



中华人民共和国国家标准

GB/T××××—××××

食品安全国家标准
蜂产品中4种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 four antiviral drugs residues in bee products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××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》的规定起草编制。

征求意见稿

食品安全国家标准

蜂产品中 4 种抗病毒类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂产品中抗病毒类药物残留量测定的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中吗啉胍，金刚烷胺，金刚乙胺和美金刚残留量的测定。

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 分析实验室用水规则和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

蜂蜜和蜂王浆中的残留药物用乙腈溶液提取，苯硼酸固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂和材料

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₄OH）。

5.1.5 乙酸铵（CH₃COONH₄）。

5.2 溶液配制

4.5.1 0.1%甲酸溶液：取甲酸 100 μL，用水稀释至 100 mL，混匀。

4.5.2 0.5%甲酸溶液：取甲酸 500 μL，用水稀释至 100 mL，混匀。

4.5.3 1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

4.5.4 20%甲醇溶液：取甲醇 20 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

4.5.5 80%乙腈溶液：取乙腈 80 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

4.5.6 乙酸铵溶液 (0.2 mol/L, pH 8.5) : 取乙酸铵 1.54 g, 用水溶解并稀释至 100mL, 氨水调节 pH 至 8.5。

4.5.7 0.1%甲酸+甲醇溶液: 取 0.1%甲酸溶液 10 mL, 用甲醇定容至 100 mL, 混匀。

4.5.8 0.5%甲酸+甲醇溶液: 取甲醇 5mL, 用 0.5%甲酸溶液稀释至 100 mL, 混匀。

4.5.9 1%甲酸+甲醇溶液: 取 1%甲酸溶液 40 mL, 用甲醇稀释至 100 mL, 混匀。

5.3 标准品及其纯度: 金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、吗啉胍、金刚烷胺-d₁₅、金刚乙胺-d₄、美金刚-d₆ 和吗啉胍-d₈, 含量均≥99%, 具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 抗病毒类药物及其内标物标准储备液: 分别称取吗啉胍及其同位素内标标准品约 10 mg, 用 0.1%甲酸-甲醇溶液溶解并定容至 10 mL, 配制成 1000 μg/mL 的标准储备液。分别称取金刚烷胺、金刚乙胺和美金刚及其同位素内标标准品约 10 mg, 用甲醇溶解后定容至 10 mL, 配制成 1000 μg/mL 的标准储备液。于-18 °C 以下避光保存, 有效期 3 个月。

5.4.2 抗病毒类药物混合标准中间液: 依次吸取 4 种抗病毒类药物标准储备液 100 μL, 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液定容至刻度, 配制成浓度为 10 μg/mL 的混合标准工作液。于-18 °C 以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.4.3 抗病毒类药物混合标准工作液: 精密量取抗病毒类药物混合标准中间液适量, 用 0.5%甲酸-甲醇溶液将其稀释成 0.1 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、500 μg/L 的系列浓度标准工作液。现用现配。

5.4.4 抗病毒类药物同位素内标混合标准中间液: 依次吸取 4 种抗病毒类药物同位素内标标准储备液 100 μL, 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液定容至刻度, 配制成吗啉胍-d₈、金刚烷胺-d₁₅、金刚乙胺-d₄ 和美金刚-d₆ 浓度为 10 μg/mL 的抗病毒类药物同位素内标混合标准工作液。于-18 °C 以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.4.5 抗病毒类药物同位素内标混合标准工作液: 吸取抗病毒类药物同位素内标混合标准中间液 100 μL, 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.5%甲酸-甲醇溶液定容至刻度, 配制成吗啉胍-d₈、金刚烷胺-d₁₅、金刚乙胺-d₄ 和美金刚-d₆ 浓度为 100 ng/mL 的抗病毒类药物同位素内标混合标准工作液。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 苯硼酸固相萃取柱: 500 mg/6 mL, 或相当者。

5.5.2 水系滤膜: 0.22 μm。

5.5.3 增强型脂质去除净化包 (EMR-Lipid)¹或相当者。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。

6.2 涡旋混合器。

6.3 高速冷冻离心机: 转速 8000 r/min 或以上, 可控温度 4 °C。

6.4 水浴振荡器。

6.5 氮吹仪。

6.6 分析天平: 感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.7 移液器: 10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL、5000 μL。

¹ 此处列出 EMR 吸附净化包仅是为了提供参考, 并不涉及商业目的, 鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的净化包。

6.8 pH计。

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空白或供试蜂产品，将其搅拌均匀。对有结晶的蜂蜜样品，在密闭情况下，置于不超过60℃的水浴中解晶，待样品全部融化后搅匀，冷却至室温。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

- a) 取均质后的供试样品，作为供试试样；
- b) 取均质后的空白样品，作为空白试样；
- c) 取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

蜂蜜样品于室温下避光保存；蜂王浆样品于-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取蜂蜜试料(2±0.05)g于50 mL具塞塑料离心管中，依次加入同位素内标混合标准工作液100 μL和80%乙腈溶液10 mL，振荡5 min，于4℃下8000 r/min离心10 min，取全部上清液，加水至30 mL，用氨水调pH至8.5±0.02，备用。

称取蜂王浆试料(1±0.05)g于50 mL具塞塑料离心管中，依次加入同位素内标混合标准工作液100 μL和乙腈溶液6 mL，振荡5 min，于4℃下8000 r/min离心10 min，取全部上清液至预先加入3.6 mL水活化的EMR净化包，振荡3 min，于4℃下8000 r/min离心10 min，取全部上清液，加水至20 mL，用氨水调pH至8.5±0.02，备用。

8.2 净化

固相萃取柱预先依次用乙腈10 mL，水10 mL和0.2 mol/L乙酸铵(pH 8.5)10 mL活化，备用液以≤1滴/秒的流速通过固相萃取柱，待备用液完全流出后，依次用水10 mL和20%甲醇溶液10 mL洗柱，弃去全部流出液，负压抽干，用8 mL甲醇-1%甲酸溶液洗脱，洗脱液收集于10 mL离心管中，于40℃下氮吹至近干，1.0 mL 0.5%甲酸-甲醇溶液复溶，经0.22 μm滤膜过滤待测。蜂王浆的洗脱液上机前用0.5%甲酸水-甲醇(95+5)稀释10倍后测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液和同位素内标混合标准工作液适量，分别加入经提取和净化的空白试料残渣中，45℃水浴氮气吹干，加入0.5%甲酸水-甲醇溶液1.0 mL涡旋溶解残余物，配制成浓度为0.1 μg/L、1.0 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、500 μg/L的蜂蜜和蜂王浆基质匹配系列混合标准溶液，内标溶液浓度为10 μg/L，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积的平均值与内标的峰面积比作为纵坐标，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：可耐受100%水相的极性修饰烷基反相色谱柱(100×2.1 mm, 2.7 μm) 或相当者；
 b) 流动相：A相：0.1%甲酸溶液，B相：甲醇，洗脱梯度条件见表1；
 c) 流速：0.3 mL/min；
 d) 柱温：30 ℃；
 e) 进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
2	100	0
3	75	25
4.5	60	40
6.5	25	75
7	5	95
9	5	95
9.1	100	0
12	100	0

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
 b) 扫描方式：正离子模式；
 c) 检测方式：多反应监测（MRM）；
 d) 干燥气温度：300 ℃；
 e) 干燥气流速：13 L/min；
 f) 雾化器压力：30 psi；
 g) 鞘气温度：325 ℃；
 h) 鞘气流速：11 L/min；
 i) 毛细管电压：3500 V；
 选择离子参数设定见表2。

表 2 选择离子参数设定

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
金刚烷胺	152.2>135.2 (23) 152.2>93.1 (30)	152.2>135.2 (23)
金刚乙胺	180.2>163.2 (12) 180.2>81.1 (24)	180.2>163.2 (12)
美金刚	180.1>163.2 (12) 180.1>91.1 (38)	180.1>163.2 (12)
吗啉胍	172.1>60.3 (18) 172.1>113.2 (22)	172.1>60.3 (18)
金刚烷胺-d ₁₅	167.3>86.2 (36)	167.3>86.2 (36)
金刚乙胺-d ₄	184.2>167.2 (12)	184.2>167.2 (12)

美金刚-d ₆	186.2 > 169.3 (12)	186.2 > 169.3 (12)
吗啉胍-d ₈	180.1 > 121.0 (20)	180.1 > 121.0 (20)

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试样溶液中抗病毒类药物与其内标的保留时间之比与基质匹配标准溶液中抗病毒类药物与其内标的保留时间之比的偏差在1%之内;且检测到的相对离子丰度,应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应穿插标准工作液,以便准确定量。4种抗病毒类药物及其同位素内标标准溶液的多反应监测色谱图参见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中抗病毒类药物的残留量 X ,按标准曲线或公式(1)计算:

$$X = \frac{C_S \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_S \times A_{is} \times m \times 1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

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

C_S — 基质匹配标准溶液中抗病毒类药物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{is} — 试样溶液中抗病毒类药物内标物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C'_{is} — 基质匹配标准溶液中抗病毒类药物内标物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_i — 试样溶液中抗病毒类药物的峰面积;

A_S — 基质匹配标准溶液中抗病毒类药物峰面积;

A_{is} — 试样溶液中抗病毒类药物内标物峰面积;

A'_{is} — 标准溶液中抗病毒类药物内标物峰面积;

V — 试样最终定容体积,单位为毫升(mL);

m — 试样质量,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法蜂蜜和蜂王浆中金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、吗啉胍检测限为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在蜂蜜中 $1-50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,其回收率范围为70%~110%;在蜂王浆中 $1-50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,其回收率范围为70%~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 $\leq 20\%$ 。

征求意见稿

附录 A

(资料性)

抗病毒类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

抗病毒类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1. 抗病毒类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
金刚烷胺	Amantadine	$C_{10}H_{17}N$	768-94-5
金刚乙胺盐酸盐	Rimantadine hydrochloride	$C_{12}H_{21}N \cdot HCl$	1501-84-4
美金刚盐酸盐	Memantine hydrochloride	$C_{12}H_{21}N \cdot HCl$	41100-52-1
吗啉胍	Moroxydine hydrochloride	$C_6H_{13}N_5O \cdot HCl$	3160-91-5
金刚烷胺-d ₁₅	Amantadine-d ₁₅	$C_{10}H_2D_{15}N$	33830-10-3
金刚乙胺-d ₄	Rimantadine-d ₄	$C_{12}H_{17}D_4N$	350818-67-6
美金刚-d ₆	Memantine-d ₆	$C_{12}H_{15}D_6N$	1189713-18-5
吗啉胍-d ₈	Moroxydine-d ₈	$C_6H_5D_8N_5O$	3160-91-6

附录 B

(资料性)

4 种抗病毒类药物及其同位素内标混合标准溶液的质量色谱图见图 B.1

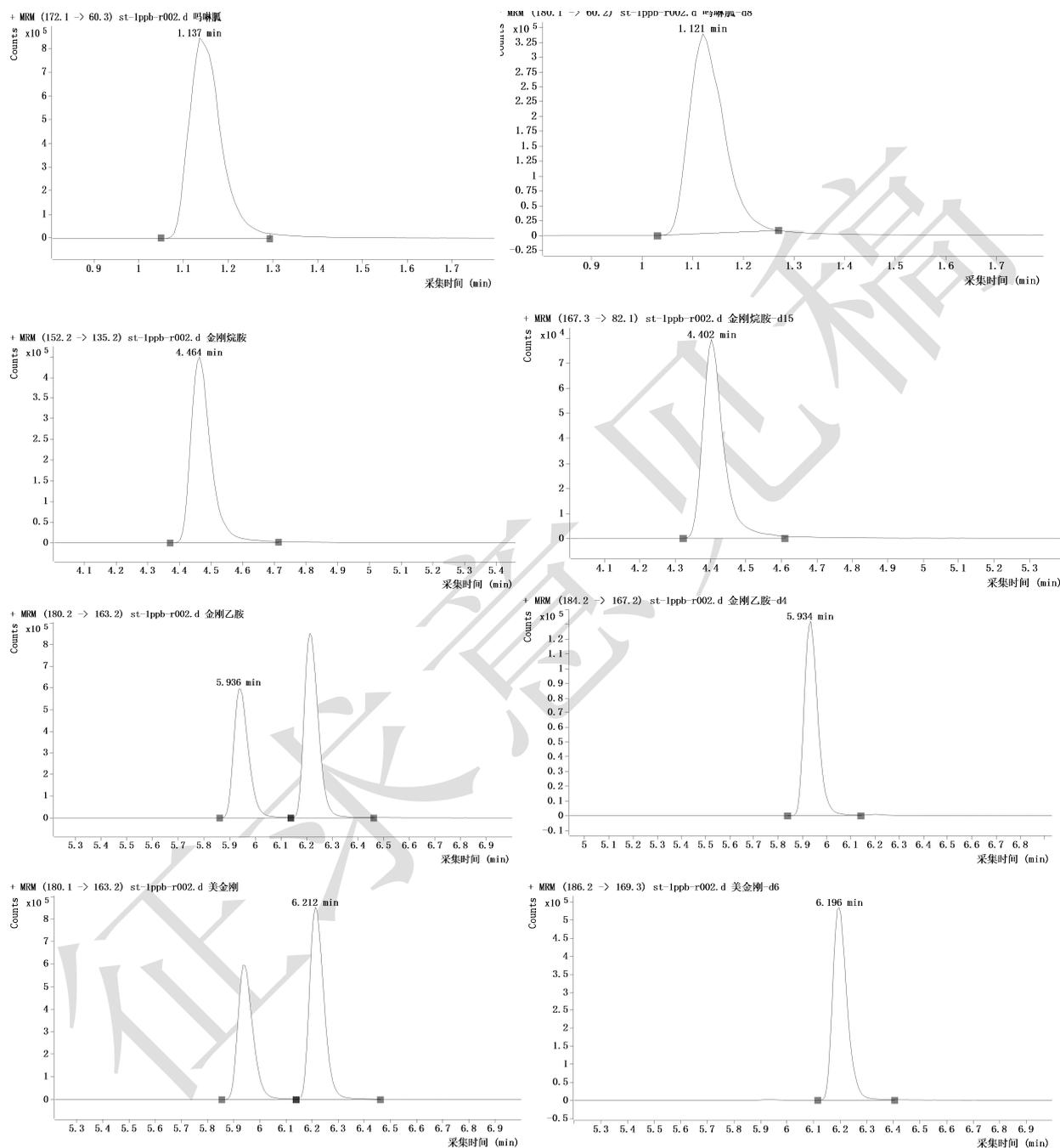


图 B.1. 4 种抗病毒类药物及其同位素内标标准溶液特征离子质量色谱图 (1 μg/L)

物及其同位素内标标准溶液