

国家标准制定项目

《饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明 (征求意见稿)

《饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准由 TC76（全国饲料工业标准化技术委员会）提出并归口，主管部门为国家标准化管理委员会，计划号为 20214594-T-469，项目名称为《饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定 液相色谱-串联质谱法》，项目承担单位中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

1.2 主要修订背景

氯苯那敏（chlorphenamine），俗称扑尔敏，化学名为 3-(4-氯苯基)-N,N-二甲基-3-吡啶-2-基-1-丙胺；溴苯那敏（bromphenamine），化学名为 3-(4-溴苯基)-N,N-二甲基-3-吡啶-2-基-1-丙胺，是氯苯那敏的溴代同系物，化学结构式见图 1。氯苯那敏和溴苯那敏是第一代的 H1 组胺受体拮抗剂。[1]氯苯那敏被用于治疗过敏性疾病，如花粉热，流感病毒的抗病毒活性，以及慢性鼻窦炎/鼻炎和上呼吸道咳嗽综合征[2]。近 50 年来，氯苯那敏和溴苯那敏被用于治疗许多过敏反应[3]。氯苯那敏也可用于局麻药，与常规局麻药相比具有相似的化学结构，同样对心血管和中枢神经系统具有相似的毒性[4]。根据文献报告，在畜牧养殖上，氯苯那敏可用于缓解高致病性猪蓝耳病临床症状[5]，能够稳定低致病性禽流感患鸡血液中白细胞数量、淋巴细胞数量、红细胞相关指标和血小板数量[6]，可以提高鸡的采食量和日增重，取得较高的生产性能[7-8]，还能有效治疗在狂犬病免疫过程中出现的免疫犬过敏反应现象[9]。同时该类药物由于具有抗晕眩以及催眠镇定等作用，能引起动物嗜睡反应，可促进动物生长[10]，因此，一些不法商人在饲料中非法使用，从而达到增加动物采食、促进生长和增加体重等作用。根据国外学者研究，服用该类药物可能会导致嗜睡、呼吸频率降低[11]和急性中毒[12]，甚至导致死亡[13]。动物采食了添加氯苯那敏和溴苯那敏的饲料，会造成其在组织中的残留，人们食用了残留了氯苯那敏和溴苯那敏的动物组织，会产生上述不良反应，因此饲料中添加氯苯那敏和

溴苯那敏的风险不容忽视。由于目前尚缺乏相关检测方法标准，无法对饲料中非法添加氯苯那敏和溴苯那敏的行为进行有效的监控。

目前相关文献与标准中检测氯苯那敏和溴苯那敏的方法主要是高效液相色谱法 (HPLC)[14-19]、液/质联用法(LC /MS)[20-23]，涉及的对象以原料药、血液、动物组织为主 [24-28]，如：王夏炎等建立高效液相色谱法测定小儿氨酚黄那敏颗粒中马来酸氯苯那敏的含量。孙会会等利用超快速液相色谱-串联质谱方法(LC-MS/MS)对人体血液中氯苯那敏成分进行定性定量分析.方法血液经过乙腈沉淀蛋白后,振荡,离心,过 0.22 μ m 有机微孔滤膜,上清液经 LC-MS/MS 分析,采用多反应监测模式。但缺乏饲料中氯苯那敏和溴苯那敏同步测定的方法，因而本标准运用液质联用技术，优化提取方法，并结合固相萃取小柱对其进行净化处理，进一步确证饲料中的氯苯那敏和溴苯那敏的含量。

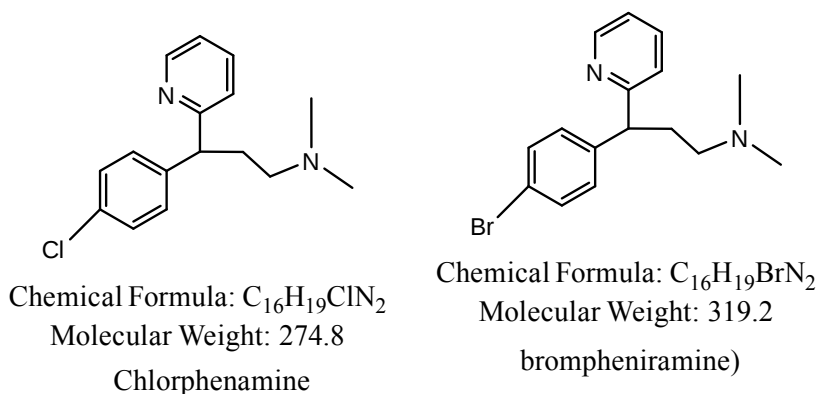


图 1. 氯苯那敏和溴苯那敏的化学结构

目前相关文献与标准中检测氯苯那敏和溴苯那敏的方法主要是高效液相色谱法 (HPLC)[14-19]、液/质联用法(LC /MS)[20-23]，涉及的对象以原料药、血液、动物组织为主 [24-28]，缺乏饲料中氯苯那敏和溴苯那敏同步测定的方法，因而本标准运用液质联用技术，优化提取方法，并结合固相萃取小柱对其进行净化处理，进一步确证饲料中的氯苯那敏和溴苯那敏的含量。

1.3 主要工作过程

标准第一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根据标准的修订需要，成立了标准工作小组，进行标准的研制及起草工作，具体工作过程如下：

2022年1-2月：标准编制工作小组检索了有关氯苯那敏和溴苯那敏检测方法的国内外文献，以及饲料中氯苯那敏和溴苯那敏检测技术现状，确保标准的实用性和普适性。随后制定了饲料中氯苯那敏和溴苯那敏检测方法试验草案，拟订工作计划。

2022年3-8月：按照拟定的试验草案对饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的提取和净化条件以及液相色谱—质谱联用仪的仪器参数进行研究，对方法的试验条件、主要技术指标等进行进一步优化，最终确定了前处理条件和仪器条件。并进行了线性、检出限和定量限、添加回收率等相关试验以确定方法最终是否具有可操作性和科学性。期间开展了对市场配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料以及牛的精料补充料中氯苯那敏和溴苯那敏的检测。

2022年9-10月：工作小组按照 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《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》等编写规则完成标准草案和编制说明的撰写，并委托3家实验室验证复核。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

本标准的编写制定过程以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检出限和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验。

本标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写及表述按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2.2 主要内容

本文件规定了饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定方法。

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 10 µg/kg，定量限均为 50 µg/kg。

2.3 方法学研究

2.3.1 质谱条件优化

配制 100 µg/mL 氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液，采用 ESI+模式，微流量泵直接进质谱，进行质谱条件的优化。通过一级全扫描质谱得到氯苯那敏和溴苯那敏的母离子[M+H]⁺为 m/z 275.2、m/z 319.1；通过母离子扫描得到二级质谱，选择质荷比较大、强度较稳定的 m/z 167.2、m/z 230.2（氯苯那敏）、m/z 167.1、m/z 274（溴苯那敏）两个碎片作为子离子，组成定性离子对 275.2/167.2 和 275.2/230.2（氯苯那敏）、319.1/167.1 和 319.1/274（溴苯那敏）；由于子离子碎片 m/z 230.2（氯苯那敏）、319.1/167.1（溴苯那敏）的响应强度较强且背景干扰小，所以选择 275.2/230.2（氯苯那敏）、319.1/167.1（溴苯那敏）作为定量离子对。在 MRM 模式下，进一步优化了这两对离子对的去簇电压 DP 和碰撞电压 CE。确定的质谱条件如下：

质谱采用电子喷雾离子源，正离子检测方式，多反应监测（MRM）；喷雾电压为 3.2 Kv；毛细管温度为 350℃；脱溶剂气、碰撞气为高纯氮气，使用前调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求，分段采集，具体的参数见表 1。

表 1 溴苯那敏和氯苯那敏的质谱条件

药物名称	出峰时间	离子对	去簇电压	碰撞能
Drug	Time (min)	Ion pairs (m/z)	DP(V)	CE(eV)
氯苯那敏	2.72	275.2>167.2	50	44
		275.2>230.2*		45
溴苯那敏	2.79	319.1>167.1*	50	44
		319.1>274		55

*为定量离子

2.3.2 色谱柱和流动相的组成的选择

本研究选取了 5 款不同色谱柱 (BEH C18, SiELC Obelise R, Cortecs HILIC, BEH HILIC) 进行比较。结果表明采用 BEH C18 色谱柱时, 梯度淋洗。发现氯苯那敏和溴苯那敏在 C18 色谱柱上的保留时间较好, 这与其极性大, 在常规反相色谱柱上保留性能有关, 试验中比较了甲醇和乙腈作为有机相时, 氯苯那敏和溴苯那敏在色谱柱上的分离效果, 结果表明乙腈比甲醇有更好的分离效果, 峰形也较好, 所以试验中选择乙腈作为有机相。基于现有文献可知, 对于饲料产品, 使用去离子水、5 mmol/L 甲酸铵、5 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液作为水相时的梯度洗脱效果较为突出, 然而对于 0.1%甲酸水溶液作为水相的洗脱效果却少有研究。本文分别考察了去离子水(A)-乙腈(B)、0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)、5 mmol/L 甲酸铵(A)-乙腈(B)以及 5 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)作为流动相时的梯度洗脱效果, 通过比较出峰时间、分离效果、峰形和灵敏度, 试验结果显示在相同的梯度洗脱条件下, 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)作为流动相时, 洗脱效果更好, 流动相采用 0.3 mL/min 的流速。

通过上述条件, 确定色谱条件如下:

色谱柱: Waters BEH C₁₈ 柱 (100 mm× 3.0 mm, 1.7 μm); 柱温: 25℃; 进样量: 5 μL; 流动相流速为 0.3 mL/min, 梯度淋洗, 流动相组成和梯度见表 2。色谱图见图 2。

表 2 流动相梯度条件

时间(min)	流速(mL/min)	0.1 甲酸水溶液(%)	乙腈(%)
Time	Flow	0.1% Formic acid aqueous solution	Acetonitrile
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

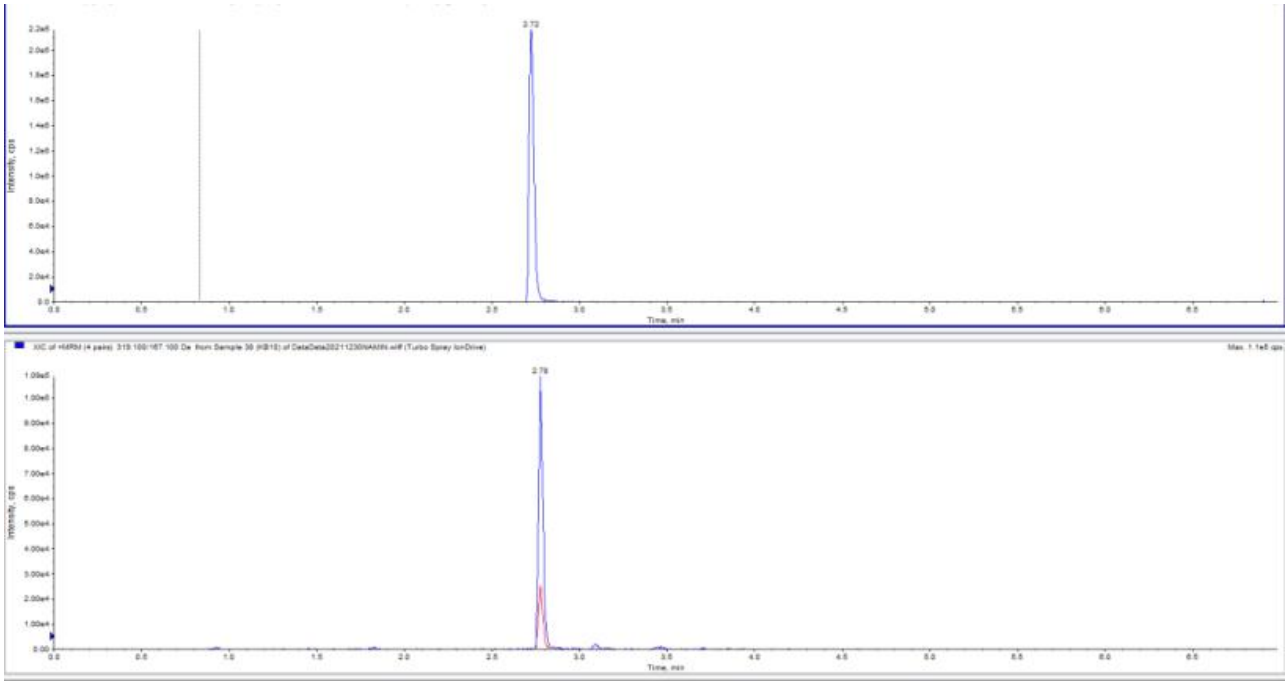


图 2 氯苯那敏和溴苯那敏色谱图

2.3.3 提取条件的优化和确定

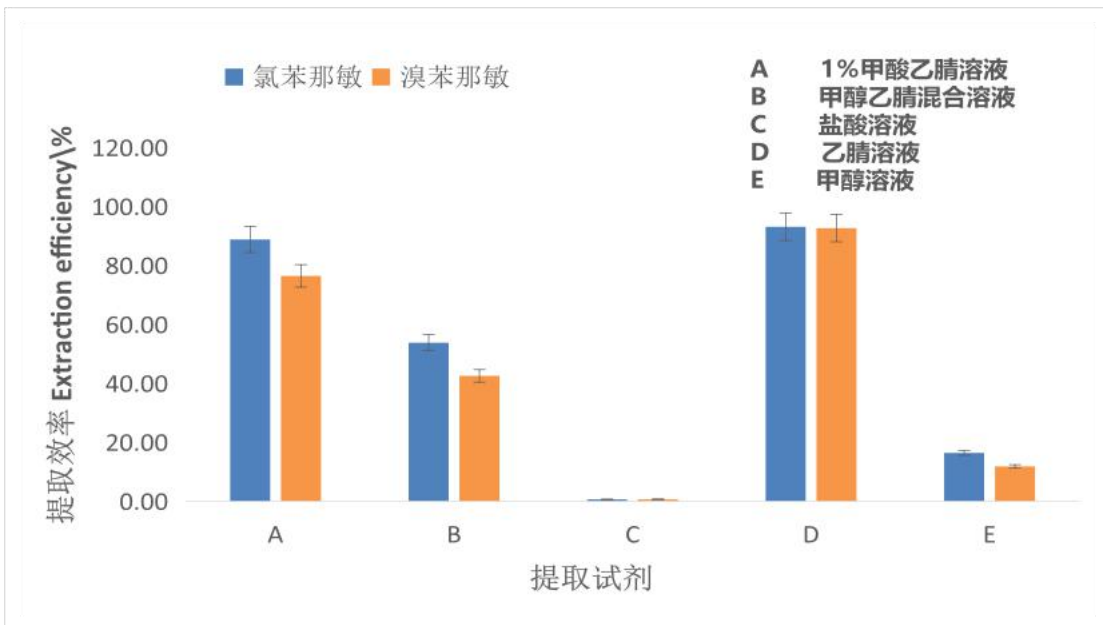


图 3 氯苯那敏和溴苯那敏提取效果图

本试验研究 1%甲酸乙腈溶液、甲醇乙腈混合溶液、盐酸溶液、乙腈溶液、甲醇溶液 5 种溶液作为氯苯那敏和溴苯那敏的提取剂,比较了 5 种不同溶液作为提取剂的提取效果,取饲料,

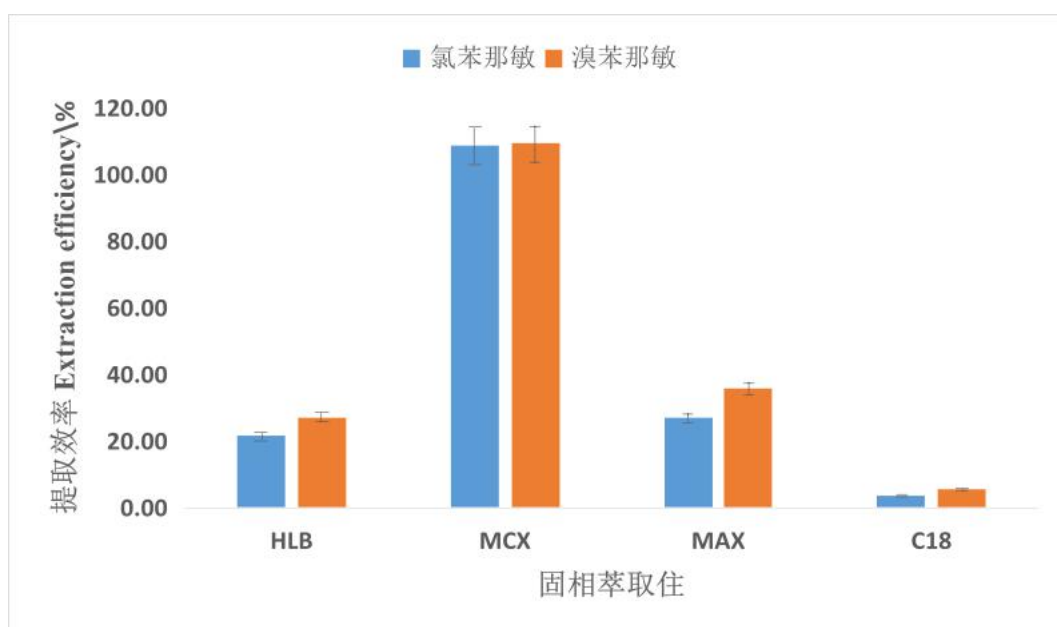
结果见图 3。

基于现有文献可知，对于饲料产品，使用甲醇、乙腈[31-32]进行处理时都可以得到较高的提取效率，而对于含有氯苯那敏和溴苯那敏的饲料样品，甲醇的提取效率较低，测量值仅为标示量的 50%以下，这严重影响了样品的检测结果。结果表明，对于氯苯那敏和溴苯那敏，1% 甲酸乙腈溶液和乙腈作为提取剂回收率较好，甲醇乙腈混合溶液、盐酸溶液、甲醇溶液提取效率较低。造成这种结果的原因可能是：甲醇对饲料中的其他物质也进行了提取，从而造成了提取液中各种物质相互交织，影响了氯苯那敏和溴苯那敏的检测；甲醇乙腈混合溶液由于其中掺杂了甲醇的原因，所以最终影响了检测结果；盐酸溶液，由于其酸性太强，在饲料提取过程中，对各种物质造成了结构破坏，杂质影响严重；1% 甲酸乙腈溶液和乙腈在对氯苯那敏和溴苯那敏的提取过程中，展现了其优秀的提取效果，达到 90%以上的提取效率，从五种提取剂中脱颖而出。综合比较，由于氯苯那敏和溴苯那敏在弱酸性条件下有较好的保留，且在上机检测中可以增强电离信号，最终选择 1% 甲酸乙腈溶液作为提取溶剂。

2.3.4 净化条件的优化和确定

饲料样品提取过程中的基质杂质可能会在色谱柱上吸附，不能被洗脱，造成色谱柱柱效降低，同时造成系统压力升高，另外无机盐类也会抑制质谱信号。因此需要一定的净化方法。

本试验比较了 HX、MAX、C₁₈ 固相萃取小柱对饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的净化效果。对四种小柱进行活化处理：加入 3 mL 甲醇，待甲醇流出后，再加入 3 mL 水。取提取上清液



10 mL 加入小柱内，待样液全部流出后，再加入 3 mL 水清洗小柱，然后用 3 mL 甲醇淋洗小柱，最后 MCX 用 3 mL 5 % 氨水甲醇洗脱，MAX 用 3 mL 甲酸甲醇洗脱，C₁₈、HLB 小柱用 3 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液氮吹至近干，用复溶液（1.2.1）溶解定容至 1 mL。结果见图 4。

图 4 不同固相萃取对净化效果

HLB、C₁₈、MAX 小柱对酸性物质有较好的选择性，而氯苯那敏和溴苯那敏呈现弱碱性，所以对其没有较好的保留；MCX 柱由于具有反相和强阳离子交换双重保留性能，对碱性物质氯苯那敏和溴苯那敏有良好的选择性和灵敏度，所以 MCX 比 HLB、C₁₈ 和 MAX 表现出了更加优越的分离富集性能，因此本试验选择对目标氯苯那敏和溴苯那敏具有高效吸附作用的 MCX 固相萃取小柱，从复杂的饲料基质中选择性吸附目标物，再通过 5% 氨水甲醇将目标物洗脱下来，从而达到净化的目的。这种方法选择性更强，适用于饲料等复杂基质的净化。同时，为考察 HLB 固相萃取柱柱容量，防止上样和淋洗过程出现过载现象，我们用空白配合饲料、浓缩饲料、预混料样品添加高浓度水平的氯苯那敏和溴苯那敏，按上述方法进行处理上机，回收率见表 3。

表 3 固相萃取柱容量考察结果

	平均回收率%				
	0.10 g/mL	10 g/mL	100 g/mL	1000 g/mL	2000 g/mL
配合饲料	93.2	89.2	92.6	88.7	91.3
浓缩饲料	86.9	86.3	90.6	91.4	97.1
预混料	88.7	93.6	92.3	88.5	86.9

结果表明，配合饲料、浓缩饲料、预混料中目标化合物含量至少在 2000 g/mL 以内，不会出现小柱过载情况。

2.3.5 试验步骤

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，向其中加入 20 mL 1% 甲酸乙腈溶液，常温下超声提取 20 min，于 8000 rpm 离心 5 min，取上清液备用。备用上

样至 SPE 小柱 (SPE 小柱依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化), 再先后用 3mL 水和 3 mL 甲醇淋洗, 弃去淋洗液, 抽干。用 3 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 40℃水浴氮气吹干, 准确加入 1mL 1%甲酸溶液复溶, 过微孔滤膜, 上机

2.3.6 基质效应

液质检测具有高灵敏度和高选择性的同时也存在基质效应, 不同饲料样品的组成比较复杂, 液质检测药物时基质干扰非常明显。首先考察基质效应, 取不同饲料样品进行前处理, 以此基质提取液作稀释液配制 1.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00 ng/mL 的基质样品, 与直接用复溶液配制的标准溶液对比, 大部分氯苯那敏和溴苯那敏表现基质抑制。为消除基质效应, 本试验绘制基质校正来进行定量。

不同基质中氯苯那敏和溴苯那敏的基质效应

基质	氯苯那敏基质效应	溴苯那敏基质效应
猪配合料	0.83	0.89
猪浓缩料	0.72	0.74
猪预混料	0.70	0.72
鸡配合料	0.73	0.77
鸡浓缩料	0.69	0.66
鸡预混料	0.54	0.59

3.2 稳定性考察

2.3.7 标准溶液有效期实验

在仪器测定方法优化完成后, 参照 NY/T 1896 标准, 我们对标准溶液的稳定性进行了考察。将配置好的氯苯那敏和溴苯那敏标准储备液 (1 mg/mL) 于-20℃保存避光保存、标准溶液稳定性的考察时间为六个月, 在此期间内每 2 周反复进样, 每次将-20℃保存的氯苯那敏和溴苯那敏标准储备液 (1 mg/mL) 从冰箱取出, 充分回温, 分别逐级稀释至 100 ppb 进样分析, 结果见图:

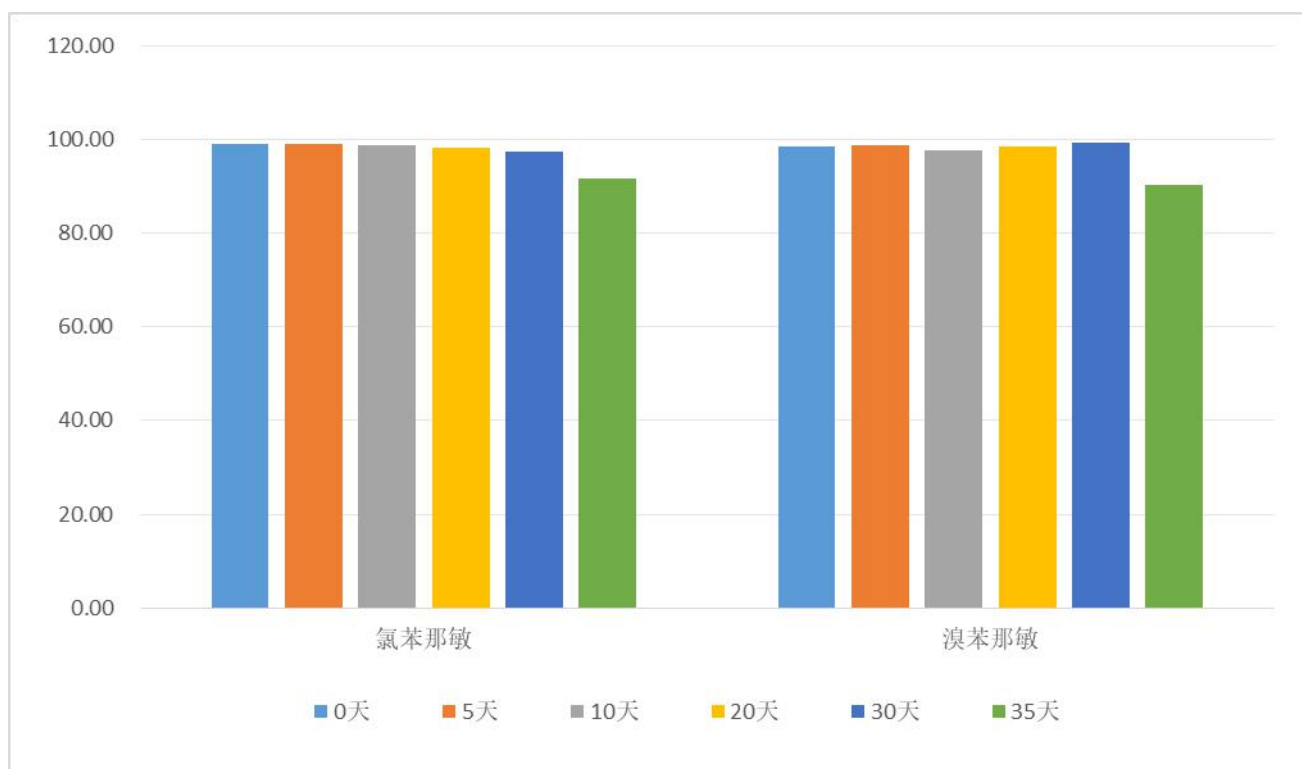
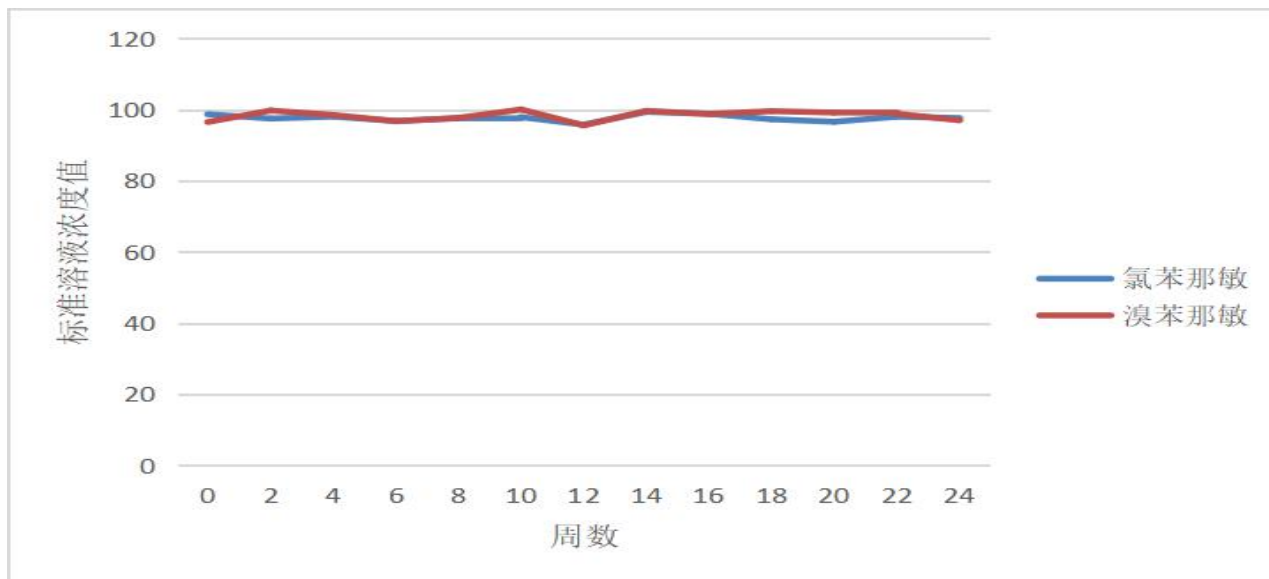


图 5 氯苯那敏和溴苯那敏标准储备液保存期实验

由上述测定的数据表明：氯苯那敏和溴苯那敏标准储备液（1 mg/mL）置于-20℃下避光保存，6个月无变化、因此规定有效期为6个月。同时对中间液进行了稳定性实验，定为有效期为1个月。

2.4 方法性能

2.4.1 线性方程和线性范围

分别取，配置浓度为 1.0 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液，以条件进行检测，以定量离子色谱峰面积与标准溶液终浓度作标准曲线。线性试验结果见表 3。

依据定量离子色谱峰的信噪比(S/N)大于 3 为检出限(LOD), S/N 大于 10 为定量限(LOQ), 得出 LOD 和 LOQ, 见表 4。色谱图见图 6-15

表 4 氯苯那敏和溴苯那敏线性方程

药物名称	线性方程	相关系数	检出限	定量限
Drugs	Linear equations	Correlation coefficient	LOD	LOQ
氯苯那敏	$y = 3424.449x - 19.875$	$R^2 = 0.9993$	3	10
溴苯那敏	$y = 3429.664x - 28.298$	$R^2 = 0.9989$	3	10

从表 3 中可以看出：标准溶液在 1.0 ~ 200 $\mu\text{g/kg}$ 的范围内线性关系良好；方法的检出限为 3 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

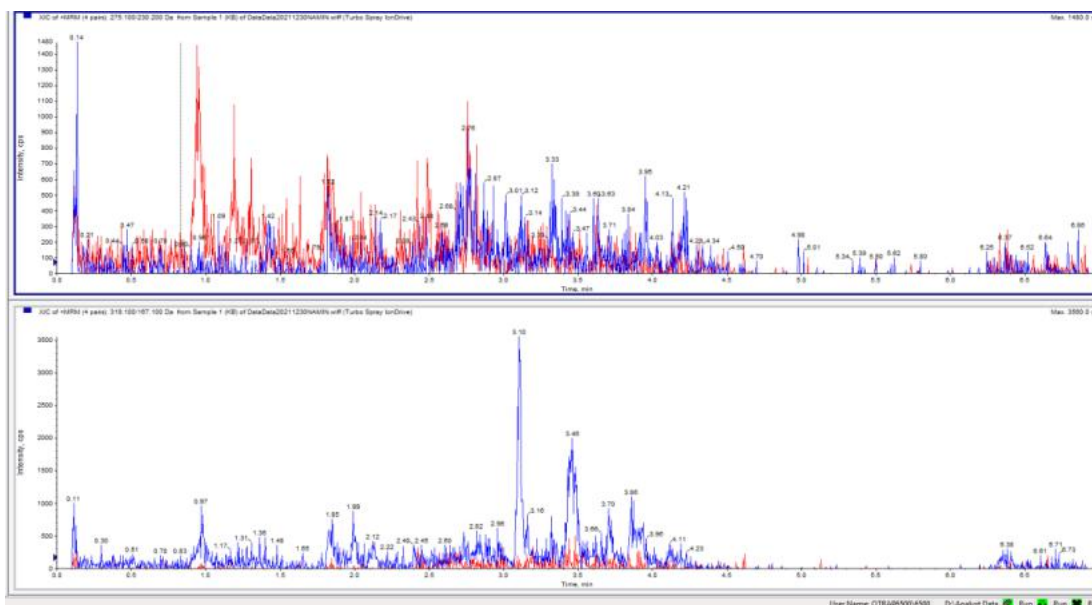


图 6 空白鸡配合饲料色谱图

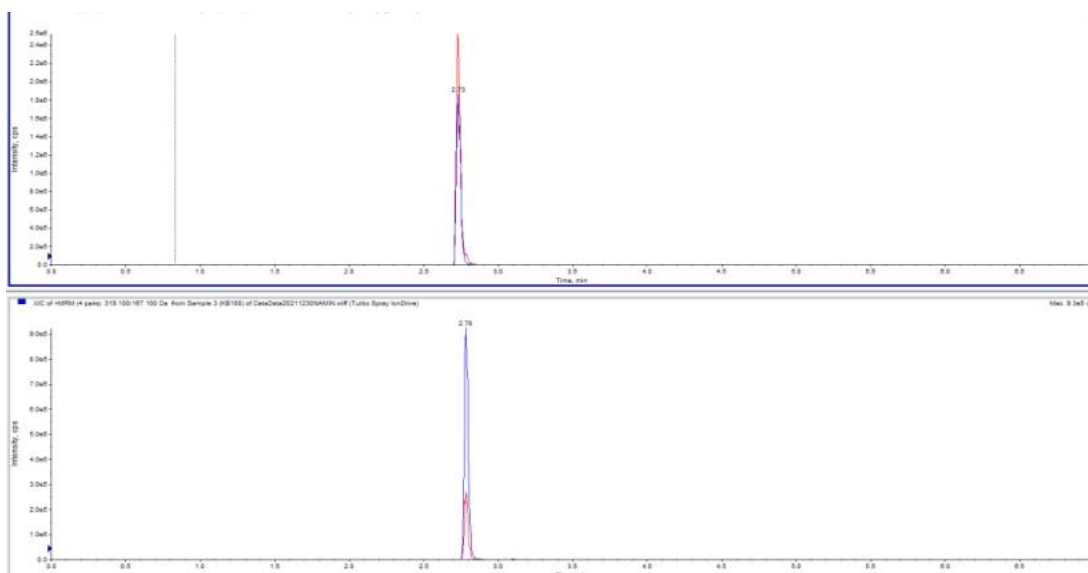


图 7 鸡配合饲料阳性添加（添加浓度 10 ng/g）色谱图

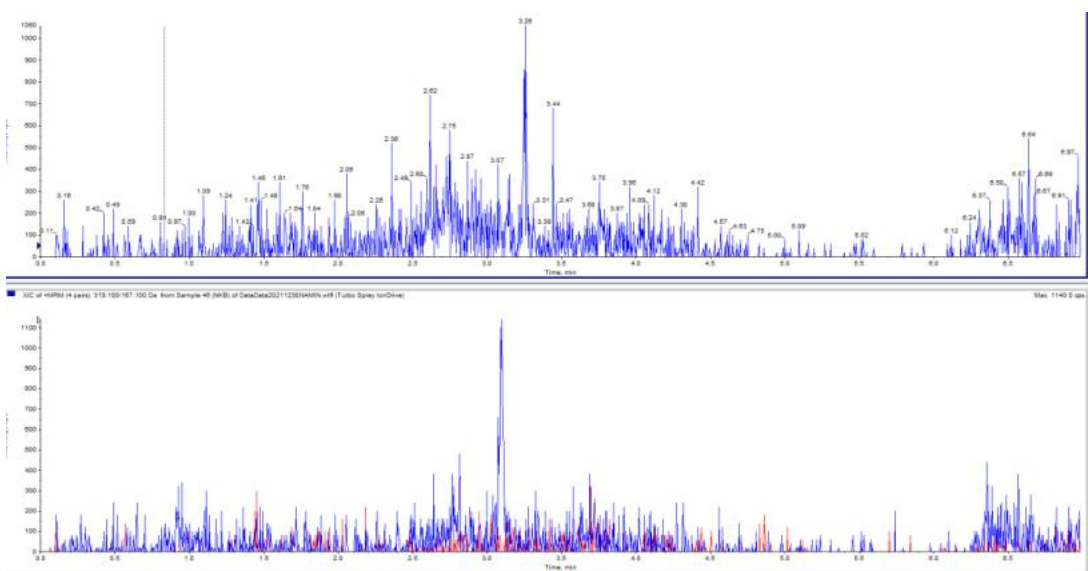


图 8 鸡空白预混合饲料色谱图

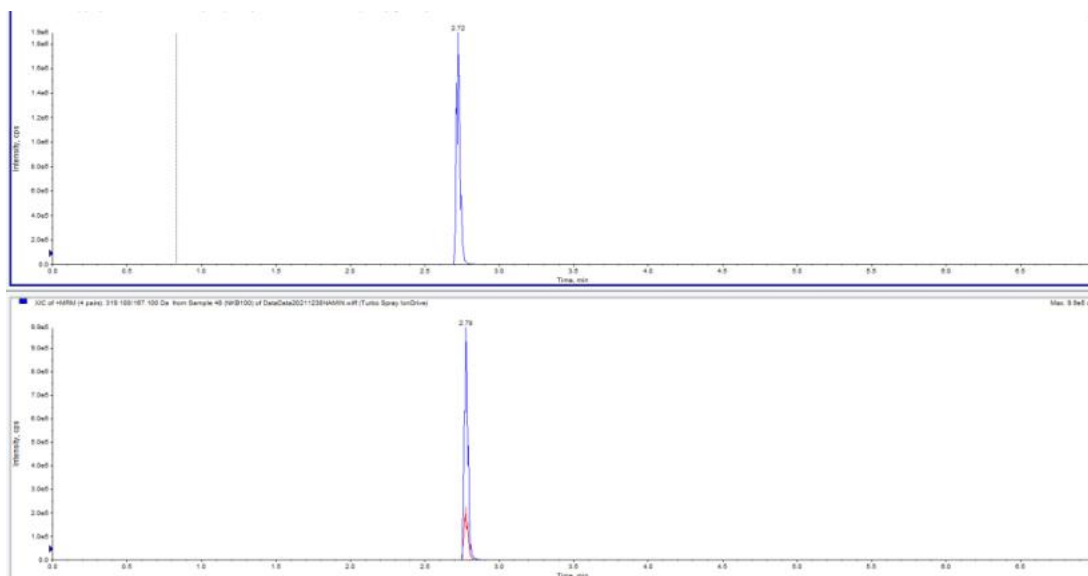


图 9 鸡预混合饲料阳性添加（添加浓度 10 μg/kg）色谱图

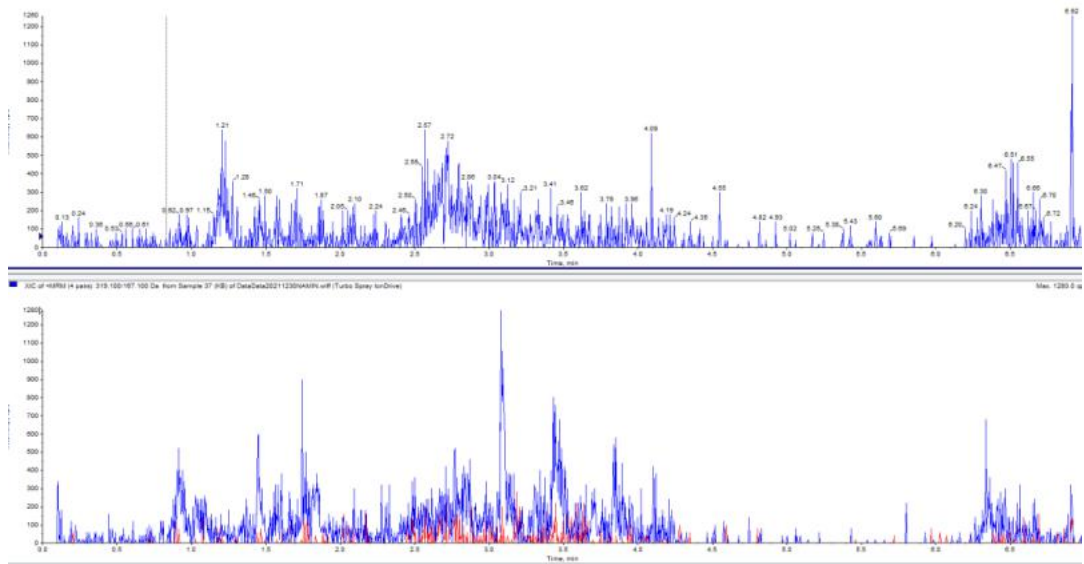


图 10 空白鸡浓缩饲料色谱图

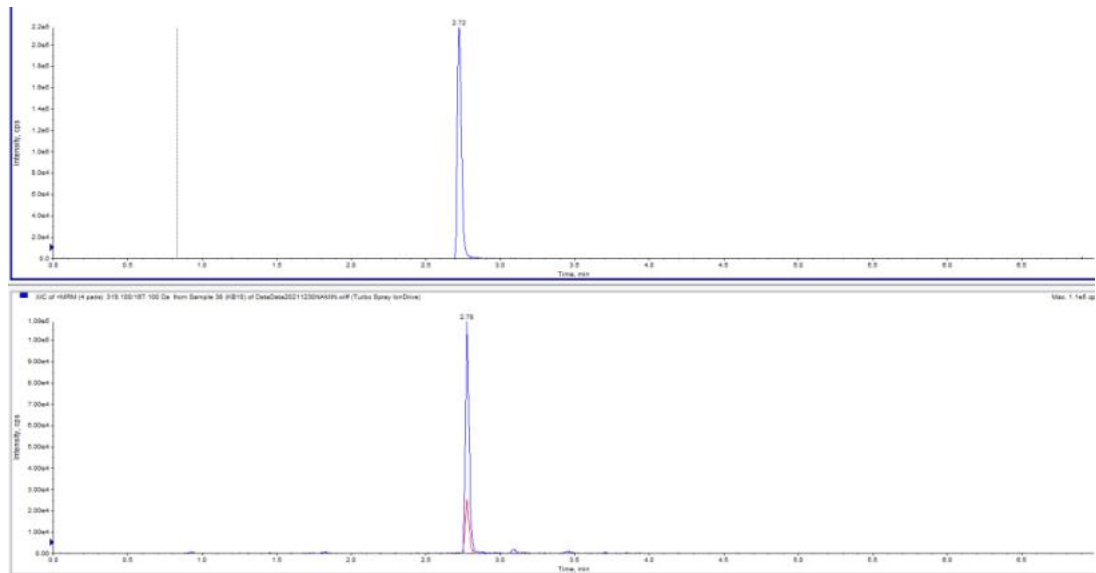


图 11 鸡浓缩饲料阳性添加（添加浓度 10 µg/kg）色谱图

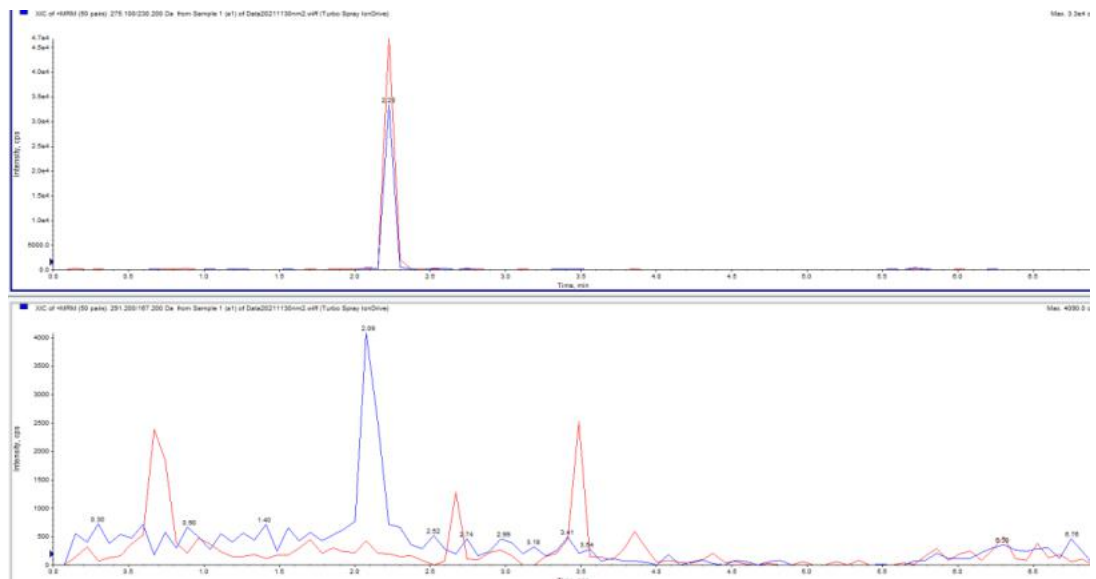


图 12 空白猪配合饲料色谱图

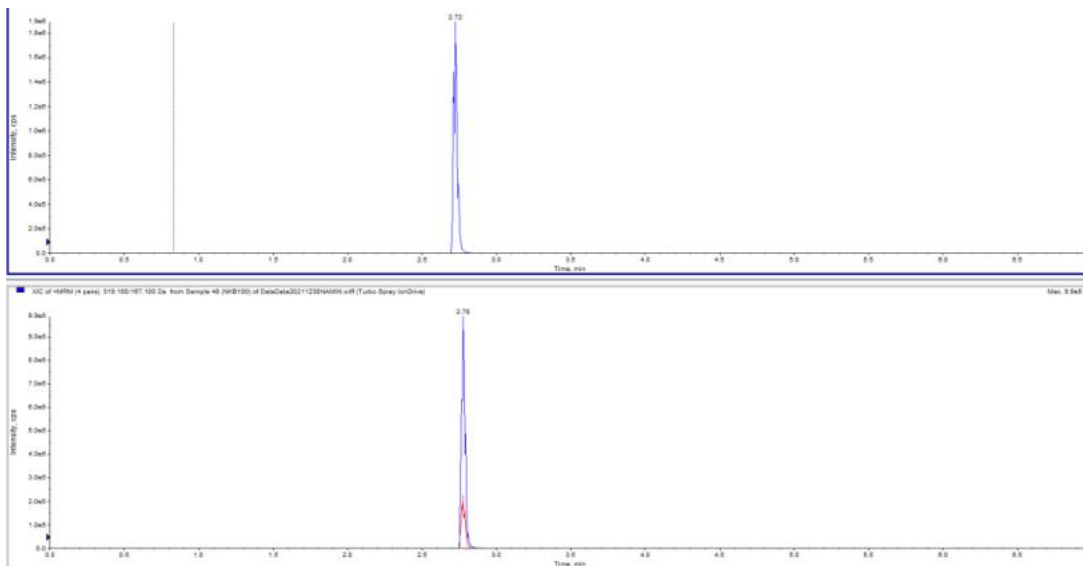


图 13 猪配合饲料阳性添加（添加浓度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）色谱图

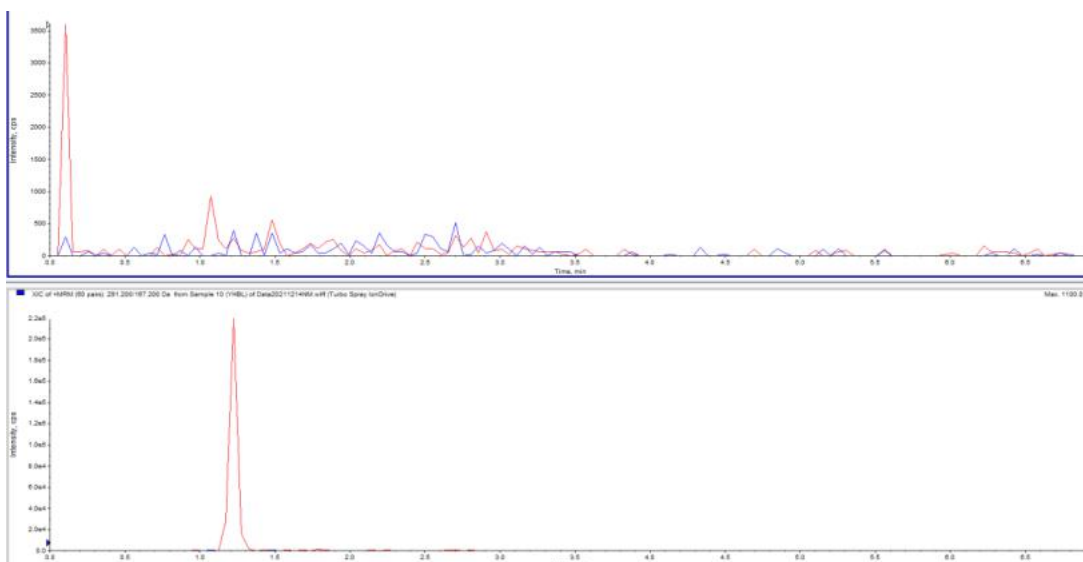


图 14 空白猪预混合饲料色谱图

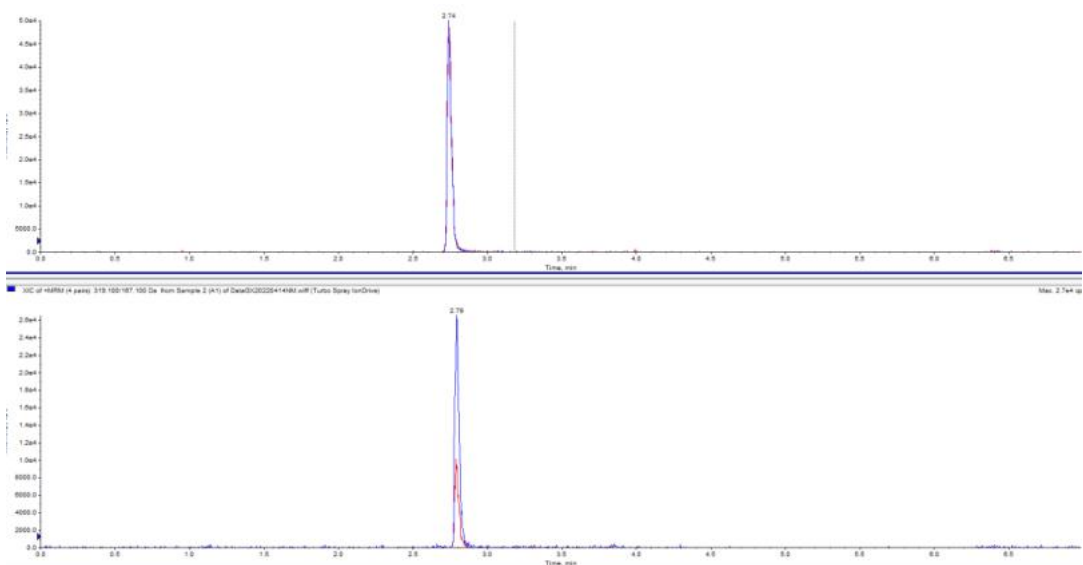


图 15 猪预混合饲料阳性添加（添加浓度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）色谱图

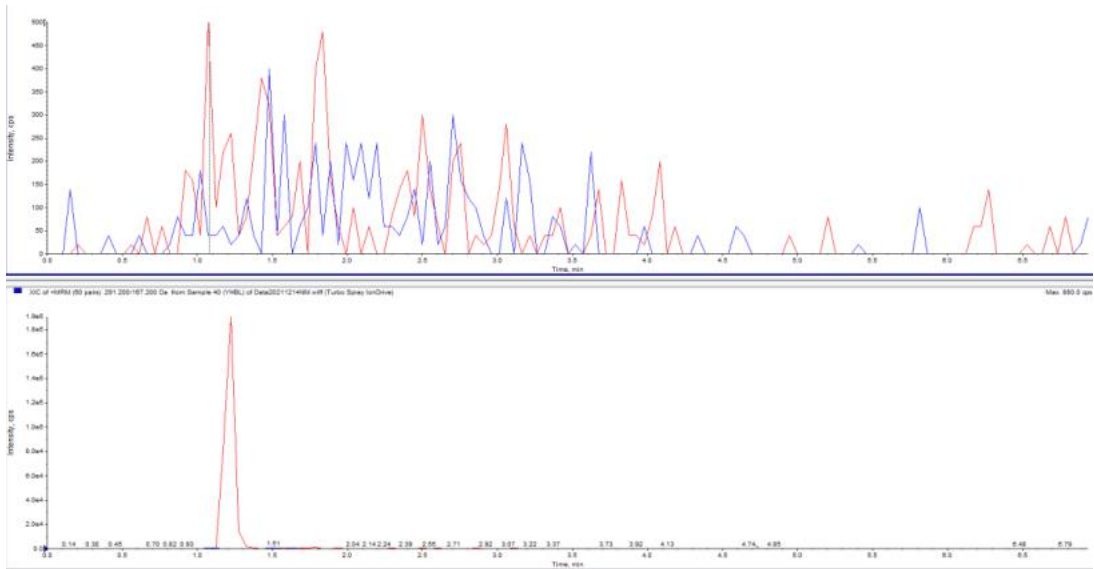


图 16 空白奶牛精料补充料色谱图

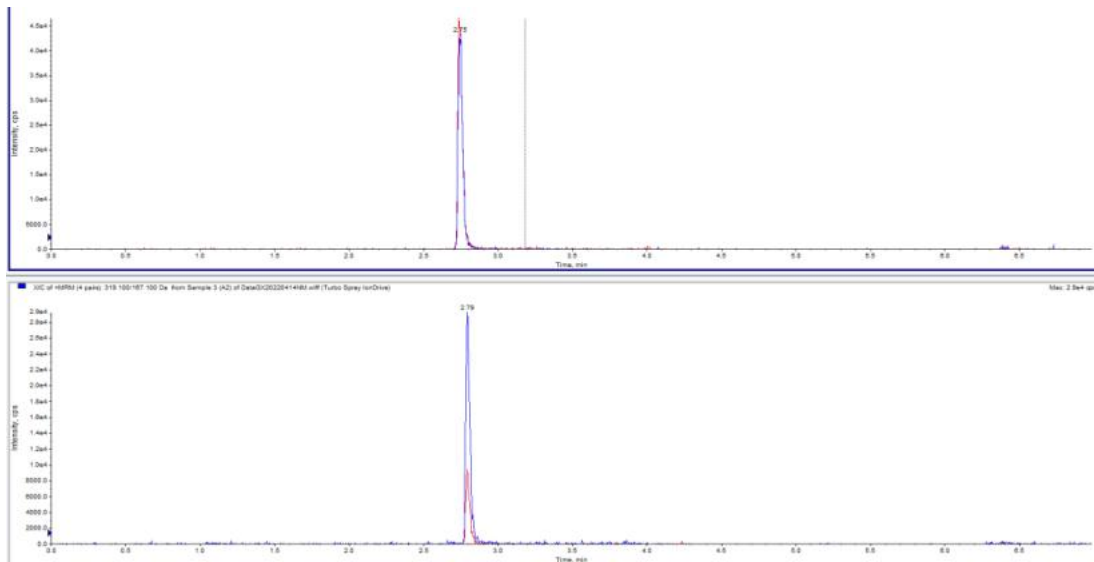


图 17 奶牛精料补充料阳性添加（添加浓度 10 µg/kg）色谱图

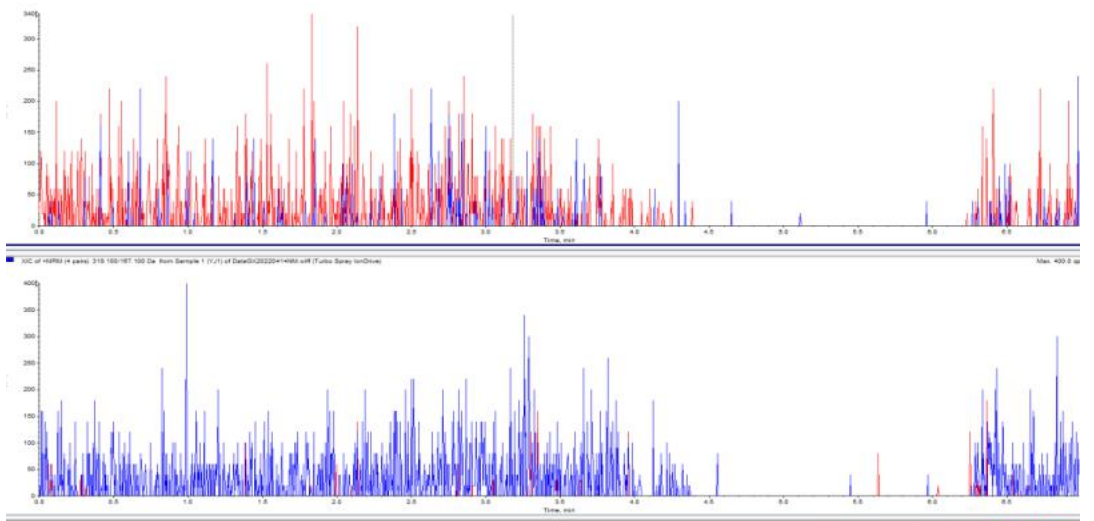


图 18 玉米载体空白色谱图

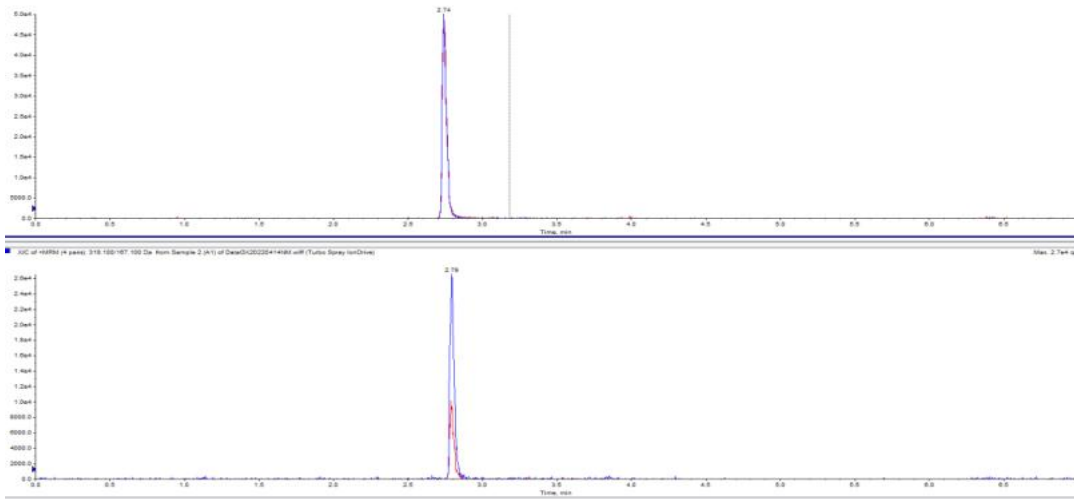


图 19 玉米载体阳性添加 (添加浓度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

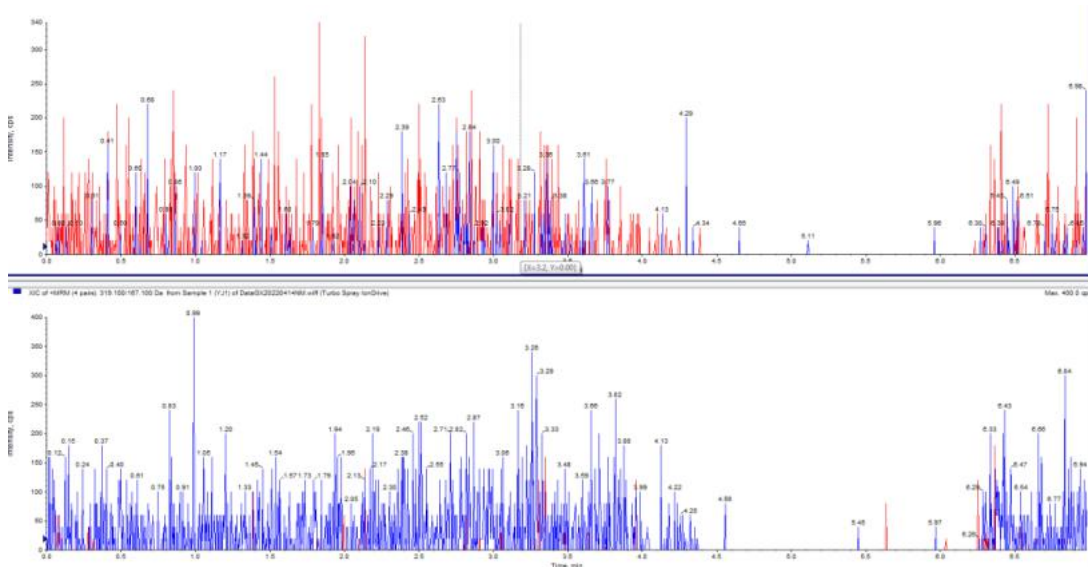


图 20 石粉载体空白色谱图

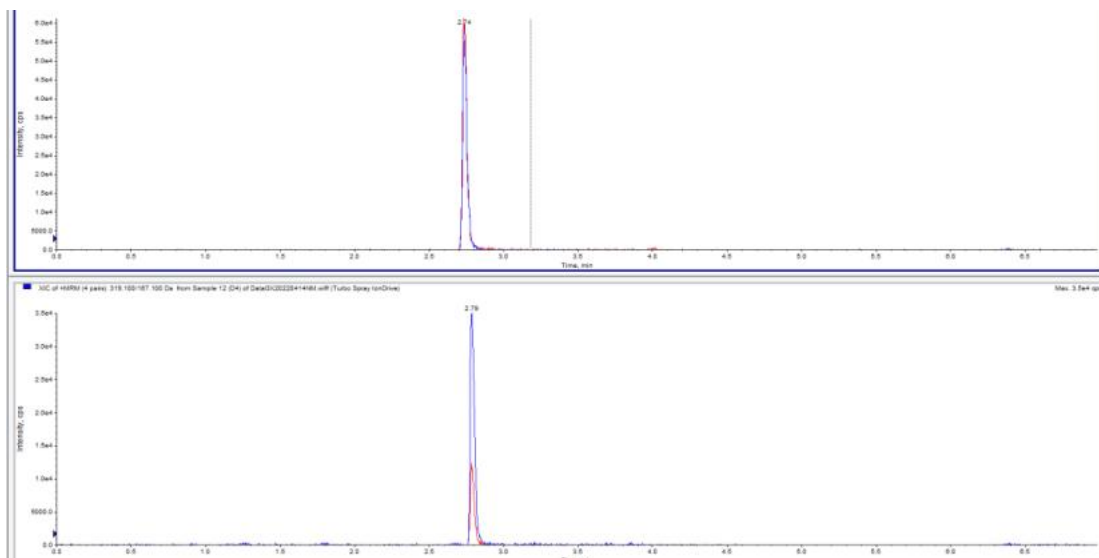


图 21 石粉载体阳性添加（添加浓度 10 μg/kg）色谱图

2.5 方法的回收率和重现性

精密称取各种饲料样品各 5 g，添加不同量氯苯那敏和溴苯那敏标准溶液制成含高、中、低浓度样品，按上述方法进行检测，每个样品 6 个重复，测得回收率和变异系数见表 5-13：由表可知，在添加水平，方法平均回收率为 84.2%~99.4%，相对标准偏差为小于 20%。

表 5 鸡配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
10.0	7.8	8.9	9.5	10.0	8.4	7.8	87.4	7.0	87.1	8.0
	7.9	9.3	8.1	7.6	7.6	10.0	84.2	5.3		
	10.2	8.5	10.1	8.0	8.9	8.0	89.6	9.5		
50.0	41.3	48.6	49.0	48.6	47.8	50.3	95.2	5.5	94.6	7.7
	53.9	54.1	53.4	42.9	47.0	39.7	97.0	8.2		
	37.9	50.3	47.3	51.9	40.7	46.7	91.6	8.9		
100.0	89.7	86.6	86.2	102.7	89.8	88.6	90.6	5.7	92.9	6.4
	104.6	89.1	87.0	96.2	101.9	79.5	93.0	6.2		

	100.5	98.2	82.0	96.7	95.4	98.2	95.2	6.2		
--	-------	------	------	------	------	------	------	-----	--	--

表 6 鸡预混合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
	10.0	9.9	10.1	10.1	9.0	7.9	8.1	91.7	4.0	91.5
10.7		9.5	9.1	7.8	8.8	8.2	90.4	8.3		
9.7		10.5	7.9	9.7	8.4	9.2	92.4	7.6		
100.0	47.4	38.7	51.9	41.9	38.4	39.7	86.0	9.3	89.6	7.3
	46.4	50.3	43.9	39.1	44.4	43.6	89.2	6.8		
	46.7	42.0	46.7	52.1	49.9	43.6	93.7	5.2		
5000.0	4400.6	4030.8	5301.7	4385.1	3972.4	4023.6	87.0	7.7	88.6	7.3
	5170.9	5127.3	4118.6	4112.9	3951.3	4224.3	89.0	10.3		
	5145.0	4561.9	4289.3	3952.0	4532.8	4447.7	89.8	7.3		

表 7 鸡浓缩饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
	10.0	7.6	8.8	9.0	10.2	9.2	10.2	91.4	6.7	92.5
8.2		9.7	9.6	8.4	8.1	10.4	90.4	6.8		
8.8		10.7	8.7	9.1	10.2	10.0	95.7	6.9		
50.0	41.3	49.8	41.0	46.0	50.7	49.4	92.7	6.8	93.1	6.5
	51.5	46.8	46.5	47.9	39.0	45.0	92.2	3.3		
	49.3	49.8	43.1	42.3	45.7	52.9	94.4	6.9		
1000.0	884.9	884.3	1017.2	806.8	852.7	1017.5	91.1	5.9	92.1	7.5
	1032.7	773.6	928.9	1063.2	914.9	765.3	91.3	9.8		
	966.3	911.5	897.4	1033.8	849.6	984.3	94.0	4.8		

表 8 猪配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变异 系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
	10.0	8.2	8.2	8.7	7.8	7.9	8.5	82.1	2.5	89.6
9.2		8.4	9.5	8.2	10.5	9.4	92.0	5.2		
10.1		10.8	8.5	10.7	8.3	8.4	94.6	7.6		
50.0	44.5	51.0	49.1	50.2	44.6	44.0	94.5	4.1	93.9	4.6
	42.6	52.9	47.3	48.5	47.2	44.7	94.4	5.8		

	47.7	44.8	49.8	46.9	45.0	44.5	92.9	2.9		
100.0	84.2	104.1	89.7	103.8	98.4	78.3	93.1	8.5	92.2	6.9
	85.0	79.6	90.9	86.8	101.2	89.1	88.8	3.3		
	86.6	103.8	94.7	95.9	89.7	97.7	94.7	4.6		

表 9 猪预混合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
10.0	8.8	9.7	10.4	10.2	9.4	8.1	94.6	5.3	93.6	8.1
	8.8	7.8	10.2	9.5	10.7	10.8	96.3	7.8		
	8.8	10.5	8.2	8.5	8.9	9.1	89.9	7.4		
50.0	50.4	47.8	54.4	40.9	41.9	48.9	94.7	8.0	95.3	6.7
	40.2	50.2	50.2	47.9	53.1	52.4	98.0	7.0		
	50.9	43.7	46.8	48.2	45.4	44.9	93.3	4.4		
5000.0	5074.7	4368.6	5169.4	3842.5	4267.5	5078.3	92.7	10.2	95.5	9.1
	5300.5	5332.2	4628.0	4624.3	4237.8	4014.4	93.8	6.9		
	5048.9	5391.0	4846.5	5367.8	4116.5	5276.7	100.2	4.3		

表 10 奶牛精料补充料添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
10.0	8.5	8.2	10.6	8.9	8.9	9.5	91.1	7.8	91.9	7.7
	9.7	7.7	9.0	8.3	10.1	10.0	91.4	6.7		
	10.6	8.2	10.0	10.0	9.0	8.1	93.1	7.3		
50.0	39.4	48.2	52.1	39.9	47.7	37.8	88.4	10.5	89.3	8.1
	49.0	49.9	49.9	44.5	38.5	40.0	90.6	3.8		
	42.4	50.4	46.2	42.9	40.0	45.2	89.0	5.7		
100.0	79.3	108.3	85.1	76.0	87.1	103.1	89.8	10.6	91.0	8.1
	83.8	99.8	104.2	91.4	100.4	98.6	96.4	7.2		
	78.8	91.4	84.1	82.7	89.9	94.7	86.9	3.6		

表 11 玉米载体添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
10.0	8.6	9.8	9.0	9.2	9.9	8.6	91.6	3.5	90.6	6.5

	8.9	9.0	8.3	8.3	9.8	8.0	87.2	3.4		
	8.4	8.6	8.1	10.8	10.1	9.8	93.0	9.1		
50.0	41.2	48.6	50.1	41.8	43.6	42.4	89.2	7.9	91.3	7.4
	42.5	53.1	47.4	42.4	41.7	51.6	92.9	7.8		
	52.7	45.5	39.4	42.9	49.2	45.5	91.8	7.9		
1000.0	100.5	91.5	92.2	79.3	96.4	92.4	92.1	5.8	92.3	4.6
	101.0	89.1	91.2	93.1	84.7	94.6	92.3	3.7		
	91.3	93.1	93.9	77.3	101.2	98.2	92.5	5.8		

表 12 石粉载体添加回收率试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)						批内平 均回收 率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间平 均回收 率 (%)	批间变 异系数 (%)
	10.0	8.2	9.1	10.0	10.3	10.4	10.5	97.4	7.7	95.7
10.7		8.2	9.6	9.0	9.8	9.2	94.3	7.7		
10.1		8.3	10.8	7.9	10.3	9.9	95.4	11.8		
50.0	52.3	44.2	50.3	52.5	49.4	41.8	96.8	5.6	92.2	9.1
	44.5	39.2	40.0	54.2	43.2	51.8	91.0	9.8		
	49.4	45.7	43.1	38.6	49.6	39.5	88.6	6.7		
100.0	100.6	79.3	94.1	88.5	96.5	86.4	90.9	6.7	89.4	7.0
	98.7	101.6	82.1	100.2	88.3	79.0	91.6	6.8		
	84.6	83.3	79.7	80.4	94.5	92.0	85.7	2.0		

2.6 实际样品测定

通过建立的上述方法对市场上采集的 50 批次不同类型的饲料样品进行检测, 在 30 份饲料样品中有 4 份样品检出氯苯那敏, 浓度为 2.37 $\mu\text{g/g}$ 、12.5 $\mu\text{g/kg}$, 50.8 $\mu\text{g/kg}$ 和 3.2%。1 份样品检出溴苯那敏, 浓度为 15.2 $\mu\text{g/kg}$ 。其余基质均未检出氯苯那敏和溴苯那敏。

三、实验验证的分析

2022 年 4 月, 标准编制小组委托广西饲料检测所、浙江饲料检测所和广东饲料检测中心完成本标准的复核验证工作。三家检测机构对本标准的复核验证结论为: 经试验验证, 采用《饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定》规定的方法能满足饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定要求, 标准曲线相关系数均可达 0.99, 方法检出限、定量限可达标准制修订单位规定的水平, 回收率、精密度符合 GB/T 27404-2008 和 GB/T 27417 的要求, 故该方法通过验证, 可作为饲料中氯苯那敏和溴苯那敏的测定标准方法。详见附件。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国际、国外无同类标准，未见同时测定饲料中的相关报道。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

无采标情况，无引用或采用国际国外标准情况。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等、严格执行国家强制性标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准的制定广泛征求意见，包括高校、科研院所、检验机构、生产企业，根据反馈意见对标准的《征求意见稿》进行修改，无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作；

十、其他应当说明的事项

无

参考文献：

[1] Xu W, Xia S, Pu J, *et al.* The antihistamine drugs carbinoxamine maleate and chlorpheniramine

maleate exhibit potent antiviral activity against a broad spectrum of influenza viruses[J].

Frontiers in Microbiology. 2018; 9:2643.

[2] Du F. Therapeutic effect of chlorpheniramine in treating upper airway cough syndrome (UACS) and chronic rhinitis/sinusitis[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018; 31:1679–82.

[3] Chong-Chi, Chiu, Kuo-Sheng, *et al.* Chlorpheniramine produces cutaneous analgesia in rats[J]. Pharmacological reports: PR, 2019.

[4] Lirk P, Hollmann MW, Strichartz G. The science of local anesthesia: basic research, clinical application, and future directions. Anesthesia & Analgesia. 2018; 126:1381–92.

[5] 刘芳, 高登慧, 欧德渊, 等. 两种组胺受体拮抗剂对高致病性猪蓝耳病临床症状的影响[J]. 贵州畜牧兽医, 2011, 35(03):13-17.

Liu Fang, Gao Denghui, Ou Deyuan, *et al.* Effects of Two Histamine Receptor Antagonists on Clinical Symptoms of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome(PRRS) [J]. Guizhou Animal Husbandry and Veterinary, 2011, 35(03):13-17. (in Chinese)

[6] 张楚珺, 欧德渊, 姚红艳, 等. 组胺受体拮抗剂对低致病性禽流感患鸡血液指标的影响[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(02):98-102.

ZHANG Chujun, OU Deyuan, YAO Hongyan, *et al.* Effect of histamine receptor antagonists on low pathogenic avian influenza hematology[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 49(02):98-102. (in Chinese)

[7] Ghandforoushan M, Zendehdel M, Babpour V. Interactions between Histamine H1 and H3 and Dopamine D1 Receptors on feeding behavior in chicken[J]. Iranian Journal of Veterinary Medicine . 2017.

[8] Zahra S B, Reza M, Mohammad S, *et al.* Effects of chlorpheniramine (histamine H1 receptor antagonist) on food and water intake in broiler chickens in hunger and satiety[J]. 2014.

[9] 宋玉清. 狂犬病免疫过敏反应临床救治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 28(01):106-107.

Song Yuqing. Clinical treatment of rabies immune allergic reaction[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Abstracts, 2012, 28(01):106-107. (in Chinese)

- [10] 王京, 叶佳明, 王潇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽产品中 15 种镇静类药物残留[J]. 农产品加工, 2020(07):45-49. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2020.04.012.
WANG Jing, YE Jiaming, WANG Xiao, *et al.* CHEN Qingjun2 Determination of 15 Sedative Drugs Residues in Livestock and Poultry Meat by UPLC- MS/MS[J]. Agricultural Products Processing, 2020(07):45-49. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2020.04.012. (in Chinese)
- [11] Adedapo A, Ademowo O G, Adedapo K S, *et al.* Potential toxicity of Chlorpheniramine plus chloroquine for the treatment of childhood malaria[J]. Nigerian Journal of Clinical Practice, 2009, 12(3):252-7.
- [12] Hua Y M, Hung C H, Yuh Y S. Acute intoxication of lidocaine and chlorpheniramine: report of one case[J]. Taiwan Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih , 2005, 46(6):385-387.
- [13] 曾巧英. 过量服用氯苯那敏死亡用药分析 1 例[J]. 医师在线, 2020, 10(16):2.
Zeng Qiaoying. Analysis of a fatal drug use case of overdose of chlorpheniramine[J]. Physician Online, 2020, 10(16):2 (in Chinese)
- [14] Bachute M T, Shanbhag S V, Turwale S L. Simultaneous determination of four active pharmaceuticals in tablet dosage form by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2019, 18(10): 2161-2166.
- [15] Nezhadali A, Shapouri M R, Amoli-Diva M, *et al.* Method development for simultaneous determination of active ingredients in cough and cold pharmaceuticals by high performance liquid chromatography[J]. Heliyon, 2019, 5(12): e02871.
- [16] 刘凯双, 闫研, 殷果, 等. HPLC 法同时测定复方金刚烷胺氨基比林片中氨基比林和马来酸氯苯那敏的含量及含量均匀度[J]. 中国药品标准, 2021, 22(02):164-170.
DOI:10.19778/j.chp.2021.02.013.
LIU Kaishuang, YAN Yan, YIN Guo, *et al.* HPLC determination of content and content uniformity of aminopyrine and chlorphenamine maleate in Compound Amantadine Aminopyrine Tablets[J]. Chinese Drug Standards, 2021, 22(02):164-170. DOI:10.19778/j.chp.2021.02.013. (in Chinese)
- [17] 沈晓燕, 刘晓瑜, 邱海强. HPLC 法测定感冒灵胶囊中 5 种有效成分的含量[J]. 药学研究, 2021, 40(03):171-175. DOI:10.13506/j.cnki.jpr.2021.03.007.

SHEN Xiaoyan, LIU Xiaoyu, QIU Haiqiang. Determination of five active ingredients in Ganmaoling Capsules by HPLC[J]. *Pharmaceutical Research*, 2021, 40(03):171-175.

DOI:10.13506/j.cnki.jpr.2021.03.007. (in Chinese)

- [18] Hassani S A M. Simultaneous Determination of Active Ingredients in Multicomponent Common Over the Counter Tablets in the Presence of Parabens and 4-Aminophenol by HPLC[J]. *Chromatographia*, 2020, 83(7):791-805.
- [19] Ali A, U Farooq, Ahmed M, *et al.* Stability-indicating RP-HPLC assay for simultaneous determination of chlorpheniramine maleate and prednisolone in veterinary injection[J]. *Acta Chromatographica*, 2019, 32(2):1-6.
- [20] Zhao S, Li D, Qiu J, *et al.* Simultaneous determination of amantadine, rimantadine and chlorpheniramine in animal-derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after fast sample preparation[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(17):7062-7067.
- [21] 孙会会, 袁明俊, 杜鸿雁, 等. 超快速液相色谱-串联质谱法测定人血中的氯苯那敏[J]. *刑事技术*, 2020, 45(01):55-59. DOI:10.16467/j.1008-3650.2020.01.011.
- SUN Huihui, YUAN Mingjun, DU Hongyan, *et al.* Determination of Chlorpheniramine in Human Plasma by Ultra Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Criminal Technology*, 2020, 45(01):55-59. DOI:10.16467/j.1008-3650.2020.01.011. (in Chinese)
- [22] Ioutsis A N, Ioutsis V A, Shapovalova E N, *et al.* Determination of Pharmacologically Active Nitrogen-Containing Compounds on Silica Doubly Modified with 6,10-Ionene and Dextran Sulphate by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 75(7):930-935.
- [23] Yanru Liu, Bolin Zhu, Mengyao Xue, *et al.* Studies on the chiral separation of pheniramine and its enantioselective pharmacokinetics in rat plasma by HPLC-MS/MS, *Microchemical Journal*, 2020(156), 104989, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104989>.
- [24] Huiya Yuan, Shihui Yu, Guihong Chai, *et al.* An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of the cystic fibrosis therapeutic drugs colistin, ivacaftor and ciprofloxacin[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11(06):732-738.
- [25] Lisa Strasser, Giorgio Oliviero, Craig Jakes, *et al.* Detection and quantitation of host cell proteins in monoclonal antibody drug products using automated sample preparation and data-independent

acquisition LC-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 11(06):726-731.

- [26] 刘静, 王震红, 王晓黎, 等. LC-MS 快速检测降糖类中成药中 14 种非法添加化学药物[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23):3009-3014. DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.015.
LIU Jing, WANG Zhenhong, WANG Xiaoli, *et al.* Rapid Detection of 14 Chemical Drugs Illegally Added in Antidiabetic Traditional Chinese Medicine by LC-MS[J]. China Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(23):3009-3014. DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.015.
(in Chinese)
- [27] Fanlin Kong, Yuan Li, Qiyu Diao, *et al.* The crucial role of lysine in the hepatic metabolism of growing Holstein dairy heifers as revealed by LC-MS-based untargeted metabolomics[J]. Animal Nutrition, 2021, 7(04):1152-1161.
- [28] 张筱, 隋海山, 李现菊, 等. HPLC-DAD 法同时测定复方甘草片中 3 种有效成分和 5 种防腐剂[J]. 中成药, 2022, 44(02):376-380.
ZHANG Xiao, SUI Hai-shan, LI Xian-ju, *et al.* Simultaneous determination of three effects constituents and five preservatives in Compound Gancao Tablets by HPLC-DAD[J]. Chinese Patent Medicine, 2022, 44(02):376-380. (in Chinese)
- [29] 孙文闪、周婷婷、诸俊杰, 等. 固相萃取净化超高液相色谱-串联质谱测定鱼粉中的组胺[J]. 粮食与饲料工业, 2020, No.392(03):69-73.
SUN Wen-shan, ZHOU Ting-ting, ZHU Jun-jie, *et al.* Determination of Histamine in Fish meal by SPE UPLC-MS/MS[J]. Food and Feed Industry, 2020, No.392(03):69-73. (in Chinese)
- [30] 孙树周, 何燕莉, 陈泳恩, 等. 液相色谱-串联质谱法测定凉茶中非法添加的 26 种止咳平喘类化学药物[J]. 今日药学, 2021, 31(3):5.
SUN Shuzhou, HE Yanli, CHEN Yongen, *et al.* Determination of 26 Chemical Drugs for the Treatment of Cough and Asthma Added Illegally in Herbal Tea by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. Pharmacy Today, 2021, 31(3):5. (in Chinese)
- [31] 兰文, 李昌亮, 黄海. 高效液相色谱法测定复方锌布颗粒中马来酸氯苯那敏和布洛芬的含量与有关物质[J]. 中南药学, 2015(9):4.

LAN Wen, LI Chang-liang, HUANG Hai. RP-HPLC determination of the content and related substances of chlorphenamine maleate and ibuprofen in compound zinc gluconate and ibuprofen granules [J]. Zhongnan Pharmacy, 2015(9):4. (in Chinese)

[32] 虞雪军, 杨婷婷, 吴珍, 等.液相串联质谱法测定婴幼儿护肤品中 28 种抗组胺药物[J]. 药品评价, 2021, 18(24):1493-1496. DOI:10.19939/j.cnki.1672-2809.2021.24.05.

YU Xuejun, Y ANG Tingting, WU Zhen, et al. Measurement of 28 Antihistamines in Infant Skin Care Products by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. Drug Evaluation, 2021, 18(24):1493-1496. DOI:10.19939/j.cnki.1672-2809.2021.24.05. (in Chinese)

[33] 郭倩倩,荆辉. HPLC 测定复方锌布颗粒剂中马来酸氯苯那敏含量及含量均匀度[J]. 微量元素与健康研究, 2020, 37(6):3.