

中华人民共和国国家标准

农业部 1068 号公告—3—2008

饲料中 10 种蛋白同化激素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of ten kinds of anabolic androgenic steroids in feeds
High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

2008-07-25 发布

2008-07-25 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国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归口。

本标准主要起草单位：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)]、浙江省饲料监察所、北京市饲料监察所、上海市兽药饲料检测所。

本标准主要起草人：赵根龙、苏晓鸥、朱聪英、应永飞、苏淑清、韦敏珏、黄士新、索德成、邓程君、卢光菊、曹莹。

饲料中 10 种蛋白同化激素的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱-串联质谱法测定配合饲料中大力补、甲基睾丸酮、丙酸睾酮、睾酮、诺龙、丙酸诺龙、勃地龙、群勃龙、脱氢异雄酮、黄体酮等 10 种蛋白同化激素含量的方法。

本标准适用于配合饲料中大力补等 10 种蛋白同化激素含量的测定。方法最低定量限为 0.05 mg/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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 方法提要

饲料样品中的蛋白同化激素以甲醇溶液超声提取，提取液离心后经 C_{18} 固相萃取柱净化，以甲醇洗脱，用高效液相色谱-串联质谱仪，电喷雾正离子方式进行测定。

4 试剂

除方法另有规定外，试剂均为分析纯，实验室用水符合 GB/T 6682 中二级水的规定。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 甲酸：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇溶液 I：分别用量筒量取 300 mL 甲醇(4.1)和 700 mL 水，混匀。

4.5 甲醇溶液 II：分别用量筒量取 200 mL 甲醇(4.1)和 800 mL 水，混匀。

4.6 大力补、甲基睾丸酮、丙酸睾酮、睾酮、诺龙、丙酸诺龙、勃地龙、群勃龙、脱氢异雄酮、黄体酮等 10 种蛋白同化激素对照品：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.7 蛋白同化激素贮备液配制：分别精密称取 10 种蛋白同化激素对照品至棕色容量瓶中，用甲醇配成 10 份浓度各约为 1 mg/mL 的标准贮备液， -20°C 保存，有效期 6 个月。

4.8 混合对照品工作液：分别吸取一定量的 10 种蛋白同化激素类药物的贮备液(4.7)，置于棕色容量瓶中，用甲醇稀释成浓度为 1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL、50.00 ng/mL、100.00 ng/mL、500 ng/mL 的对照品工作液。 -20°C 保存，有效期 1 个月。

4.9 固相萃取小柱： C_{18} 固相萃取柱，载体 200 mg，承载液体积 3 mL，或其他性能类似的小柱。

5 仪器和设备

5.1 实验室常用仪器、设备。

- 5.2 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.001 g 各 1 台。
- 5.3 超声水浴。
- 5.4 离心机:4 000 r/min~5 000 r/min(相对离心力为 1 912 g~2 988 g)。
- 5.5 固相萃取装置。
- 5.6 配备电喷雾离子源(ESI)的液相色谱串联质谱仪。
- 5.7 可控温 30℃~50℃氮吹装置。

6 试样制备

按照 GB/T 20195 制备样品,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存,备用。

7 操作方法

7.1 提取

称取饲料样品 5 g(准确至 0.001 g),置于 100 mL 离心管中,准确加入甲醇溶液 I(4.4)50.00 mL,加塞,充分摇动 1 min,再置超声水浴中超声提取 20 min,其间充分摇动 2 次。取出后,于离心机上 5 000 r/min 离心 10 min。

7.2 净化

分别用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化固相萃取小柱(4.9),准确移取 10 mL 上清液(7.1)上柱,控制过柱速度在 1 mL/min 以内。再用 3 mL 水和 3 mL 甲醇溶液 II(4.5)洗涤固相萃取柱,近干后用甲醇(4.1)5 mL 洗脱。在氮吹装置(5.7)上 40℃下用氮气吹干。准确加入一定体积的甲醇(4.1),涡旋振荡 1 min,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱串联质谱条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 150 mm,柱内径 2.1 mm,粒度 3.5 μm 或性能类似的分析柱。

柱温:室温。

流动相流速:250 μL/min。

进样量:20 μL。

流动相、流速及梯度洗脱条件见表 1(实际根据使用仪器及色谱柱适当调整)。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱条件

时间,min	流速,mL/min	0.1%甲酸溶液,%	乙腈,%
0.0	0.25	50	50
15.0	0.25	10	90
19.0	0.25	10	90
20.0	0.25	50	50

7.3.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源。
- b) 扫描方式:正离子模式。
- c) 检测方式:多反应监测。
- d) 壳气流量、补充气和碰撞气,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- e) 毛细管温度、棱镜补偿、碰撞能量等值应优化至最佳灵敏度。
- f) 定性离子对、定量离子对及对应的保留时间和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 10 种蛋白同化激素的定性、定量离子对及保留时间、碰撞电压的参考值

被测药物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	参考保留时间 min	参考碰撞能量 V
群勃龙	271.2/199.2	271.0/199.0	3.73	28
	271.2/253.2			23
勃地龙	287.0/135.1	287.1/121.1	3.94	22
	287.0/121.1			32
诺龙	275.2/109.1	275.3/109.1	4.35	38
	275.2/257.3			26
睾酮	289.3/97.1	289.3/97.1	4.98	32
	289.3/109.1			35
大力补	301.3/121.1	301.3/121.1	4.52	35
	301.3/283.2			16
甲基睾酮	303.4/97.2	303.4/109.1	5.80	40
	303.4/109.1			36
脱氢异雄酮	289.0/253.0	289.0/213.0	4.99	12
	289.0/213.0			20
丙酸诺龙	331.2/109.1	331.4/109.1	9.47	34
	331.2/145.3			36
丙酸睾酮	345.2/97.2	345.4/109.1	12.67	44
	345.2/109.1			28
黄体酮	315.1/97.0	315.1/97.0	13.79	22
	315.1/109.0			22

7.3.3 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对照品工作液中对应的保留时间偏差在 $\pm 5\%$ 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对照品工作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%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.4 定量测定

定量方法:在仪器最佳工作条件下,对混合对照品工作液进样,以标准溶液中被测组分与样品中被测组分的峰面积进行单点或多点校正定量,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。

8 结果计算与表述

8.1 试样中某种蛋白同化激素的质量分数 X_i 以毫克每千克(mg/kg)表示,可用式(1)计算:

$$X_i = \frac{P_i \times V_1 \times c_i \times V_3}{P_{st} \times m \times V_2} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_i ——试样溶液中某种蛋白同化激素的峰面积值;

V_1 ——试样提取液体积,单位为毫升(mL);

C_i ——某种蛋白同化激素标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_2 ——净化时分取溶液的体积,单位为毫升(mL);

P_{st} ——标准溶液峰面积平均值；

m ——试样质量,单位为克(g)；

V_3 ——上机前定容体积,单位为毫升(mL)。

8.2 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 重复性

在同一实验室由同一操作人员完成的 2 个平行测定的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)

10 种蛋白同化激素的液相色谱-串联质谱图

A.1 100 ng/mL 10 种蛋白同化激素标准液相色谱-串联质谱图见图 A.1。从上至下依次为：群勃龙、诺龙、勃地龙、脱氢异雄酮、睾酮、大力补、甲基睾酮、黄体酮、丙酸诺龙、丙酸睾酮。

D:\Xcalibur\...100ppbstd_080604154831

2008-6-4 15:48:31

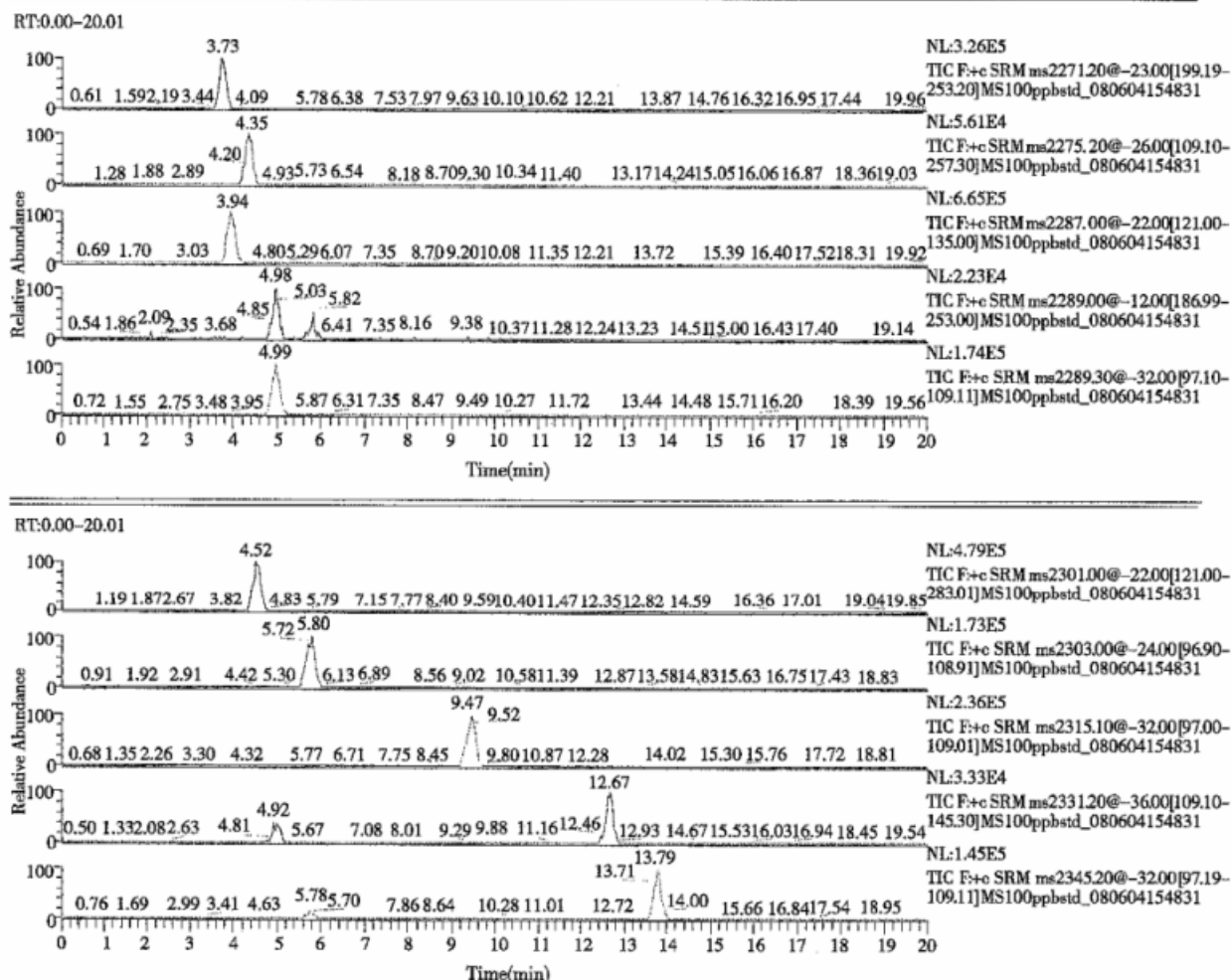


图 A.1 100 ng/mL 10 种蛋白同化激素标准液相色谱-串联质谱图