三氯乙酸混合溶液（4.10），涡旋混合 1 min，10 000 r/min 均质 1 min，超声提取 30 min 后，以 10 000 r/min 速度-4℃ 下离心 4 min，取上清液于 15 mL 试管中。

7.2 净化

7.2.1 手动净化

使用前依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水将固相萃取柱（4.18）进行预处理。取 5 mL 7.1 的上清液过柱，待全部通过后，依次 6 mL 2% 盐酸和 6 mL 甲醇淋洗，流速不超过 1.0 mL/min，弃去淋洗液。负压抽干，用 5 mL 氨水-甲醇-异丙醇混合溶液（4.13）洗脱，上样、淋洗和洗脱过程流速均不超过 1 mL/min。收集洗脱液至试管中，40℃ 以下氮气浓缩至近干，用乙腈-0.1% 甲酸混合溶液（4.14）溶解并定容至 1 mL，经滤膜（4.19）过滤，供 LC-MS/MS 测定。

7.2.2 自动净化

将 7.1 中上清液置于固相萃取仪中净化。固相萃取仪参考条件如下：

- a) 预处理程序：依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水预处理，流速均为 15 mL/min。
- b) 上样程序：取 5 mL 上柱，流速 1.0 mL/min。
- c) 淋洗程序：依次用 6 mL 2 % 盐酸和 6 mL 甲醇淋洗，流速 1.0 mL/min。
- d) 干燥程序：氮气吹干 2 min。
- e) 洗脱程序：用 5 mL 氨水-甲醇-异丙醇混合溶液（4.13）洗脱，流速 1.0 mL/min。
- f) 定容过程：收集洗脱液至试管中，40℃ 以下氮气浓缩至近干，用乙腈-0.1 % 甲酸混合溶液（4.14）溶解并定容至 1 mL，经滤膜（4.19）过滤，供 LC-MS/MS 测定。

7.3 空白试验

除不称取试料外，采取完全相同的分析步骤进行平行操作。

7.4 测定

7.4.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C18，2.1mm×150 mm，3.5 μm；
- b) 柱温：室温；
- c) 流速：0.20 mL/min；
- d) 进样量：10 μL；
- e) 流动相：乙腈-0.1 % 甲酸混合溶液。

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离（ESI）；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- d) 电离电压：5 kV；
- e) 脱溶剂气：0.75 MPa；
- f) 雾化气：0.625 MPa；
- g) 辅助气：0.625 MPa；
- h) 碰撞气：0.15 MPa；
- i) 离子源温度：550.0 ℃；
- j) 定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量见表 1。

表1 金刚烷胺的监测离子对、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 V
金刚烷胺	152	135 ^a	65	24
		107	65	36
		93	65	52
^a 定量离子。				

7.4.3 标准工作曲线

将浓度为20.0 μg/kg、40.0 μg/kg、80.0 μg/kg、100.0 μg/kg、200.0 μg/kg的金刚烷胺标准工作溶液，按参考色谱和质谱条件测定。以金刚烷胺质量浓度为横坐标，相应的峰面积响应值为纵坐标，进行线性回归分析。

7.4.4 定性分析

在同一色谱/质谱条件下进行标准溶液和样品溶液的测定，如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准物质色谱峰的保留时间一致，所选择的两对子离子的质荷比也一致，而且样品定性离子的相对丰度与浓度相当标准工作溶液的定性离子的相对丰度相比较，相对标准偏差不超过表2规定的范围，则可判定样品中存在该物质。标准溶液的多反应监测色谱图参见附录A。

表2 定性分析时相对离子丰度的最大允许偏差

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

7.4.5 定量测定

做两份试料的平行测定。根据试样中被测样液中被测组分的含量情况，选取响应值相近的标准工作液进行分析，对于高浓度样品须适当进行系列稀释。标准工作液和样液中被测组分的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述色谱条件下，金刚烷胺的参考保留时间为2.6 min，外标法定量。标准溶液的多反应监测色谱图参见附录A。同时做空白试验。

8 结果计算和表述

按（1）式计算试样中金刚烷胺含量，计算结果需扣除空白值。

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

式中：

X ——试样中金刚烷胺含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

c ——从标准曲线得到的金刚烷胺溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样液所代表的试料的质量，单位为克（g）。

注：计算结果保留至小数点后一位。

9 精密度

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大于这两个测定结果的算术平均值的15%。

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大于这两个测定结果的算术平均值的20%。

地方标准信息服务平台