



中华人民共和国国家标准

GB/T 22147—2008

饲料中沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗的测定 液相色谱质谱联用法

Determination of salbutamol, ractopamine and clenbuterol in feeds—
Liquid chromatography-mass spectrometry

2008-06-27 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：中国农业大学、农业部饲料效价与安全监督检验测试中心（北京）。

本标准主要起草人：张丽英、常碧影、贺平丽、董涛、杨文军、王宗义。

饲料中沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗的测定 液相色谱质谱联用法

1 范围

本标准规定了同步测定饲料中 β -激动剂沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗的液相色谱质谱联用法(LC-MS)法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗的测定。本标准中沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗的检测限均为 0.01 mg/kg,定量限均为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 原理

试样经磷酸甲醇溶液提取,用固相萃取柱净化后,经反相 C_{18} 柱梯度洗脱分离,采用质谱检测器以三种物质的质量色谱峰保留时间和特征离子定性、确证,并用外标法定量。

4 试剂和溶液

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯。水符合 GB/T 6682 二级用水规定。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇。

4.3 磷酸甲醇提取液:向 3.92 g 浓磷酸中加入 200 mL 水,再用甲醇定容到 1 000 mL。

4.4 冰乙酸溶液(2%):10 mL 冰乙酸用水稀释至 500 mL。

4.5 硫化钠溶液(1 g/L):称取 0.250 g 硫化钠($Na_2S \cdot 9H_2O$)用水溶解,并定容至 250 mL。

4.6 SPE 小柱淋洗液与洗脱液

4.6.1 淋洗液:移取 9 mL 浓盐酸于 1 000 mL 水中,摇匀。

4.6.2 洗脱液:移取 10 mL 25%的氨水于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容。

4.7 流动相

A 液:甲酸铵 3.65 g 溶于 500 mL 去离子水中,用甲酸调 pH 至 3.80。

B 液:乙腈,色谱纯。

4.8 沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗标准溶液

4.8.1 标准贮备液:称取沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗(标准品含量均 $>98\%$)各 50 mg 分别于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解,并定容至刻度。于冰箱中 4℃保存,保存期一个月。

4.8.2 标准工作中间液:移取沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗标准贮备液(4.8.1)各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用冰乙酸溶液(4.4)定容。

4.8.3 标准工作液:移取沙丁胺醇、莱克多巴胺和盐酸克仑特罗标准工作中间液(4.8.2)各 0.5,1,5,10 mL 于 100 mL 容量瓶中,用冰乙酸溶液(4.4)定容。

5 仪器和设备

- 5.1 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.2 聚丙烯离心管:50 mL。
- 5.3 恒温水浴:可保持水温至 55 ℃和 75 ℃。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 酸度计:准确至 0.001。
- 5.6 离心机。
- 5.7 混合型阳离子交换 SPE 小柱。
- 5.8 固相萃取(SPE)减压净化系统。
- 5.9 液相色谱/质谱联用仪。

6 试样制备

按照 GB/T 14699.1 规定方法采样,采取样品量至少 500 g,以四分法缩减至 200 g,粉碎过 40 目筛,充分混匀,装瓶,备用。

7 测定

7.1 试样前处理

7.1.1 试样提取

准确称取适量试样(配合饲料 5 g,浓缩饲料 2 g,添加剂预混合饲料 1 g,准确至 0.000 1 g)于 50 mL 离心管,用磷酸甲醇提取液(4.3)40 mL,振摇提取 30 min,然后于离心机上以 3 000 r/min 离心 10 min。上清液倒入 100 mL 容量瓶,残渣再用上述提取液(4.3)40 mL、20 mL,重复提取 2 次,每次振摇 5 min~10 min,于离心机上以 3 000 r/min 离心 10 min 后,合并上清液于 100 mL 容量瓶中。最后用提取液(4.3)定容,混匀,过滤。

7.1.2 净化

7.1.2.1 配合饲料和浓缩饲料:吸取一定体积试样提取液滤液(配合饲料 1 mL,浓缩饲料 0.5 mL)于 5 mL 试管中,置 55 ℃水浴中以氮气吹至近干。同时将固相萃取柱(5.7)固定于 SPE 减压净化系统(5.8)上,依次用 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化、平衡。向试管中加入冰乙酸溶液(4.4)1 mL,涡旋振荡,然后全部加到小柱上,控制过柱速度不超过的 1 mL/min,分别用 1 mL 淋洗液(4.6.1)和 1 mL 甲醇淋洗一次,最后用 1 mL 洗脱液(4.6.2)洗脱,洗脱速度不超过 1 mL/min。洗脱液于 55 ℃水浴中,用氮气吹干,准确加入 1.00 mL 冰乙酸溶液(4.4)充分溶解混匀,并转移到上机样品瓶中,盖好,备用。

7.1.2.2 添加剂预混合饲料:取提取液 0.2 mL,加硫化钠溶液(4.5)0.1 mL,涡旋振荡,然后加入冰乙酸(4.4)4 mL,涡旋振荡,于离心机上以 3 000 r/min 离心 10 min,再取 1 mL 上清液按照 7.1.2.1 步骤过固相萃取柱(5.7)净化。

7.2 测定

7.2.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱,内径 2.1 mm,柱长 150 mm,填充物粒度 3 μm。

柱温:室温。

流动相:流动相 A:甲酸铵缓冲溶液(4.7),流动相 B:乙腈(4.1)。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	98	2
5	70	30
15	50	50

每次进样间隔用流动相 A+B=98+2,平衡 10 min。

流速:0.20 mL/min。

进样体积:20 μL。

7.2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子(ESI+)模式做选择离子检测,选择离子为:

沙丁胺醇:m/z 240,m/z 222,m/z 166;

莱克多巴胺:m/z 302,m/z 284,m/z 164;

盐酸克仑特罗:m/z 277,m/z 259,m/z 203。

源温度:120 ℃。

取样锥孔电压:25 V。

萃取锥孔电压:5 V。

脱溶剂氮气温度的:300 ℃。

脱溶剂氮气流速:300 L/h。

7.2.3 定性定量方法

7.2.3.1 定性

通过样品总离子流色谱图上沙丁胺醇(m/z 240,m/z 222,m/z 166)、莱克多巴胺(m/z 302,m/z 284,m/z 164)和盐酸克仑特罗(m/z 277,m/z 259,m/z 203)的保留时间和各色谱峰对应的特征离子,与标准品相应的保留时间和各色谱峰对应的特征离子进行对照定性。样品与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%。每种药物的 3 个特征离子基峰百分数与标准品允许差分别为:当基峰百分数>50%时,允许差±20%;当基峰百分数 20%~50%时,允许差±25%;当基峰百分数 10%~20%时,允许差±30%;当基峰百分数≤10%时,允许差±50%。

7.2.3.2 定量

采用 M+1 的准分子离子的色谱峰面积做单点校正定量。

8 结果的计算与表述

试样中药物含量(X)以质量分数计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{A_x}{A_s \times m} \times n \times c_s \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_x ——待测试样测得的特征离子色谱峰面积;

A_s ——标准溶液药物的特征离子色谱峰面积;

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数;

GB/T 22147—2008

c_s ——标准溶液中药物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

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 允许差

同一实验室同一操作人员完成的两个平行测定的相对偏差不大于 15%。
