

前 言

盐酸克仑特罗,其化学名称为 α -[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐,俗称克喘素,是一种 β_2 肾上腺素受体激动药,属国家禁止在饲料中使用的药物。本标准是在参阅欧盟有关的推荐方法和国内外文献的基础上,经大量实验研究制定的。

本标准规定了以高效液相色谱(HPLC)法和气相色谱-质谱(GC-MS)法测定饲料中盐酸克仑特罗的方法,规定 GC-MS 法为仲裁法。

本标准由全国饲料标准化技术委员会提出并归口。

本标准由国家饲料产品质量监督检验中心(北京)负责起草,北京师范大学分析测试中心参加起草。

本标准主要起草人:常碧影、范 理、阎惠文、宋 荣、李新新、李 兰。

中华人民共和国农业行业标准

饲料中盐酸克仑特罗的测定

NY 438—2001

Determination of clenbuterol hydrochloride in feed

1 范围

本标准规定了以高效液相色谱(HPLC)法和气相色谱-质谱(GC-MS)法测定饲料中盐酸克仑特罗的方法,规定 GC-MS 法为仲裁法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中盐酸克仑特罗的测定与仲裁。HPLC 法的最低检测限为 0.5 ng(取样 5 g 时,最低检测浓度为 0.05 mg/kg)。GC-MS 法最低检测限为 0.025 ng(取样 5 g 时,最低检测浓度为 0.01 mg/kg)。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 HPLC 法

3.1 方法原理

用加有甲醇的稀酸溶液将饲料中的克仑特罗盐酸盐溶出,溶液碱化,经液液萃取和固相萃取柱净化后,在 HPLC 仪器上分离、测定。

3.2 试剂和材料

以下所用的试剂和水,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

3.2.1 甲醇:色谱纯,过 0.45 μm 滤膜。

3.2.2 乙腈:色谱纯,过 0.45 μm 滤膜。

3.2.3 提取液:0.5%偏磷酸溶液(14.29 g 偏磷酸溶解于水,并稀释至 1 L):甲醇=80:20。

3.2.4 氢氧化钠溶液 $c(\text{NaOH})$ 约 2 mol/L:20 g 氢氧化钠溶于 250 mL 水中。

3.2.5 液液萃取用试剂

3.2.5.1 乙醚。

3.2.5.2 无水硫酸钠。

3.2.6 氮气。

3.2.7 盐酸溶液 $c(\text{HCL})$ 约 0.02 mol/L:1.67 mL 盐酸用水定容至 1 L。

3.2.8 固相萃取(SPE)用试剂

3.2.8.1 30 mg/lcc Oasis®HLB 固相萃取小柱¹⁾或同等效果净化柱。

1) Oasis®HLB 固相萃取小柱是由 Waters Corporation (34 Maple Street Milford MA, USA)提供的产品的商品名称,给出这一信息是为了给本行业标准的使用者提供方便,而不是标准主管部门对这一产品的认可。

3.2.8.2 SPE 淋洗液

3.2.8.2.1 淋洗液-1:含 2%氨水的 5%甲醇水溶液。

3.2.8.2.2 淋洗液-2:含 2%氨水的 30%甲醇水溶液。

3.2.9 HPLC 专用试剂

3.2.9.1 HPLC 流动相:1 mL1:1 磷酸(优级纯)用实验室二级水稀释至 1 L,并按 100:12 的比例和乙腈(3.2.2)混合,用前超声脱气 5 min。

3.2.9.2 盐酸克仑特罗标准溶液

3.2.9.2.1 储备液:200 $\mu\text{g/mL}$:10.00 mg 盐酸克仑特罗(含 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ 不少于 98.5%)溶于 0.02 mol/L 盐酸溶液并定容至 50 mL,储于冰箱中。有效期 1 个月。

3.2.9.2.2 工作液,2.00 $\mu\text{g/mL}$:用微量移液器移取储备液 500 μL ,以 0.02 mol/L 盐酸溶液稀至 50 mL,储于冰箱中。

3.2.9.2.3 标准系列:用微量移液器移取工作液(3.2.9.2.2)25、50、100、500、1 000 μL ,以 0.02 mol/mL 盐酸溶液稀释至 2 mL,该标准系列中盐酸克仑特罗的相应浓度分别为:0.025、0.050、0.100、0.500、1.00 $\mu\text{g/mL}$,储于冰箱中。

3.3 仪器、设备

3.3.1 实验室常用仪器、设备。

3.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g;感量 0.000 01 g。

3.3.3 超声水浴。

3.3.4 离心机:能达 4 000 r/min。

3.3.5 分液漏斗:150 mL。

3.3.6 电热块或沙浴:可控制温度在 $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。

3.3.7 烘箱:温度可控制在 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。

3.3.8 高效液相色谱仪:具有 C_{18} 柱 4 μm (如 150 mm $\times$ 3.9mm ID)或类似的分析柱和 UV 检测器或二极管阵列检测器。

3.4 样品的制备

取具代表性的饲料样品,用四分法缩减分取 200 g 左右,粉碎过 0.45 mm 孔径的筛,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 提取:称取适量试样(配合饲料 5 g,预混料和浓缩料 2 g)精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 三角瓶中,准确加入提取液(3.2.3)50 mL,振摇使全部润湿,放在超声水浴中超声提取 15 min,每 5 min 取出用手振摇一次。超声结束后,手摇至少 10 s,并取上层液于离心机上 4 000 r/min 下离心 10 min。

3.5.2 净化:准确吸取上清液 10.00 mL,置 150 mL 分液漏斗中滴加氢氧化钠溶液(3.2.4),充分振摇,调 pH 至 11~12,该过程反应较慢,放置 3~5 min 后,检查 pH,如 pH 降低,需再加碱调节。溶液用 30、25 mL 乙醚萃取两次,令醚层通过无水硫酸钠干燥,用少许乙醚淋洗分液漏斗和无水硫酸钠,并用乙醚定容至 50 mL。准确吸取 25.00 mL 于 50 mL 烧杯中,置通风橱内、低于 50 $^\circ\text{C}$ 加热块或沙浴(3.3.6)上蒸干,残渣溶于 2.00 mL 盐酸溶液(3.2.7),取 1.00 mL 置于预先已分别用 1 mL 甲醇和 1 mL 去离子水处理过的 SPE 小柱上,用注射器稍稍加压,使其过柱速度不超过 1 mL/min,再先后分别用 1 mL SPE 淋洗液-1(3.2.8.2.1)和淋洗液-2(3.2.8.2.2)淋洗,最后用甲醇洗脱,洗脱液置 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ 加热块或沙浴上,用氮气吹干。

3.5.3 测定

3.5.3.1 于净化、吹干的样品残渣中准确加入 1.00~2.00 mL 盐酸溶液(3.2.7),充分振摇,超声,使残渣溶解,必要时过 0.45 μm 的滤膜,清液上机测定,用盐酸克仑特罗标准系列(3.2.9.2.3)进行单点或多点校准。

3.5.3.2 HPLC 测定参数设定:

色谱柱: C_{18} 柱, 150 mm $\times$ 3.9 mm ID, 粒度 4 μ m 或类似的分析柱。

柱温: 室温。

流动相: 0.05% 磷酸水溶液: 乙腈 = 100 : 12 (3.2.9.1), 流速: 1.0 mL/min。

检测器: 二极管阵列或 UV 检测器。

检测波长: 210 nm 或 243 nm。

进样量: 20~50 μ L。

3.5.3.3 定性定量方法:

定性方法: 除了用保留时间定性外, 还可利用二极管阵列测定盐酸克仑特罗紫外光区的特征光谱, 即在 210、243 和 296 nm 有三个峰值依次变低的吸收峰。

定量方法: 积分得到峰面积, 而后用单点或多点校准法定量。

3.6 分析结果的表述

每千克试样中所含盐酸克仑特罗的质量按式(1)计算:

$$X = \frac{m_1}{m} \times D \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: X ——每千克试样中盐酸克仑特罗的质量, mg;

m_1 ——HPLC 色谱峰的面积对应的盐酸克仑特罗的质量, μ g;

D ——稀释倍数;

m ——所称量的样品质量, g。

结果表示至小数点后 1 位。

3.7 允许差

取平行测定结果的算术平均值为测定结果, 两个平行测定的相对偏差不大于 10%。

4 GC-MS 法(仲裁法)

4.1 方法原理

用加有甲醇的稀酸溶液将饲料中的克仑特罗盐酸盐溶出, 溶液碱化, 经液液萃取和固相萃取柱净化后, 在 GC-MS 联用仪上分离、测定。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂和水, 除特别注明者外均为分析纯试剂, 水为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

4.2.1 提取净化用试剂: 同 HPLC 法中 3.2.1~3.2.8。

4.2.2 衍生剂: N,O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)。

4.2.3 甲苯。

4.2.4 盐酸克仑特罗标准溶液

4.2.4.1 储备液, 200 μ g/mL: 10.00 mg 盐酸克仑特罗(含 $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$ 不少于 98.5%)溶于甲醇并定容至 50 mL, 储于冰箱中。有效期 3 个月。

4.2.4.2 工作液, 2.00 μ g/mL: 用微量移液器移取储备液(4.2.4.1)500 μ L, 以甲醇稀释至 50 mL, 储于冰箱中。

4.2.4.3 标准系列: 用微量移液器移取工作液(4.2.4.2)25、50、100、500、1 000 μ L, 以甲醇稀释至 2 mL, 该标准系列中盐酸克仑特罗的相应浓度为: 0.025、0.050、0.100、0.500、1.00 μ g/mL, 储于冰箱中。

4.3 仪器、设备

4.3.1 样品前处理设备同 HPLC 法 3.3.1~3.3.7。

4.3.2 GC-MS 联用仪

装有弱极性或非极性的毛细管柱的气相色谱仪和具电子轰击离子源及检测器。

4.4 样品的制备

同 HPLC 法 3.4。

4.5 分析步骤

4.5.1 提取:同 HPLC 法 3.5.1。

4.5.2 净化:同 HPLC 法 3.5.2。

4.5.3 测定

4.5.3.1 衍生:于净化、吹干的样品残渣中加入衍生剂 BSTFA(4.2.2)50 μL ,充分涡旋混合后,置(70 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,衍生反应 30 min。用氮气吹干,加甲苯(4.2.3)100 μL ,混匀,上 GC-MS 联用仪测定。同时用盐酸克仑特罗标准系列(4.2.4.3)做同步衍生。

4.5.3.2 GC-MS 测定参数设定:

色谱柱:DB-5MS,30 m $\times$ 0.25 mm ID0.25 μm 。

载气:氮气;柱头压:50 kPa。

进样口温度:260 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:1 μL ,不分流。

柱温程序:70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 200 $^{\circ}\text{C}$,于 200 $^{\circ}\text{C}$ 保持 6 min,再以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 2 min。

EI 源电子轰击能:70 eV。

检测器温度:200 $^{\circ}\text{C}$ 。

接口温度:250 $^{\circ}\text{C}$ 。

质量扫描范围:60~400 AMU。

溶剂延迟:7 min。

检测用克仑特罗三甲基硅烷衍生物的特征质谱峰: $m/Z=86,187,243,262$ 。

4.5.3.3 定性定量方法

定性方法:样品与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%。特征离子基峰百分数与标准品相差不大于 20%。

定量方法:选择离子监测(SIM)法计算峰面积,单点或多点校准法定量。

4.6 分析结果的表述

每千克试样中所含盐酸克仑特罗的质量按式(2)计算:

$$X = \frac{m_2}{m} \times D \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中: X ——每千克试样中盐酸克仑特罗的质量,mg;

m_2 ——GC-MS 色谱峰的面积对应的盐酸克仑特罗的质量, μg ;

D ——稀释倍数;

m ——所称量的样品质量,g。

结果表示至小数点后 1 位。

4.7 允许差

取平行测定结果的算术平均值为测定结果,两个平行测定的相对偏差不大于 20%。