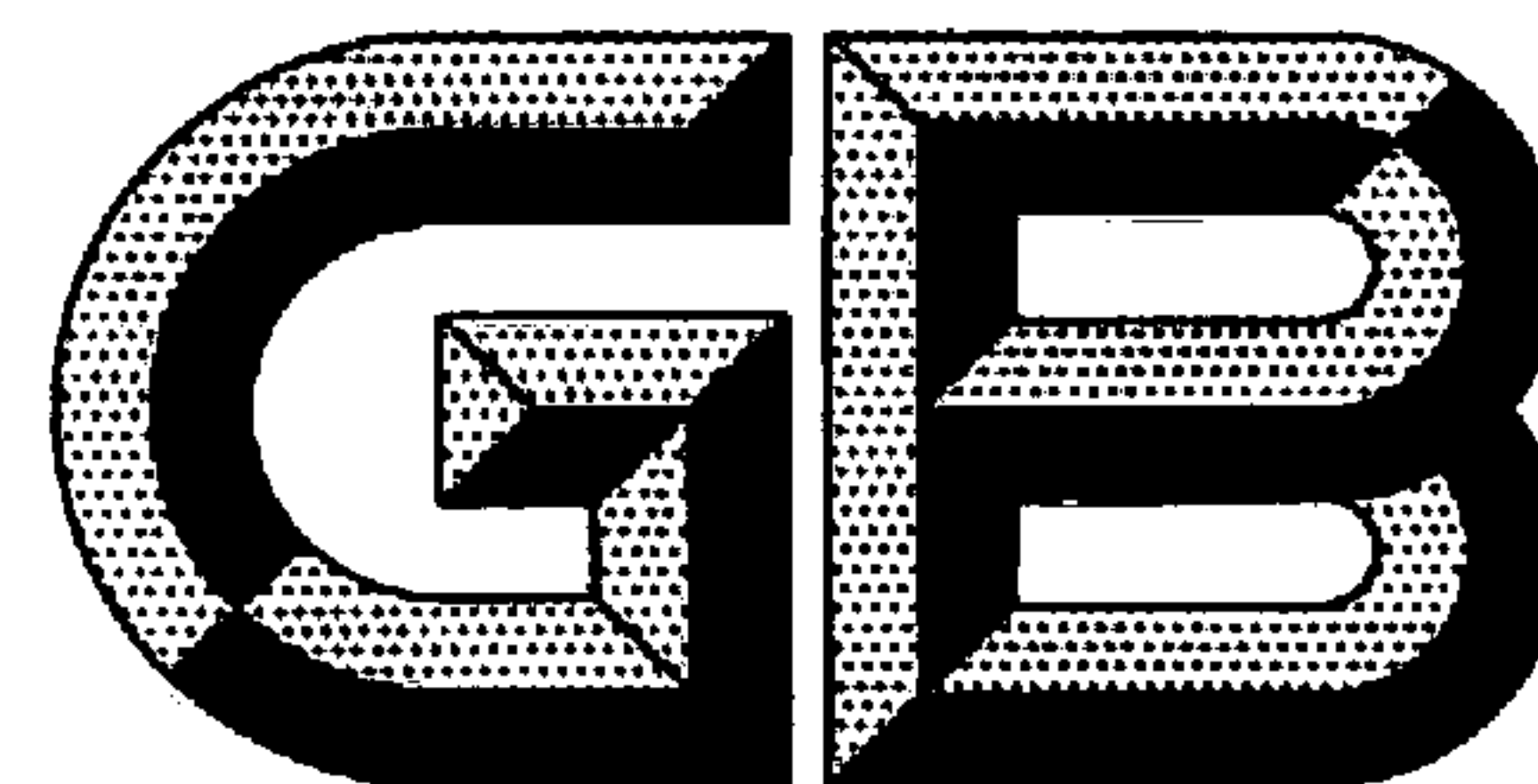




中华人民共和国国家标准

GB/T 22965—2008

牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 12 β -agonists residues in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨方、刘正才、林永辉、余孔捷、黄杰、李耀平、陈健、庞国芳。

牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂残留量的液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂多残留的测定。12 种 β -兴奋剂药物包括溴布特罗(brombuterol)、塞曼特罗(cimaterol)、克仑特罗(clenbuterol)、克仑潘特(clenpenterol)、羟甲基氨克仑特罗(hydroxymethylclenbuterol)、苯氧丙酚胺(isoxsuprine)、马布特罗(mabuterol)、莱克多巴胺(ractopamin)、利托君(ritodrine)、沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)和妥布特罗(tulobuterol)。

本标准的的方法检出限:牛奶中莱克多巴胺、沙丁胺醇、塞曼特罗、克仑潘特和克仑特罗的检出限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$,溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、利托君、苯氧丙酚胺和羟甲基氨克仑特罗的检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$;奶粉中莱克多巴胺、沙丁胺醇、塞曼特罗、克仑潘特和克仑特罗的检出限为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、利托君、苯氧丙酚胺和羟甲基氨克仑特罗的检出限为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 1 部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 2 部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

样品经稀酸水解、高氯酸沉淀蛋白后,残留的 β -兴奋剂以乙酸乙酯与异丙醇混合溶剂萃取,混合型阳离子交换反相吸附固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱测定,内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 异丙醇。
- 4.3 乙酸乙酯。
- 4.4 乙腈:色谱纯。
- 4.5 甲酸。
- 4.6 高氯酸。

- 4.7 盐酸。
- 4.8 氢氧化钠。
- 4.9 乙酸铵:色谱纯。
- 4.10 氨水。
- 4.11 氯化钠。
- 4.12 10 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 40 g 氢氧化钠至 100 mL 水中,混匀。
- 4.13 0.1 mol/L 高氯酸溶液:移取 0.4 mL 高氯酸至 100 mL 水中,混匀。
- 4.14 0.1 mol/L 盐酸溶液:移取 0.85 mL 盐酸至 100 mL 水中,混匀。
- 4.15 5 mmol/L 乙酸铵溶液:称取 0.385 g 乙酸铵至约 800 mL 水中,加入 2 mL 甲酸,定容至 1000 mL,混匀。
- 4.16 甲醇-0.1%甲酸溶液:移取 0.1 mL 甲酸于约 50 mL 水中,加入 10 mL 甲醇,以水定容 100 mL,混匀。
- 4.17 标准物质:溴布特罗、塞曼特罗、克仑特罗、克仑潘特、羟甲基氨克仑特罗、苯氧丙酚胺、马布特罗、莱克多巴胺、利托君、沙丁胺醇、特布他林和妥布特罗,纯度大于 98.0%。
- 4.18 内标标准物质:盐酸克仑特罗-D9、盐酸莱克多巴胺-D5、沙丁胺醇-D3,纯度大于 98.0%。
- 4.19 标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确称取适量的溴布特罗、塞曼特罗、克仑特罗、克仑潘特、羟甲基氨克仑特罗、苯氧丙酚胺、马布特罗、莱克多巴胺、利托君、沙丁胺醇、特布他林和妥布特罗,用甲醇分别配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,−20 °C 冰箱中保存。
- 4.20 混合标准储备液(1 $\mu\text{g/mL}$):分别准确量取 1.0 mL 的标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,−20 °C 冰箱中保存。
- 4.21 内标储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确称取适量的克仑特罗-D9、莱克多巴胺-D5、沙丁胺醇-D3 对照品,用甲醇配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,−20 °C 冰箱中保存。
- 4.22 内标工作液(10 ng/mL):分别准确量取适量的同位素内标储备液至同一容量瓶中,用甲醇稀释定容成浓度为 10 ng/mL 的同位素内标工作液,−20 °C 下冰箱中保存。
- 4.23 基质标准工作溶液:以空白基质溶液将混合标准储备液与内标工作液稀释至适当浓度,临用现配。
- 4.24 混合型阳离子交换反相吸附固相萃取柱:60 mg/3 mL,使用前依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化,保持柱体湿润。
- 4.25 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾电离(ESI)源。
- 5.2 天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 组织捣碎机。
- 5.4 高速冷冻离心机:转速可达 15 000 r/min,制冷可达 4 °C
- 5.5 离心机:5 000 r/min
- 5.6 旋涡振荡器。
- 5.7 电热恒温振荡水槽。
- 5.8 pH 计。
- 5.9 旋转蒸发仪。
- 5.10 固相萃取装置。
- 5.11 氮吹仪。

6 试样制备和保存

6.1 试样制备

取不少于 500 g 有代表性的牛奶或奶粉,充分混匀,分为两份,置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

牛奶置于 4 ℃ 冰柜中避光保存,奶粉则在室温下置于干燥器保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶

准确称取 10 g(精确到 0.01 g)牛奶样品于 50 mL 聚丙烯离心管内,加入 50 μL 10 ng/mL 的内标物,加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.14),涡旋混匀,于 37 ℃ 下避光水浴振荡 16 h(过夜),取出冷却至室温,涡旋混匀,4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 10 min,分取 10 mL 上清液转移至另一 50 mL 离心管内。加入 5 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液(4.13),用 10 mol/L 氢氧化钠溶液(4.12)调节 pH 值至 9.7±0.3,加入约 2 g 氯化钠,再加入 25 mL 异丙醇-乙酸乙酯(3+2),涡动提取 2 min,4 500 r/min 离心 5 min,取出上清液至另一 50 mL 离心管中。再在下层水相中加 15 mL 乙酸乙酯-异丙醇(7+3),涡动提取 1 min,4 500 r/min 离心 5 min,合并有机相,40 ℃ 下旋转蒸发至近干,加入 5 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.14),涡动 1 min,待净化。

7.1.2 奶粉

取 12.5 g 奶粉于烧杯中,加适量 35 ℃ ~50 ℃ 水将其溶解,待冷却至室温后,加水至总质量为 100 g,充分混匀后准确称取 10 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,按 7.1.1 步骤进行处理。

7.2 净化

将 7.1 所得溶液以约 1 mL/min 的流速全部过混合型阳离子交换反相吸附固相萃取柱(4.24),依次用 3 mL 水、3 mL 2% 甲酸水溶液和 2 mL 甲醇淋洗,抽干,用 5 mL 5 % 氨水甲醇溶液(体积分数)洗脱,洗脱液于 40 ℃ 下以氮气吹至近干,以 0.5 mL 甲醇-0.1% 甲酸溶液(1+9)溶解,涡动混匀,过 0.2 μm 滤膜(4.25),供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 10 g(精确至 0.01 g),按 7.1 和 7.2 步骤操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈,1.7 μm,2.1 mm× 55 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液(4.15),B 为 0.1% 甲酸乙腈(体积分数),梯度洗脱,洗脱程序见表 1;

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	85	15
1.0	85	15
2.0	30	70
2.5	30	70
3.0	85	15
5.0	85	15

- c) 流速:0.25 mL/min;
- d) 柱温:30 ℃;
- e) 进样量:10 μL

7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾源(ESI),正离子模式;
- b) 扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 毛细管电压:1.5 kV;
- d) 源温度:120 ℃;
- e) 去溶剂温度:450 ℃;
- f) 锥孔气流(氮气):45 L/h;
- g) 去溶剂气流(氮气): 700 L/h;
- h) 碰撞气压(氩气): 2.20×10^{-6} Pa;
- i) 驻留时间: 0.20 s

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 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基质标准校准溶液中对浓度标准校准溶液的保留时间偏差在±2.5%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混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,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偏差 以%表示

相对离子丰度 K	$K>50$	$20<K<50$	$10<K<20$	$K\leq 10$
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

内标法定量:用混合标准工作溶液分别进样,以分析化合物和内标化合物的峰面积比为纵坐标,以分析化合物和内标化合物的浓度比为横坐标作标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,标准工作液和待测液中 12 种药物的响应值均应在仪器线性响应范围内。12 种 β-兴奋剂类药物的保留时间、母离子和子离子见表 3。12 种 β-兴奋剂类药物标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1,添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1

表 3 12 种 β-兴奋剂保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

化合物名称	保留时间/ min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/ V	碰撞能量/ eV
莱克多巴胺	2.00	302/164	302/164	25	15
		302/284			12
沙丁胺醇	0.75	240/148	240/148	20	18
		240/166			13
塞曼特罗	0.84	220/160	220/160	18	15
		220/202			10
克仑潘特	2.25	291/203	291/203	20	15
		291/ 273			10

表 3 (续)

化合物名称	保留时间/ min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/ V	碰撞能量/ eV
克仑特罗	2.15	277/203	277/203	26	15
		277/259			11
溴布特罗	2.20	367/293	367/293	18	18
		367/349			13
妥布特罗	2.13	228/119	228/154	21	25
		228/154			16
马布特罗	2.25	311/237	311/237	20	16
		311/293			11
特布他林	0.78	226/125	226/152	20	22
		226/152			16
利托君	1.25	288/121	288/270	20	20
		288 /270			12
苯氧丙酚胺	2.22	302/150	302/150	20	22
		302/284			14
羟甲基氨克仑特罗	1.95	293/203	293/203	18	15
		293/275			12
克仑特罗-D9	2.13	286/204	286/204	26	15
沙丁胺醇-D3	0.75	243/151	243/151	20	18
莱克多巴胺-D5	2.00	308/168	308/168	25	15

采用克仑特罗-D9 定量的化合物有：克仑潘特、克仑特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、苯氧丙酚胺。

采用沙丁胺醇-D5 定量的化合物有：沙丁胺醇、塞曼特罗、特布他林。

采用莱克多巴胺-D5 定量的化合物有：莱克多巴胺、利托君、羟甲基氨克仑特罗。

7.5 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

8 结果计算

试样中 β-兴奋剂类药物残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算：

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克(μg/kg)；
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- V——试样溶液定容体积，单位为毫升(mL)；
- m——试样溶液最终所代表试样的质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,被测物的添加浓度范围及重复性方程见表 4

表 4 12 种 β -兴奋剂类药物的添加
浓度范围及重复性和再现性方程
单位为微克每千克

化合物名称	样品基质	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
莱克多巴胺	牛奶	0.05~0.5	$\lg r = 0.942\ 3\ \lg m - 0.768\ 1$	$\lg R = 0.980\ 8\ \lg m - 0.509\ 1$
	奶粉	0.4~4.0	$\lg r = 1.025\ 0\ \lg m - 10.706$	$\lg R = 1.019\ 4\ \lg m - 0.562\ 2$
沙丁胺醇	牛奶	0.05~0.5	$\lg r = 0.963\ 4\ \lg m - 0.415\ 0$	$\lg R = 0.981\ 2\ \lg m - 0.488\ 7$
	奶粉	0.4~4.0	$\lg r = 1.029\ 1\ \lg m - 0.708\ 5$	$\lg R = 0.975\ 4\ \lg m - 0.554\ 9$
塞曼特罗	牛奶	0.05~0.5	$\lg r = 1.097\ 1\ \lg m - 0.676\ 2$	$\lg R = 0.919\ 1\ \lg m - 0.494\ 1$
	奶粉	0.4~4.0	$\lg r = 1.107\ 7\ \lg m - 0.691\ 3$	$\lg R = 0.922\ 5\ \lg m - 0.489\ 8$
克仑潘特	牛奶	0.05~0.5	$\lg r = 0.946\ 7\ \lg m - 0.608\ 4$	$\lg R = 1.006\ 6\ \lg m - 0.470\ 5$
	奶粉	0.4~4.0	$\lg r = 1.102\ 1\ \lg m - 0.675\ 1$	$\lg R = 1.009\ 6\ \lg m - 0.470\ 2$
克仑特罗	牛奶	0.05~0.5	$\lg r = 0.988\ 4\ \lg m - 0.778\ 7$	$\lg R = 1.056\ 4\ \lg m - 0.513\ 6$
	奶粉	0.4~4.0	$\lg r = 1.081\ 6\ \lg m - 0.654\ 4$	$\lg R = 1.075\ 7\ \lg m - 0.556\ 9$
溴布特罗	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.893\ 0\ \lg m - 0.713\ 4$	$\lg R = 1.033\ 0\ \lg m - 0.453\ 1$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 0.931\ 0\ \lg m - 0.618\ 0$	$\lg R = 1.084\ 2\ \lg m - 0.512\ 0$
妥布特罗	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.905\ 4\ \lg m - 0.493\ 6$	$\lg R = 0.975\ 1\ \lg m - 0.561\ 1$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 1.184\ 3\ \lg m - 0.629\ 8$	$\lg R = 0.957\ 5\ \lg m - 0.491\ 3$
马布特罗	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.982\ 5\ \lg m - 0.637\ 2$	$\lg R = 0.933\ 5\ \lg m - 0.468\ 4$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 0.912\ 4\ \lg m - 0.629\ 7$	$\lg R = 0.972\ 2\ \lg m - 0.450\ 4$
特布他林	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.936\ 6\ \lg m - 0.732\ 8$	$\lg R = 0.971\ 5\ \lg m - 0.499\ 1$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 0.993\ 4\ \lg m - 0.735\ 5$	$\lg R = 0.957\ 0\ \lg m - 0.535\ 8$
利托君	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.958\ 5\ \lg m - 0.731\ 6$	$\lg R = 0.932\ 6\ \lg m - 0.488\ 7$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 1.099\ 9\ \lg m - 0.774\ 2$	$\lg R = 1.012\ 2\ \lg m - 0.605\ 9$
苯氧丙酚胺	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.963\ 2\ \lg m - 0.755\ 8$	$\lg R = 0.984\ 0\ \lg m - 0.520\ 8$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 0.978\ 9\ \lg m - 0.676\ 8$	$\lg R = 0.950\ 6\ \lg m - 0.554\ 0$
羟甲基氨克 仑特罗	牛奶	0.25~2.5	$\lg r = 0.989\ 1\ \lg m - 0.739\ 6$	$\lg R = 1.001\ 2\ \lg m - 0.468\ 4$
	奶粉	2.0~20.0	$\lg r = 0.918\ 6\ \lg m - 0.497\ 0$	$\lg R = 0.967\ 7\ \lg m - 0.482\ 4$

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 4

附录 A
(资料性附录)
标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

12 种 β -兴奋剂类药物标准物质的多反应监测(MRM)色谱图见图 A.1

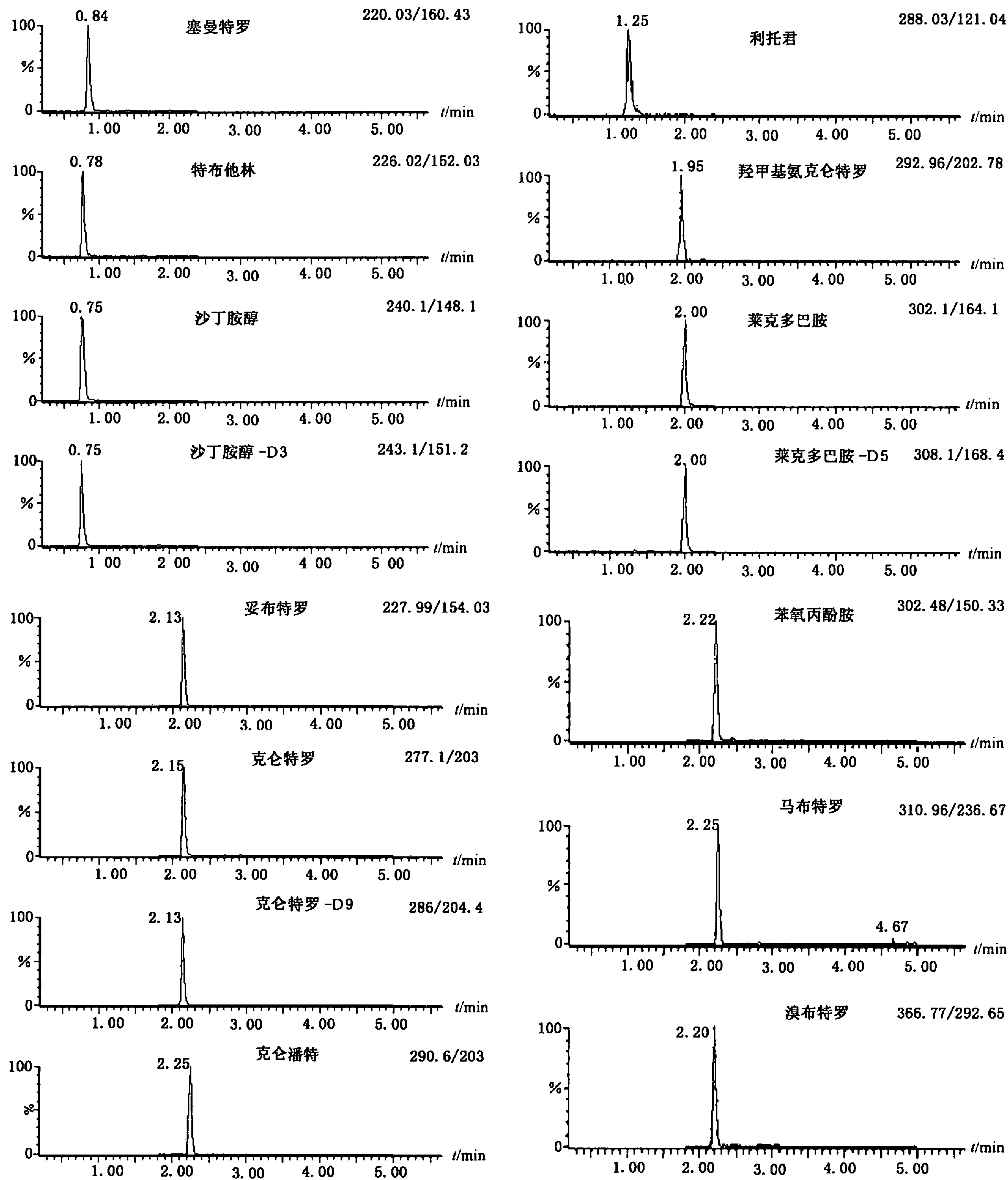


图 A.1 12 种 β -兴奋剂类药物标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

12 种 β -兴奋剂类药物的添加浓度及其平均回收率范围的试验数据见表 B.1

表 B.1 12 种 β -兴奋剂类药物的添加浓度及其平均回收率范围的试验数据

化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%	
		牛 奶	奶 粉
莱克多巴胺	0.10	91.8	92.2
	0.20	89.3	91.8
	0.50	92.7	91.4
	1.0	91.9	94.6
沙丁胺醇	0.10	89.7	93.2
	0.20	90.5	91.9
	0.50	90.3	92.3
	1.0	91.6	93.0
塞曼特罗	0.10	86.4	86.7
	0.20	86.3	87.9
	0.50	86.8	87.6
	1.0	87.5	86.3
克仑潘特	0.10	86.7	88.5
	0.20	91.7	87.5
	0.50	91.0	88.5
	1.0	89.9	88.1
克仑特罗	0.10	93.0	94.1
	0.20	94.7	91.9
	0.50	93.2	91.8
	1.0	93.6	91.3
溴布特罗	0.10	87.7	86.6
	0.20	88.9	84.9
	0.50	88.5	88.2
	1.0	87.1	86.2
妥布特罗	0.50	88.1	88.9
	1.0	89.9	85.1
	2.5	87.8	90.4
	5.0	91.2	90.7
马布特罗	0.50	87.6	82.2
	1.0	89.7	82.8
	2.5	83.7	86.2
	5.0	86.7	88.0
特布他林	0.50	85.5	87.2
	1.0	88.7	84.6
	2.5	87.0	88.5
	5.0	86.4	86.7
利托君	0.50	86.0	88.6
	1.0	87.6	86.1

表 B. 1 (续)

化合物名称	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率/%	
		牛奶	奶粉
利托君	2.5	82.5	85.5
	5.0	89.0	83.8
苯氧丙酰胺	0.50	87.9	87.9
	1.0	88.8	87.3
	2.5	88.1	87.2
	5.0	89.8	87.1
羟甲基氨克仑特罗	0.50	85.1	86.0
	1.0	87.7	87.9
	2.5	87.4	88.9
	5.0	86.6	86.1