

DB33

浙江省地方标准

DB33/T 623—2006

动物尿液中特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺残留量的测定 气相色谱-质谱法

Determination of the residues of terbutaline, clenbuterol, salbutamol
and ractopamine in animal urine—
Gas chromatography-mass spectrometry method

2006-12-14 发布

2007-01-14 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准是在参阅了国内外文献的基础上，根据我国技术发展水平研究制定的，建立了气相色谱-质谱法测定动物尿液中特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺等4种 β_2 -兴奋剂残留的方法。

本标准附录A和附录B为资料性附录。

本标准由浙江省农业厅提出并归口。

本标准起草单位：浙江省畜产品质量安全检测中心、浙江省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：朱聪英、吴平谷、应永飞、陆春波、任玉琴、陈勇、林仙军、周文海、赵永信。

动物尿液中特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺 残留量的测定 气相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了气相色谱-质谱(GC-MS)法测定动物尿液中特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺等4种 β_2 -兴奋剂残留量的方法。

本标准适用于猪、牛、羊等动物尿液中特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺等4种 β_2 -兴奋剂残留量的测定。

本方法检测限为：特布他林1.0 $\mu\text{g/L}$ 、克伦特罗2.0 $\mu\text{g/L}$ 、沙丁胺醇1.0 $\mu\text{g/L}$ 、莱克多巴胺2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

试样加入内标物，调节pH值至2.0后，过阳离子交换固相萃取柱，氮气吹干，与N，O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)进行衍生化反应，于气相色谱-质谱仪上进行测定。内标法定量。

4 试剂和溶液

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验室用水为去离子水，应符合GB/T 6682二级水的规定。

4.1 甲醇。

4.2 乙酸乙酯：色谱纯。

4.3 氨水。

4.4 盐酸。

4.5 2mol/L 盐酸溶液：取盐酸(4.4)18mL，加水至100mL，摇匀，即得。

4.6 30mmol/L 盐酸溶液：取2mol/L 盐酸溶液(4.5)3mL，加水至200mL，摇匀，即得。

4.7 无水硫酸钠：450 $^{\circ}\text{C}$ 干燥12h，备用。

4.8 甲苯：色谱纯

4.9 衍生剂：N，O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)。

4.10 4%氨水/乙酸乙酯溶液：取氨水(4.3)4mL加乙酸乙酯(4.2)至100mL，超声15min，充分混匀，即配即用。

4.11 SLS阳离子交换固相萃取柱¹⁾：每根柱填料量为400mg，柱体积5mL。

4.12 标准品：特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺，纯度 $\geq 98\%$ 。

4.13 同位素内标物溶液：D₉-克伦特罗100 $\mu\text{g/mL}$ ，D₃-沙丁胺醇100 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.14 β_2 -兴奋剂标准储备液：取特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺标准品(4.12)10mg，精密称定，分别置100mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，其浓度均为0.1mg/mL，置-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱中保存，有效期为6个月。

1) SLS 阳离子交换固相萃取柱是由杭州富裕科技服务有限公司提供的产品的商品名称，给出这一信息是为了给本标准的使用者提供方便，而不是主管部门对这一产品的认可。

4.15 β_2 -兴奋剂混合标准工作液：分别准确吸取适量的 β_2 -兴奋剂标准储备液（4.15）于同一容量瓶中，用甲醇稀释成含特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作液，置 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，有效期为 1 个月。

4.16 β_2 -兴奋剂内标工作液：分别准确吸取适量的 β_2 -兴奋剂同位素内标物（4.14）于同一容量瓶中，用甲醇稀释成含D₉-克伦特罗、D₃-沙丁胺醇均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合内标工作液，置 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，有效期为 1 个月。

5 仪器设备

- 5.1 气相色谱-质谱仪：配有电子轰击（EI）源。
- 5.2 离心机：最大转速 5000r/min 或以上。
- 5.3 固相萃取装置。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 分析天平：感量 0.00001g。
- 5.6 烘箱。
- 5.7 离心管：10mL。
- 5.8 氮吹仪。
- 5.9 pH 计。
- 5.10 具塞玻璃试管：5mL，10mL。
- 5.11 移液器：量程 20 μL ~200 μL ，100 μL ~1000 μL 。

6 测定步骤

6.1 试样制备

采集的尿液应保存于4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，尿液有如有混浊，应经离心处理，备用。

6.2 试样净化

准确量取试样5mL至10mL离心管中，加 β_2 -兴奋剂内标工作液（4.16）50 μL ，用2mol/L盐酸溶液（4.5）调节pH值至2.0，5000r/min离心5min，试样液备用。

依次用甲醇5mL、水5mL、30mmol/L盐酸溶液（4.6）5mL润洗阳离子交换固相萃取柱（4.11）；取试样液上柱，并依次用水5mL、甲醇5mL淋洗柱子，抽干；用4%氨水/乙酸乙酯溶液（4.10）10mL洗脱，收集洗脱液，经无水硫酸钠（4.7）脱水，50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干；残余物中加乙酸乙酯5mL，置于超声波清洗器中超声5min，5000r/min离心5min，取上清液至5mL具塞玻璃试管中，50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干，吹干物备用。

6.3 衍生化

吹干物加入甲苯（4.8）100 μL 和衍生剂（4.9）100 μL ，加塞后于涡旋混合器充分混匀，在80 $^{\circ}\text{C}$ ±5 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中恒温衍生60min，氮气吹干，加甲苯0.5mL溶解供GC-MS分析。

另取 β_2 -兴奋剂混合标准工作液（4.15）适量，加 β_2 -兴奋剂内标工作液（4.16）50 μL ，加乙酸乙酯5mL后，氮气吹干，与试样同步进行衍生化。

6.4 测定

6.4.1 色谱条件

色谱柱：5%苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)，或具同等性能的色谱柱；
进样口温度：280 $^{\circ}\text{C}$ ；

柱温程序：初温120 $^{\circ}\text{C}$ ，保持3 min，然后以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至230 $^{\circ}\text{C}$ ，保持5min，再以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至280 $^{\circ}\text{C}$ 保持3min；

载气：高纯氮气（99.999%）；

流速：1.0mL/min，不分流进样；

进样量：2.0 μL 。

6.4.2 质谱条件

EI源：源温230℃；
 电子能量：70eV；
 接口温度：280℃；
 电子倍增器电压：高于调谐电压200V；
 质量扫描范围：30~550U；
 溶剂延迟：10min；
 选择离子监测方式（SIM）。

监测离子（m/z）：特布他林86、356*、426；克伦特罗86*、262、243；沙丁胺醇369*、440、207；
 莱克多巴胺179、250*、502；D₉-克伦特罗95*、262；D₃-沙丁胺醇372*、443；其中带*离子为定量离子。
 分三段进行采集，特布他林、克伦特罗、D₉-克伦特罗为第I阶段，沙丁胺醇、D₃-沙丁胺醇为第II阶段
 莱克多巴胺第III阶段，详见表1。在上述色谱条件下，标准物质总离子流图参见附录A；标准物质质谱
 图参见附录B。

表1 4种β₂-兴奋剂和2种内标物的采集阶段和质谱条件

药物名称	采集阶段	选择离子（m/z）	定量离子（m/z）
特布他林	I	356, 86, 426	356
克伦特罗	I	86, 243, 262	86
D ₉ -克伦特罗	I	95, 262	95
沙丁胺醇	II	369, 207, 440	369
D ₃ -沙丁胺醇	II	372, 443	372
莱克多巴胺	III	250, 179, 502	250

6.4.3 气相色谱-质谱测定

6.4.3.1 定性测定

在相同试验条件下，试样中待测物与同时检测的标准物质的保留时间之差在±2s之内，并且所选择的离子相对丰度比符合表2要求，可判定为试样中存在该药物残留。

表2 试样离子丰度比与标准物质离子丰度比的允许偏差范围

占基峰相对丰度（%）	最大允许偏差（%）
>50	±10
>20~50	±15
>10~20	±20
≤10	±50

6.4.3.2 定量测定

以峰面积按内标法进行单点或多点校准定量，标准工作液和试样液中药物响应值均应在仪器检测线性范围内。

以D₉-克伦特罗（m/z 95）作为计算克伦特罗（m/z 86）和莱克多巴胺（m/z 250）浓度的内标物，
 以D₃-沙丁胺醇（m/z 372）作为计算特布他林（m/z 356）和沙丁胺醇（m/z 369）浓度的内标物。

7 结果计算

按内标法单点或多点校准计算试样中4种β₂-兴奋剂的含量。

试样中4种β₂-兴奋剂的含量按下式计算：

$$X = \frac{A}{V} \times D$$

式中：

X ——试样中 β_2 -兴奋剂各组分的含量， $\mu\text{g/L}$ ；

A ——试样色谱峰对应的 β_2 -兴奋剂组分的质量， ng ；

V ——试样体积， mL ；

D ——稀释倍数。

计算结果保留 3 位有效数字。

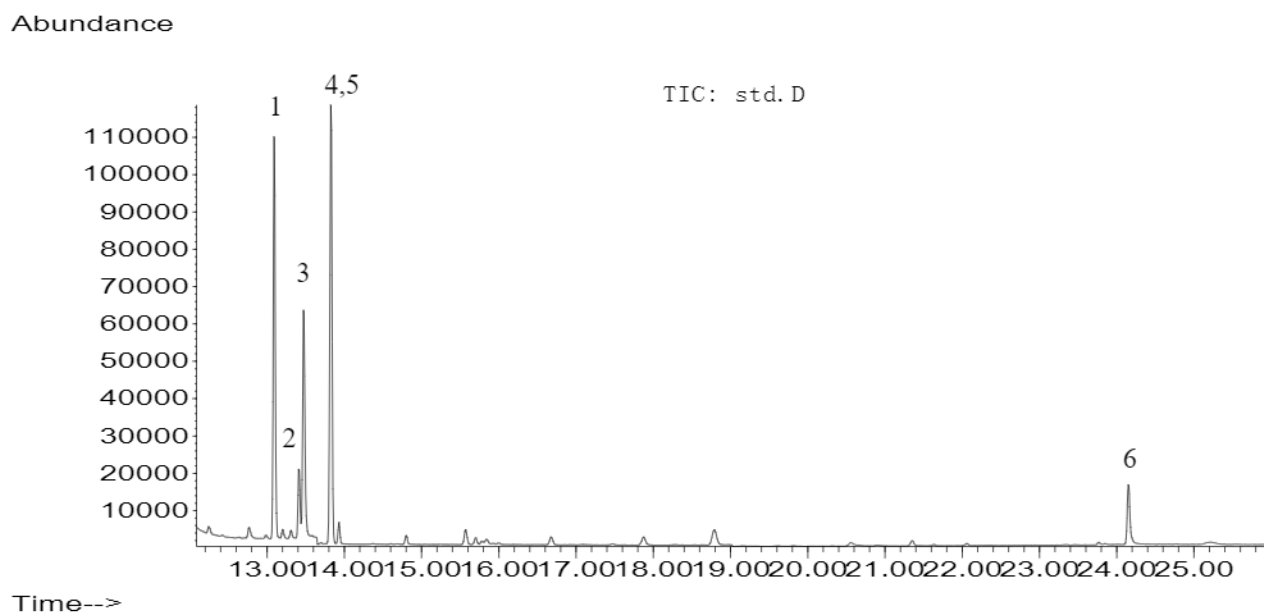
8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与算术平均值之比应不大于 20%。

9 回收率

本方法回收率在 60%~130%之间。

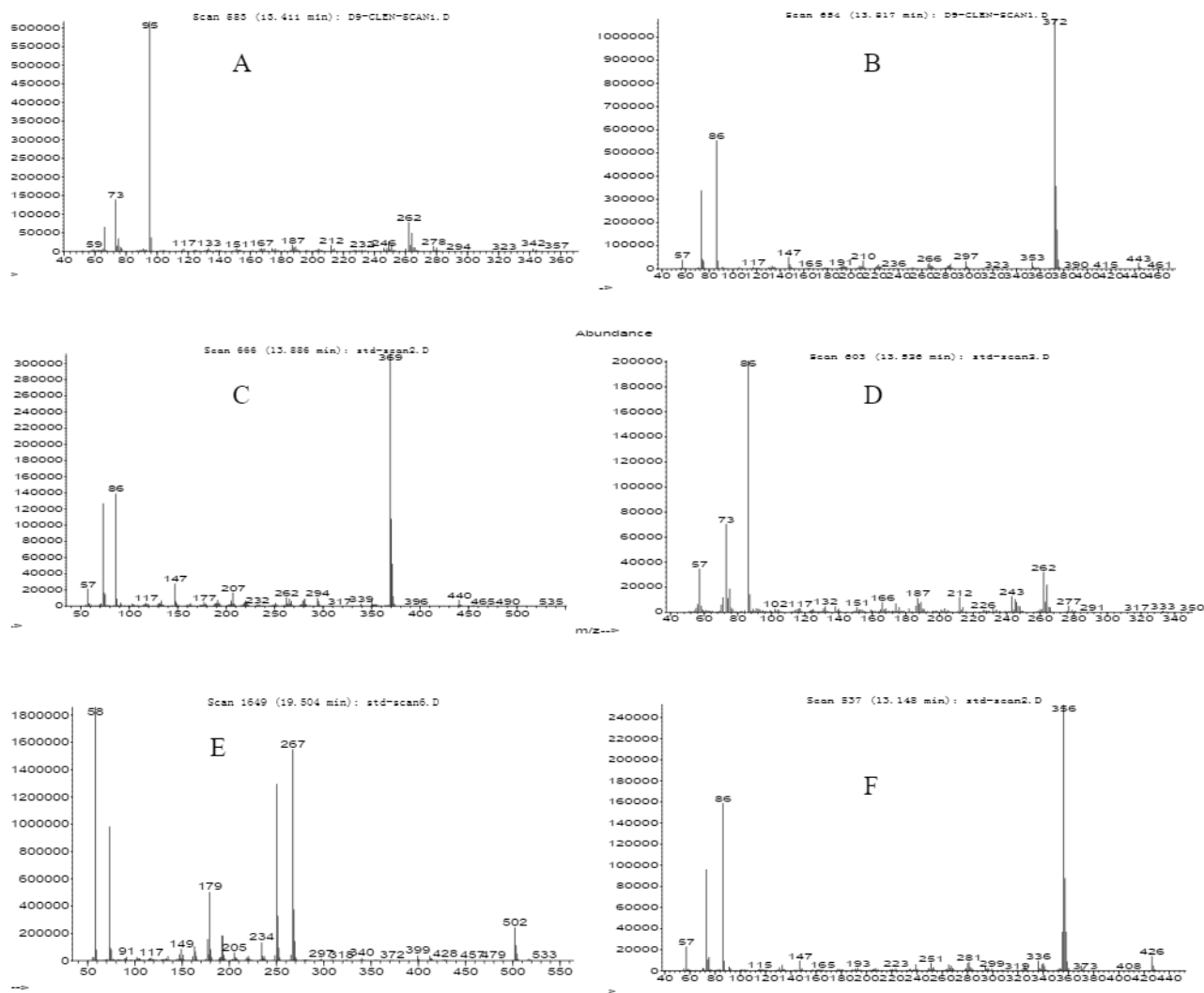
附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图



图A.1 β_2 -兴奋剂和内标物衍生物的总离子流 (TIC) 图

1. 特布他林 (13.09min) , 2. D₉-克伦特罗 (13.41min) , 3. 克伦特罗 (13.47min) ,
- 4.沙丁胺醇 (13.83min) , 5.D₃-沙丁胺醇 (13.82min) , 6.莱克多巴胺 (24.15min)

附录 B
(资料性附录)
标准物质质谱图



图B.1 β_2 -兴奋剂和内标物衍生物的质谱图 (EI源)

A. D₉-克伦特罗, B. D₃-沙丁胺醇, C.沙丁胺醇, D.克伦特罗, E.莱克多巴胺, F.特布他林