

中华人民共和国农业行业标准

农业部 1063 号公告—3—2008

动物尿液中11种 β -受体激动剂的检测 液相色谱—串联质谱法

Determination of β -receptor agonists in animal urine
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2008-07-15 发布

2008-07-15 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畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：上海市兽药饲料检测所、浙江省饲料监察所、北京市饲料监察所。

本标准主要起草人：黄土新、王蓓、曹莹、李丹妮、严凤、张文刚、朱聪英、蒋音、应永飞、孙志文。

动物尿液中 11 种 β -受体激动剂的检测 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物尿液中克仑特罗、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、班布特罗等 11 种 β -受体激动剂的液相色谱—串联质谱测定方法。

本标准适用于动物尿液中克仑特罗等 11 种 β -受体激动剂的测定。方法检测限为 0.1 ng/mL, 定量限为 0.2 ng/mL。

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 原理

样品经氢氧化钠溶液调节 pH,叔丁醇、叔丁基甲醚混合溶液萃取并浓缩后用固相萃取小柱净化,洗脱液浓缩后用含 0.2%甲酸的水溶液溶解,供液相色谱—串联质谱仪进行检测,内标法定量。

4 试剂和材料

除方法另有规定外,试剂均为分析纯,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:色谱纯。
- 4.3 氢氧化钠。
- 4.4 叔丁醇。
- 4.5 叔丁基甲醚。
- 4.6 氨水。
- 4.7 叔丁醇—叔丁基甲醚(60:40)提取液:取叔丁醇 60 mL,叔丁基甲醚 40 mL 混匀。
- 4.8 氢氧化钠溶液(5 mol/L):称取氢氧化钠 10g,溶于 50 mL 水中。
- 4.9 0.2%甲酸水溶液:取甲酸 1 mL,加水定容至 500 mL。
- 4.10 5%氨水甲醇溶液:取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。
- 4.11 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、班布特罗对照品:纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.12 β -受体激动剂贮备液配制:分别精密称取 11 种 β -受体激动剂类药物对照品,用甲醇配成浓度各约为 1 mg/mL 的标准贮备液,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存,有效期 6 个月。
- 4.13 混合对照品工作液:分别吸取 11 种 β -受体激动剂贮备液,置于一棕色容量瓶中,用 0.2%甲酸水溶液稀释成浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品工作液。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存,有效期 1 个月。
- 4.14 同位素内标:克仑特罗-D9、沙丁胺醇-D3、莱克多巴胺-D5,纯度 $>92\%$ 。

- 4.15 同位素内标贮备液:分别取三种同位素内标,用甲醇配成三份浓度各约为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的贮备液。
- 4.16 同位素内标工作液:将上述同位素内标贮备液用 0.2%甲酸水溶液稀释成 40 ng/mL 的混合工作液。
- 4.17 固相萃取小柱:混合型阳离子交换柱,1 $\text{mL}/30 \text{ mg}$,或其他性能类似的小柱。
- 4.18 氮气:纯度 99.99%。

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 旋转蒸发器。
- 5.3 离心机:转速大于 7 000 r/min 。
- 5.4 旋涡振荡器。
- 5.5 滤膜:0.22 μm ,水系。
- 5.6 天平:感量 0.000 1 g 。
- 5.7 微量移液器:100 μL 。

6 试样制备

供试样品置于 -18°C 以下冷冻保存,使用前放至室温,如有混浊,离心后取上清液备用。

7 操作方法

7.1 提取

取备用液(6)5.0 mL 于 50 mL 离心管中,添加内标工作液 100 μL (4.16),充分混匀。用 5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.8)调节 pH 至 9~10,加提取液(4.7)10 mL 充分振荡,7 000 r/min 离心 10 min ,将上清液转移至梨形瓶中,重复提取一次,合并上清液,旋转蒸发(40°C)至干。用 0.2%甲酸水溶液(4.9)1.0 mL 溶解残余物,备用。

7.2 净化

固相萃取小柱先用 1 mL 甲醇,1 mL 水活化。备用液(7.2)过柱,用 1 mL 0.2%甲酸水溶液(4.9)和 1 mL 甲醇淋洗,空气抽干 2 min ,用 5%氨水甲醇溶液(4.10)3 mL 洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发(50°C)至干,用 1.0 mL 0.2%甲酸水溶液(4.9)溶解,经 0.22 μm 滤膜过滤后进样测定。

8 液相色谱-串联质谱测定

8.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} 100 $\text{mm}\times 2.1 \text{ mm}$,粒径 1.7 μm 。或其他效果等同的 C_{18} 柱。
- b) 柱温: 40°C 。
- c) 进样量:5 μL 。
- d) 流动相:甲醇:0.2%甲酸溶液=50:50。
- e) 流速:0.2 mL/min 。

8.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾正离子源。
- b) 检测方式:多反应监测。
- c) 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。

- d) 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。
e) 定性离子对、定量离子对及对应的保留时间、锥孔电压和碰撞能量见表 1。

表 1 11 种 β -受体激动剂及三种内标的定性、定量离子对及保留时间、锥孔电压、碰撞电压的参考值

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	保留时间 min	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
西马特罗 (Cimaterol)	219.8>202.0	219.8>159.7	1.24	16	10
	219.8>159.7				16
马布特罗 (Mabuterol)	310.8>236.9	310.8>236.9	1.78	26	16
	310.8>216.9				25
西布特罗 (Cimbuterol)	233.8>159.7	233.8>159.7	1.26	23	16
	233.8>215.9				10
溴布特罗 (Brombuterol)	366.7>292.7	366.7>292.7	1.72	25	19
	366.7>348.8				12
莱克多巴胺 (Ractopamine)	301.9>163.8	301.9>163.8	1.32	26	17
	301.9>120.7				22
氯丙那林 (Clorprenaline)	213.9>153.8	213.9>153.8	1.58	25	17
	213.9>195.9				12
特布他林 (Terbutaline)	225.8>151.8	225.8>151.8	1.24	25	17
	225.8>124.7				21
齐帕特罗 (Zilpaterol)	261.8>243.8	261.8>184.7	1.25	24	13
	261.8>184.7				24
沙丁胺醇 (Salbutamol)	240.2>148.0	240.2>148.0	1.24	22	20
	240.2>222.3				10
克仑特罗 (Clenbuterol)	276.7>202.7	276.7>202.7	1.54	25	17
	276.7>258.8				11
班布特罗 (Bambuterol)	367.9>293.9	367.9>293.9	1.69	25	17
	367.9>71.7				30
莱克多巴胺- D5 (Ractopamine - D5)	306.9>166.8	306.9>166.8	1.33	27	17
沙丁胺醇- D3 (Salbutamol - D3)	242.9>150.8	242.9>150.8	1.25	23	20
克仑特罗- D9 (Clenbuterol - D9)	285.8>203.9	285.8>203.9	1.55	25	15

8.3 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 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 $\pm 2.5\%$ 之内, 且样品谱图中各组分定性离子的相对离子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离子丰度进行比较, 若偏差不超过表 2 规定的范围, 则可判定为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误差(%)

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

8.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对混合对照品工作液进样,以标准溶液中被测组分峰与内标物面积的比值为纵坐标,对照品工作液中被测组分浓度为横坐标绘制工作曲线,用工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。克仑特罗、西马特罗、西布特罗、马布特罗、溴布特罗、班布特罗用克仑特罗-D9 内标定量,莱克多巴胺、氯丙那林用莱克多巴胺-D5 内标定量,沙丁胺醇、齐帕特罗、特布他林用沙丁胺醇-D3 内标定量。上述色谱和质谱条件下,克仑特罗等 11 种 β-受体激动剂对照品的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

8.5 平行试验

按上述步骤,对同一样品进行平行试验测定。

8.6 回收率试验

本标准线性工作范围为:0.2 ng/mL~50 ng/mL。

阴性样品中添加对照品工作液,按样品制备步骤操作,测定后计算样品添加的回收率。在 0.2 ng/mL~10 ng/mL 浓度范围内的添加回收率为 50%~100%。

9 计算

试样中每种 β-受体激动剂的含量以质量分数 X 计,数值以纳克每毫升(ng/mL)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{m_1}{m} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m_1 ——试样的色谱峰对应的某一种 β-受体激动剂的质量,单位为纳克(ng);

n ——试样的稀释倍数;

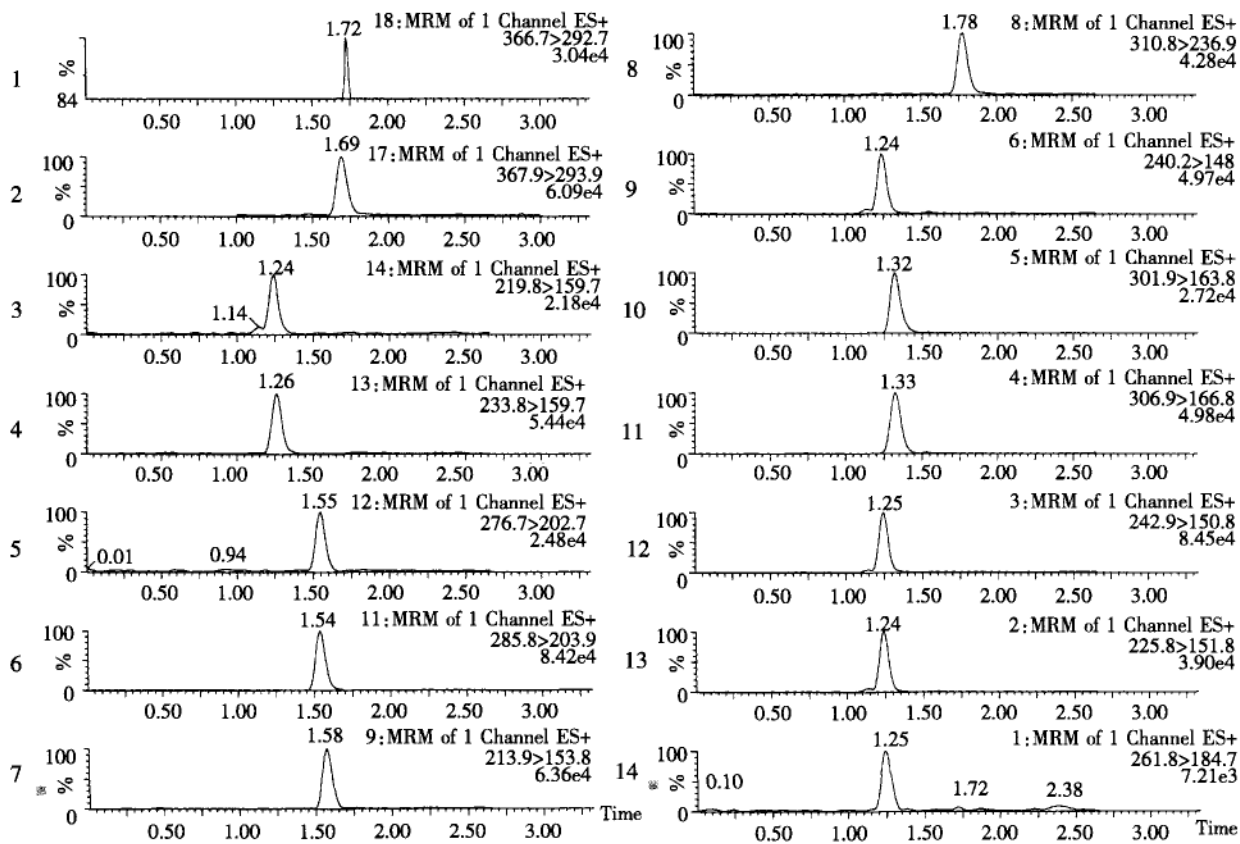
m ——试样的体积,单位为毫升(mL)。

10 重复性

在同一实验室由同一操作人员完成的两个平行测定的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)

克仑特罗等 11 种 β -受体激动剂和内标对照品的液相色谱—串联质谱图(MRM 图)



1. 溴布特罗
2. 班布特罗
3. 西马特罗
4. 西布特罗
5. 克仑特罗
6. 克仑特罗-D9
7. 氯丙那林

8. 马布特罗
9. 沙丁胺醇
10. 莱克多巴胺
11. 莱克多巴胺-D5
12. 沙丁胺醇-D3
13. 特布他林
14. 齐帕特罗

(β -受体激动剂的浓度为 2.0 ng/mL)

图 A.1 克仑特罗等 11 种 β -受体激动剂和内标对照品的 MRM 图

