

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告—11—2008

猪尿中 β -受体激动剂多残留检测 液相色谱—串联质谱法

Determination of β -agonists residues in pig urine
by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施

中华人民共和国农业部 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 制样	1
3.1 样品的制备	1
3.2 样品的保存	1
4 测定方法	1
4.1 方法提要或原理	1
4.2 试剂和材料	1
4.3 仪器和设备	2
4.4 测定步骤	2
4.5 结果计算和表述	4
5 检测方法灵敏度、准确度和精密度	4
5.1 灵敏度	4
5.2 准确度	4
5.3 精密度	4
附录 A (资料性附录) β -受体激动剂特征离子质量色谱图	5

前 言

本标准附录 A 是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：王树槐、孙雷、刘琪、汪霞。

本标准系首次发布的国家标准。

猪尿中 β -受体激动剂多残留检测 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了猪尿中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗残留检测的制样和高效液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于猪尿中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗单个或混合物残留量的检测。

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 分析实验室用水规则和试验方法

农业部农牧发[2003]1号 兽药残留试验技术规范(试行)

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试样品,解冻摇匀备用。

3.2 样品的保存

-20℃以下贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试样中的 β -受体激动剂残留物经酶解,离心后将上清液调 pH,用异丙醇-乙酸乙酯提取,再用 MCX 柱子净化,吹干浓缩后用高效液相色谱—串联质谱法测定,同位素内标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 盐酸克仑特罗、盐酸莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗对照品:纯度大于 98.0%。

4.2.2 盐酸克仑特罗-D₉、盐酸莱克多巴胺-D₅、沙丁胺醇-D₃、西马特罗-D₇ 对照品:纯度大于 98.0%。

4.2.3 乙酸铵缓冲液(2 mol/L):称取 15.4 g 乙酸铵,溶解于 100 mL 水中,用适量乙酸调 pH 至 5.2。

4.2.4 氢氧化钠溶液:5 mol/L。

4.2.5 异丙醇-乙酸乙酯:(6+4,V/V)。

4.2.6 甲醇:色谱纯。

4.2.7 甲酸水溶液:2%。

4.2.8 氨水甲醇溶液:5%。

4.2.9 甲醇-0.1%甲酸/水:(5+95,V/V)。

4.2.10 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(β -Glucuronidase/aryl sulfatase)。

4.2.11 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取适量的盐酸克仑特罗、盐酸莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗对照品,按克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗计,用甲醇分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, -20°C 冰箱中保存,有效期为 3 个月。

4.2.12 混合标准储备液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确量取 1.0 mL 的克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度, -20°C 冰箱中保存,有效期为 3 个月。

4.2.13 同位素内标储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取适量的盐酸克仑特罗- D_9 、盐酸莱克多巴胺- D_5 、沙丁胺醇- D_3 和西马特罗- D_7 对照品,按克仑特罗- D_9 、莱克多巴胺- D_5 、沙丁胺醇- D_3 和西马特罗- D_7 计,用甲醇配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, -20°C 冰箱中保存,有效期为 3 个月。

4.2.14 同位素内标工作液(100 ng/mL):分别准确量取适量的同位素内标储备液至同一容量瓶中,用甲醇稀释定容成浓度为 100 ng/mL 的同位素内标工作液, -20°C 下冰箱中保存,有效期为 3 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源)。

4.3.2 漩涡振荡器。

4.3.3 电热恒温振荡水槽。

4.3.4 pH 计。

4.3.5 旋转蒸发器。

4.3.6 固相萃取装置。

4.3.7 Oasis MCX 固相萃取柱(60 $\text{mg}/3\text{ mL}$)或相当者。

4.3.8 氮吹仪。

4.3.9 微孔滤头:0.45 μm 。

4.4 测定步骤

4.4.1 试样的制备

试样的制备包括:

——取摇匀的供试样品,作为供试试样;

——取摇匀的空白样品,作为空白试样;

——取摇匀的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

4.4.2 酶解

准确量取 5 mL 尿样于 50 mL 离心管内,加入 0.5 mL 2 mol/L 的乙酸铵缓冲液($\text{pH}=5.2$),再加入 40 μL 的 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶,涡旋混匀,于 37°C 下避光水浴振荡 16 h。

4.4.3 提取

酶解后,添加 100 μL 100 ng/mL 内标物于待测样品中,涡旋混匀,10 000 r/min 高速离心 10 min,转移上清液于另一 50 mL 离心管内,用 5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 9.8 ± 0.2 ,加入 10 mL 异丙醇-乙酸乙酯(6+4),再加入 1.5 g~2 g 的固体氯化钠饱和水相,涡旋后振摇 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 50 mL 鸡心瓶内,再用 10 mL 异丙醇-乙酸乙酯(6+4)重复提取一次,合并上清液, 50°C 下旋转蒸干,用 5 mL 2 mol/L 的乙酸铵溶液($\text{pH}=5.2$)溶解,备用。

4.4.4 净化

MCX 柱子依次用 3 mL 甲醇,3 mL 水活化,取备用液全部过柱,再依次用 3 mL 水、3 mL 2% 的甲酸水溶液、3 mL 甲醇淋洗,减压抽干,用 5 mL 5% 的氨水甲醇溶液洗脱;洗脱液在 50°C 下用氮气吹干。

残余物用 0.5 mL 的甲醇-0.1% 甲酸/水(5+95)溶解,过滤膜后供高效液相色谱-串联质谱法测定。

4.4.5 标准曲线的制备

精密量取适量的克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗混合标准工作液,制得 1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 各系列对照溶液(内标均为 10 ng/mL)供高效液相色谱-串联质谱法测定。

4.4.6 测定

4.4.6.1 液相色谱条件

色谱柱: XBridge C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 粒径 5 μm)或相当者;

流动相: A 相: 0.1% 甲酸甲醇溶液; B 相: 0.1% 甲酸水溶液;

梯度洗脱: 0 min~5 min, 5% A 线性变化至 60% A; 5 min~12 min, 60% A 线性变化至 90% A; 12 min~14 min, 保持 90% A; 14 min~25 min, 90% A 线性变化至 5% A;

流速: 0.2 mL/min;

柱温: 30°C;

进样量: 50 μL。

4.4.6.2 质谱条件

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;

电离电压: 3.5 kV;

萃取电压: 2.0 V;

预六极杆电压: 0.5 V;

源温: 110°C;

雾化温度: 350°C;

锥孔气流速: 50 L/h;

雾化气流速: 450 L/h;

光电倍增器: 650 V;

氩气: 3.70×10^{-3} 。

定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 1。

表 1 四种 β-受体激动剂和内标的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
克仑特罗	276.9 > 203.0	276.9 > 203.0	22	15
	276.9 > 259.1			11
莱克多巴胺	302.3 > 107.2	302.3 > 164.1	22	30
	302.3 > 164.1			15
沙丁胺醇	240.2 > 148.2	240.2 > 148.2	24	18
	240.2 > 222.2			10
西马特罗	220.3 > 202.2	220.3 > 202.2	16	10
	220.3 > 160.2			16
克仑特罗- D ₃	286.1 > 204.1	286.1 > 204.1	22	15
莱克多巴胺- D ₃	307.3 > 167.2	307.3 > 167.0	22	15
沙丁胺醇- D ₃	243.2 > 151.2	243.2 > 151.2	24	18
西马特罗- D ₇	227.3 > 161.1	227.3 > 161.1	16	16

4.4.6.3 测定法

取试样溶液和相应的对照溶液,作单点或多点校准,按内标法以峰面积比计算,即得。对照溶液及试样溶液中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗及内标克仑特罗-D₆、莱克多巴胺-D₅、沙丁胺醇-D₃、西马特罗-D₇的峰面积之比均应在仪器检测的线性范围之内。对照溶液和试样溶液中各特征离子质量色谱图分别见附录 A 中图 A.1、图 A.2。

4.4.7 空白试验

除不加试样外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

单点校准:
$$C_i = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is}}{A_{is} A_s C'_{is}} \dots\dots\dots (1)$$

或标准曲线校准:由
$$\frac{A_s}{A'_{is}} = a \frac{C_s}{C'_{is}} + b \dots\dots\dots (2)$$

求得 a 和 b,则
$$C_i = \frac{C_{is}}{a} \left(\frac{A_i}{A_{is}} - b \right) \dots\dots\dots (3)$$

按下式计算试样中克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗残留量:

$$X = \frac{C_i V'}{V} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- C_i —— 试样溶液中相应 β-受体激动剂的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_{is} —— 试样溶液中相应 β-受体激动剂内标的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_s —— 对照溶液中相应 β-受体激动剂的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C'_{is} —— 对照溶液中相应 β-受体激动剂内标的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i —— 试样溶液中相应 β-受体激动剂的峰面积;
- A_{is} —— 试样溶液中相应 β-受体激动剂内标的峰面积;
- A_s —— 对照溶液中相应 β-受体激动剂的峰面积;
- A'_{is} —— 对照溶液中相应 β-受体激动剂内标的峰面积;
- X —— 试样中相应 β-受体激动剂的残留量,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V' —— 溶解残余物所得试样溶液体积,单位为毫升(mL);
- V —— 试样的体积,单位为毫升(mL)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

5.1 灵敏度

克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和西马特罗在猪尿中的检测限为 0.3 ng/mL,定量限为 0.5 ng/mL。

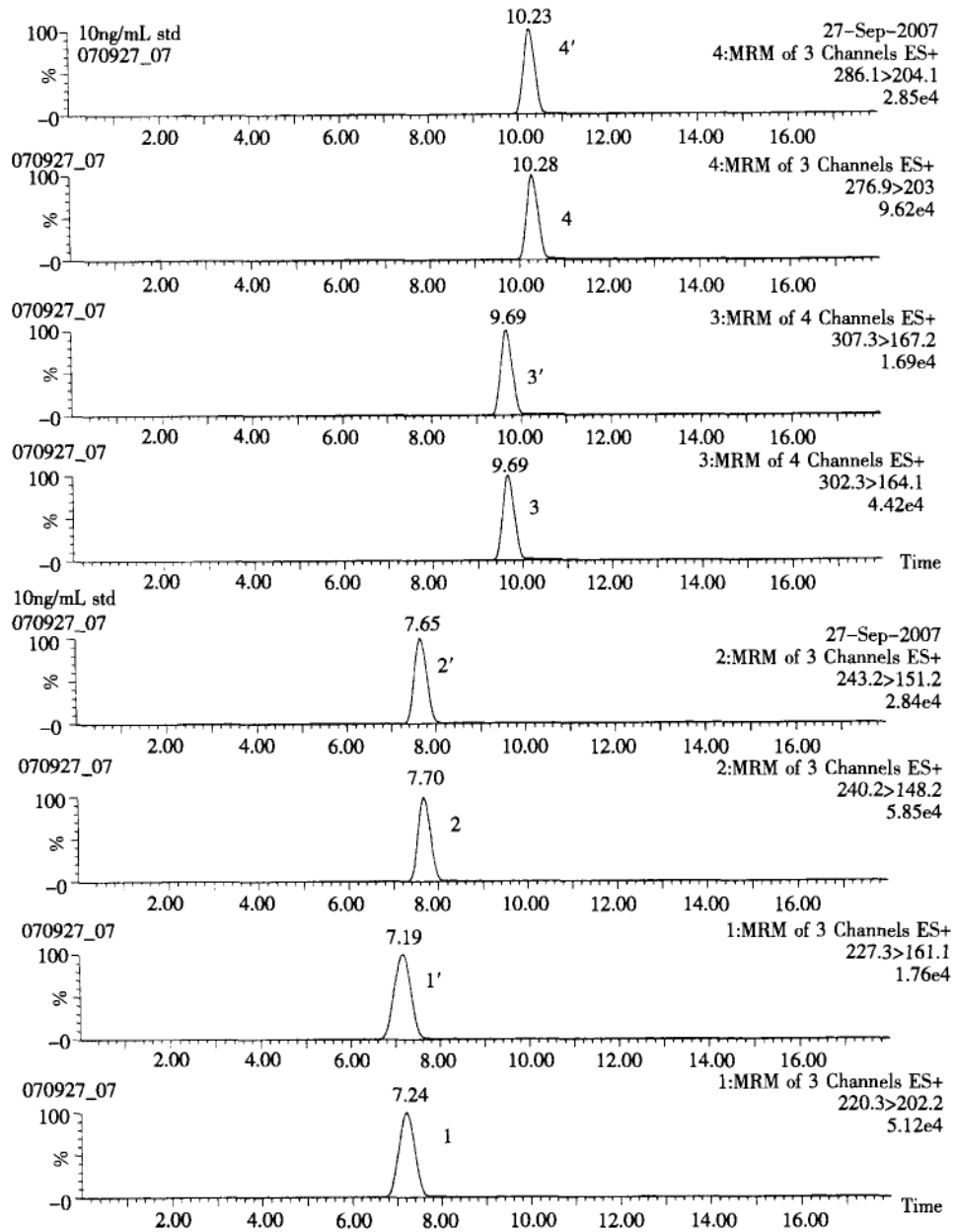
5.2 准确度

本方法在 0.5 ng/mL~2 ng/mL 添加浓度的回收率为 60%~120%。

5.3 精密度

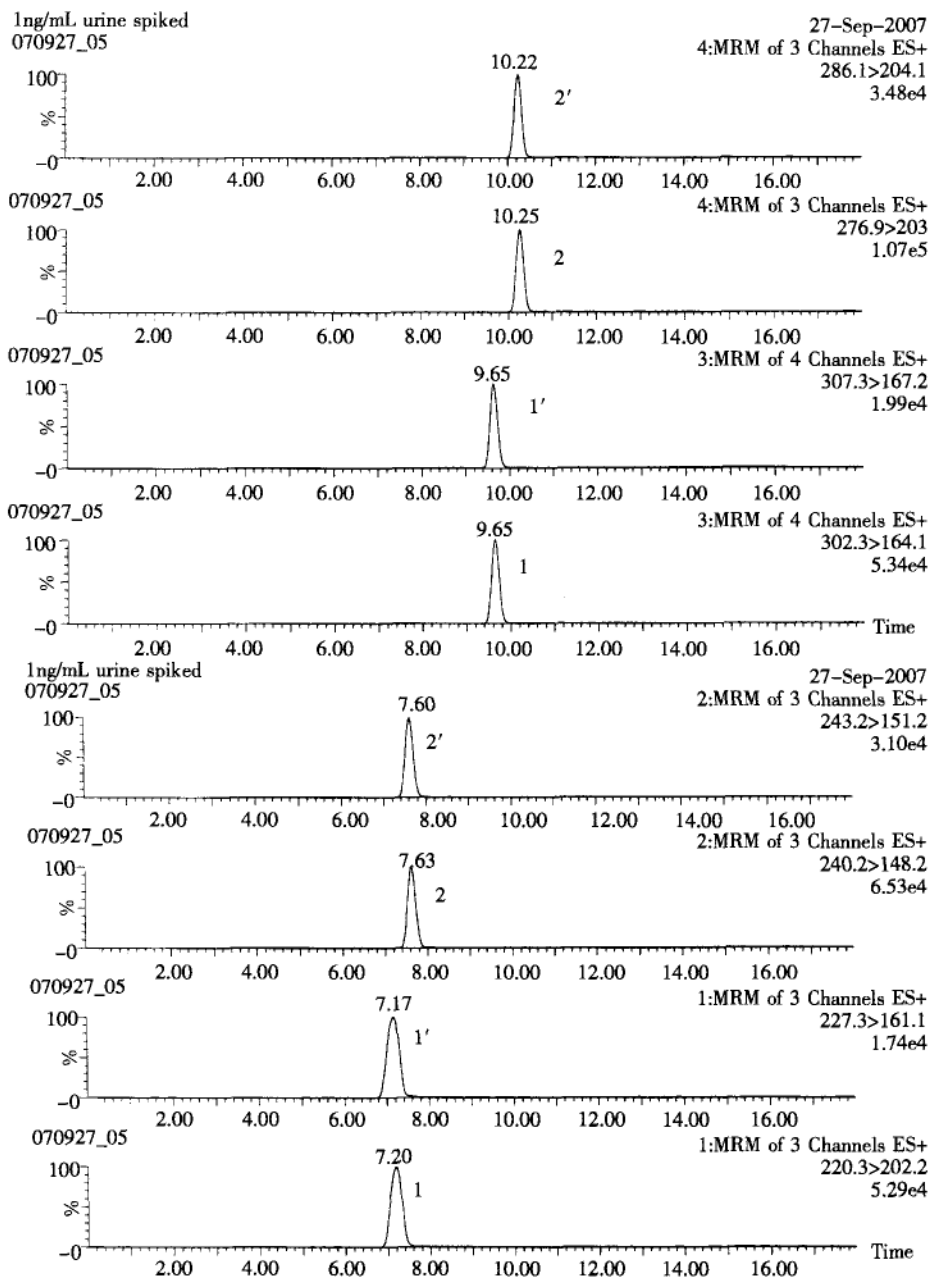
本方法的批内相对标准偏差≤20%,批间相对标准偏差≤20%。

附录 A
(资料性附录)
β-受体激动剂特征离子质量色谱图



- 1——西马特罗特征离子质量色谱图(220.3>202.2)；
1'——西马特罗-D₇特征离子质量色谱图(227.3>161.1)；
2——沙丁胺醇特征离子质量色谱图(240.2>148.2)；
2'——沙丁胺醇-D₃特征离子质量色谱图(243.2>151.2)；
3——莱克多巴胺特征离子质量色谱图(302.3>164.1)；
3'——莱克多巴胺-D₅特征离子质量色谱图(307.3>167.2)；
4——克仑特罗特征离子质量色谱图(276.9>203.0)；
4'——克仑特罗-D₉特征离子质量色谱图(286.1>204.1)。

图 A.1 10 ng/mL 标液中四种 β-受体激动剂及内标特征离子质量色谱图



- 1——西马特罗特征离子质量色谱图(220.3>202.2);
- 1'——西马特罗-D₇特征离子质量色谱图(227.3>161.1);
- 2——沙丁胺醇特征离子质量色谱图(240.2>148.2);
- 2'——沙丁胺醇-D₅特征离子质量色谱图(243.2>151.2);
- 3——莱克多巴胺特征离子质量色谱图(302.3>164.1);
- 3'——莱克多巴胺-D₅特征离子质量色谱图(307.3>167.2);
- 4——克仑特罗特征离子质量色谱图(276.9>203.0);
- 4'——克仑特罗-D₅特征离子质量色谱图(286.1>204.1)。

图 A.2 1 ng/mL 空白猪尿添加试液中四种 β-受体激动剂及内标特征离子质量色谱图

