

中华人民共和国国家标准

农业部 1031 号公告—3—2008

猪肝和猪尿中 β -受体激动剂残留 检测 气相色谱-质谱法

**Determination of β -agonist residues in swine liver and urine
Gas chromatography-mass spectrometry method**

2008-05-09 发布

2008-05-09 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

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：农业部畜禽产品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：吴银良、姜艳彬、刘兴国、单吉浩、刘勇军、蔡英华、李艳华。

猪肝和猪尿中 β -受体激动剂残留检测 气相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了猪肝和猪尿中 β -受体激动剂类药物(马布特罗、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、班布特罗和莱克多巴胺)含量检测的制样和气相色谱质谱法的测定方法。

本标准适用于猪肝和猪尿中 β -受体激动剂类药物(马布特罗、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、班布特罗和莱克多巴胺)含量的检测。

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

3 制样

3.1 样品的制备

取适量猪尿 3 000 r/min 离心 5 min;新鲜或冷冻的猪肝,绞碎并使均匀。

3.2 样品的保存

-20℃冰箱中储存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

样品中呈结合态的 β -受体激动剂类药物在乙酸铵缓冲溶液中经酶解后成游离状态,调节提取液 pH,然后用乙酸乙酯和异丙醇混合溶剂萃取,萃取液旋转蒸干后用乙酸铵缓冲溶液溶解,过阳离子交换柱。净化后的样品氮气吹干后用双三甲基硅基三氟乙酰氨(BSTFA)衍生,然后采用选择离子模式进行气相色谱质谱分析。内标法定量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中使用确认的分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.2.1 马布特罗:含马布特罗不得少于 98.0%。
- 4.2.2 盐酸克伦特罗:含盐酸克伦特罗不得少于 98.0%。
- 4.2.3 沙丁胺醇:含沙丁胺醇不得少于 98.0%。
- 4.2.4 班布特罗:含班布特罗不得少于 98.0%。
- 4.2.5 莱克多巴胺:含莱克多巴胺不得少于 98.0%。
- 4.2.6 美托洛尔:纯度不得少于 98.0%。
- 4.2.7 乙酸铵。
- 4.2.8 乙酸乙酯。
- 4.2.9 异丙醇。

- 4.2.10 氯化钠。
- 4.2.11 氢氧化钠。
- 4.2.12 乙酸。
- 4.2.13 甲醇:色谱纯。
- 4.2.14 氨化甲醇溶液 4%:用甲醇稀释 4 mL 氨水至 100 mL。
- 4.2.15 乙酸乙酯与异丙醇混合溶剂:体积比为 6:4。
- 4.2.16 乙酸铵溶液 0.02 mol/L:称取 1.54 g 乙酸铵,加水溶解并稀释至 800 mL 左右,调节 pH 至 5.2,定容至 1 000 mL。
- 4.2.17 氢氧化钠溶液 2.0 mol/L:取氢氧化钠 40 g,加水稀释到 500 mL。
- 4.2.18 SCX 小柱:supelclean,LC-SCX Sep Pak 小柱 500 mg,3 mL,或相当者。
- 4.2.19 双三甲基硅基三氟乙酰氨(BSTFA)。
- 4.2.20 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase)3 000 U/mL,或相当者。
- 4.2.21 标准溶液的配制:
- 4.2.21.1 储备液:分别精确称取 10 mg 五种 β -受体激动剂类药物于 100 mL 容量瓶中,均用甲醇配成浓度为 100 mg/L 的标准储备液,放在 4℃冰箱中冷藏保存;有效期 6 个月。
- 4.2.21.2 工作液:分别吸取马布特罗、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、班布特罗和莱克多巴胺标准储备液 2 mL、1 mL、1 mL、1 mL 和 2 mL 于 100 mL 容量瓶中,有甲醇稀释至刻度,即成含马布特罗和莱克多巴胺 2 mg/L、其余三种 β -受体激动剂类药物 1 mg/L 的标准工作液,存放在 4℃冰箱中备用。
- 4.2.22 内标溶液的配制:精确称取 10 mg 美托洛尔标准品于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即成 100 mg/L 的标准储备液,放在 4℃冰箱中冷藏保存;有效期 6 个月。工作液:将储备液用甲醇稀释为 500 ng/mL,存放在 4℃冰箱中备用。
- 4.3 仪器和设备
- 4.3.1 气相色谱-质谱联用仪(配自动进样器和 EI 源)。
- 4.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 4.3.3 天平:感量 0.01 g。
- 4.3.4 氮吹仪。
- 4.3.5 固相萃取装置。
- 4.3.6 取液器(量程 200 μ L~1 000 μ L)。
- 4.3.7 取液器(量程 20 μ L~100 μ L)。
- 4.3.8 匀质器。
- 4.3.9 旋涡混合器。
- 4.3.10 离心机。
- 4.3.11 烘箱:精度为 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.12 pH 计。
- 4.3.13 旋转浓缩仪。
- 4.3.14 色谱柱:HP-5 MS 石英毛细管色谱柱,30 m \times 0.25 mm,膜厚 0.25 μ m,或相当者。
- 4.4 测定步骤
- 4.4.1 试料的制备
- 试料的制备包括:
- 取绞碎并均匀后的供试样品,作为供试试料;

——取绞碎并均匀后的空白样品,作为空白试料;

——取绞碎并均匀后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

4.4.2.1 猪肝样品:称取(5±0.05) g 试料于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙酸铵溶液,匀质 1 min,加入 50 μL 3 000 U/mL 的 β-葡萄糖醛酸苷酶溶液和 100 μL 内标工作液,盖上盖子在 60℃烘箱中酶解 2 h。酶解后,以 5 000 r/min 离心 10 min,收集提取液于另一 50 mL 离心管中,然后在残渣中再加入 10 mL 乙酸铵溶液,匀质 30 s,以 5 000 r/min 离心 5 min,合并提取液,用氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5±0.2,再以 5 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,加入 8 g 氯化钠,振荡使溶解后待净化处理。

4.4.2.2 猪尿样品:吸取 5.0 mL 样品于 50 mL 离心管中,用乙酸调节 pH 至 5.2 后加入 1 mL 乙酸铵溶液和 50 μL 3 000 U/mL 的 β-葡萄糖醛酸苷酶溶液和 100 μL 内标工作液,盖上盖子在 60℃烘箱中酶解 2 h。酶解后,用氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5±0.2 后加入 2 g 氯化钠,振荡使溶解后待净化处理。

4.4.3 净化

在样品提取液中加入乙酸乙酯与异丙醇混合溶剂萃取水相中的 β-受体激动剂类药物。其中,猪肝样品为 20 mL,猪尿样品为 10 mL,离心后吸取上清液,并以同样体积的混合溶剂萃取一次,合并萃取液在 60℃水浴中旋转浓缩至干,加入 3 mL 乙酸铵溶液待固相萃取净化。

将上述溶液转移到已依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水和 5 mL 30 mmol/L 的盐酸活化的阳离子交换柱上,然后用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗,弃去淋洗液,抽干 SCX 小柱,再用 6 mL 4% 氯化甲醇洗脱,收集洗脱液,在 50℃水浴中用氮气吹干。

4.4.4 衍生化

在 4.4.3 吹干后的样品中加入甲苯和 BSTFA 各 100 μL,振荡混合后,封口,在 80℃烘箱中衍生 60 min,冷却后进行气质分析。

4.4.5 标准工作曲线制备

采用空白样品中添加标准工作液的方法制备标准工作曲线,盐酸克伦特罗、沙丁胺醇和班布特罗添加浓度分别为 0 μg/kg、1.0 μg/kg、2.0 μg/kg、5.0 μg/kg、10.0 μg/kg,马布特罗和莱克多巴胺的添加浓度为 0 μg/kg、2.0 μg/kg、4.0 μg/kg、10.0 μg/kg、20.0 μg/kg,每个浓度点 3 个平行样,用平均值绘制标准曲线。

4.4.6 GC-MS 分析测定

载气为高纯 He,恒流 0.9 mL/min;

进样口温度:220℃;

不分流进样;

进样体积:1 μL;

色谱柱起始温度 70℃(保持 0.6 min),以 25℃/min 的升温速率升至 200℃(保持 4 min),再以 15℃/min 的升温速率升至 280℃(保持 5 min);

GC/MS 传输线温度:280℃;

溶剂延迟:7 min;

EM 电压:高于调谐电压 200 V;

离子源(EI)温度:200℃;

四极杆温度:160℃;

选择离子监测:(*m/z*)86,277,296,311(马布特罗);86,212,262,277(盐酸克伦特罗);86,350,369,440(沙丁胺醇);72,223(美托洛尔);86,277,333,352(班布特罗);163,234,250,502(莱克多巴胺)。

4.4.7 定性定量方法

4.4.7.1 定性:样品峰与标样的保留时间之差不多于 2 s,并人工比较选择离子的丰度。其中,试样峰

的选择离子相对强度(与基峰的比例)不超过标准相应选择离子相对强度平均值的±20%(标样中选择离子峰与基峰的强度比大于10%)或±50%(标样中选择离子峰与基峰的强度比小于10%)。

4.4.7.2 定量方法:选择定量离子马布特罗(m/z 86)、盐酸克伦特罗(m/z 86)、沙丁胺醇(m/z 369)、班布特罗(m/z 86)和莱克多巴胺(m/z 250)与内标离子(m/z 72)的峰面积比进行单点或多点校准定量。

4.4.8 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

试样中 β -受体激动剂类药物的残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 $\mu\text{g}/\text{L}$)按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中 β -受体激动剂类药物残留含量,单位为微克每千克或微克每升($\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 $\mu\text{g}/\text{L}$);

A —— 试样色谱峰与内标色谱峰的峰面积比值对应的 β -受体激动剂类药物质量,单位为纳克(ng);

f —— 试样稀释倍数;

m —— 试样的取样量,单位为克或毫升(g 或 mL)。

计算结果扣除空白值,保留到小数点后两位。

5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

5.1 灵敏度

本方法检测限:盐酸克伦特罗、沙丁胺醇和班布特罗为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (或 $\mu\text{g}/\text{L}$),马布特罗和莱克多巴胺为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (或 $\mu\text{g}/\text{L}$)。

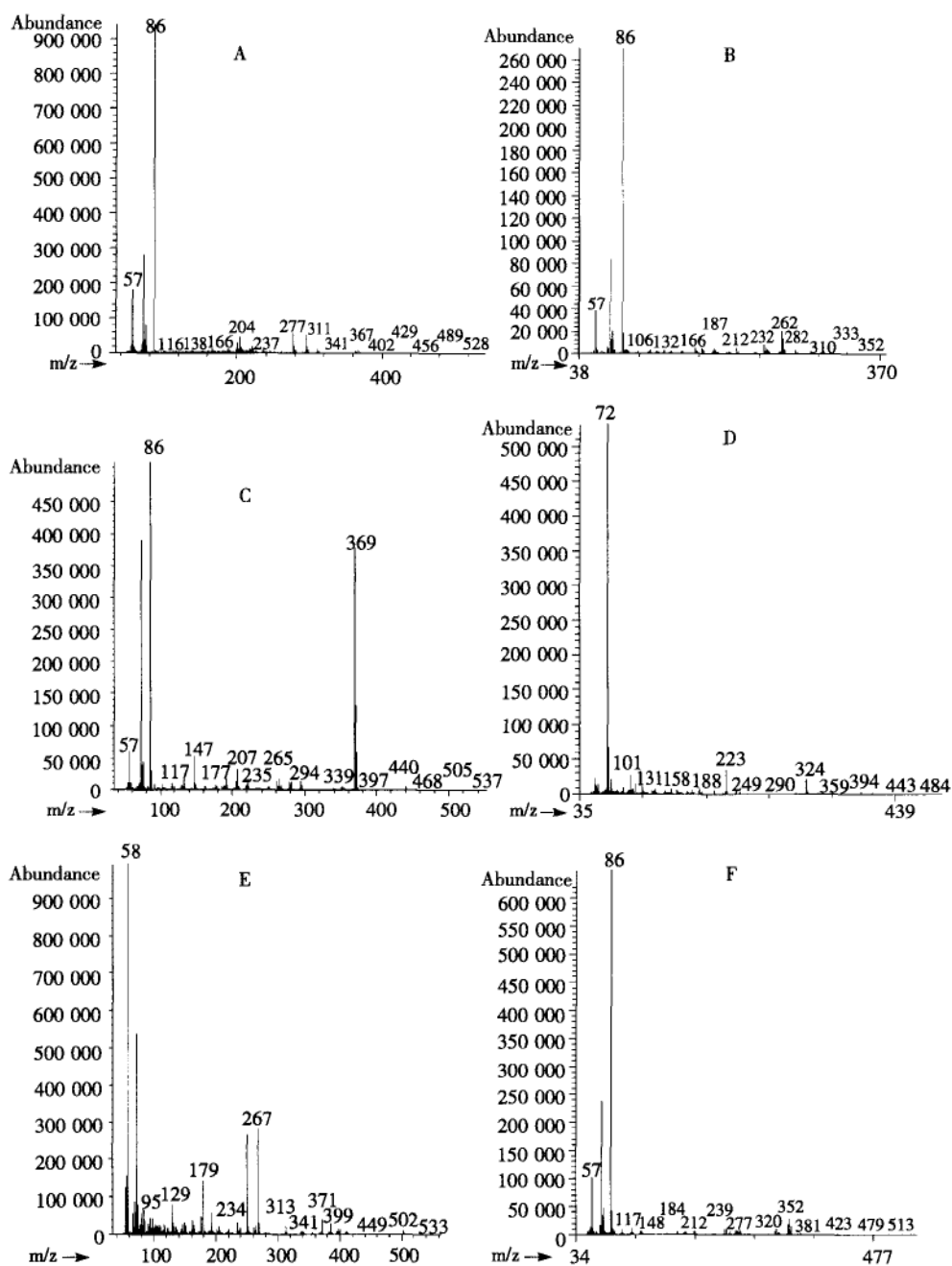
5.2 准确度

本方法的回收率在 60%~120%范围内。

5.3 精密度

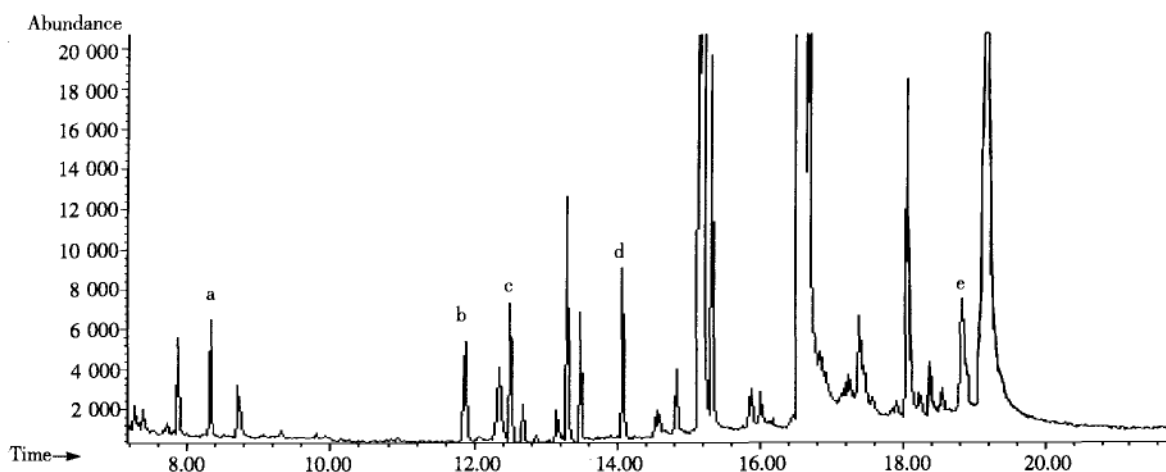
本方法的批内变异系数 $CV \leq 15\%$,批间变异系数 $CV \leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
β-受体激动剂质谱图和色谱图



A——马布特罗；
B——盐酸克伦特罗；
C——沙丁胺醇；
D——美托洛尔；
E——莱克多巴胺；
F——班布特罗。

图 A. 1 β-受体激动剂类药物和内标物甲基硅烷化衍生物质谱图



- a——马布特罗衍生物；
- b——盐酸克伦特罗衍生物；
- c——沙丁胺醇衍生物；
- d——班布特罗衍生物；
- e——莱克多巴胺衍生物。

图 A. 2 β -受体激动剂类药物标准溶液色谱图 (盐酸克伦特罗、沙丁胺醇和班布特罗浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 马布特罗和莱克多巴胺浓度为 200 $\mu\text{g/L}$)

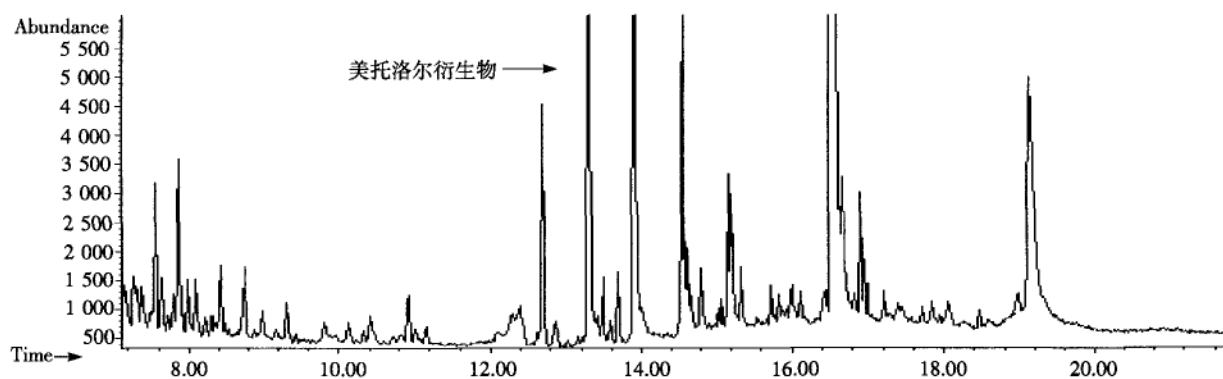


图 A. 3 猪肝空白样品色谱图

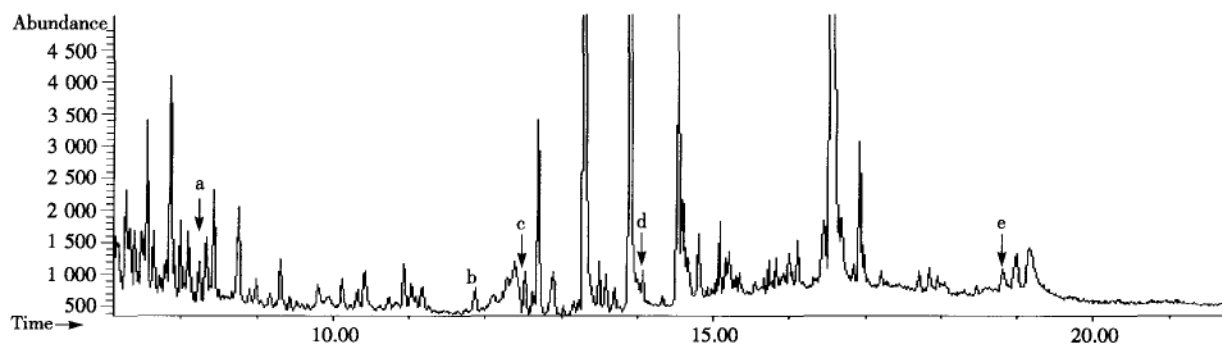


图 A. 4 猪肝添加样品色谱图 (盐酸克伦特罗、沙丁胺醇和班布特罗添加浓度为 1 $\mu\text{g/kg}$, 马布特罗和莱克多巴胺添加浓度为 2 $\mu\text{g/kg}$)

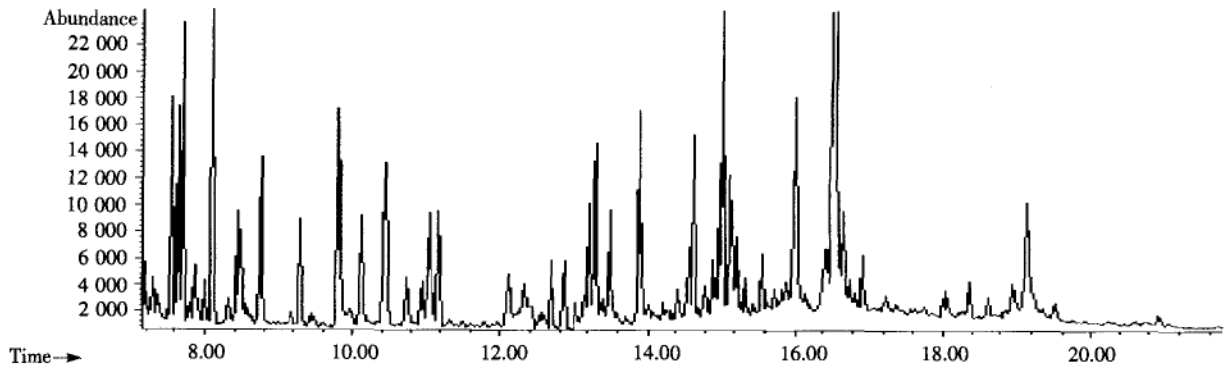


图 A.5 猪尿空白样品色谱图

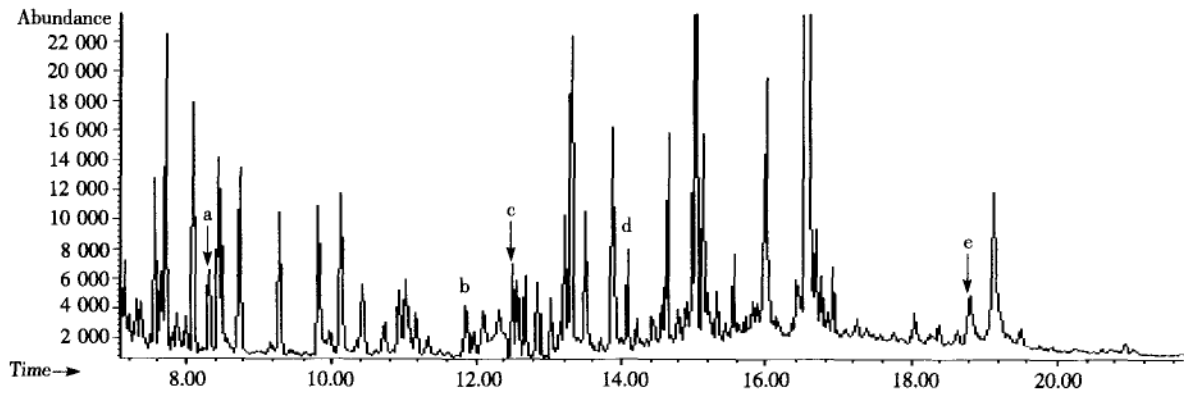


图 A.6 猪尿添加样品色谱图(盐酸克伦特罗、沙丁胺醇和班布特罗添加浓度为 $1 \mu\text{g/L}$, 马布特罗和莱克多巴胺添加浓度为 $2 \mu\text{g/L}$)

