

《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》地方标准编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

2019年9月4日，山东省市场监督管理局印发《关于印发2019年度标准化综合改革暨山东标准建设项目计划的通知》（鲁标改办发（2019）6号），将《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》列入山东省地方标准制修订计划，项目编号为16，由山东省海洋局提出，山东省海洋标准化技术委员会（鲁TC20）归口，由山东省海洋资源与环境研究院起草。

（二）起草单位、起草人及任务分工

本标准起草单位是山东省海洋资源与环境研究院、中国海洋大学。山东省海洋资源与环境研究院是一所拥有60余年海洋与渔业科研历史、多学科综合性的省属公益性重点科研机构。承担国家、省部等公益性科研项目数百项，成果获各级奖励120余项，多项成果达国际领先及国际先进水平。水产品质量检验中心从属山东省海洋资源与环境研究院，中心挂农业农村部渔业产品质量监督检验测试中心（烟台）牌子，为山东省制订和实施渔业法规、保障水产品食用安全、促进海洋和渔业可持续发展，提供了强有力的科学依据和技术支持。中心先后起草了GB 31660.3-2019《食品安全国家标准 水产品中氟乐灵残留量的测定 气相色谱法》、GB

31660.2-2019《食品安全国家标准 水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留量的测定 气相色谱-质谱法》、农业部 1163 号公告-9-2009《水产品中己烯雌酚残留检测气相色谱-质谱法》等十余项国家、行业标准和 DB37/T 2095-2012《水产品中乙酰甲喹残留量的测定 液相色谱法》等近 30 项检测类山东省地方标准，并参与《食品安全国家标准 水产品中红霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》等十余项标准的验证工作，熟悉标准制定工作。项目组主要成员均参加过全国水产标准化技术委员会举办的标准培训班并获得证书，主持、参与上述国家标准、行业及地方标准，熟悉标准的制修订工作。

标准主要起草人及任务分工：

田秀慧：主持调查研究、标准内容设计、标准起草和修改等全部工作；

刘小静：参与调查研究、标准内容设计等工作；

刘昕：参与调查研究、标准内容设计等工作；

任传博：参与调查研究、标准内容设计、标准起草和修改、实验室分析等工作；

张秀珍：参与调查研究、标准内容设计等工作；

孙春晓：参与调查研究、标准内容设计等工作；

薛敬林：参与调查研究、标准起草和修改、实验室分析等工作；

崔艳梅：参与调查研究、实验室分析等工作；

韩典峰：参与调查研究、实验室分析等工作；

罗晶晶：参与调查研究、征求意见等工作；

王丹：参与调查研究、征求意见等工作；

徐英江：参与调查研究、实验室分析等工作；

宫向红：参与调查研究、实验室分析等工作；

张华威：参与调查研究、实验室分析等工作；

李振兴：参与征求意见等工作。

（三）起草过程

1. 立项情况

金刚烷胺因其疗效显著且价格低廉，一度成为养殖户防治流感病毒的常用药。2012年11月备受关注的“速成鸡”事件中，某些养殖企业非法使用金刚烷胺等违禁药物所带来的食品安全问题，引起了人们的普遍关注。2012年由于我国国内出现鸡肉使用抗菌剂的报道，2013年，日本厚生劳动省医药食品安全部为了安全起见将金刚烷胺的检测加入到进口食品监控计划中。基于此，山东省海洋资源与环境研究院提出了该标准的立项申请。

山东省海洋标准化技术委员会召开标准研讨会。邀请专家对标准的申请文件进行了审阅，与会专家对申请立项的《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》进行初审，审核了拟申报标准项目标准草案及编制说明，规范了标准的格式及用词用语，对必要性进行了论证，在修订标准的必要性、可行性等方面统一了认识。2019年9月4日，

山东省市场监督管理局印发《关于印发 2019 年度标准化综合改革暨山东标准建设项目计划的通知》（鲁标改办发（2019）6 号），将《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》列入山东省地方标准制修订计划。

2. 起草阶段

在接到《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》标准制定任务后，成立了标准制定小组，在仪器设备、试验材料和资料检索等方面做了充分准备，并对所检索到的资料进行了综合分析，在已建立的海水中金刚烷胺残留的测定 液相色谱串联质谱法的基础上，依据 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》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分：试验方法标准》，完成了本文件的征求意见稿，并请农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（广州）、农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（舟山）和烟台海关技术中心进行方法验证试验，汇总了验证实验数据。

3. 征求意见阶段

2020 年 1 月至 3 月（时间符合“公开征求时间满足至少 30 天”的要求），通过电子邮件和电话问询的方式对三十家单位征求了意见，其中发送“征求意见稿”的单位数 30 个；收到“征求意见稿”后，回函的单位数 30 个；收到“征求意见稿”回函并有建议或意见的单位数 16 个。专家意见涉及征求意见稿和编制说明的主要内容和结构。按照意见对主要内容进

行了修订，主要对表述和写法进行了修改，使其符合相关规定；同时对文本的结构进行了调整和优化。对征求意见稿进行修改完善后，提交山东省海洋标准化服务平台进行公示，完成了本文件的送审稿。

4. 送审阶段

2021 年 11 月 19 日，山东省海洋局、山东省海洋标准化技术委员会在济南组织召开了山东省地方标准《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》专家论证会议。会议邀请专家组成标准论证专家组，与会专家听取了起草单位关于标准编制情况的汇报和说明，经质询讨论，形成专家意见如下：该标准符合有关法律、法规和强制性标准的要求，与相关国家标准、行业标准和地方标准的相协调；文本编写规范，符合 GB/T 1.1-2020 的要求。该标准技术内容完整，具有可靠性和可操作性，为开展海洋生物体中的金刚烷胺测定提供了技术依据。起草单位按照专家提出的意见进行修改完善，按程序进行送审，形成标准送审稿。

5. 审查阶段

2023 年 4 月，山东省海洋局在济南组织召开了山东省地方标准《海洋生物体中金刚烷胺的测定 液相色谱-串联质谱法》专家审查会议，山东省市场监督管理局对审查会议进行监督指导。来自国家海洋环境监测中心等单位 9 名专家组成了审查委员会。审查委员会听取了标准编制情况汇报，对标

准文本和标准编制说明进行了逐章、逐条审查。审查委员会对标准材料提出了审查意见，标准起草工作组根据审查意见对标准进行了修改完善，审查委员会对修改内容予以确认。会议一致同意该标准通过审查，要求起草单位尽快形成报批材料后上报山东省市场监督管理局。标准起草工作组根据专家审查会意见，形成了本文件的报批稿，报山东省市场监督管理局。

二、地方标准制定目的和意义

金刚烷胺是一类由 Setter 于 1960 年首次合成，Davis 于 1964 年首次发现具有抗病毒作用的抗病毒药物，也是美国 FDA 首个批准的抗流感病毒药物。根据其药理作用，国内现在主要将金刚烷胺用于鸡、猪流感的预防和早期治疗，以及猪传染性胃肠炎的防治。但金刚烷胺可能产生嗜睡、失眠、眩晕、抑郁、恶心、食欲减退等多种不良反应，具有一定的毒副作用。长期使用金刚烷胺可使病毒产生不同程度的耐药性，诱导产生新型耐药病毒。动物实验也表明其对胚胎有毒性和致畸作用。

为避免影响国家动物疫病强制性免疫政策落实及给重大动物疫病防控工作带来不良后果，农业部发布《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》，规定除经批准生产、使用的疫苗产品外，禁止使用金刚烷胺防治高致病性禽流感等一类病原微生物引起的病毒性疫病。20 世纪 90 年代后，当代畜禽养殖业逐渐规模化，骤增的养殖密度导致大规模疾

病频繁发生，缺乏科学知识的养殖户愚昧无知，为了满足自身经济利益，在畜禽养殖过程中为防止动物疫病发生从而导致经济利益受到损害的情况下，不规范使用及使用国家违禁药物的现象层出不穷。

2014 年，山东省荣成市出入境检验检疫局首次在送检的辣椒产品中检出金刚烷胺。当前金刚烷胺的检测方法研究多是针对动物源性食品和饲料中药物残留量的检测，关于海洋生物体中金刚烷胺的检测技术尚未发布相关标准，因此建立海洋生物体中金刚烷胺的检测方法，对保障海洋生物体的质量安全及海洋监管十分重要。虽然目前关于海洋生物体中金刚烷胺污染的报道较少，但是不排除滥用药物后对海洋生物污染的可能，并且我们在前期调研中发现某些海带、海参等水产品中检出金刚烷胺残留，因此为保证食品和环境安全，建立海洋生物体中金刚烷胺残留检测方法势在必行。

山东省是藻类养殖大省，藻类是作为低等植物，是海洋中重要的初级生产者，地球上几乎所有环境中都能见到藻类。在海洋中的多种藻类，具有丰富的资源，其中包括大型藻类和海洋藻类，其对维持生态系统的平衡起重要作用，而且与大多数污染物比鱼类和贝类更为敏感。许多品种的大型海藻作为海洋经济藻种，其数量与质量的变化，关系到海洋生态环境平衡与人们的食品安全。在上述背景下，在建立的高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）的基础上，我们在前期工作中发现，藻类中检出金刚烷胺，含量在 $3.01\ \mu\text{g/kg}$

-25.1 $\mu\text{g/kg}$ 之间。同时对烟台长岛海域的海带中金刚烷胺进行连续检测，发现金刚烷胺检出率较高。目前我国海洋生态环境整体形势依然严峻，仍然处于污染排放和环境风险的高峰期、生态退化和灾害频发的叠加期；海洋环境监督管理制度落实不到位，污染物标准统筹不够，无法满足海洋环境保护及监测的实际要求。

近年来，海洋污染越来越严重，对海洋生物造成了较大的经济损失。因此建立海洋生物体中污染物的检测技术应迫在眉睫，以应对保护海洋生态环境，应完善海洋标准检测及监测体系的需要。目前我国及我省还没有关于金刚烷胺在海洋环境中污染状况的研究报道，国外也鲜有这方面的资料，其在海洋环境中分布状况以及对海洋生物的影响都无从评估。因此该标准的立项，对理清海洋生物体中金刚烷胺来源，保护其赖以生存的环境，提出切实可行的控制技术并对维持海洋环境的健康、可持续发展至关重要且已刻不容缓。

三、地方标准编制原则、主要技术内容和确定依据

（一）编制原则

本文件制定的主要原则：一是符合性，符合国家和行业有关方针、政策、法律、法规，贯彻国家强制性标准；二是适用性，充分考虑我国国情，以促进海洋环境保护为目的，同时兼顾当前及未来金刚烷胺分析技术的发展，确保为海洋环境监测提供准确、有效地方法和完善的技术；三是目的性，有利于我国海洋环境监测技术的进步，有利于海洋生态环境

监测与评价技术水平的提高，有利于我国海洋资源的合理开发；四是协调性，与相关国家和行业标准协调一致。

（二）主要技术内容和确定依据

根据金刚烷胺的结构和性质，海洋生物体样品用1%乙酸乙腈提取后，经浓缩净化后，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

1. 标准溶液的制备与保存期限

溶液制备方法参照GB/T 601-2016 化学试剂 标准滴定溶液的制备。称取金刚烷胺0.0100 g，用乙腈溶解，并定容至10 mL，配制成1.0 mg/mL标准贮备液，-20℃下避光保存，有效期为3个月。用乙腈稀释金刚烷胺标准贮备液成标准使用液，金刚烷胺的浓度为1.0 µg/mL，4℃下避光保存，有效期为1个月。用乙腈稀释成金刚烷胺内标溶液成标准使用液，浓度为100 µg/L，4℃下避光保存，有效期为1个月。保存期内标准溶液重复进样，确保标准物质不变质。

2. 提取剂的选择及超声时间的选择

根据相关文献，本实验采用不同的提取试剂进行对比试验，分别是乙腈、1%三氯乙酸-乙腈、3%三氯乙酸-乙腈、1%甲酸-乙腈、3%甲酸-乙腈、1%乙酸-乙腈、3%乙酸-乙腈等对金刚烷胺提取，进行回收率对照实验，添加浓度为1.0 mg/L。

具体步骤：准确称取剪切后的一定量的海洋生物样品于

50 mL 带螺旋盖的聚丙烯离心管中，加入 15 mL 提取试剂和 1.0 mg/L 金刚烷胺内标溶液，充分旋涡 1 min，20℃ 超声提取 20 min，7000 r/min 离心 15 min，吸取上清液转移至另一 50 mL 离心管中待净化处理。

金刚烷胺的化学结构带有氨基，呈现出一定的碱性，易溶于酸性试剂，又因其属于极性化合物，在纯有机试剂中的溶解度较小，故一般文献均选用极性较强的稀酸溶液和水-有机溶剂混合液等作为金刚烷胺的提取试剂。乙腈可以有效提取目标化合物，且具有沉淀蛋白质的作用，其提取出的弱极性成分少，在质谱上的响应高，基质效应低，因而选用乙腈作为提取试剂。结果表明，加标样品（浓度水平为 100 $\mu\text{g/L}$ ）使用 1% 乙酸乙腈（v/v）提取试剂的提取效果优于其他的提取溶液，金刚烷胺的回收率高达 117.75%。因此本实验选择 1% 乙酸乙腈作为提取溶液。

比较了前处理超声提取时间分别为 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 五种方式对于金刚烷胺的提取效果，结果表明，随着超声提取时间的增加，金刚烷胺的回收率随之增加，15 min 时金刚烷胺回收率达到 110% 左右，随着提取时间的延长，金刚烷胺回收率稳定在 115% 左右不再增加，因此，本实验选择超声提取时间为 15 min。

3. 固相萃取柱的选择

由于金刚烷胺的脂溶性，脂肪较难除去。在实验中试图

用正己烷去除脂肪步骤，发现对分析灵敏度有明显影响。正己烷可能在去脂步骤导致部分金刚烷胺被分配除去。因此，需要用固相萃取小柱对提取液进行净化，除去一些与金刚烷胺性质相似的干扰物和色素等杂质。

通过空白鲮鱼加标，采用外标法对比HLB、MCX、MAX固相萃取柱的回收率情况，结果表明MCX回收率最高(图1)，说明金刚烷胺主要以离子的形式存在，强阳离子交换柱对其有一定的保留，因此本文件采用MCX对目标物进行富集和净化。使用MCX固相萃取柱净化，操作简单，回收率高，重现性好，背景噪音低。最终本研究采用MCX固相萃取柱对提取液进行净化。

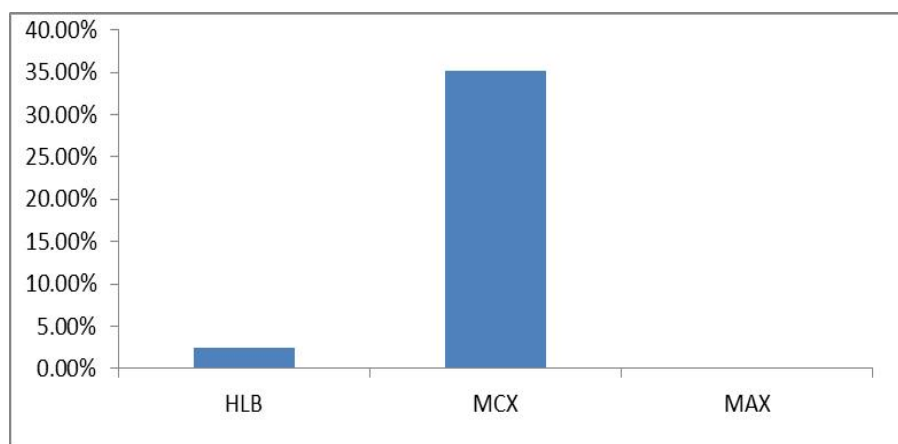


图1 不同SPE柱对回收率的影响（以外标法计，n=6）

4. 定容液的选择

定容液能影响目标物的峰形和响应值，从而影响定量结果的准确性。实验发现：定容液中添加甲酸可有效提高响应值，而定容液中的有机相比比例对金刚烷胺的峰形影响较大，

通过对比V乙腈+V水=5+5，V乙腈+V水=3+7，V乙腈+V水=7+3，发现V乙腈+V水=3+7最合适，而质谱方法一般采用0.1%甲酸提高响应值，故采用乙腈-水（3:7，V/V）溶液（含0.1%甲酸）作为定容液。

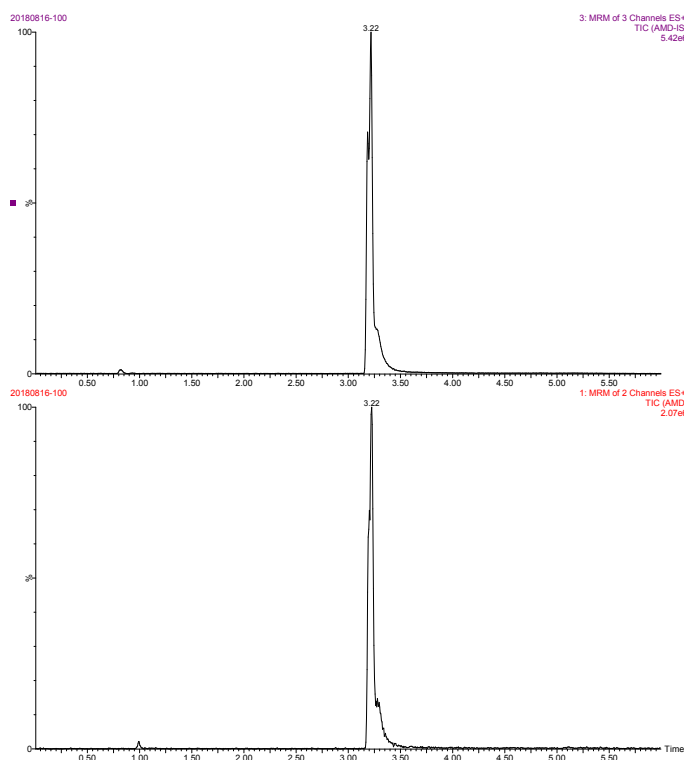


图2 未添加0.1%甲酸的定溶液谱图（10 $\mu\text{g/L}$ ）

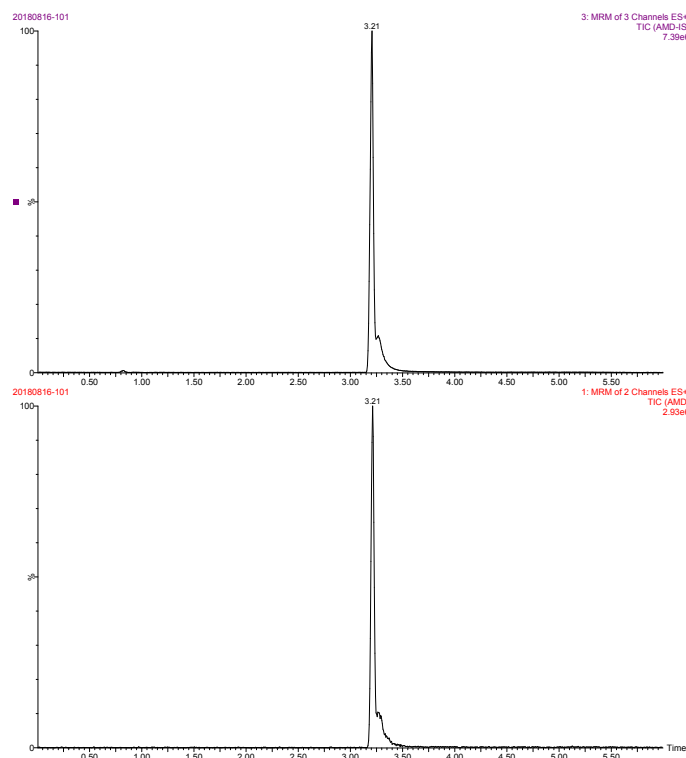


图3 添加0.1%甲酸的定溶液谱图（10 $\mu\text{g/L}$ ）

5. 液相色谱条件的确定

金刚烷胺结构中的氨基，易形成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准分子离子，适合在正离子模式下扫描，系统自动优化后确定金刚烷胺的离子对、碰撞能量以及雾化气压力、干燥器温度等质谱分析参数。根据文献，流动相中的有机相选择甲醇和乙腈，乙腈可以明显降低背景噪音，有效分离目标物。水相选择了超纯水和 0.1%甲酸水溶液，结果如图所示，图 2-4 可见流动相为超纯水时，干扰较大，响应值差；图 2-5 可见流动相为 0.1%甲酸水溶液时峰形较好响应良好。故流动相选用 0.1%甲酸水溶液。在质谱分析中，从保护质谱配件的角度出发，甲酸一般不超过 0.20%，所以本研究选择加入 0.10%甲酸。本论文

采用了梯度洗脱，使金刚烷胺与杂质可以实现较好的分离，提高检测灵敏度，减少基质影响。

有机相对比了甲醇和乙腈，水相对比了超纯水、0.1%甲酸溶液、5 mmol/L 乙酸铵和含有 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液，发现流动相的酸度对金刚烷胺响应和峰形有较大影响，本研究通过对比，最终确定采用乙腈和 0.1%甲酸溶液作为流动相。

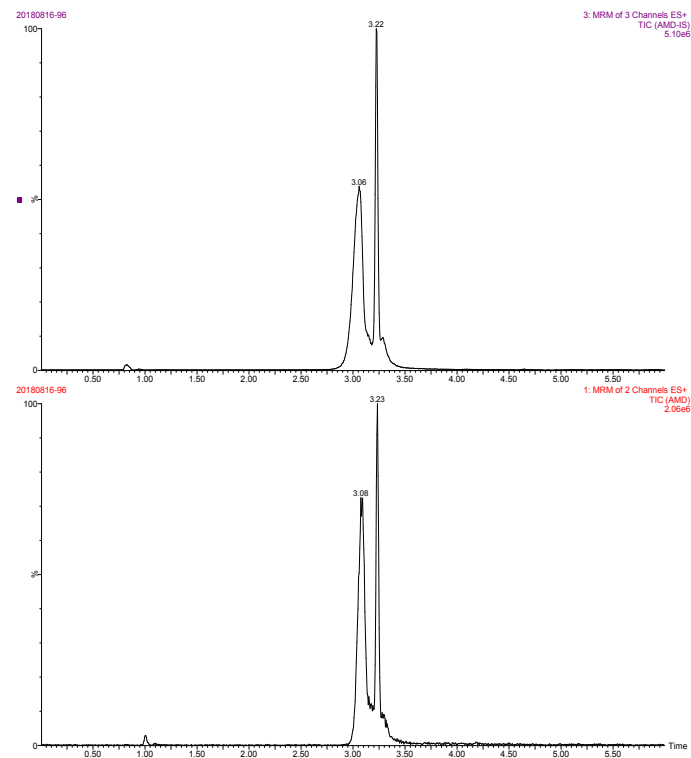


图4 流动相为甲醇和0.1%甲酸水的总离子流图 (10 $\mu\text{g/L}$)

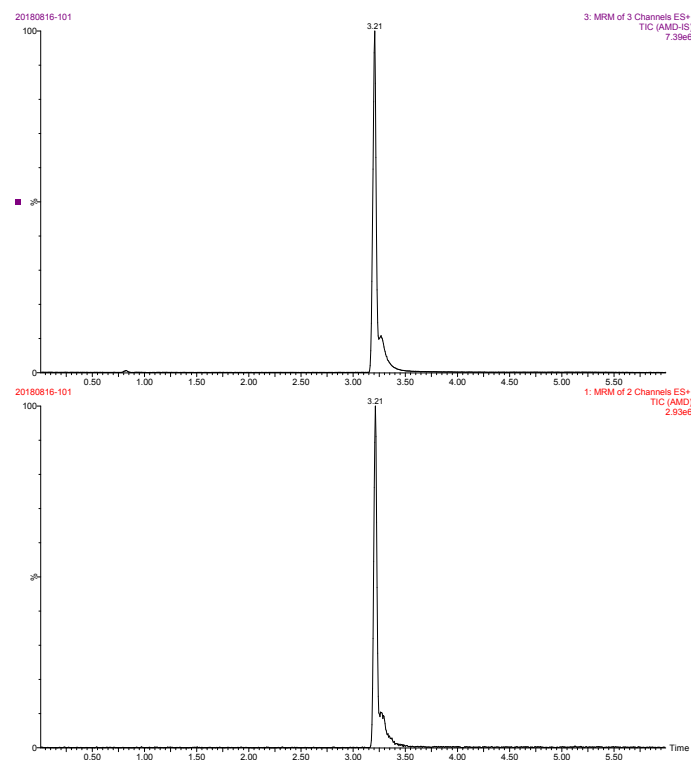


图5 流动相为乙腈和0.1%甲酸水的谱图 (10 $\mu\text{g/L}$)

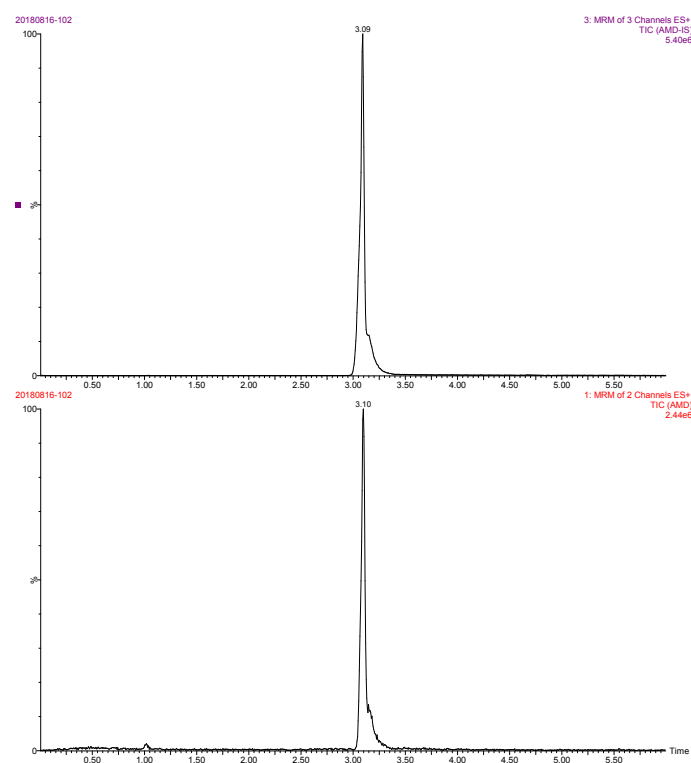


图6 流动相为乙腈和水的谱图 (10 $\mu\text{g/L}$)

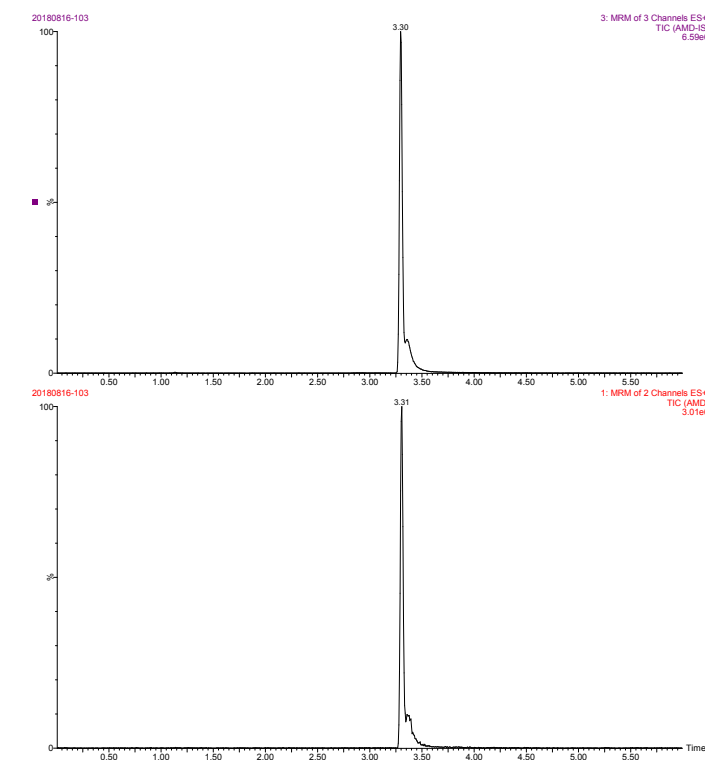


图7 流动相为乙腈和含0.1%甲酸5mmol/L乙酸铵水的谱
图（10 $\mu\text{g/L}$ ）

6. 基质效应的影响

由于海洋生物基质比较复杂，因此，在生物样品的提取中有必要对处理后的基质效应进行评价。比较净化后的空白样品的提取净化液与标准溶液在相同金刚烷胺浓度下的响应，评价基质中效应。

本研究通过对比空白大黄鱼、大菱鲆、刺参、海带、南美白对虾经前处理后分别用 1 mL 标准溶液溶解测定其响应值（B，n=6）与 1 mL 标准溶液直接上机测定（A，n=6）的比值来计算绝对基质效应，如图 11 所示负值为离子增益，金刚烷胺在海洋生物体中存在基质效应。由于基质效应的产生

原因复杂，因而难以根本清除基质效应的影响。目前用以清除或补偿基质效应的方法有基质净化法、同位素内标法、空白基质匹配标准溶液等。为了能较好地减小基质效应的影响，本文件采用内标法进行定量分析。

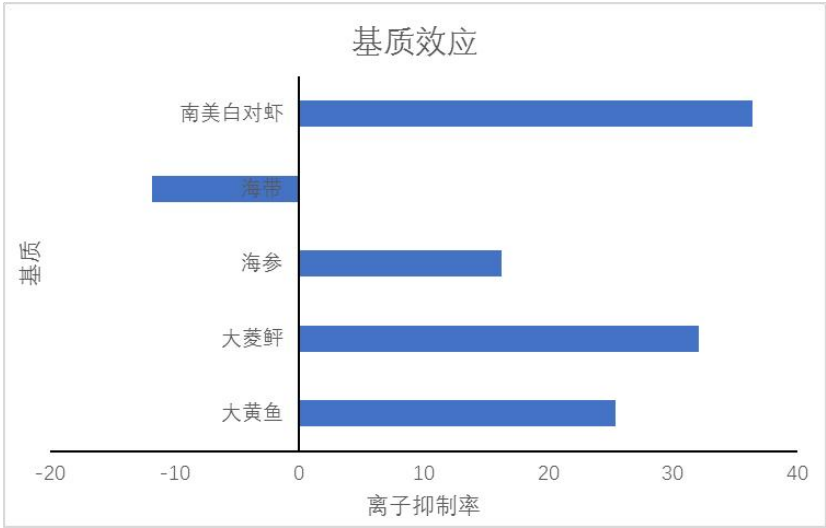


图8 海洋生物体中金刚烷胺基质效应情况

7. 质谱条件的确定

本研究采用直接进样的方式进行质谱条件的摸索和优化。将金刚烷胺配制成 1 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醇溶液，在 ESI+ 模式下进行全扫描，以选择合适的母离子和子离子。实验结果表明：金刚烷胺在 ESI+ 模式下能获得较高丰度的分子母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。然后分别进行二级质谱分析，找出二级质谱中两个信号较强的碎片离子，用信号最强的做定量离子，另一个作辅助定性离子，并对离子传输管温度、鞘气压力、喷雾电压等参数进行优化，得到完整的质谱条件，用选择反应模式的方式对样品进行定性和定量分析。

通过对金刚烷胺标准溶液的质谱方法优化，确定了质谱条件：正离子(ESI+)模式；电离电压为 2.50 kV；锥孔电压为 25 V；离子源温度为 140℃；锥孔反吹气流速为 50 L/h；脱溶剂气温度为 400℃；脱溶剂气流速为 700 L/h；氦气流速为 0.12 mL/min；其他参数见表 4。采用多反应监测方式对样品进行定性和定量分析。三重四级杆串联质谱仪中，第一个四级杆（Q1）选择母离子，经过在第二个四级杆（Q2）中碰撞解离，到达第三个四级杆（Q3）进行选择离子检测，只有符合特定条件的离子才能被检测到，该模式排除了本底干扰，具有较高的选择性和信噪比，较低的检测限。

表4 待测物监测离子

化合物	母离子	子离子	锥孔电压	碰撞能量
金刚烷胺	152	93	25	30
		135*	25	17
金刚烷胺内标	167	141*	25	17

注：*表示为定量离子

8. 标准曲线的绘制

取 1.0 mg/L 金刚烷胺标准使用溶液 10 μL、20 μL、40 μL、50 μL、100 μL 于样品瓶中，分别添加 100 μL 内标工作液，定容至 1.00 mL，配制成金刚烷胺浓度为 10 μg/L、20 μg/L、40 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 的系列标准溶液，10 μL 进样。以各标准溶液峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，以各标准工作液浓度为横坐标，绘制标准曲线。所得典型标准曲线

方程为 $Y=0.06601X +0.67559$ ，相关系数 r 为 0.9995，大于 0.99，线性关系良好，适用于海洋生物体中金刚烷胺的定量分析。

9. 样品测定

样品峰与标准物质的保留时间之差不大于0.10 min，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的特征离子均应出现，要求样品峰的各选择离子相对强度与标准物质相应选择离子的相对强度之差不超过表5规定的范围。

表5 试样相对离子丰度与标准物质相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/（%）	允许偏差/（%）
> 50	±20
> 20~50	±25
> 10~20	±30
≤10	±50

10. 方法的评价

10.1 方法的正确度和精密度

于空白大黄鱼、大菱鲆、刺参、海带、南美白对虾及四角蛤蜊样品中加入金刚烷胺及其内标溶液，进行回收率和精密度实验，每个浓度样品平行测定6次，测定3个批次，检测结果见表6。以大菱鲆为例，金刚烷胺标准溶液、空白大菱鲆及空白大菱鲆样品中添加金刚烷胺总离子流图如图9、10、11所示。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/828001005056006024>