

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告—18—2008

动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测 液相色谱-串联质谱法

Determination of β -agonists residues in animal derived food
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

β 2- α p- β 1-0341
20/6
2008

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

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、朱永林、张骊、汪霞。

动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪肝、猪肉、牛奶和鸡蛋中特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布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。

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

3.1.1 猪肝和猪肉

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎并使均质。

3.1.2 牛奶

取适量新鲜或冷冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

3.1.3 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

3.2 样品的保存

上述制备的猪肝、猪肉、牛奶和鸡蛋样品-20℃以下贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料中的残留药物经酶解，用高氯酸调 pH 后高速离心沉淀蛋白，上清液调 pH 后分别用乙酸乙酯和叔丁基甲醚(TBME)提取，再用 MCX 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定。

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 特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗对照品：纯度均大于 98.0%。

4.2.2 乙酸铵缓冲液(0.2 mol/L)：称取 15.4 g 乙酸铵，溶解于 1 000 mL 水中，用适量乙酸调 pH 至 5.2。

4.2.3 高氯酸：70%~72%。

4.2.4 高氯酸溶液：0.1 mol/L。

4.2.5 氢氧化钠溶液：10 mol/L。

- 4.2.6 乙酸乙酯。
- 4.2.7 叔丁基甲醚。
- 4.2.8 甲醇:色谱纯。
- 4.2.9 甲酸水溶液:2%。
- 4.2.10 氨水甲醇溶液:3%。
- 4.2.11 甲醇-0.1%甲酸溶液(10+90,V/V)。
- 4.2.12 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(β -Glucuronidase/aryl sulfatase)。
- 4.2.13 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取适量的特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗对照品,用甲醇分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,有效期为 6 个月。
- 4.2.14 混合标准储备液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确吸取 1.0 mL 的特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,有效期为 6 个月。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 液相色谱-串联质谱仪(带电喷雾离子源)。
- 4.3.2 涡旋振荡器。
- 4.3.3 高速离心机。
- 4.3.4 电热恒温振荡水槽。
- 4.3.5 pH 计。
- 4.3.6 固相萃取装置。
- 4.3.7 MCX 固相萃取柱:60 mg/3 mL。
- 4.3.8 氮吹仪。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

- 取均质的供试样品,作为供试试料。
- 取均质的空白样品,作为空白试料。
- 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

4.4.2 酶解

准确称取 2 g(精确到 0.01 g)测试样品于 50 mL 离心管内,加入 0.2 mol/L 乙酸铵溶液(pH=5.2) 8.0 mL,再加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 40 μL ,涡旋混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光水浴振荡 16 h。

4.4.3 提取

酶解后放置至室温,涡旋混匀,10 000 r/min 高速离心 10 min,倾出上清液于另一 50 mL 离心管内,加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液 5 mL,涡旋混匀,用高氯酸调 pH 至 1.0 ± 0.2 ,10 000 r/min 离心 10 min 后,将上清液转移至另一 50 mL 离心管内。用 10 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.5 ± 0.2 ,加入乙酸乙酯 15 mL,涡旋混匀,并振荡 10 min,5 000 r/min 离心 5 min,取出上层有机相至另一 50 mL 离心管内。再在下层水相中加入叔丁基甲醚 10 mL,涡旋混匀,并振荡 10 min,5 000 r/min 离心 5 min,合并有机相,50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,用 2%甲酸溶液 5 mL 溶解,备用。

4.4.4 净化

MCX 固相萃取柱依次用甲醇、水、2%甲酸溶液各 3 mL 活化,取备用液全部过柱,再依次用 2%甲酸溶液、甲醇各 3 mL 淋洗,抽干,用 3%氨水甲醇溶液 2.5 mL 洗脱;洗脱液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干。

残余物用甲醇—0.1%甲酸溶液(10+90, V/V)0.2 mL 溶解, 涡旋混匀, 15 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液适量, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.5 空白添加标准曲线的制备

分别精密量取 9 种 β -受体激动剂混合标准工作液适量, 添加到 2 g 空白试料中, 制得浓度为 0.25、0.5、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的各系列空白添加试料, 按 4.4.2~4.4.4 步骤操作, 供液相色谱-串联质谱测定。

4.4.6 测定

4.4.6.1 液相色谱参考条件

色谱柱: BEH C_{18} (50×2.1 mm, 1.7 μm), 或相当者;
 流动相: A 相: 0.1%甲酸乙腈溶液; B 相: 0.1%甲酸水溶液;
 梯度洗脱: 0 min~2 min, 维持 4%A; 2 min~12 min, 4%A 线性变化至 60%A; 12 min~12.1 min, 60%A 线性变化至 4%A; 12.1 min~16 min, 维持 4%A;
 流速: 0.3 mL/min;
 柱温: 30°C;
 进样量: 10 μL 。

4.4.6.2 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: 多反应监测;
 电离电压: 3.2 kV;
 源温: 110°C;
 雾化温度: 350°C;
 锥孔气流速: 50 L/h;
 雾化气流速: 650 L/h;
 药物保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 1。

表 1 9 种 β -受体激动剂保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
特布他林	1.94	226.15>124.67 226.15>151.74	226.15>151.74	25	22 15
西马特罗	1.98	220.18>201.95 220.18>129.77	220.18>201.95	20	10 16
沙丁胺醇	2.08	240.17>147.70 240.17>221.97	240.17>147.70	22	18 10
非诺特罗	3.83	304.15>134.61 304.15>106.59	304.15>106.59	35	18 30
氯丙那林	4.81	214.13>153.75 214.13>195.97	214.13>153.75	25	18 12
莱克多巴胺	4.96	302.33>106.77 302.33>163.87	302.33>163.87	25	28 15
克仑特罗	5.38	277.11>202.78 277.11>258.94	277.11>202.78	25	15 10
妥布特罗	5.39	228.22>153.90 228.22>171.88	228.22>153.90	25	15 12
喷布特罗	8.76	292.36>236.22 292.36>201.00	292.36>236.22	30	15 20

4.4.6.3 测定法

取试料溶液和空白添加标准溶液,作单点或多点校准,外标法计算,即得。试料溶液及空白添加标准溶液中特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试料溶液中的离子相对丰度与空白添加标准溶液中的离子相对丰度相比,符合表 2 的要求。对照溶液和空白添加标准溶液中各特征离子的质量色谱图分别见附录 A 中图 A.1~图 A.5。

表 2 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度(%)	允许偏差(%)
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

4.4.7 空白试验

取空白试料,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:
$$X = \frac{X_s A m_s}{A_s m} \dots\dots\dots (1)$$

或空白添加标准曲线校准:由 $A_s = aX_s + b$,

求得 a 和 b , 则
$$X = \frac{A - b}{a} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——供试试料中 β -受体激动剂残留量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

X_s ——空白添加试料中相应 β -受体激动剂浓度, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

A ——供试试料溶液中相应 β -受体激动剂峰面积;

A_s ——空白添加试料溶液中相应 β -受体激动剂峰面积;

m_s ——空白添加试料质量, g ;

m ——供试试料质量, g 。

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

特布他林、西马特罗、沙丁胺醇、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克仑特罗、妥布特罗和喷布特罗在猪肝、猪肉、牛奶和鸡蛋中的检测限为 $0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,用空白添加标准校正,其回收率范围为 $70\% \sim 120\%$ 。

5.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

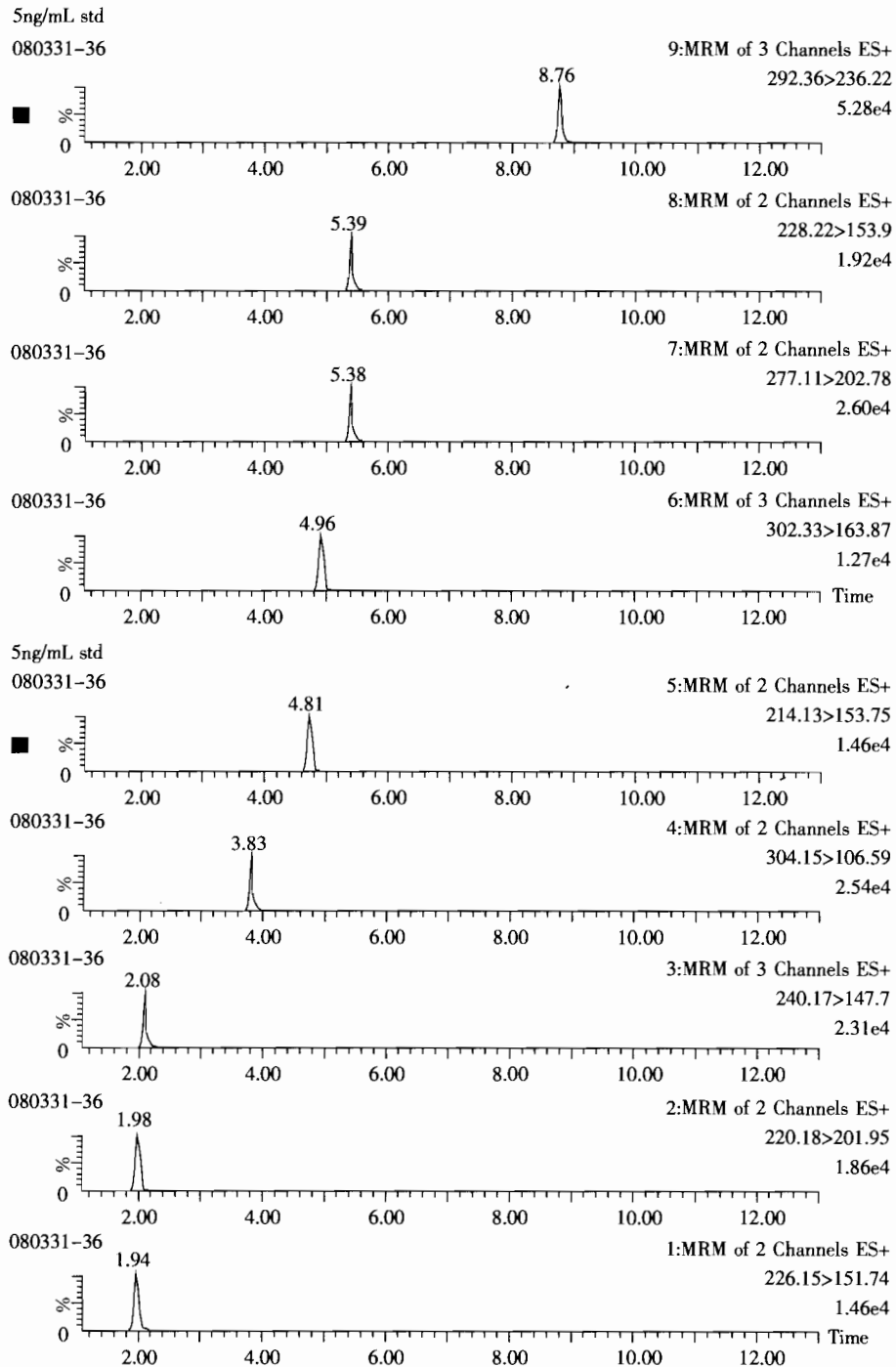


图 A. 1 5 ng/mL 混合标液中 9 种 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

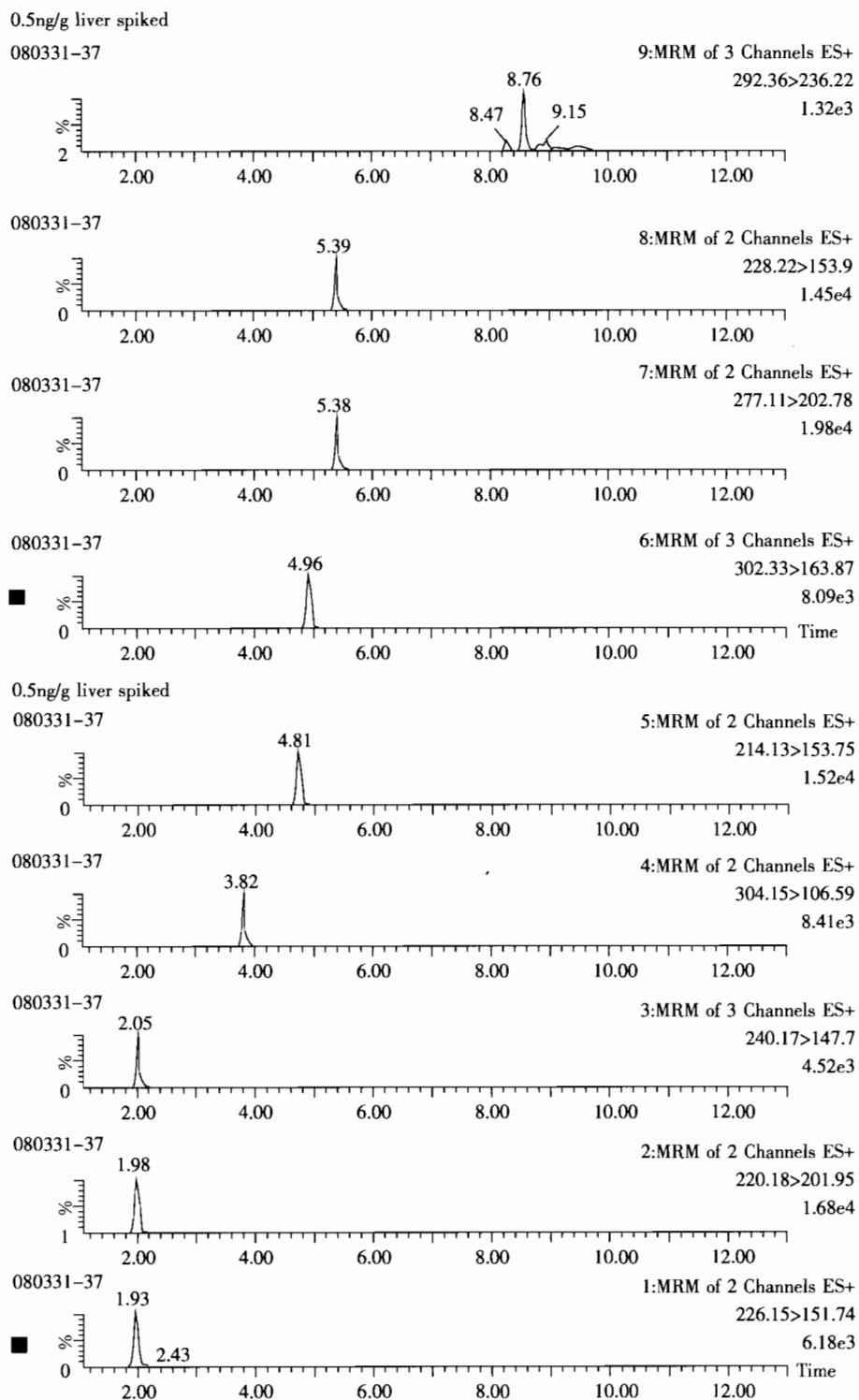


图 A. 2 0.5 ng/g 空白猪肝添加试液中 9 种 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

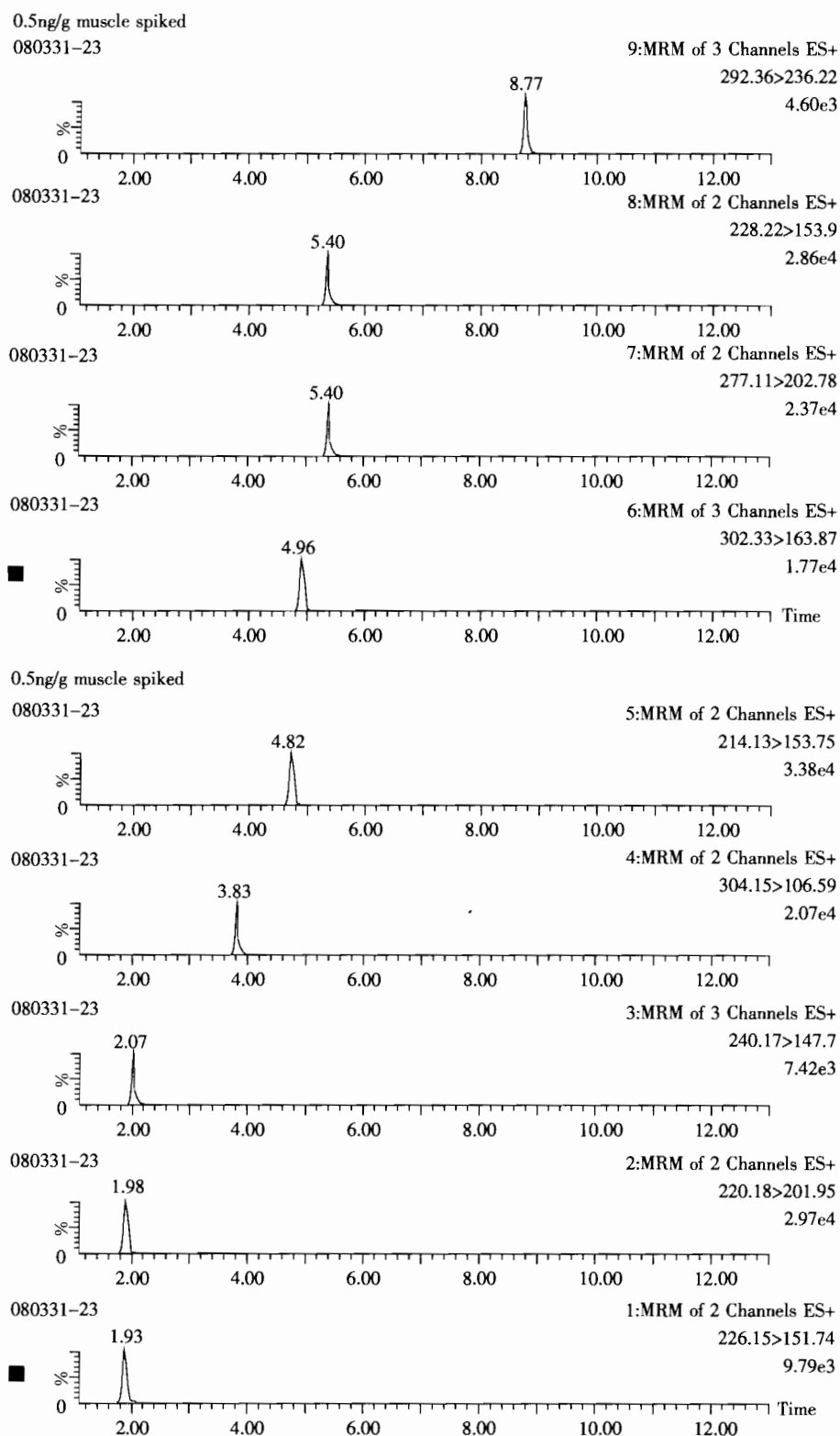


图 A.3 0.5 ng/g 空白猪肉添加试液中 9 种 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

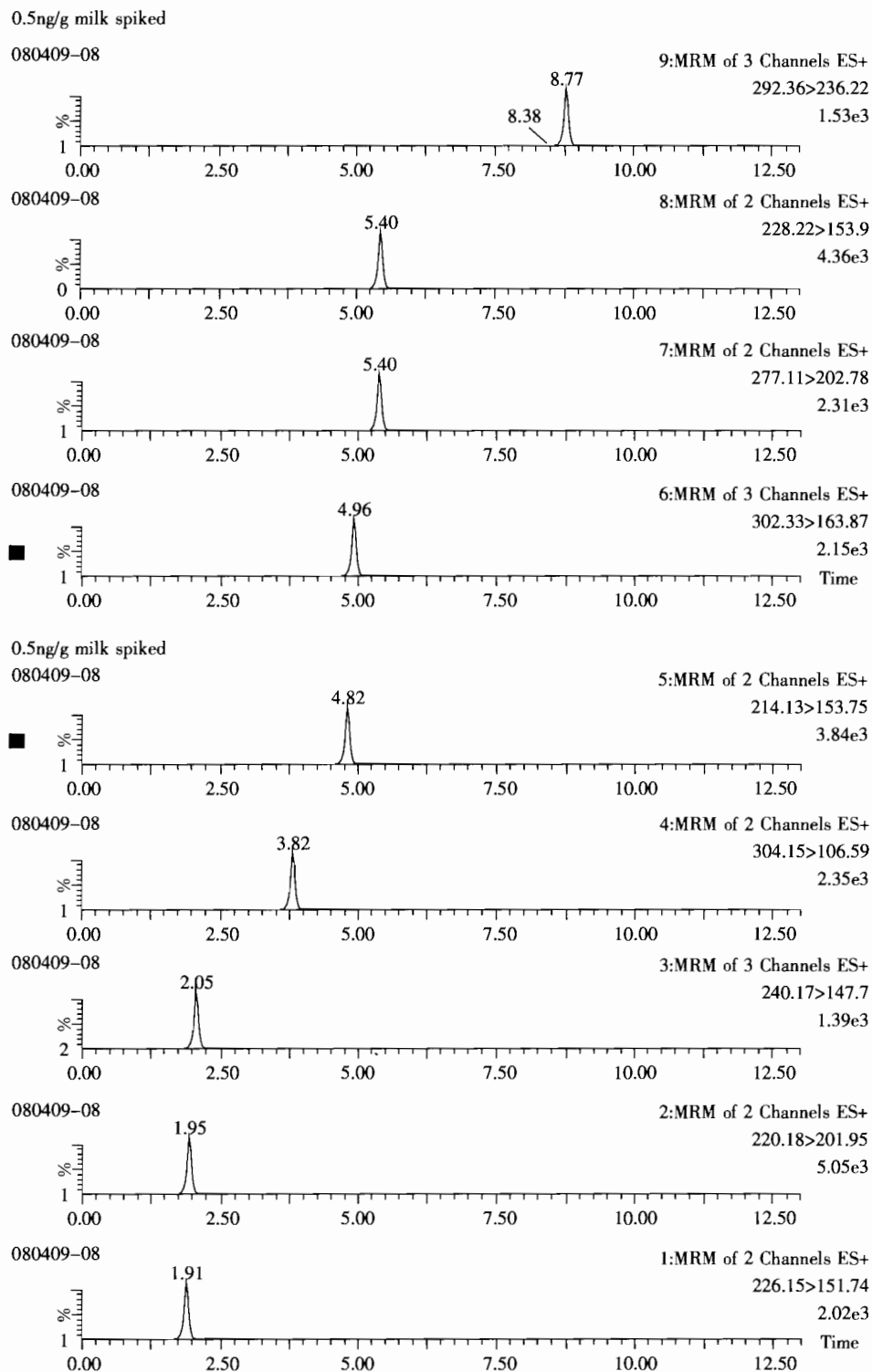


图 A. 4 0.5 ng/g 空白牛奶添加试液中 9 种 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

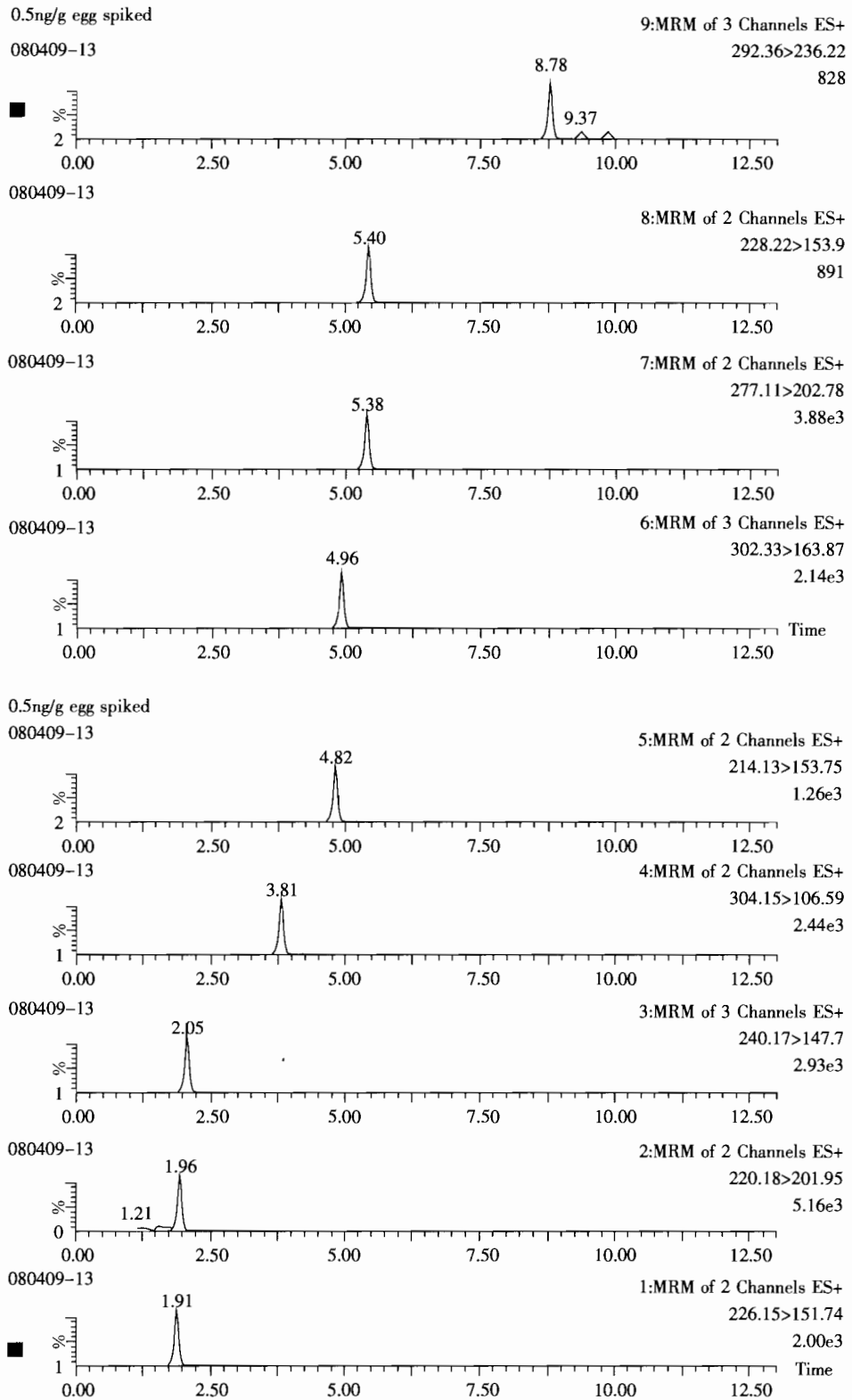


图 A.5 0.5 ng/g 空白鸡蛋添加试液中 9 种 β -受体激动剂特征离子质量色谱图

农业部 1025 号公告—18—2008

- 注:1. 特布他林特征离子质量色谱图(226.15>151.74);
2. 西马特罗特征离子质量色谱图(220.18>201.95);
3. 沙丁胺醇特征离子质量色谱图(240.17>147.70);
4. 非诺特罗特征离子质量色谱图(304.15>106.59);
5. 氯丙那林特征离子质量色谱图(214.13>153.75);
6. 莱克多巴胺特征离子质量色谱图(302.33>163.87);
7. 克伦特罗特征离子质量色谱图(277.11>202.78);
8. 妥布特罗特征离子质量色谱图(228.22>153.90);
9. 喷布特罗特征离子质量色谱图(292.36>236.22)。
-