



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 禽蛋中抗病毒类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of antiviral drugs residues in poultry eggs by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

禽蛋中抗病毒类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋和鸽子蛋中金刚烷胺、金刚乙胺、吗啉胍、阿昔洛韦、利巴韦林 5 种抗病毒类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋和鸽子蛋中金刚烷胺、金刚乙胺、吗啉胍、阿昔洛韦、利巴韦林 5 种抗病毒类药物残留量的测定，其他禽蛋可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中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

试料中残留的药物经 1% 乙酸乙腈提取，N-丙基乙二胺（PSA）和 C_{18} 粉净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准溶液校准，内标法定量。

5 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别说明外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（ $HCOOH$ ）：色谱纯。

5.1.4 乙酸（ CH_3COOH ）。

5.1.5 二甲基亚砷 (CH_3SOCH_3)。

5.2 溶液的配制

5.2.1 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水溶解并稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.2 1%乙酸乙腈：移取乙酸 10 mL，加乙腈并稀释至 1000 mL，混匀。

5.3 标准品

盐酸金刚烷胺、盐酸金刚乙胺、吗啉胍、阿昔洛韦、利巴韦林、盐酸金刚烷胺- D_{15} 、盐酸金刚乙胺- D_4 、阿昔洛韦- D_4 、利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$ 标准品，含量均 $\geq 95\%$ ，具体见附录 A。

注：标准品可为相应的盐。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：取抗病毒类药物各标准品适量 (相当于有效成分 10 mg)，精密称量，分别于 10 mL 棕色容量瓶中，阿昔洛韦用二甲基亚砷溶解并稀释至刻度，其他标准品用甲醇溶解并稀释至刻度，分别配制成浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标储备液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：取抗病毒类药物各同位素内标标准品适量 (相当于有效成分 1 mg)，精密称量，分别于 10 mL 棕色容量瓶中，阿昔洛韦- D_4 用二甲基亚砷溶解并稀释至刻度，其他同位素内标用甲醇溶解并稀释至刻度，分别配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的同位素内标储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准储备液：分别准确移取金刚烷胺、金刚乙胺、吗啉胍、阿昔洛韦标准储备液各 0.5 mL 和利巴韦林标准储备液 2.5 mL，于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (利巴韦林浓度为 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 3 个月。

5.4.4 混合内标储备液：分别准确移取金刚烷胺- D_{15} 、金刚乙胺- D_4 、美金刚- D_6 、阿昔洛韦- D_4 标准储备液各 0.5 mL 和利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$ 标准储备液 2.5 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$ 浓度为 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合内标储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 3 个月。

5.4.5 混合内标工作液：准确移取混合内标储备液 0.4 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度。该溶液中各内标浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ (利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$ 浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$)。现用现配。

5.4.6 混合标准工作液：准确移取混合标准储备液、混合内标储备液适量，用 0.1% 甲酸溶液逐级稀释成浓度为 0.5、2.0、5.0、10、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ (利巴韦林浓度为 2.5、10、25、50、100 和 250 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的系列标准工作溶液，每一标准工作溶液含各内标浓度均为 5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ (利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$ 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{L}$)。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 N-丙基乙二胺 (PSA)：40-60 目，或相当者。

5.5.2 C₁₈ 填料：40-60 目，或相当者。

5.5.3 针头式过滤器（通用型滤膜）：尼龙材质，孔径 0.22 μm，或性能相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 离心机：6 000 r/min 或以上。

6.4 涡旋混合器。

6.5 振荡器。

6.6 离心管：聚丙烯塑料离心管，50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，去壳后混合均匀。

——取均质后的供试料品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料（2±0.05）g，于50 mL离心管中，加混合内标工作液50 μL，再加入1%乙酸乙腈10.0 mL，涡旋1 min，振荡10 min，6000 r/min的速度离心3 min，收集上清液，备用。

8.2 净化

取全部备用液，转入装有 PSA 0.3 g、C₁₈ 0.3 g 的 50 mL 离心管中，涡旋混匀 1 min，6000 r/min 离心 2 min，移取上清液，50℃水浴中氮吹至干，用 0.1%甲酸溶液 2.0 mL 溶解残渣，涡旋混匀，0.22 μm 滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试样依次按8.1和8.2处理，50℃水浴氮气吹干后分别加入2.0 mL 5.4.6中的混合系列标准工作溶液，涡旋混匀，过0.22 μm滤膜，得内标浓度均为5.0 μg/L 的0.5、2.0、5.0、10、20和50 μg/L的系列基质匹配标准工作溶液（利巴韦林-¹³C₅浓度为25 μg/L，利巴韦林浓度为2.5、10、25、50、100和250 μg/L），供液相色谱-串联质谱测定。以定量离子对峰面积与相应内标物的离子对峰面积比值为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：二异丙基侧链基团的亲水型烷基键合硅胶色谱柱（100 mm×3.0 mm，1.8 μm），或相当者；
- b) 流动相：A：0.1%甲酸溶液，B：甲醇，梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：35℃；
- e) 进样量：10 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	0.1%甲酸溶液 (%)	甲醇 (%)
0	98	2
2.5	98	2
4.0	50	50
6.0	15	85
6.5	15	85
6.6	98	2
9.0	98	2

8.4.2 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) 毛细管电压：1.5 KV。

- e) RF透镜电压: 0.5 V。
- f) 离子源温度: 150 °C。
- g) 脱溶剂气温度: 500 °C。
- h) 锥孔气流速: 50 L/h。
- i) 脱溶剂气流速: 1000 L/h。
- j) 倍增器电压: 650 V。
- k) 二级碰撞气: 氦气。
- l) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表2。

表2 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和锥孔电压

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 <i>V</i>	碰撞能量 <i>eV</i>
金刚烷胺	152.1>79.2	152.1>79.2	64	26
	152.1>93.2			24
金刚乙胺	180.2>93.1	180.2>163.4	22	26
	180.2>163.4			14
吗啉胍	172.1>85.2	172.1>113.1	74	18
	172.1>113.1			18
阿昔洛韦	226.1>135.1	226.1>152.1	26	28
	226.1>152.1			10
利巴韦林	245.0>96.1	245.0>113.1	2	26
	245.0>113.1			8
金刚烷胺-D ₁₅	167.1>86.2	167.1>86.2	64	28
金刚乙胺-D ₄	184.2>167.4	184.2>167.4	22	14
美金刚-D ₆	186.2>169.2	186.2>169.2	22	14
阿昔洛韦-D ₄	230.1>152.1	230.1>152.1	26	10
利巴韦林- ¹³ C ₅	250.0>113.1	250.0>113.1	2	8

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值与标准溶液中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值相对偏差在±1%以内, 且检测到的离子的相对丰度, 应当与浓度相当的基质匹配标准工作溶液相对丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和基质匹配标准工作溶液，作单点或多点校准，内标法计算。有相应内标物的药物选择对应的同位素内标物进行定量，吗啉胍选择利巴韦林-¹³C₅进行定量。基质匹配标准工作溶液及试样溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下，鸡蛋基质标准溶液多反应监测色谱图见附录 B.1。对于试料中抗病毒类药物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。

8.5 空白试验

除不加试料外，均按上述测定步骤进行。

9 结果计算和表述

试料中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is} V}{A_{is} A_s C'_{is} m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样溶液中抗病毒类药物的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_{is} ——试样溶液中抗病毒类药物内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

C_s ——对照溶液中抗病毒类药物浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

C'_{is} ——对照溶液中抗病毒类药物内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

A_i ——试样溶液中抗病毒类药物的峰面积；

A_{is} ——试样溶液中抗病毒类药物内标的峰面积；

A_s ——对照溶液中抗病毒类药物的峰面积；

A'_{is} ——对照溶液中抗病毒类药物内标的峰面积；

V ——定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试料的质量，单位为克（ g ）；

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

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法利巴韦林在禽蛋中的检测限为 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ，其他药物在禽蛋中的检测限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

本方法利巴韦林在 $5.0\sim 125\mu\text{g}/\text{kg}$ ，其他药物在 $1.0\sim 25\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A (资料性附录)

抗病毒类药物和利巴韦林代谢物的英文名称、分子式、CAS号

抗病毒类药物和利巴韦林代谢物的英文名称、分子式和CAS号见表A.1。

表A.1 抗病毒类药物和利巴韦林代谢物的英文名称、分子式、CAS号

化合物	英文名	分子式	CAS号
盐酸金刚烷胺	amantadine hydrochloride	C ₁₀ H ₁₇ N.HCl	665-66-7
盐酸金刚乙胺	rimantadine hydrochloride	C ₁₂ H ₂₁ N.HCl	1501-84-4
吗啉胍	moroxydine	C ₆ H ₁₃ N ₅ O	3731-59-7
阿昔洛韦	acyclovir	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	59277-89-3
利巴韦林	ribavirin	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	36791-04-5
2H-1,2,4-三氮唑-3-甲酰胺	2H-1,2,4-triazole-3-carboxamide	C ₃ H ₄ N ₄ O	3641-08-5
盐酸金刚烷胺-D ₁₅	amantadine-D ₁₅ hydrochloride	C ₁₀ H ₂ D ₁₅ N.HCl	33830-10-3
盐酸金刚乙胺-D ₄	rimantadine-D ₄ hydrochloride	C ₁₂ H ₁₇ D ₄ N.HCl	350818-67-6
阿昔洛韦-D ₄	acyclovir-D ₄	C ₈ H ₇ D ₄ N ₅ O ₃	1185179-33-2
利巴韦林- ¹³ C ₅	ribavirin- ¹³ C ₅	C ₃ ¹³ C ₅ H ₁₂ N ₄ O ₅	1646818-35-0

附录 B (资料性附录)

标准工作溶液MRM色谱图

标准工作溶液特征离子质量色谱图见图B1。

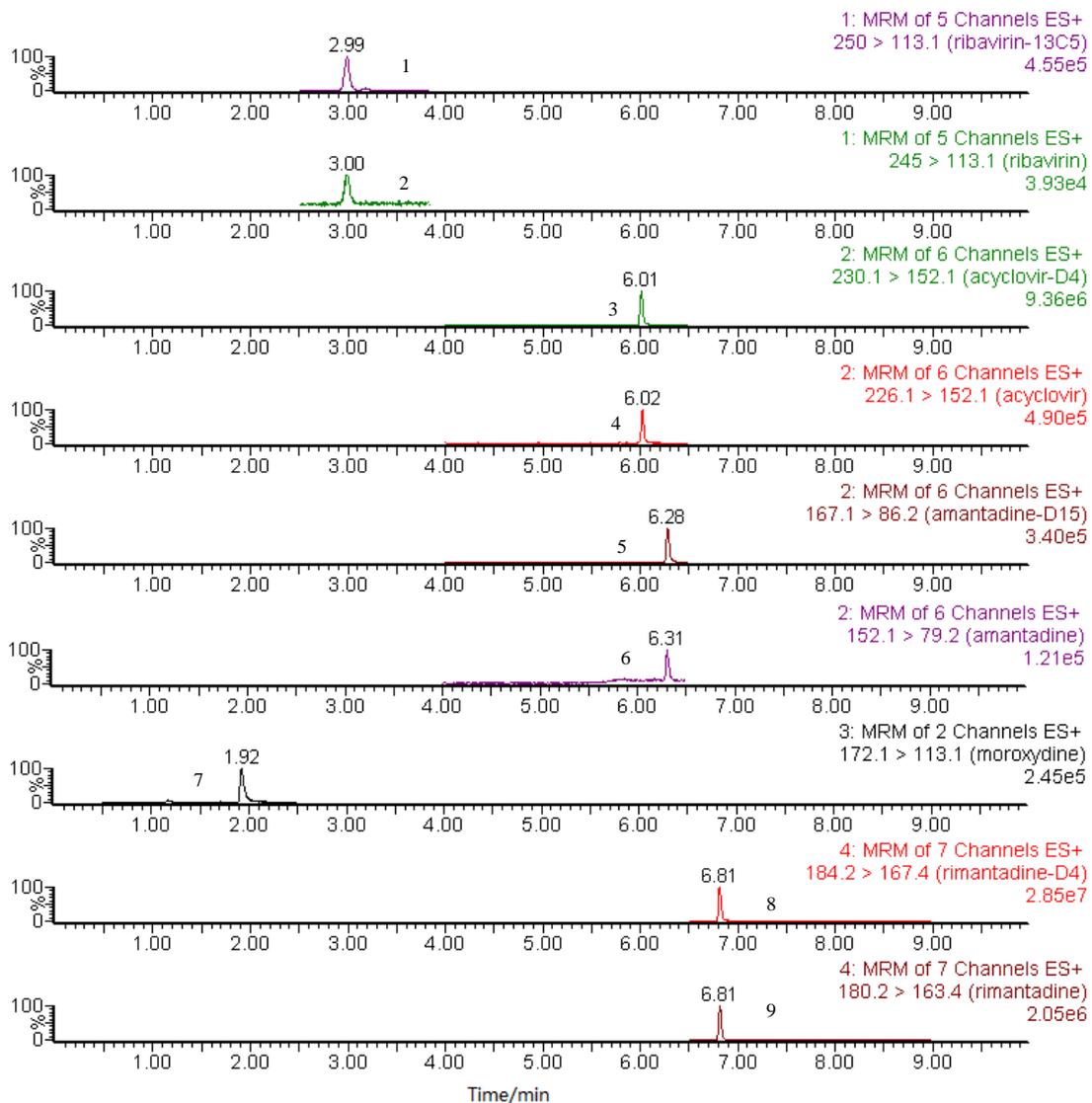


图 B.1 标准工作溶液特征离子质量色谱图(利巴韦林浓度为2.5 $\mu\text{g/L}$, 利巴韦林-¹³C₅浓度为25 $\mu\text{g/L}$, 其余药物浓度0.5 $\mu\text{g/L}$, 其余内标物浓度5.0 $\mu\text{g/L}$)

注: 1—利巴韦林-¹³C₅; 2—利巴韦林; 3—阿昔洛韦-D₄; 4—阿昔洛韦; 5—金刚烷胺-D₁₅; 6—金刚烷胺; 7—吗啉胍; 8—金刚乙胺-D₄; 9—金刚乙胺。