

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4817—2017

进出口食用动物中克伦特罗、 莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of clenbuterol, ractopamine, salbutamol residues in edible
animal for import and export—HPLC-MS/MS method

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张金玲、王凤美、梁广辉、郭礼强、孙军、颜显辉、张艺兵、赵丽青。

进出口食用动物中克伦特罗、 莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了进出口食用动物中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于进出口猪、羊、牛等动物毛发和血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量的测定。

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 方法原理

毛发样品经碱水解,有机溶剂提取浓缩,血浆样品用酶提取,经混合型阳离子交换固相萃取柱净化,液相色谱-质谱/质谱法测定,内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 乙醇。
- 4.2 氢氧化钠。
- 4.3 乙酸铵。
- 4.4 氯化钠。
- 4.5 叔丁醇。
- 4.6 冰乙酸。
- 4.7 甲醇:色谱纯。
- 4.8 正己烷:色谱纯。
- 4.9 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.10 甲酸:色谱纯。
- 4.11 氨水:25%~28%。
- 4.12 浓盐酸:36%~38%。
- 4.13 萃取溶液:150 mL 叔丁醇(4.5)与 350 mL 乙酸乙酯(4.9)混匀。
- 4.14 β -葡萄糖醛甙酶/芳基硫酸酯酶溶液:含 β -葡萄糖醛甙酶 111 000 unit/mL;芳基硫酸酯酶

1 079 units/mL。

4.15 乙酸铵缓冲溶液(2 mol/L):称取乙酸铵(4.3)77.0 g,用水稀释并定容至 500 mL,混匀,加冰乙酸(4.6)调 pH 为 5.2。

4.16 固相萃取(SPE)柱:混合型阳离子交换固相萃取柱,基质为苯磺酸化的聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物,60 mg, 3 mL,或性能相当者。使用前依次用 5 mL 甲醇(4.7)、5 mL 水对柱子进行活化。

4.17 洗脱溶液:50 mL 乙酸乙酯(4.9)、45 mL 甲醇(4.7)与 5 mL 氨水(4.11)混匀。

4.18 定容液:移取 1 mL 甲酸(4.10),用水稀释并定容至 1 000 mL,混匀。

4.19 氮气:纯度 $\geq 99.99\%$ 。

4.20 标准品:盐酸克伦特罗(Clenbuterol hydrochloride),CAS 编号:21898-19-1,纯度 $\geq 98.5\%$;盐酸莱克多巴胺(Ractopamine hydrochloride),CAS 编号:90274-24-1,纯度 $\geq 98.0\%$;硫酸沙丁胺醇(Salbutamol sulfate),CAS 编号:51022-70-9,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.21 标准储备溶液(1 000 mg/L):分别准确称取盐酸克伦特罗,盐酸莱克多巴胺、硫酸沙丁胺醇标准品(折合成目标化合物 10.0 mg)(4.20),分别用适量甲醇溶解,并用甲醇定容至 10 mL。保存于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,有效期 12 个月。

4.22 标准中间液(1 000 $\mu\text{g/L}$):用甲醇分别稀释盐酸克伦特罗、盐酸莱克多巴胺、硫酸沙丁胺醇标准储备溶液(4.21)至 1 000 $\mu\text{g/L}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期为 6 个月。

4.23 同位素内标物(100 mg/L):克伦特罗内标溶液(Clenbuterol-D9),浓度为 100 mg/L,溶剂为丙酮;盐酸莱克多巴胺内标物(Ractopamine-D3-HCl),纯度 $\geq 98.0\%$,准确称取盐酸莱克多巴胺内标物(折合成目标化合物 10.0 mg),用适量甲醇溶解,并用甲醇定容至 100 mL;沙丁胺醇内标溶液(Salbutamol-D3),浓度为 100 mg/L,溶剂为丙酮。

4.24 同位素内标中间溶液(1.0 mg/L):用甲醇分别稀释克伦特罗-D9、莱克多巴胺-D3、沙丁胺醇-D3(4.23)至 1.0 mg/L。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期为 6 个月。

4.25 标准工作液(10 $\mu\text{g/L}$):根据需要移取适量标准中间液、同位素内标中间液,用甲醇稀释,配制浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$ 的标准及其同位素内标工作液,该溶液临用前配制。

5 仪器

5.1 液相色谱-质谱/质谱联用仪:带电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

5.3 旋涡混合器。

5.4 冷冻离心机:最高转速大于或等于 12 000 r/min。

5.5 氮气浓缩仪。

5.6 水浴振荡器。

5.7 固相萃取装置。

5.8 pH 计。

5.9 电热干燥器。

5.10 水浴锅。

6 样品制备

6.1 毛发

将样品依次用热水、乙醇清洗,重复清洗三次后,用滤纸吸干。 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 电热干燥 2 h,将毛发剪碎至约 2 mm,充分混匀,置于密封干燥处待测。

6.2 血浆

取静脉血 10 mL, 置入抗凝血试管中混匀, 离心取上清于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 毛发

称取 1 g (准确至 0.01 g) 样品至 100 mL 带螺旋盖聚丙烯离心管中, 添加 100 μL 同位素内标(4.25)工作液, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 20 mL, 旋紧螺旋盖, 充分振荡混匀, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 取出冷至室温, 用 2 mol/L 盐酸调节 pH 至 9.5~10, 加氯化钠至饱和。然后加入 15 mL 萃取溶液(4.13)振荡混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 10 000 r/min 离心 10 min, 萃取两次, 合并上层萃取液, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮气吹干。加入 10 mL 乙酸铵缓冲溶液(4.15)溶解残渣, 振荡混匀, 待净化。

7.1.2 血浆

准确移取 1 mL 试样, 置于 50 mL 螺旋盖聚丙烯离心管中, 添加 100 μL 同位素内标(4.25)工作液, 加入 15 mL 乙酸铵缓冲溶液(4.15), 然后加入 20 μL β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶(4.14), 充分振荡混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于螺旋盖聚丙烯离心管中, 样液经滤纸过滤, 并用 2 mL 乙酸铵缓冲溶液(4.15)洗涤滤纸, 收集全部滤液, 待净化。

7.2 净化

将 7.1 待净化溶液以低于 1 mL/min 的流速过 SPE 小柱(4.16), 再依次用 5 mL 水, 5 mL 甲醇, 5 mL 正己烷淋洗, 真空抽干, 最后用 5 mL 洗脱溶液(4.17)洗脱, 收集洗脱液, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮气吹干。用 0.5 mL 定容液(4.18)溶解, 涡混均匀。样液过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 柱, 100 mm \times 3.0 mm (内径), 粒度 1.8 μm 或性能相当者;
- 进样量: 10 μL ;
- 流速: 0.35 mL/min;
- 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 流动相: A: 甲醇, B: 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	15	85
3	60	40
5	60	40
5.1	15	85
8.5	15	85

7.3.2 质谱条件

质谱条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测；
- d) 监测离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能参见附录 A 表 A.1；
- e) 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体；使用前应调节气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求；喷雾电压等电压值应优化至最佳灵敏度，参考质谱参数见表 A.2。

7.3.3 液相色谱-质谱/质谱测定

7.3.3.1 定性标准

被测组分选择 1 个母离子，2 个子离子，在相同实验条件下，样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内；且样品谱图中被测组分监测离子的相对丰度与浓度接近的标准工作溶液谱图中对应的监测离子的相对丰度进行比较，偏差不得超过表 2 规定的范围，则可判定样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.3.2 定量测定

根据试样中被测物的含量情况，选取响应值相近的标准工作液一起进行色谱分析。用标准工作曲线按内标法定量，标准工作液和待测溶液中待测物的响应值在仪器线性响应范围内。在上述色谱条件下克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的保留时间参见附录 A，标准溶液及空白基质的多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 B。

7.3.3.3 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

8 结果计算

采用内标法定量，按式(1)计算克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量，结果保留三位有效数字。

$$X = C \times \frac{C_i}{C_{si}} \times \frac{A}{A_i} \times \frac{A_{si}}{A_s} \times \frac{V}{W} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X —— 样品中待测组分残留量，单位为微克每千克或微升每升 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 或者 $\mu\text{L}/\text{L}$)；

C —— 标准工作溶液中待测组分的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

C_i —— 样品中内标物的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

A —— 样品中待测组分的峰面积；

A_{si} —— 标准工作溶液中内标物的峰面积；

- V ——样品定容体积,单位为毫升(mL);
- C_{si} ——标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i ——样品溶液中内标物的峰面积;
- A_s ——标准工作溶液中待测组分的峰面积;
- W ——样品称样量或移取量,单位为克或毫升(g 或 mL)。

9 方法性能指标

9.1 测定低限

本方法克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的测定低限均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 回收率

本方法回收率的实验数据参见表 C.1。

9.3 精密度

本方法精密度的实验数据参见表 C.1。

附录 A

(资料性附录)

离子对、保留时间、去簇电压和碰撞能量等质谱参数

克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的检测离子对、定量离子对、保留时间见表 A.1。

表 A.1 克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的检测离子对、定量离子对、保留时间¹⁾

序号	化合物	保留时间 /min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
1	克伦特罗	3.7	277.1	203.1*	120	25
				132.0	120	30
				168.0	120	28
2	莱克多巴胺	3.4	302.2	164.0*	80	25
				284.1	80	15
3	沙丁胺醇	2.2	240.1	148.2*	80	30
				222.1	80	15
4	克伦特罗-D9	3.7	286.1	204.1	70	25
5	莱克多巴胺-D3	3.4	305.1	166.7	90	25
6	沙丁胺醇-D3	2.2	243.0	150.8	90	30

注：表 A.1 中带 * 的离子为定量离子；对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

参考质谱参数见表 A.2。

表 A.2 参考质谱参数¹⁾

质谱参数	参数值
电离源	ESI+
气帘气	30 L/min
GAS1	55 L/min
GAS2	55 L/min
CAD 碰撞气	Medium
辅助加热气温度	550 °C
喷雾电压	5 500 V

1) 非商业性声明：表 A.1, 表 A.2 所列参数是用 QTrap 5500 质谱仪完成，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)
色谱图

B.1 标准品多重反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

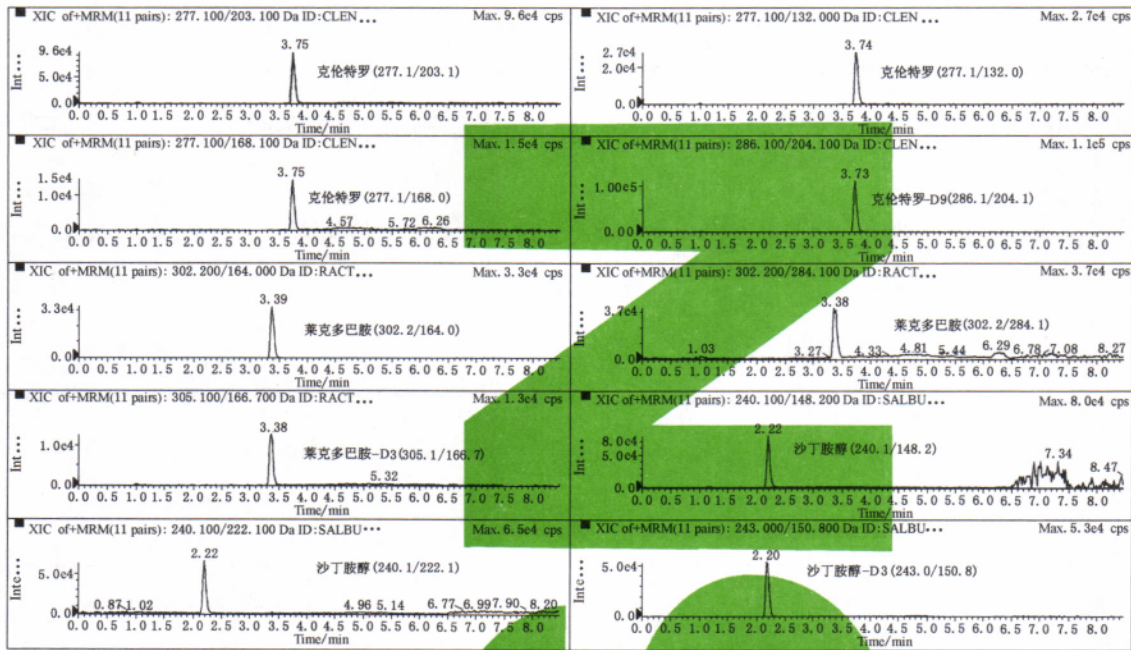


图 B.1 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的液相色谱-质谱/质谱提取离子色谱图

B.2 羊毛空白基质多重反应监测(MRM)色谱图见图 B.2。

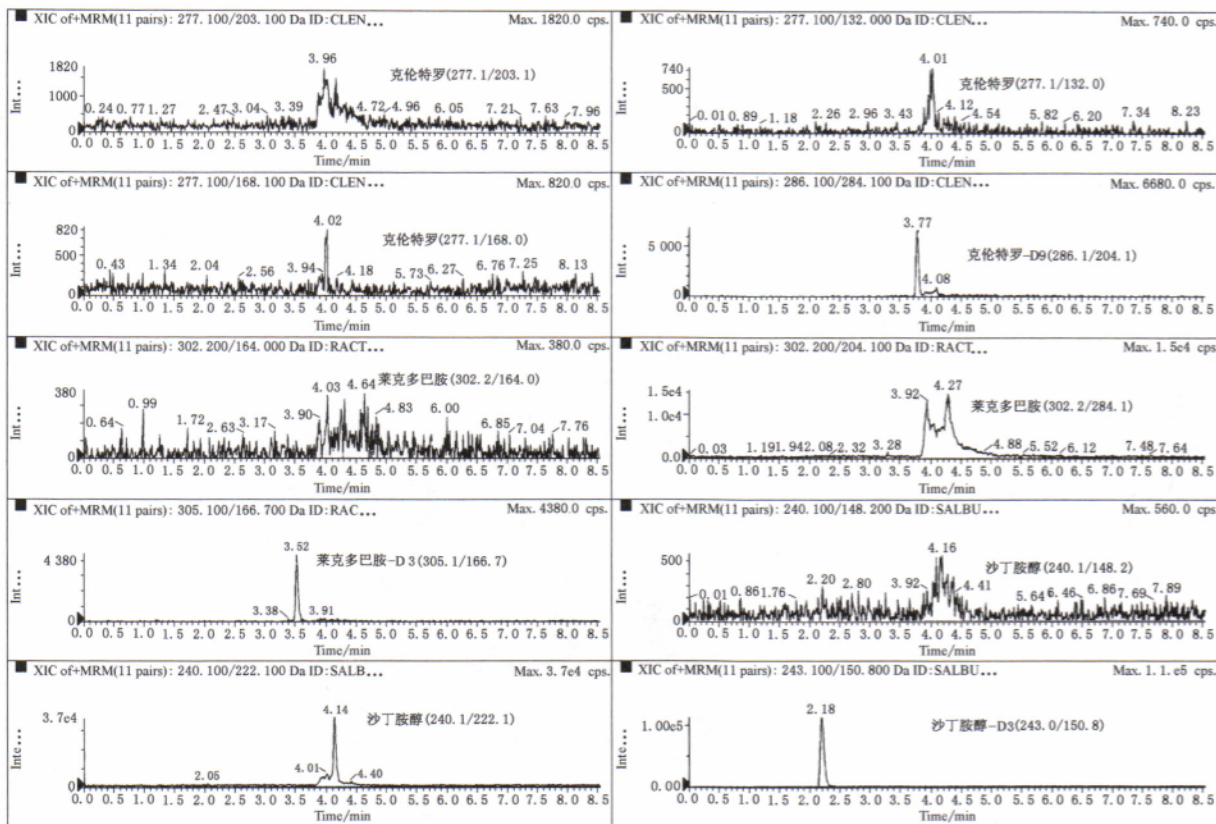


图 B.2 羊毛空白基质中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的液相色谱-质谱/质谱提取离子色谱图

附 录 C
(资料性附录)
回收率和精密度

回收率和精密度见表 C.1。

表 C.1 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇残留的添加浓度及其回收率和精密度

化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%						相对标准偏 差范围/%
		猪毛	牛毛	羊毛	猪血浆	牛血浆	羊血浆	
克伦特罗	0.5	88.6~109.8	92.0~110.8	87.0~113.8	85.2~105.0	83.8~113.2	91.2~110.4	5.22~9.11
	1.0	92.1~114.3	88.9~114.5	85.5~113.9	90.1~108.4	83.7~111.6	89.2~104.8	3.35~7.64
	5.0	84.5~109.4	90.4~113.6	86.2~105.6	92.4~102.6	90.0~103.2	89.8~103.6	2.31~6.75
莱克多巴胺	0.5	90.2~116.2	82.6~110.8	90.2~115.6	82.8~113.4	87.2~103.4	91.4~108.6	5.19~11.06
	1.0	90.1~114.4	83.5~113.9	81.2~114.4	85.2~109.3	88.5~107.3	90.2~109.9	4.27~9.33
	5.0	90.9~108.2	86.1~108.6	90.7~110.0	93.4~104.2	91.2~108.4	91.8~103.9	3.55~8.86
沙丁胺醇	0.5	91.2~118.4	92.6~112.6	85.2~116.6	86.8~108.8	89.8~106.8	93.2~113.0	3.98~9.42
	1.0	90.3~114.3	90.2~114.5	86.2~114.0	91.9~106.1	90.8~111.2	95.4~112.3	4.53~10.52
	5.0	90.5~109.8	90.3~105.6	87.7~117.8	92.4~106.6	91.4~104.8	89.8~104.3	3.26~9.51

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食用动物中克伦特罗、
莱克多巴胺、沙丁胺醇残留量的测定
液相色谱-质谱/质谱法
SN/T 4817—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2018年5月第一版 2018年5月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-33354 定价 18.00 元



SN/T 4817-2017