

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第197号—6—2019

饲料中利巴韦林等7种抗病毒类 药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 7 antiviral drugs including ribavirin in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019-08-01 发布

2020-01-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:上海市兽药饲料检测所。

本标准主要起草人:黄士新、吴剑平、潘娟、张婧、严凤、商军、顾欣、姜芹、田恺、张亦菲、张浩然。

饲料中利巴韦林等 7 种抗病毒类药物的测定 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、吗啉胍、金刚乙胺、阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦和奥司他韦 7 种抗病毒类药物的液相色谱-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、吗啉胍、金刚乙胺、阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦和奥司他韦 7 种抗病毒类药物的测定。

本标准方法的检出限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 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 原理

用甲酸铵缓冲溶液和乙腈提取试样中的 7 种抗病毒类药物, 再经分散固相萃取净化后, 用亲水相互作用色谱-串联质谱法测定, 以基质匹配标准外标法定量。

4 试剂或材料

除特殊注明外, 本法所用试剂均为分析纯。

4.1 水: GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 甲醇: 色谱纯。

4.4 甲酸: 色谱纯。

4.5 丙基乙二胺(Primary secondary amine, PSA); 60 目。

4.6 无水硫酸镁。

4.7 甲酸铵溶液(0.05 mol/L): 取 3.15 g 甲酸铵用水溶解后定容至 1 L, 用甲酸(4.4)调 pH 至 4.3 ± 0.1 。

4.8 抗病毒类药物标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别准确称取金刚烷胺、吗啉胍、金刚乙胺、阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦和奥司他韦对照品(含量大于 97%)各 20 mg(精确至 0.01 mg), 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇(4.3)溶解并定容至刻度, 配制成浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, -20°C 以下保存, 有效期为 3 个月。

4.9 抗病毒类药物混合标准中间溶液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别取 7 种抗病毒类药物标准储备液 1 mL 置 200 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释并定容至刻度, 配制成浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间溶液, -20°C 以下保存, 有效期为 1 个月。

4.10 尼龙滤膜: 0.22 μm 。

5 仪器设备

5.1 pH 计。

5.2 分析天平: 感量 0.01 mg 和感量 1 mg。

- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 高速冷冻离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 台式离心机:转速不低于 14 000 r/min。
- 5.7 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6 样品

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取约 200 g,按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。准确称取 2.00 g 试样(精确至 1 mg)置于 50 mL 离心管中,加 5 mL 0.05 mol/L 甲酸铵溶液(4.7),涡旋振匀,8 000 r/min 离心 3 min,收集上清液;残渣加入 5 mL 乙腈振荡提取残渣 3 min,8 000 r/min 离心 3 min 后收集上清液。重复上述整个提取过程 1 次,合并上清液作为提取液备用。

7.2 净化

移取提取液(7.1)200 μ L,加入乙腈 800 μ L 稀释后,依次加入无水硫酸镁(4.6)100 mg、PSA 粉(4.5) 100 mg,涡旋 1 min 后 14 000 r/min 离心 3 min,取上清液,过 0.22 μ m 尼龙滤膜(4.10)后作为试样溶液待测。

7.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样,按 7.1 与 7.2 中前处理方法操作后获得 6 份空白基质溶液,分别取抗病毒类药物混合标准中间溶液(4.9)适量,以空白基质溶液进行稀释,配制成 0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL 基质匹配标准系列溶液待测。若需使用单点校准,则必须配制在此标准曲线进样浓度范围(0.5 ng/mL~100 ng/mL)内的与样品溶液峰面积最接近的基质匹配标准溶液进行校准。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:亲水相互作用(HILIC)色谱柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒度 2.6 μ m 或柱效相当者。
流动相 A:甲酸铵溶液(4.7);流动相 B:乙腈,梯度洗脱,洗脱程序见表 1。
柱温:30℃。
进样量:10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	流速,mL/min	流动相 A,%	流动相 B,%
0.00	0.3	10	90
0.50	0.3	10	90
3.00	0.3	30	70
5.00	0.3	30	70
5.10	0.3	10	90
8.00	0.3	10	90

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:选择反应监测(SRM)。
电离电压:3 900 V。

离子传输管温度:350℃。

雾化温度:400℃。

鞘气压力:344 kPa。

辅助气流速:5 L/min。

吹扫气流速:0.3 L/min。

碰撞气压力:0.2 Pa。

抗病毒类药物定性与定量离子对及保留时间、碰撞能量和透镜电压的参考值见表 2。

表 2 抗病毒类药物定性与定量离子对及保留时间、碰撞能量和透镜电压的参考值

化合物	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 eV	透镜电压 V
金刚烷胺	3.6	152.1>135.2	152.1>135.2	10	61
		152.1>79.2		32	
吗啉胍	4.4	172.2>113.2	172.2>113.2	21	75
		172.2>85.1		18	
金刚乙胺	3.1	180.1>163.2	180.1>107.2	15	79
		180.1>107.2		25	
阿昔洛韦	2.2	226.0>152.2	226.0>152.2	12	72
		226.0>135.1		29	
利巴韦林	1.5	245.0>113.1	245.0>113.1	10	48
		245.0>133.2		11	
更昔洛韦	2.8	256.2>152.1	256.2>152.1	13	62
		256.2>135.1		33	
奥司他韦	3.5	313.2>166.1	313.2>166.1	18	68
		313.2>225.0		10	

7.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(7.3)和试样溶液(7.2)上机测定,标准曲线的线性相关系数不低于 0.98。

7.4.4 定性

待测物选择 1 个母离子和 2 个子离子,在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与基质匹配标准系列溶液中对应的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且试样中目标化合物 2 个子离子的相对丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对离子离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分率

相对离子丰度	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.5 定量

试样溶液(7.2)和基质匹配标准溶液(7.3)上机分析所得色谱峰面积的响应值作单点或多点校准,用外标法定量。7 种抗病毒药物基质匹配标准溶液(10 ng/mL)的色谱图参见附录 A。

8 试验数据处理

试样中抗病毒类药物的含量按式(1)、式(2)和式(3)计算。

标准曲线校准:由 $A_s = aC_s + b$,求得 a 和 b ,则

$$C = \frac{A - b}{a} \dots\dots\dots (1)$$

或单点校准:

$$C = \frac{C_s A}{A_s} \dots\dots\dots (2)$$

按式(3)计算试料中抗病毒类药物含量。

$$\omega = \frac{(800 + 200)CV}{200m} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

C —— 试样溶液中单种抗病毒类药物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A —— 试样溶液中单种抗病毒类药物峰面积;

C_s —— 基质匹配标准系列溶液中单种抗病毒类药物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_s —— 基质匹配标准系列溶液中单种抗病毒类药物峰面积;

ω —— 试样中抗病毒类药物的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);

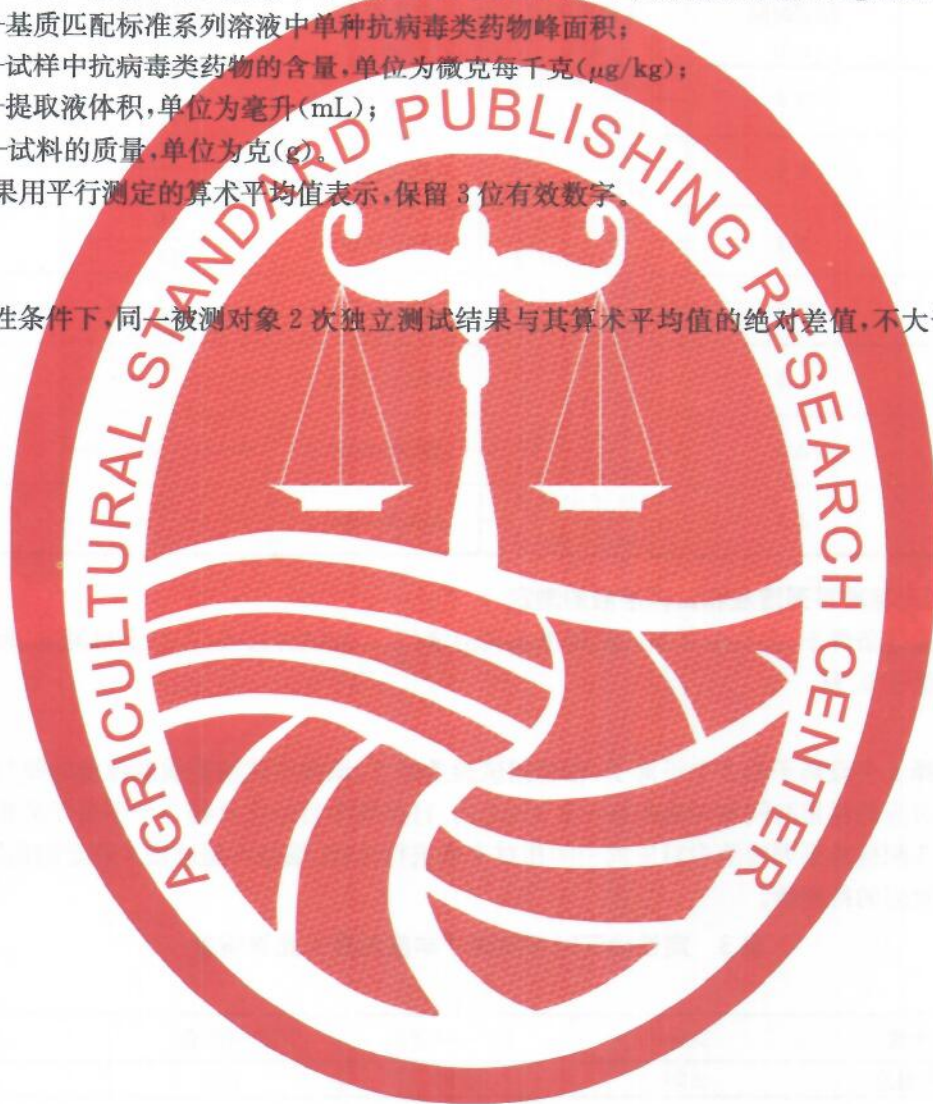
V —— 提取液体积,单位为毫升(mL);

m —— 试料的质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 精密度

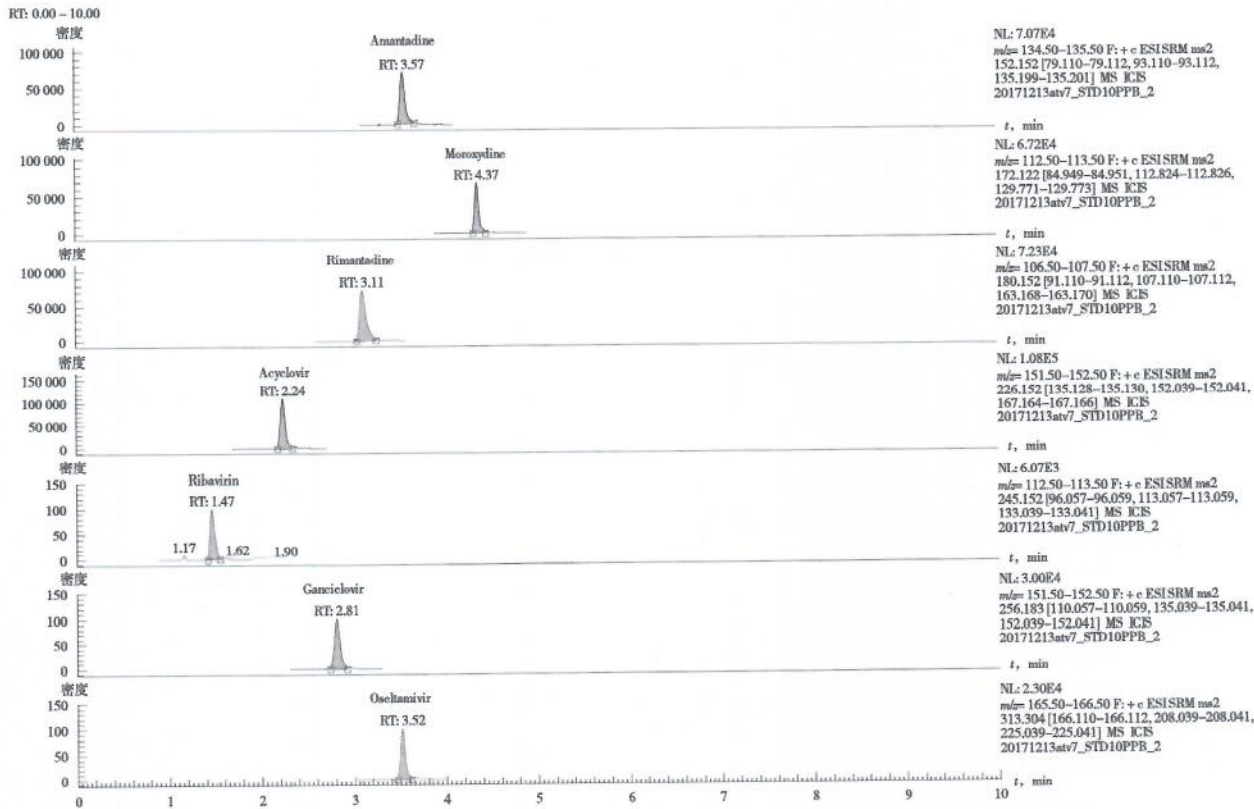
在重复性条件下,同一被测对象 2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值,不大于该平均值的 20%。



附录 A
(资料性附录)

7 种抗病毒类药物基质匹配标准溶液 (10 ng/mL) 的色谱图

7 种抗病毒药物基质匹配标准溶液 (10 ng/mL) 的色谱图见图 A. 1。



注: 从上至下依次为金刚烷胺 (Amantadine)、吗啉胍 (Moroxydine)、金刚乙胺 (Rimantadine)、阿昔洛韦 (Acyclovir)、利巴韦林 (Ribavirin)、更昔洛韦 (Ganciclovir)、奥司他韦 (Oseltamivir)。

图 A. 1 7 种抗病毒药物基质匹配标准溶液 (10 ng/mL) 的色谱图

中华人民共和国
国家标准
饲料中利巴韦林等7种抗病毒类药物的测定
液相色谱-串联质谱法

农业农村部公告第197号—6—2019

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2019年12月第1版 2019年12月北京第1次印刷

书号:16109·4961

定价:18.00元

版权专有 侵权必究
举报电话:(010) 59194261



农业农村部公告第197号—6—2019