



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1924—2007

进出口动物源食品中克伦特罗、 莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林残留量 的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of clenbuterol, ractopamine, salbutamol and
terbutalin residues in foodstuffs of animal origin for import and
export—HPLC-MS/MS method

2007-05-23发布

2007-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国河南出入境检验检疫局、中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：邓晓军、朱坚、郭德华、李波、杨冀州、戴华、陈惠兰、郭俊峰、王美玲、陈墨莲。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口动物源食品中克伦特罗、 莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林残留量 的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林残留量的制样和测定方法。

本标准适用于动物源性食品肌肉和内脏中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林残留量的检测。

2 试样制备与保存

2.1 试样制备

从所取全部样品中取出有代表性样品约500g,充分绞碎,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封作为试样,标明标记。在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

2.2 试样保存

将试样于-18℃保存。

3 方法提要

试样中的药物残留采用pH5.2 的乙酸铵缓冲溶液提取,同时加入β 盐酸葡萄糖醛基转移酶-芳基硫酸酯酶进行酶解后,提取液经C₁₈和 SCX 双 SPE 柱净化,液相色谱-质谱进行测定,内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定,均使用分析纯试剂,水为超纯水。

4.1 甲醇:液相色谱级。

4.2 乙腈:液相色谱级。

4.3 乙酸铵。

4.4 乙酸乙酯。

4.5 氢氧化铵。

4.6 盐酸。

4.7 甲酸。

4.8 冰乙酸。

4.9 β 盐酸葡萄糖醛基转移酶-芳基硫酸酯酶:含β 盐酸葡萄糖醛基转移酶134600 U/mL,芳基硫酸酯酶5200 U/mL。

- 4.10 乙酸铵缓冲溶液：0.02 mol/L,pH=5.2。 溶解1.54 g 乙酸铵于900 mL 水中，用冰乙酸调节 pH 到 5.2 ± 0.1 ，最后用水稀释到1 L，于+4℃贮存，使用期为1个月。
- 4.11 乙酸乙酯-氢氧化铵(97+3, 体积比)。使用前搅拌，同时用超声波水浴超声使成均相。
- 4.12 盐酸溶液：0.03 mol/L。 取30 mL,1 mol/L的盐酸溶液用水稀释到1 L。
- 4.13 标准品：特布他林(分子式： $C_2H_9NO_3$,CAS 号：23031-25-6)、克伦特罗(分子式： $C_{21}H_{19}Cl_2N_2O$ CAS 号：37148-27-9)、D₉-克伦特罗、沙丁胺醇(分子式： $C_9H_{17}NO_3$ CAS 号：18559-94-9)、D₃-沙丁胺醇、

莱克多巴胺(分子式 $C_{11}H_{23}NO_3$ CAS 号: 97825-25-7)、 D_3 -莱克多巴胺纯度 $\geq 98\%$ 。

4.14 标准储备液的配制(1.0 mg/mL): 分别称取约50 mg(± 0.1 mg) 的特布他林、莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇标准品于50 mL 容量瓶中, 用少量甲醇溶解, 然后用甲醇配成1.0 mg/mL 标准储备溶液。低于5℃保存, 有效期为1年。

4.15 同位素内标标准储备液的配制(1.0 mg/mL): 分别称取约50 mg(± 0.1 mg) 的 D_9 -克伦特罗、 D_3 -沙丁胺醇、 D_3 -莱克多巴胺标准品于50 mL 容量瓶中, 用少量甲醇溶解, 然后用甲醇配成1.0 mg/mL 标准储备溶液。低于5℃保存, 有效期为1年。

4.16 混合标准中间溶液的配制: 用甲醇分别稀释标准储备液至终浓度约为1.0 μ g/mL 和100.0 ng/mL, 低于5℃保存, 有效期为6个月。

4.17 混合同位素内标标准中间溶液的配制: 用甲醇分别稀释同位素内标标准储备液至终浓度约为100.0 ng/mL, 低于5℃保存, 有效期为6个月。

4.18 标准工作液的配制: 根据需要, 临用时吸取一定量的混合标准中间溶液(4.16)和混合同位素内标中间标准溶液(4.17), 用水稀释配制适当浓度的混合标准工作溶液(参考线性浓度范围为0.5 ng/mL ~10 ng/mL), 每毫升该混合标准工作溶液含有同位素内标各1.0 ng。低于5℃保存, 有效期为6个月。

4.19 CSPE 柱: LC-18 Sep Pak 500 mg, 3 mL或相当者。

4.20 SCX SPE柱: LC-SCX Sep Pak 500 mg, 3 mL或相当者。

4.21 水相滤膜: 0.45 μ m。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾(ESI) 离子源。

5.2 涡旋混合器。

5.3 离心机: 转速 ≥ 4000 r/min。

5.4 旋转蒸发器。

5.5 感量天平(0.1 mg 和0.01 g)。

5.6 超声波发生器。

5.7 恒温箱。

5.8 真空过柱装置。

5.9 吹氮浓缩装置。

5.10 粉碎机。

6 测定步骤

6.1 提取

称取10 g(精确至0.1g) 试样, 于50 mL 塑料离心管中, 加入20 mL pH 为5.2的乙酸铵缓冲溶液(4.10), 在2000 r/min 下涡旋混合2 min。添加200.0 μ L 同位素内标物(4.17)于待测样品中。加50 μ L的 β 盐酸葡萄糖醛酰酶-芳基硫酸酯酶, 加盖后超声提取15 min。在恒温箱中于37℃酶解16 h。以3800 r/min离心10 min 后, 将上清液过0.45 μ m滤膜(4.21)取5 mL 滤液于10 mL 带刻度的玻璃试管。

6.2 净化

将C 小柱(4.19)和 SCX(4.20) 小柱按从上到下的次序装好。依次用5 mL 水、5 mL 甲醇和5 mL 0.03 mol/L 盐酸(4.12)溶液以1.0 mL/min 的流速过柱活化。转移过滤后的提取液至固相层析柱的

顶部，以0.5mL/min 流速过固相层析柱，此步操作至少需要10 min。用 5mL 水、5mL 甲醇淋洗小柱， 在较强的负压下抽10 min。取下 Cg 小柱。用12 mL 混合均匀的乙酸乙酯-氢氧化铵溶液 (4.11), 洗脱

SCX 柱子上的待分析成分并收集洗脱液，并在吹氮浓缩装置上于40℃±5℃的温度下蒸干。加入

1.0 mL乙腈+水(1+9)振荡溶解残渣后过0.45 μm 滤膜。滤液供液相色谱-质谱测定。

6.3 测定

6.3.1 高效液相色谱条件

- a) 色谱柱: C_g 柱, 150 mm (柱长) × 2.1 mm (内径), 粒度5 μm ;
- b) 流动相: A: 乙腈+0.1%甲酸, B: 2 mmol/L乙酸铵水溶液+0.1%甲酸; 流速: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相比例/(%)	
	流动相 A	流动相 B
0	10	90
5	50	50
7	50	50
8	10	90
12	10	90

- c) 柱温: 35℃;
- d) 进样量: 30 μL 。

6.3.2 质谱条件

- a) 离子源: 电喷雾 ESI, 正离子;
- b) 扫描方式: 多反应监测 MRM;
- c) 雾化气压力(GS1)、气帘气压力(CUR)、辅助气流速(GS2) 均为高纯氮气或其他合适气体; 使用前应调节各气体流量以及离子源温度(TEM) 使质谱灵敏度达到检测要求, 详细条件参考附录A;
- d) 电喷雾电压(IS)、碰撞电压(CE)、去簇电压(DP)、碰撞室入口电压(EP)、碰撞室出口电压(CXP) 应优化至最佳灵敏度, 监测离子对和定量离子等详细条件参考附录 A。

6.3.3 定量测定

根据试样中被测物的药物含量, 选取响应值相近的标准工作液(4.18)同时进行分析。标准工作液和待测液中四种药物的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果含量超过标准曲线范围, 应用乙腈+水(1+9)稀释到合适浓度后分析。在上述色谱条件下的待测药物的参考保留时间分别为3.0 min(沙丁胺醇)、3.1 min(特布它林)、9.4 min(莱克多巴胺)和9.9 min(克伦特罗), 标准溶液的选择性离子流图参见附录 B。

6.3.4 定性测定

按照液相色谱-串联质谱条件测定样品和标准工作溶液, 如果检测的质量色谱峰保留时间与标准品一致, 定性离子对的相对丰度, 是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示, 应当与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致, 相对丰度允许偏差不超过表2规定的范围, 则可判断样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/(%)	>50	>20至50	>10至20	≤10
允许的相对偏差/(%)	±20	±25	±30	±50

6.4 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

7 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算样品中待测药物残留量。计算结果需扣除空白值。

$$X = \frac{c \times c_i \times A \times A_{wi} \times V}{c_{si} \times A_i \times A_s \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X—— 样品中待测组分残留量, 单位为毫克每千克(mg/kg);
- c—— 标准工作溶液中药物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c₄—— 样液中内标物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A—— 样液中药物的峰面积;
- A_w—— 标准工作溶液中内标物的峰面积;
- V—— 样品溶液最终定容体积, 单位为毫升(mL);
- c_y—— 标准工作溶液中内标物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i—— 样液中内标物的峰面积;
- A_s—— 标准工作溶液中药物的峰面积;
- m—— 最终样液代表的试样质量, 单位为克(g)。

注: 待测药物采用相对应的同位素作为内标, 特布他林采用同位素标记的沙丁胺醇作为内标。

8 测定低限、回收率

8.1 测定低限(LOQ)

本方法肉和肝的测定低限为0.0005 mg/kg。

8.2 回收率

8.2.1 肉中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林添加浓度及回收率试验数据见表3。

表 3 肉中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林回收率数据表

药物名称	添加浓度/ (μg/kg)	回收率范围/(%)	药物名称	添加浓度/ (μg/kg)	回收率范围/(%)
克伦特罗	0.5	73.4~96.4	沙丁胺醇	0.5	80.8~91.6
	1.0	98.5~126.5		1.0	104.7~110.9
	2.0	86.5~102.0		2.0	73.5~78.5
莱克多巴胺	0.5	90.6~98.8	特布他林	0.5	80.6~108.0
	1.0	91.7~108.9		1.0	90.0~97.3
	2.0	90.6~98.8		2.0	80.6~108.0

8.2.2 肝中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林添加水平及回收率试验数据见表4。

表 4 肝中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林回收率数据表

药物名称	添加浓度/ (μg/kg)	回收率范围/(%)	药物名称	添加浓度/ (μg/kg)	回收率范围/(%)
克伦特罗	0.5	94.6~100.8	沙丁胺醇	0.5	77.2~89.8
	1.0	78.3~98.4		1.0	77.3~92.0
	2.0	90.5~99.0		2.0	73.5~80.0

莱克多巴胺	0.5	96.4~100.4	特布他林	0.5	77.2~90.6
	1.0	95.5~122.0		1.0	80.5~94.9
	2.0	92.0~108.5		2.0	73.0~79.5

附录 A'
(资料性附录)
质谱参数

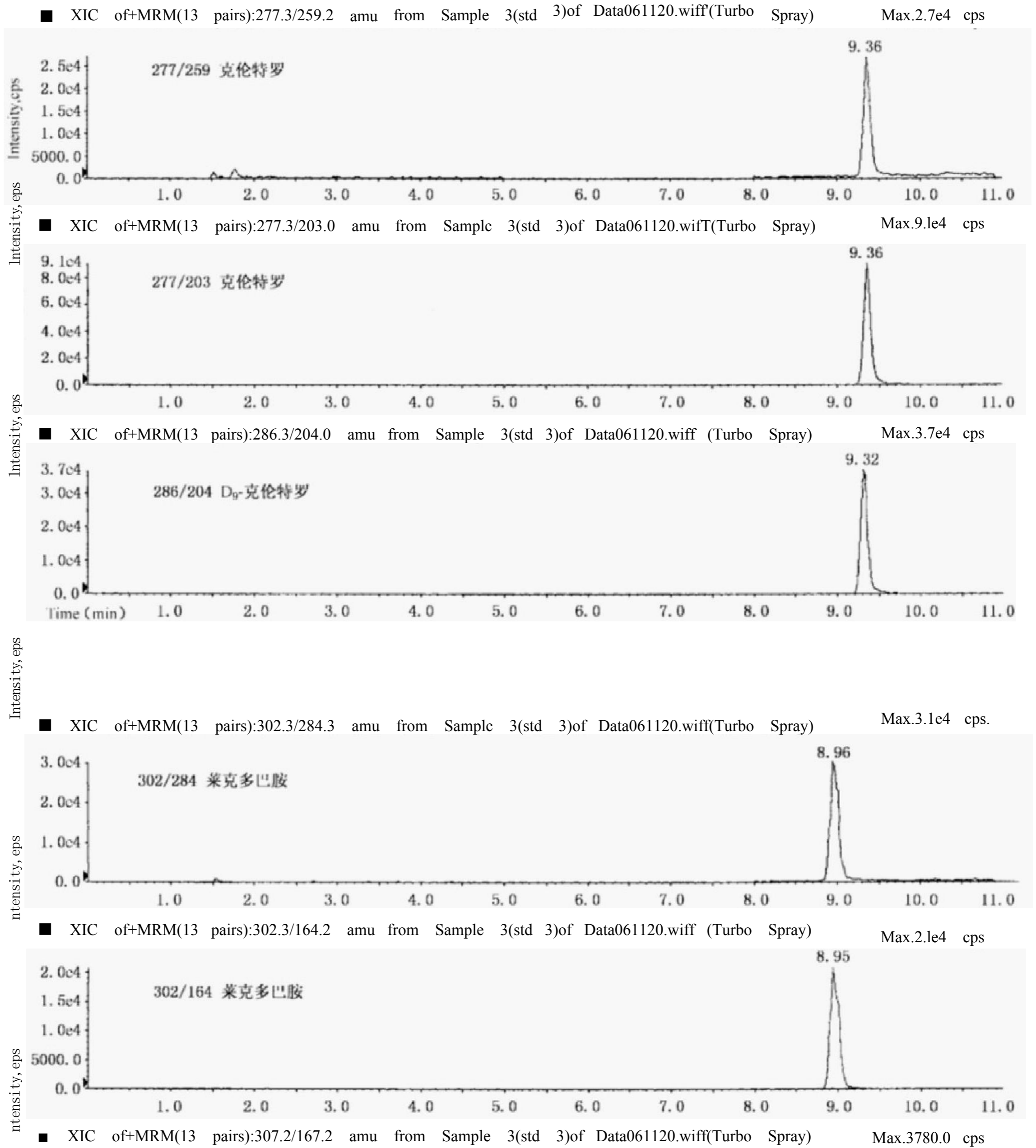
- a) 电喷雾电压(IS):5500 V;
 b) 雾化气压力(GS1):50 Pa;
 c) 气帘气压力(CUR):20 Pa;
 d) 辅助气流速(GS2):30 Pa;
 e) 离子源温度(TEM):550°C;
 f) 碰撞电压(CE)、去簇电压(DP) 见表 A.1 所示。碰撞室入口电压(EP) 为10 V、碰撞室出口电压(CXP) 为13 V。

表 A.1 β -兴奋剂及内标碰撞电压、去簇电压参数表

	母离子(Q1)m/z	子离子(Q3)m/z	碰撞电压/V	去簇电压/V
克伦特罗	277.3	203.0*	18	45
		259.2	20	50
莱克多巴胺	302.3	164.2°	12	50
		284.3	22	50
沙丁胺醇	240.2	148.1°	25	55
		222.1	17	75
特布它林	226.2	152.1 ^a	23	48
		107.1	43	45
D ₃ -克伦特罗	286.3	204.0	16	75
D ₃ -莱克多巴胺	307.2	167.2	15	45
D ₃ -沙丁胺醇	243.2	151.1	22	55
a 为定量离子对。				

- 1) 附录所列参数是在API4000 质谱仪完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)
标准品 MRM 图谱



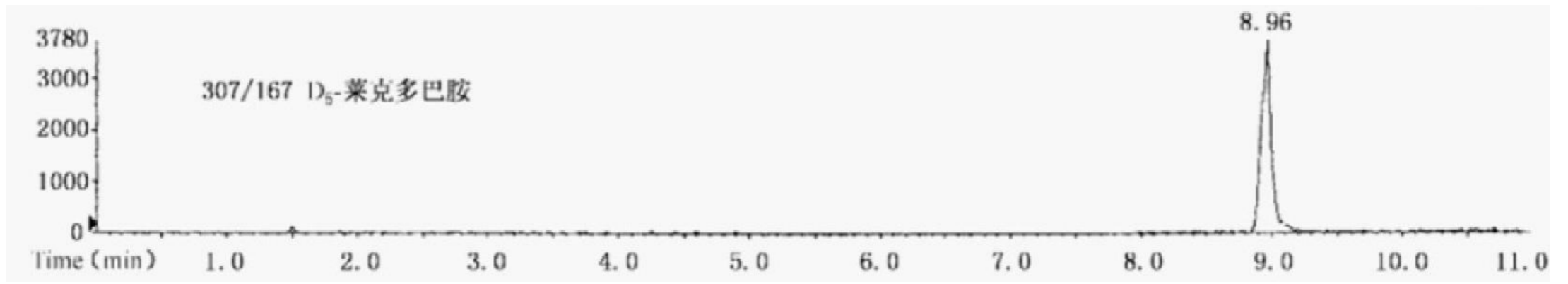


图 B.1 克仑特罗、莱克多巴胺标准品的多反应监测(MRM) 图谱

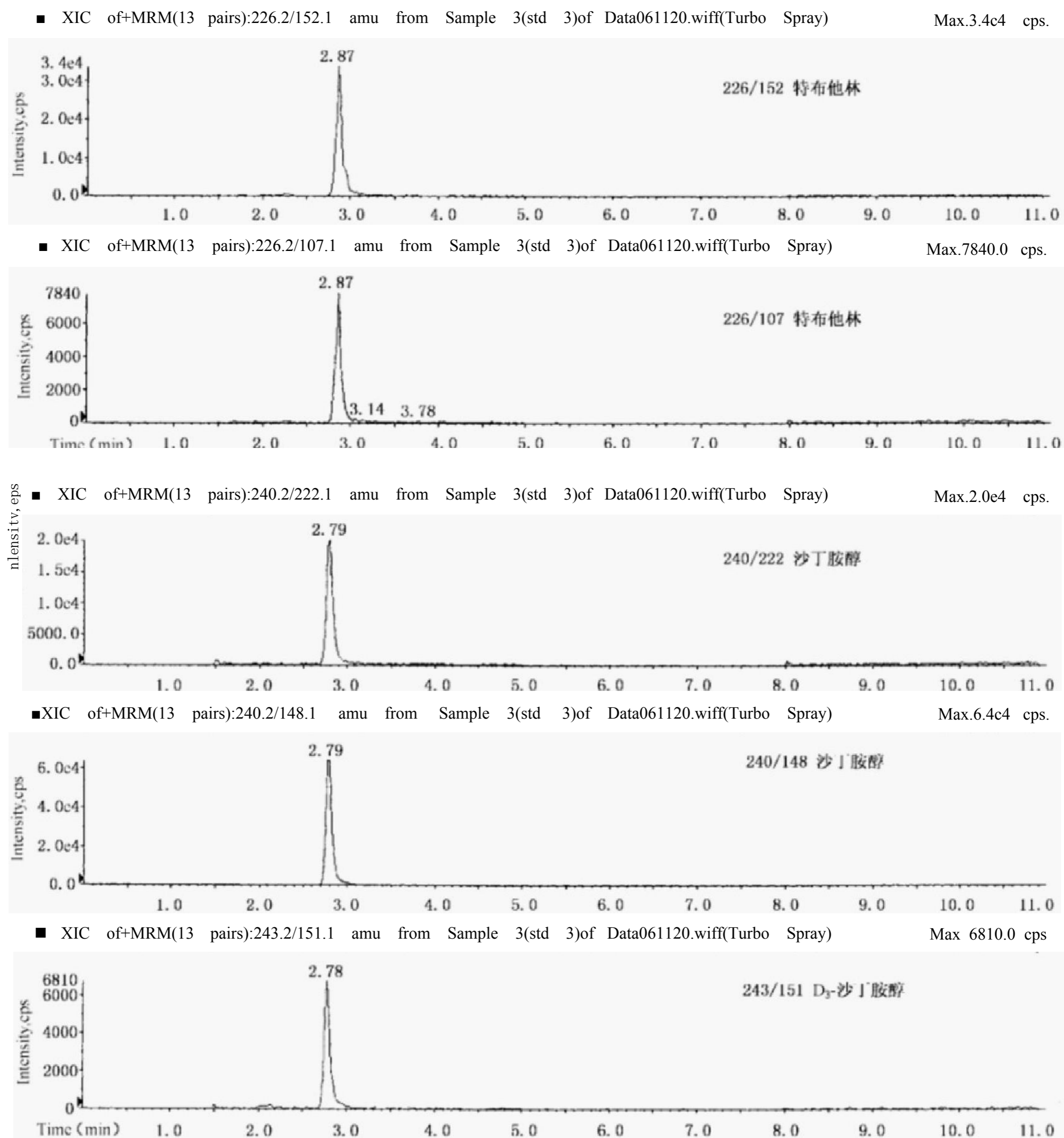


图 B.2 特布他林、沙丁胺醇标准品的多反应监测(MRM) 图谱

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：
<https://d.book118.com/188141036143006050>