

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3146—2017

动物尿液中22种 β -受体激动剂的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 22 β -agonists in animal urines—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2017-12-22 发布

2018-06-01 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—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

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)]。

本标准主要起草人:王培龙、索德成、范理、王瑞国、李阳、张维、宋荣、张苏、苏晓鸥、李宏、周炜、冯三令、耿士伟、黄土新。

动物尿液中 22 种 β -受体激动剂的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物尿液中 22 种 β -受体激动剂含量测定的液相色谱-串联质谱方法。

本标准适用于猪尿液、牛尿液和羊尿液中克仑特罗(Clenbuterol)、沙丁胺醇(Salbutamol)、莱克多巴胺(Ractopamine)、齐帕特罗(Zilpaterol)、氯丙那林(Clorprenaline)、特布他林(Terbutaline)、西马特罗(Cimaterol)、西布特罗(Cimbuterol)、马布特罗(Mabuterol)、溴布特罗(Brombuterol)、班布特罗(Bambuterol)、克仑普罗(Clenproperol)、妥布特罗(Tulobuterol)、利托君(Ritodrine)、沙美特罗(Salmeterol)、喷布特罗(Penbuterol)、马喷特罗(Mapenterol)、福莫特罗(Formoterol)、苯乙醇胺 A(Phenylethanolamine A)、异克舒令(Isoxsuprine)、克伦塞罗(Clencyclohexerol)、拉贝特罗(Labetalol) 22 种 β -受体激动剂的测定。

本标准方法检出限为 $0.1 \mu\text{g/L}$ ，定量限为 $0.2 \mu\text{g/L}$ 。

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

3 原理

尿液样品经酶解处理后，用混合型阳离子固相萃取柱净化、吹干、稀释液溶解，液相色谱-串联质谱仪检测，内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯试剂，实验室用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

- 4.1 甲醇：色谱纯。
- 4.2 甲酸：色谱级。
- 4.3 乙腈：色谱纯。
- 4.4 试样稀释液：取甲酸(4.2) 0.1 mL，乙腈 10 mL，与 90 mL 水混匀。
- 4.5 氨水甲醇溶液：取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。
- 4.6 高氯酸溶液：取 30 mL 高氯酸与 70 mL 水混合。
- 4.7 0.2 mol/L 乙酸铵提取液(pH=5.2)：取乙酸铵 15.4 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL，用冰乙酸调 pH 至 5.2。
- 4.8 氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠 10 g，溶于 100 mL 水中。
- 4.9 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶，活性 $\geq 85\ 000$ U/mL。
- 4.10 β -受体激动剂对照品(克仑特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、齐帕特罗、氯丙那林、特布他林、西马特罗、西布特罗、马布特罗、溴布特罗、班布特罗、克仑普罗、妥布特罗、利托君、沙美特罗、喷布特罗、马喷特罗、福莫特罗、苯乙醇胺 A、异克舒令、克伦塞罗、拉贝特罗)、 β -受体激动剂内标对照品(氯丙那林-D7、西马特罗-D7、西布特罗-D9、沙丁胺醇-D3、马布特罗-D9、克仑普罗-D7、莱克多巴胺-D3、克仑特罗-D9、苯乙醇胺 A-D3、沙美特罗-D3)：纯度 $\geq 97\%$ 。

- 4.11 β -受体激动剂标准储备液:精密称取各种 β -受体激动剂对照品至棕色容量瓶中,用甲醇(4.1)配成浓度各为1 mg/mL的标准储备液,2℃~8℃冷藏保存,有效期12个月。
- 4.12 β -受体激动剂标准工作液:分别吸取各种 β -受体激动剂标准储备液(4.10),用0.2%甲酸水溶液(4.3)稀释成浓度为1 μ g/mL的标准工作液。2℃~8℃冷藏保存,有效期3个月。
- 4.13 β -受体激动剂内标储备液:精密称取各种 β -受体激动剂内标对照品至棕色容量瓶中,用甲醇(4.1)配成浓度各为1 mg/mL的标准储备液,2℃~8℃冷藏保存,有效期12个月。
- 4.14 β -受体激动剂内标工作液:分别吸取各种 β -受体激动剂内标储备液,用0.2%甲酸水溶液(4.3)稀释成浓度为1 μ g/mL的标准工作液。2℃~8℃冷藏保存,有效期3个月。
- 4.15 氮气:纯度99.9%。
- 4.16 固相萃取小柱:混合型阳离子交换柱(3 mL,60 mg),或其他性能类似的小柱。
- 4.17 滤膜:0.22 μ m,有机系。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱串联质谱仪:配有电喷雾电离源。
- 5.2 氮吹仪或旋转蒸发仪。
- 5.3 离心机:转速不低于8 000 r/min。
- 5.4 涡旋振荡器。
- 5.5 恒温水浴摇床。
- 5.6 固相萃取装置。
- 5.7 天平:感量0.000 01 g。

6 试样的保存

样品应置于-18℃保存,测试有效期不超过3个月,分析前放置至室温,如有浑浊,离心后取上清液备用。

7 分析步骤

7.1 酶解

精确吸取试样10 mL于50 mL离心管中,用高氯酸溶液(4.6)或氢氧化钠溶液(4.8)调节试样pH至5~7之间。准确加入10 mL乙酸铵溶液(4.7)、50 μ L β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶和10 μ L内标工作液(4.14)。涡旋混合30 s,于37℃振荡水解过夜(应大于16 h),加入1.0 mL高氯酸溶液(4.6),涡旋混合30 s,然后于8 000 r/min离心5 min,上清液备用。

7.2 净化

固相萃取小柱依次用3 mL甲醇、3 mL水活化。取适量或全部上清液过柱,用3 mL水和3 mL甲醇淋洗,抽干,用3 mL氨水甲醇溶液(4.5)洗脱,收集洗脱液。洗脱液用氮吹仪在50℃条件下吹干,用1.0 mL样品稀释液(4.4)溶解,过0.22 μ m滤膜。如检测含量超出线性范围(1.0 μ g/L~100 μ g/L),应适当减少过固相萃取小柱的溶液量,将上机溶液所含药物的浓度稀释至线性范围(1.0 μ g/L~100 μ g/L)内上样。

7.3 参考液相色谱条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长150 mm,内径3.0 mm,粒径1.7 μ m(或其他效果等同的C₁₈柱)。

柱温:30℃。

进样量:10 μ L。

流动相及参考梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相及参考梯度洗脱程序

| 时间, min | 流速, mL/min | 0.1%甲酸溶液, % | 乙腈, % |
|---------|------------|-------------|-------|
| 0 | 0.3 | 95 | 5 |
| 1.0 | 0.3 | 95 | 5 |
| 2.0 | 0.3 | 80 | 20 |
| 6.0 | 0.3 | 70 | 30 |
| 7.0 | 0.3 | 10 | 90 |
| 8.0 | 0.3 | 10 | 90 |
| 9.1 | 0.3 | 95 | 5 |
| 10 | 0.3 | 95 | 5 |

7.4 参考质谱条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子模式。

检测方式:多反应监测。

脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

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。

定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 22 种 β -受体激动剂及内标的定性离子对、定量离子对及锥孔电压、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 | 锥孔电压, V | 碰撞能量, eV |
|-------|---------------|---------------|---------|----------|
| 氯丙那林 | 213.9 > 153.9 | 213.9 > 153.9 | 26 | 32 |
| | 213.9 > 90.9 | | | 16 |
| 西马特罗 | 220.1 > 202.1 | 220.1 > 202.1 | 23 | 16 |
| | 220.1 > 160.0 | | | 10 |
| 特布他林 | 226.0 > 152.0 | 226.0 > 152.0 | 25 | 20 |
| | 226.0 > 170.0 | | | 20 |
| 妥布特罗 | 228.0 > 154.0 | 228.0 > 154.0 | 26 | 20 |
| | 228.0 > 172.0 | | | 20 |
| 西布特罗 | 234.0 > 160.0 | 234.0 > 216.0 | 25 | 15 |
| | 234.0 > 216.0 | | | 9 |
| 沙丁胺醇 | 240.0 > 148.0 | 240.0 > 148.0 | 25 | 20 |
| | 240.0 > 222.0 | | | 10 |
| 齐帕特罗 | 262.2 > 185.0 | 262.2 > 185.0 | 24 | 24 |
| | 262.2 > 244.0 | | | 13 |
| 克仑普罗 | 263.1 > 203.1 | 263.1 > 203.1 | 22 | 18 |
| | 263.1 > 245.2 | | | 11 |
| 克仑特罗 | 277.0 > 203.0 | 277.0 > 203.0 | 25 | 20 |
| | 277.0 > 259.0 | | | 10 |
| 利托君 | 288.0 > 150.0 | 288.0 > 150 | 19 | 20 |
| | 288.0 > 121.2 | | | 20 |
| 喷布特罗 | 292.2 > 236.2 | 292.2 > 236.2 | 22 | 20 |
| | 292.2 > 209.2 | | | 15 |
| 异克舒令 | 302.0 > 150.0 | 302.0 > 150 | 22 | 20 |
| | 302.0 > 107.0 | | | 20 |
| 莱克多巴胺 | 302.2 > 163.9 | 302.2 > 163.9 | 20 | 16 |
| | 302.2 > 284.2 | | | 12 |

表 2 (续)

| 被测物名称 | 定性离子对, m/z | 定量离子对, m/z | 锥孔电压, V | 碰撞能量, eV |
|------------|---------------|---------------|---------|----------|
| 马布特罗 | 310.9 > 236.9 | 310.9 > 236.9 | 30 | 24 |
| | 310.9 > 216.9 | | | 16 |
| 克伦塞罗 | 319.1 > 202.9 | 319.1 > 202.9 | 22 | 20 |
| | 319.1 > 301.1 | | | 13 |
| 马喷特罗 | 325.2 > 237.0 | 325.2 > 237.0 | 19 | 15 |
| | 325.2 > 307.1 | | | 15 |
| 拉贝特罗 | 329.0 > 207.0 | 329.0 > 207.0 | 25 | 17 |
| | 329.0 > 311.0 | | | 13 |
| 福莫特罗 | 345.0 > 149.0 | 345.0 > 149.0 | 22 | 30 |
| | 345.0 > 120.9 | | | 20 |
| 苯乙醇胺 A | 345.1 > 150.0 | 345.1 > 150.0 | 22 | 20 |
| | 345.1 > 327.2 | | | 15 |
| 溴布特罗 | 367.0 > 293.0 | 367.0 > 293.0 | 20 | 18 |
| | 367.0 > 349.0 | | | 12 |
| 班布特罗 | 368.0 > 294.0 | 368.0 > 294.0 | 30 | 25 |
| | 368.0 > 71.9 | | | 18 |
| 沙美特罗 | 416.2 > 380.3 | 416.2 > 380.3 | 19 | 18 |
| | 416.2 > 398.3 | | | 15 |
| 氯丙那林- D7 | 220.7 > 155.0 | 220.7 > 155.0 | 18 | 18 |
| 西马特罗- D7 | 226.8 > 161.1 | 226.8 > 161.1 | 14 | 18 |
| 西布特罗- D9 | 243.0 > 161.3 | 243.0 > 161.3 | 6 | 16 |
| 沙丁胺醇- D3 | 243.2 > 151.1 | 243.2 > 151.1 | 22 | 18 |
| 马布特罗- D9 | 320.0 > 238.2 | 320.0 > 238.2 | 14 | 12 |
| 克仑普罗- D7 | 270.0 > 252.2 | 270.0 > 252.2 | 22 | 17 |
| 莱克多巴胺- D3 | 305.3 > 167.1 | 305.3 > 167.1 | 24 | 16 |
| 克仑特罗- D9 | 286.2 > 204.0 | 286.2 > 204.0 | 12 | 16 |
| 苯乙醇胺 A- D3 | 348.2 > 153.2 | 348.2 > 153.2 | 20 | 22 |
| 沙美特罗- D3 | 419.2 > 401.2 | 419.2 > 401.2 | 20 | 16 |

7.5 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个及以上子离子, 在相同试验条件下, 样品中待测物质的保留时间与混合对照品工作液中对应的保留时间偏差在 ± 0.3 之内, 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的对照品工作液中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 若偏差不得超过表 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

单位为百分率

| 相对离子丰度 | >50 | 20~50(含) | 10~20(含) | ≤ 10 |
|---------|----------|----------|----------|-----------|
| 允许的最大偏差 | ± 30 | ± 30 | ± 30 | ± 30 |

7.6 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 取试样溶液和标准溶液分别进样, 以标准溶液中被测组分峰面积与对应内标峰面积比值为纵坐标, 被测组分浓度为横坐标, 进行单点或多点校准。样品溶液中待测物的响应值与对应内标响应值的比值均应在仪器测定的线性范围内。以沙丁胺醇- D3 为内标物计算沙丁胺醇、特布他林含量, 以氯丙那林- D7 为内标物计算氯丙那林含量, 以西马特罗- D7 为内标物计算西马特罗含量, 以西布特罗- D9 为内标物计算西布特罗、利托君含量, 以马布特罗- D9 为内标物计算马布特罗、马喷特罗、溴布特罗含量, 以克仑普罗- D7 为内标物计算克仑普罗、齐帕特罗含量, 以莱克多巴胺- D3 为内标物

计算莱克多巴胺、异克舒令含量,以克仑特罗-D9 为内标物计算克仑特罗、克伦塞罗、班布特罗、妥布特罗含量,以苯乙醇胺 A-D3 为内标物计算苯乙醇胺 A、拉贝特罗、福莫特罗含量,以沙美特罗-D3 为内标物计算沙美特罗、喷布特罗含量。或根据激动剂保留特性和相关回收率结果,选取适合的内标计算 β -受体激动剂含量。在上述色谱和质谱条件下,克仑特罗等 22 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图参见附录 A。

7.7 回收率

本标准方法的回收率范围为 60%~110%。

8 计算

试样中待测 β -受体激动剂的浓度 X_i 以微克每升($\mu\text{g/L}$)表示,按式(1)计算。

$$X_i = \frac{P_i \times V_1 \times c_i \times V_3 \times P_{ist} \times c_{is}}{P_s \times V \times V_2 \times P_{is} \times c_{is} \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- P_i —— 试样溶液中待测 β -受体激动剂的峰面积值;
- V_1 —— 试样提取液体积,单位为毫升(mL);
- c_i —— 待测 β -激动剂标准溶液浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V_3 —— 上机前定容体积,单位为毫升(mL);
- P_{ist} —— 待测 β -受体激动剂内标的峰面积值;
- c_{is} —— 样品溶液中 β -受体激动剂内标溶液浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- P_s —— 标准溶液峰面积平均值;
- V —— 试样体积,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 净化时分取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- P_{is} —— 试样溶液中 β -受体激动剂内标的峰面积值;
- c_{is} —— 标准溶液中 β -受体激动剂内标溶液浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)。

测定结果用平行测定算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下,获得的 2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于这 2 个值算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

22 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图

22 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图见图 A.1。

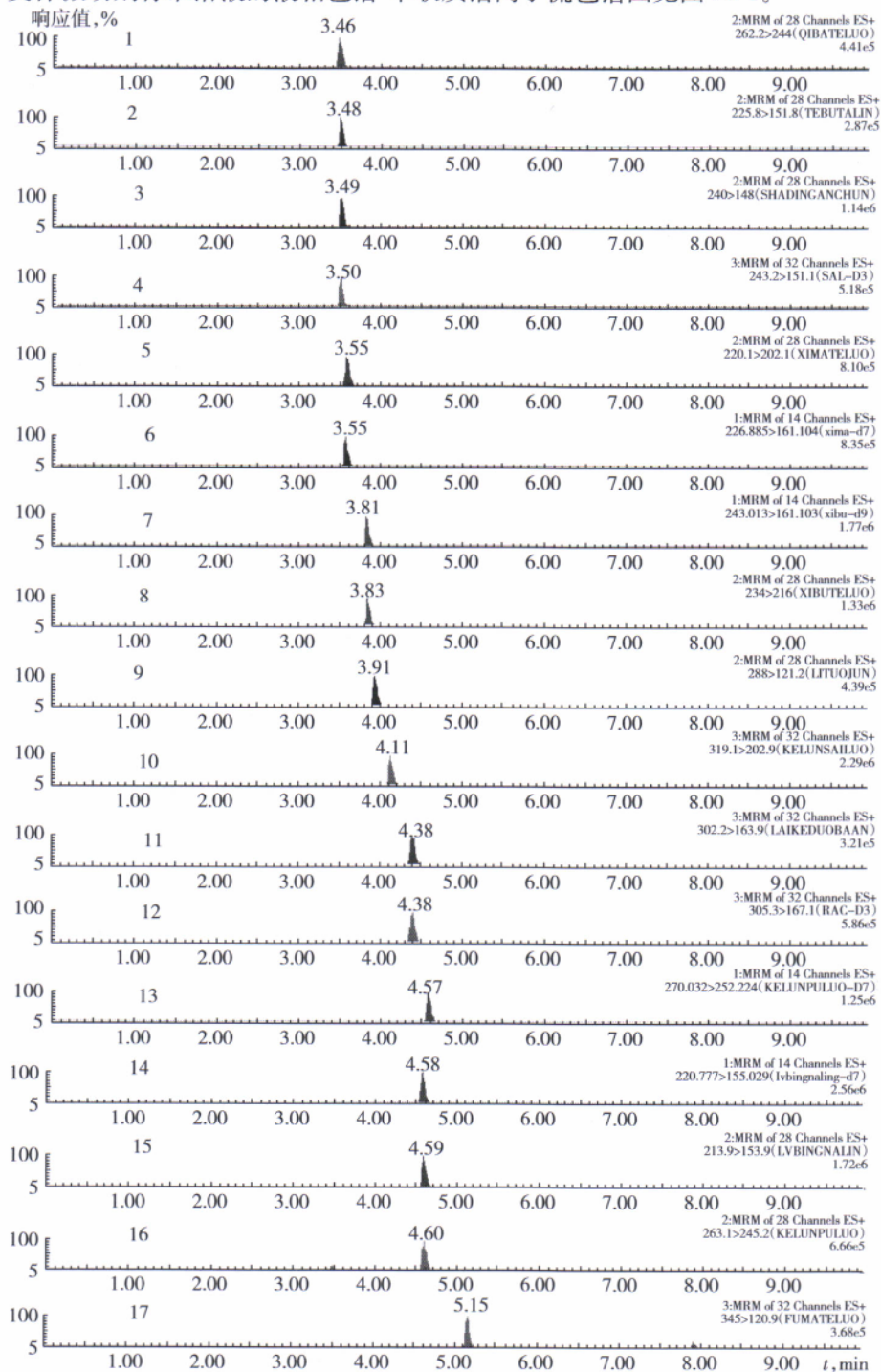
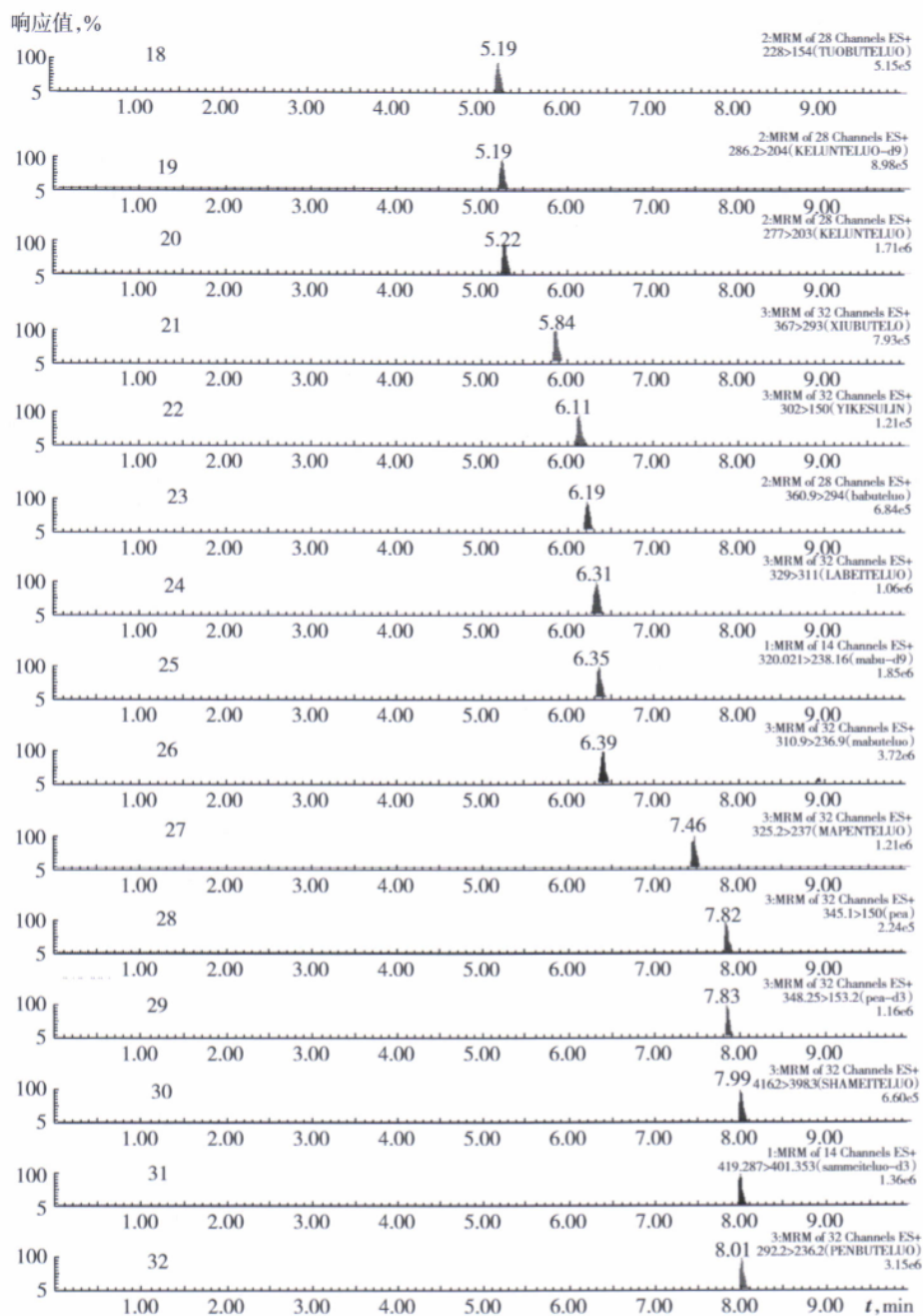


图 A.1 22 种 β -受体激动剂标准溶液(浓度为 10 $\mu\text{g/L}$)的液相色谱-串联质谱离子流色谱图



说明:

- | | | | |
|------------|--------------|-------------|---------------|
| 1—齐帕特罗; | 9—利托君; | 17—福莫特罗; | 25—马布特罗-D9; |
| 2—特布他林; | 10—克伦塞罗; | 18—妥布特罗; | 26—马布特罗; |
| 3—沙丁胺醇; | 11—莱克多巴胺; | 19—克仑特罗-D9; | 27—马喷特罗; |
| 4—沙丁胺醇-D3; | 12—莱克多巴胺-D3; | 20—克仑特罗; | 28—苯乙醇胺 A; |
| 5—西马特罗; | 13—克仑普罗-D7; | 21—溴布特罗; | 29—苯乙醇胺 A-D3; |
| 6—西马特罗-D7; | 14—氯丙那林-D7; | 22—异克舒令; | 30—沙美特罗; |
| 7—西布特罗-D9; | 15—氯丙那林; | 23—班布特罗; | 31—沙美特罗-D3; |
| 8—西布特罗; | 16—克仑普罗; | 24—拉贝特罗; | 32—喷布特罗。 |

图 A.1 (续)

中华人民共和国
农业行业标准
动物尿液中 22 种 β -受体激动剂的测定
液相色谱-串联质谱法

NY/T 3146—2017

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

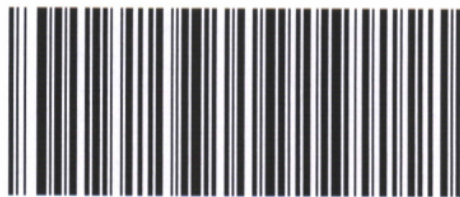
2018 年 5 月第 1 版 2018 年 5 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4389

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 65005894



NY/T 3146—2017