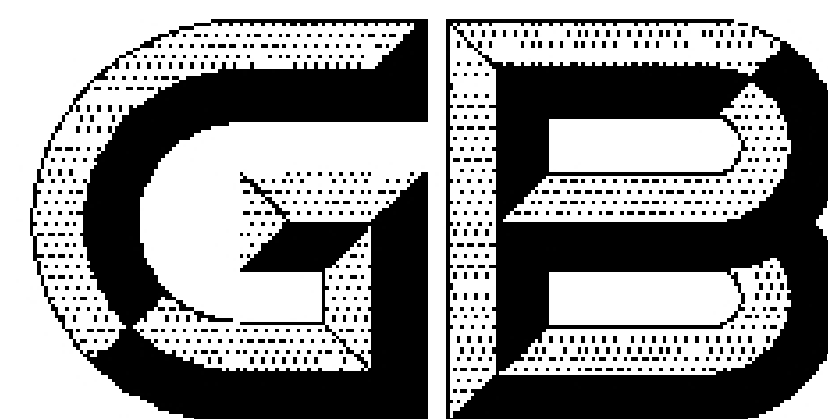




中华人民共和国国家标准

GB/T 20758—2006

牛肝和牛肉中睾酮、表睾酮、 孕酮残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of testosterone, epi-testosterone and
progesterone residues in bovine liver and muscle tissues—
LC-MS-MS 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、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、林峰、林海丹、张美金、黄华军。

本标准系首次发布的国家标准。



牛肝和牛肉中睾酮、表睾酮、孕酮残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肝和牛肉中睾酮、表睾酮和孕酮残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肝和牛肉中睾酮、表睾酮、孕酮残留量的测定。

本标准的方法检出限：肝脏中睾酮、表睾酮、孕酮为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ ，肌肉中睾酮、表睾酮为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ ，孕酮为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中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

牛肝和牛肉中的睾酮、表睾酮、孕酮药物残留经酶解后用甲醇叔丁基甲醚提取，提取液用 C_{18} 固相萃取柱净化，肝脏样品需再经硅胶固相萃取柱净化，洗脱液浓缩定容后，供液相色谱-串联质谱测定。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，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 叔丁基甲醚：色谱纯。

4.4 正己烷：色谱纯。

4.5 三氯甲烷。

4.6 甲酸铵。

4.7 β -葡萄糖苷酸酶和硫酸酯酶：H-2 型，helix pomatia。

4.8 磷酸盐缓冲液： 1.0 mol/L 。称取 13.6 g 磷酸二氢钾溶于 100 mL 水中，称取 8.7 g 磷酸氢二钾溶于 50 mL 水中，分别取 70 mL 磷酸二氢钾水溶液和 28 mL 磷酸氢二钾水溶液，混匀后调节 pH 值为 5.0 ，置 4°C 中可保存 1 周。

4.9 饱和氯化钠水溶液。

4.10 水饱和乙酸乙酯。

4.11 睾酮、表睾酮、孕酮标准物质：纯度 $\geq 99\%$ ；氘代睾酮（ d_5 -睾酮）、氘代孕酮（ d_9 -孕酮）内标标准物质：纯度 $\geq 98\%$ 。



- 4.12 标准储备溶液:100 $\mu\text{g/mL}$ 。准确称取适量的睾酮、表睾酮、孕酮标准物质,用甲醇分别配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液, -18°C 贮存,可使用6个月。
- 4.13 标准工作溶液:5 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取5 mL 睾酮、表睾酮、孕酮标准储备溶液(4.12)至100 mL 容量瓶中,以甲醇稀释并定容,此标准工作溶液的浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ 。 -18°C 贮存,可使用6个月。
- 4.14 混合标准工作溶液:50 $\mu\text{g/L}$ 。分别吸取1.00 mL 睾酮、表睾酮、孕酮标准工作液(4.13)至100 mL 容量瓶中,以甲醇稀释并定容,此混合工作溶液的浓度为50 $\mu\text{g/L}$ 。 -18°C 贮存,可使用3个月。
- 4.15 内标储备溶液:100 $\mu\text{g/mL}$ 。准确称取适量的氘代睾酮(d_5 -睾酮)、氘代孕酮(d_5 -孕酮)标准品,用甲醇分别配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备溶液, -18°C 贮存,可使用6个月。
- 4.16 内标工作溶液:5 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取5 mL 氘代睾酮(d_5 -睾酮)、氘代孕酮(d_5 -孕酮)内标储备溶液(4.15)至100 mL 容量瓶中,以甲醇稀释并定容。 -18°C 贮存,可使用6个月。
- 4.17 内标混合工作溶液:25 $\mu\text{g/L}$ 。分别吸取0.50 mL 氘代睾酮(d_5 -睾酮)、氘代孕酮(d_5 -孕酮)内标工作溶液(4.16)至100 mL 容量瓶中,以甲醇稀释并定容。 -18°C 贮存,可使用3个月。
- 4.18 基质混合标准工作溶液:根据每种标准的灵敏度和仪器线性范围,吸取一定量的混合标准工作溶液(4.14)和内标工作溶液(4.16),用空白样品提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液。当天配制。
- 4.19 C_{18} 固相萃取柱:500 mg,6 mL。使用前依次用6 mL 甲醇、6 mL 水活化。
- 4.20 硅胶固相萃取柱:200 mg,6 mL。使用前用6 mL 正己烷活化。
- 4.21 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感量0.1 mg 和0.01 g。
- 5.3 匀质机。
- 5.4 高速组织匀浆机。
- 5.5 低温高速离心机:转速大于4 000 r/min。
- 5.6 高速离心机:转速大于12 000 r/min。
- 5.7 超声波。
- 5.8 旋涡振荡器。
- 5.9 振荡水浴。
- 5.10 氮气浓缩仪。
- 5.11 固相萃取装置。
- 5.12 旋转蒸发器。
- 5.13 KD 浓缩瓶。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

取样品约500 g 用组织捣碎机捣碎,装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

6.2 试样的保存

将试样于 -18°C 保存。

7 测定步骤

7.1 酶解

准确称取5 g 试样,准确至0.01 g,置于50 mL 离心管中,依次加入200 μL 内标混合工作溶液

(4.17)、10 mL 磷酸盐缓冲液(4.8),以 14 000 r/min 均质 30 s,加入 60 μ L 葡萄糖苷酸酶和硫酸酯酶(4.7),混匀 30 s,置于 37℃ 恒温振荡水浴中酶解 16 h。

7.2 提取

酶解后的样品溶液(7.1)加 10 mL 甲醇,混匀 2 min,置冰浴中放置 5 min,在 5℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至 50 mL 离心管中,下层沉淀再用 5 mL 甲醇重复上述操作一次,合并上清液至上述 50 mL 离心管中,向离心管中加入 15 mL 叔丁基甲醚,振摇 5 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,上层溶液转移至 125 mL 分液漏斗中,下层溶液依次再用 15 mL、10 mL 叔丁基甲醚提取两次,合并上层溶液至上述分液漏斗中,加入 10 mL 饱和氯化钠水溶液(4.9),振摇 30 s,静置分层,上层溶液转移至梨形瓶中,在 40℃ 旋转蒸发至干,残渣中加入 1.5 mL 甲醇,涡旋 1 min,超声 5 min,再加入 20 mL 水,混匀,待净化。

7.3 净化

将样品提取液(7.2)转移至已活化的 C₁₈ 固相萃取柱(4.19)上,用 5 mL 水洗涤梨形瓶,洗涤液合并至 C₁₈ 固相萃取柱中,以 ≤ 2 mL/min 流速使样液通过固相萃取柱,待样液过柱后,用 5 mL 水淋洗 C₁₈ 固相萃取柱,弃去淋洗液,用 10 mL 甲醇将待测组分从 C₁₈ 固相萃取柱上洗脱,洗脱液转移至梨形瓶中,在 40℃ 旋转蒸发至干。肌肉样品用 0.5 mL 甲醇溶解残渣,涡旋 1 min,加入 0.5 mL 水混匀,过 0.2 μ m 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

肝脏样品的洗脱液蒸干后,向梨形瓶中加入 0.5 mL 三氯甲烷,涡旋 1 min,加入 5 mL 正己烷,超声 1 min,然后转移至已活化的硅胶固相萃取柱(4.20)中,以 1 mL/min 流速使样液通过固相萃取柱,待样液过柱后,用 5 mL 正己烷淋洗硅胶固相萃取柱,弃去淋洗液,用 6 mL 水饱和乙酸乙酯(4.10)洗脱待测组分,洗脱液转移至 KD 接收瓶中,在 40℃ 旋转蒸发至干,加 0.5 mL 甲醇,涡旋 1 min,加入 0.5 mL 水混匀,过 0.2 μ m 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

称取阴性样品,按 7.1、7.2 和 7.3 步骤制备空白样品提取液,用于配制系列基质混合标准工作溶液。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:C₁₈ 色谱柱,5 μ m,150 mm $\times$ 2.1 mm(内径);
- b) 柱温:40℃;
- c) 进样量:20 μ L;
- d) 流动相、流速及梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	乙腈/(%)	3 mmol/L 甲酸铵/(%)
0.00	0.200	30	70
10.00	0.200	85	15
15.00	0.200	85	15
15.01	0.200	30	70
23.01	0.200	30	70

7.4.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体,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) 喷雾电压、去簇电压、碰撞能等电压值应优化至最佳灵敏度；
- f) 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 睾酮、表睾酮和孕酮及内标物的质谱参数

被测物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	定量用内标物	采集时间/ms	去簇电压/V	碰撞能量/V
睾酮	289/97	289/97	氘代睾酮	100	65	35
	289/109					39
表睾酮	289/97	289/97	氘代睾酮	100	65	35
	289/109					39
孕酮	315/109	315/109	氘代孕酮	100	54	38
	315/97					37
氘代睾酮 (<i>d</i> ₅ -睾酮)	294/100	294/100	—	100	57	35
氘代孕酮 (<i>d</i> ₉ -孕酮)	324/100	324/100	—	100	50	34

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 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标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶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偏差 %

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

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准工作溶液(4.18)进样,以标准溶液中被测组分峰面积和内标物峰面积的比值为纵坐标,标准溶液中被测组分浓度与内标物浓度的比值为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。内标法定量。睾酮、表睾酮和孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见图 A.1 和图 A.2。睾酮、表睾酮和孕酮的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B.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 结果计算和表述

结果按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中被测物残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;
 A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;
 c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;
 A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;
 V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样溶液所代表试样的质量,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 ,被测物的含量范围及重复性方程见表 4 和表 5。

表 4 含量范围及重复性和再现性方程(基质为肌肉)

化合物名称	含量范围/($\mu\text{g/kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
睾酮	0.05~0.5	$r=0.073\ 2\ m+0.022\ 9$	$R=0.072\ 0\ m+0.026\ 8$
表睾酮	0.05~0.5	$r=0.143\ m+0.028\ 7$	$R=0.014\ 9\ m+0.016\ 8$
孕酮	0.25~2.5	$r=0.073\ 9\ m+0.071\ 6$	$R=0.218\ m+0.017\ 8$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 5 含量范围及重复性和再现性方程(基质为肝脏)

化合物名称	含量范围/($\mu\text{g/kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
睾酮	0.25~2.5	$r=0.102\ m+0.021\ 6$	$R=0.153\ m+0.000\ 8$
表睾酮	0.25~2.5	$r=0.207\ m$	$R=0.183\ m+0.032\ 1$
孕酮	0.25~2.5	$r=0.080\ 5\ m+0.081\ 1$	$R=0.092\ 6\ m+0.067\ 7$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限,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 ,被测物的含量范围及再现性方程见表 4 和表 5。

附录 A
(资料性附录)

睾酮、表睾酮和孕酮的多反应监测(MRM)色谱图

A.1 孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

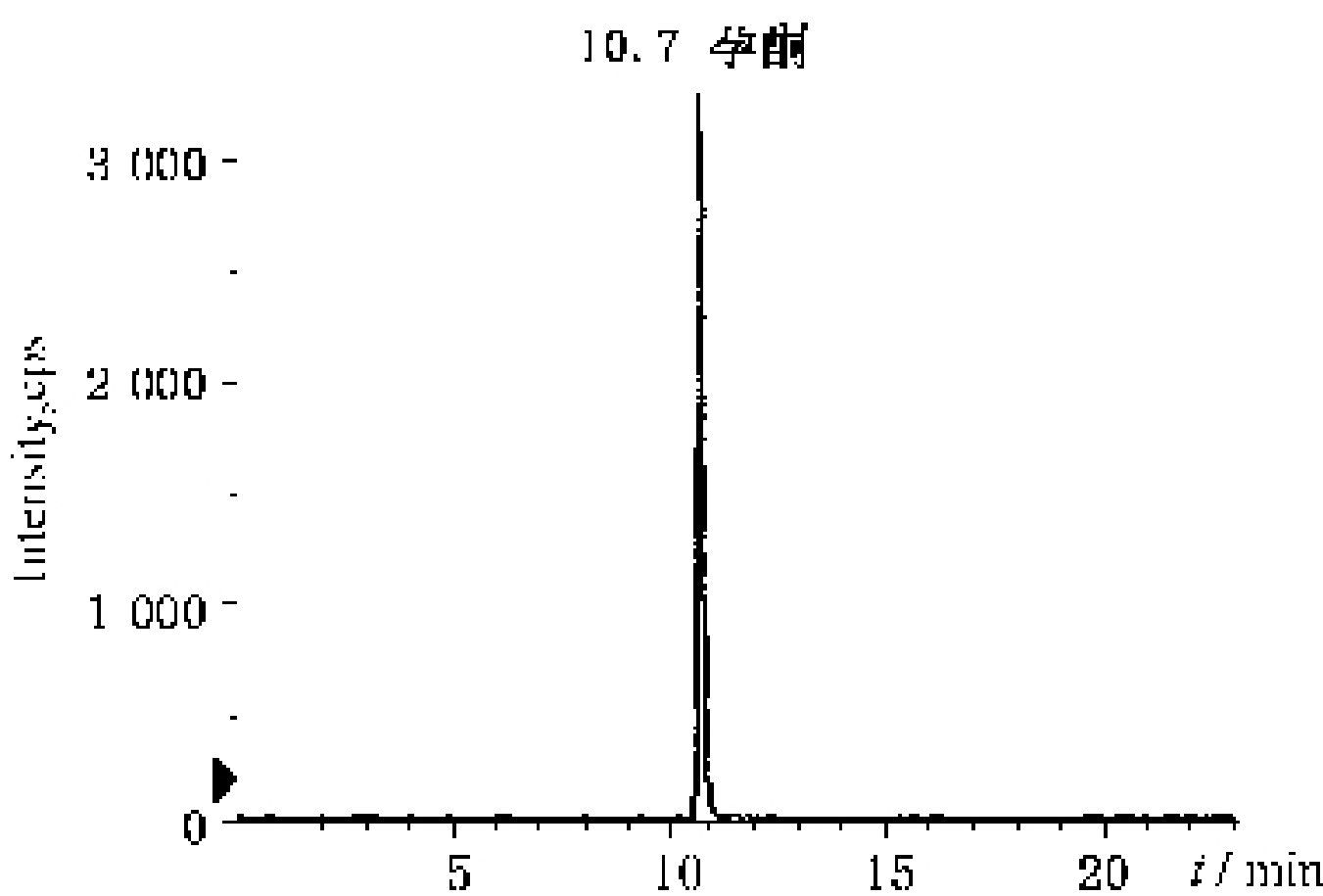


图 A.1 孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

A.2 睾酮、表睾酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.2。

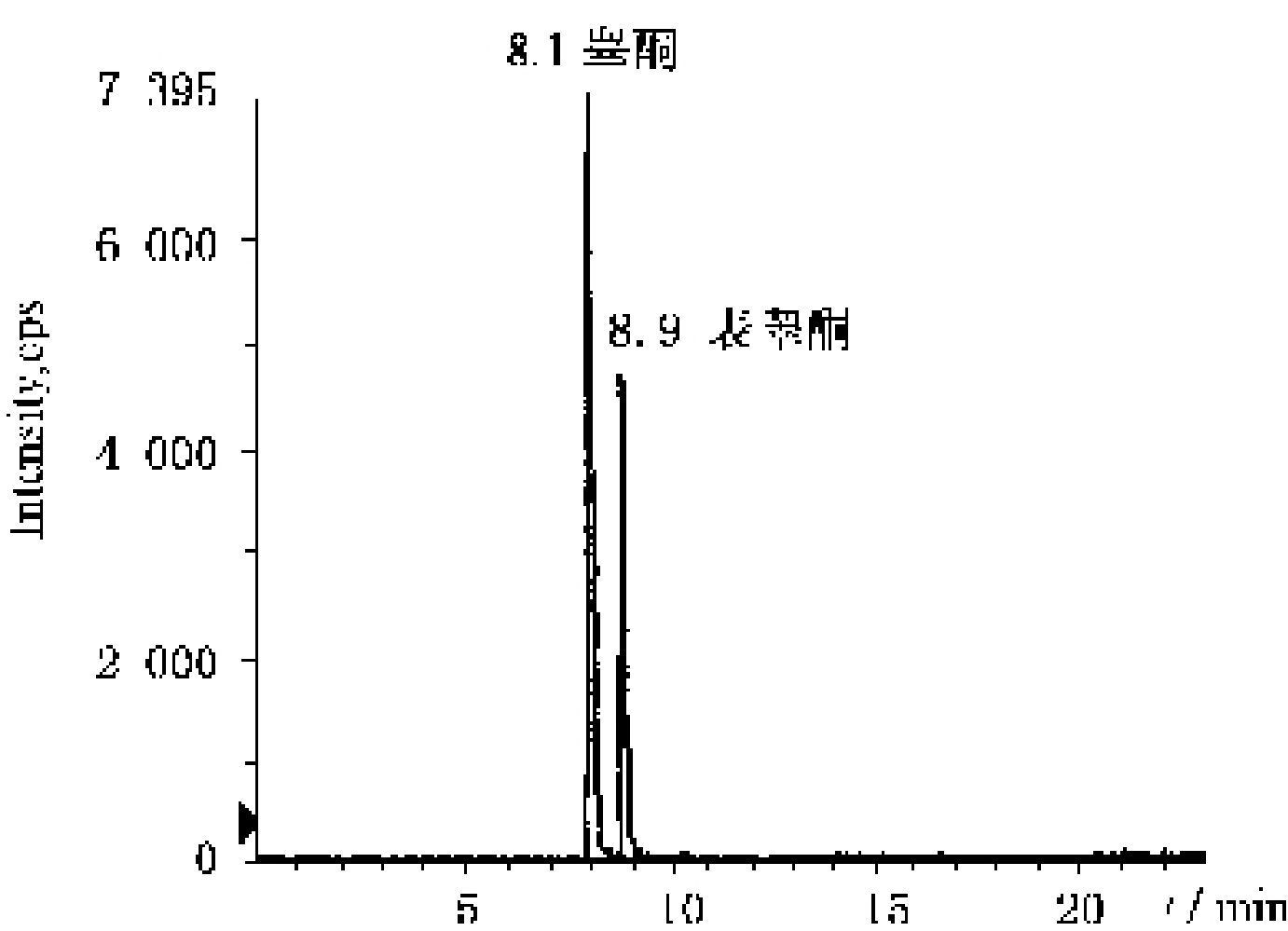


图 A.2 睾酮、表睾酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图



附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

睾酮、表睾酮和孕酮的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 睾酮、表睾酮和孕酮的添加浓度及其平均回收率的试验数据(*n* = 10)

样品基质	化合物名称	添加水平/(μg/kg)	平均回收率/(%)
肌肉	睾酮	0.1	101.0
		0.2	97.3
		0.5	106.0
	表睾酮	0.1	95.9
		0.2	86.4
		0.5	105.0
	孕酮	0.5	86.8
		1.0	86.1
		2.5	99.4
牛肝	睾酮	0.5	106.0
		1.0	103.0
		2.5	102.0
	表睾酮	0.5	114.0
		1.0	102.0
		2.5	118.0
	孕酮	0.5	93.4
		1.0	86.5
		2.5	91.8