

中华人民共和国国家标准

农业部 1879 号公告—1—2012

动物尿液中苯乙醇胺 A 的测定 液相色谱—串联质谱法

**Determination of phenylethanolamine A in animal urine—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry**

2012-12-24 发布

2012-12-24 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 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:农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)。

本标准主要起草人:柏凡、林顺全、高庆军、赵立军、王宇萍、徐素彬、冯娅、张静、廖峰。

动物尿液中苯乙醇胺 A 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苯乙醇胺 A 测定的制样和液相色谱—串联质谱测定方法。

本标准适用于动物尿液中苯乙醇胺 A 的测定。

本标准的检测限为 0.1 ng/mL, 定量限为 0.5 ng/mL。

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

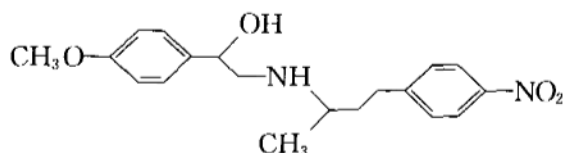
3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

苯乙醇胺 A phenylethanolamine A

化学命名为 2-[4-(4-硝基苯基)丁基-2-基氨基]-1-(4-甲氧基苯基)乙醇。分子量为 344.17, 分子式为 $C_{19}H_{24}N_2O_4$, 英文名称 2-[4-(nitrophenyl)butan-2-ylamino]-1-(4-methoxy-phenyl)ethanol。化学结构式如下:



4 原理

试样中苯乙醇胺 A 残留物经酶解, 离心后将上清液调 pH, 用乙酸乙酯提取, 再经固相萃取柱净化, 吹干浓缩后用高效液相色谱—串联质谱法测定, 内标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明, 在分析中仅使用分析纯的试剂。色谱分析用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

- 5.1 甲醇: 色谱纯。
- 5.2 乙酸。
- 5.3 氢氧化钠。
- 5.4 氨水。
- 5.5 甲酸。
- 5.6 乙酸乙酯。
- 5.7 甲酸水溶液: 2%。

- 5.8 NaOH 溶液(5 mol/L):称取氢氧化钠 2 g,溶解于 10 mL 水中。
- 5.9 氨水甲醇溶液:5%。
- 5.10 乙酸铵缓冲液(2 mol/L):称取乙酸铵 15.4 g,溶解于 1 000 mL 水中,用适量乙酸调 pH 至 5.2。
- 5.11 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(β -Glucuronidase/aryl sulfatase): β -盐酸葡萄糖醛苷酶活性约 30 U/mL;芳基硫酸酯酶活性约 60 U/mL。
- 5.12 苯乙醇胺 A 及苯乙醇胺 A-D₃对照品:纯度均大于 99.0%。
- 5.13 标准储备液:准确称取适量苯乙醇胺 A 对照品,用甲醇溶解、定容至 100 mL。此储备液浓度为 200.0 μ g/mL,密封贮于-20℃冰箱内,有效期为 3 个月。
- 5.14 标准中间液:准确吸取适量苯乙醇胺 A 储备液,用甲醇溶解、定容至 100 mL。此中间液浓度为 2.0 μ g/mL,密封贮于-20℃冰箱内,有效期为 3 个月。
- 5.15 内标储备液:准确称取适量的苯乙醇胺 A-D₃对照品,用甲醇配制成 100.0 μ g/mL 的标准储备液,密封贮于-20℃冰箱内,有效期为 3 个月。
- 5.16 内标工作液:准确吸取适量的苯乙醇胺 A-D₃内标储备液,用甲醇稀释成 100.0 ng/mL 的内标工作液,密封贮于-20℃冰箱内,有效期为 3 个月。
- 5.17 固相萃取柱:混合型阳离子交换柱(60 mg/3 mL)或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱—串联质谱仪(带电喷雾离子源)。
- 6.2 分析天平:感量为 0.1 mg。
- 6.3 离心机:转速为 10 000 r/min 以上。
- 6.4 超纯水器。
- 6.5 电热恒温振荡水槽。
- 6.6 涡旋混合器。
- 6.7 振荡器。
- 6.8 密封盖塑料离心管:50 mL。
- 6.9 pH 计。
- 6.10 0.22 μ m 有机滤膜。
- 6.11 氮吹仪。
- 6.12 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 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。
- 各试样使用前放置室温,如有混浊,离心后取上清液备用。

7.2 试样保存

将试样于-18℃冷冻保存。

8 操作步骤

8.1 酶解

准确量取 5.0 mL 试样(7.1)于 50 mL 离心管,加入乙酸铵缓冲液(5.10)0.5 mL,再加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(5.11)50 μ L,涡旋混匀,于 37°C 下避光水浴震荡 16 h。

8.2 提取

酶解后,添加 100.0 ng/mL 的内标工作液(5.16)100 μ L 于待测样品中,涡旋混匀。用 NaOH 溶液(5.8)调 pH 至 9.8 ± 0.2 ,加入乙酸乙酯 10 mL,再加入固体氯化钠 1.5 g~2 g 饱和水相,涡旋后振摇 10 min,10 000 r/min 离心 5 min。取上清液于另一 50 mL 离心管内,再用乙酸乙酯 10 mL 重复提取一次。合并上清液,50°C 下氮气吹干,用乙酸铵溶液(5.10)5 mL 溶解,备用。

8.3 净化

固相萃取柱依次用甲醇 3 mL,水 3 mL 活化,取备用液全部过柱;再依次用水 3 mL、2%甲酸水溶液 3 mL、甲醇 3 mL 淋洗,减压抽干;用 5%氨水甲醇(5.9)3 mL 溶液洗脱,洗脱液在 50 °C 下用氮气吹干。

残余物用甲醇—0.2%甲酸水溶液(5+95)0.5 mL 溶解,过 0.22 μ m 滤膜后,上机测定。

8.4 标准曲线的制备

精密量取适量的苯乙醇胺 A 标准中间液,用甲醇—0.2%甲酸水溶液(5+95)定容,制得 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL 各系列工作液(内标浓度均为 10.0 ng/mL)供高效液相色谱—串联质谱测定。

8.5 液相色谱—串联质谱测定

8.5.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 2.4 μ m;或性能类似的色谱柱。

流动相:A 相为乙腈;B 相为 0.2% 甲酸水溶液。梯度洗脱条件见表 1。

流速:0.2 mL/min。

柱温:30°C。

进样量:5 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间,min	A 相,%	B 相,%
0	20	80
5.0	80	20
5.1	20	80
9.0	20	80

8.5.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源;

扫描方式:正离子扫描;

检测方式:多反应检测;

毛细管电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度;

定性离子对、定量离子对等参数见表 2。

表 2 苯乙醇胺 A 及内标的定性、定量离子对及碰撞能量参考值

名称	定性离子对,m/z	定量离子对,m/z	参考碰撞能量,V
苯乙醇胺 A	345/327	345/327	10
	345/150		20
苯乙醇胺 A-D ₃	348/330	348/330	10

8.5.3 定性测定

在相同试验条件下,样品中待测物的保留时间与标准工作液的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 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标准工作溶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 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	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

8.5.4 定量测定

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苯乙醇胺 A 及内标苯乙醇胺 A-D₃ 的峰面积之比均应在仪器检测的线性范围之内。对照溶液多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

9 结果计算和表示

9.1 结果计算

9.1.1 单点校准时,试样溶液中相应苯乙醇胺 A 的浓度按式(1)计算:

$$C_i = \frac{\Lambda_i \times \Lambda'_{is} \times C_s \times C_{is}}{\Lambda_{is} \times \Lambda_s \times C'_{is}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- C_i ——试样溶液中相应苯乙醇胺 A 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_{is} ——试样溶液中相应苯乙醇胺 A 内标的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_s ——对照溶液中相应苯乙醇胺 A 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C'_{is} ——对照溶液中相应苯乙醇胺 A 内标的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- Λ_i ——试样溶液中相应苯乙醇胺 A 的峰面积;
- Λ_{is} ——试样溶液中相应苯乙醇胺 A 内标的峰面积;
- Λ_s ——对照溶液中相应苯乙醇胺 A 的峰面积;
- Λ'_{is} ——对照溶液中相应苯乙醇胺 A 内标的峰面积。

9.1.2 标准曲线校准时,先按式(2)求出 a 和 b,再按式(3)计算试样溶液中相应苯乙醇胺 A 的浓度。

$$\frac{\Lambda_i}{\Lambda'_{is}} = a \frac{C_i}{C'_{is}} + b \dots\dots\dots (2)$$

$$C_i = \frac{C'_{is}}{a} \left(\frac{\Lambda_i}{\Lambda'_{is}} - b \right) \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- a ——标准曲线的斜率;
- b ——标准曲线的截距。

9.1.3 试样中苯乙醇胺 A 的残留量按式(4)计算:

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

式中:

- X ——试样中苯乙醇胺 A 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)。

9.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

10 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)

苯乙醇胺 A 标准液相色谱—串联质谱图(MRM 色谱图)

苯乙醇胺 A(2.0 ng/mL)标准液相色谱—串联质谱图(MRM 色谱图,其中 348.2→330.0 谱图为内标物色谱图)见图 A.1。

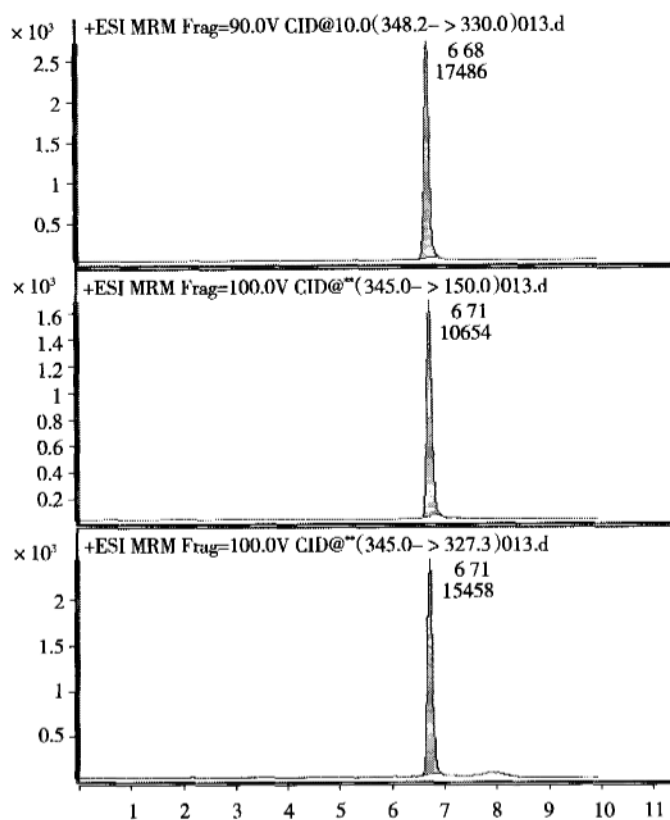


图 A.1 苯乙醇胺 A(2.0 ng/mL)标准液相色谱—串联质谱图