



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××-202×

---

饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定  
液相色谱-串联质谱法

Determination of Chlorphenamine and Bromphenamine in feeds—  
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

---

国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本文件按照 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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家市场监督管理总局标准技术管理司提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：

# 饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定

## 液相色谱-串联质谱法

### 1 范围

本文件描述了饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的液相色谱-串联质谱法测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂中氯苯那敏和溴苯那敏的测定。

本文件的氯苯那敏和溴苯那敏检出限均为 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限均为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20195 动物饲料 试样的制备

### 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

### 4 原理

试样中的待测物用甲酸乙腈液提取，经混合型阳离子交换固相萃取小柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

### 5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 氨水。

5.3 甲酸。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 甲醇：色谱纯。

5.6 乙腈：色谱纯。

- 5.7 甲酸溶液（0.1%）：移取 1 mL 甲酸（5.4），用水稀释至 1000 mL，混匀。。
- 5.8 甲酸乙腈溶液（1%）：移取 1 mL 甲酸（5.3），用乙腈稀释至 100 mL，混匀。。
- 5.9 氨水甲醇溶液（5%）：取氨水（5.2）5 mL，加甲醇稀释至 100 mL，混匀。。
- 5.10 氯苯那敏标准储备溶液（500 μg/mL）：称取氯苯那敏（氯苯那敏（CAS：132-22-9，纯度≥98%）25 mg，精确至 0.01 mg，用乙腈溶解，转移至 50 mL 容量瓶中定容，摇匀。-18℃ 以下储存，有效期不超过 6 个月。或采用有证标准物质。
- 5.11 溴苯那敏标准储备溶液（500 μg/mL）：称取 溴苯那敏（CAS：86-22-6，纯度≥98%）25 mg，精确至 0.01 mg，用乙腈溶解，转移至 50 mL 容量瓶中定容，摇匀。-18℃ 以下储存，有效期不超过 6 个月。或采用有证标准物质。
- 5.12 混合标准中间溶液（50 μg/mL）：分别准确移取氯苯那敏标准储备溶液（5.10），溴苯那敏标准储备溶液（5.11）各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释并定容，混匀。-18℃ 以下储存，有效期不超过 1 个月。
- 5.13 标准系列溶液：准确移取适量的混合标准溶液（5.12）用甲酸溶液（5.7）配制成浓度分别为 1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L 和 200 μg/L 的标准工作溶液。此溶液临用现配。
- 5.14 混合型阳离子交换固相萃取小柱：60 mg/3 mL，或性能相当者。
- 5.15 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

## 6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：精度 0.1 mg 和 0.01 mg。。
- 6.3 离心机：转速不低于 8 000 r/min。
- 6.4 超声波清洗仪。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 氮吹仪。

## 7 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分混匀，避光密闭保存。选取类型相同，均匀一致、且在待测物保留时间处，仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为基质空白样品。

## 8 试验步骤

### 8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.1 mg，置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 甲酸乙腈溶液（5.8），超声提取 30 min，于 8000 r/min 离心 5 min，取上清液，备用。

### 8.2 净化

混合型阳离子交换固相萃取小柱（5.14）依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化，取 10 mL 备用液过柱。用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗混合型阳离子交换柱，抽干。用 3 mL 氨水甲醇溶液（5.9）洗脱，收集洗

脱液于 40℃水浴氮气吹至近干，准确加入 1.00 mL 甲酸溶液（5.7）复溶，涡旋混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜（5.15），上机。

### 8.3 基质曲线的制备

选取与待测饲料样品类型相近、混合均匀程度较高的空白饲料，称取 6 份，每份 5g（精确至 0.001g），于 50mL 离心管中，按 8.1 和 8.2 步骤处理，在净化、吹干后的残渣中，分别添加分别添加 1.0mL 混合标准溶液，配置成不同浓度（1 μg/L-100 μg/L）的基质添加标准曲线，供液相色谱-串联质谱测定，进行定量。也可利用待检测样品，添加适量的混合标准溶液，配置成相应浓度（1 μg/L-100 μg/L）的基质添加，按 8.1 和 8.2 步骤处理、通过扣除待测样品检测值进行定量。

### 8.4 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C18 色谱柱，柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm。或相当者；
- b) 流速：0.4 mL/min；
- c) 柱温：30℃；
- d) 进样量：5 μL。
- e) 流动相：A: 0.1% 甲酸水溶液；B: 乙腈，梯度洗脱，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流速(mL/min)	0.1%甲酸水溶液(%)	0.1%甲酸乙腈(%)
0	0.4	80	20
0.5	0.4	80	20
2	0.4	40	60
2.5	0.4	30	70
3.0	0.4	5	95
4.5	0.4	5	95
5.5	0.4	70	30
6.1	0.4	80	20
7.0	0.4	80	20

### 8.5 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 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) 毛细管电压：3.0 kV。
- d) 离子源温度：250 °C。
- e) 脱溶剂温度：320 °C。
- f) 雾化气、干燥气为高纯氮气，碰撞气为高纯氩气或其他合适气体；
- g) 喷雾电压、碰撞能量等参数应优化至最优灵敏度；
- h) 监测离子对、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 氯苯那敏和溴苯那敏的定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值

药物名称 Drug	离子对 Ion pairs (m/z)	去簇电压 DP(V)	碰撞能 CE(eV)
氯苯那敏	275.2>167.2	50	44
	275.2>230.2*		45
溴苯那敏	319.1>167.1*	50	44
	319.1>274		55

\*为定量离子

## 8.6 测定

### 8.6.1 定性测定

待测物选择 1 个母离子和 2 个子离子，在相同试验条件下，试样中待测物质的保留时间与标准系列溶液中对应该化合物的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内，且试样中目标化合物两个子离子的相对丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应该离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为试样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偏差 (%)

相对离子丰度/(%)	>50	>20~50	>10~20	$\leq 10$
允许的最大偏差/(%)	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

### 8.6.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下，依次测定氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液与试样溶液，以标准溶液的浓度为横坐标，以定量离子的峰面积为纵坐标，绘制工作曲线（相关系数 R 应大于或等于 0.99），并对样品进行定量。试样测定溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围之内，若试样测定溶液中的药物浓度超出线性范围时，可用 0.1%甲酸溶液进一步稀释（n 倍），重新测定。上述色谱和质谱条件下，氯苯那敏和溴苯那敏的标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图见附录 A。

## 9 试验数据处理

试样中氯苯那敏和溴苯那敏的含量以质量分数  $w$  表示，数值以毫克每千克（g/kg）表示，多点校准按式（1）计算，单点校准按式（2）计算：

$$w = \frac{\rho_1 \times V \times V_2 \times n}{V_1 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho_1$ ——由标准工作曲线得到的试样溶液中氯苯那敏和溴苯那敏的浓度，单位为微克每毫升（g/L）；

$V$ ——提取液的定容体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——用于净化的提取液体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——净化后最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$n$ ——稀释倍数；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）。

$$w = \frac{A_1 \times \rho_2 \times V \times V_2 \times n}{A_2 \times V_1 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A_1$ ——试样中氯苯那敏和溴苯那敏色谱峰面积；

$A_2$ ——标准溶液中氯苯那敏和溴苯那敏色谱峰面积；

$\rho_2$ ——标准溶液中氯苯那敏和溴苯那敏的浓度，单位为微克每毫升（g/L）；

$V$ ——提取液的定容体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——用于净化的提取液体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——净化后最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$n$ ——稀释倍数；

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）。

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。

## 10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附录 A  
(资料性)

氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液色谱图 (MRM 图)

氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液 (10 μg/L) 色谱图见图 A.1

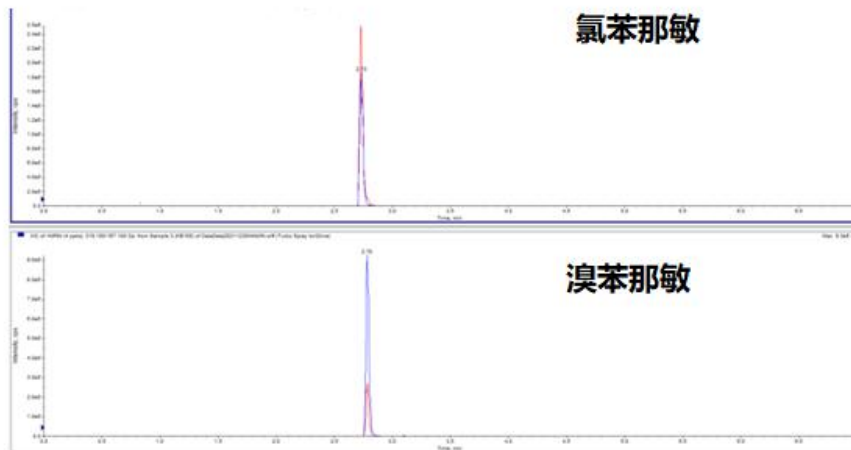


图 A.1 氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液 (10 μg/L) 色谱图