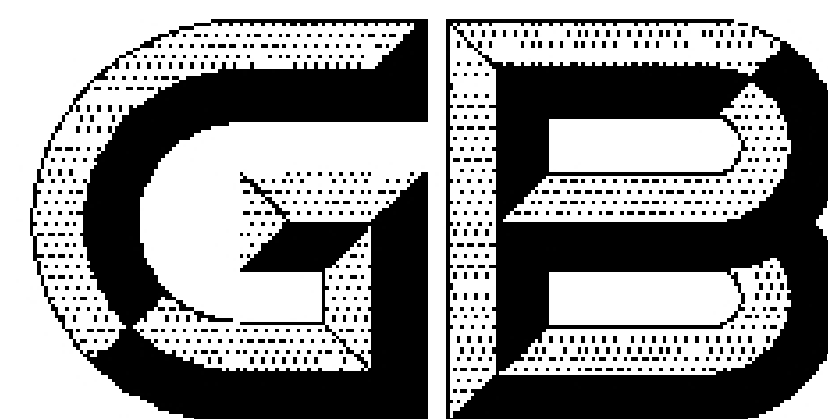




中华人民共和国国家标准

GB/T 20761—2006

牛尿中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of α -trenbolone, β -trenbolone, nortestosterone
and epi-nortestosterone residues in bovine urine—
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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、王凤池、郭春海、艾连峰。

本标准系首次发布的国家标准。

牛尿中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛尿中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛尿中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛尿中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮均为 $2\ \mu\text{g/L}$ 。

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

试样在 $\text{pH}=5.0$ 条件下加酶水解，经免疫亲和柱净化，用液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

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 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 乙酸：色谱纯。

4.4 β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸酯（ β -glucuronidase and aryl sulfatase）：100 000 unit/mL。

4.5 氢氧化钠溶液：1 mol/L。10 g 氢氧化钠溶于 250 mL 水中。

4.6 盐酸溶液：1 mol/L。吸取 20.8 mL 浓盐酸溶于水中，定容至 250 mL。

4.7 免疫亲和柱淋洗缓冲储备液和柱贮存缓冲储备液：免疫亲和柱附带。

4.8 柱淋洗缓冲溶液：量取 1 mL 储备溶液与 19 mL 水混溶，临用前现配。

4.9 柱贮存缓冲溶液：量取 1 mL 储备溶液与 4 mL 水混溶，临用前现配。

4.10 甲醇+水溶液：70+30。

4.11 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮标准物质：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.12 标准储备溶液：分别精确称取 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮标准物质（4.11）各 0.010 0 g，用乙腈（4.2）溶解并定容至 100 mL，配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。此

溶液-18℃冷冻保存,可使用六个月。

4.13 混合标准工作溶液:取标准储备溶液(4.12)各 5 mL 置于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成混合标准工作溶液,浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,此溶液-18℃冷冻保存,可使用三个月。

4.14 群勃龙/19-乙烯去甲睾酮免疫亲和柱:带有柱淋洗缓冲储备溶液和柱储存缓冲储备溶液,在 2℃~8℃ 保存。

4.15 0.45 μm 滤膜。

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(ESI)。

5.2 离心机:最大转速 5 000 r/min。

5.3 恒温水浴摇床。

5.4 旋涡混合器。

5.5 氮气浓缩仪。

5.6 固相萃取装置。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取新鲜牛尿迅速冷冻作为试样备用。

6.2 试样保存

制备好的试样置于-18℃冰柜中避光保存。

7 测定步骤

7.1 基质混合标准校准溶液的制备

7.1.1 试样的称取

取 5 个阴性样品,将冷冻尿液融化混匀,取部分样品以转速 4 000 r/min 离心 10 min。然后,每个样品分别量取 5 mL(精确到 0.01 mL)于 15 mL 具塞离心管中,再分别加入不同量混合标准工作溶液(4.13),使各被测组分的浓度均为 2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

7.1.2 水解

分别将上述离心管溶液,用 1 mol/L 的盐酸(4.6)调节尿样 pH 值在 4.9~5.1 之间,接着加入 40 μL β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸酯(4.4),摇匀后盖好塞子置于恒温水浴摇床(5.3)上 37℃ 振荡水解 2 h。待水解液冷却至室温后,加入 4 mL 柱淋洗缓冲溶液(4.8),用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.5)调整尿样 pH 值在 7~9 之间。

7.1.3 免疫亲和柱净化

首先将柱贮存缓冲溶液(4.9)过柱,再用 15 mL 柱淋洗缓冲溶液平衡柱子。然后,将水解处理好的尿样过柱,接着依次用 8 mL 柱淋洗缓冲溶液、5 mL 水淋洗柱子。最后,用 4 mL 甲醇+水溶液(4.10)洗脱分析物并收集于带刻度的试管中(上述过程过柱流速应 ≤ 2 mL/min)。洗脱液用氮气浓缩仪(5.5)在 60℃ 水浴中吹至约 1 mL,用流动相定容至 2 mL,旋涡振荡(5.4)混合,过 0.45 μm 滤膜(4.15)供 LC-MS-MS 测定。

注:为确保柱子在下次使用时无残留影响,应继续用 10 mL 甲醇+水溶液(70+30)洗涤柱子。若接着使用此柱,则重复 7.1.3 步骤。若不再使用,应用 15 mL 柱贮存缓冲溶液洗涤柱子,最后柱内保留 5 mL 柱贮存缓冲溶液,2℃~8℃ 保存。此柱能重复使用 10 次左右。

7.2 试样溶液的制备

将冷冻尿液样品融化混匀,取部分样品以转速 4 000 r/min 离心 10 min。然后,量取 5 mL(精确到

0.01mL)于 15 mL 具塞离心管中。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.3 空白基质溶液的制备

将阴性冷冻尿液样品融化混匀,取部分样品以转速 4 000 r/min 离心 10 min。然后,量取 5 mL(精确到 0.01 mL)于 15 mL 具塞离心管中。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: Inertsil C₁₈, 5 μm, 150 mm×2.1 mm (内径)或相当者;
- b) 流动相: 0.1% 乙酸水溶液+乙腈(62+38);
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 色谱柱温度: 35 ℃;
- e) 进样量: 20 μL。

7.4.2 质谱条件

- a) 离子源: ESI, 正模式;
- b) 雾化喷嘴压力: 0.24 MPa;
- c) 干燥气流量: 9.0 L/min;
- d) 干燥气温度: 350 ℃;
- e) 毛细管电压、去簇电压、碰撞电压等电压值应优化至最优灵敏度;
- f) 检测离子对见表 1。

表 1 四种被测物的保留时间、母离子和子离子

被 测 物	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	
β-群勃龙	6.5	271	253 ^a	199
α-群勃龙	7.2	271	253 ^a	199
19-乙烯去甲睾酮	8.4	275	257 ^a	239
epi-19-乙烯去甲睾酮	11.4	275	257 ^a	239
^a 定量离子。				

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,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间,与基质混合标准校准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%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的基质混合标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差 %

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准校准溶液进样,以峰面积为纵坐标,基质混合校准溶液浓度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。上述色谱和质谱条件下,标准品选择离子质量色谱图参见图 A.1。

本标准的添加回收率数据参见附录 B。本标准的添加回收率数据参见附录 B。

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

吸取适量混合标准工作溶液,用空白基质溶液(7.3)稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液,按 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

试样中被测组分残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中被测组分残留量,单位为微克每升(μg/L);
- c —— 从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V₁ —— 样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- V₂ —— 样品溶液所代表最终试样的体积,单位为毫升(mL)。

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 3。

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 3。

表 3 四种分析物的含量范围及重复性和再现性方程

被测物名称	含量范围/(μg/L)	重复性限 <i>r</i>	再现性限 <i>R</i>
β-群勃龙	2~40	lg <i>r</i> =0.923 lg <i>m</i> -0.879	lg <i>R</i> =0.871 lg <i>m</i> -0.546
α-群勃龙	2~40	lg <i>r</i> =0.828 lg <i>m</i> -0.820	lg <i>R</i> =0.863 g <i>m</i> -0.571
19-乙烯去甲睾酮	2~40	lg <i>r</i> =0.711 lg <i>m</i> -0.831	lg <i>R</i> =0.458 g <i>m</i> -0.606
epi-19-乙烯去甲睾酮	2~40	lg <i>r</i> =0.708 lg <i>m</i> -0.716	lg <i>R</i> =0.984 lg <i>m</i> -0.881
注: <i>m</i> 为两次测定结果的算术平均值。			



附录 A
(资料性附录)
标准物质选择离子 LC-MS-MS 图

α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮标准品的选择离子 LC-MS-MS 图,见图 A.1。

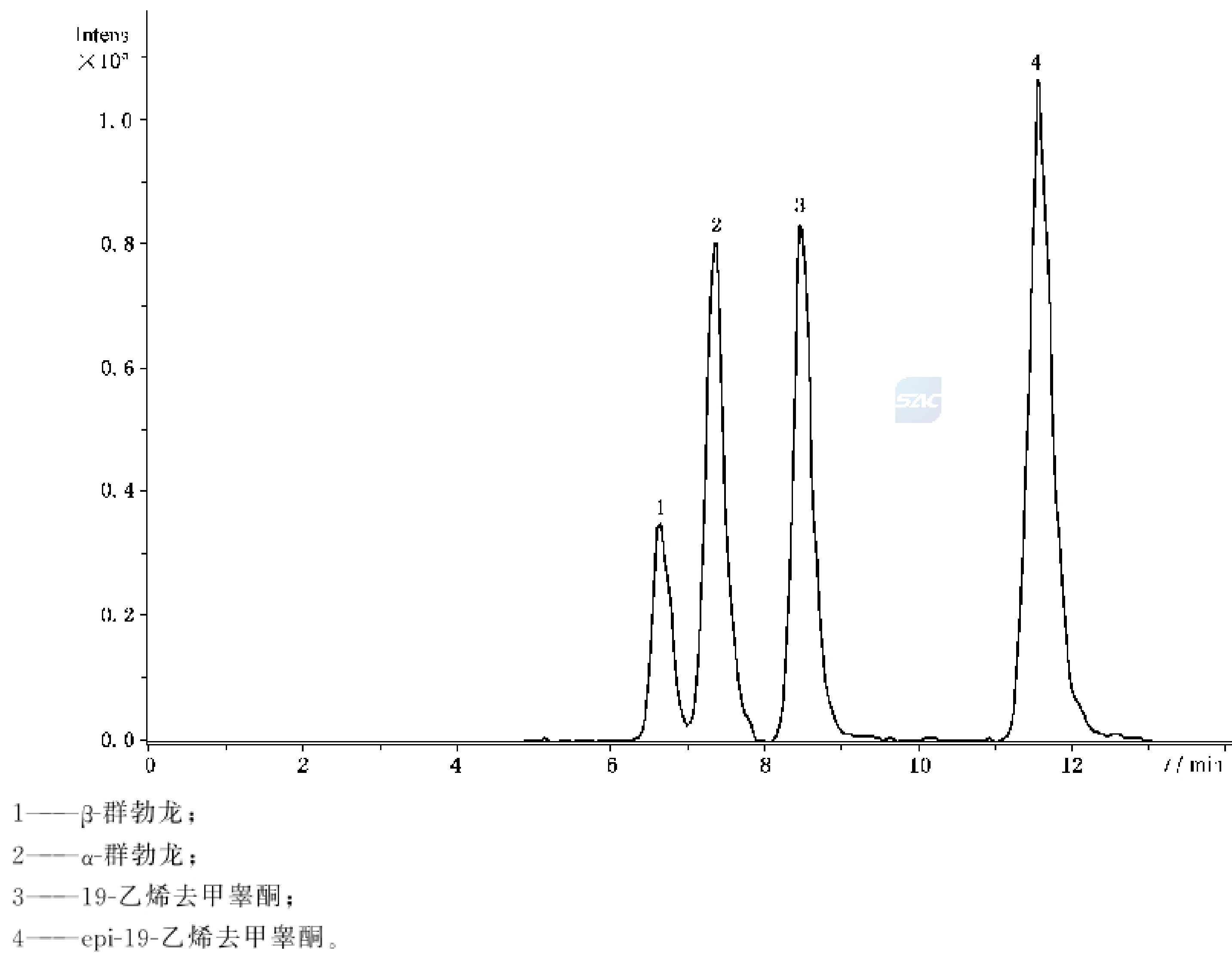


图 A.1 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮标准品的选择离子 LC-MS-MS 图

附录 B
(资料性附录)
回收率

四种分析物的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 四种分析物的添加浓度及其平均回收率的试验数据($n=10$)

添加水平/($\mu\text{g/L}$)	分析物的回收率/(%)			
	β -群勃龙	α -群勃龙	19-乙烯去甲睾酮	epi-19-乙烯去甲睾酮
2	77.5	84.0	74.0	82.5
5	85.6	79.0	80.8	79.6
10	77.9	77.5	72.8	77.8