

DB43

湖 南 省 地 方 标 准

DB43/T 687—2012

饲料中福莫特罗、苯乙醇胺A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of formoterol, phenylethanolamine A,
clenbuterol, ractopamine, salbutamol, terbutaline, cimaterol in feeds
Liquid chromatography- tandem mass spectrometric method

2012-07-24 发布

2012-12-10 实施

湖南省质量技术监督局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 方法提要	1
4 试剂与材料	1
5 仪器与设备	2
6 试样制备	2
7 分析测定	2
8 方法的线性范围、灵敏度、准确度和精密度	4
附录 A (资料性附录) 七种化合物的液相色谱-串联质谱图 (MRM 色谱图)	6

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009 的规则编制。

本标准由长沙市畜禽水产品质量检测中心提出。

本标准由湖南省畜牧水产局归口。

本标准起草单位：长沙市畜禽水产品质量检测中心。

本标准起草人：卢艳芬、王辉、徐丽君、颜克旭、唐巍、漆亮、杨辉、尹雯婕、薛爽。

饲料中福莫特罗、苯乙醇胺 A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中福莫特罗 (Formoterol)、苯乙醇胺 A (Phenylethanolamine A)、克仑特罗 (Clenbuterol)、莱克多巴胺 (Ractopamine)、沙丁胺醇 (Salbutamol)、特布它林 (Terbutaline)、西马特罗 (Cimaterol) 液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于预混合饲料、浓缩饲料和配合饲料中福莫特罗、苯乙醇胺 A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗的测定。

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 方法提要

试样用盐酸-甲醇溶液提取,调 pH 后经混合型阳离子固相萃取小柱净化,用带有电喷雾离子源的液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂与材料

本法所用试剂除另有说明外,均为分析纯;实验用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 甲酸:色谱纯。
- 4.3 盐酸。
- 4.4 氨水。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 提取液: 0.1 mol/L 盐酸+甲醇=8+2 (V+V)。
- 4.7 0.1 mol/L 盐酸: 取盐酸 9 mL, 用水稀释至 1000 mL。
- 4.8 0.1%甲酸溶液: 取甲酸 1 mL, 加水稀释至 1000 mL。
- 4.9 10 mol/L 氢氧化钠: 称取 40 g 氢氧化钠, 用适量水溶解冷却后, 用水稀释至 100 mL。
- 4.10 5%氨化甲醇溶液: 取 5 mL 氨水用甲醇稀释到 100 mL。
- 4.11 溶解液: 0.1%甲酸溶液 (4.8) + 甲醇=5+95 (V+V)。
- 4.12 标准物质: 福莫特罗、苯乙醇胺 A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗,

纯度均应大于 98.0%。

4.13 标准储备液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别准确称取适量的福莫特罗、苯乙醇胺 A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗标准物质, 用甲醇分别配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。保存期不超过 6 个月。

4.14 混合标准中间溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别准确吸取 1.0 mL 标准储备液, 用甲醇稀释定容至 100 mL, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。保存期不超过 6 个月。

4.15 混合标准工作溶液: 准确吸取适量的混合标准中间溶液, 用溶解液稀释成浓度分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准工作溶液。使用前配制。

4.16 微孔有机过滤膜, 0.22 μm 。

5 仪器与设备

5.1 分析天平: 感量 0.01 mg、0.01 g。

5.2 离心管: 5 mL, 50 mL。

5.3 水浴超声器。

5.4 高速离心机: 5000 r/min。

5.5 氮吹仪。

5.6 涡旋振荡器。

5.7 固相萃取装置。

5.8 高效液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。

5.9 混合型阳离子固相萃取小柱: 60 mg/3 mL, 使用前活化。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 采样。选取有代表性饲料样品至少 500 g, 按 GB/T 20195 制备试样。

7 分析测定

7.1 样品制备

7.1.1 提取

称取试样 2 g (精确到 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 提取液 (4.6); 充分振荡后超声 10 min, 5000 r/min 高速离心 5 min。上清液全部转移到另一离心管中。残渣用上述方法重复提取一次。合并上清液, 用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4, 待用。

7.1.2 净化

依次用 3 mL 甲醇, 3 mL 水活化固相萃取小柱, 准确移取 5 mL 上清液上柱。再依次用 3 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液、3 mL 甲醇淋洗, 抽干, 用 3 mL 5% 氯化甲醇洗脱, 收集洗脱液于 5 mL 离心管中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干。用 1.0 mL 溶解液溶解, 涡旋混匀后过有机微孔滤膜, 上机测定。若试样溶液中含有的被测物质浓度超出仪器线性范围, 可用一定体积溶解液稀释后进样。

7.2 液相色谱-串联质谱测定

7.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C18 (50×2.1 mm, 粒径 1.7 μm), 或相当者。

流动相: A相: 0.1%甲酸水溶液; B相: 甲醇。流动相梯度洗脱条件参见表1 流动相梯度洗脱条件。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
3.4	95	5
3.6	72	28
5.5	72	28
5.7	30	70
6.7	30	70
8.0	95	5

流速: 0.3 mL/min。

柱温: 35℃。

进样量: 4 μL。

7.2.2 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: 多反应监测。

电离电压: 3.0 KV。

离子源温度: 120 ℃。

雾化温度: 350 ℃。

锥孔气流速: 50 L/h。

雾化气流速: 580 L/h。

各化合物保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量参见表2 七种化合物的保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量。

表2 七种化合物的保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

化合物	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (v)	碰撞能量 (ev)
西马特罗 (Cima)	2.18	220.1/160.1	220.1/160.1	23	18
		220.1/202.1			10
特布他林 (Terb)	2.70	226.1/125.0	226.1/152.0	30	25
		226.1/152.0			18
沙丁胺醇 (Salb)	3.23	240.1/148.1	240.1/148.1	25	20
		240.1/222.2			10
莱克多巴胺 (Ract)	4.70	302.2/107.1	302.2/164.1	28	30
		302.2/164.1			18
克伦特罗 (Clen)	5.10	277.1/203.0	277.1/203.0	28	18
		277.1/259.1			12
福莫特罗 (Form)	5.33	345.2/149.1	345.2/149.1	30	20
		345.2/121.2			35
苯乙醇胺A (Phen A)	6.32	345.5/327.2	345.5/150.2	25	13
		345.5/150.2			23

7.2.3 液相色谱-串联质谱测定

取适量标准工作溶液及试样溶液注入液相色谱-串联质谱联用仪，各被测物质的响应值均应在仪器检测的线性范围内。

7.2.3.1 定性测定

每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个以上子离子，在相同的试验条件下，试样中被测化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间一致，变化范围应在±2.5%之内。而且试样中被测化合物的定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度相比，其允许偏差不超过表3定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差规定的范围。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

7.2.3.2 定量测定

以各化合物质量色谱峰峰面积按外标法进行单点或多点校准测定。在上述参考条件下，七种化合物的液相色谱-串联质谱图（MRM 色谱图）参见附录A。

7.2.4 空白试验

除不加样品外，采用完全相同的分析测定步骤进行操作。

7.3 结果计算

试样中各被测化合物的含量以质量分数（mg/kg）表示，其结果可由计算机外标法自动计算获得，也可按下式计算：

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times f$$

式中：

X——试样中各化合物的质量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A——样品溶液中各化合物的峰面积；

C_s——标准工作溶液中各化合物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——样品最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s——标准工作溶液中各化合物的峰面积；

m——试样的质量，单位为克（g）；

f——稀释倍数。

平行测定用算术平均值表示，计算结果应扣除空白值，结果保留3位有效数字。

8 方法的线性范围、灵敏度、准确度和精密度

8.1 线性范围

各化合物混合标准工作溶液的线性范围为0.5 μg/L~50 μg/L。

8.2 灵敏度

本方法中各化合物的定量限均为 0.05 mg/kg。

8.3 准确度

本方法中，各化合物在添加浓度为 0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg 时，回收率范围为 65%~105%。

8.4 精密度

批内变异系数 \leq 15%，批间变异系数 \leq 15%。

附录 A

(资料性附录)

七种化合物的液相色谱-串联质谱图 (MRM 色谱图)

