

中华人民共和国化工行业标准

HG/T 4850.5—XXXX

稳定性同位素氘标记试剂
第5部分：特罗类-D9

Stable isotope deuterium labelled reagents

Part 5: Clenbuterol-D9

（征求意见稿）

（本稿完成日期：2018年11月25日）

2019—XX—XX 发布

2019—XX—XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

HG/T 4850《稳定性同位素氘标记试剂》分为六个部分：

- 第1部分：甲萘威-D₃；
- 第2部分：沙丁胺醇-D₃；
- 第3部分：恩诺沙星-D₅；
- 第4部分：敌百虫-D₆；
- 第5部分：特罗类-D₉试剂；
- 第6部分：孔雀石绿-D₁₂。

本部分是HG/T 4850的第5部分。

本部分由中国石油和化学工业联合会提出

本部分由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会（SAC/TC105）归口。

本部分起草单位：上海化工研究院有限公司、上海稳定性同位素工程技术研究中心。

本部分主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。

本部分为首次发布。

稳定性同位素氘标记试剂

第 5 部分：特罗类-D₉

1 范围

HG/T 4850的本部分规定了稳定性同位素氘标记试剂特罗类-D₉的要求、试验方法、检验规则、标识、包装、运输和贮存。

本部分稳定性同位素氘标记试剂特罗类-D₉主要包括妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉三种试剂，它们分别适用于以邻氯苯乙酮和氘代叔丁胺为原料，通过有机合成法制备的稳定性同位素氘标记妥布特罗-D₉产品；以4-氨基-3-氯-5-三氟甲基苯乙酮和氘代叔丁胺为原料，通过有机合成法制备的稳定性同位素氘标记马布特罗-D₉产品；以双-3,5-（N,N-二甲氨基甲酰氧基）-2-溴苯乙酮和氘代叔丁胺为原料，通过有机合成法制备的稳定性同位素氘标记班布特罗-D₉产品。

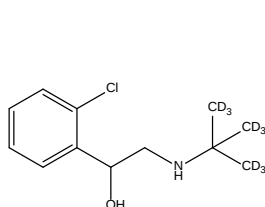
2 规范性引用文件

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。

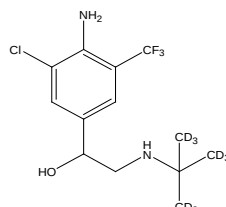
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170-2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

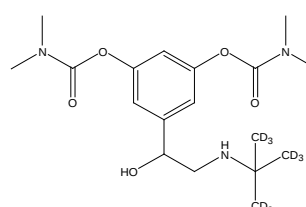
3 分子结构式



妥布特罗-D₉



马布特罗-D₉



班布特罗-D₉

4 符号

下列符号适用于本文件。

4.1 同位素原子的表示：^mA

其中 A 表示元素符号，*m* 表示该元素的同位素的相对原子质量数。例如：²H 表示氢元素中相对原子质量数为 2 的同位素氢原子，通常以 D 表示。

4.2 同位素原子标记个数的表示：^mA_n

其中 A 表示元素符号，*m* 表示该元素的同位素的相对原子质量数，*n* 则表示含该元素的同位素原子的个数。例如：²H₉ 表示氢元素中相对原子质量数为 2 的同位素氢原子有 9 个，通常以 D₉ 表示。

4.3 同位素丰度的单位表示：atom%^mA

表示 A 元素的相对质量数为 m 的原子占 A 元素的原子百分数。例如：atom%D 表示相对原子质量数为 2 的同位素氢原子在氢元素中所占的原子百分数。

5 要求

5.1 外观

白色粉末。

5.2 要求

产品的技术要求应符合表1的要求。

表1 产品技术要求

项 目	指 标	
	I 型（内标试剂）	II 型（化学试剂）
纯度(质量分数) / %	≥ 99.0	95.0
D 同位素丰度/(atom%D)	≥ 99.0	95.0

6 试验方法

6.1 一般规定

除非另有规定，本标准分析过程中所用水应符合GB/T 6682中规定的一级水，试剂均为分析纯。

6.2 外观

在常温环境下，取试样在自然光条件下目测。

6.3 纯度——高效液相色谱法

6.3.1 方法原理

高效液相色谱法测定妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉纯度，分别以天然丰度妥布特罗、马布特罗及班布特罗标准品作为外标，建立标准工作曲线，测定稳定性同位素氘标记妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉的纯度。

6.3.2 试剂和材料

6.3.2.1 乙腈：色谱纯。

6.3.2.2 乙酸铵水溶液：10 mmol/L

称取 0.38 g 乙酸铵(HPLC 级)于 1 L 烧杯中,加入 500 mL 水溶解，经超声混匀 5 min 后,过 0.45μm 滤膜，待用。

6.3.2.3 妥布特罗标准品：纯度≥97.0 %。

马布特罗标准品：纯度≥98.0 %。

班布特罗标准品：纯度 $\geq 98.0\%$ 。

6.3.3 仪器和设备

- 6.3.3.1 通常实验室用玻璃仪器及设备。
- 6.3.3.2 涡旋混合器。
- 6.3.3.3 液相色谱仪，配紫外检测器或 PDA 阵列检测器。
- 6.3.3.4 微量进样器：25 μL 。
- 6.3.3.5 分析天平：精度十万分之一。
- 6.3.3.6 微孔滤膜：孔径 0.22 μm 。
- 6.3.3.7 水相过滤膜：孔径 0.45 μm 。
- 6.3.3.8 超声波脱气仪。
- 6.3.3.9 移液器：10 μL ~100 μL ，精度 $\leq 1\%$ 。

6.3.4 色谱条件

推荐的典型色谱条件如下，也可选择其他达到同等分离效果的条件。

- 6.3.4.1 色谱柱：Athena C18-WP，100 mm $\times$ 4.6 mm I.D.，5 μm ，或采用具有同等分离效率的色谱柱；
- 6.3.4.2 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 6.3.4.3 进样量：5 μL ；
- 6.3.4.4 UV 检测器波长：妥布特罗、班布特罗 205nm；马布特罗 246nm；
- 6.3.4.5 流速：0.7 mL/min；
- 6.3.4.6 流动相：A为乙腈，B为10 mmol/L乙酸铵水溶液；
- 6.3.4.7 洗脱条件：A/B=70/30，等度洗脱。

6.3.5 分析步骤

6.3.5.1 外标标准储备溶液的制备

准确称取10 mg（精确到 0.01 mg）的妥布特罗、马布特罗、班布特罗标准品，溶于乙腈，转移至10mL棕色容量瓶定容，配制成1000 mg/L的标准储备液，避光保存于2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，可使用1个月。

6.3.5.2 外标工作溶液的制备

将上述妥布特罗、马布特罗、班布特罗标准储备溶液用乙腈稀释得到浓度分别为10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、70 mg/L和100 mg/L的标准工作溶液，避光保存于2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，可使用2周。

6.3.5.3 试样的溶解

做两份试样的平行测定。每份称取10 mg（精确到0.01 mg）妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉、班布特罗-D₉试样，溶于乙腈，定容于10 mL棕色容量瓶中，得到浓度为1000 mg/L的样品储备溶液。用乙腈稀释样品储存液得到50 mg/L的样品分析液。

6.3.5.4 标准工作曲线的建立

待高效液相色谱仪稳定后，将6.3.5.2处理得到的系列标准工作溶液，以孔径0.22 μm 的微孔滤膜过滤后，用微量进样器分别注入仪器，每个浓度的标准工作溶液均重复测定 3 次，以标准工作溶液的浓度为横坐标，每个浓度 3 次测定得到的外标物峰面积平均值为纵坐标，绘制标准工作曲线，并拟合得到标准曲线方程。

6.3.5.5 试样的测定

将6.3.5.3处理得到的溶液用孔径0.22 μm的微孔滤膜过滤后，用微量进样器注入仪器，每份试样溶液重复测定 3 次，计算得出 3 次测定的峰面积平均值，由标准曲线方程求得试样溶液的浓度，代入公式(1)可得试样的纯度。

6.3.6 分析结果的计算与表述

6.3.6.1 纯度

纯度 w 以质量分数计，数值以%表示，按公式 (1) 计算：

$$w = k \frac{C}{m} \frac{V}{X_{ST}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

k —— 稳定同位素氘标记妥布特罗-D₉与标准品的摩尔质量校正系数：1.04；

稳定同位素氘标记马布特罗-D₉与标准品的摩尔质量校正系数：1.03；

稳定同位素氘标记班布特罗-D₉与标准品的摩尔质量校正系数：1.02；

C ——试样峰面积平均值在标准工作曲线上对应的产品溶液浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——试样溶液定容体积的数值，单位为升（L）；

X_{ST} ——妥布特罗、马布特罗、班布特罗标准品标注纯度的数值，以质量分数（%）表示；

m ——试样质量的数值，单位为毫克（mg）。

取三次平行测定的算术平均值作为结果，计算结果保留到小数点后一位。

6.3.6.2 允许差

平行测定结果的绝对差值≤0.5 %。

6.4 D 同位素丰度——液相色谱-质谱法

6.4.1 方法原理

将样品用无水甲醇完全溶解后，以质谱蠕动泵进样的形式，将样品导入液相色谱-质谱的电喷雾离子源（ESI），使样品溶液发生静电喷雾，在近大气压下的干燥气流中形成带电雾滴。随着溶剂蒸发，通过离子蒸发等机制，形成气态离子，进入质谱分析。按离子的质荷比(m/z)不同加以分离，最终被离子收集检测器采集到相应的质谱信息，得到各 m/z 峰强度，用“质量簇”分类法计算试样的 D 同位素丰度值。“质量簇”分类法原理见附录A。

6.4.2 试剂和材料

6.4.2.1 无水甲醇：色谱纯。

6.4.2.2 离心管：1.5 mL。

6.4.2.3 移液器：100 μL ~1000 μL。

6.4.3 仪器和设备

6.4.3.1 通常实验室用玻璃仪器及设备。

6.4.3.2 液相色谱-质谱联用仪，配有蠕动泵及 ESI 离子源。

6.4.3.3 进样针：500 μL。

6.4.4 质谱条件

- 6.4.4.1 扫描模式：正离子模式（+ESI）。
- 6.4.4.2 电喷雾电压：3.5 kV。
- 6.4.4.3 离子传输管温度：275 °C。
- 6.4.4.4 雾化气流量：13 L/min。
- 6.4.4.5 单次质谱扫描时间：0.5 s。
- 6.4.4.6 质谱谱图叠加次数：>20。
- 6.4.4.7 扫描范围： $m/z = [M+H]^+ \pm 10$ dalton。
- 6.4.4.8 蠕动泵流速：10 μ L/min。

6.4.5 分析步骤

6.4.5.1 试样的溶解

称取约1 mg试样置于1.5 mL离心管中，加入1 mL无水甲醇充分溶解。用移液器移取100 μ L该溶液于10 mL容量瓶中，用无水甲醇稀释定容，浓度约为10 mg/L。同时做两份试样的平行测定。

6.4.5.2 试样的测定

将6.4.5.1得到的试样溶液，吸入进样针，连接到质谱仪进样系统，并利用蠕动泵将进样针内的溶液推入质谱仪离子源，采集妥布特罗-D₉正离子模式扫描的 $m/z = 228 \sim 237$ 的信号峰，马布特罗-D₉正离子模式扫描的 $m/z = 311 \sim 320$ 的信号峰，班布特罗-D₉正离子模式扫描的 $m/z = 368 \sim 377$ 的信号峰，输出相应的信号峰强度数据。通过公式计算得到试料的同位素丰度。

6.4.6 分析结果的计算与表述

6.4.6.1 妥布特罗-D₉不同D标记丰度的摩尔分数计算

采集质谱图中 $m/z=228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237$ 的峰强度数据，代入以下方程组(2)计算，解得 x_{labj} ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$\begin{aligned}
 A_{228} &= x_{lab0} \times 0.661 \\
 A_{229} &= x_{lab0} \times 0.089 + x_{lab1} \times 0.661 \\
 A_{230} &= x_{lab0} \times 0.218 + x_{lab1} \times 0.089 + x_{lab2} \times 0.661 \\
 A_{231} &= x_{lab0} \times 0.029 + x_{lab1} \times 0.218 + x_{lab2} \times 0.089 + x_{lab3} \times 0.661 \quad \dots\dots\dots (2) \\
 A_{232} &= x_{lab0} \times 0.002 + x_{lab1} \times 0.029 + x_{lab2} \times 0.218 + x_{lab4} \times 0.089 + x_{lab5} \times 0.661 \\
 A_{233} &= x_{lab1} \times 0.002 + x_{lab2} \times 0.029 + x_{lab3} \times 0.218 + x_{lab5} \times 0.089 + x_{lab6} \times 0.661 \\
 &\dots\dots\dots \\
 A_{237} &= x_{lab5} \times 0.002 + x_{lab6} \times 0.029 + x_{lab7} \times 0.218 + x_{lab8} \times 0.089 + x_{lab9} \times 0.661
 \end{aligned}$$

式中：

$A_{228}, A_{229}, \dots, A_{237}$ —质荷比为228, 229, $\dots$, 237的质谱峰强度相对值；

x_{lab0} —标记0个D原子的妥布特罗-D₀分子的摩尔分数；

x_{lab1} —标记1个D原子的妥布特罗-D₁分子的摩尔分数；

x_{lab2} —标记2个D原子的妥布特罗-D₂分子的摩尔分数；

x_{lab3} —标记3个D原子的妥布特罗-D₃分子的摩尔分数；

x_{lab4} —标记4个D原子的妥布特罗-D₄分子的摩尔分数；

x_{lab5} —标记5个D原子的妥布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x_{lab6} —标记6个D原子的妥布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x_{lab7} —标记7个D原子的妥布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x_{lab8} —标记8个D原子的妥布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x_{lab9} —标记9个D原子的妥布特罗-D₉分子的摩尔分数；

0.661 : 0.089 : 0.218 : 0.029 : 0.002为妥布特罗分子的同位素分布比。

6.4.6.2 马布特罗-D₉不同D标记丰度的摩尔分数计算

采集质谱图中 $m/z=311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320$ 的峰强度数据，代入下方程组(3)计算，解得 x_{labj} ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$A_{311} = x_{lab0} \times 0.653$$

$$A_{312} = x_{lab0} \times 0.098 + x_{lab1} \times 0.653$$

$$A_{313} = x_{lab0} \times 0.217 + x_{lab1} \times 0.098 + x_{lab2} \times 0.653$$

$$A_{314} = x_{lab0} \times 0.029 + x_{lab1} \times 0.217 + x_{lab2} \times 0.098 + x_{lab3} \times 0.653 \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$A_{315} = x_{lab0} \times 0.002 + x_{lab1} \times 0.029 + x_{lab2} \times 0.217 + x_{lab4} \times 0.098 + x_{lab5} \times 0.653$$

$$A_{316} = x_{lab1} \times 0.002 + x_{lab2} \times 0.029 + x_{lab3} \times 0.217 + x_{lab5} \times 0.098 + x_{lab6} \times 0.653$$

.....

$$A_{320} = x_{lab5} \times 0.002 + x_{lab6} \times 0.029 + x_{lab7} \times 0.217 + x_{lab8} \times 0.098 + x_{lab9} \times 0.653$$

式中：

$A_{228}, A_{229}, \dots, A_{237}$ —质荷比为311, 312,, 320的质谱峰强度相对值；

x_{lab0} —标记0个D原子的马布特罗-D₀分子的摩尔分数；

x_{lab1} —标记1个D原子的马布特罗-D₁分子的摩尔分数；

x_{lab2} —标记2个D原子的马布特罗-D₂分子的摩尔分数；

x_{lab3} —标记3个D原子的马布特罗-D₃分子的摩尔分数；

x_{lab4} —标记4个D原子的马布特罗-D₄分子的摩尔分数；

x_{lab5} —标记5个D原子的马布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x_{lab6} —标记6个D原子的马布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x_{lab7} —标记7个D原子的马布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x_{lab8} —标记8个D原子的马布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x_{lab9} —标记9个D原子的马布特罗-D₉分子的摩尔分数；

0.653 : 0.098 : 0.217 : 0.029 : 0.002为马布特罗分子的同位素分布比。

6.4.6.3 班布特罗-D₉不同D标记丰度的摩尔分数计算

采集质谱图中 $m/z=368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377$ 的峰强度数据，代入下方程组(4)计算，解得 x_{labj} ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$A_{368} = x_{lab0} \times 0.803$$

$$A_{369} = x_{lab0} \times 0.169 + x_{lab1} \times 0.803$$

$$A_{370} = x_{lab0} \times 0.025 + x_{lab1} \times 0.169 + x_{lab2} \times 0.803$$

$$A_{371} = x_{lab0} \times 0.003 + x_{lab1} \times 0.025 + x_{lab2} \times 0.169 + x_{lab3} \times 0.803 \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$A_{372} = x_{lab0} \times 0.003 + x_{lab1} \times 0.025 + x_{lab2} \times 0.169 + x_{lab4} \times 0.803$$

.....

$$A_{377} = x_{lab6} \times 0.003 + x_{lab7} \times 0.025 + x_{lab8} \times 0.169 + x_{lab9} \times 0.803$$

式中：

$A_{368}, A_{369}, \dots, A_{377}$ —质荷比为368, 369,, 377的质谱峰强度相对值；

x_{lab0} —标记0个D原子的班布特罗-D₀分子的摩尔分数；

x_{lab1} —标记1个D原子的班布特罗-D₁分子的摩尔分数；

x_{lab2} —标记2个D原子的班布特罗-D₂分子的摩尔分数；

x_{lab3} —标记3个D原子的班布特罗-D₃分子的摩尔分数；

x_{lab4} —标记4个D原子的班布特罗-D₄分子的摩尔分数；

x_{lab5} —标记5个D原子的班布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x_{lab6} —标记6个D原子的班布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x_{lab7} —标记7个D原子的班布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x_{lab8} —标记8个D原子的班布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x_{lab9} —标记9个D原子的班布特罗-D₉分子的摩尔分数；

0.803：0.169：0.025：0.003为班布特罗分子的同位素分布比。

6.4.6.4 D同位素丰度的计算与表述

D同位素丰度值以E计，数值以atom%D表示。按公式(5)计算：

$$E = \frac{\sum_{j=1}^9 jX_{labj}}{9\sum_{j=0}^9 X_{labj}} \quad (j = 0,1,2,\cdots,9) \quad \dots\dots\dots(5)$$

6.4.7 允许差

两次平行测定结果的极差≤0.3 atom%D。

不同实验室测定结果的极差≤0.5 atom%D。

7 检验规则

7.1 检验类别及检验项目

产品检验类别为出厂检验，项目包括产品的纯度及D同位素丰度值。

7.2 组批与采样

7.2.1 以每次投料反应最终得到的结晶产品为一批。

7.2.2 每批样品的采样，应用清洁、干燥的匙勺从容器的4个不同部位等量采样。采样量约为0.10 g，混合均匀后等量装入两个清洁、干燥且密封良好的样品瓶中，并在瓶上粘贴标签，其内容包括生产厂名、产品名称、批号批量、采样量、采样日期和采样人姓名。一瓶作产品质量分析，另一瓶作为留样，留样应保存6个月。

7.3 结果判定

7.3.1 产品质量指标合格判定，采用GB/T 8170-2008中的“修约值比较法”。

7.3.2 产品检验部门按本部分的规定进行检验，所有出厂产品都应符合本部分要求。如果检验结果不符合本部分要求，应重新自该批产品中取双倍样进行检验。重新检验结果中，若有一项指标不符合本部分要求，则判该批产品为不合格。

8 标识

8.1 每批出厂产品应附有质量证明书，内容有：生产厂名、厂址、产品名称、纯度、D的丰度值、批号、产品等级、生产日期、本部分号和检验员签字。同时，需注明产品安全性、危险物警告标识图案和文字等内容。

8.2 每个内包装单元上应有标签，内容有：生产厂名、产品名称、纯度、D 同位素丰度值、净含量、生产日期及有效期。

8.3 外包装上应有生产厂名、厂址、产品名称、批号、纯度、D 同位素丰度值及净含量。

9 包装、运输和贮存

9.1 包装

9.1.1 内包装

采用色谱样品瓶，瓶口用塑膜封口，瓶的规格由供需双方商定。

9.1.2 外包装

在样品瓶外用(0.3~0.5)mm PVC塑料膜密封，再用钙塑箱包装。

9.2 运输和贮存

产品在运输与贮存时，贮存容器应具有一定的密封性，应保持通风、干燥，避光保存于-19℃的冰箱中。产品在运输时防止雨淋和受潮受热，温度不高于45℃。

产品经检验合格后，在符合本标准规定的储存条件下，贮存期为1年。

附录 A

(资料性附录)

“质量簇”分类计算法

原理：

将稳定同位素标记有机化合物分为以下类别： $C_xH_yN_wO_z(^LX_n\ ^HX_0)$ ， $C_xH_yN_wO_z(^LX_{n-1}\ ^HX_1)$ ，…， $C_xH_yN_wO_z(^LX_1\ ^HX_{n-1})$ ， $C_xH_yN_wO_z(^LX_0\ ^HX_n)$ ，其中，X 为被标记的元素，可以为 C、H 或 N 等元素，具有轻重两种原子形态（ LX 和 HX ）。每一类为一质量簇；

质谱图质荷比 $m/z = i$ 的质谱峰强度来自于多个质量簇的叠加，质荷比 $m/z = i$ 位置的质谱峰强为：

$$A_{\text{mix}}^i = \sum (x_{\text{labj}} \cdot A_{\text{labj}}^i), \quad (j = 0, 1, \dots, n) \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中， A_{mix}^i 为目标化合物在质荷比 $m/z = i$ 位置的质谱峰强， A_{labj}^i 是“质量簇” $C_xH_yN_wO_z(^LX_{n-j}\ ^HX_j)$ 在质荷比 $m/z = i$ 位置的质谱峰强贡献， x_{labj} 为 $C_xH_yN_wO_z(^LX_{n-j}\ ^HX_j)$ 的摩尔分数；

联立质谱图上每一个质荷比的峰强的方程和摩尔分数的方程 $1 = \sum x_{\text{labj}} \quad (j = 0, 1, \dots, n)$ ，求出各质量簇的摩尔分数；

稳定同位素标记有机化合物 $C_xH_yN_wO_z(X_n)$ 的 HX 同位素标记丰度公式为：

$$\text{atmo}\% \ ^HX = \frac{\sum_{j=1}^n j x_{\text{labj}}}{n \sum_{j=0}^n x_{\text{labj}}} \quad (j = 0, 1, \dots, n) \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

利用该公式及获得数据计算得到同位素丰度。