

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3144—2017

饲料原料 血液制品中18种 β -受体激动剂的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 18 β -agonists in blood products feedstuff—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2017-12-22 发布

2018-06-01 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—2009 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:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人:索德成、王培龙、李阳、王瑞国、苏晓鸥、樊霞、周炜、冯三令、李宏。

饲料原料 血液制品中 18 种 β -受体激动剂的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料原料血液制品中 18 种 β -受体激动剂测定的液相色谱-串联质谱法。

本标准适用于血球蛋白粉、水解血粉、血球蛋白粉、血粉、发酵血粉中克仑特罗 (Clenbuterol)、沙丁胺醇 (Salbutamol)、莱克多巴胺 (Ractopamine)、齐帕特罗 (Zilpaterol)、氯丙那林 (Clorprenaline)、特布他林 (Terbutaline)、西马特罗 (Cimaterol)、西布特罗 (Cimbuterol)、马布特罗 (Mabuterol)、溴布特罗 (Brombuterol)、班布特罗 (Bambuterol)、克仑普罗 (Clenproperol)、妥布特罗 (Tulobuterol)、利托君 (Ritodrine)、沙美特罗 (Salmeterol)、克仑塞罗福莫特罗 (Formoterol)、苯乙醇胺 A (Phenylethanolamine A) 18 种 β -受体激动剂的测定。

本标准方法检出限为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料原料血液制品经酶解处理后, 用混合型阳离子固相萃取小柱净化, 吹干, 稀释液溶解, 液相色谱-串联质谱仪检测, 基质添加校正、外标法定量。

4 试剂

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯试剂, 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: 色谱级。
- 4.3 乙酸铵提取液 (pH=5.2): 取乙酸铵 15.4 g, 用 1 000 mL 水溶解, 用乙酸调 pH 至 5.2。
- 4.4 样品稀释溶液: 取甲酸 0.1 mL, 乙腈 10 mL, 加水 90 mL, 混匀。
- 4.5 氨水甲醇溶液: 取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混合。
- 4.6 高氯酸溶液: 取 30 mL 高氯酸与 70 mL 水混合。
- 4.7 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、克仑普罗、妥布特罗、利托君、沙美特罗、克仑塞罗、福莫特罗和苯乙醇胺 A 对照品: 纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.8 β -受体激动剂标准储备液: 分别精密称取各种 β -受体激动剂对照品至棕色容量瓶中, 用甲醇配成浓度为 $1\text{ mg}/\text{mL}$ 的标准储备液, $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存, 有效期 12 个月。
- 4.9 β -受体激动剂标准工作液: 分别精密吸取各种 β -受体激动剂储备液 (4.8), 用样品稀释溶液稀释

成浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。2℃~8℃冷藏保存,有效期 3 个月。

- 4.10 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶: β -盐酸葡萄糖醛苷酶 $\geq 85\,000\text{ u/mL}$ 。
- 4.11 氮气:纯度 99.9%。
- 4.12 固相萃取小柱:混合型阳离子交换柱(3 mL, 60 mg),或其他性能相当的小柱。
- 4.13 滤膜:0.22 μm ,有机材质。

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 氮吹仪。
- 5.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 5.4 粉碎机。
- 5.5 涡旋振荡器。
- 5.6 恒温水浴振荡摇床。
- 5.7 固相萃取装置。
- 5.8 天平:感量 0.01 g;感量 0.000 01 g。

6 采样和试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定抽取有代表性的样品,用四分法缩减取样,按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎过 0.45 mm 孔径筛,混合均匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中,准确加入 20 mL 乙酸铵提取液(4.3)和 50 μL β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶,37℃水解过夜(应大于 16 h),然后于 8 000 r/min 离心 5 min,将 10 mL 上清液转移至另一离心管中,加入 1.0 mL 高氯酸溶液,涡旋混合 30 s,然后于 8 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

7.2 净化

固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。取适量或全部上清液过柱,用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗,抽干,用氨水甲醇溶液 3 mL 洗脱,收集洗脱液,用氮吹仪在 50℃条件下吹干或用旋转蒸发仪蒸干,用 1.0 mL 样品稀释液(4.4)溶解,过 0.22 μm 滤膜。如果检测含量超出线性范围(1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$),应适当减少称样量重新处理或减少过固相萃取小柱的溶液量,将上机溶液所含药物的浓度稀释至线性范围内上样。

7.3 空白基质曲线的制备

选取待测样品类型相同的空白血粉样品,称取 6 份或 2 份双平行,每份 2 g(精确至 0.01 g),于 50 mL 离心管中,按 7.1 和 7.2 步骤处理,在净化、吹干后的残渣中,分别添加适量的混合标准工作溶液,配制不同浓度(1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$)的基质添加标准曲线或双平行单点标准溶液,供液相色谱-串联质谱测定,进行定量。

7.4 参考液相色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 1.7 μm (或其他效果等同的 C_{18} 柱)。

柱温:30℃。

进样量:10 μL 。

流动相及参考梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相及参考梯度洗脱程序

时间, min	流速, mL/min	0.1%甲酸溶液, %	乙腈, %	曲线
0	0.3	95	5	6
1.0	0.3	95	5	6
2.0	0.3	80	20	6
6.0	0.3	70	30	6
7.0	0.3	10	90	6
8.0	0.3	10	90	6
9.1	0.3	95	5	6
10	0.3	95	5	6

7.5 参考质谱条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子模式。

检测方式:多反应监测。

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。

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。

定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 18 种 β -受体激动剂的定性离子对、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量的参考值

被测物名称	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
西马特罗	220.1 > 202.1	220.1 > 202.1	16	10
	220.1 > 160.1			16
马布特罗	311.1 > 237.1	311.1 > 237.1	26	16
	311.1 > 217.1			25
西布特罗	234.2 > 162.0	234.2 > 162.0	23	16
	234.2 > 216.2			10
溴布特罗	367.0 > 293.0	367.0 > 293.0	25	19
	367.0 > 349.0			12
莱克多巴胺	302.4 > 164.4	302.4 > 164.4	26	17
	302.4 > 284.4			13
氯丙那林	214.0 > 154.1	214.0 > 154.1	25	17
	214.0 > 196.1			12
特布他林	226.3 > 152.3	226.3 > 152.3	25	17
	226.3 > 170.3			12
齐帕特罗	262.3 > 244.3	262.3 > 244.3	24	13
	262.3 > 185.3			24
沙丁胺醇	240.3 > 148.3	240.3 > 148.3	22	20
	240.3 > 222.3			10
克仑特罗	277.0 > 203.0	277.0 > 203.0	25	17
	277.0 > 259.0			11
克仑普罗	262.8 > 244.9	262.8 > 202.8	19	14
	262.8 > 202.8			16
妥布特罗	227.8 > 153.7	227.8 > 153.7	19	14
	227.8 > 171.7			9
班布特罗	367.9 > 71.7	367.9 > 294.0	25	30
	367.9 > 294.0			17

表 2 (续)

被测物名称	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
苯乙醇胺 A	345.1 > 150.0	345.1 > 150.0	22	30
	345.1 > 327.0			17
福莫特罗	345.2 > 149.0	345.2 > 149.0	22	30
	345.2 > 327.0			17
利托君	288.2 > 270.1	288.2 > 270.1	20	12
	288.2 > 121			24
克仑塞罗	319.1 > 202.9	319.1 > 202.9	22	20
	319.1 > 301.1			13
沙美特罗	416.2 > 380.3	416.2 > 380.3	30	18
	416.2 > 398.3			15

7.6 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标准溶液中对应的保留时间偏差在 ± 0.5 之内, 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 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(含)	10~20(含)	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.7 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 取试样溶液和基质标准溶液分别进样, 以标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标, 被测组分浓度为横坐标, 用标准系列进行单点或多点校准。采用基质添加校正、外标法对样品进行定量。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。上述色谱和质谱条件下, 18 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图参见附录 A。

8 计算

试样中待测激动剂的质量分数 X_i 以毫克每千克(mg/kg)表示, 测定结果可由计算机外标法自动计算, 也可按式(1)计算。

$$X_i = \frac{P_i \times V_1 \times c_i \times V_3 \times 1000}{P_s \times m \times V_2 \times 1000} \quad (1)$$

式中:

P_i —— 试样溶液中待测激动剂的峰面积;

V_1 —— 试样提取液体积, 单位为毫升(mL);

c_i —— 待测激动剂标准溶液浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_3 —— 上机前定容体积, 单位为毫升(mL);

P_s —— 标准溶液峰面积平均值;

m —— 试样质量, 单位为克(g);

V_2 —— 净化时分取溶液的体积, 单位为毫升(mL)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示, 结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下, 获得的 2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于这 2 个值算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

18 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图

18 种 β -受体激动剂标准溶液的液相色谱-串联质谱离子流色谱图见图 A. 1。

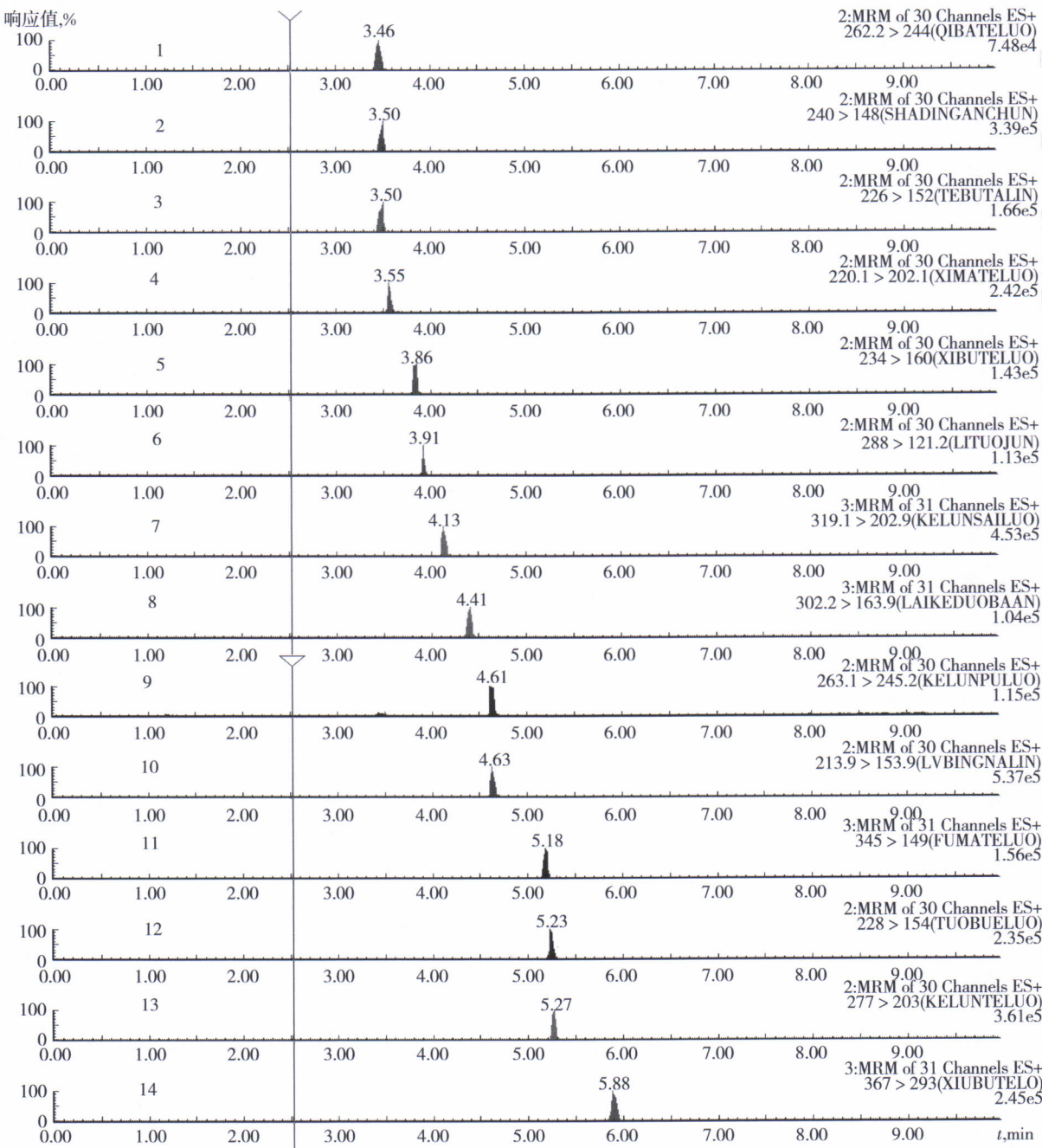
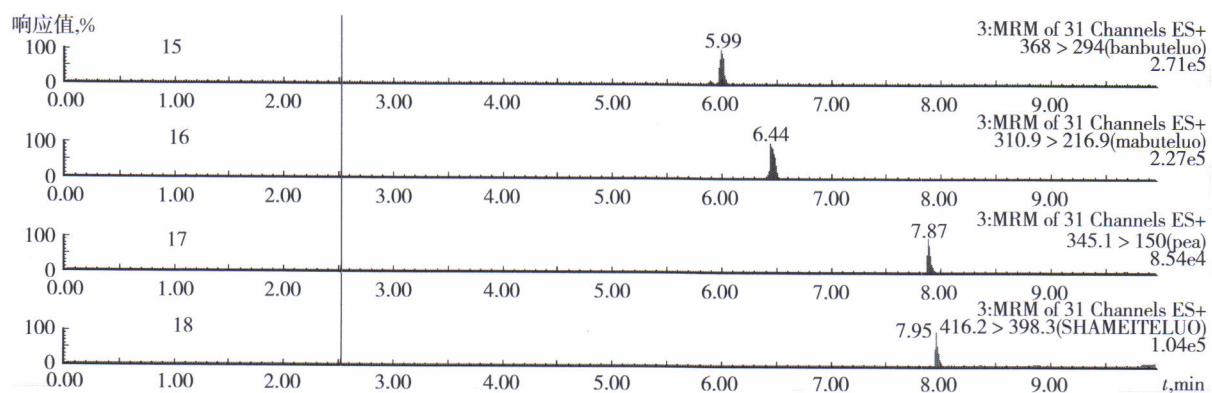


图 A. 1 18 种 β -受体激动剂标准溶液(浓度为 10 μ g/L)的液相色谱-串联质谱离子流色谱图



说明:

- | | |
|-----------|-------------|
| 1——齐帕特罗; | 10——氯丙那林; |
| 2——沙丁胺醇; | 11——福莫特罗; |
| 3——特布他林; | 12——妥布特罗; |
| 4——西马特罗; | 13——克仑特罗; |
| 5——溴布特罗; | 14——西布特罗; |
| 6——利托君; | 15——班布特罗; |
| 7——克仑塞罗; | 16——马布特罗; |
| 8——莱克多巴胺; | 17——苯乙醇胺 A; |
| 9——克仑普罗; | 18——沙美特罗。 |

图 A.1 (续)

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
饲料原料 血液制品中 18 种 β -受体激动
剂的测定 液相色谱-串联质谱法

NY/T 3144—2017

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

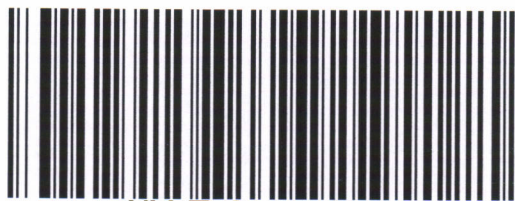
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2018 年 5 月第 1 版 2018 年 5 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4387

定价: 18.00 元



NY/T 3144—2017

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 65005894