



中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—202X

饲料中二羟丙茶碱的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of diprophylline in feeds —
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

202X - XX - XX 发布

202X - XX - XX 实施

中华人民共和国农业农村部

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

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：四川省饲料工作总站[农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）]

本文件主要起草人：

饲料中二羟丙茶碱的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了饲料中二羟丙茶碱的液相色谱—串联质谱测定方法。

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中二羟丙茶碱的测定。

本方法的检出限为0.01 mg/kg，定量限为0.05 mg/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

试样中的二羟丙茶碱经甲酸溶液提取、固相萃取柱净化后，用液相色谱-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 甲醇：色谱纯。

5.3 甲酸：色谱纯。

5.4 乙酸铵：色谱纯。

5.5 25%甲醇溶液：250 mL 甲醇加水稀释至 1 L，混匀。

5.6 0.2%甲酸溶液：2 mL 甲酸加水稀释至 1 L，混匀。

5.7 乙酸铵溶液（200 mmol/L）：3.1 g 乙酸铵加水溶解并稀释至 200 mL，混匀。

5.8 乙酸铵-甲酸溶液：移取 12.5 mL 乙酸铵溶液（5.7）和 1 mL 甲酸，加水定容至 500 mL，混匀。

5.9 标准储备溶液（1 mg/mL）：精密称取二羟丙茶碱标准品或对照品（CAS：479-18-5，纯度不低于 98%）50 mg（精确至 0.01 mg）于 50 mL 容量瓶中，用 25%甲醇溶液（5.5）溶解定容。于 2℃~8℃ 保存，有效期为 3 个月。

- 5.10 标准中间溶液（10 μg/mL）：精密移取 1mL 二羟丙茶碱标准储备溶液（5.9）于 100mL 容量瓶中，用 0.2%甲酸溶液（5.6）稀释至刻度，混匀。于 2℃~8℃ 保存，有效期为 1 个月。
- 5.11 固相萃取柱：混合型阳离子交换柱，60 mg/3 mL，或性能相当者。
- 5.12 微孔滤膜：0.22 μm，水系。
- 5.13 密封盖塑料离心管：50 mL。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 6.3 离心机：转速不低于 8 000 r/min。
- 6.4 往复振荡器。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 旋涡混合器。
- 6.7 粉碎机。
- 6.8 氮吹仪。

7 样品

按 GB/T 20195 制备试样，至少 200 g，粉碎后通过 0.42 mm 孔筛，充分混匀，装入容器，密闭保存，备用。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，作为空白试样。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g，精确至 0.0001 g，置于 50 mL 离心管中，加入 20.0 mL 0.2% 甲酸溶液（5.6），摇匀，振荡 20 min，以 8 000 r/min 离心 5 min，移取上清液作为备用液。

8.2 净化

8.2.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料：将固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。准确移取 5.0 mL 备用液（8.1）过柱，用 3 mL 水淋洗，抽干，再用 3 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，于 50℃ 氮吹至干，准确加入 1.00 mL 0.2% 甲酸溶液（5.6）溶解，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜（5.12）。

8.2.2 添加剂预混合饲料：取适量备用液（8.1）过 0.22 μm 滤膜（5.12）两次。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样，按 8.1 和 8.2 处理得到空白基质溶液，取适量标准中间液（5.10），以空白基质溶液进行稀释，配制成浓度为 5.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、200.0 ng/mL、500.0 ng/mL 基质匹配标准系列溶液，临用现配。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，柱长50 mm，内径2.1 mm，填料粒径1.8 μm。或性能相当者。

流动相：A相，甲醇（5.2）；B相，乙酸铵-甲酸溶液（5.8），梯度洗脱条件见表1。

流速：0.3 mL/min。

柱温：30℃。

进样量：2 μL。

表1 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A 相(%) | B 相(%) |
|----------|--------|--------|
| 0 | 15.0 | 85.0 |
| 0.50 | 15.0 | 85.0 |
| 2.50 | 95.0 | 5.0 |
| 3.20 | 98.0 | 2.0 |
| 4.20 | 98.0 | 2.0 |
| 4.21 | 15.0 | 85.0 |
| 6.50 | 15.0 | 85.0 |

8.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

毛细管电压：3.5 kV。

干燥气温度：300℃。

干燥气流速：5 L/min。

雾化器压力：45 psi。

二羟丙茶碱的定性离子对、定量离子对等参数见表2。

表2 二羟丙茶碱的多反应监测（MRM）离子对及碰撞能量参考值

| 待测物名称 | 监测离子对(m/z) | 碰撞能量 (eV) |
|--------------------|--------------------------|-----------|
| 二羟丙茶碱 | 255.0/180.9 ^a | 22 |
| | 255.0/123.9 | 34 |
| ^a 为定量离子 | | |

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液和试样溶液上机测定。基质匹配标准溶液多反应监测色谱图参见附录A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差在±2.5%以内，且试样谱图中二羟丙茶碱定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的定性离子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

| 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 |

8.4.5 定量

分别取适量试样溶液和基质匹配标准系列溶液，以浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液用0.2%甲酸溶液稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与基质匹配标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中二羟丙茶碱的含量以质量分数 w 计，单位为毫克每千克（mg/kg）表示。标准曲线校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算。

$$w = \frac{C_x \times V \times n}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

$$w = \frac{A \times C_s \times V \times n}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C_x ——由标准曲线得到的试样溶液中二羟丙茶碱的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A ——试样溶液中二羟丙茶碱的色谱峰面积；

A_s ——基质匹配标准溶液中二羟丙茶碱的色谱峰面积；

C_s ——基质匹配标准溶液中二羟丙茶碱的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

n ——稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）。

测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留3位有效数字。

10 精密度

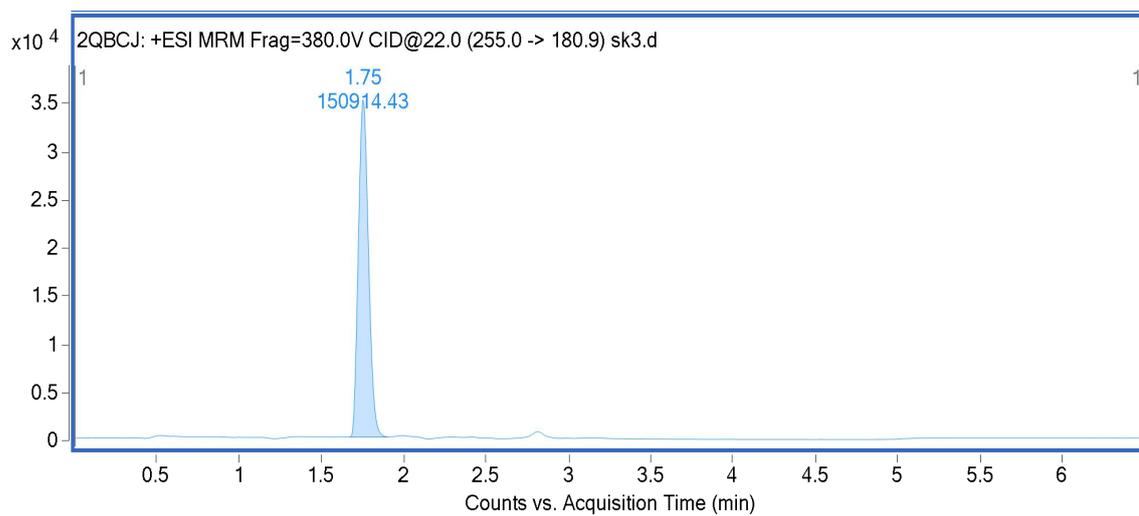
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附录 A

(资料性)

基质匹配二羟丙茶碱标准溶液多反应监测色谱图

基质匹配二羟丙茶碱标准溶液定量离子色谱图见图 A.1。



图A.1 基质匹配二羟丙茶碱标准溶液（100.0 ng/mL）多反应监测色谱图

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中二羟丙茶碱的测定 液相色谱-串联
质谱法》

编制说明

（公开征求意见稿）

起草单位：四川省饲料工作总站农业农村部饲料质量监督检
验测试中心（成都）

2021年3月

目 录

| | |
|--------------------|----|
| 一、标准制定背景及任务来源 | 3 |
| 二、主要工作过程 | 5 |
| 三、标准的编写规则和编制依据 | 6 |
| 四、标准制定的主要内容及其依据 | 7 |
| 五、结论 | 48 |
| 六、验证试验结果 | 48 |
| 七、与现行法律法规和强制标准的关系 | 49 |
| 八、标准作为强制性或推荐性标准的意见 | 49 |
| 九、重大分歧意见的处理经过和依据 | 49 |
| 十、其他需要说明的事项 | 49 |
| 参考文献 | 50 |

一、标准制定背景及任务来源

1、标准制定背景

近年来，食品安全问题已经成为社会普遍关心的热点话题，习总书记对食品安全工作提出了四个“最严”的要求，以确保人民群众舌尖上的安全。饲料作为养殖业的投入品和食品安全的源头，已经成为农产品质量安全关注的焦点之一，只有饲料安全，才能确保畜禽产品质量安全。但我国饲料产品中违法添加和使用禁用物质的现象屡禁不止，先后曝光出饲料中添加“苏丹红、三聚氰胺、氯丙那林、苯乙醇胺 A、喹乙醇”等违法违规行为，对饲料行业和养殖业的健康可持续发展造成沉重打击，严重危害了人民群众的健康。

二羟丙茶碱也称为喘定、甘油茶碱、新赛林，是茶碱的衍生物之一，对呼吸道有直接松弛作用，在临床上主要用于治疗人的支气管哮喘、心源性哮喘、喘息型支气管炎、阻塞性肺气肿等。人虽然可以服用较大剂量二羟丙茶碱以达到平喘止咳效果，但可能会发生不良反应^[1-3]。据文献报道，二羟丙茶碱一次性用量过大，或静脉注射速度过快，或反复用药积累，或与其他药物同用使其血浓度加大，均有可能发生中毒^[4]。人体摄入二羟丙茶碱的毒副作用类似茶碱，剂量过大时会出现恶心、呕吐、易激动、失眠、心动过速、心律失常，甚至发热、脱水、惊厥，严重者呼吸、心跳骤停。有实验表明，人体在摄入 128 mg/kg 剂量后已出现严重头痛症状。若人体长期摄入二羟丙茶碱类药物，会造成胆囊壁变厚，使其正常收缩功能紊乱，严重危害身体健康^[5-6]。

2013 年 9 月，在四川省“瘦肉精”拉网检查中，绵阳市盐亭县农业执法

人员在用“瘦肉精”快速检测联卡对富驿镇共和村某养猪场猪尿液进行抽样检测时，发现部分猪尿液为阳性。15个阳性样品带回实验室后，我单位采用液质联用仪对其进行14种兴奋剂类物质（含苯乙醇胺A）检测，结果均未检出。但实验发现部分猪尿样品在“氯丙那林”质谱碎片离子通道中的色谱峰面积酶解后峰面积明显增大，怀疑其含有其它未知物质。针对这一检测结果，我单位立即要求盐亭县畜牧局对该养殖户使用的相关饲料、兽药产品进行抽样送检测。我们先后利用串联质谱和飞行时间质谱对饲料和兽药样品进行扫描分析，最终在商品名为“氟苯尼考注射液”的一种兽药中检出二羟丙茶碱等违禁物质。我们将此情况上报告给省局和农业部相关部门，引起高度重视，要求继续排查相关可疑样品，并积极申报检测方法立项。

以“二羟丙茶碱”为关键词在百度中搜索，可以找到84万余条信息，其中有很多网页宣称二羟丙茶碱在养殖中的“功效和优势”，有的产品甚至宣传“该药物具有与肾上腺素受体激动剂类似的作用，能对动物体内营养再分配起到促进作用，加速动物体内的脂肪分解代谢和蛋白质合成，能显著提高胴体的瘦肉率，提高养殖动物日增重和饲料转化率等”。这些夸大宣传极有可能诱导某些厂家将该种药物在饲料生产中滥用，进而通过畜产品进入人体。经查证，目前二羟丙茶碱未列入《饲料原料目录》、《饲料添加剂品种目录》、《饲料药物添加剂品种目录》和《国家兽药典》中，因此在商品饲料生产中禁止添加使用。按照农业农村部第194号公告要求，自2020年7月1日起，饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂（中药类除外）的商品饲料。随着禁抗政策的执行，茶碱类药物极有可能被某些厂家非法使用，造成饲料质量安全隐患。

为保障我国饲料产品质量安全，严厉查处该类药物在生产中的违法使用行为，国家急需出台饲料中二羟丙茶碱的检测方法。经资料查询，目前国内外均无饲料中二羟丙茶碱的检测方法。该标准的制定将提升监管部门对该类物质的监控能力，为防止其违法滥用提供重要技术支撑，这将为促进我国饲料行业健康平稳发展，确保饲料及畜产品质量安全具有重要的意义。

2、任务来源

根据全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料工业国家标准、行业标准制修订文件，四川省饲料工作总站【农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）】承担了《饲料中二羟丙茶碱的测定》农业行业标准制定工作，项目编号为 2015-50，该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

二、主要工作过程

1、成立标准编制小组。

计划任务下达后，我单位成立标准起草小组，对标准起草工作进行分工，明确任务职责，确保项目顺利实施。

2、查询国内外相关标准和文献资料。

查阅了国内外有关标准和参考文献等技术资料，选取具有代表性的参考资料作为标准起草中的主要技术参考文本。

3、确定标准制定技术路线、原则。

本标准依据二羟丙茶碱的理化性质基础上，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定。

4、进行论证实验，建立新标准方法。

通过实验摸索，优化样品前处理条件和上机条件，建立饲料中二羟丙茶碱的液相色谱-串联质谱法。

5、编写标准征求意见稿。根据收集和查阅的相关资料文献以及实验测定结果，最终形成标准征求意见稿，编写标准文本内容和编制说明。

6.征求专家意见

总共发送“征求意见稿”26份，回函25份，合并相同意见后共计78条，在此基础上修改征求意见稿，形成标准预审稿。

7.组织方法验证

2020年7月，本标准方法经山东省饲料质量检验所、河南省兽药饲料监察所和农业农村部食品质量监督检验测试中心（成都）3家单位验证。验证结果表明，该标准方法设计合理，实用有效。

8. 标准预审

在全国饲料工业标准化技术委员会的指导下，标准编制小组邀请山东省饲料质量检验所、中国农科院质标所、河南省兽药饲料监察所等单位8位专家于2021年2月3日对标准进行了预审，并提出意见。标准编制小组根据预审会专家组的意见和建议，进一步补充有关数据、修改完善标准文本和编制说明，形成标准公开征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

三、标准的编写规则和编制依据

1、编写规则

本标准的结构、技术要素及表述方法是按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作

导则 第 1 部分：标准的结构和编写》以及 GB/T 20001.4-2015《标准编制规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。标准制定结合国内外检测技术发展趋势和我国饲料行业发展现状，力求做到技术上先进、经济上合理，确保方法的安全性、准确性、通用性。

2、编制依据

- (1) 遵循国家颁布的相关法律法规；
- (2) 国家或行业有关标准；
- (3) 标准编制小组调研和实测的样品检测数据。

四、标准制定的主要内容及其依据

经资料查询，目前二羟丙茶碱药物的检测方法有熔点法、比色法、液相色谱法和液相色谱-串联质谱法等^[8-10]，因为二羟丙茶碱禁止在饲料产品中使用，所以饲料中其含量的测定应考虑准确度和定量。为此，我们选择目前国际上普遍采用的液相色谱-串联质谱法对其进行检测。方法确定过程总体分为样品提取、样品净化和样品检测三个部分，并对具体实验条件进行优化。

4.1 样品提取条件的确定

二羟丙茶碱为白色粉末或颗粒，密度为 1.57 g/cm^3 ，熔点为 $161 \sim 162^\circ\text{C}$ ，沸点为 589.6°C ，无臭，味苦，易溶于水，微溶于乙醇、乙醚等有机溶剂，常温常压下稳定存在。分子结构式见下图 1。

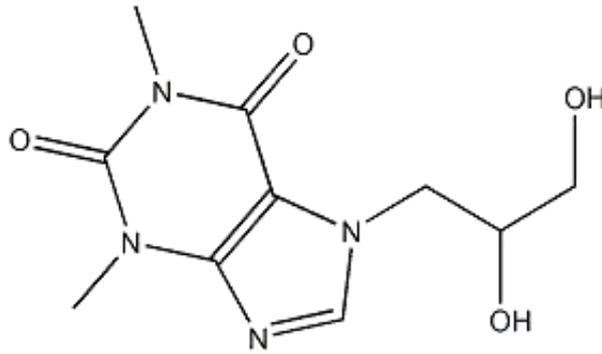


图 1 二羟丙茶碱的分子结构式

根据其物理化学性质可知，该物质为极性化合物，因此我们选取基质较为复杂的某配合饲料 2 g，添加二羟基丙茶碱标液使其浓度为 10.0 mg/kg，分别用 0.2%甲酸甲醇，0.2%甲酸乙腈，0.2%甲酸水，0.1%甲酸水，1.0%甲酸水溶液作为溶剂进行提取，上机测定，计算其回收率，结果见下表 1。

表 1 某配合饲料各溶剂的提取情况

| | 0.2%甲酸甲 醇溶液 | 0.2%甲酸乙 腈溶液 | 0.2%甲酸 溶液 | 0.1%甲 酸溶液 | 1.0%甲 酸溶液 |
|------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| 回收率 (%) | 46.0 | 37.8 | 73.4 | 63.2 | 62.3 |

由表 1 中回收率结果可知，0.2%甲酸水溶液对样品的回收率最高，且不使用挥发性和毒性较强的甲醇、乙腈有机溶剂，提取溶剂绿色环保，成本低廉，因此考虑采用甲酸水作为提取液。经对不同浓度的甲酸水溶液进行提取效率的比较，最终选择 0.2%甲酸水作为配合饲料的提取液。

另外分别选用维生素预混料、复合预混料和浓缩料各 2.0 g，添加成浓度为 25 mg/kg，考察 0.2%甲酸水溶液对其提取效率，结果见下表 2。

表 2 溶剂为 0.2%甲酸水溶液的提取情况

| | 维生素预混料 | 复合预混料 | 浓缩料 |
|-----------|--------|-------|-------|
| 回收率-1 (%) | 97.28 | 87.39 | 93.84 |
| 回收率-2 (%) | 83.85 | 89.53 | 88.84 |
| 回收率-3 (%) | 85.91 | 91.60 | 93.87 |

从表 2 中的回收率可以看出，在预混料和浓缩料中 0.2%甲酸水溶液的提取效率较高，且 3 个平行样品的重复性较好，因此最终也选择 0.2%甲酸水溶液作为提取溶剂。

考察了提取时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min 时样品的回收率情况，试验结果表明，随着提取时间增加，样品回收率逐渐升高，且在 20min 时样品回收率可达 80%以上，之后回收率无明显增加。为提高检测效率，节约操作时间，最终将样品提取时间定为 20 min。考察了提取液体积分别为 10 mL、20 mL、30 mL、40 mL 时样品的回收率测试情况，当体积为 10 mL 时，虽然回收率较高，但部分样品植物性成分含量高，吸水性较强，离心后上清液较少，不利于吸取。提取体积为 30 mL 和 40 mL 时，虽然回收率满意，但造成了提取液的浪费。因此试验最终选择提取液体积为 20 mL，在回收率满足要求的情况下，最大限度节约溶剂，方便移取操作。

4.2 样品净化条件的确定

饲料产品基质复杂，除含有各种植物性色素外，生产时往往还会添加各类维生素、矿物质、氨基酸、酶制剂、微生物制剂等。如果对样品的提取液不加以净化处理，可能会对检测仪器造成干扰和污染，这将极大影响检测结果的准确性，因此实验中选择适当的净化方法是十分必要的。

目前实验室常用的净化方法是选用固相萃取技术，利用固相萃柱对待测物或样品中杂质选择性吸收，从而达到净化的目的。本方法选用实验室常用的 C₁₈、HLB 和 MCX 柱用于净化条件摸索。C₁₈ 小柱是最常见的净化柱，主要填充物含疏水基团，适用于非极性化合物的净化。HLB 小柱的填充物为二乙烯苯-N-乙烯基吡咯烷酮聚合物，是亲脂疏水化合物。MCX 柱为混合型阳离子交换固相萃取柱，其填料为聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物，比表面积高，交换容量大，对碱性化合物具有较高的选择性和灵敏度。

选取鸡配合饲料 2 g 添加二羟丙茶碱使其浓度成为 0.3 mg/kg，经 0.2% 甲酸水提取，分别经 C₁₈、HLB 和 MCX 柱初步净化后，上机测定，计算其回收率，具体色谱图见下图 2、3、4 所示。

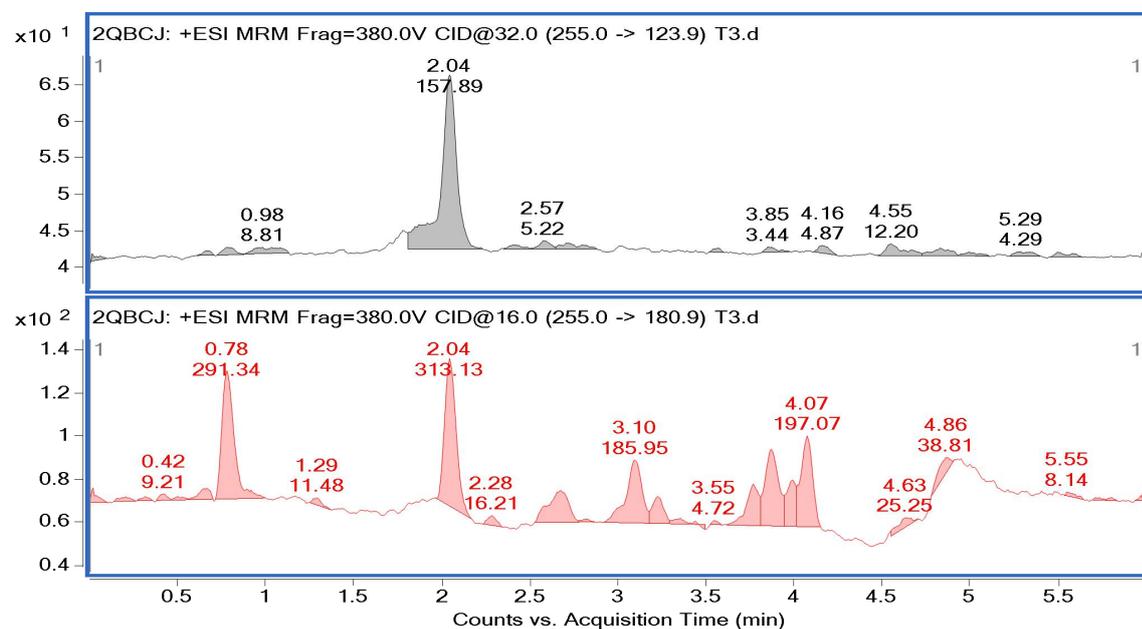


图 2 C₁₈ 柱对饲料净化效果的离子色谱图

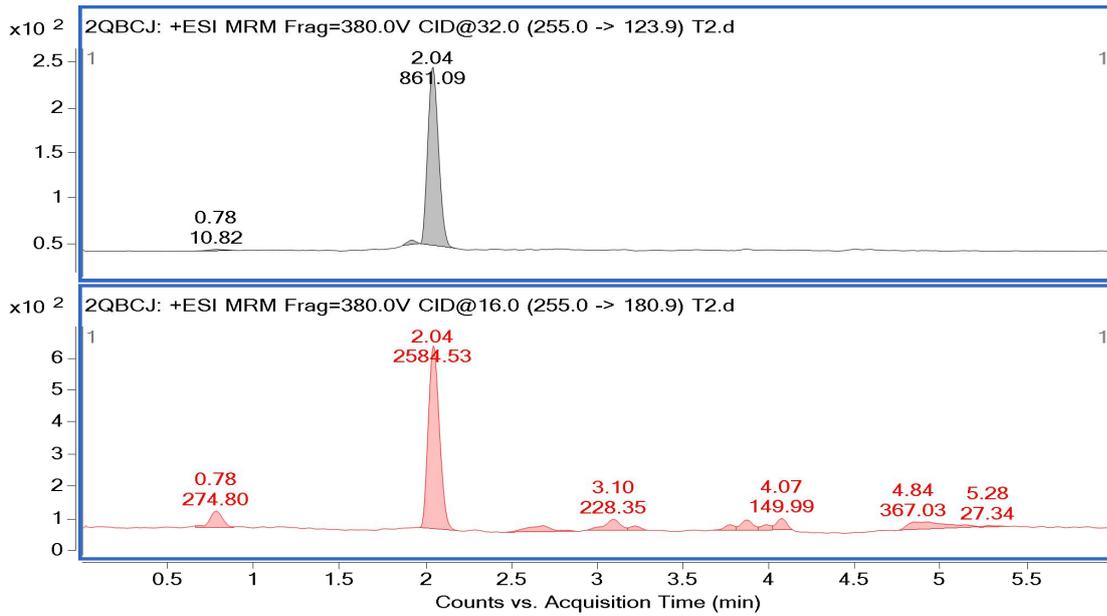


图3 HLB柱对饲料净化效果的离子色谱图

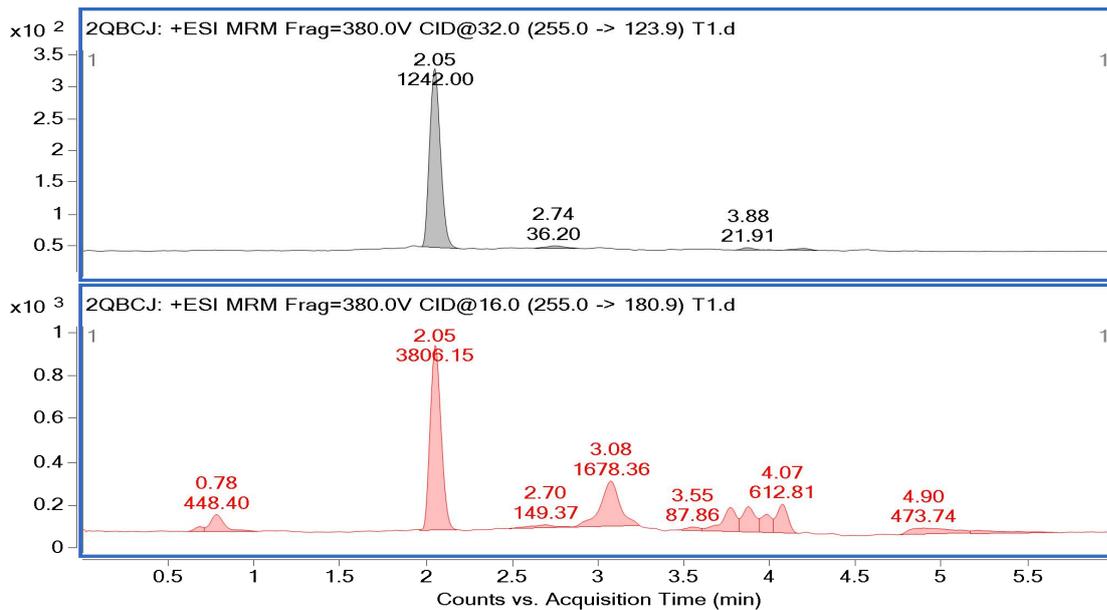


图4 MCX柱对饲料净化效果的离子色谱图

通过以上三种色谱图可以看出，C₁₈柱对样品净化效果最差，谱图中除待测物外还有很多杂质峰，净化后的杂质干扰待测物的检测基线。HLB柱和MCX柱对样品的净化效果较好，但使用HLB柱净化的样品回收率为72%，而使用MCX柱净化的样品回收率达到80.5%。MCX柱净化的样品效果和回收率明显优于其他两种净化柱，所以最终选择MCX柱作为净化柱。该实验结

果与 MCX 柱特别适用于碱性化合物的净化结论一致。考虑到 MCX 净化柱的普及性，我们最终选取 60mg/3mL 规格进行实验，并对其淋洗、洗脱条件进行摸索。经反复实验比较，最终将净化条件确定为“将固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。准确移取 5 mL 备用液过柱，用 3 mL 水淋洗，再用 3 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，于 50℃氮吹至干，准确加入 1.0 mL 0.2%甲酸水溶液(4.6)溶解，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜后上机测定。”

为进一步验证 MCX 柱对不同饲料样品的净化效果，我们选取猪预混料、猪配合料、猪浓缩料（添加浓度为 5.0 mg/kg）比较其提取液过柱和未过柱的离子色谱图，结果见下图 5~图 10，其回收率结果见表 3。

表 3 样品提取液过柱与未过柱回收率结果情况

| | 猪预混料 | | 猪配合饲料 | | 猪浓缩饲料 | |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 未净化 | 净化 | 未净化 | 净化 | 未净化 | 净化 |
| 回收率 (%) | 73.3% | 60.3% | 23.8% | 93.5% | 27.6% | 84.2% |

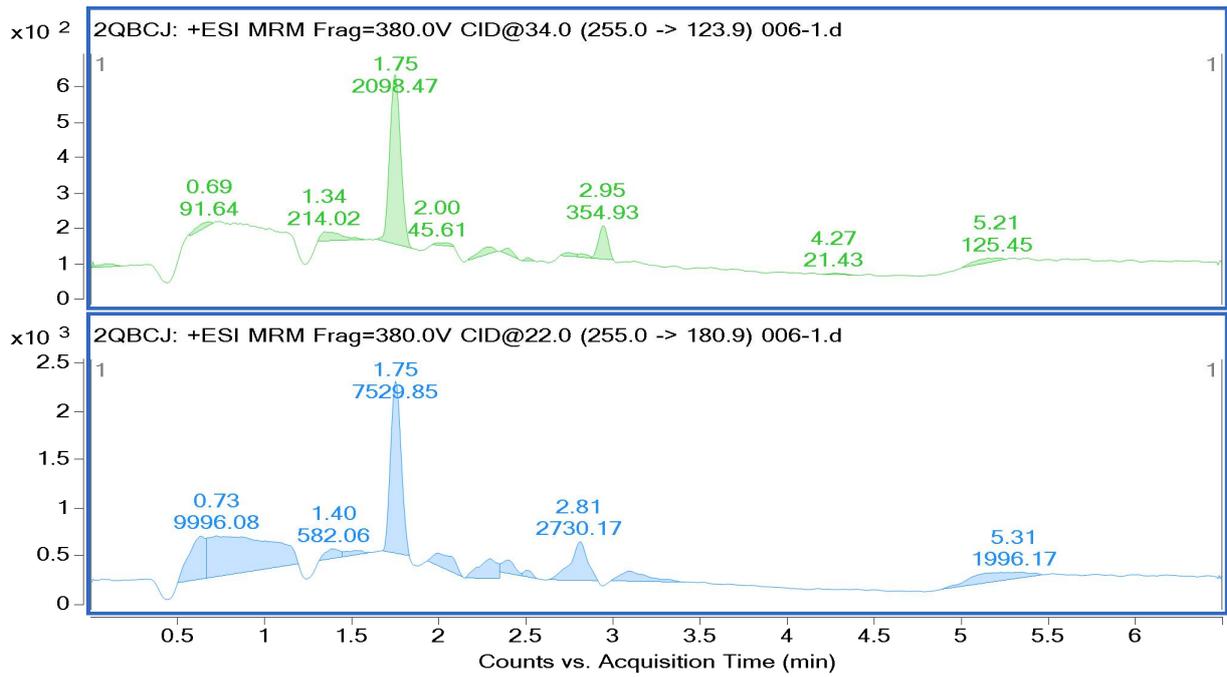


图 5 猪预混料未经 MCX 柱净化的离子色谱图

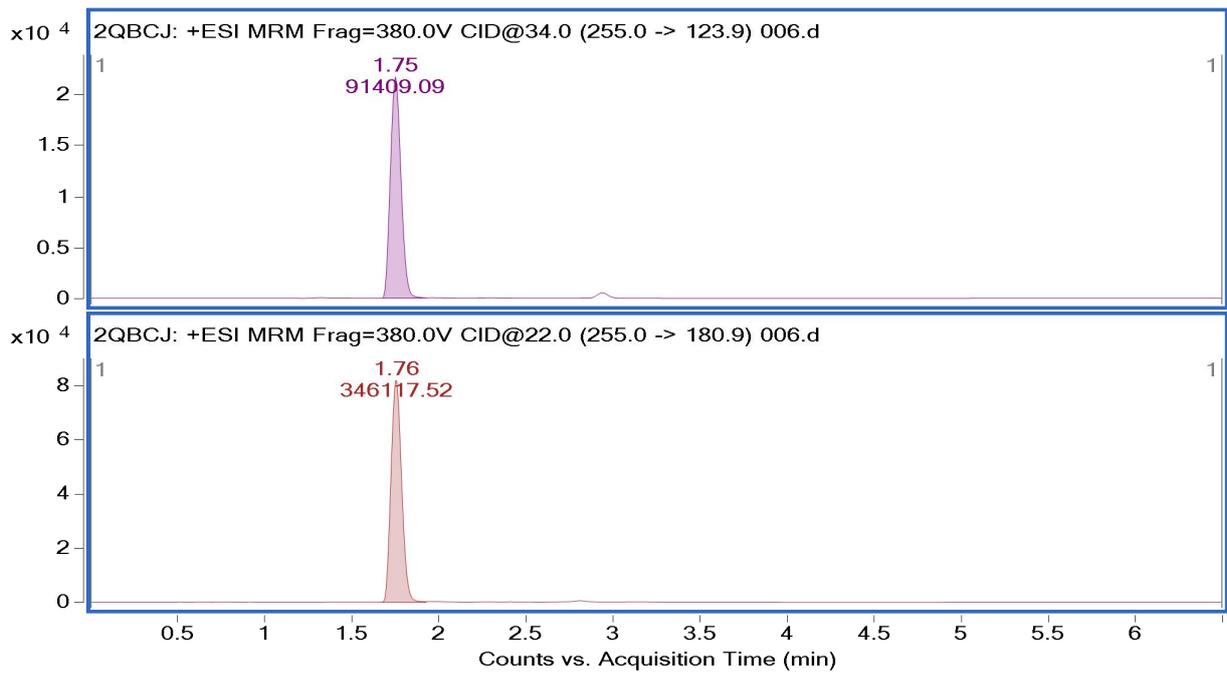


图 6 猪预混料经 MCX 柱净化的离子色谱图

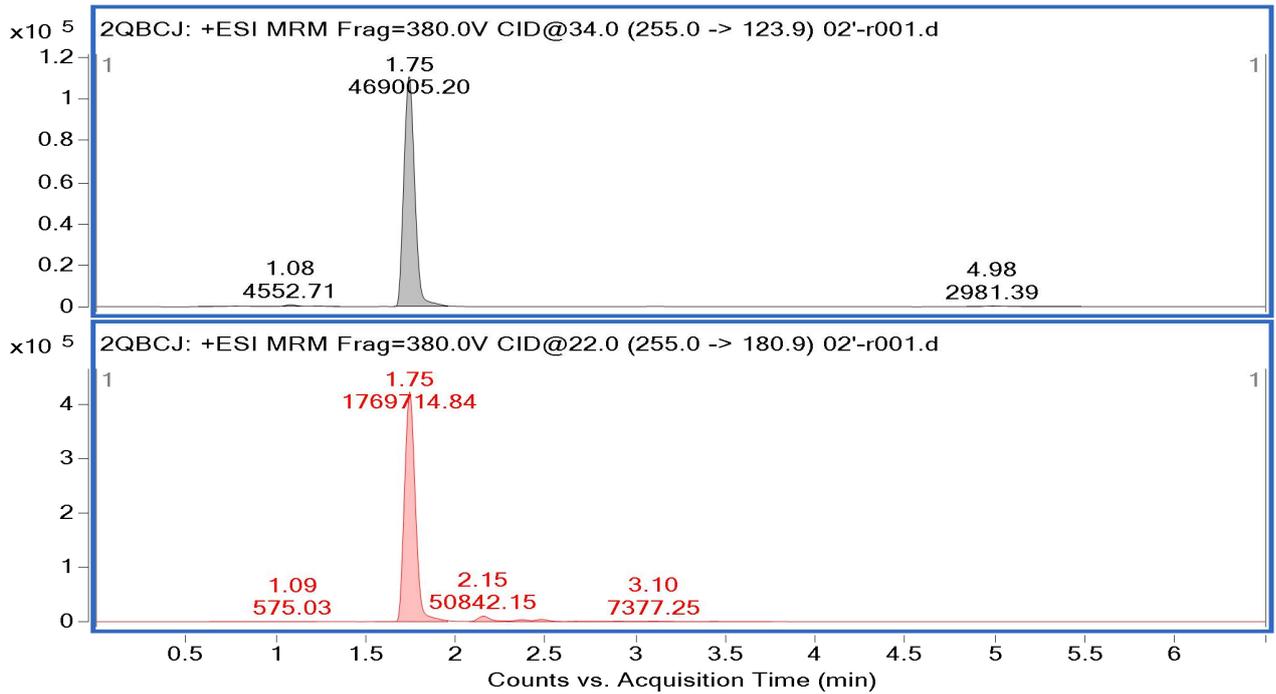


图 7 猪配合料未经 MCX 柱净化的离子色谱图

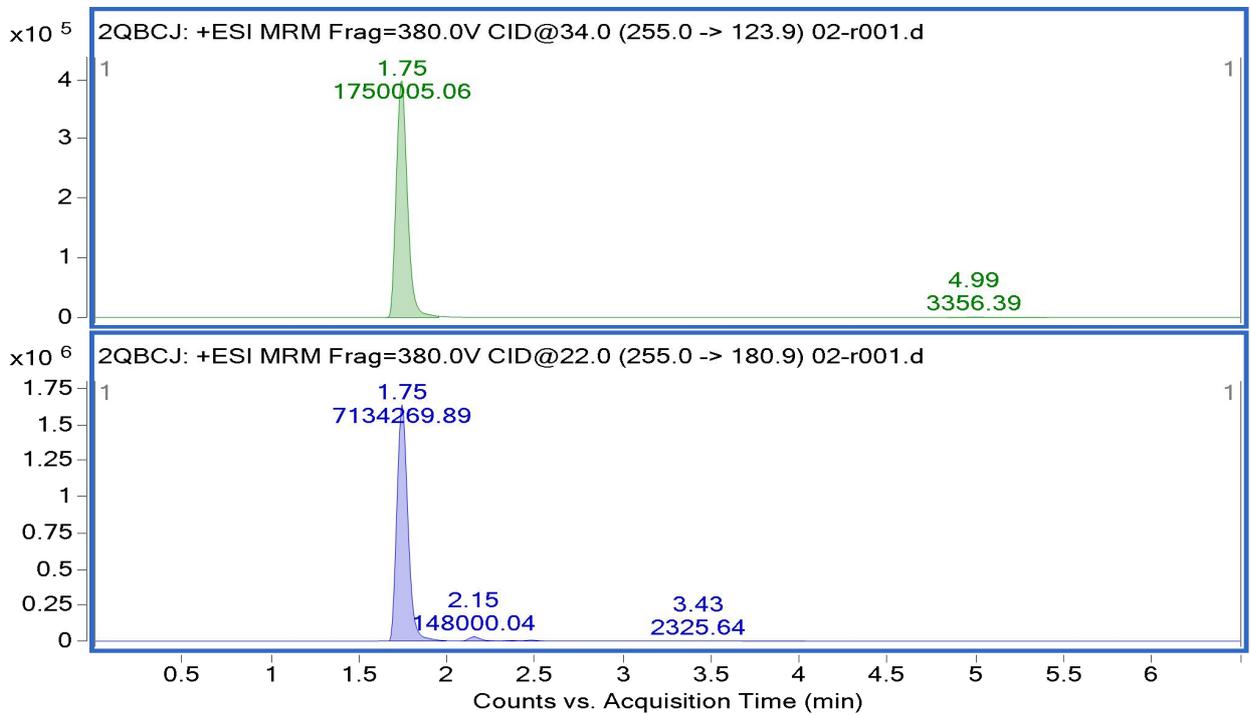


图 8 猪配合料经 MCX 柱净化的离子色谱图

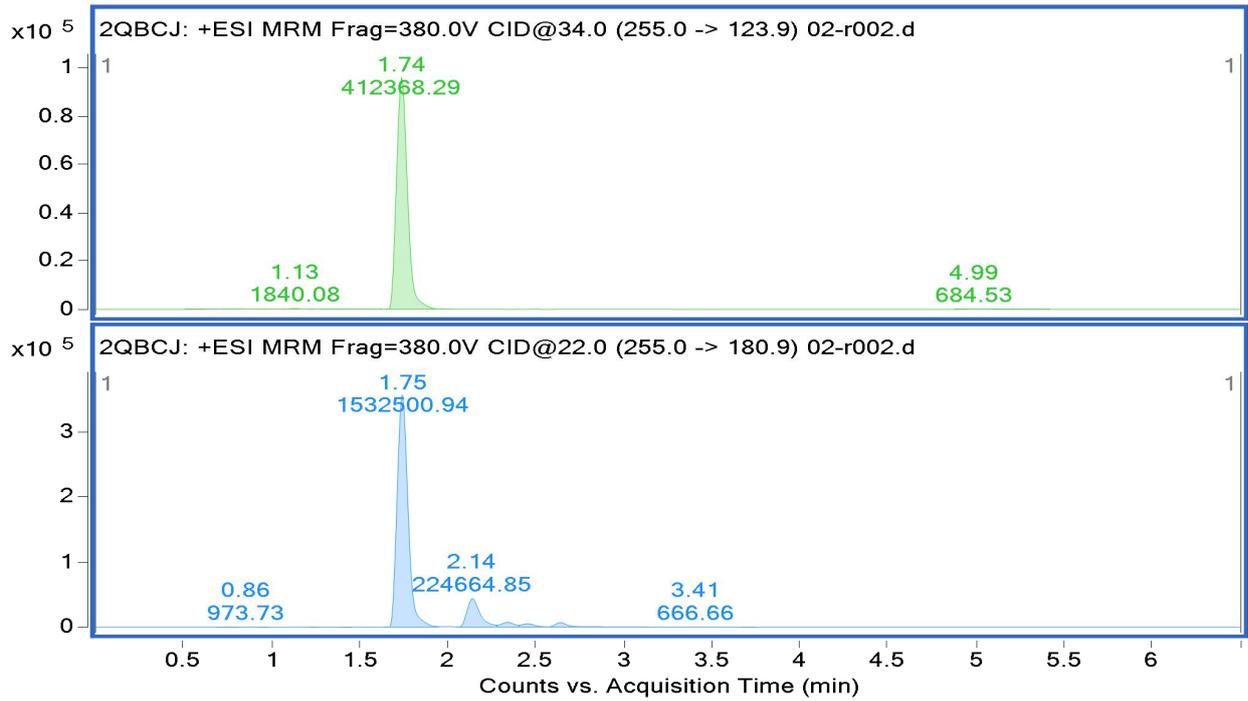


图 9 猪浓缩料未经 MCX 柱净化的离子色谱图

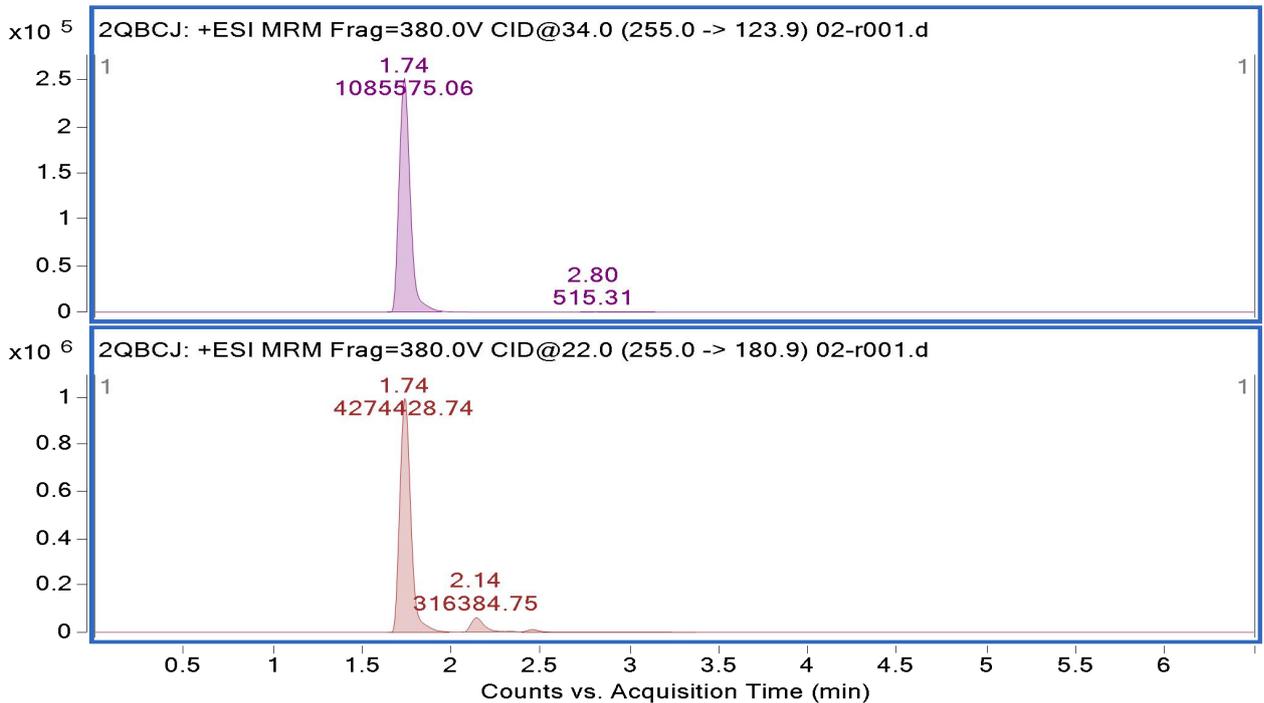


图 10 猪浓缩料经 MCX 柱净化的离子色谱图

由试验结果可以看出，配合料和浓缩料经 MCX 柱净化后达到了较好的效果，色谱图中基线较低，杂质峰干扰少，回收率较高，所以最终选择 60 mg/3mL

MCX 柱为其净化柱。配合料、浓缩料和精料补充料的前处理方法最终确定为：称取试样 2 g，精确至 0.0001 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 20.0 mL 0.2% 甲酸溶液，摇匀，振荡 20 min，以 8 000 r/min 离心 5 min，移取上清液作为备用液。将固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。准确移取 5.0 mL 备用液过柱，用 3 mL 水淋洗，抽干，再用 3 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，于 50℃ 氮吹至干，准确加入 1.00 mL 0.2% 甲酸溶液溶解，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

试验表明预混料经 MCX 柱净化后，其回收率偏低。为进一步确定预混料的净化条件，试验选择禽复合预混料、猪复核预混料、维生素预混料和微量元素预混料分别添加低中高不同浓度，采用 MCX 柱净化，测定其回收率，试验结果见表 4~7。

表 4 禽复合预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收率 % | 批内变异系数 % | 批间变异系数 % |
|--------|---------------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 禽复合预混料 | 0.05 | 72.80 | 75.46 | 78.39 | 81.99 | 80.00 | 77.73 | 4.69 | 7.28 |
| | | 95.58 | 97.26 | 96.55 | 97.35 | 89.35 | 95.22 | 3.52 | |
| | | 95.49 | 90.22 | 88.94 | 87.19 | 88.41 | 90.05 | 3.59 | |
| | | 84.23 | 85.74 | 87.47 | 86.17 | 85.66 | 85.85 | 1.35 | |
| | | 86.96 | 86.84 | 86.47 | 87.31 | 88.10 | 87.14 | 0.71 | |
| | 0.5 | 82.54 | 79.11 | 83.00 | 82.03 | 85.81 | 82.50 | 2.90 | 8.69 |
| | | 102.13 | 99.88 | 101.38 | 96.73 | 90.76 | 98.18 | 4.72 | |
| | | 99.22 | 84.34 | 91.25 | 107.45 | 99.95 | 96.44 | 9.20 | |
| | | 84.80 | 82.70 | 89.70 | 83.40 | 88.91 | 85.90 | 3.74 | |
| | | 85.32 | 84.65 | 86.06 | 87.84 | 85.56 | 85.89 | 1.40 | |
| | 10 | 87.08 | 85.24 | 86.31 | 87.49 | 85.90 | 86.40 | 1.04 | 9.83 |
| | | 108.90 | 103.55 | 100.67 | 100.22 | 103.20 | 103.31 | 3.35 | |
| | | 103.26 | 119.05 | 111.40 | 105.47 | 104.85 | 108.81 | 5.98 | |
| | | 90.23 | 98.65 | 99.12 | 100.21 | 104.56 | 98.55 | 5.28 | |
| | | 89.64 | 82.56 | 87.68 | 90.21 | 95.62 | 89.14 | 5.29 | |
| 100 | 80.25 | 89.36 | 85.64 | 82.10 | 86.34 | 84.74 | 4.25 | 8.06 | |

| | | | | | | | | | |
|--|--|-------|-------|-------|--------|-------|-------|------|--|
| | | 77.11 | 74.03 | 74.94 | 72.49 | 71.36 | 73.99 | 3.01 | |
| | | 81.18 | 85.95 | 97.61 | 100.12 | 82.40 | 89.45 | 9.85 | |
| | | 85.23 | 86.32 | 84.21 | 85.26 | 86.31 | 85.47 | 1.03 | |
| | | 82.31 | 85.62 | 84.32 | 89.64 | 87.21 | 85.82 | 3.25 | |

表 5 维生素预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回 收率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|----------------------------|---------------|---------|--------|--------|--------|--------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 维 生 素 预 混 料 | 0.05 | 78.38 | 80.59 | 95.59 | 86.31 | 89.66 | 86.11 | 8.06 | 5.27 |
| | | 87.16 | 88.54 | 90.36 | 86.82 | 87.47 | 88.07 | 1.63 | |
| | | 94.02 | 91.38 | 91.14 | 89.16 | 96.14 | 92.37 | 2.95 | |
| | | 80.79 | 83.6 | 83.42 | 86.13 | 81.34 | 83.06 | 2.55 | |
| | | 85.31 | 88.52 | 86.95 | 83.21 | 84.52 | 85.70 | 2.42 | |
| | 0.5 | 92.62 | 91.76 | 87.56 | 84.43 | 89.31 | 89.14 | 3.71 | 3.48 |
| | | 87.97 | 85.97 | 87.26 | 87.17 | 83.31 | 86.34 | 2.13 | |
| | | 88.01 | 90.33 | 87.09 | 84.12 | 88.96 | 87.70 | 2.66 | |
| | | 87.74 | 82.58 | 87.54 | 86.32 | 84.21 | 85.68 | 2.60 | |
| | | 88.95 | 89.67 | 94.21 | 91.02 | 93.26 | 91.42 | 2.48 | |
| | 10 | 94.80 | 86.01 | 84.42 | 88.46 | 86.33 | 88.00 | 4.62 | 6.22 |
| | | 74.43 | 86.27 | 79.84 | 81.85 | 79.25 | 80.33 | 5.35 | |
| | | 87.04 | 79.52 | 80.39 | 82.09 | 79.37 | 81.68 | 3.90 | |
| | | 77.31 | 80.37 | 77.49 | 80.77 | 73.62 | 77.91 | 3.70 | |
| | | 89.17 | 87.52 | 87.63 | 85.31 | 89.64 | 87.85 | 1.93 | |
| | 100 | 95.28 | 93.53 | 106.23 | 106.46 | 105.89 | 101.48 | 6.39 | 8.46 |
| | | 93.04 | 92.72 | 97.56 | 91.73 | 91.40 | 93.29 | 2.66 | |
| | | 121.63 | 112.31 | 116.53 | 112.41 | 115.85 | 115.75 | 3.30 | |
| | | 111.10 | 110.27 | 111.5 | 99.87 | 106.95 | 107.94 | 4.50 | |
| | | 99.93 | 100.21 | 105.63 | 98.65 | 98.74 | 101.11 | 3.06 | |

表 6 微量元素预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回 收率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|------------------|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 微 量 元 素 | 0.05 | 20.89 | 22.56 | 22.71 | 23.77 | 23.14 | 22.61 | 4.74 | 8.45 |
| | | 22.64 | 21.96 | 20.57 | 23.34 | 24.9 | 22.68 | 7.09 | |
| | | 25.57 | 26.19 | 26.47 | 25.11 | 24.89 | 25.65 | 2.64 | |
| | | 27.33 | 26.55 | 26.95 | 25.26 | 26.12 | 26.44 | 3.02 | |
| | | 27.26 | 28.47 | 29.03 | 28.25 | 29.11 | 28.42 | 2.62 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 预混料 | 0.5 | 26.34 | 25.77 | 27.35 | 28.66 | 26.19 | 26.86 | 4.32 | 4.12 |
| | | 27.78 | 27.59 | 28.34 | 27.11 | 28.24 | 27.81 | 1.80 | |
| | | 27.55 | 25.64 | 25.92 | 26.45 | 25.33 | 26.18 | 3.33 | |
| | | 28.92 | 27.67 | 27.83 | 26.35 | 26.98 | 27.55 | 3.51 | |
| | | 42.6 | 41.89 | 50.1 | 47.87 | 43.97 | 45.29 | 7.83 | |
| | 10 | 44.36 | 46.77 | 49.89 | 43.56 | 48.25 | 46.57 | 5.66 | 5.10 |
| | | 47.34 | 48.98 | 50.12 | 45.69 | 49.03 | 48.23 | 3.59 | |
| | | 47.15 | 45.29 | 48.44 | 47.97 | 45.09 | 46.79 | 3.27 | |
| | | 44.29 | 47.55 | 47.04 | 45.29 | 49.13 | 46.66 | 4.08 | |
| | | 33.11 | 31.7 | 31.78 | 31.11 | 29.81 | 31.50 | 3.80 | |
| | 100 | 33.57 | 32.55 | 30.72 | 31.9 | 31.44 | 32.04 | 3.39 | 5.52 |
| | | 35.02 | 30.11 | 27.98 | 28.45 | 29.6 | 30.23 | 9.30 | |
| | | 30.78 | 30.06 | 31.47 | 29.05 | 30.16 | 30.30 | 2.97 | |
| | | 30.22 | 30.79 | 29.64 | 28.38 | 28.92 | 29.59 | 3.27 | |
| | | 20.89 | 22.56 | 22.71 | 23.77 | 23.14 | 22.61 | 4.74 | |

表 7 猪复合预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 % | | | | | 平均回 收率 % | 批内变异 系数 % | 批间变异 系数 % |
|-----------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 猪用复合预混合饲料 | 0.05 | 11.32 | 12.56 | 13.74 | 13.24 | 14.57 | 13.09 | 9.40 | 9.67 |
| | | 15.71 | 15.66 | 16.89 | 16.42 | 15.03 | 16.34 | 6.39 | |
| | | 15.34 | 16.51 | 15.17 | 15.33 | 16.93 | 15.86 | 5.08 | |
| | | 14.33 | 13.14 | 13.56 | 13.74 | 14.45 | 13.84 | 3.94 | |
| | | 15.49 | 16.28 | 16.06 | 16.29 | 15.67 | 15.96 | 2.27 | |
| | 0.5 | 14.22 | 14.45 | 16.05 | 16.63 | 15.9 | 15.45 | 6.84 | 7.68 |
| | | 17.05 | 15.37 | 17.02 | 17.34 | 16.09 | 16.57 | 4.95 | |
| | | 12.45 | 15.9 | 14.59 | 14.56 | 14.71 | 14.44 | 8.62 | |
| | | 15.24 | 15.98 | 16.07 | 16.29 | 14.3 | 15.58 | 5.23 | |
| | | 16.44 | 17.21 | 14.45 | 17.11 | 15.29 | 16.10 | 7.44 | |
| | 10 | 26.23 | 25.46 | 25.84 | 24.45 | 23.67 | 25.13 | 4.18 | 2.53 |
| | | 24.47 | 26.31 | 25.33 | 25.9 | 24.69 | 25.34 | 3.08 | |
| | | 25.33 | 24.97 | 25.99 | 25.23 | 24.97 | 25.30 | 1.65 | |
| | | 25.37 | 26.01 | 24.78 | 25.06 | 25.32 | 25.31 | 1.81 | |
| | | 24.49 | 24.78 | 24.64 | 25.38 | 25.56 | 24.97 | 1.89 | |
| | 100 | 55.56 | 57.82 | 61.62 | 59.01 | 59.27 | 58.66 | 3.77 | 2.97 |
| | | 57.93 | 62.33 | 57.33 | 61.13 | 61.23 | 59.99 | 3.69 | |
| | | 57.24 | 58.46 | 56.94 | 58.84 | 55.56 | 57.41 | 2.27 | |
| | | 60.11 | 60.04 | 59.03 | 59.12 | 56.69 | 59.00 | 2.35 | |
| | | 59.35 | 58.56 | 57.34 | 58.99 | 59.03 | 58.65 | 1.34 | |

由上述试验结果可知，除禽用复合预混料和维生素预混合饲料结果较为满意外，微量元素预混料、猪用复合预混料的平均回收率仅为 13.09%~59.99%，说明上述净化方法对复合预混料和微量元素预混料中二羟丙茶碱的测定结果准确度较低。这可能是由于复合预混料和微量元素预混料中大量使用石粉、沸石粉、膨润土等矿物质作为原料或载体，其多孔的表面对待测物造成较强吸附，从而导致提取效率降低，加之过固相萃取柱造成的损失，导致回收率结果较差。

在饲料工业生产中，厂家普遍将复合预混料和微量元素预混料作为原料使用，是非常重要的两类添加剂预混合饲料，其产品质量安全直接关系到饲料产品的质量安全。因此建立这两类样品中二羟丙茶碱的测定方法具有十分重要的意义。由于两类添加剂预混合饲料中普遍含有大量无机载体和有机载体，部分产品甚至含有防霉剂等强吸附性物质，给待测物的检测带来极大干扰，过多的净化过程也会造成方法回收率偏低。因此为保证检测方法的准确性和灵敏度，试验前处理采用了在样品中直接加入提取液，并用微孔滤膜净化的方式。结果表明，此种优化条件有效降低了提取和净化操作对回收率造成的损失，试验数据较为满意。建立的添加剂预混料前处理方法简单易行，节约成本，适用于实验室大批量样品的测定。因此最终将添加剂预混料的前处理方法确定为：称取试样 2 g，准确加入 20.0 mL 0.2% 甲酸溶液，摇匀，振荡 20 min，以 8000 r/min 离心 5 min，将适量上清液过两次 0.22 μm 滤膜后上机测定。

4.3 样品基质效应的影响

饲料产品种类繁多且本底复杂，往往含有丰富的动物蛋白、植物性色素

及氨基酸、维生素等，而在液质联用检测技术中，与待测物共流出的干扰物在离子源离子化时影响了分析物，从而会产生基质效应。各种基质效应的存在往往会干扰测定结果，极大影响液质联用技术的灵敏度、准确度和精密度，降低检测结果的可靠性。目前，基质效应的消除和弥补方法中应用最多的是基质加标和基质稀释法。由于基质稀释过程需要使用大量的有机溶剂并且耗时，而且影响待测物的检测灵敏度。因此，本方法采用基质加标的方式来降低基质效应的影响。试验中选取猪配合饲料、猪浓缩饲料、维生素预混料，分别将其添加成二羟丙茶碱浓度为 0.5 mg/kg，每种饲料做 5 个平行，前处理后上机测定，分别以纯溶剂标准品和基质匹配标准品计算其回收率，结果见表 8。

表 4 表 8 纯溶剂和基质匹配标准品回收率试验结果比较

| 回收率 (%) | 猪配合饲料 | 猪浓缩饲料 | 维生素预混饲料 |
|---------|-------|--------|---------|
| 纯溶剂标准品 | 78.68 | 59.85 | 55.74 |
| | 78.00 | 53.81 | 57.31 |
| | 83.26 | 47.37 | 67.98 |
| | 74.95 | 58.58 | 61.38 |
| | 81.39 | 56.06 | 63.76 |
| 基质匹配标准品 | 93.21 | 105.00 | 78.38 |
| | 92.40 | 94.4 | 80.59 |
| | 98.63 | 83.11 | 95.59 |
| | 88.79 | 102.77 | 86.31 |
| | 96.42 | 98.36 | 89.66 |

由实验结果可以看出，使用基质匹配标准品计算，样品回收率更高，结果精密度更好。因此本方法采用基质匹配标准溶液校正检测结果，以降低基质效应的影响，保证数据的准确性。

4.4 不同厂家固相萃取柱效果比较

称取猪配合饲料 2 g，添加浓度为 1.0 mg/kg，选取 5 个不同厂家的混合型阳离子固相萃取柱，分别做 3 个平行，以基质匹配标准溶液进行结果校正，回收率结果见表 9。

表 9 不同厂家固相萃取柱效果比较

| 回收率 (%) | 厂家 1 | 厂家 2 | 厂家 3 | 厂家 4 | 厂家 5 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 78.62 | 86.64 | 88.42 | 74.65 | 78.42 |
| 2 | 83.61 | 85.91 | 77.96 | 73.38 | 79.26 |
| 3 | 84.23 | 89.93 | 79.93 | 76.15 | 79.86 |

通过以上试验数据可以看出，样品提取液经不同厂家的混合型阳离子固相萃取柱净化，用基质匹配标准溶液校正得到的回收率和重现性普遍较好，说明不同厂家的固相萃取柱对二羟丙茶碱的净化效果差异不大，均适用于本方法。

4.5 固相萃取柱柱容量考察

在配合饲料、浓缩饲料和精料补充料净化方法中采用了 60 mg/3mL 规格的混合型阳离子交换固相萃取柱，为考察净化柱柱容量，防止样品上样液和淋洗过程出现过载现象，我们用空白饲料样品添加高浓度水平的二羟丙茶碱，按上述方法进行处理上机，回收率见表 10。

表 10 固相萃取柱柱容量考察结果

| | |
|--|---------|
| | 平均回收率 % |
|--|---------|

| | 500mg/kg | 800mg/kg | 1000mg/kg | 1500mg/kg | 2000mg/kg |
|-------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 配合饲料 | 87.6 | 83.5 | 79.2 | 83.9 | 76.0 |
| 浓缩饲料 | 82.6 | 76.9 | 80.6 | 70.6 | 72.9 |
| 精料补充料 | 83.6 | 80.3 | 79.4 | 78.1 | 72.3 |

结果表明，样品中待测物含量在 2000 mg/kg 以内，不会出现固相萃取柱过载情况。

4.6 仪器条件的确定

4.6.1 色谱条件的选择

由于二羟丙茶碱为极性化合物，本方法采用实验室最为常用的 C₁₈ 色谱柱进行分析。试验中分别选用柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.4 μm 和柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.8 μm 的色谱柱进行考察。在保证待测物与杂质有效分离的前提下，为提高仪器分析效率，最终确定柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.8 μm 的色谱柱为分析柱，待测物的保留时间约为 1.8 min。流动相采用能提高待测物质谱离子化效率的甲醇和 0.2% 甲酸溶液。为确保得到的色谱峰对称性好，消除峰拖尾现象，实现待测物与杂质尽可能基线分离，方法在 0.2% 甲酸水中加入 5 mM 乙酸铵，使流动相形成缓冲体系，这有利于检测结果的重现性，另外流动相选用梯度洗脱方式，也有利于稳定色谱柱的柱效。本方法使用安捷伦 6495 三重串联质谱仪，该仪器购于 2017 年，其检测灵敏度非常高，因此最终将进样量确定为 2 μL。为降低柱温对保留时间漂移的影响，试验将柱温设定为 30℃。

液相色谱条件为：

色谱柱：C₁₈柱，柱长50 mm，内径2.1 mm，粒径1.8 μm。

流动相：A相：甲醇；B相：0.2%甲酸水（5 mM 乙酸铵），梯度洗脱条件见表11。

进样量：2 μ L。

柱温：30 $^{\circ}$ C。

表5 表 11 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A 相(%) | B 相(%) | 流速 (mL/min) |
|----------|--------|--------|-------------|
| 0.00 | 15.0 | 85.00 | 0.30 |
| 0.50 | 15.0 | 85.00 | 0.30 |
| 2.50 | 95.0 | 5.00 | 0.30 |
| 3.20 | 98.0 | 2.00 | 0.30 |
| 4.20 | 98.0 | 2.00 | 0.30 |
| 4.21 | 15.0 | 85.00 | 0.30 |

4.6.2 质谱条件的选择

由于各仪器厂家不同，质谱各设置参数也不同。优化质谱仪以下各参数，使其达到最佳灵敏度。

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯气体及其他合适气体，调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求；
- c) 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；
- d) 定性离子对、定量离子对及对应的保留时间、锥孔电压和碰撞能量。

本实验采用安捷伦 6495 液质联用仪，经各参数优化后其条件如下：

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；

毛细管电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度；

定性、定量离子对及碰撞能量等参数见表12。

表 12 二羟丙茶碱的定性、定量离子对及碰撞能量的参考值

| 被测物名称 | 定性离子对 m/z | 定量离子对 m/z | 碰撞能量 V |
|-------|--------------|--------------|-----------|
| 二羟丙茶碱 | 255>180.9 | 255>180.9 | 22 |
| | 255>123.9 | | 34 |

图 11 和图 12 分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 二羟丙茶碱标准溶液的一级全扫描质谱图和二级质谱图。

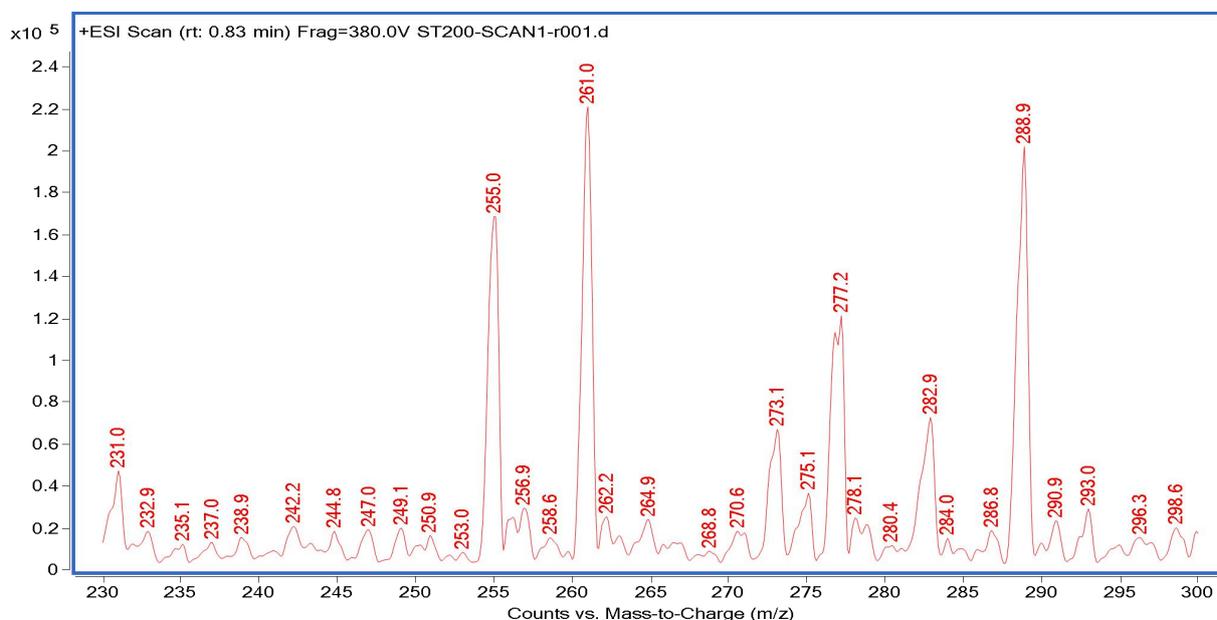


表 6 图 11 二羟丙茶碱一级全扫描质谱图

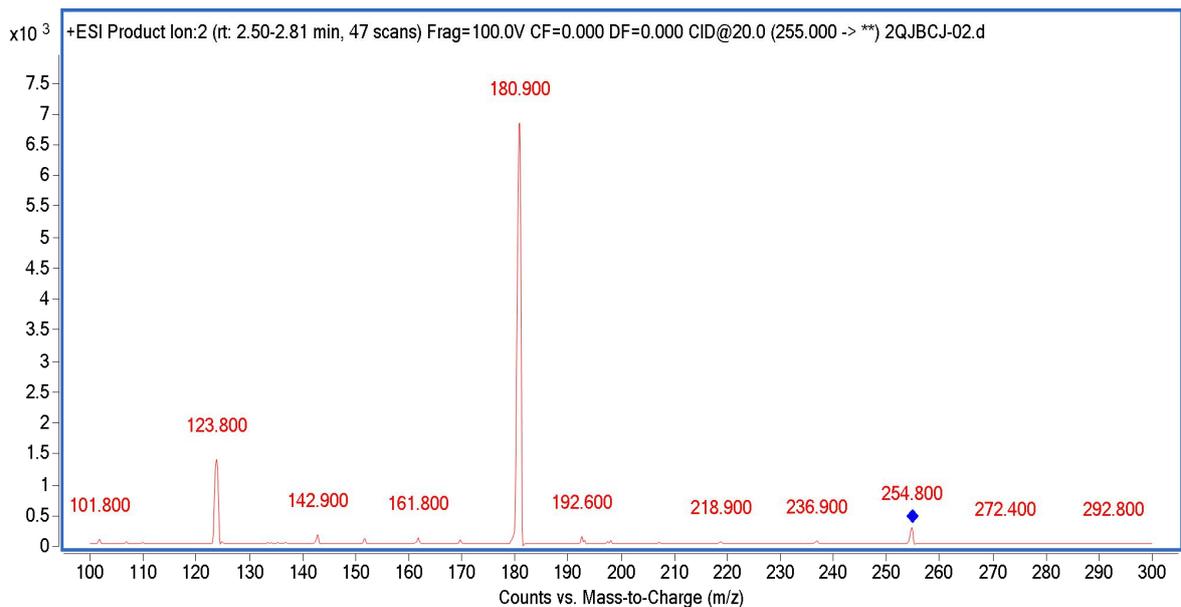


表 7 图 12 二羟丙茶碱二级质谱图

4.7 标准溶液有效期的确定

为确保检测方法的准确性，依据二羟丙茶碱理化性质，对其标准溶液稳定性进行验证，分别在 0 天、30 天、60 天、90 天、120 天、180 天将 1.00 mg/mL 标准储备液从冰箱取出，充分回温至室温，用 0.2% 甲酸水逐级稀释成 50 ng/mL 工作液，用液相色谱质谱联用仪分析。对各工作液连续进样 5 次考察其稳定性，具体结果见下表 13。

表 8 表 13 50 ng/mL 标准工作液稳定性试验

| 测试浓度及稀释时间 | 峰面积平均值 |
|-----------|--------|
| 0 天 | 11201 |
| 30 天 | 10563 |
| 60 天 | 10794 |
| 90 天 | 10484 |
| 120 天 | 9482 |
| 180 天 | 9607 |

由上表可见当测试时间为 120 天时，溶液定量离子峰面积偏离初始数据

(0 天) 超过 5%，因此为保证标准溶液稳定性，减少测试误差，并参照 GB/T 27404-2008 中的“标准溶液参考有效期”的要求，最终确定在 2℃~8℃ 冷藏保存条件下，1.00 mg/mL 标准储备溶液有效期确定为 3 个月；10.0 μg/mL 的标准中间液有效期确定为 1 个月；基质匹配标准工作溶液临用现配。

4.8 线性范围

准确称取 2g 空白样品（精确至 0.0001 g），用 0.2% 甲酸水溶液提取、净化、浓缩、复溶后，制得空白基质溶液。再精密量取适量二羟丙茶碱标准中间液，制得 2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、200.0 ng/mL、500.0 ng/mL 各系列基质匹配工作溶液，供高效液相色谱-串联质谱测定。以待测物峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线，结果表明待测物在 2.0~500 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，回归方程为 $y=195.29x-341.73$ ，相关系数 $R^2 = 0.9997$ 。图 13 为基质匹配标准曲线。

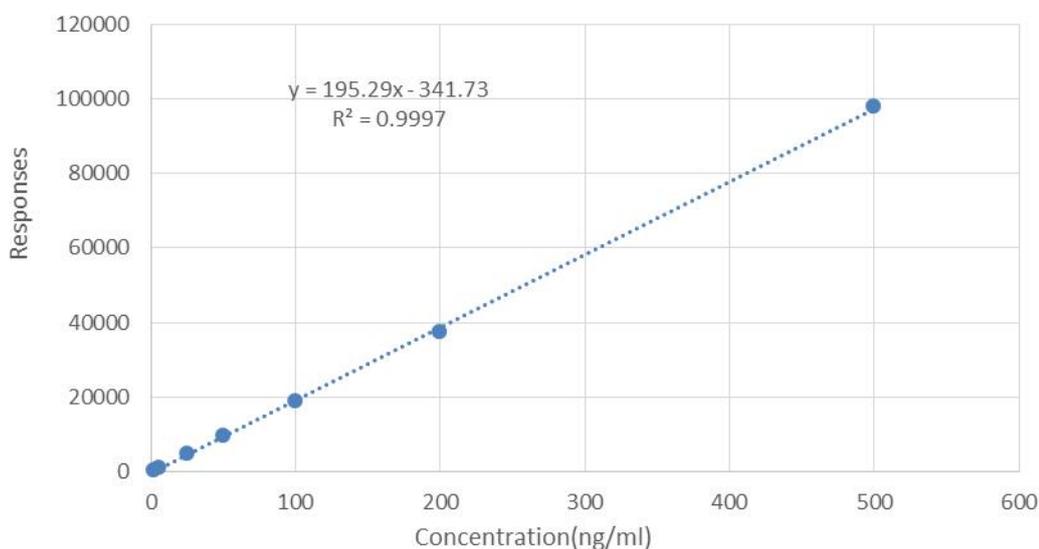


表 9

表 10 图 13 基质匹配标准曲线

4.9 定性和定量测定

4.9.1 定性测定

在相同试验条件下，样品中待测物的保留时间与基质匹配标准工作液的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 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标准工作溶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14规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 14 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

| | | | | |
|---------|------------|------------------|------------------|-------------|
| 相对离子丰度 | $>50\%$ | $20\% \sim 50\%$ | $10\% \sim 20\%$ | $\leq 10\%$ |
| 允许的最大偏差 | $\pm 20\%$ | $\pm 25\%$ | $\pm 30\%$ | $\pm 50\%$ |

4.9.2 定量测定

分别取适量试样溶液和基质匹配标准系列溶液，以浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与基质匹配标准溶液浓度相差不超过 30%。在上述色谱和质谱条件下，100.0 ng/mL 二羟丙茶碱基质匹配标准溶液特征离子色谱图见图 14。

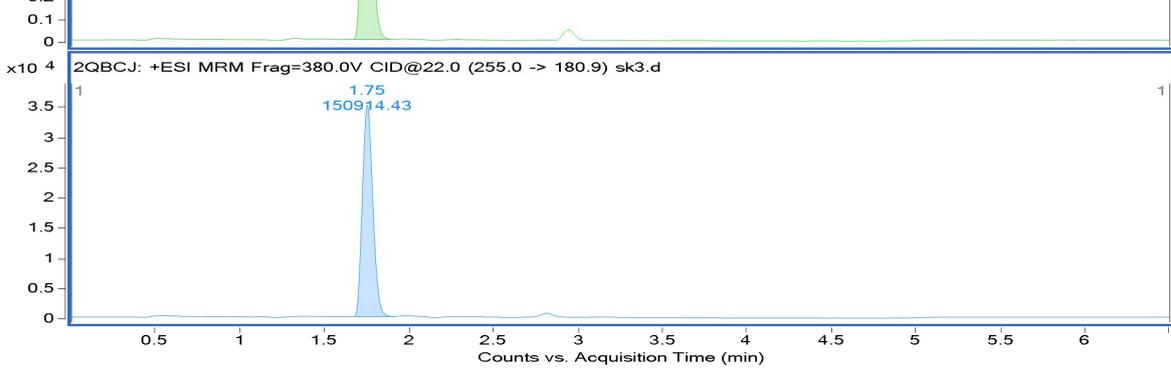


表 11 图 14 基质匹配二羟丙茶碱标准溶液（100.0 ng/mL）特征离子色谱图

4.10 方法灵敏度

将仪器条件优化至最佳后，确定方法的检出限和定量限，具体操作如下。
 检出限（LOD）：添加适量标准溶液于空白样品中，经提取净化处理后供液相色谱-串联质谱仪检测，依据分析物信噪比 $S/N > 3$ ，确定方法检出限为 0.01 mg/kg。
 定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于空白样品中，经提取净化处理后供液相色谱-串联质谱仪检测，依据分析物信噪比 $S/N > 10$ ，确定方法定量限为 0.05 mg/kg。

图 15~图 32 分别列出了猪配合饲料、猪浓缩饲料、禽配合饲料、禽浓缩饲料、精料补充料、维生素预混料在定量限浓度和十倍定量限浓度时的特征离子色谱图。由实验结果可知，待测物响应信号强，杂质干扰少，两个添加浓度的回收率均大于 70%，满足二羟丙茶碱测定工作的需要。

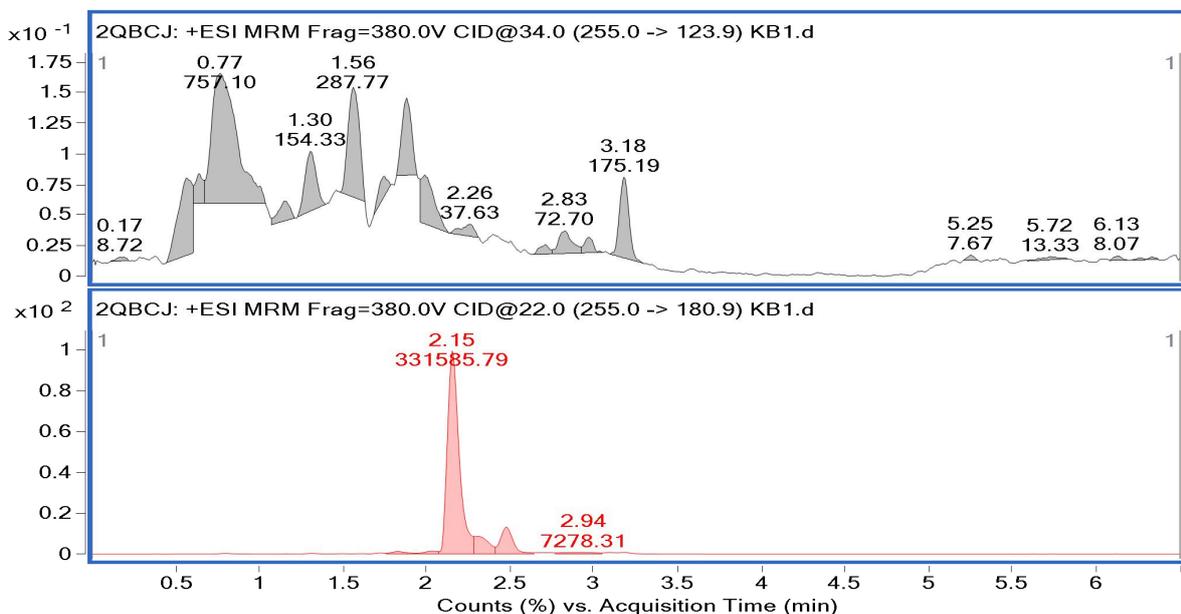


图 15 空白猪配合料特征离子色谱图

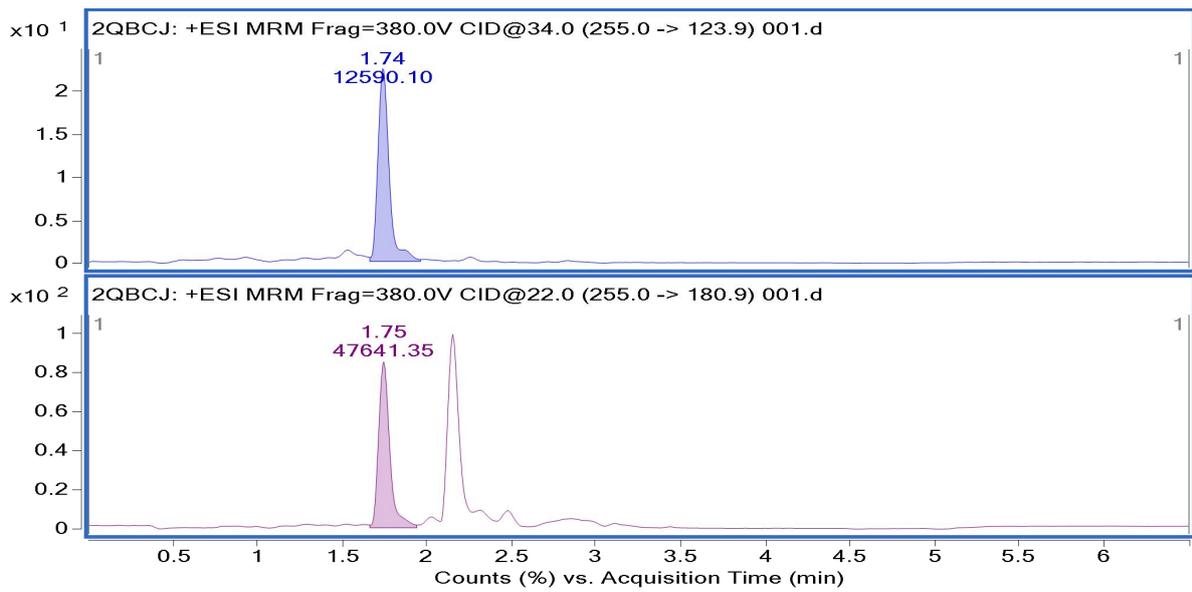


图 16 添加浓度为0.05mg/kg猪配合料特征离子色谱图

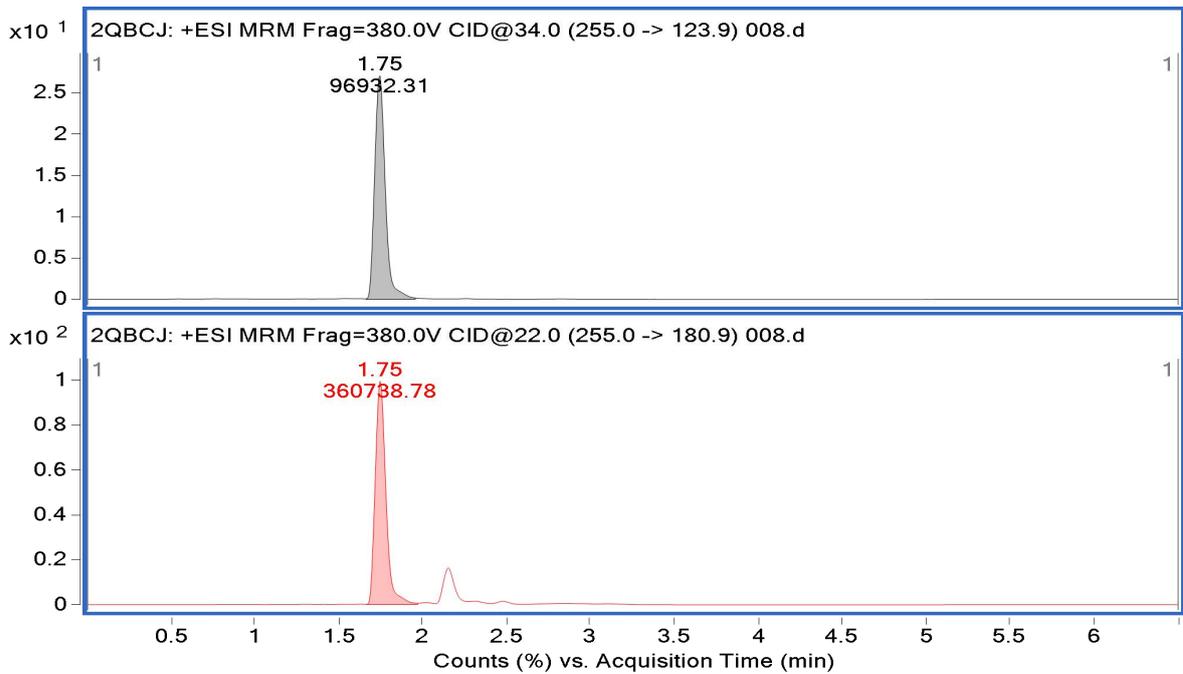


图 17 添加浓度为0.5mg/kg猪配合料特征离子色谱图

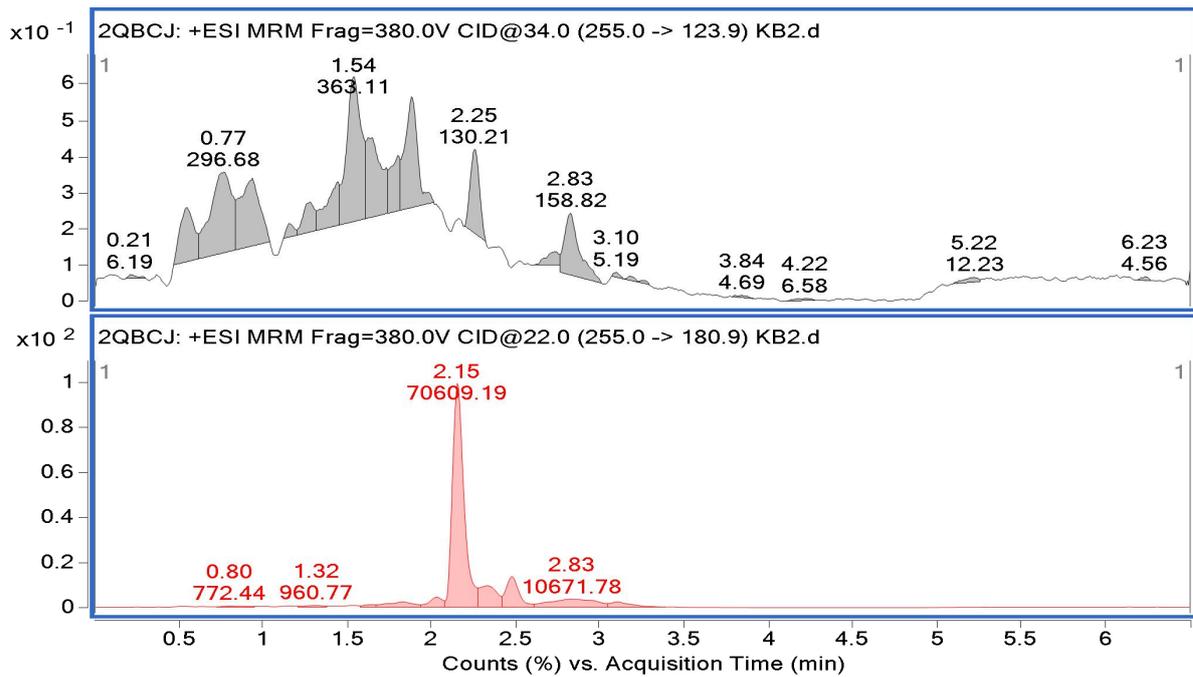


图 18 空白猪浓缩料特征离子色谱图

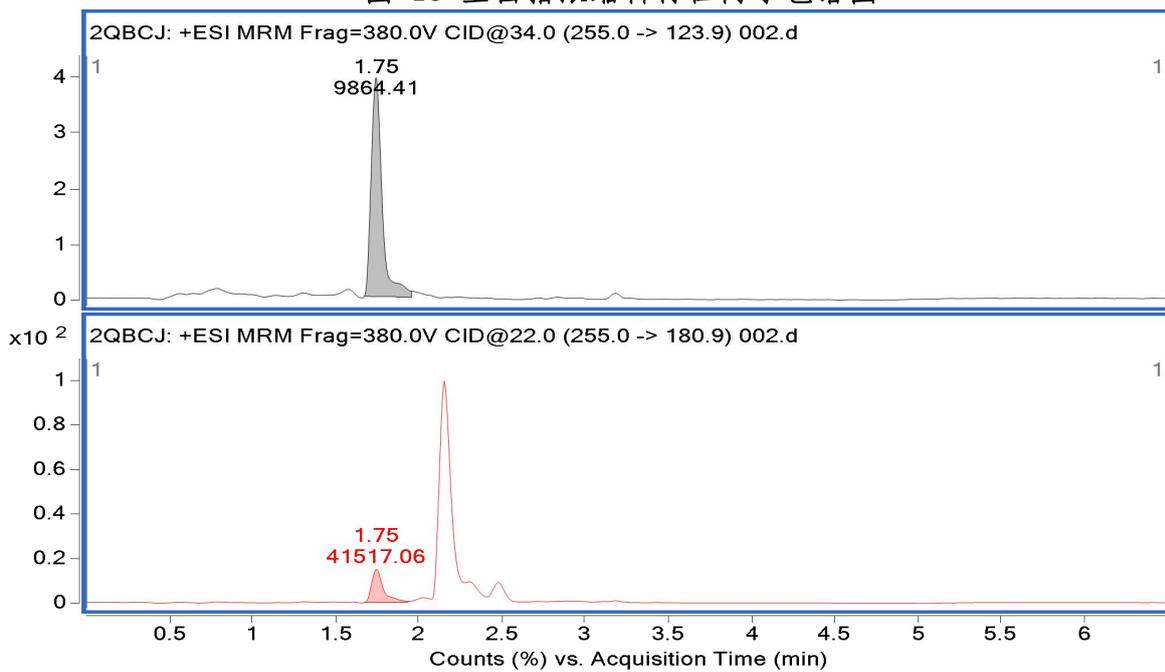


图 19 添加浓度为0.05mg/kg猪浓缩料特征离子色谱图

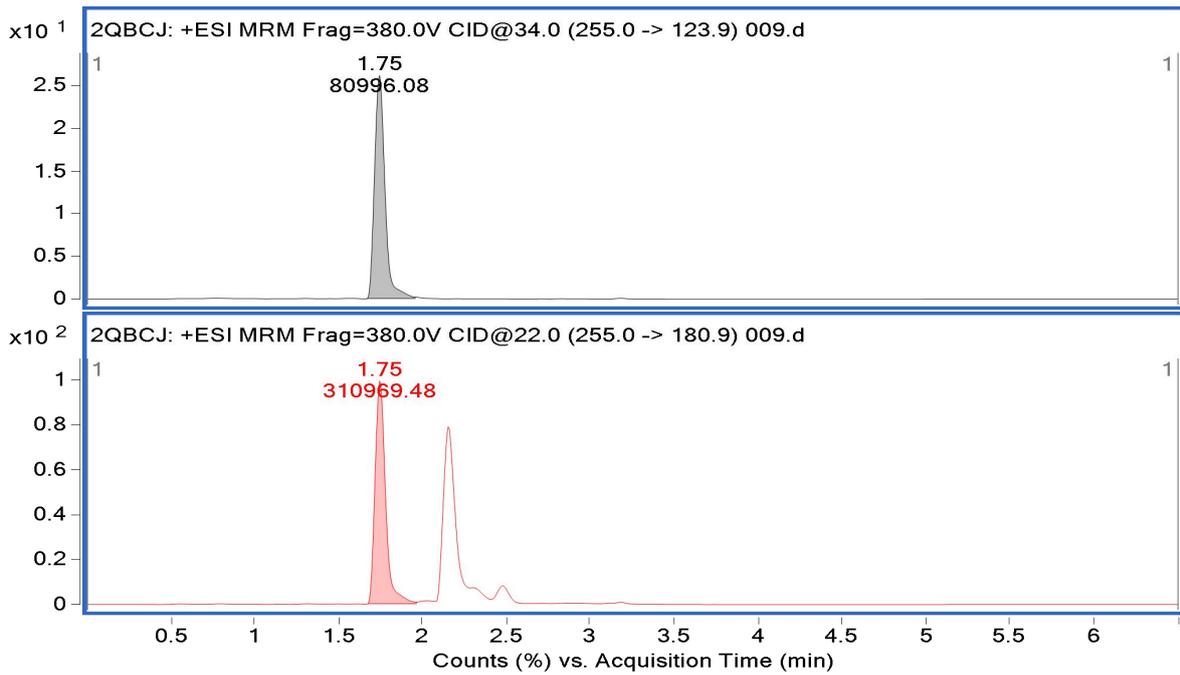


图 20 添加浓度为0.5mg/kg猪浓缩料特征离子色谱图

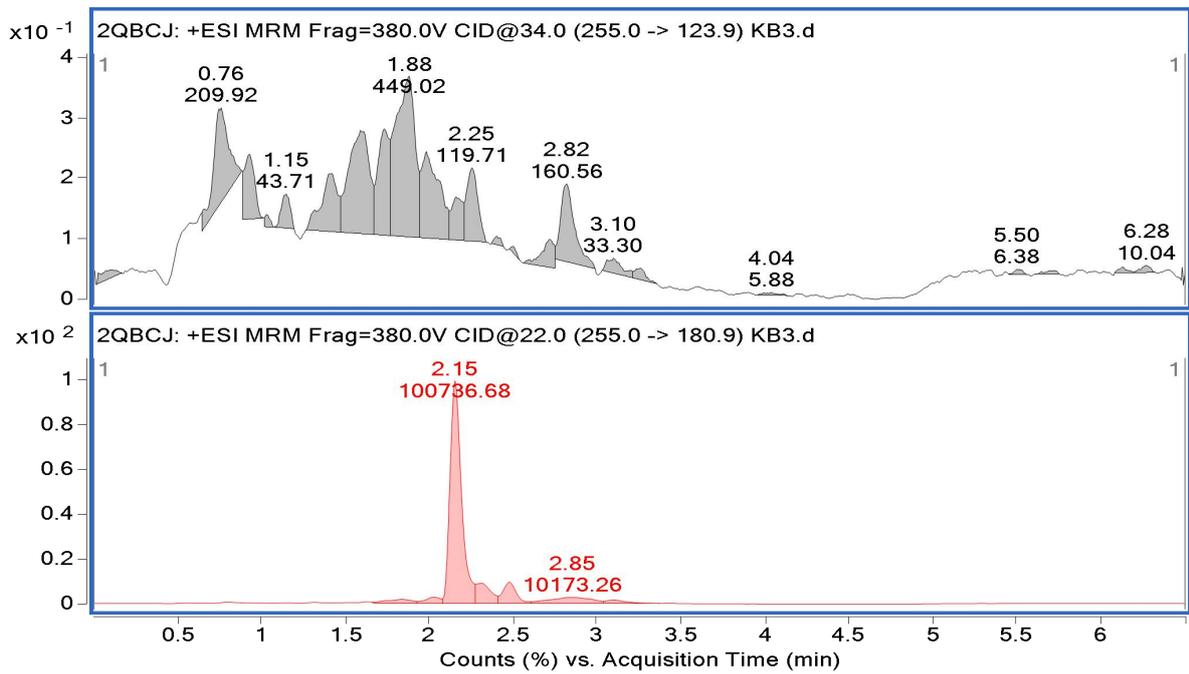


图 21 空白禽配合料特征离子色谱图

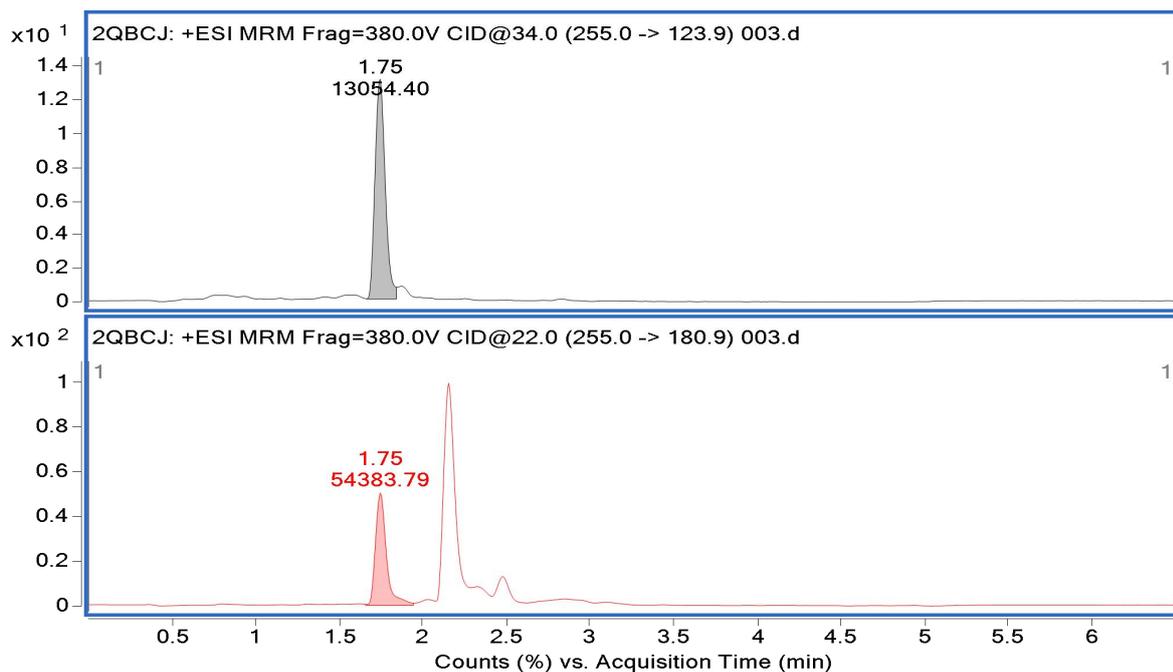


图 22 添加浓度为0.05mg/kg禽配合料特征离子色谱图

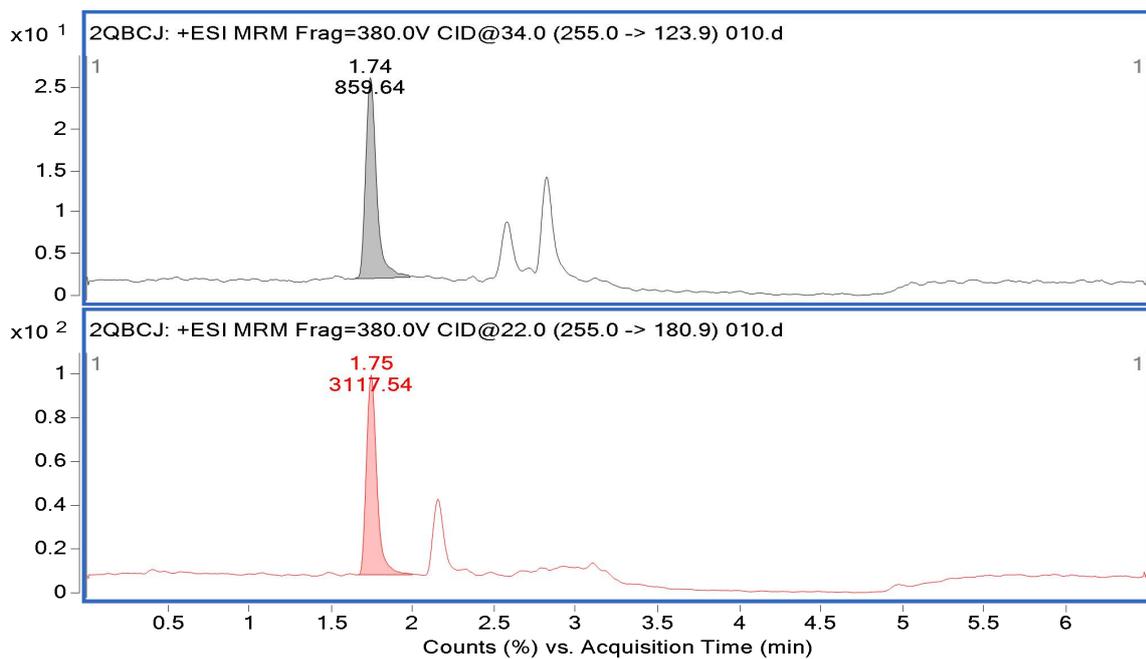


图 23 添加浓度为0.5mg/kg禽配合料特征离子色谱图

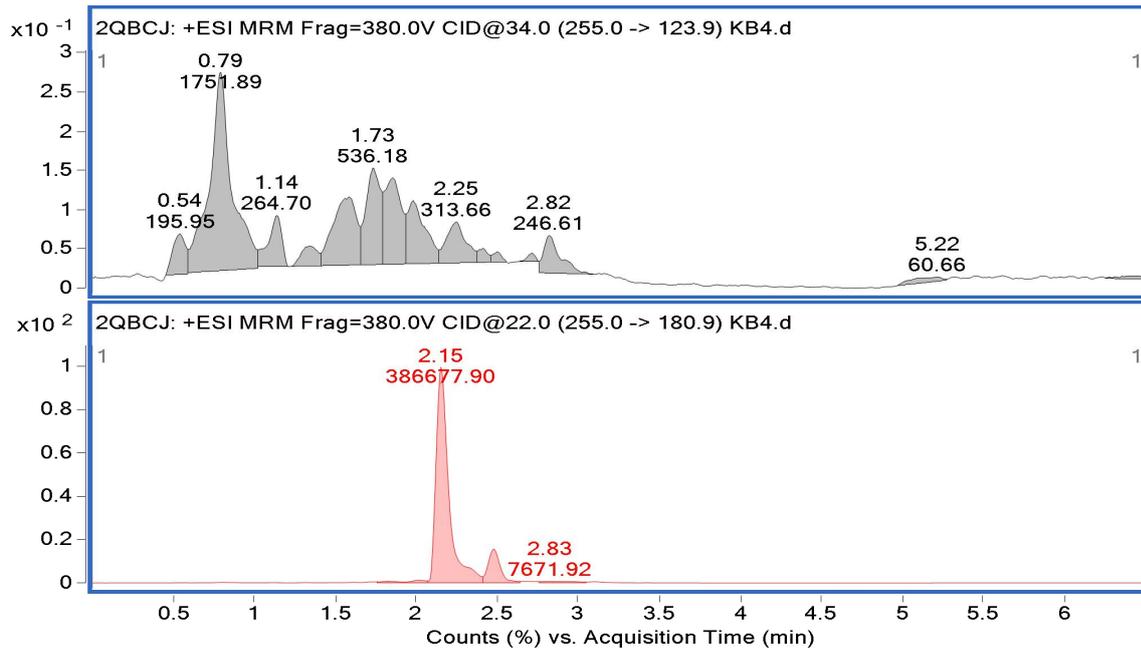


图 24 空白禽浓缩料特征离子色谱图

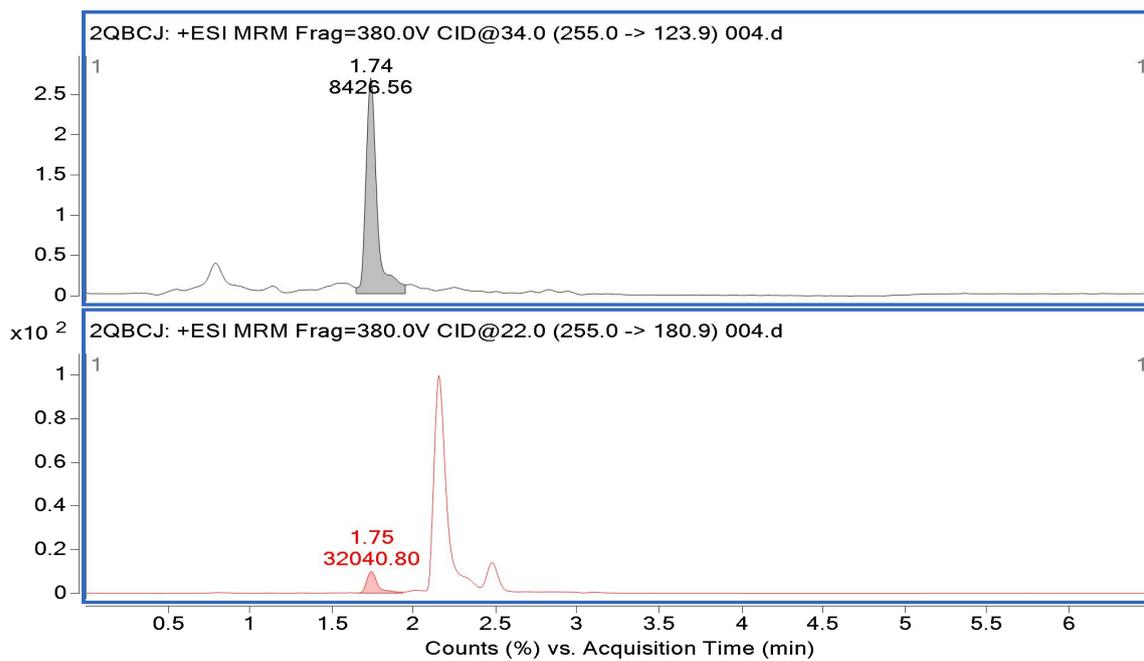


图 25 添加浓度为0.05mg/kg禽浓缩料特征离子色谱图

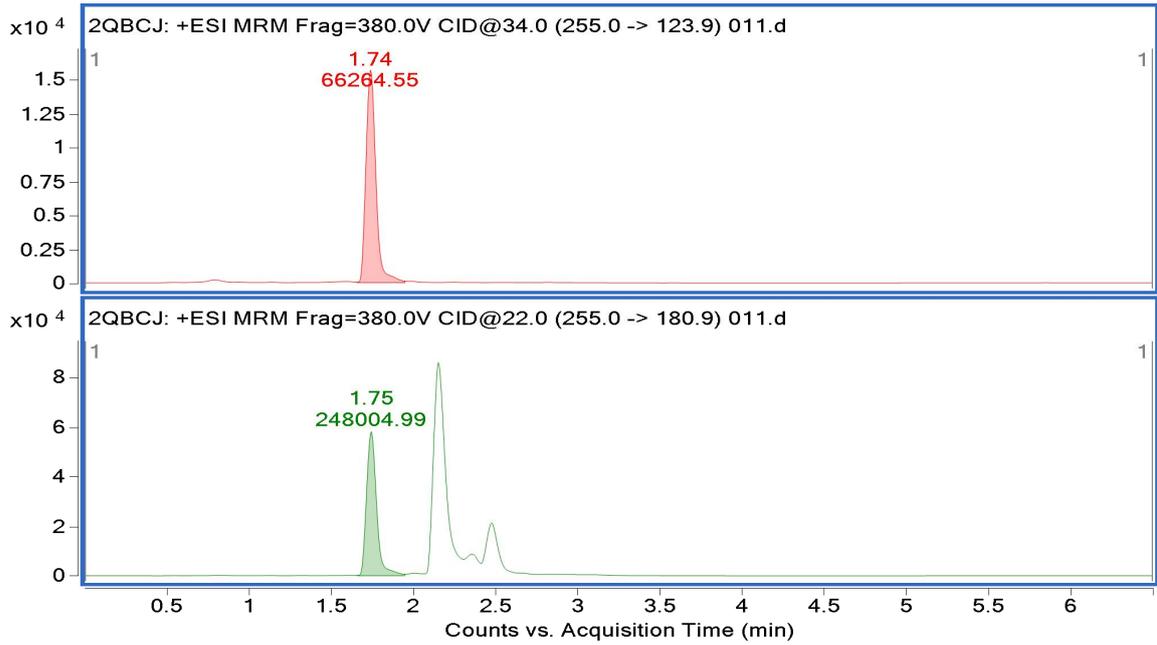


图 26 添加浓度为0.5mg/kg禽浓缩料特征离子色谱图

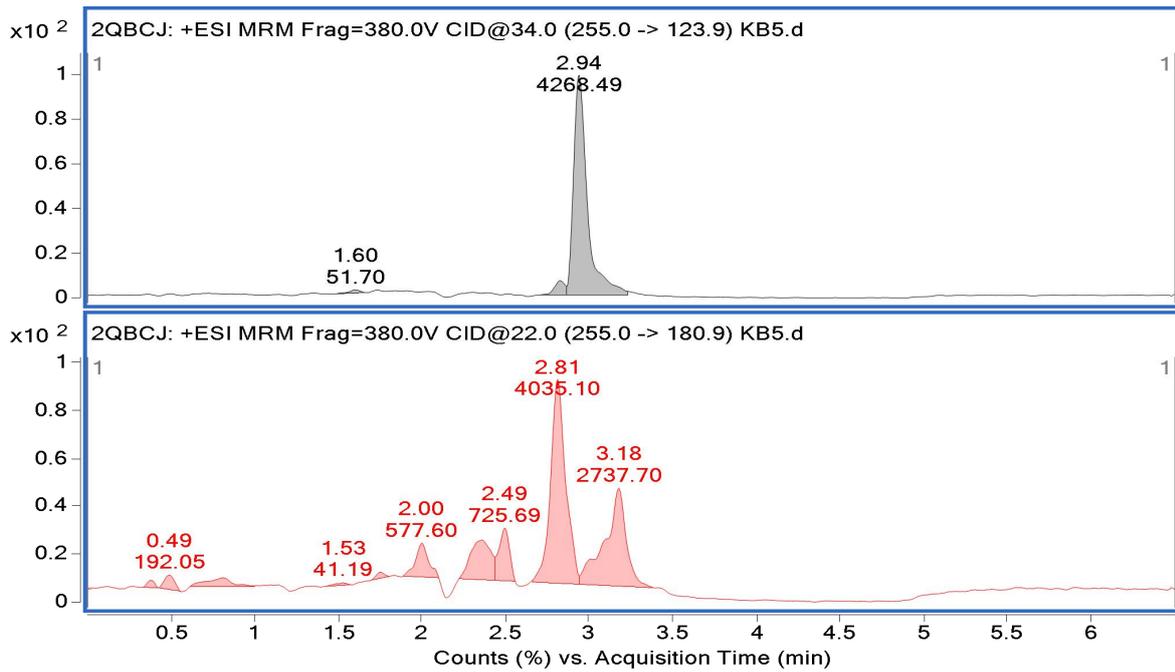


图 27 空白精料补充料特征离子色谱图

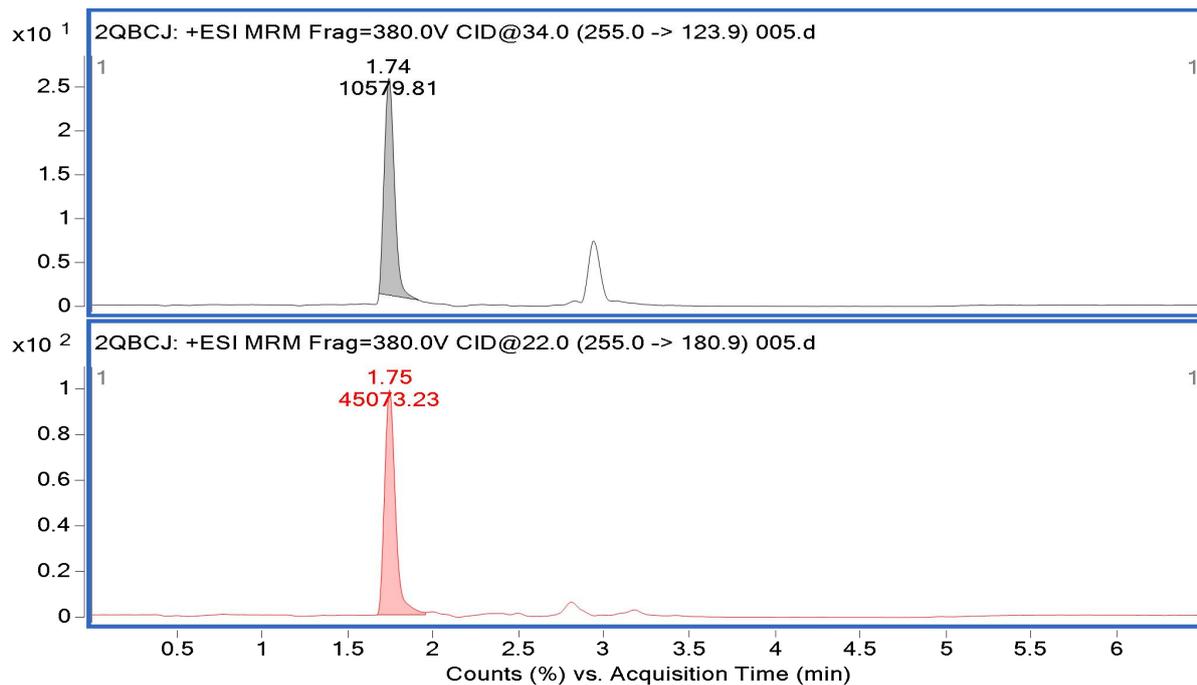


图 28 添加浓度为0.05mg/kg精料补充料特征离子色谱图

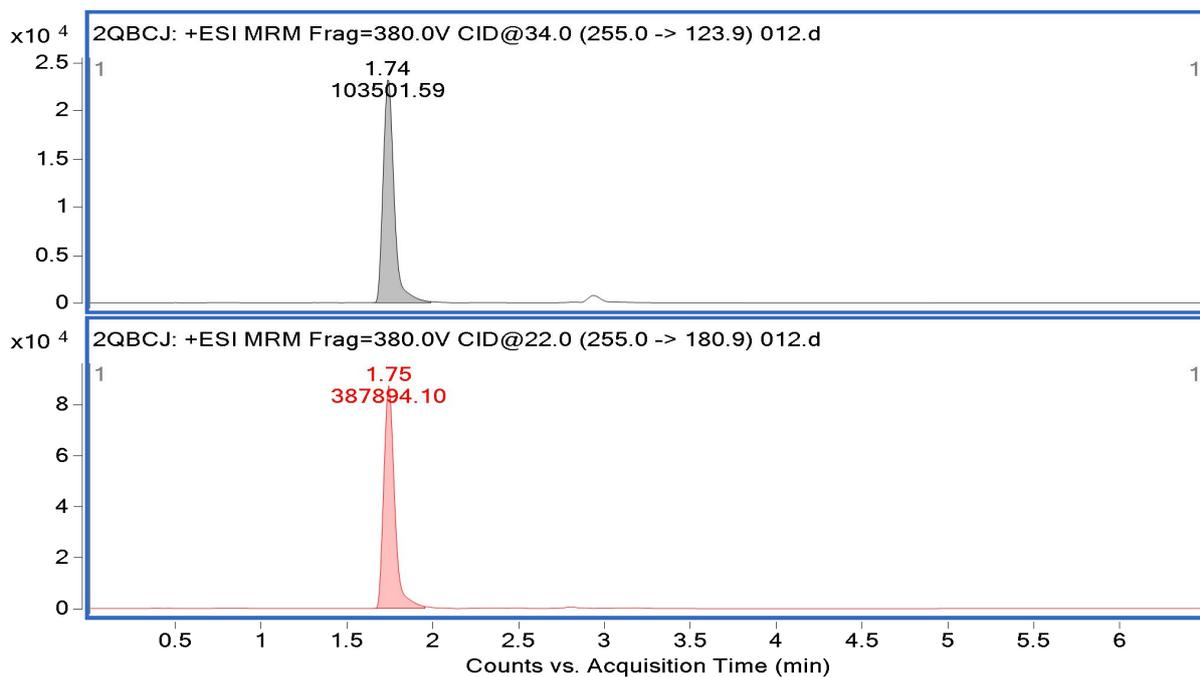


图 29 添加浓度为0.5mg/kg精料补充料特征离子色谱图

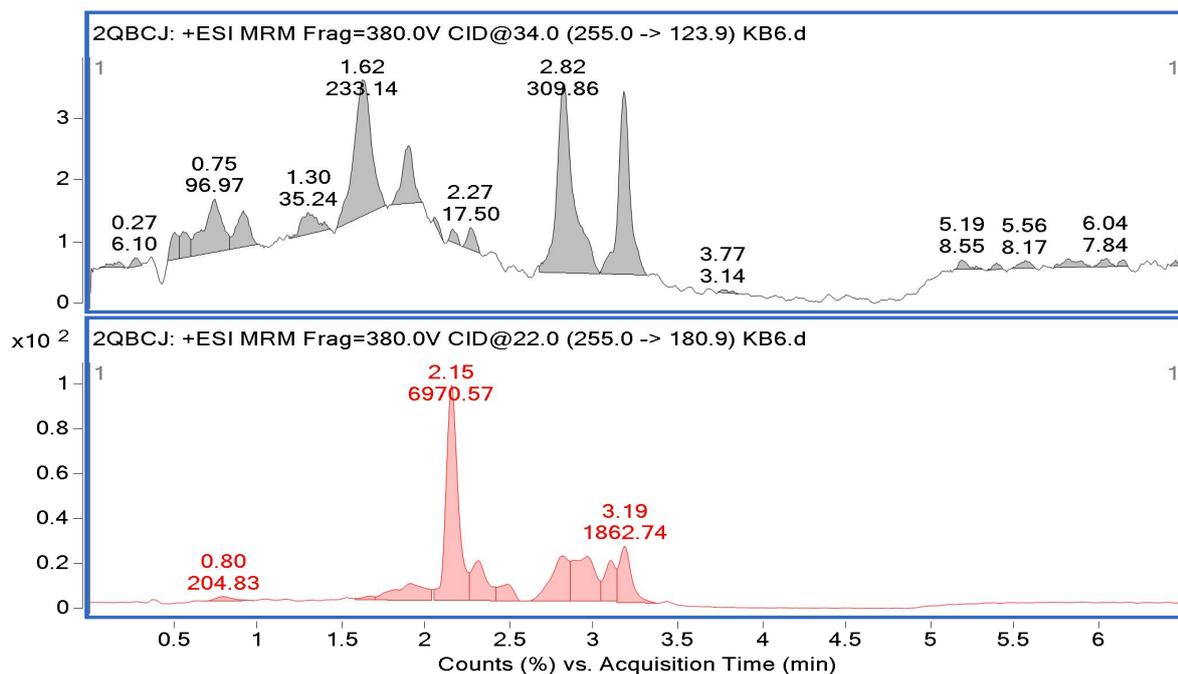


图 30 空白维生素预混料特征离子色谱图

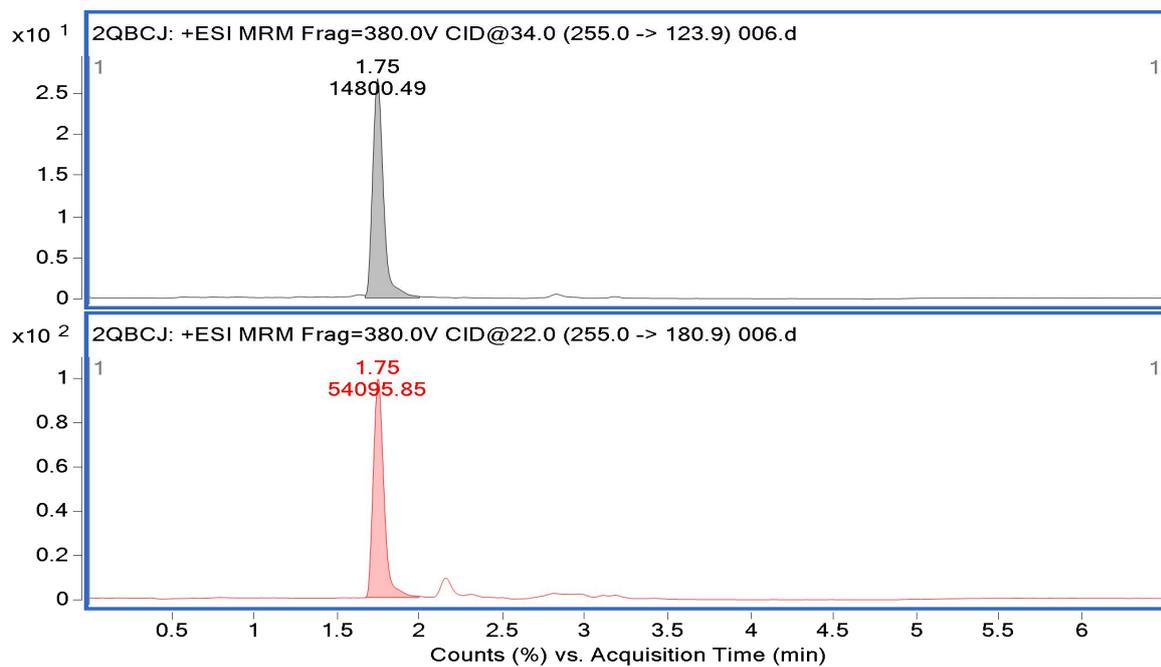


图 31 添加浓度为0.05mg/kg维生素预混料特征离子色谱图

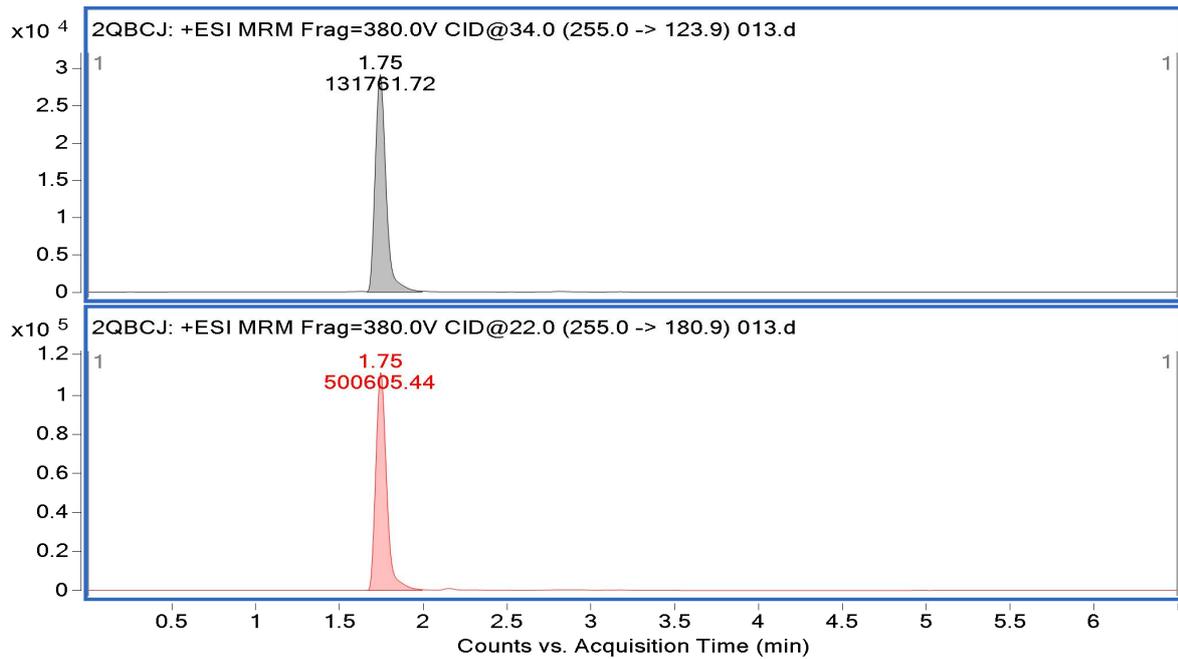


图 32 添加浓度为0.5mg/kg维生素预混料特征离子色谱图

4.11 方法准确度和精密度

为进一步考察方法准确度和精密度，选用畜禽配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和预混合饲料分别进行加标回收试验，每种饲料采用不同的添加浓度，每个添加浓度制备 5 个平行样品，重复 5 个批次，具体结果见表 15~表 19。

表 15 猪配合料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收 率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|------------------|---------------|---------|---------|--------|--------|--------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 猪 配 合 料 | 0.05 | 80.58 | 83.16 | 88.88 | 87.82 | 80.42 | 84.17 | 4.73 | 5.99 |
| | | 90.00 | 87.75 | 87.58 | 90.58 | 81.07 | 87.40 | 4.32 | |
| | | 91.46 | 93.19 | 97.29 | 91.65 | 91.16 | 92.95 | 2.74 | |
| | | 93.21 | 92.40 | 98.63 | 88.79 | 96.42 | 93.89 | 4.04 | |
| | | 99.10 | 98.49 | 92.99 | 88.40 | 94.85 | 94.77 | 4.61 | |
| | 1 | 93.73 | 93.50 | 92.00 | 90.69 | 95.00 | 92.98 | 1.79 | 6.23 |
| | | 102.03 | 102.141 | 93.77 | 83.13 | 87.69 | 93.75 | 9.06 | |
| | | 94.93 | 80.47 | 87.26 | 85.43 | 86.44 | 86.91 | 5.99 | |
| | | 99.93 | 94.39 | 98.76 | 97.08 | 93.40 | 96.71 | 2.88 | |
| | | 99.96 | 91.56 | 91.72 | 99.27 | 98.05 | 96.11 | 4.31 | |
| | 5 | 92.82 | 98.03 | 98.53 | 97.85 | 98.68 | 97.18 | 2.53 | 5.15 |
| | | 92.56 | 95.62 | 97.67 | 94.97 | 93.83 | 94.93 | 2.03 | |
| | | 103.37 | 109.37 | 100.37 | 103.24 | 107.28 | 104.73 | 3.41 | |
| | | 93.87 | 91.86 | 93.28 | 90.84 | 92.39 | 92.45 | 1.29 | |
| | | 94.11 | 95.06 | 94.07 | 93.12 | 90.47 | 93.37 | 1.88 | |
| | 10 | 102.73 | 102.75 | 101.6 | 101.18 | 101.67 | 101.99 | 0.70 | 6.45 |
| | | 89.37 | 90.98 | 87.58 | 92.07 | 90.07 | 90.01 | 1.88 | |
| | | 109.44 | 106.37 | 111.19 | 106.37 | 103.85 | 107.44 | 2.68 | |
| | | 93.54 | 94.75 | 95.44 | 99.88 | 94.37 | 95.60 | 2.61 | |
| | | 94.85 | 97.72 | 95.59 | 98.81 | 95.7 | 96.53 | 1.72 | |

表 16 猪浓缩料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收率% | 批内变异系数% | 批间变异系数% |
|------|------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 猪浓缩料 | 0.05 | 91.69 | 89.36 | 84.83 | 86.29 | 88.74 | 88.18 | 3.04 | 8.84 |
| | | 86.36 | 87.63 | 89.61 | 97.15 | 92.67 | 90.68 | 4.77 | |
| | | 93.94 | 119.56 | 102.13 | 96.80 | 105.67 | 103.62 | 9.66 | |
| | | 98.15 | 99.02 | 102.77 | 100.40 | 106.65 | 101.40 | 3.37 | |
| | | 105.00 | 94.40 | 83.11 | 102.77 | 98.36 | 96.73 | 8.93 | |
| | 0.5 | 87.58 | 81.50 | 84.50 | 85.84 | 84.27 | 84.74 | 2.64 | 7.71 |
| | | 95.02 | 95.34 | 87.61 | 90.73 | 89.78 | 91.70 | 3.68 | |
| | | 85.17 | 87.31 | 92.75 | 100.48 | 105.92 | 94.33 | 9.30 | |
| | | 97.31 | 93.03 | 87.08 | 94.74 | 98.69 | 94.17 | 4.81 | |
| | | 100.68 | 106.81 | 99.89 | 93.20 | 89.66 | 98.05 | 6.86 | |
| | 5 | 91.97 | 93.16 | 95.29 | 86.63 | 86.53 | 90.72 | 4.36 | 6.15 |
| | | 82.45 | 91.17 | 97.48 | 87.21 | 86.87 | 89.04 | 6.33 | |
| | | 86.43 | 99.18 | 107.54 | 91.64 | 89.84 | 94.93 | 8.91 | |
| | | 91.63 | 98.70 | 96.49 | 101.04 | 91.70 | 95.91 | 4.38 | |
| | | 100.61 | 95.64 | 91.51 | 93.64 | 90.85 | 94.45 | 4.16 | |
| | 50 | 82.29 | 85.75 | 87.50 | 85.16 | 85.55 | 85.25 | 2.21 | 4.79 |
| | | 92.26 | 85.40 | 90.00 | 87.12 | 90.76 | 89.11 | 3.13 | |
| | | 88.31 | 84.16 | 86.38 | 84.94 | 97.17 | 88.19 | 5.97 | |
| | | 93.44 | 80.93 | 81.50 | 80.07 | 90.65 | 85.32 | 7.31 | |
| | | 84.28 | 81.45 | 86.82 | 88.94 | 88.63 | 86.02 | 3.67 | |

表 17 禽配合料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收率 % | 批内变异系数 % | 批间变异系数 % |
|------|------------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 禽配合料 | 0.05 | 88.42 | 81.23 | 88.47 | 88.95 | 89.73 | 87.36 | 3.97 | 7.86 |
| | | 95.16 | 82.45 | 76.84 | 91.13 | 81.77 | 85.47 | 8.74 | |
| | | 90.44 | 91.24 | 83.73 | 86.25 | 84.93 | 87.32 | 3.83 | |
| | | 99.59 | 106.49 | 100.97 | 103.49 | 97.58 | 101.62 | 3.41 | |
| | | 92.89 | 91.27 | 91.84 | 91.98 | 91.43 | 91.88 | 0.69 | |
| | 1 | 91.48 | 94.800 | 92.08 | 93.05 | 82.95 | 90.87 | 5.07 | 7.13 |
| | | 85.92 | 75.86 | 96.73 | 91.73 | 81.77 | 86.40 | 9.47 | |
| | | 85.87 | 93.85 | 94.44 | 93.28 | 94.19 | 92.33 | 3.94 | |
| | | 97.09 | 104.62 | 96.54 | 97.41 | 103.22 | 99.78 | 3.84 | |
| | | 92.71 | 88.92 | 86.32 | 94.20 | 84.78 | 89.39 | 4.51 | |
| | 5 | 96.33 | 94.33 | 98.82 | 93.48 | 96.58 | 95.91 | 2.18 | 8.05 |
| | | 81.91 | 83.56 | 87.09 | 82.08 | 89.65 | 84.86 | 4.00 | |
| | | 84.66 | 84.63 | 87.67 | 85.93 | 91.12 | 86.80 | 3.13 | |
| | | 107.19 | 99.12 | 102.91 | 99.61 | 97.63 | 101.29 | 3.77 | |
| | | 85.58 | 82.72 | 90.61 | 85.37 | 82.20 | 85.30 | 3.91 | |
| | 10 | 90.49 | 88.88 | 93.70 | 95.26 | 92.1 | 92.09 | 2.74 | 5.73 |
| | | 80.68 | 80.26 | 93.49 | 92.10 | 83.55 | 86.02 | 7.37 | |
| | | 88.71 | 91.78 | 91.36 | 92.57 | 87.72 | 90.43 | 2.32 | |
| | | 99.06 | 98.17 | 91.25 | 101.25 | 97.14 | 97.37 | 3.84 | |
| | | 84.36 | 91.47 | 89.78 | 95.12 | 92.60 | 90.67 | 4.44 | |

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收率 % | 批内变异系数 % | 批间变异系数 % |
|------|------------|---------|--------|-------|-------|--------|---------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 禽浓缩料 | 0.05 | 98.26 | 100.41 | 98.48 | 94.32 | 100.96 | 98.49 | 2.65 | 4.72 |
| | | 87.66 | 91.59 | 85.57 | 90.84 | 94.65 | 90.06 | 3.92 | |
| | | 91.37 | 90.22 | 88.94 | 87.19 | 88.41 | 89.23 | 1.81 | |
| | | 89.91 | 87.99 | 90.06 | 87.74 | 92.90 | 89.72 | 2.31 | |
| | | 98.25 | 90.65 | 96.09 | 92.07 | 91.07 | 93.63 | 3.59 | |
| | 0.5 | 97.67 | 98.01 | 98.59 | 98.13 | 98.74 | 98.23 | 0.44 | 7.18 |
| | | 82.66 | 83.54 | 85.30 | 81.75 | 87.42 | 84.13 | 2.68 | |
| | | 82.99 | 86.61 | 81.49 | 84.77 | 82.60 | 83.69 | 2.41 | |
| | | 89.91 | 87.99 | 80.06 | 87.74 | 82.90 | 85.72 | 4.77 | |
| | | 80.55 | 81.42 | 83.45 | 84.05 | 85.19 | 82.93 | 2.30 | |
| | 5 | 94.80 | 91.70 | 95.69 | 93.51 | 96.26 | 94.39 | 1.94 | 6.31 |
| | | 80.86 | 78.31 | 80.18 | 81.30 | 89.86 | 82.10 | 5.46 | |
| | | 78.24 | 83.87 | 80.97 | 82.07 | 79.75 | 80.98 | 2.66 | |
| | | 84.86 | 85.62 | 85.59 | 88.71 | 85.70 | 86.10 | 1.74 | |
| | | 86.60 | 87.10 | 81.03 | 84.34 | 85.46 | 84.91 | 2.84 | |
| | 50 | 77.34 | 76.71 | 73.88 | 71.86 | 71.41 | 74.24 | 3.66 | 8.68 |
| | | 79.19 | 77.08 | 76.28 | 72.01 | 73.48 | 75.61 | 3.79 | |
| | | 68.25 | 70.80 | 70.16 | 65.24 | 66.64 | 68.22 | 3.42 | |
| | | 81.58 | 81.00 | 82.24 | 86.97 | 82.24 | 82.81 | 2.88 | |
| | | 84.29 | 86.40 | 84.72 | 88.31 | 83.64 | 85.47 | 2.21 | |

表 18 禽浓缩料回收率试验结果

表 19 精料补充料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回 收率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|-----------|---------------|---------|-------|--------|-------|--------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 精料 补充料 | 0.05 | 90.32 | 89.45 | 93.68 | 90.54 | 103.12 | 93.42 | 6.05 | 7.77 |
| | | 83.86 | 86.99 | 82.07 | 92.34 | 89.05 | 86.86 | 4.70 | |
| | | 86.97 | 89.52 | 93.64 | 81.11 | 80.81 | 86.41 | 6.38 | |
| | | 84.61 | 79.99 | 91.26 | 80.09 | 79.91 | 83.17 | 5.94 | |
| | | 78.45 | 87.35 | 91.59 | 80.07 | 71.07 | 81.71 | 9.79 | |
| | 0.5 | 87.27 | 91.32 | 87.32 | 91.11 | 79.94 | 87.39 | 5.27 | 8.49 |
| | | 71.23 | 73.54 | 90.87 | 82.43 | 82.12 | 80.04 | 9.82 | |
| | | 91.12 | 79.61 | 71.82 | 84.36 | 82.68 | 81.92 | 8.60 | |
| | | 72.31 | 77.95 | 90.26 | 81.38 | 92.13 | 82.81 | 10.07 | |
| | | 82.35 | 87.12 | 93.35 | 92.02 | 75.35 | 86.04 | 8.59 | |
| | 5 | 85.14 | 72.36 | 89.88 | 79.32 | 91.78 | 83.70 | 9.51 | 8.25 |
| | | 72.19 | 89.48 | 91.32 | 76.46 | 80.23 | 81.94 | 10.08 | |
| | | 87.39 | 83.89 | 78.01 | 92.03 | 79.98 | 84.26 | 6.71 | |
| | | 76.90 | 86.16 | 82.09 | 91.04 | 79.04 | 83.05 | 6.82 | |
| | | 91.02 | 95.89 | 87.91 | 78.09 | 95.12 | 89.61 | 8.04 | |
| | 50 | 82.28 | 81.45 | 89.12 | 90.29 | 79.98 | 84.62 | 5.59 | 6.93 |
| | | 85.12 | 89.06 | 80.67 | 79.96 | 92.57 | 85.48 | 6.32 | |
| | | 92.34 | 97.23 | 90.18 | 89.69 | 95.08 | 92.90 | 3.47 | |
| | | 84.56 | 87.68 | 90.59 | 92.98 | 89.09 | 88.98 | 3.55 | |
| | | 85.90 | 96.90 | 105.89 | 91.09 | 83.67 | 92.69 | 9.68 | |

由上述结果可知，按已确定的样品提取方法和检测条件测定配合饲料、浓缩饲料和精料补充料添加回收率，平均回收率在 68.22%~115.754%，批内变异系数均小于 11%，批间变异系数均小于 10%，证明本方法准确度和精密度良好，适用于上述类型饲料产品中二羟丙茶碱的测定。

表 20~22 给出了猪复合预混料、微量元素预混料、维生素预混料的加标回收率试验数据。

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回 收率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|----------------------------|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 猪 复 合 预 混 料 | 0.05 | 81.14 | 80.12 | 65.36 | 70.36 | 75.69 | 74.53 | 8.94 | 7.46 |
| | | 88.19 | 76.69 | 83.19 | 80.77 | 71.24 | 80.02 | 8.04 | |
| | | 69.80 | 77.02 | 83.11 | 80.78 | 79.56 | 78.05 | 6.55 | |
| | | 86.50 | 80.09 | 79.22 | 83.54 | 72.36 | 80.34 | 6.62 | |
| | | 85.82 | 79.28 | 78.89 | 80.41 | 68.90 | 78.66 | 7.79 | |
| | 0.5 | 86.34 | 80.94 | 82.66 | 83.05 | 71.21 | 80.84 | 7.08 | 3.91 |
| | | 81.57 | 89.08 | 82.33 | 80.97 | 81.98 | 83.19 | 4.01 | |
| | | 82.28 | 81.32 | 80.99 | 83.74 | 87.02 | 83.07 | 2.95 | |
| | | 80.74 | 80.77 | 86.29 | 81.41 | 80.57 | 81.96 | 2.98 | |
| | | 84.82 | 82.45 | 83.01 | 82.08 | 83.22 | 83.12 | 1.27 | |
| | 10 | 80.52 | 82.00 | 82.67 | 83.29 | 77.90 | 81.28 | 2.65 | 2.50 |
| | | 79.86 | 78.54 | 79.26 | 84.03 | 83.62 | 81.06 | 3.17 | |
| | | 81.91 | 80.97 | 77.27 | 79.90 | 79.44 | 79.90 | 2.20 | |
| | | 79.95 | 80.28 | 83.59 | 80.01 | 78.78 | 80.52 | 2.25 | |
| | | 84.21 | 80.33 | 83.59 | 79.22 | 80.67 | 81.60 | 2.66 | |
| | 100 | 81.27 | 82.09 | 81.44 | 82.90 | 85.16 | 82.57 | 1.92 | 2.29 |
| | | 84.42 | 83.56 | 82.08 | 84.24 | 80.69 | 83.00 | 1.91 | |
| | | 82.87 | 80.98 | 83.23 | 85.01 | 83.90 | 83.20 | 1.78 | |
| | | 84.60 | 83.31 | 81.11 | 88.08 | 82.68 | 83.96 | 3.13 | |
| | | 85.36 | 79.99 | 80.46 | 83.63 | 84.92 | 82.87 | 3.02 | |

表 20 猪复合预混料回收率试验结果

表 21 微量元素预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收 率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|---------|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 微量元素预混料 | 0.05 | 59.89 | 60.18 | 62.22 | 60.30 | 59.89 | 60.50 | 1.62 | 2.93 |
| | | 59.72 | 62.45 | 61.98 | 60.37 | 59.56 | 60.82 | 2.18 | |
| | | 60.86 | 59.27 | 62.11 | 63.94 | 60.05 | 61.25 | 3.00 | |
| | | 57.85 | 58.29 | 60.46 | 61.14 | 61.23 | 59.79 | 2.69 | |
| | | 58.20 | 59.39 | 63.97 | 64.01 | 63.26 | 61.77 | 4.47 | |
| | 0.5 | 70.33 | 69.24 | 71.34 | 70.29 | 70.67 | 70.37 | 1.08 | 1.54 |
| | | 70.44 | 71.34 | 73.49 | 70.21 | 69.58 | 71.01 | 2.14 | |
| | | 70.62 | 69.34 | 70.28 | 72.03 | 70.58 | 70.57 | 1.37 | |
| | | 69.43 | 69.99 | 71.35 | 72.11 | 71.46 | 70.87 | 1.57 | |
| | | 69.07 | 72.11 | 71.93 | 69.96 | 70.47 | 70.71 | 1.84 | |
| | 10 | 67.80 | 69.02 | 73.47 | 75.00 | 70.46 | 71.15 | 4.24 | 2.63 |
| | | 69.46 | 72.55 | 74.89 | 70.23 | 71.77 | 71.78 | 2.96 | |
| | | 68.52 | 69.54 | 71.36 | 71.49 | 70.20 | 70.22 | 1.78 | |
| | | 68.22 | 70.99 | 68.94 | 69.27 | 70.32 | 69.55 | 1.59 | |
| | | 69.97 | 69.46 | 70.95 | 71.13 | 70.42 | 70.39 | 0.98 | |
| | 100 | 67.41 | 69.22 | 73.36 | 71.97 | 69.55 | 70.30 | 3.35 | 2.41 |
| | | 69.26 | 70.52 | 68.77 | 69.49 | 71.76 | 69.96 | 1.70 | |
| | | 68.52 | 73.21 | 69.82 | 70.06 | 71.49 | 70.62 | 2.54 | |
| | | 70.10 | 72.30 | 71.44 | 73.29 | 71.83 | 71.79 | 1.63 | |
| | | 69.97 | 68.40 | 72.26 | 70.35 | 73.01 | 70.80 | 2.61 | |

表 22 维生素预混料回收率试验结果

| 样品 | 添加浓度 mg/kg | 回收率 (%) | | | | | 平均回收 率% | 批内变异 系数% | 批间变异 系数% |
|--------|---------------|---------|--------|--------|--------|--------|------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 维生素预混料 | 0.05 | 80.47 | 81.07 | 92.66 | 89.24 | 79.30 | 84.55 | 7.10 | 5.51 |
| | | 88.20 | 89.55 | 92.89 | 88.02 | 86.71 | 89.07 | 2.65 | |
| | | 95.11 | 92.14 | 91.50 | 88.73 | 95.28 | 92.55 | 2.95 | |
| | | 84.34 | 84.98 | 84.76 | 89.27 | 84.11 | 85.49 | 2.50 | |
| | | 86.22 | 87.19 | 80.33 | 81.59 | 80.28 | 83.12 | 4.01 | |
| | 0.5 | 88.35 | 89.97 | 86.23 | 85.77 | 88.90 | 87.84 | 2.04 | 4.67 |
| | | 86.45 | 88.80 | 88.39 | 89.44 | 86.21 | 87.86 | 1.65 | |
| | | 81.59 | 80.28 | 89.34 | 81.21 | 80.05 | 82.49 | 4.70 | |
| | | 80.60 | 81.29 | 83.12 | 80.11 | 80.35 | 81.09 | 1.50 | |
| | | 83.56 | 80.29 | 89.75 | 90.68 | 80.27 | 84.91 | 5.93 | |
| | 10 | 87.87 | 87.48 | 86.22 | 83.90 | 89.61 | 87.02 | 2.44 | 4.58 |
| | | 77.71 | 89.23 | 80.76 | 81.25 | 85.45 | 82.88 | 5.42 | |
| | | 88.09 | 81.45 | 81.37 | 85.29 | 81.22 | 83.48 | 3.70 | |
| | | 79.34 | 80.67 | 80.21 | 83.98 | 79.46 | 80.73 | 2.35 | |
| | | 89.67 | 88.24 | 88.98 | 86.43 | 89.29 | 88.52 | 1.45 | |
| | 100 | 96.65 | 94.22 | 105.37 | 107.88 | 106.25 | 102.07 | 6.06 | 7.59 |
| | | 95.55 | 94.29 | 98.80 | 93.67 | 93.30 | 95.12 | 2.34 | |
| | | 118.05 | 110.44 | 111.56 | 113.24 | 116.65 | 113.99 | 2.86 | |
| | | 111.98 | 113.33 | 115.97 | 100.04 | 105.26 | 109.32 | 5.96 | |
| | | 100.46 | 99.98 | 107.29 | 99.67 | 100.01 | 101.48 | 3.21 | |

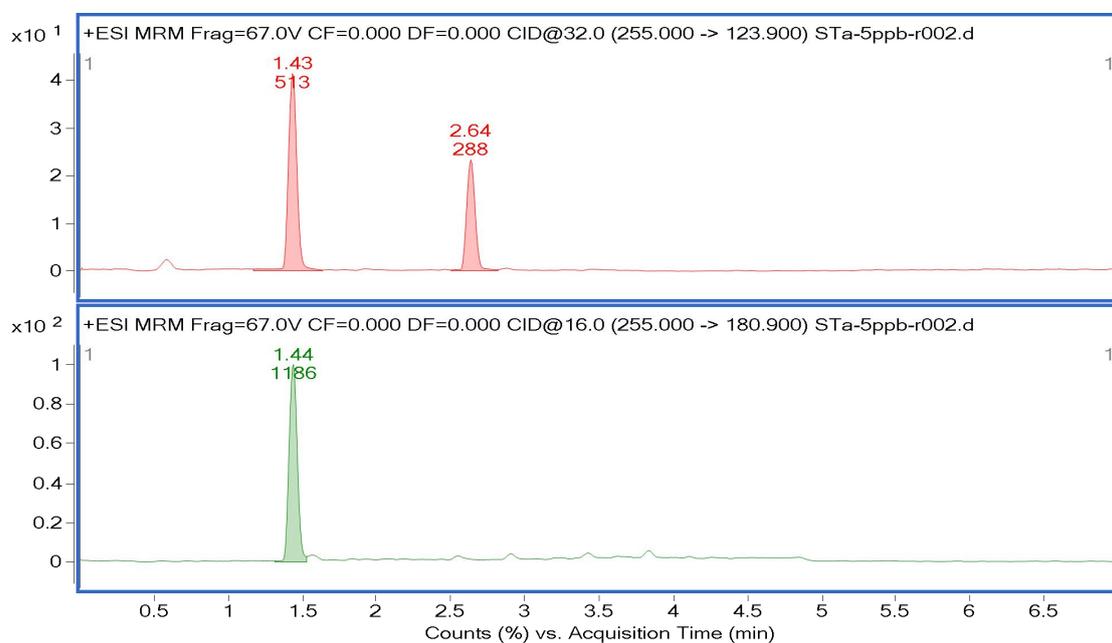
由上述结果可知，按已确定的样品提取方法和检测条件测定猪复合预混料、微量元素预混料、维生素预混料的添加回收率，平均回收率在 60.50%~113.99%，批内和批间变异系数均小于 10%，证明本方法准确度和精密度良好，适用于添加剂预混合饲料产品中二羟丙茶碱的测定。

液质联用检测仪属于高灵敏度高精密度仪器，而饲料样品种类繁多，所含杂质无法准确确定，而且实验前处理过程影响因素多，因此会给同一样品的检测结果造成不同程度的偏差。依据本实验检测结果的相对偏差值，并参照国内外相关液质联用检测标准，最终将本标准重复性允许偏差确定为不大

于 20%。

4.12 干扰实验

选用茶碱类、磺胺类、氟喹诺酮类和酰胺醇类等化合物考察常见药物的干扰，在本方法的试验条件下进行测试，其中基质匹配标准溶液的浓度为 5.0 ng/mL，各种干扰药物的浓度为 50.0 ng/mL，二羟丙茶碱保留时间约为 1.4 min，结果见图 33~34。结果表明，在该试验条件下，45 种常见药物未干扰二羟丙



茶碱的测定。干扰药物

种类汇总表见表 23。

图 33 5.0 ng/mL基质匹配标准溶液特征离子色谱图

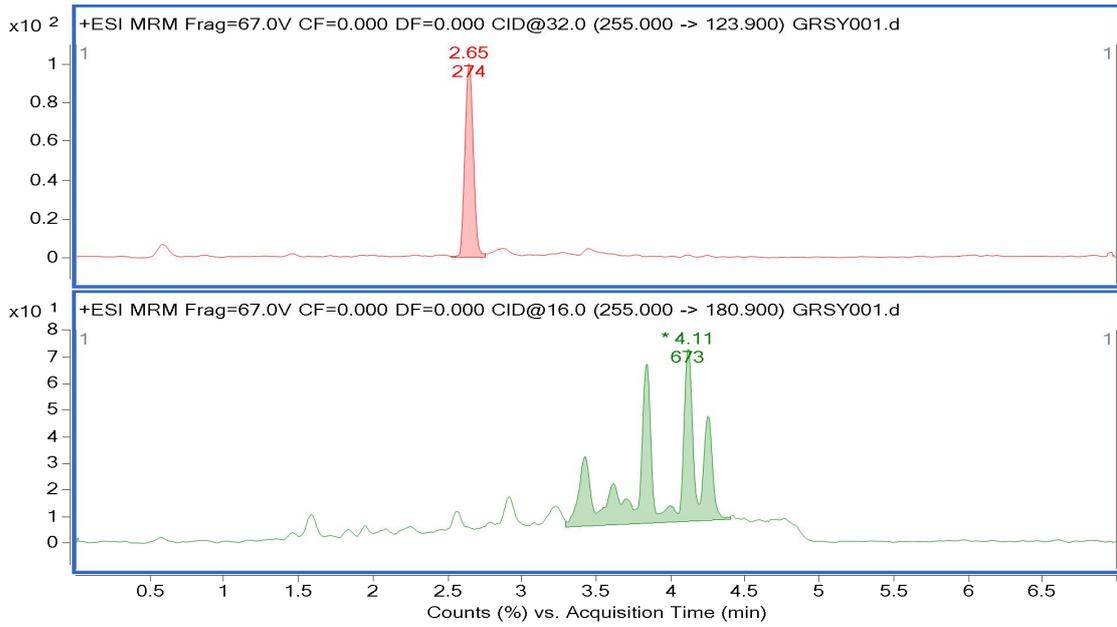


图 34 干扰药物浓度为50.0 ng/mL特征离子色谱图

表 23 干扰药物种类汇总表

| | |
|------------|--|
| 茶碱类（2种） | 茶碱、氨茶碱 |
| 磺胺类（24种） | 磺胺醋酰、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲异噁唑、磺胺氯吡嗪 磺胺氯噻嗪、磺胺嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺噻唑、磺胺 间甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺吡啶、 磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧噻嗪、磺胺二甲嘧啶、磺胺苯吡 唑、甲氧苄啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺脒、磺胺二甲异嘧 啶、磺胺恶唑、磺胺苯酰、磺胺喹恶啉、磺胺硝苯 |
| 氟喹诺酮类（16种） | 恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星 沙拉沙星、依诺沙星、洛美沙星、萘啶酸、恶喹酸、氟甲喹、 达氟沙星、双氟沙星、奥比沙星、司帕沙星、氟罗沙星 |
| 酰胺醇类（3种） | 氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考 |

五、结论

本方法样品前处理步骤科学合理，易于掌握，与现有饲料中药物和违禁物的检测方法要求基本类似，减轻了操作人员工作负担，极大提高了检测效率，增强了方法的实用性和适用性。从方法灵敏度、准确度和精密度试验可知，对于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混料和精料补充料的添加回收率测定，其平均回收率在 60.50%~113.99%，批内变异系数均小于 11%，批间变异系数均小于 10%，证明本方法灵敏度、准确度和精密度良好，可完全满足上述类型饲料产品中二羟丙茶碱的检测。综上所述，本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中二羟丙茶碱的测定。

六、验证试验结果

标准完成起草工作后，本标准内容经山东省饲料质量检验所、河南省兽药饲料监察所和农业农村部食品质量监督检验测试中心(成都)3家单位验证，结果表明适用于饲料中二羟丙茶碱的测定。

七、与现行法律法规和强制标准的关系

标准制定过程中严格贯彻和遵守国家有关方针、政策、法律和规章，并与有关基础标准相衔接，与国家现行强制性标准无冲突。

八、标准作为强制性或推荐性标准的意见

标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、人身财产安全和环境质量要求等有关强制性标准或强制性条文要求。因此，建议将本标准作为推荐性标准颁布实施。

九、重大分歧意见的处理经过和依据

标准制定过程中，多次征求相关专家的意见，无重大分歧意见。

十、其他需要说明的事项

无

参考文献

- [1] 刘海萍, 国麟祺, 王东伟. 二羟丙茶碱全麻诱导前预处理对肺灌洗液中 IL-8、ICAM-1 表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2018(2).
- [2] 卢晶, 郭红, 刘海萍. 二羟丙茶碱预处理对支气管麻醉手术肺保护作用的研究[J]. 中国医学创新, 2018, 5(52): 129- 131.
- [3] 郭红, 国玉芝, 刘海萍. 二羟丙茶碱对肺癌手术急性肺损伤的保护及抗炎作用的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2018, 3(41): 22- 24.
- [4] 何瑾, 张峻, 周琼. 286 例血清茶碱浓度监测结果分析[J]. 中国药师, 2009, 12(13): 350- 352.
- [5] Simons K J, Simons F E. Urinary excretion of dyphylline in humans.[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 68(10): 1327-1329.
- [6] 姜寅光, 李隽. 二羟丙基茶碱引起胆囊改变 27 例分析[J], 中国药事, 2003 6(17): 388.
- [7] 班付国, 邹素华, 吴宁鹏, 李慧素. HPLC-PDA 法检测 17 种兽药中非法添加氨茶碱、二羟丙茶碱的研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 000(012): 32- 37.
- [8] James WA, Duangchit P, John H. Preparation and characterization of potential prodrugs of dyphylline[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1985, 74(2), 184- 187.
- [9] 施春阳, 王文清, 汤杰. 高效液相色谱法测定二羟丙茶碱释缓片的含量[J]. 医药报道, 2005(5): 439- 441.
- [10] 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版. 二部.