

中华人民共和国农业农村部公告

第 600 号

根据《兽药管理条例》《饲料和饲料添加剂管理条例》规定,我部组织制定了《动物毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 的测定 液相色谱 - 串联质谱法》检测方法,现予发布,自发布之日起实施。

特此公告。

附件:动物毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 的测定 液相色谱 - 串联质谱法

农业农村部

2022 年 9 月 3 日

附件

动物毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、 沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本方法规定了动物毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A残留的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于猪、牛和羊的毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A残留量的测定。

2 原理

动物毛发经清洗、烘干、粉碎处理后，经盐酸溶液水解，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，同位素内标法定量。

3 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明外均为分析纯试剂，水为符合《分析实验室用水规格和试验方法》（GB/T 6682）规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈（ C_2H_3N ）：色谱纯。

3.1.2 甲酸（ CH_2O_2 ）：色谱纯。

3.1.3 甲醇（ CH_4O ）：色谱纯。

3.1.4 十二烷基磺酸钠 ($C_{12}H_{25}SO_3Na$)。

3.1.5 盐酸 (HCl)：含量36%~38%。

3.1.6 氨水 ($NH_3 \cdot H_2O$)：含量25%~28%。

3.2 溶液配制

3.2.1 十二烷基磺酸钠溶液：称取十二烷基磺酸钠10 g，加水溶解并稀释至1000 mL，混匀。

3.2.2 0.1 mol/L盐酸溶液：量取盐酸8.3 mL，加水稀释至1000 mL，混匀。

3.2.3 0.1%甲酸溶液：量取甲酸1 mL，加水稀释至1000 mL，混匀。

3.2.4 0.1%甲酸乙腈溶液：量取乙腈10 mL，加入0.1%甲酸溶液90 mL，混匀。

3.2.5 5%氨水甲醇溶液：量取氨水5 mL，加入甲醇95 mL，混匀。

3.3 标准品

3.3.1 盐酸克仑特罗、盐酸莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A，纯度均 $\geq 98.0\%$ 。详见附录1。

3.3.2 克仑特罗-D₉、盐酸莱克多巴胺-D₃、沙丁胺醇-D₃和苯乙醇胺A-D₃，纯度均 $\geq 98.0\%$ 。详见附录1。

3.4 标准溶液的制备

3.4.1 克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A标准储备溶液 (1 mg/mL)：取约10 mg标准品 (以克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A计)，精密称定，分别置于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配成

浓度均为1 mg/mL的标准储备溶液。-18℃以下保存，有效期12个月。

3.4.2 内标储备溶液（1 mg/mL）：取约10 mg标准品（以克仑特罗-D₉、莱克多巴胺-D₃、沙丁胺醇-D₃和苯乙醇胺A-D₃计），精密称定，分别置于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配成浓度均为1 mg/mL的内标储备溶液。-18℃以下保存，有效期12个月。

3.4.3 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：分别吸取标准储备溶液0.10 mL，置于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配成浓度为10 μg/mL混合标准中间溶液。-18℃以下保存，有效期12个月。

3.4.4 混合标准工作溶液（100 ng/mL）：吸取混合标准中间液0.10 mL，置于10 mL棕色容量瓶中，用0.1%甲酸乙腈溶液溶解并稀释至刻度，配成浓度为100 ng/mL混合标准工作溶液，现配现用。

3.4.5 混合内标中间溶液（10 μg/mL）：分别吸取内标储备液0.10 mL，置于10 mL棕色容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配成浓度为10 μg/mL混合内标中间溶液。-18℃以下保存，有效期12个月。

3.4.6 混合内标工作溶液（100 ng/mL）：吸取混合内标中间液0.10 mL，置于10 mL棕色容量瓶中，用0.1%甲酸乙腈溶液溶解并稀释至刻度，配成浓度为100 ng/mL混合内标工作溶液，现配现用。

3.5 材料

3.5.1 固相萃取柱：混合型阳离子交换柱，60 mg/3 mL，或性能相当者。

3.5.2 微孔滤膜：孔径0.22 μm ，疏水型。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾电离源（ESI）。

4.2 分析天平：感量0.00001 g和0.001 g。

4.3 超声波清洗器。

4.4 电热干燥箱，控温精度 $\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.5 球磨机：振动频率不低于60 Hz。

4.6 干燥器。

4.7 旋涡振荡器。

4.8 恒温水浴：控温精度 $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.9 离心机：转速不低于7000 r/min。

4.10 氮吹仪。

4.11 固相萃取装置。

5 试料的制备与保存

5.1 样品采集

选取动物背部毛发，从根部剪断，保存备用。采集毛发的质量应不少于4 g。

5.2 样品制备

取2 g毛发加入50 mL烧杯中，加入20 mL十二烷基磺酸钠溶液，于超声波清洗器上超声清洗30 min，再用水洗净毛发，置于40 $^\circ\text{C}$ 电热干燥箱中烘干，用球磨机将其均质成粉末。

——取均质的供试毛发样品，作为供试试料。

——取均质的空白毛发样品，作为空白试料。

——取均质的空白毛发样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

5.3 试料的保存

置于干燥器中保存。

6 测定步骤

6.1 提取

称取试料0.5 g（精确至0.001 g），于10 mL离心管中，依次加入混合内标工作溶液25 μ L、0.1 mol/L盐酸溶液5 mL，涡旋混匀。于60 $^{\circ}$ C水浴中水解4 h，7000 r/min离心10 min，取上清液备用。

6.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇3 mL，水3 mL预洗。取全部备用液过柱，依次用水3 mL、甲醇3 mL淋洗，抽干，用5%氨水甲醇溶液3 mL洗脱，收集洗脱液，于50 $^{\circ}$ C氮气吹干，用0.1%甲酸乙腈溶液0.50 mL溶解，过0.22 μ m微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

6.3 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作溶液、混合内标工作溶液适量，用0.1%甲酸乙腈溶液稀释成浓度为0.50 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL的系列标准工作溶液（含内标溶液均为5 ng/mL），供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测分析物特征离子质量色谱峰的峰面积与内标物特征离子质量色谱峰的峰面积比值为纵坐标，相应的

浓度为横坐标，绘制标准曲线；求回归方程和相关系数，相关系数应大于0.99。

6.4 测定

6.4.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C₁₈柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.7 μm。或性能相当者。

b) 柱温：40 °C。

c) 进样量：10 μL。

d) 流动相：A：0.1%甲酸溶液；B：乙腈，梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.3	98	2
2	0.3	98	2
7	0.3	40	60
8	0.3	98	2
10	0.3	98	2

6.4.2 串联质谱参考条件

a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI+）。

b) 检测方式：多反应监测（MRM）。

c) 离子源温度：500 °C。

d) 离子化电压：4500 V。

e) 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；脱溶剂气、锥孔气、碰撞气参考值分别为500 L/h、30 L/h和20 L/h。

f) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值见表2。

表2 定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
克仑特罗	277.0>203.1	277.0>203.1	25	17
	277.0>259.2			11
莱克多巴胺	302.1>107.0	302.1>164.1	20	17
	302.1>164.1			13
沙丁胺醇	240.1>148.1	240.1>148.1	25	20
	240.1>222.1			10
苯乙醇胺 A	345.0>327.0	345.0>150.0	22	17
	345.0>150.0			13
克仑特罗-D ₉	286.0>204.1	286.0>204.1	25	17
莱克多巴胺-D ₃	305.2>167.2	305.2>167.2	20	14
沙丁胺醇-D ₃	243.0>151.2	243.0>151.2	25	14
苯乙醇胺 A-D ₃	348.2>153.1	348.2>153.2	22	17

6.4.3 测定方法

a) 定性测定

在相同的测试条件下，试样溶液的保留时间与标准溶液保留时间的偏差应在±2.5%之内；试样溶液中的离子相对丰度与标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表3的要求。

表3 试样溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

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

b) 定量测定

取试样溶液和标准工作溶液，作单点或多点校准，按内标法定量。标准工作溶液及试样溶液中目标物的响应值均应在线性范围内。如超出线性范围，应将试样溶液重新稀释至适当的浓度。在上述液相色谱-串联质谱条件下，标准溶液及对应的同位素内标溶液特征离子质量色谱图见附录2。

6.5 空白试验

取空白试料，除不添加待测分析物外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

7 结果计算和表述

试料中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A残留量按标准曲线或以下公式计算：

$$X = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \times \frac{1000}{1000}$$

式中：

X —供试试料中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

A —试样溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A的峰面积；

A_s —标准溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A的峰面积；

A_{is} —试样溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A对应内标的峰面积；

A'_{is} —标准溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A对应内标的峰面积；

C_s —标准溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C_{is} —试样溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A内标浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C'_{is} —标准溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇或苯乙醇胺A内标浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V —溶解最终残余物体积，单位为毫升（mL）；

m —供试试料的质量，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

8 方法的灵敏度、准确度和精密度

8.1 灵敏度

本方法对猪、牛和羊毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A的检测限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

8.2 准确度

本方法对于猪、牛和羊的毛发中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺A在1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内的回收率为70%~120%。

8.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 1

标准品的中英文名称、化学分子式和 CAS 号

标准品的中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 4。

表 4 标准品中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
盐酸克仑特罗	Clenbuterol hydrochloride	$C_{12}H_{18}ClN_2O \cdot HCl$	21898-19-1
盐酸莱克多巴胺	Ractopamine hydrochloride	$C_{18}H_{23}NO_3 \cdot HCl$	90274-24-1
沙丁胺醇	Salbutamol	$C_{13}H_{21}NO_3$	18559-94-9
苯乙醇胺 A	Phenylethanolamine A	$C_{19}H_{24}N_2O_4$	1346746-81-3
克仑特罗-D ₉	Clenbuterol-D ₉	$C_{12}H_9Cl_2D_9N_2O$	129138-58-5
盐酸莱克多巴胺-D ₃	Ractopamine-D ₃ hydrochloride	$C_{18}H_{20}D_3NO_3 \cdot HCl$	1219794-72-5
沙丁胺醇-D ₃	Salbutamol-D ₃	$C_{13}H_{18}D_3NO_3$	1219798-60-3
苯乙醇胺 A-D ₃	Phenylethanolamine A-D ₃	$C_{19}H_{21}D_3N_2O_4$	/

附录 2

克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 的特征离子质量色谱图

克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 标准溶液（10 ng/mL）及内标溶液（5 ng/mL）的特征离子质量色谱图见图 1。

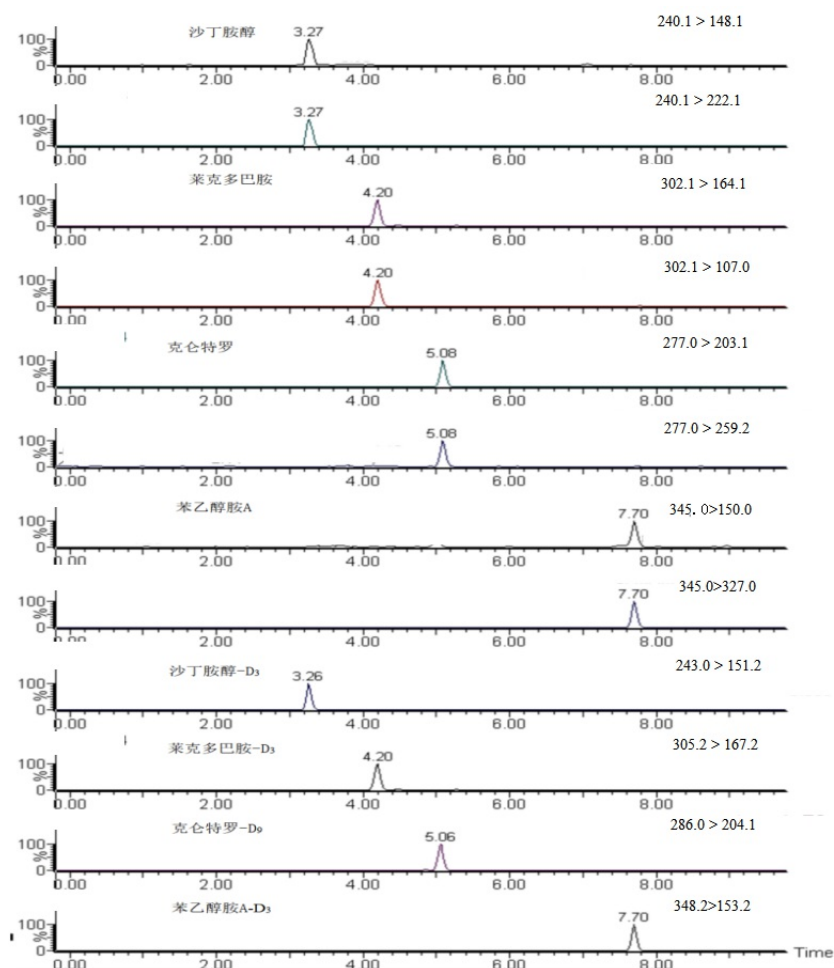


图 1 克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和苯乙醇胺 A 标准溶液及内标溶液的特征离子质量色谱图