

# 中华人民共和国国家标准

农业部 1629 号公告—1—2011

---

## 饲料中 16 种 $\beta$ -受体激动剂的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of sixteen  $\beta$ -agonists in feeds  
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2011-08-17 发布

2011-08-17 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

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、国家饲料质量监督检验中心(北京)、浙江省兽药监察所、河南省饲料产品质量监督检验站。

本标准主要起草人:顾欣、李丹妮、张文刚、严凤、张鑫、黄士新、王蓓、索德成、陈蔷、韦敏珏。

## 饲料中 16 种 $\beta$ -受体激动剂的测定

### 液相色谱—串联质谱法

#### 1 范围

本标准规定了饲料中克仑特罗(Clenbuterol)、沙丁胺醇(Salbutamol)、莱克多巴胺(Ractopamine)、齐帕特罗(Zilpaterol)、氯丙那林(Clorprenaline)、特布他林(Terbutaline)、西马特罗(Cimaterol)、西布特罗(Cimbuterol)、马布特罗(Mabuterol)、溴布特罗(Brombuterol)、克仑普罗(Clenproperol)、班布特罗(Bambuterol)、妥布特罗(Tulobuterol)、利托君(Ritodrine)、马赉特罗(Mapenterol)、喷布特罗(Penbutolol) 16 种  $\beta$ -受体激动剂的液相色谱—串联质谱测定方法(LC-MS/MS)。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料及预混合饲料中克仑特罗等 16 种  $\beta$ -受体激动剂的测定。

本标准的检出限为 10  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 50  $\mu\text{g/kg}$ 。

#### 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

饲料经盐酸甲醇混合溶液提取、乙酸铅沉淀蛋白后经固相萃取小柱净化, 洗脱液蒸干后用含 0.1% 甲酸的甲醇水溶液溶解, 供液相色谱—串联质谱仪进行检测, 添加标准曲线法定量。

#### 4 试剂和材料

除非另有规定, 在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级用水。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 甲酸: 色谱纯。

4.3 盐酸。

4.4 氨水。

4.5 乙酸铅。

4.6 0.1 mol/L 盐酸溶液: 取盐酸 9 mL, 用水定容至 1 000 mL。

4.7 盐酸甲醇提取液: 取 0.1 mol/L 盐酸(4.6) 80 mL, 加入甲醇 20 mL 混匀。

4.8 饱和乙酸铅溶液: 在 50 mL 水中加入一定量的乙酸铅, 超声 5 min, 直至固体不再溶解。

4.9 0.1% 甲酸溶液: 取甲酸 1 mL, 加水定容至 1 000 mL。

4.10 0.1% 甲酸甲醇水溶液: 取 0.1% 甲酸溶液(4.9) 80 mL, 与 20 mL 甲醇混合。

4.11 5% 氨水甲醇溶液: 取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。

4.12 盐酸克仑特罗、沙丁胺醇、盐酸莱克多巴胺、齐帕特罗、盐酸氯丙那林、特布他林、西马特罗、西布特罗、盐酸马布特罗、盐酸溴布特罗、克仑普罗、盐酸班布特罗、盐酸妥布特罗、盐酸利托君、盐酸马赉特

罗、盐酸喷布特罗 16 种对照品:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.13  $\beta$ -受体激动剂储备液:分别精密称取 16 种  $\beta$ -受体激动剂类药物对照品(4.12),用甲醇配成浓度各为 1 mg/mL 的标准储备液,2℃~8℃冷藏保存,有效期为 6 个月。

4.14 16 种  $\beta$ -受体激动剂混合中间液:分别吸取 16 种  $\beta$ -受体激动剂储备液(4.13)各 1 mL,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度。该溶液中 16 种  $\beta$ -受体激动剂浓度均为 10  $\mu\text{g/mL}$ ,于 2℃~8℃冷藏保存,有效期 1 个月。

4.15 混合工作液:吸取 16 种  $\beta$ -受体激动剂混合中间液(4.14)1 mL,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.1%甲酸甲醇水溶液(4.10)定容至刻度。该溶液中 16 种  $\beta$ -受体激动剂浓度均为 100 ng/mL,现配现用。

4.16 固相萃取小柱:混合型阳离子交换柱,60 mg/3 mL;或其他性能类似的小柱。

## 5 仪器和设备

5.1 液相色谱—串联质谱仪:配有电喷雾电离源。

5.2 天平:感量为 0.000 1 g 和 0.01 g 各一台。

5.3 旋转蒸发仪。

5.4 离心机:最大离心力不低于 8 000 g。

5.5 粉碎机。

5.6 涡旋振荡器。

5.7 滤膜:0.22  $\mu\text{m}$ ,材质 PVDF。

## 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,粉碎过 0.45 mm 孔径筛,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

## 7 分析步骤

### 7.1 提取

称取 2 g(精确至 0.01 g)试样(6)于 50 mL 离心管中,准确加入 18 mL 盐酸甲醇提取液(4.7)和 2 mL 饱和乙酸铅溶液(4.8),充分振荡 20 min,然后离心 10 min(离心力 8 000 g),上清液备用。

### 7.2 净化

固相萃取小柱先用 3 mL 甲醇,3 mL 水活化。取备用液(7.1)2 mL 过柱,依次用 2 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗,用 5%氨水甲醇溶液(4.11)5 mL 洗脱。收集洗脱液,旋转蒸发(60℃)至干。用 1.0 mL 0.1%甲酸甲醇水溶液(4.10)溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机测定。若样品液中含有的  $\beta$ -受体激动剂浓度超出线性范围,进样前可用 0.1%甲酸甲醇水溶液(4.10)稀释,使稀释后上机液的  $\beta$ -受体激动剂浓度在线性范围内。

### 7.3 添加标准曲线的制备

分别精密量取 16 种  $\beta$ -受体激动剂混合中间液(4.14)适量,添加到适量空白饲料中,按 7.1、7.2 步骤操作后,制得浓度范围为 50  $\mu\text{g/kg}$ ~1 000  $\mu\text{g/kg}$  的基质添加标准曲线,供液相色谱—串联质谱仪测定。

### 7.4 样品测定

#### 7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,柱长为 100 mm,内径为 3.0 mm,粒径为 1.8  $\mu\text{m}$ ;或其他效果等同的  $\text{C}_{18}$ 柱。

柱温:30℃。

进样量:5  $\mu$ L。

流速:0.3 mL/min。

流动相:A 为甲醇,B 为 0.1%甲酸溶液(4.9),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间<br>min | 甲醇,A<br>% | 0.1%甲酸溶液,B<br>% |
|-----------|-----------|-----------------|
| 0.00      | 20        | 80              |
| 4.00      | 60        | 40              |
| 5.00      | 80        | 20              |
| 6.00      | 20        | 80              |

#### 7.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾正离子源。

检测方式:多反应监测(MRM)。

脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体,使用前应调节各气体流量使质谱灵敏度达到检测要求。

毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最佳灵敏度。

定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 16 种  $\beta$ -受体激动剂的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞电压的参考值

| 名 称                     | 定性离子对, $m/z$ | 定量离子对, $m/z$ | 锥孔电压,V | 碰撞能量,V |
|-------------------------|--------------|--------------|--------|--------|
| 西马特罗<br>(Cimaterol)     | 220.0>202.0  | 220.0>202.0  | 15     | 10     |
|                         | 220.0>160.0  |              |        | 16     |
| 马布特罗<br>(Mabuterol)     | 311.0>237.0  | 311.0>237.0  | 20     | 15     |
|                         | 311.0>217.0  |              |        | 25     |
| 西布特罗<br>(Cimbuterol)    | 234.0>160.0  | 234.0>160.0  | 18     | 15     |
|                         | 234.0>216.0  |              |        | 8      |
| 溴布特罗<br>(Brombuterol)   | 367.0>293.0  | 367.0>293.0  | 20     | 18     |
|                         | 367.0>349.0  |              |        | 12     |
| 莱克多巴胺<br>(Ractopamine)  | 302.0>164.1  | 302.0>164.1  | 20     | 30     |
|                         | 302.0>107.0  |              |        | 15     |
| 氯丙那林<br>(Clorprenaline) | 214.0>154.1  | 214.0>154.1  | 20     | 15     |
|                         | 214.0>196.0  |              |        | 10     |
| 特布他林<br>(Terbutaline)   | 226.0>152.0  | 226.0>152.0  | 23     | 15     |
|                         | 226.0>170.0  |              |        | 10     |
| 齐帕特罗<br>(Zilpaterol)    | 262.0>244.0  | 262.0>244.0  | 20     | 12     |
|                         | 262.0>185.1  |              |        | 25     |
| 沙丁胺醇<br>(Salbutamol)    | 240.0>148.1  | 240.0>148.0  | 20     | 17     |
|                         | 240.0>222.0  |              |        | 10     |
| 克仑特罗<br>(Clenbuterol)   | 277.0>203.1  | 277.0>203.1  | 18     | 15     |
|                         | 277.0>259.2  |              |        | 10     |
| 克仑普罗<br>(Clenproperol)  | 263.2>245.4  | 263.2>245.4  | 20     | 10     |
|                         | 263.2>203.1  |              |        | 20     |
| 妥布特罗<br>(Tulobuterol)   | 228.0>154.0  | 228.0>154.0  | 20     | 15     |
|                         | 228.0>172.0  |              |        | 12     |
| 班布特罗<br>(Bambuterol)    | 368.0>72.0   | 368.0>294.0  | 25     | 30     |
|                         | 368.0>294.0  |              |        | 20     |

表 2（续）

| 名 称                  | 定性离子对, $m/z$  | 定量离子对, $m/z$  | 锥孔电压, V | 碰撞能量, V |
|----------------------|---------------|---------------|---------|---------|
| 利托君<br>(Ritodrine)   | 288. 3>120. 9 | 288. 3>120. 9 | 25      | 21      |
|                      | 288. 3>150. 0 |               |         | 16      |
| 喷布特罗<br>(Penbutolol) | 292. 2>201. 2 | 292. 2>201. 2 | 30      | 20      |
|                      | 292. 2>236. 2 |               |         | 15      |
| 马贲特罗<br>(Mapenterol) | 325. 2>237. 0 | 325. 2>237. 0 | 25      | 15      |
|                      | 325. 2>307. 1 |               |         | 15      |

7.4.3 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子、2 个以上子离子,在仪器最佳工作条件下,样品中待测物质的保留时间与对照品混合工作液中对应的保留时间相对偏差在±2.5%之内,且样品谱图中各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的对照品工作液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品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误差 单位为 %

| 相对离子丰度     | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
|------------|-----|--------|--------|-----|
| 允许的最大偏差, % | ±20 | ±25    | ±30    | ±50 |

7.4.4 定量测定

取试样溶液和相应的对照品添加溶液进样,以添加样品溶液中被测组分峰面积的为纵坐标,被测组分浓度为横坐标绘制工作曲线,用单点或工作曲线对样品进行定量,试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下,克仑特罗等 16 种 β-受体激动剂对照品的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

8 计算

试样中 β-受体激动剂的含量 X 以质量分数表示,单位以微克每千克(μg/kg)表示。单点校准按式(1)计算:

$$X = \frac{X_s \times \Lambda \times m_s}{A_s \times m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

空白添加标准曲线校准:由  $A_s=aX_s+b$ ,求得 a 和 b,按式(2)计算:

$$X = \frac{\Lambda - b}{a} \dots\dots\dots (2)$$

式(1)、式(2)中:

- $X_s$ ——空白添加试料中相应 β-受体激动剂含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- $m$ ——试料称样量,单位为克(g);
- $m_s$ ——空白添加试料质量,单位为克(g);
- $\Lambda$ ——供试试料中测得的相应 β-受体激动剂色谱峰面积;
- $A_s$ ——空白添加试料中测得的相应 β-受体激动剂色谱峰面积;
- $f$ ——稀释因子。

9 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

10 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

## 附 录 A

(资料性附录)

克仑特罗等 16 种  $\beta$ -受体激动剂的液相色谱—串联质谱图(MRM 色谱图, 5  $\mu\text{g/L}$ )