

中华人民共和国国家标准

农业部 1486 号公告 —1— 2010

饲料中苯乙醇胺 A 的测定 高效液相色谱—串联质谱法

Determination of phenylethanolamine A of in feeds—
High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2010-11-16 发布

2010-11-16 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76) 归口。

本标准主要起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]、农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)。

本标准主要起草人:索德成、李云、赵根龙、赵立军、张苏、李兰、张静、宋荣、冯忠华、邱静、柏凡、杨曙明、苏晓鸥。

饲料中苯乙醇胺 A 的测定 高效液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中苯乙醇胺 A 的高效液相色谱串联质谱的测定方法。
本标准适用于配合饲料、添加剂预混合饲料和浓缩饲料中苯乙醇胺 A 的测定。
方法最低检出限为 0.02 mg/kg，最低定量限为 0.05 mg/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 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

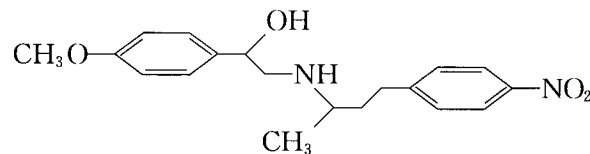
3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

苯乙醇胺 A phenylethanolamine A

化学命名为 2-[4-(4-硝基苯基)丁基-2-基氨基]-1-(4-甲氧基苯基)乙醇，俗称克伦巴胺。分子量为 344.17，分子式 $C_{19}H_{24}N_2O_4$ ，英文名称 2-[4-(nitrophenyl)butan-2-ylamino]-1-(4-methoxyphenyl)ethanol。化学结构式如下：



4 原理

样品中的苯乙醇胺 A 以甲酸甲醇溶液提取，提取液经过固相萃取柱净化，用高效液相色谱串联质谱法进行测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除方法另有规定外，试剂均为分析纯，实验室用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

5.1 乙腈：色谱纯。

5.2 甲醇。

5.3 甲酸：优级纯。

5.4 苯乙醇胺 A 对照品：纯度 $\geq 95\%$ 。

5.5 混合性阳离子固相萃取柱(MCX)：3 cc, 60 mg。

5.6 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1.0 mL 加水定容至 1 000 mL，摇匀，即得。

农业部 1486 号公告—1—2010

- 5.7 甲酸甲醇溶液:取甲酸 0.1 mL,加甲醇定容至 100 mL,摇匀,即得。
- 5.8 稀释液:取 0.1%甲酸溶液(5.6)90 mL 加乙腈至 100 mL,摇匀,即得。
- 5.9 氨化甲醇溶液:取氨水 5 mL,加入甲醇(5.2)100 mL,混匀。
- 5.10 标准储备液:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,准确称取苯乙醇胺 A,用甲醇配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,−18℃ 避光保存备用,有效期为六个月。
- 5.11 标准中间液:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,吸取苯乙醇胺 A 标准储备溶液(5.10),用甲醇稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,−18℃ 避光保存,有效期为三个月。
- 5.12 标准工作溶液:根据需要,分别吸取标准中间液(5.11)适量,用稀释液(5.8)稀释配制成浓度范围为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液,现配现用。

6 仪器和设备

- 6.1 实验室常用仪器、设备。
- 6.2 电子天平:感量 0.0001 g、感量 0.001 g。
- 6.3 离心机:可达 5 000 r/min(相对离心力为 2 988 g)。
- 6.4 超声水浴。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 高效液相色谱串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。
- 6.7 氮吹装置。
- 6.8 有机滤膜:0.22 μm 。

7 试样制备

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存,备用。

8 操作方法

8.1 试样提取

称取饲料试样 2 g(精确到 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,准确加入甲酸甲醇溶液(5.7)20 mL,充分摇动 30 s,再置于超声水浴中超声提取 20 min,期间摇动 2 次;取出后,于离心机上 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。

8.2 试样净化

固相萃取柱(5.5)分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化,准确移取 5 mL 上清液(8.1)过柱,用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗,近干后用 3 mL 氨化甲醇溶液(5.9)洗脱,收集洗脱液。在氮吹装置上 50℃ 下用氮气吹干,准确加入 1 mL 稀释液(5.8)溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,上 LC-MS/MS 测定。若样品液中含有的药物浓度超出线性范围,进样前用一定体积的稀释液稀释,使稀释后上机液中的药物浓度在线性范围内。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,柱内径 2.1 mm,粒度 3.5 μm 或相当性能的分析柱。

柱温:30℃。

流动相:0.1%甲酸溶液;乙腈,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	0.1%甲酸溶液, %	乙腈, %
0	95	5
9	40	60
9.1	95	5
12	95	5

流速: 0.20 mL/min。

进样量: 20 μ L。

8.3.2 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 MRM。

使用前, 应调节各气体流量, 以使质谱灵敏度达到检测要求。

质谱参数应优化至最佳。

定性离子对、定量离子对及碰撞能量的参考值见表 2。

表 2 苯乙醇胺 A 的定性、定量离子对及碰撞能量的参考值

名称	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	参考碰撞能量, V
苯乙醇胺 A	345/327	345/150	20
	345/150		20

8.3.3 定性测定

在相同试验条件下, 样品中待测物的保留时间与标准工作液的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内, 并且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近标准工作液中对应的定性离子对的相对丰度进行比较, 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

8.3.4 定量测定

按照上述液相色谱—串联质谱条件测定样品和标准工作溶液, 以色谱峰面积进行单点或多点校正定量, 样品溶液中待测物的响应值应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下, 苯乙醇胺 A 对照品的色谱质谱图见附录 A。

9 结果计算

试样中苯乙醇胺 A 的 X 以质量分数 (mg/kg) 表示, 测定结果可由计算机外标法自动计算, 也可按式(1)计算。

$$X = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_3 \times 1\,000}{P_{st} \times m \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_i ——试样溶液中苯乙醇胺 A 的峰面积值;

V ——试样提取液体积, 单位为毫升 (mL);

c_i ——苯乙醇胺 A 标准溶液浓度, 单位为微克每毫升 (mg/mL);

农业部 1486 号公告—1—2010

V_2 ——净化时分取溶液的体积,单位为毫升(mL);

P_s ——标准溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g);

V_3 ——上机前定容体积,单位为毫升(mL)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,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结果的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)
苯乙醇胺 A 的液相色谱—质谱图

A.1 苯乙醇胺 A 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的色谱图见图 A.1。

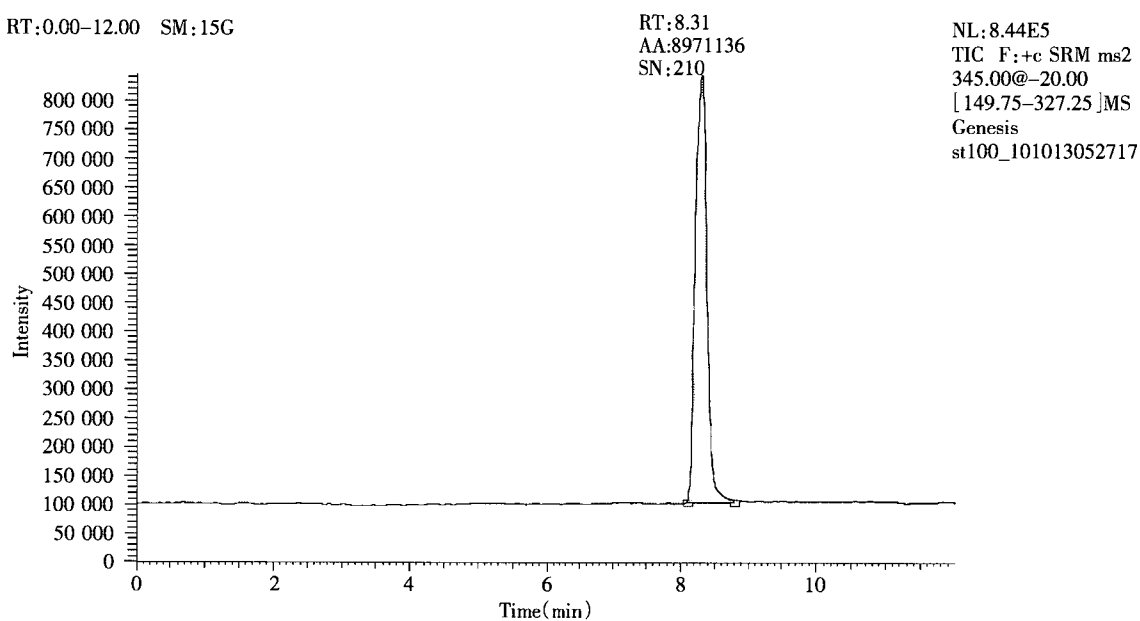


图 A.1 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的色谱图

A.2 苯乙醇胺 A 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的全扫描质谱图见图 A.2。

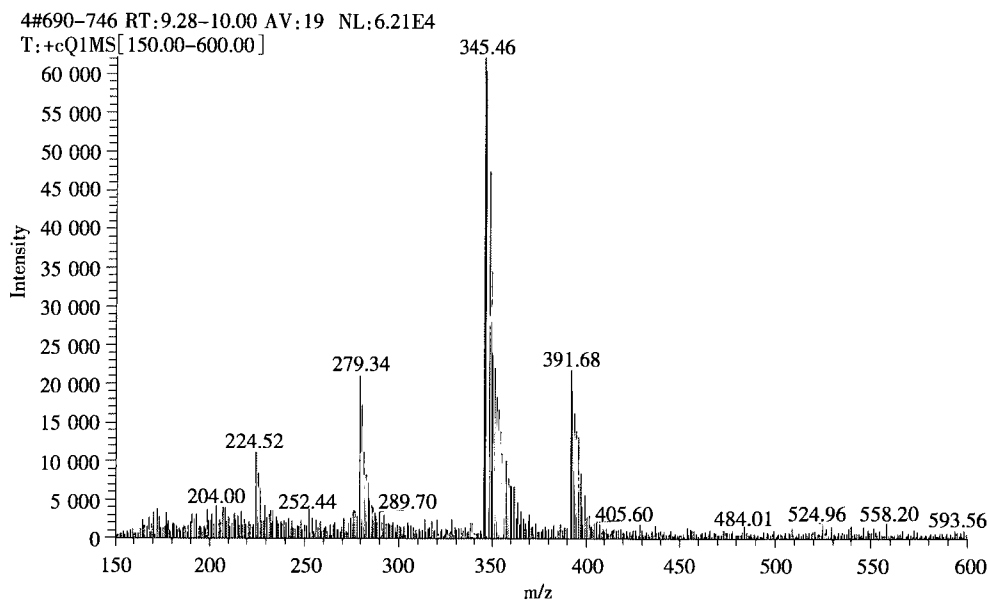


图 A.2 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的全扫描质谱图

A.3 苯乙醇胺 A 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的母离子(m/z 345)二级子离子扫描质谱图见图 A.3。

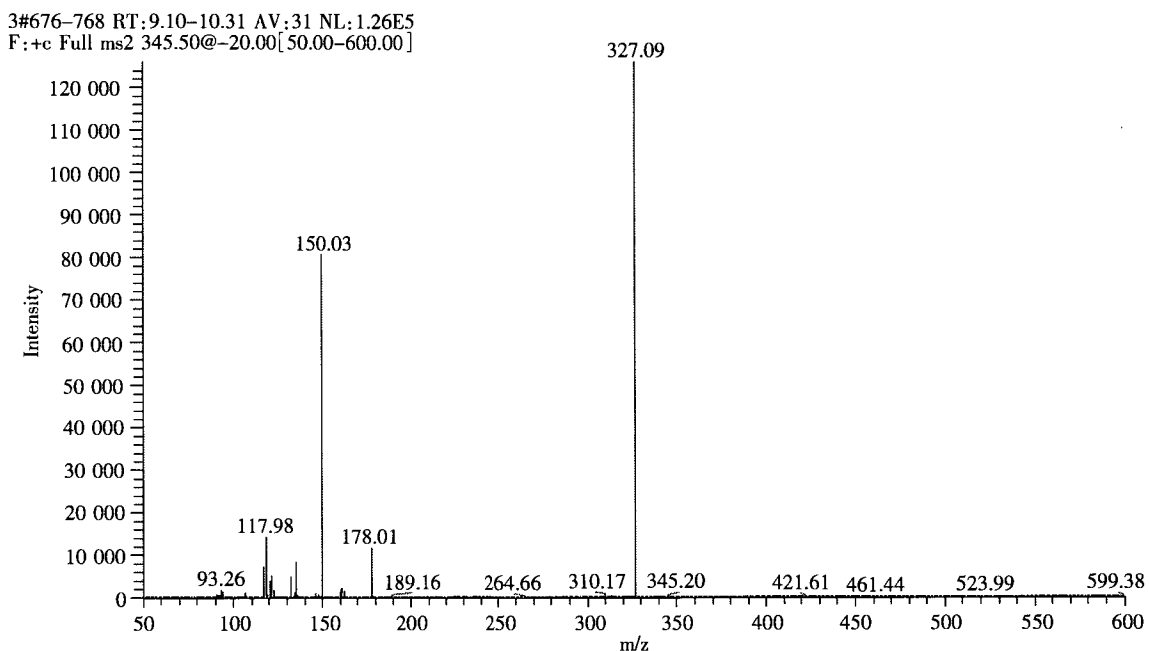


图 A.3 标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)的母离子(m/z 345)二级子离子扫描质谱图