

《稳定性同位素氘标记试剂 第 5 部分：特罗类-D₉》

化工行业标准编制说明（意见征求意见稿）

1. 工作简况（包括任务来源、协作单位、主要工作过程、行业标准主要起草人及其所做工作等）

1.1 任务的来源

根据国家工信部办公厅工信厅科〔2018〕31 号《工业和信息化部办公厅关于印发 2018 年第二批行业标准制修订计划的通知》，开展了《稳定性同位素氘标记试剂 第 5 部分：特罗类-D₉》行业标准的制定工作，本标准由中国石油和化学工业联合会提出，全国肥料和土壤调节剂标准化技术委员会归口，由上海化工研究院有限公司负责起草，参与起草单位为上海稳定性同位素工程技术研究中心等，项目计划编号为：2018-0317T-HG。

1.2 本标准制定工作简况

1.2.1 查阅相关文献，确定技术指标

在对特罗类试剂相关文献及标准查阅的基础上，标准制定小组确立了妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉三种稳定性同位素氘标记特罗类-D₉的主要技术指标要求，即：产品的纯度和 D 同位素丰度。在建立测试方法的同时，还开展了相关试验方法的研究和方法学验证。

技术要求仅选择这两项指标，主要基于如下考虑：本标准所涉及的稳定性同位素氘标记特罗类试剂，其合成的原料均为试剂级，且经过一系列制备及纯化处理后，杂质含量可达试剂级要求。同时，考虑到该产品的核心技术指标是产品的纯度以及氘丰度值，所以本标准仅选用产品的纯度、氘同位素丰度作为技术指标，而对极微量存在且样品消耗用量大的杂质分析不作规定。标准起草工作组在此基础上拟定了标准方法的实验方案。

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)	≥ 90.0	90.0

1.2.2 针对技术要求，研究试验方法

根据收集到的妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉试样和查阅的相关技术标准及文献，标准制定工作组制定了试验方案，并对这三种特罗类-D₉试剂的化学纯度和同位素丰度做了相关试验方法和方法学验证的研究。

(1) 纯度的测定——高效液相色谱法 (HPLC)

原理

以妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉试剂，分别配成一定浓度的待测试样，将该试样引入 HPLC 中，利用不同物质在固定相与流动相之间的吸附或分配系数的微小差别，经过连续多次在两项间的质量交换，最终实现产品中各组分的分离。

外标法是样品纯度定量最常用的方法之一。配制已知系列浓度的标准溶液，并以峰面积或峰高与其对应的浓度做标准曲线。氘标记妥布特罗、马布特罗及班布特罗试剂的纯度分析使用外标法测定。配制不同浓度的相关待测天然丰度试剂标准溶液，做出峰面积对浓度的标准曲线，得到一次线性方程。在完全相同的条件下，对待测试样溶液进行测定，测出其峰面积，经过计算即可得到其纯度（质量分数%）。

产品的纯度按公式(1)计算：

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

式中：

w ——妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉、班布特罗-D₉产品纯度的数值，单位为质量分数(%)；

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）。

(2) 同位素丰度的测定——质谱法 (MS)

原理

将待测试样用甲醇溶剂，按一定比例配制成适当浓度的溶液后，引入液质联用仪的电喷雾(ESI)质谱，通过 ESI 电离方式，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。将三种待测特罗类-D₉样品分别配制成溶液，进入质谱后按离子的质荷比(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。经计算、校正后输出结果，采用“质量簇”分类算法，计算特罗类-D₉ 的氘同位素丰度值。

同位素丰度的计算

目标化合物妥布特罗-D₉ 的分子式为 C₁₂H₁₈ClNO，电喷雾离子化后会形成[M+H]⁺的分子离子。通过“质量簇”分类法，可以将目标化合物离子分成[C₁₂H₁₀ClNO(H₉D₀)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₈D₁)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₇D₂)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₆D₃)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₅D₄)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₄D₅)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₃D₆)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₂D₇)]⁺，[C₁₂H₁₀ClNO(H₁D₈)]⁺和[C₁₂H₁₀ClNO(H₀D₉)]⁺共十个“质量簇”，如表 2 所示。它们的质量分布与非标记位点“C₁₂H₁₀ClNO”的天然同位素分布相同，根据同位素丰度计算器的计算结果，同位素分布比为 0.661, 0.089, 0.218, 0.029, 0.002。

表 2 按照“质量簇”对目标化合物妥布特罗-D₉ 的分类

分子式	实际标记上 D 原子数目	摩尔分数	m/z 范围
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₉ D ₀)] ⁺	0	x ₀	228~232
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₈ D ₁)] ⁺	1	x ₁	229~233
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₇ D ₂)] ⁺	2	x ₂	230~234
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₆ D ₃)] ⁺	3	x ₃	231~235
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₅ D ₄)] ⁺	4	x ₄	232~236
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₄ D ₅)] ⁺	5	x ₅	233~237
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₃ D ₆)] ⁺	6	x ₆	234~238
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₂ D ₇)] ⁺	7	x ₇	235~239
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₁ D ₈)] ⁺	8	x ₈	236~240
[C ₁₂ H ₁₀ ClNO(H ₀ D ₉)] ⁺	9	x ₉	237~241

如表 2 所示，目标化合物妥布特罗-D₉ 的质荷比分布在 m/z=228~241 的范围。由“质量簇”分类算法，可以得到如下方程组(3)：

$$A_{228} = x_0 \times 0.661$$

$$A_{229} = x_0 \times 0.089 + x_1 \times 0.661$$

$$A_{230} = x_0 \times 0.218 + x_1 \times 0.089 + x_2 \times 0.661$$

$$A_{231} = x_0 \times 0.029 + x_1 \times 0.218 + x_2 \times 0.089 + x_3 \times 0.661$$

$$A_{232} = x_0 \times 0.002 + x_1 \times 0.029 + x_2 \times 0.218 + x_4 \times 0.089 + x_5 \times 0.661$$

$$A_{233} = x_1 \times 0.002 + x_2 \times 0.029 + x_3 \times 0.218 + x_5 \times 0.089 + x_6 \times 0.661$$

$$\dots\dots\dots (1)$$

$$A_{237} = x_5 \times 0.002 + x_6 \times 0.029 + x_7 \times 0.218 + x_8 \times 0.089 + x_9 \times 0.661$$

$$A_{238} = x_6 \times 0.002 + x_7 \times 0.029 + x_8 \times 0.218 + x_9 \times 0.089$$

$$A_{239} = x_7 \times 0.002 + x_8 \times 0.029 + x_9 \times 0.218$$

$$A_{240} = x_8 \times 0.002 + x_9 \times 0.029$$

$$A_{241} = x_9 \times 0.002$$

联立解方程组，可得到各个“质量簇”的D标记摩尔分数 x_j ($j=0, 1, \dots, n$)。通过公式 $X = \Sigma(x_j \cdot j) / (9 \cdot \Sigma x_j)$ ($j=0, 1, \dots, 9$)，计算可得到妥布特罗-D₉的氕标记同位素丰度值。

在标准文本中，我们根据妥布特罗-D₉实际测定情况简化了计算公式，使之更易于理解和运算。

如下所示：

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

$$A_{228} = x_0 \times 0.661$$

$$A_{229} = x_0 \times 0.089 + x_1 \times 0.661$$

$$A_{230} = x_0 \times 0.218 + x_1 \times 0.089 + x_2 \times 0.661$$

$$A_{231} = x_0 \times 0.029 + x_1 \times 0.218 + x_2 \times 0.089 + x_3 \times 0.661$$

$$A_{232} = x_0 \times 0.002 + x_1 \times 0.029 + x_2 \times 0.218 + x_4 \times 0.089 + x_5 \times 0.661$$

$$A_{233} = x_1 \times 0.002 + x_2 \times 0.029 + x_3 \times 0.218 + x_5 \times 0.089 + x_6 \times 0.661$$

$$\dots\dots\dots (2)$$

$$A_{237} = x_5 \times 0.002 + x_6 \times 0.029 + x_7 \times 0.218 + x_8 \times 0.089 + x_9 \times 0.661$$

式中：

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

x_0 —标记0个D原子的妥布特罗-D₀分子的摩尔分数；

x_1 —标记1个D原子的妥布特罗-D₁分子的摩尔分数；

x_2 —标记2个D原子的妥布特罗-D₂分子的摩尔分数；

x_3 —标记3个D原子的妥布特罗-D₃分子的摩尔分数；

x_4 —标记4个D原子的妥布特罗-D₄分子的摩尔分数；

x_5 —标记5个D原子的妥布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x_6 —标记6个D原子的妥布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x_7 —标记7个D原子的妥布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x_8 —标记8个D原子的妥布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x_9 —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。

目标化合物妥布特罗-D₉ 的分子式为 $C_{13}H_{18}ClF_3N_2O$ ，电喷雾离子化后会形成 $[M+H]^+$ 的分子离子。通过“质量簇”分类法，可以将目标化合物离子分成 $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_9D_0)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_8D_1)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_7D_2)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_6D_3)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_5D_4)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_4D_5)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_3D_6)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_2D_7)]^+$ ， $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_1D_8)]^+$ 和 $[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_0D_9)]^+$ 共十个“质量簇”，如表 3 所示。它们的质量分布与非标记位点“ $C_{13}H_{10}ClF_3N_2O$ ”的天然同位素分布相同，根据同位素丰度计算器的计算结果，同位素分布比为 0.653, 0.098, 0.217, 0.029, 0.002。

表 3 按照“质量簇”对目标化合物妥布特罗-D₉ 的分类

分子式	实际标记上 D 原子数目	摩尔分数	m/z 范围
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_9D_0)]^+$	0	x_0	311~315
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_8D_1)]^+$	1	x_1	312~316
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_7D_2)]^+$	2	x_2	313~317
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_6D_3)]^+$	3	x_3	314~318
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_5D_4)]^+$	4	x_4	315~319
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_4D_5)]^+$	5	x_5	316~320
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_3D_6)]^+$	6	x_6	317~321
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_2D_7)]^+$	7	x_7	318~322
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_1D_8)]^+$	8	x_8	319~323
$[C_{13}H_{10}ClF_3N_2O(H_0D_9)]^+$	9	x_9	320~324

如表 3 所示，目标化合物妥布特罗-D₉ 的质荷比分布在 $m/z=311\sim324$ 的范围。由“质量簇”分类算法，可以得到如下方程组(3)：

$$A_{311} = x_0 \times 0.653$$

$$A_{312} = x_0 \times 0.098 + x_1 \times 0.653$$

$$A_{313} = x_0 \times 0.217 + x_1 \times 0.098 + x_2 \times 0.653$$

$$\begin{aligned}
A_{314} &= x_0 \times 0.029 + x_1 \times 0.217 + x_2 \times 0.098 + x_3 \times 0.653 \\
A_{315} &= x_0 \times 0.002 + x_1 \times 0.029 + x_2 \times 0.217 + x_4 \times 0.098 + x_5 \times 0.653 \\
A_{316} &= x_1 \times 0.002 + x_2 \times 0.029 + x_3 \times 0.217 + x_5 \times 0.098 + x_6 \times 0.653 \\
&\dots\dots\dots \\
A_{320} &= x_5 \times 0.002 + x_6 \times 0.029 + x_7 \times 0.217 + x_8 \times 0.098 + x_9 \times 0.653 \\
A_{321} &= x_6 \times 0.002 + x_7 \times 0.029 + x_8 \times 0.217 + x_9 \times 0.098 \\
A_{322} &= x_7 \times 0.002 + x_8 \times 0.029 + x_9 \times 0.217 \\
A_{323} &= x_8 \times 0.002 + x_9 \times 0.029 \\
A_{324} &= x_9 \times 0.002
\end{aligned} \tag{3}$$

联立解方程组，可得到各个“质量簇”的D标记摩尔分数 x_j ($j=0, 1, \dots, n$)。通过公式 $X = \Sigma(x_j \cdot j) / (9 \cdot \Sigma x_j)$ ($j=0, 1, \dots, 9$)，计算可得到马布特罗-D₉的氘标记同位素丰度值。

在标准文本中，我们根据马布特罗-D₉实际测定情况简化了计算公式，使之更易于理解和运算。

如下所示：

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(4)计算，解得 x_j ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$\begin{aligned}
A_{311} &= x_0 \times 0.653 \\
A_{312} &= x_0 \times 0.098 + x_1 \times 0.653 \\
A_{313} &= x_0 \times 0.217 + x_1 \times 0.098 + x_2 \times 0.653 \\
A_{314} &= x_0 \times 0.029 + x_1 \times 0.217 + x_2 \times 0.098 + x_3 \times 0.653 \\
A_{315} &= x_0 \times 0.002 + x_1 \times 0.029 + x_2 \times 0.217 + x_4 \times 0.098 + x_5 \times 0.653 \\
A_{316} &= x_1 \times 0.002 + x_2 \times 0.029 + x_3 \times 0.217 + x_5 \times 0.098 + x_6 \times 0.653 \\
&\dots\dots\dots \\
A_{320} &= x_5 \times 0.002 + x_6 \times 0.029 + x_7 \times 0.217 + x_8 \times 0.098 + x_9 \times 0.653
\end{aligned} \tag{4}$$

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_0 —标记0个D原子的马布特罗-D₀分子的摩尔分数；

x_1 —标记1个D原子的马布特罗-D₁分子的摩尔分数；

x_2 —标记2个D原子的马布特罗-D₂分子的摩尔分数；

x_3 —标记3个D原子的马布特罗-D₃分子的摩尔分数；

x_4 —标记4个D原子的马布特罗-D₄分子的摩尔分数；

x_5 —标记5个D原子的马布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x_6 —标记6个D原子的马布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x_7 —标记7个D原子的马布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x_8 —标记8个D原子的马布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x_9 —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。

目标化合物班布特罗-D₉的分子式为 C₁₈H₂₉N₃O₅，电喷雾离子化后会形成[M+H]⁺的分子离子。通过“质量簇”分类法，可以将目标化合物离子分成 [C₁₈H₂₁N₃O₅(H₉D₀)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₈D₁)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₇D₂)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₆D₃)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₅D₄)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₄D₅)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₃D₆)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₂D₇)]⁺，[C₁₈H₂₁N₃O₅(H₁D₈)]⁺和 [C₁₈H₂₁N₃O₅(H₀D₉)]⁺共十个“质量簇”，如表 4 所示。它们的质量分布与非标记位点“C₁₈H₂₁N₃O₅”的天然同位素分布相同，根据同位素丰度计算器的计算结果，同位素分布比为 0.803, 0.169, 0.025, 0.003。

表 4 按照“质量簇”对目标化合物班布特罗-D₉的分类

分子式	实际标记上 D 原子数目	摩尔分数	m/z 范围
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₉ D ₀)] ⁺	0	x_0	368~371
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₈ D ₁)] ⁺	1	x_1	369~372
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₇ D ₂)] ⁺	2	x_2	370~373
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₆ D ₃)] ⁺	3	x_3	371~374
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₅ D ₄)] ⁺	4	x_4	372~375
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₄ D ₅)] ⁺	5	x_5	373~376
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₃ D ₆)] ⁺	6	x_6	374~377
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₂ D ₇)] ⁺	7	x_7	375~378
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₁ D ₈)] ⁺	8	x_8	376~379
[C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ (H ₀ D ₉)] ⁺	9	x_9	377~380

如表 4 所示，目标化合物班布特罗-D₉的质荷比分布在 m/z=368~380 的范围。由“质量簇”分类算法，可以得到如下方程组(5)：

$$A_{368} = x_0 \times 0.803$$

$$\begin{aligned}
A_{369} &= x_0 \times 0.169 + x_1 \times 0.803 \\
A_{370} &= x_0 \times 0.025 + x_1 \times 0.169 + x_2 \times 0.803 \\
A_{371} &= x_0 \times 0.003 + x_1 \times 0.025 + x_2 \times 0.169 + x_3 \times 0.803 \\
A_{372} &= x_0 \times 0.003 + x_1 \times 0.025 + x_2 \times 0.169 + x_4 \times 0.803 \\
&\dots\dots\dots \\
A_{377} &= x_6 \times 0.003 + x_7 \times 0.025 + x_8 \times 0.169 + x_9 \times 0.803 \\
A_{378} &= x_7 \times 0.003 + x_8 \times 0.025 + x_9 \times 0.169 \\
A_{379} &= x_8 \times 0.003 + x_9 \times 0.025 \\
A_{380} &= x_9 \times 0.003
\end{aligned} \tag{5}$$

联立解方程组，可得到各个“质量簇”的 D 标记摩尔分数 x_j ($j=0, 1, \dots, n$)。通过公式 $X = \Sigma(x_j \cdot j) / (9 \cdot \Sigma x_j)$ ($j=0, 1, \dots, 9$)，计算可得到班布特罗-D₉ 的氘标记同位素丰度值。

在标准文本中，我们根据班布特罗-D₉ 实际测定情况简化了计算公式，使之更易于理解和运算。

如下所示：

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(6)计算，解得 x_j ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$\begin{aligned}
A_{368} &= x_0 \times 0.803 \\
A_{369} &= x_0 \times 0.169 + x_1 \times 0.803 \\
A_{370} &= x_0 \times 0.025 + x_1 \times 0.169 + x_2 \times 0.803 \\
A_{371} &= x_0 \times 0.003 + x_1 \times 0.025 + x_2 \times 0.169 + x_3 \times 0.803 \\
A_{372} &= x_0 \times 0.003 + x_1 \times 0.025 + x_2 \times 0.169 + x_4 \times 0.803 \\
&\dots\dots\dots \\
A_{377} &= x_6 \times 0.003 + x_7 \times 0.025 + x_8 \times 0.169 + x_9 \times 0.803
\end{aligned} \tag{6}$$

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_0 —标记 0 个 D 原子的班布特罗-D₀ 分子的摩尔分数；

x_1 —标记 1 个 D 原子的班布特罗-D₁ 分子的摩尔分数；

x_2 —标记 2 个 D 原子的班布特罗-D₂ 分子的摩尔分数；

x_3 —标记 3 个 D 原子的班布特罗-D₃ 分子的摩尔分数；

x_4 —标记 4 个 D 原子的班布特罗-D₄ 分子的摩尔分数；

x₅—标记5个D原子的班布特罗-D₅分子的摩尔分数；

x₆—标记6个D原子的班布特罗-D₆分子的摩尔分数；

x₇—标记7个D原子的班布特罗-D₇分子的摩尔分数；

x₈—标记8个D原子的班布特罗-D₈分子的摩尔分数；

x₉—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。

D同位素丰度值以E计，数值以atom%D表示，按公式（2）计算：

$$E = \frac{\sum_{j=1}^9 jx_j}{9 \times \sum_{j=1}^9 x_j} \dots\dots\dots(2)$$

取平行测定结果的算术平均值为测定结果。

2. 标准编制原则和确定标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据（包括试验、统计数据）

2.0 标准编制原则

本标准的制定根据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构与编写规则》、GB/T 20001.4-2001《标准编写规则第4部分：化学分析方法》的规定进行本标准的编制工作。制定标准时尽可能地遵循简化、统一、协调、优化的原则。以既充分考虑标准的先进性，也要考虑其实用性、可行性；既要符合国内外发展的需要，也要结合国内目前产业的实际状况为总体原则。

2.1 确定标准主要内容的论据

2.1.1 研究背景

妥布特罗、马布特罗以及班布特罗均属于国家公布的主要“瘦肉精”类物质，由于它们具有能增加肌肉/脂肪比，可明显提高饲养动物瘦肉率的功效，因此，往往会被一些不法商贩利用，导致以残留的方式进入人体及生态系统。如：在畜产品养殖中，猪、牛、羊等动物被过量使用这类物质后，可长期残留在其体内，其产品属有毒、有害食品，人食用含有过量“瘦肉精”类物质的动物产品后，可造成中毒，甚至死亡。近年来，我国已禁止所有瘦肉精类物质用于养殖业，但违规使用仍屡禁不绝，严重危害畜牧产品的质量安全。

稳定性同位素氘标记的瘦肉精类（特罗类）试剂为一类合成的新型同位素试剂，因其强大的示踪能力而广泛应用于食品安全、兴奋剂检测及医学研究等领域，尤其在动物源性食品安全检测领域。目前包括出入境检验检疫局、食品检验机构和相关科研院所等对氘标记试剂的需求量正呈逐年上升趋势。它不仅是同位素示踪和同位素稀释质谱法的基本试剂，也是目

前食品安全领域瘦肉精类（特罗类）物质残留检测的一种极有市场前景的主要试剂之一。

目前，国际上对食品污染物的检测向着微痕量、超痕量的方向发展，同时，检测过程中所要面对的食品基质亦日渐复杂。为了避免由于复杂基质效应、前处理和质谱检测器等因素对分析测定结果的影响，目前无论在违禁添加剂、兴奋剂残留以及农药残留检测等食品安全领域中，同位素内标质谱检测法已经被公认为最准确的方法之一。近年我国发布的各类食品安全相关瘦肉精类（特罗类）检测的国家标准中，大多都采用了稳定同位素作为内标规范检测方法，但能与稳定性同位素标记的核心试剂相配套的规范标准，则处于一种严重缺乏状态。因此，对于妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉以及班布特罗-D₉这三种重要稳定同位素氘标记β-肾上腺素受体激动剂，建立一套科学、准确、快速的测试方法，并在此基础上形成相应的产品标准显得十分重要。

本标准的建立将对瘦肉精类（特罗类）稳定同位素氘标记试剂在食品安全检测以及兴奋剂检测领域内的应用推广起到重要作用。本标准的实施也将更好地完善我国稳定性同位素氘标记核心产品的标准体系，同时有利于指导稳定同位素相关行业领域的研究开发与应用领域的研究。本项目的完成也将为进一步完善稳定同位素标准化体系的建设奠定基础。

2.1.2 研究基础

在同位素内标试剂的技术标准方面，近年来由上海化工研究院有限公司起草的 HG/T 4850.1~4850.3《稳定性同位素氘标记试剂》系列行业标准：甲萘威-D₃、沙丁胺醇-D₃、恩诺沙星-D₅以及《稳定性同位素氘标记试剂卤代苯同位素丰度的测定方法 气相色谱-质谱联用法》行业标准均已发布实施。HG/T 4850.4《稳定性同位素氘标记试剂第4部分：敌百虫-D₆》现已处于报批过程中。因此，上海化工研究院有限公司已对同位素内标试剂方法开发积累了一定的研究基础。

由于目前国际、国内尚未公开发表稳定性同位素氘标记特罗类试剂的检测方法和技术标准。而稳定同位素标记试剂的色谱行为与相应的天然丰度试剂是一致的，因此产品纯度的测定可以参考天然丰度敌百虫试剂的高效液相色谱测定方法，优化色谱分离条件，得到易操作、精密度、准确度理想的方法。同时以成本低廉的相应天然丰度标准品作为外标，通过建立标准曲线，快速定量方法测定氘标记试剂的纯度。在同位素丰度检测方面，采用有机质谱结合“质量簇”概念及相应的同位素丰度计算方法，完成了其中氘标记同位素丰度的质谱法测定。该分析方法操作简便、快速，样品的消耗量较小，符合经济性的要求，测定结果准确度较高，重复性好，可以作为标准推荐的方法。

2.1.3 采用的标准样品

纯度分析用特罗类标准样品：上海安谱科学仪器有限公司。

同位素丰度研究用特罗类-D₉样品：上海化工研究院有限公司自主研制。

3. 主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益

3.1 特罗类-D₉纯度测定方法的建立

在标准制订过程中，工作组主要参考了国内外相关研究文献中，HPLC 法检测化学品纯度的各种不同方法，并最终确定采用标准曲线法作为本标准测定特罗类-D₉纯度的方法。

3.2 主要试验内容

3.2.1 样品的处理

依据查阅敌百虫的溶解性参数后，通过采用不同溶剂溶解不同实验量的样品，最终确定最理想的实验条件，获得较优实验结果。

3.2.2 标准曲线的建立

(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，溶于乙腈中，转移至 10mL 棕色容量瓶定容，配制成 1000 mg/L 的标准储备液，避光保存于冰箱中，可使用 1 个月。

(2) 外标标准工作溶液的制备

将配制的妥布特罗、马布特罗、班布特罗外标标准储备液用乙腈稀释成浓度为 10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、70 mg/L 和 100 mg/L 的标准工作溶液。

(3) 标准工作曲线的建立

将配制的外标标准工作溶液进行 HPLC 定量分析（每次分析都在完全相同的条件下），将色谱图上测得的峰面积对标样浓度作图，即可得到一条标准工作曲线。

3.2.3 色谱条件的确定

3.2.3.1 色谱柱：Athena C18 柱，5 μ m，4.6 mm $\times$ 100 mm。或采用具有同等分离效率的色谱柱；

3.2.3.2 柱温：30 $^{\circ}$ C；

3.2.3.3 UV 检测器波长：妥布特罗、班布特罗 205nm；马布特罗 246nm；

3.2.3.4 流速：0.7 mL/min；

3.2.3.5 进样量：5 μ L；

3.2.3.6 流动相：A 为乙腈，B 为 10mmol/L 乙酸铵水溶液；

3.2.3.7 洗脱条件：A/B=70/30，等度洗脱。

3.3 确定特罗类-D₉同位素丰度的测定方法

3.3.1 样品处理与测定

用甲醇分别将妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉样品经超声完全溶解于 1.5mL 离心管，浓度约为 10 mg/L。分别用注射器取少量溶解完全的样品，在流速 10 μL/min 下，用蠕动泵进样。

3.3.2 质谱条件的确定

根据妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉样品的实际情况，标准工作组采用电喷雾质谱进行氘同位素丰度的检测，主要进行了如下质谱参数的优化试验，并确立了较理想的质谱条件如下：

电喷雾电压：3.5 kV；雾化气流量：13 L/min；离子传输管温度：275 °C；单扫描时间：0.5 s；蠕动泵流速：10μL/min；扫描模式：正离子模式；扫描范围： $m/z=[M+H]^+ \pm 10$ dalton；谱图叠加次数：> 20；重复测定次数：6 次。

3.3.3 D 同位素丰度测定的方法学验证

(1) 方法的重复性

使用同一台液质联用仪，在完全相同的检测条件下，对同一批次上述三种特罗类-D₉样品的同位素丰度值进行重复测定，所得数据见试验报告表 6。

(2) 方法的再现性

在不同实验室中，采用两台不同型号的液质联用仪，对同一批次的特罗类-D₉样品的同位素丰度值进行了测定，分别是上海化工研究院有限公司技术开发中心 TSQ Quantum Access 三重四极杆液质联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），和上海天科化工检测有限公司 AB 4500QTRAP 三重四极杆线性离子阱质谱仪（美国 AB 公司）所得数据见试验报告表 7，合并对两组数据进行数理统计检验的结果也列于其中。

(3) 稳定性试验

为考察妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉样品在不同存储条件下的稳定性，我们采用同一批号的样品，分别置于常温（20±5）°C 以及（0~8）°C 环境中，分别检测在 0、7、14 天后的化学纯度和 D 同位素丰度。同时，开展了同批次特罗类-D₉产品在-20°C 储存条件下，12 个月的长期稳定性试验。

3.5 技术经济论证，预期的经济效果

本部分标准的编制过程符合相应的产品生产企业的要求，同时满足市场监督、检测的要求。本项行业标准制定，从一定程度上保证了稳定性同位素氘标记特罗类试剂生产销售产品的质量，能够满足生产企业、监管部门的需要。本标准的制定、发布与实施，将提高监管

部门的监测能力。

本部分标准完成后，对从源头上控制兽药残留，保证食品安全意义重大，并且会更好地完善我国在相关稳定性同位素氘标记产品的标准体系，同时也有利于指导稳定同位素特罗类试剂相关行业领域的研究开发与应用领域的研究。标准的制定和实施将推动相应同位素试剂制备技术的研究，早日实现该类试剂的国产化，摆脱对国外进口试剂的依赖，进而起到推动国内科研单位开展相关兴奋剂残留量检测，加快这一领域内与国际接轨进程的作用，解决试剂依赖进口和研发、检测成本昂贵的问题。

4. 采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

经文献查阅，目前国内外尚未公开发表稳定性同位素氘标记特罗类试剂的检测方法和技术标准。虽然在少数发达国家（如美国）稳定同位素内标试剂制备方面已经形成了一个具有显著经济效益的高科技产业，但是由于技术保密的原因，这些国家没有公开发表的产品技术标准，产品的生产商家有自己内部的质量标准，但绝不公开。

国内可以查到与之相关的特罗类天然丰度产品的检测方法，多是采用高效液相色谱法测定其含量，但不同的是我们的检测要求不仅是产品的纯度还有其同位素丰度的测定。

本部分通过对大量试验条件的优化考察，并通过对收集得到的实验数据归纳总结的基础上，最终确立了采用高效液相色谱法，以成本低廉的相应天然丰度标准品作为外标，通过建立标准曲线，快速定量方法测定氘标记试剂的纯度。并采用有机质谱，结合“质量簇”概念及相应的同位素丰度计算方法，完成了氘标记同位素丰度的质谱法测定。该分析方法操作简便、快速，样品的消耗量较小，符合经济性的要求，测定结果准确度较高，重复性好，可以作为标准推荐的方法。

5. 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

该标准与我国有关的现行法律、法规不冲突，并填补现行标准空白。

6. 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

7. 国家标准作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议

建议将本标准作为推荐性行业标准颁布实施。

8. 贯彻国家标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

为了更好地实施本行业标准，建议开展本行业标准技术的培训。

9. 废止现行有关标准的建议

目前，尚无相关标准。

10. 其他应予说明的事项

无。

稳定性同位素氘标记试剂 第 5 部分：特罗类-D₉

试 验 报 告

一、试验目的

确定稳定同位素氘标记试剂特罗类-D₉产品的纯度和氘同位素丰度值的测定方法。

二、试验方法

由于目前国内外尚未公开发表稳定性同位素氘标记特罗类试剂的检测方法和技术标准，通过查阅相关文献可知，分析天然丰度特罗类试剂多采用高效液相色谱法（HPLC）测定其含量。本品为高纯度产品，拟采用高效液相色谱法，以成本低廉的天然丰度特罗类试剂做外标，标准曲线法准确测定特罗类-D₉的纯度。并采用液相色谱-质谱联用仪，进行特罗类-D₉中 D 标记同位素丰度的质谱法测定。该分析方法操作简便、快速，样品的消耗量较少，符合经济的要求，测定结果准确度高，精密度高，重复性好，可作为标准推荐的方法。

1. 方法原理

1.1 HPLC 分析原理

将特罗类-D₉配成一定浓度样品，将溶液注入 HPLC 中，利用不同物质在固定相与流动相之间的吸附或分配系数的差异，经过连续多次在两相间的交换，最终实现产品中各组分的分离。

外标法是样品纯度定量最常用的方法之一。配制系列已知浓度的标准溶液，经高效液相色谱检测，得到峰高或峰面积对溶液浓度的标准曲线。特罗类-D₉的纯度分析就是采用外标法测定。只需测得特罗类-D₉溶液在相同色谱条件下的峰高或峰面积，即可求得试样的浓度，根据公式（1）可计算得到其纯度值（质量分数）。

1.2 MS 分析原理

将待测试样配制成溶液，引入液质联用仪的电喷雾(ESI)质谱，通过 ESI 电离方式，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。待测特罗类-D₉样品配制成溶液，进入质谱后按离子的质荷比(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。经计算、校正后输出结果，使用“质量簇”分类算法，计算特罗类-D₉样品的氘同位素丰度值。

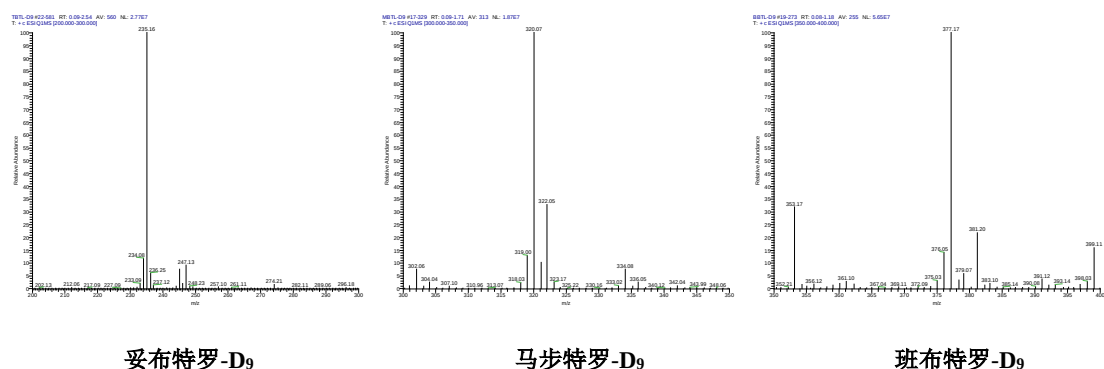


图 1 特罗类-D₉ 的质谱图

1.3 质谱分析

1.3.1 仪器与试剂

仪器:美国 Thermo Fisher Scientific 公司 TSQ Quantum Access 三重四极杆液质联用仪;美国 AB 公司 QTRAP 4500 三重四极杆线性离子阱液质联用仪; Hamilton 1750RNR 500 μ L 平头注射器;美国 Merck Millipore Simplicity™ 超纯水系统;德国 Sartorius 天平。

试剂:甲醇(色谱级,德国 Merck 公司);乙腈(色谱级,德国 Merck 公司);乙酸铵(色谱级,美国 Tedia 公司);妥布特罗、马布特罗及班布特罗标准品(上海安谱科技有限公司);妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉(上海化工研究院有限公司自制)。

1.3.2 待测样品溶液配制

称取约 1 mg 试料置于 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 10mL 容量瓶中,用无水甲醇稀释定容,浓度约为 10 mg/L。试样溶液经 0.22 μ m 孔径的有机相针式过滤器过滤备用。

1.3.3 仪器参数

Thermo Fisher Scientific 公司 TSQ Quantum Access 三重四极杆液质联用仪:仪器控制和实验数据处理采用 Thermo Fisher Scientific 公司 XCalibur 2.0.6 软件;AB QTRAP 4500 三重四极杆线性离子阱液质联用仪:仪器控制和实验数据处理采用 AB 公司 Analyst 1.6 软件。

2. 试验步骤

2.1 特罗类-D₉ 纯度的测定

2.1.1 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,避光保存于冰箱中,可使用 1 个月。

2.1.2 外标标准工作溶液配制

将 2.1.1 配制的外标标准储备液用乙腈稀释成浓度为 10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、70 mg/L 和 100 mg/L 的标准工作溶液。

2.1.3 待测样品溶液配制

做两份试样的平行测定。每份称取妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉、班布特罗-D₉ 试样各 10 mg（精确到 0.01 mg），分别溶于乙腈，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。用乙腈稀释样品储备溶液，得到 50 mg/L 的待测样品溶液。

2.1.4 标准工作曲线的建立

将 2.1.2 配制的外标标准工作溶液进行 HPLC 定量分析（每次分析都在完全相同的条件下进行），将色谱图上测得的峰面积对标样浓度作图，得到标准工作曲线。

2.1.5 待测样品的测定

将 2.1.3 待测的特罗类-D₉ 样品通过 HPLC 定量分析，在相同条件下测出其峰面积，将峰面积数据带入 2.1.4 标准工作曲线，得到理论浓度值。根据公式（1）计算即可得到其纯度（质量分数）。

2.1.6 色谱条件

2.1.6.1 色谱柱：Venusil HILIC(E)，150 mm × 2.1mm I.D.，5 μm，或有同等分离效率的色谱柱；

2.1.6.2 柱温：30 °C。

2.1.6.3 UV 检测器波长：妥布特罗、班布特罗 205nm；马布特罗 246nm；

2.1.6.4 流速：0.7 mL/min；

2.1.6.5 进样量：5 μL；

2.1.6.6 流动相：A 为乙腈，B 为 0.1%甲酸水溶液；

2.1.6.7 洗脱条件：A/B=70/30，等度洗脱。

2.1.7 特罗类-D₉ 纯度计算

纯度 w 以质量分数计，数值以%表示，按公式 (1) 计算：

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

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1位。

2.2 特罗类-D₉的氘同位素丰度测定

2.2.1 样品处理

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。

2.2.2 样品测定

用注射器取少量2.2.1的样品，进行蠕动泵10 μ L/min进样。

2.2.3 质谱条件

电喷雾电压：3.5 kV；雾化气流量：13 L/min；离子传输管温度：275℃；蠕动泵流速：10 μ L/min；扫描模式：正离子模式；扫描范围： $m/z=[M+H] \pm 10$ dalton；谱图叠加次数：> 20；单次质谱扫描时间：0.5s；重复测定次数：6 次。

2.2.4 样品的D同位素丰度计算与表述

2.2.4.1 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} （ $j=0, 1, \dots, 9$ ）。

$$A_{228} = X_{lab0} \times 0.661$$

$$A_{229} = X_{lab0} \times 0.089 + X_{lab1} \times 0.661$$

$$A_{230} = X_{lab0} \times 0.218 + X_{lab1} \times 0.089 + X_{lab2} \times 0.661$$

$$A_{231} = X_{lab0} \times 0.029 + X_{lab1} \times 0.218 + X_{lab2} \times 0.089 + X_{lab3} \times 0.661 \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$A_{232} = X_{lab0} \times 0.002 + X_{lab1} \times 0.029 + X_{lab2} \times 0.218 + X_{lab4} \times 0.089 + X_{lab5} \times 0.661$$

$$A_{233} = X_{lab1} \times 0.002 + X_{lab2} \times 0.029 + X_{lab3} \times 0.218 + X_{lab5} \times 0.089 + X_{lab6} \times 0.661$$

.....

$$A_{237} = X_{lab5} \times 0.002 + X_{lab6} \times 0.029 + X_{lab7} \times 0.218 + X_{lab8} \times 0.089 + X_{lab9} \times 0.661$$

式中：

$A_{228}, A_{229}, \dots, A_{237}$ —质荷比为228, 229, ……，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。

2.2.4.2 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 $m/z=311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320$ 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。

2.2.4.3 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} ($j=0, 1, \dots, 9$)。

$$\begin{aligned} A_{368} &= x_{lab0} \times 0.803 \\ A_{369} &= x_{lab0} \times 0.169 + x_{lab1} \times 0.803 \\ A_{370} &= x_{lab0} \times 0.025 + x_{lab1} \times 0.169 + x_{lab2} \times 0.803 & \dots\dots\dots (4) \\ A_{371} &= x_{lab0} \times 0.003 + x_{lab1} \times 0.025 + x_{lab2} \times 0.169 + x_{lab3} \times 0.803 \\ A_{372} &= x_{lab0} \times 0.003 + x_{lab1} \times 0.025 + x_{lab2} \times 0.169 + x_{lab4} \times 0.803 \\ &\dots\dots\dots \\ A_{377} &= x_{lab6} \times 0.003 + x_{lab7} \times 0.025 + x_{lab8} \times 0.169 + x_{lab9} \times 0.803 \end{aligned}$$

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。

2.2.4.4 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(2)计算:

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

取每份试样平行测定三次结果的算术平均值作为测定结果。

三、结果与讨论

1. 特罗类-D₉纯度测定的方法学验证

1.1 标准曲线及检出限

分别配制系列的天然丰度妥布特罗、马步特罗及班布特罗标准工作溶液，按试验方法2.1.4中的步骤进行测定，分别得到的谱图示于图2~图4。

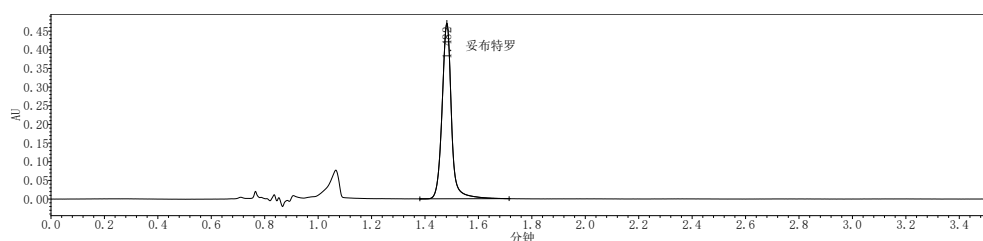


图2 妥布特罗标准溶液的HPLC图

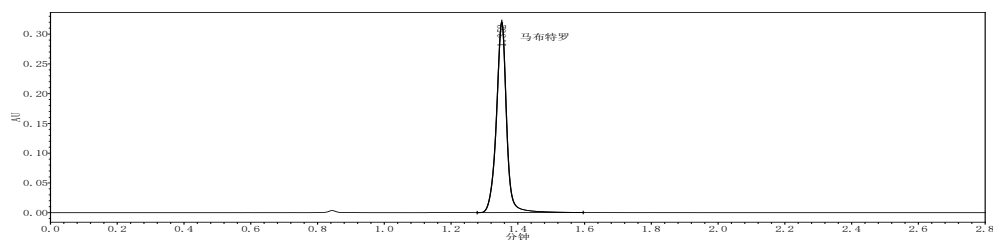


图3 马布特罗标准溶液的HPLC图

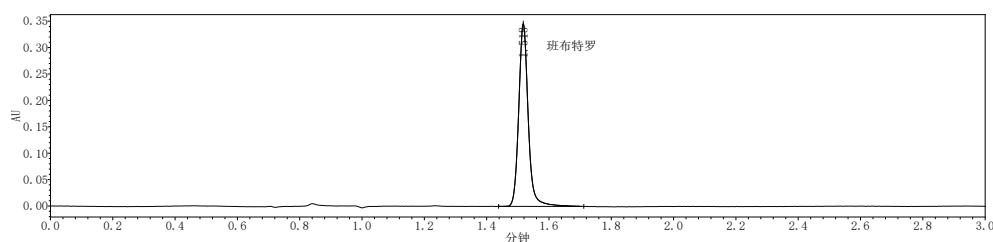


图4 班布特罗标准溶液的HPLC图

通过液相色谱数据工作站处理后的妥布特罗、马步特罗以及班步特罗的输出数据分别列于表1~表3。

表 1 妥布特罗液相色谱实验数据

编号	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积/ mAu
Std1	4.61	372586
Std2	8.97	721938

Std3	13.08	1085412
Std4	16.98	1406508
Std5	24.16	1991924

表2 马步特罗液相色谱实验数据

编号	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积/ mAu
Std1	8.48	150547.2
Std2	16.96	303063.6
Std3	33.92	607924.6
Std4	67.88	1215849
Std5	84.8	1563654

表3 班步特罗液相色谱实验数据

编号	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积/ mAu
Std1	17.7	227952.5
Std2	35.4	425405.5
Std3	53.1	648402.5
Std4	70.8	834145
Std5	88.5	1060622

以色谱图中特罗类标准品的峰面积(y)对特罗类标准品溶液的浓度(x)分别作图, 得到妥布特罗、马步特罗及班步特罗的标准曲线分别示于图5~图8, 进一步线性回归后求得的回归方程及相关系数为:

$$\text{妥布特罗: } y=83188x-12354, \quad R^2=0.9997$$

$$\text{马布特罗: } y=18365x-10624, \quad R^2=0.9993$$

$$\text{班布特罗: } y=18548x-60913, \quad R^2=0.9990$$

试验结果表明: 妥布特罗、马布特罗及班布特罗在浓度C为4.61~24.16 $\mu\text{g/mL}$ 、8.48~84.8 $\mu\text{g/mL}$ 及17.7~88.5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 分别与其相应的色谱峰面积A呈良好的线性关系。

检出限的确定: 分别取上述三种特罗类标准品溶液适量, 采用逐级稀释法, 按进样后所得谱图中敌百虫信噪比约为3倍计算, 得出该方法对于妥布特罗的检测限为0.2 $\mu\text{g/mL}$, 马布

特罗与班布特罗的检测限均为0.5 μ g/mL。

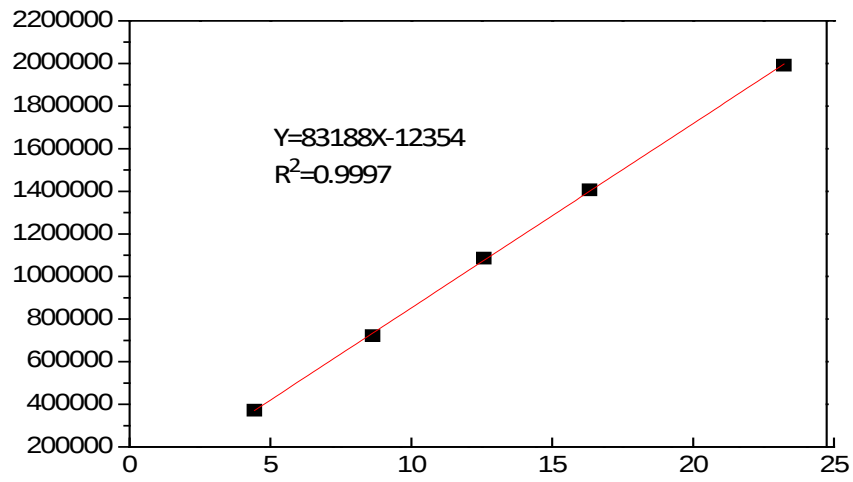


图5 妥布特罗标准曲线图

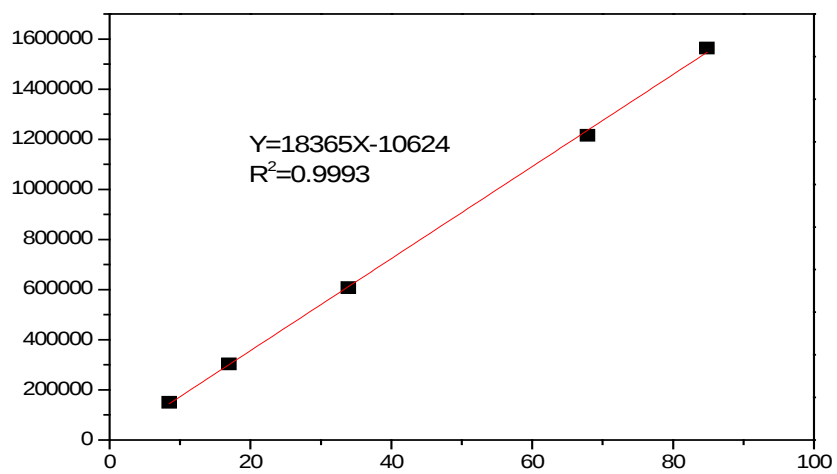


图6 马布特罗标准曲线图

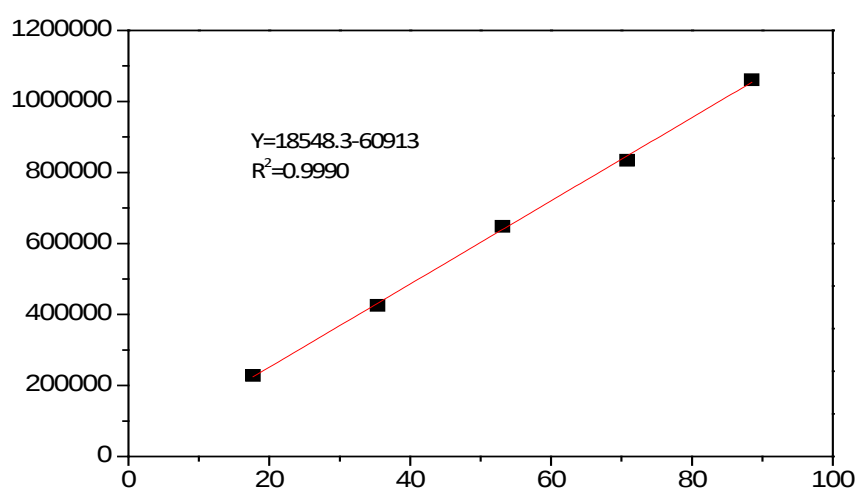


图7 班布特罗标准曲线图

1.2 方法的精密度

分别取浓度为 13.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 妥布特罗标准品溶液、33.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马布特罗标准品溶液及 53.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 班布特罗标准品溶液，重复进样 6 次，所得妥布特罗、马布特罗及班布特罗的标准品峰面积数据分别列于表 4~表 6，表中妥布特罗、马布特罗及班布特罗数据的 RSD 值依次为 0.14%、0.24%及 0.90%，说明该分析测定方法具有较高的精密度。

表 4 妥布特罗方法的精密度试验

样品编号	妥布特罗标准品峰面积	平均值	RSD/%
S1	1089351	1087135	0.14
S2	1088174		
S3	1085412		
S4	1087619		
S5	1086685		
S6	1085567		

表 5 马布特罗方法的精密度试验

样品编号	马布特罗标准品峰面积	平均值	RSD/%
S1	607346	607593	0.24
S2	608021		

S3	605925
S4	608753
S5	609518
S6	607996

表6 班布特罗方法的精密度试验

样品编号	班布特罗标准品峰面积	平均值	RSD/%
S1	639967	649711	0.90
S2	651935		
S3	648402		
S4	651398		
S5	657812		
S6	648753		

1.3 方法的加标回收率

在已知浓度的特罗类样品溶液中分别加入一定量的特罗类标准品溶液，在试验方法 2.1.5 的液相条件下进行测定，根据所得数据计算加标回收率，妥布特罗、马布特罗及班布特罗结果分别列于表 7~表 9。

表 7 妥布特罗方法的加标回收率试验

加标前样品含量 $\mu\text{g/mL}$	加入标准品含量 $\mu\text{g/mL}$	加标后理论含量 $\mu\text{g/mL}$	加标后实测含量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	平均值 %
8.2568	0.5031	8.7599	8.7568	98.59	98.72
			8.7563	98.82	
			8.7496	98.74	
			13.3209	99.85	
8.2568	5.0834	13.3402	13.3198	99.86	99.84
			13.3156	99.82	
			28.2836	99.98	
			28.2855	99.99	
8.2568	20.0315	28.2883	28.3503	100.22	100.06
			28.2855	99.99	

表 8 马布特罗方法的加标回收率试验

加标前样品含 量 $\mu\text{g/mL}$	加入标准品含 量 $\mu\text{g/mL}$	加标后理论含 量 $\mu\text{g/mL}$	加标后实测 含量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	平 均 值 %
			10.5321	98.96	
10.1362	0.5068	10.6430	10.4398	98.09	98.59
			10.5072	98.72	
			15.2217	99.23	
10.1362	5.2040	15.3402	15.1298	98.63	99.02
			15.2163	99.19	
			30.1516	100.01	
10.1362	20.0132	30.1494	30.1398	99.97	99.99
			30.1475	99.99	

表 9 布特罗方法的加标回收率试验

加标前样品含 量 $\mu\text{g/mL}$	加入标准品含 量 $\mu\text{g/mL}$	加标后理论含 量 $\mu\text{g/mL}$	加标后实测 含量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	平 均 值 %
			18.3238	98.71	
18.0629	0.5008	18.5637	18.4069	99.16	98.94
			18.3698	98.96	
			23.0689	99.97	
18.0629	5.0121	23.0750	23.5932	102.25	100.71
			23.0543	99.91	
			38.0698	100.01	
18.0629	20.0012	38.0641	38.0594	99.99	100.01
			38.0702	100.02	

由表 7~表 9 试验结果可见：当添加水平为 0.5、5.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 时，妥布特罗、马布特罗及班布特罗的回收率均在为 98.59%~100.71% 范围内，说明该方法具有较高的回收率和准确度，完全能满足作为兽药残留分析的内标试剂要求。

1.4 方法的再现性

分别采用两台不同的液相色谱仪对同一批次妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 样品的化学纯度分别进行了测定，分别是 LC-20AT（日本岛津公司）和 ACQUITY UHPLC

液相色谱仪（美国 Waters 公司），所得数据如下表 10~表 12 所示。

表 10 妥布特罗-D₉纯度方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	99.38	99.35
S2	99.33	99.37
S3	99.39	99.34
S4	99.34	99.35
S5	99.37	99.36
S6	99.39	99.30
S7	99.36	99.33
S8	99.40	99.36
算术平均值 $\bar{x}$	99.37	99.35
标准偏差 S	0.03	0.02
方差 S ²	0.0009	0.0004
$F = S_1^2 / S_2^2$	2.25	
F _{0.05} (7,7)	3.79	
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	0.03	
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	1.33	
t _(0.05,14)	2.145	

表 11 马布特罗-D₉纯度方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	98.57	98.51
S2	98.62	98.57
S3	98.60	98.6
S4	98.61	98.58

S5	98.56	98.56
S6	98.66	98.58
S7	98.63	98.6
S8	98.55	98.61
算术平均值	98.60	98.58
标准偏差 S	0.04	0.03
方差 S ²	0.0016	0.0009
$F = S_1^2 / S_2^2$	1.78	
F _{0.05} (7,7)	3.79	
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	0.035	
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}}$	1.14	
t _(0.05,14)	2.145	

表 12 班布特罗-D₉纯度方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	99.46	99.43
S2	99.43	99.45
S3	99.49	99.46
S4	99.44	99.49
S5	99.47	99.46
S6	99.49	99.47
S7	99.46	99.42
S8	99.48	99.46
算术平均值 $\bar{x}$	99.47	99.46
标准偏差 S	0.02	0.02
方差 S ²	0.0004	0.0004
$F = S_1^2 / S_2^2$	1.00	

$F_{0.05}(7,7)$	3.79
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}}$	0.02
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}}$	1.00
$t_{(0.05,14)}$	2.145

由表 10~表 12 可知，在两个实验室，分别用不同型号液相色谱对特罗类-D₉ 同位素纯度的测定，在显著性水平 $\alpha=0.05$ 时，对两组数据做统计检验，可知 $F_{0.05(7, 7)}=3.79$ ， $t_{(0.05,14)}=2.145$ ，证明上述两组数据间没有显著差异。

2. 氘同位素丰度测定的方法学验证

2.1 方法的重复性

采用同一台质谱仪，在相同检测条件下，对同一批次的妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 样品的同位素丰度值进行重复测定，所得数据列于表 13。

表 13 方法的重复性试验

样品	D 同位素丰度/at.%D	平均值 $\bar{x}$ / at.%D	RSD/%
妥布特罗-D ₉	S1	98.11	0.04
	S2	98.13	
	S3	98.09	
	S4	98.04	
	S5	98.07	
	S6	98.09	
马布特罗-D ₉	S1	98.57	0.04
	S2	98.62	
	S3	98.60	
	S4	98.61	
	S5	98.56	
	S6	98.66	
班布特罗-D ₉	S1	98.53	0.04
	S2	98.50	
	S3	98.48	

S4	98.56
S5	98.47
S6	98.48

由表 13 数据可见：上述三种特罗类-D₉ 样品丰度数据的 RSD 值均为 0.04% ，说明该分析测定方法具有较高的重复性。

2.2 方法的再现性

在不同实验室中采用两台不同的液质联用仪对同一批次妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 样品的同位素丰度值进行了测定，分别是上海化工研究院有限公司技术开发中心 TSQ Quantum Access 三重四级杆液质联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）和上海天科化工检测有限公司 AB 4500QTRAP 三重四极杆线性离子阱质谱仪（美国 AB 公司），所得试验数据如下表 14~表 16 所示。

表 14 妥布特罗-D₉ 丰度测试方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	98.11	98.12
S2	98.13	98.09
S3	98.09	98.03
S4	98.04	98.05
S5	98.07	98.14
S6	98.09	98.13
S7	98.06	98.11
S8	98.00	98.12
算术平均值 $\bar{x}$	98.07	98.10
标准偏差 S	0.04	0.05
方差 S ²	0.0016	0.025
$F = S_1^2 / S_2^2$	0.64	
F _{0.05} (7,7)	3.79	
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	0.04	
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	1.50	

$t_{(0.05,14)}$	2.145
-----------------	-------

表 15 马布特罗-D₉丰度测试方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	98.57	98.51
S2	98.62	98.57
S3	98.60	98.6
S4	98.61	98.58
S5	98.56	98.56
S6	98.66	98.58
S7	98.63	98.6
S8	98.55	98.61
算术平均值	98.60	98.58
标准偏差 S	0.04	0.03
方差 S ²	0.0016	0.0009
$F = S_1^2 / S_2^2$	1.78	
F _{0.05(7,7)}	3.79	
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	0.035	
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	1.14	
$t_{(0.05,14)}$	2.145	

表 16 班布特罗-D₉丰度测试方法的再现性试验

	上海化工研究院有限公司 技术开发中心 TSQ Quantum Access	上海天科化工检测 有限公司 AB 4500QTRAP
S1	98.53	98.58
S2	98.50	98.54

S3	98.48	98.52
S4	98.56	98.55
S5	98.47	98.48
S6	98.48	98.54
S7	98.50	98.53
S8	98.52	98.55
算术平均值 $\bar{x}$	98.51	98.54
标准偏差 S	0.03	0.03
方差 S^2	0.0009	0.0009
$F = S_1^2 / S_2^2$	1.00	
$F_{0.05}(7,7)$	3.79	
$\bar{S} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	0.03	
$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\bar{S}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	2.00	
$t_{(0.05,14)}$	2.145	

由表 14~表 16 可见:在不同实验室,分别采用不同型号质谱仪对同一批次妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉、班布特罗-D₉ 样品进行 D 同位素丰度的测定,在显著性水平 $\alpha=0.05$,对表 14 的数据进行数理统计检验。通过查表可知,在自由度均为 7 的情况下 $F_{0.05(7, 7)}=3.79$, $t_{(0.05,14)}=2.145$,说明上述两组检测数据之间没有显著差异。

3 稳定性实验

3.1 储存条件对样品稳定性影响

为考察妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 样品在不同存储条件下的稳定性,我们采用同一批号的样品,分别置于常温(20±5)℃以及(0~8)℃环境中,分别检测在 0、7、14 天后的化学纯度和 D 同位素丰度,数据见表 17、表 18。

表 17 常温储存下纯度及 D 同位素丰度稳定性实验

编 号		纯度/% (n=6)	平均值/%	丰度/ at.%D (n=6)	平均值
妥布特 罗-D ₉	T-0	99.56	98.94	98.20	97.68
	T-7	99.08		97.64	
	T-14	98.17		97.21	
马布特 罗-D ₉	M-0	99.38	98.92	98.65	98.07
	M-7	99.01		98.03	

	M-14	98.38		97.52	
班布特罗-D ₉	B-0	99.53		98.46	
	B-7	99.18	98.91	98.15	98.01
	B-14	98.32		97.43	

由上表数据可知：妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 的短期常温储存条件下，试样纯度与同位素丰度均已发生变化，稳定性较差。

表 18 （0~8）℃ 储存下纯度及 D 同位素丰度稳定性实验

编 号		纯度/% (n=6)	平均值/%	丰度/ at.%D (n=6)	平均值
妥布特罗-D ₉	T-0	99.56		98.20	
	T-7	99.22	99.24	98.09	98.03
	T-14	98.95		97.81	
马布特罗-D ₉	M-0	99.38		98.65	
	M-7	99.12	99.12	98.43	98.34
	M-14	98.87		97.95	
班布特罗-D ₉	B-0	99.53		98.46	
	B-7	99.38	99.29	98.26	98.23
	B-14	98.96		97.98	

由上表数据可知：上述三种特罗类-D₉ 样品在（0~8）℃ 储存条件下，开始有小幅变化，稳定性有下降趋势。由此可见，妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 样品应储存于温度更低的环境中。

3.2 长期稳定性

为验证妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉ 及班布特罗-D₉ 在-20℃ 储存条件下的稳定性，我们采用与（3.1）同一批号的样品分别在 0，2，4，8，12 个月时取样测其化学纯度、D 同位素丰度，并对检测得到的结果，在置信水平 95%，α=0.05 时，进行数理统计，结果见表 19，表 20。

表 19 纯度长期稳定性判断依据（12 个月）

样品编号	纯度/% (n=6)	均值	标准差 s	$\frac{ \bar{x}_i - \bar{x} }{s}$	t _(0.05,4)
妥布特 S-0	99.56			1.250	

罗-D ₉	S-2	99.52			0.417	
	S-4	99.54	99.53	0.024	0.417	2.776
	S-8	99.50			1.250	
	S-12	99.51			0.833	
马布特罗-D ₉	S-0	99.38			1.469	
	S-2	99.32			0.322	
	S-4	99.30	99.33	0.031	0.968	2.776
	S-8	99.35			0.645	
	S-12	99.32			0.322	
班布特罗-D ₉	S-0	99.53			1.053	
	S-2	99.50			0.526	
	S-4	99.48	99.51	0.019	1.579	2.776
	S-8	99.51			0	
	S-12	99.52			0.526	

表 20 D 同位素丰度长期稳定性判断依据（12 个月）

样品编号		丰度/ at.%D (n=6)	均值	标准差 s	$\frac{ \overline{x_i} - \overline{x} }{s}$	t _(0.05,4)
妥布特 罗-D ₉	S-0	98.20			0	
	S-2	98.22			0.645	
	S-4	98.24	98.20	0.031	1.290	2.776
	S-8	98.17			0.968	
	S-12	98.15			1.623	
马布特 罗-D ₉	S-0	98.65			1.489	
	S-2	98.53			1.064	
	S-4	98.60	98.58	0.047	0.426	2.776
	S-8	98.59			0.213	
	S-12	98.55			0.638	
班布特 罗-D ₉	S-0	98.46			0.476	
	S-2	98.42			0.476	
	S-4	98.49	98.44	0.042	1.190	2.776
	S-8	98.38			1.429	
	S-12	98.43			0.238	

由表 19 与表 20 实验数据可见：妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉样品在-20℃储存条件下的长期稳定性良好。

4. 结论

通过对妥布特罗-D₉、马布特罗-D₉及班布特罗-D₉这三种特罗类-D₉产品，纯度及同位素丰度值测定进行的多组验证实验，可得出如下结论：本试验方法准确可靠，具有较高的精密度，良好的重复性及再现性，完全能够满足测定的要求，因此，将此试验方法定为本标准用试验方法。