

动物尿液中盐酸克伦特罗（瘦肉精）残留的 检测—气相色谱/质谱（GC/MS）方法

1 主题内容与适用范围

本标准规定了动物尿液中盐酸克伦特罗残留的检测方法。

本标准适用于动物尿液。

2 原理

对样品在 pH=5.2 的缓冲溶液中进行提取。萃取的样液用 C₁₈ 和 SCX 小柱，固相萃取净化，分离的药物残留经过双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)衍生后用带有质量选择检测器的气相色谱仪测定。

3 试剂及仪器设备

本技术适用于动物尿液中盐酸克伦特罗的确证检测，方法的最低检出限为 1 μ g/kg。方法所涉及的试剂、材料仪器及设备：

3.1 试剂

3.1.1 乙酸胺缓冲液（20mM, pH=5.2）、溶解 1.45g 乙酸胺于 500mL~700mL 水中，用乙酸调整 pH 值为 5.2 并稀释到 1 升。

3.1.2 30mM 盐酸：稀释 30mL 1M 盐酸到 1 升蒸馏水中。

3.1.3 甲醇：分析纯。

3.1.4 氨化甲醇（amoniun methanol）：4%。用甲醇稀释 4mL 氨溶液（比重 0.88）至 100mL。

3.1.5 双三甲基硅基三氟乙酰胺，BSTFA。

3.1.6 甲苯：分析纯。

3.1.7 C₁₈ 小柱：supelclean LC-18 Sep Pak 小柱 500mg, 3mL。

3.1.8 SCX 小柱：supelclean, LC-SCX Sep Pak 小柱 500mg, 3mL。

3.1.9 标准溶液

盐酸克伦特罗储备液：精确称取适量的盐酸克伦特罗标准品，用甲醇配成浓度约 1mg/mL 的标准储备液。

盐酸克伦特罗标准工作液：将储备液用甲醇稀释为 0.05~2.0 μ g/mL，存放在冰箱中备用。

3.2 仪器设备

3.2.1 离心瓶，50mL，具塞。

3.2.2 Sep-Pak 真空接头。

3.2.3 具聚四氟乙烯拧盖的试管。

3.2.4 匀浆机。

3.2.5 机械真空泵。

3.2.6 旋涡混合器。

3.2.7 恒温箱，精度为 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.8 气相色谱仪，配质谱检测器。

4 操作规程

4.1 提取

移取 5mL 尿样于 50mL 具塞的离心管中。用乙酸调 pH 至 5.2，加入 1mL 20mM 的乙酸铵缓冲溶液，再加 10mL 乙酸乙酯-异丙醇 (6+4) 混合液，震荡 15min，用滴管收集有机相。用 10mL 乙酸乙酯-异丙醇 (6+4) 混合液重复提取一次，合并两次提取的溶液于一玻璃试管中，用氮气吹干后再用 1mL 20mM 的乙酸铵缓冲溶液溶解。

4.2 净化

装好真空泵和接管，将 C18 和 SCX 固相萃取柱按从上到下的顺序安装。依次用 5mL 甲醇、5mL 水和 5mL 30mmol/L 盐酸活化。移取上述所得 1mL 溶液至 C18 柱中，用 1mL 20mM 的乙酸铵缓冲溶液冲洗试管并一起转移至 C18 柱中。依次用 5mL 水、5mL 甲醇淋洗柱子，在溶剂流过固相萃取柱后，保持抽气 5 分钟使柱中的液体逐渐枯竭，取下 C18 柱，用 5mL 4% 氨化甲醇淋洗 SCX 柱并收集流出液于具塞玻璃试管中。

4.3 衍生化、检测

4.3.1 衍生化

用氮气吹干上述流出液，加入 100 μL 甲苯和 100 μL BSTFA，加盖并于旋涡混合器上震荡，在 80 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中加热 1hr（盖住盖子），冷却后加入 0.30mL 甲苯震荡溶解，转入 2mL 进样小瓶中。取适量的盐酸克仑特罗标准工作液，同时衍生化。用气质联用仪选择离子监测方式检测。

4.3.2 检测

4.3.2.1 GC/MS 条件

色谱柱：HP-5MS 5% 苯基甲基聚硅氧烷，30m \times 0.25mm（内径），0.25 μm （膜厚）；

进样口：220 $^{\circ}\text{C}$ ；

进样方式：不分流；

进样体积：2 μL ；

柱温：70 $^{\circ}\text{C}$ （保持 0.6 分钟），以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$ （保持 6 分钟），以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$ （保持 5 分钟）；

载气：氮气，流速：0.9mL/分钟（恒流）。

GC/MS 传输线温度：280 $^{\circ}\text{C}$ ；

溶剂延迟：8 分钟；

EM 电压：高于调谐电压 200V；

分析器温度：230 $^{\circ}\text{C}$ ；

四极杆温度：106 $^{\circ}\text{C}$ 。

选择离子监测: (M/Z) 86, 243, 262, 277。

4.3.2.1 测定

根据样品液中盐酸克仑特罗含量情况, 选定峰面积相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样品液中盐酸克仑特罗响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样品液等体积参插进样测定。

定性: 样品峰与标样的保留时间之差不多于 2 秒, 匹配度值应大于 800, 当匹配度值小于 800 时, 应通过人工比较选择离子的丰度, 以基峰百分数表示。

$$X = \frac{h \times C_s \times V}{h_s \times m}$$

式中: X—试样中克仑特罗残留含量, mg/kg;

h—样液中经衍生化盐酸克仑特罗的峰高, mm;

h_s—标准工作液中经衍生化盐酸克仑特罗的峰高, mm;

C_s—标准工作液中盐酸克仑特罗的浓度, μg/mL;

V—样液最终定容体积, mL;

m—最终样液所代表的试样量, g。

注: 计算结果需将空白值扣除。
