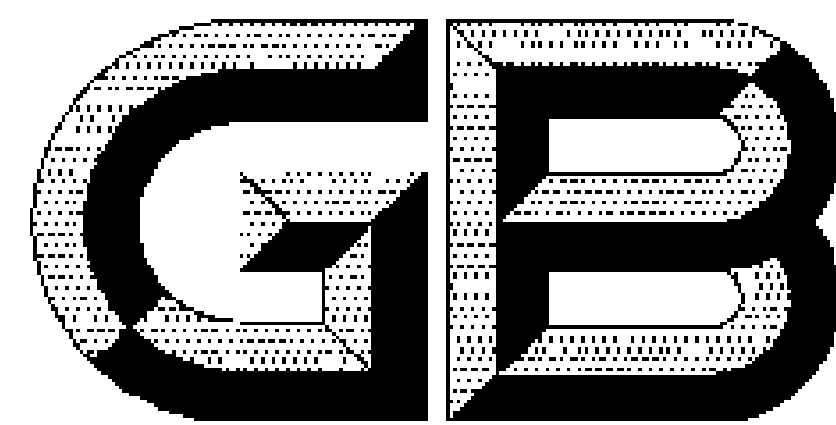




中华人民共和国国家标准

GB/T 20753—2006

牛和猪脂肪中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮 和醋酸甲地孕酮残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

Method for the determination of melengestrol acetate, chlormadinone
acetate and megestrol acetate residues in bovine and porcine fat—
LC-UV Detection Method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

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、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、唐毅锋、方晓明、王传琨、姜维。

本标准系首次发布的国家标准。



牛和猪脂肪中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮 和醋酸甲地孕酮残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

1 范围

本标准规定了牛和猪脂肪中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮残留量的液相色谱测定方法。

本标准适用于牛和猪脂肪中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮残留量的测定。

本标准的方法检出限：醋酸美仑孕酮、醋酸甲地孕酮和醋酸氯地孕酮均为 0.010 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 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—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

脂肪样品经微波融化，用乙腈提取，皂化后，经氰丙基型固相萃取柱净化，C₁₈ 色谱柱分离，紫外检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙酸乙酯：色谱纯。

4.4 正己烷：色谱纯。

4.5 氯化镁（MgCl₂ · 6H₂O）。

4.6 氢氧化钠。

4.7 盐酸。

4.8 乙酸乙酯+正己烷（1+19）：量取 10 mL 乙酸乙酯（4.3）与 190 mL 正己烷（4.4）混合。

4.9 乙酸乙酯+正己烷（1+4）：量取 40 mL 乙酸乙酯（4.3）与 160 mL 正己烷（4.4）混合。

4.10 盐酸溶液：0.2%。移取 2.0 mL 盐酸（4.7）与水混合至 1 L。

4.11 氯化镁溶液：1.0 mol/L。称取 20.3 g 氯化镁（4.5），用水溶解并定容到 100 mL。

4.12 氢氧化钠溶液：0.1 mol/L。称取 1.00 g 氢氧化钠（4.6），用水溶解并定容到 250 mL。

4.13 乙腈+水（65+35）：量取 650 mL 乙腈（4.1）与 350 mL 水混合，摇匀，脱气，待用。

4.14 标准物质:醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮,纯度 $\geq 97\%$ 。

4.15 标准储备溶液:1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。准确称取醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮(4.14)标准物质各 0.050 0 g 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)溶解并定容至刻度。标准储备溶液于 4℃ 保存,可使用 1 年。

4.16 混合标准溶液 I:100 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取 10.0 mL 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准储备液(4.15)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容。该混合标准溶液于 4℃ 保存,可使用 1 年。

4.17 混合标准溶液 II:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。取 1.0 mL 混合标准溶液 I(4.16)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容。该混合标准溶液于 4℃ 保存,可使用 6 个月。

4.18 混合标准工作溶液:分别吸取 10 μL , 20 μL , 40 μL , 80 μL , 100 μL 混合标准溶液 II(4.17)添加到 980 μL , 970 μL , 950 μL , 910 μL , 890 μL 的乙腈+水(65+35)(4.13)中,再加入 10 μL 盐酸溶液(4.10),混匀,得到浓度为 0.010 $\mu\text{g/mL}$ 、0.020 $\mu\text{g/mL}$ 、0.040 $\mu\text{g/mL}$ 、0.080 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准工作溶液,该溶液当日制备。

4.19 氰丙基固相萃取柱或相当者:3 mL, 500 mg。使用前分别用 5 mL 乙酸乙酯和 6 mL 正己烷淋洗,保持柱体湿润。

4.20 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器

5.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 氮气浓缩仪。

5.4 固相萃取装置:配有真空泵。

5.5 低温离心机:—5℃ 至室温,最大转速 5 000 r/min。

5.6 液体混匀器。

5.7 恒温水浴。

5.8 微波炉。

5.9 移液器:10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 。

6 试样的制备与保存

6.1 试样制备

把大约 5 g 的猪或牛脂肪组织切成小块,然后放入底部塞有玻璃棉的漏斗中,将漏斗放入 150 mL 的烧杯中,将烧杯置于微波炉内。使用最大功率,加热 30 s~60 s,如果脂肪没有融化,可在间隔 30 s~60 s 以后重复加热 30 s~60 s,直到有液体脂肪流出,通过漏斗滴入烧杯中。根据需要熬制的脂肪量,可重复加热。把熬制好的脂肪油放入样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

如果熬制好的脂肪液体不立刻测定,则将熬制好的脂肪样品置于—18℃ 冰柜中,冷冻保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 2 g 脂肪样品,精确到 0.01 g,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 5 mL 乙腈,于 60℃ 水浴中保持 3 min,使固体脂肪融化。用液体混匀器(5.6)涡旋 1 min,于—5℃ 以 3 500 r/min 离心 7 min,吸取上清液至 15 mL 具塞聚丙烯离心管中,再向沉淀物中加入 5 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液。向合并的乙腈提取液中加入 2 mL 正己烷,涡旋 1 min,于—5℃ 以 3 500 r/min 离心 5 min,弃去正己烷层,乙腈相再用 2 mL 正己烷重复洗涤一次,弃去正己烷层。乙腈提取液于 60℃ 用氮气浓缩仪吹干。

7.2 皂化

向乙腈提取液(7.1)中依次加入 4 mL 正己烷、1 mL 氢氧化钠溶液(4.12)和 0.5 mL 氯化镁溶液(4.11),于液体混匀器上快速混匀 10 s,在 60℃水浴中保持 15 min,于-5℃以 3 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液至 15 mL 玻璃离心管中。向沉淀物中再加入 4 mL 正己烷,混匀,于 60℃水浴中加热 15 min 后,于-5℃以 3 500 r/min 离心 5 min,合并上清液。于 60℃用氮气浓缩仪吹干,用 1.0 mL 正己烷溶解残渣,待净化。

7.3 净化

将上述样液(7.2)移入氰丙基固相萃取柱中(4.19),用 2 mL 正己烷分两次润洗玻璃试管,洗液也移入固相萃取柱中。待样液流出后,依次用 5 mL 正己烷和 6 mL 乙酸乙酯+正己烷溶液(4.8)淋洗固相萃取柱,淋洗液流出后,固相萃取柱抽干 2 min,最后用 3.5 mL 乙酸乙酯+正己烷溶液(4.9)洗脱,洗脱液收集于另一 15 mL 玻璃离心管中,于 60℃用氮气浓缩仪吹干。残余物用 990 μL 乙腈+水(4.13)涡旋溶解,静止 15 min 后,加入 10 μL 盐酸溶液(4.10),混匀,过 0.2 μm 滤膜后,供液相色谱测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- 色谱柱:Kromasil C₁₈, 5 μm, 250 mm×4.6 mm(内径)或相当者;
- 预柱:C₁₈, 5 μm, 12.5 mm×4.6 mm(内径);
- 流动相:乙腈+水(65+35);
- 流速:1.0 mL/min;
- 柱温:35℃;
- 检测波长:292 nm;
- 进样量:40 μL。

7.4.2 液相色谱测定

用混合标准工作溶液(4.18)分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准物质的液相色谱图参见图 A.1。



7.5 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按 7.1~7.3 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

结果按式(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,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

9 精密度

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。

9.1 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 ,试样中被测物的含量范围及重复性方程见表 1 和表 2。

表 1 牛脂肪中三种孕酮的含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
醋酸美仑孕酮	0.010~0.050	$r=0.133\ 8\ m+0.253\ 2$	$R=0.209\ 3\ m$
醋酸氯地孕酮	0.010~0.050	$r=0.124\ 6\ m$	$R=0.134\ 1\ m$
醋酸甲地孕酮	0.010~0.050	$r=0.085\ 7\ m$	$R=0.122\ 8\ m$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 2 猪脂肪中三种孕酮的含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
醋酸美仑孕酮	0.010~0.050	$r=0.651\ 8\ m$	$R=0.677\ 1\ m$
醋酸氯地孕酮	0.010~0.050	$r=0.045\ 8\ m+1.058\ 7$	$R=0.061\ 7\ m+1.223\ 5$
醋酸甲地孕酮	0.010~0.050	$r=0.059\ 0m+0.795\ 8$	$R=0.076\ 3\ m+1.074\ 2$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果两次测定值的差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 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 ,试样中被测物的含量范围及再现性方程见表 1 和表 2。



附 录 A
(资料性附录)
标准物质液相色谱图

醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准物质的液相色谱图,见图 A.1。

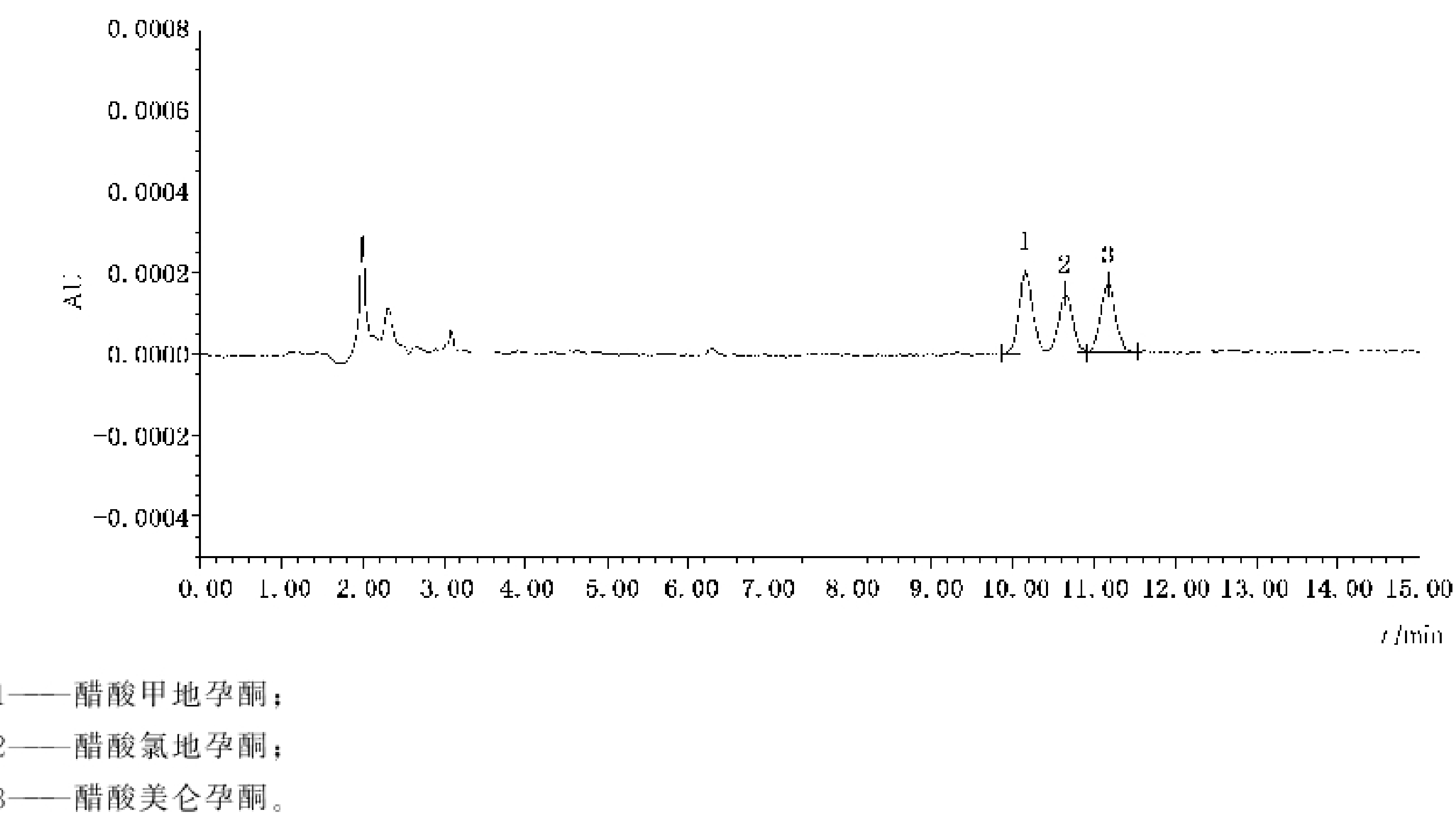


图 A.1 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准物质的液相色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回收率

本方法中三种孕酮添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 三种孕酮添加浓度及其平均回收率的试验数据($n=10$)

化合物名称	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/(%)
醋酸美仑孕酮	0.010	91.8
	0.020	87.4
	0.050	88.8
醋酸氯地孕酮	0.010	89.1
	0.020	86.7
	0.050	89.0
醋酸甲地孕酮	0.010	88.1
	0.020	89.6
	0.050	90.2