



中华人民共和国国家标准

GB/T 22976—2008

牛奶和奶粉中 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

Determination of α -trenbolone, β -trenbolone, nortestosterone and
epi-nortestosterone residues in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 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、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

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：艾连峰、王凤池、段文仲、郭春海、马育松、贾海涛、刘宝圣、勾金玉、庞国芳。



牛奶和奶粉中 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

本标准规定了牛奶和奶粉中 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高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中 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和确证。

本标准方法的检出限：牛奶中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，奶粉中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD）

3 原理

试样在 pH5.0 条件下加酶水解，乙腈-乙酸乙酯提取，凝胶色谱净化，用高效液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为液相色谱纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈。

4.2 乙酸乙酯。

4.3 环己烷。

4.4 甲醇。

4.5 乙酸。

4.6 无水硫酸钠，分析纯：经 650 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 4 h，置于干燥器内备用。

4.7 乙酸钠，分析纯。

4.8 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶： β -glucuronidase/aryl sulfatase, 100 000 unit/mL。

4.9 0.02 mol/L 乙酸钠缓冲液（pH=5.0）：称取无水乙酸钠 0.82 g 溶于 500 mL 水中，用乙酸调节 pH=5.0。

- 4.10 甲醇溶液(7+3):30 体积的水与 70 体积的甲醇混匀。
- 4.11 乙酸乙酯-环己烷(1+1):50 体积的乙酸乙酯与 50 体积的环己烷混匀。
- 4.12 α -群勃龙(α -trenbolone, CAS:80657-17-6)、 β -群勃龙(β -trenbolone, CAS: 10161-33-8)、19-乙烯去甲睾酮(nortestosterone, CAS:434-22-0)和 epi-19-乙烯去甲睾酮(epi-nortestosterone, CAS:4409-34-1)标准品:纯度大于等于 98%。
- 4.13 标准储备液:分别精确称取适量标准品,用乙腈配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。
- 4.14 混合标准中间工作液:取标准储备液(4.13)各 1 mL 至 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成混合标准工作液,浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 4.15 滤膜:0.45 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 凝胶色谱仪。
- 5.3 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.4 离心机。
- 5.5 恒温水浴摇床。
- 5.6 涡旋混和器。
- 5.7 旋转蒸发仪。

6 试样的制备与保存

6.1 牛奶

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,并标明标记。

6.2 奶粉

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

7 测定步骤

7.1 提取

牛奶样品称取约 5 g(准确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,奶粉样品称取约 1 g(准确至 0.01 g)并加入 5 mL 水于 50 mL 具塞离心管中,混匀。

在称取好样品的离心管中加入 5 mL 乙酸钠缓冲液和 20 μL β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶,摇匀后盖好塞子置于恒温水浴摇床上,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡水解过夜。待水解液冷却至室温后,首先加入 5 mL 乙腈,振摇,以沉淀蛋白,然后再加入 20 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡提取 2 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,移取上清液通过 5 g 无水硫酸钠过滤至鸡心瓶中。再用 20 mL 乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液于同一鸡心瓶中。

7.2 净化

7.2.1 凝胶色谱参考条件

凝胶色谱参考条件如下:

- a) 净化柱:22 g S-X₃ Bio-Beads 填料,200 mm $\times$ 25 mm (内径)或相当者;
- b) 流动相:乙酸乙酯-环己烷(4.11),流速:5.0 mL/min;
- c) 定量环:5 mL;
- d) 净化程序:0 min~10 min 弃去洗脱液,10 min~15.5 min 收集洗脱液。

7.2.2 凝胶色谱净化

将提取液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下蒸至近干,用乙酸乙酯-环己烷(1+1)定容至 10 mL 的玻璃试管中,按 7.2.1 的条件净化。净化后将收集的洗脱液蒸干,用 1 mL 甲醇溶液(4.10)旋涡振荡溶解,过 0.45 μm 滤膜供

HPLC-MS-MS 分析。

7.3 空白基质溶液的制备

将取牛奶阴性样品 5 g,奶粉阴性样品 1 g(精确到 0.01 g),按 7.1 和 7.2 操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱： C_{18} , 5 μm , 150 mm $\times$ 2.1 mm (内径)或相当者；
- b) 色谱柱温度：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- c) 进样量：20 μL ；
- d) 流动相梯度及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/($\mu\text{L}/\text{min}$)	0.1%乙酸水溶液/%	乙腈/%
0.00	200	80	20
6.00	200	65	35
8.00	200	65	35
8.10	200	80	20
10.00	200	80	20

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子化模式：电喷雾正离子模式(ESI+)；
- b) 质谱扫描方式：多反应监测(MRM)；
- c) 鞘气压力：104 kPa；
- d) 辅助气压力：138 kPa；
- e) 正离子模式电喷雾电压(IS)：4 000 V；
- f) 毛细管温度：320 $^{\circ}\text{C}$ ；
- g) 源内诱导解离电压：10 V；
- h) Q1 为 0.4，Q3 为 0.7；
- i) 碰撞气：高纯氩气；
- j) 碰撞气压力：0.2 Pa；
- k) 其他质谱参数见表 2。

表 2 被测物的参考保留时间、采集窗口、监测离子对和裂解能量

化合物名称	保留时间/min	检测离子对(m/z)	裂解能量/eV
β -群勃龙	8.93	271.16/253.08 ^a	21
		271.16/199.08	21
α -群勃龙	9.47	271.16/253.08 ^a	21
		271.16/199.08	21
19-乙烯去甲睾酮	10.28	275.18/239.10 ^a	15
		275.18/257.12	25
epi-19-乙烯去甲睾酮	11.64	275.18/239.10 ^a	15
		275.18/257.12	25
^a 为定量离子对,对于不同质谱仪器,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。			

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,与混合基质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混合基质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 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 K	$K>50$	$20<K<50$	$10<K<20$	$K\leq 10$
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对混合基质标准校准溶液进样,以峰面积为纵坐标,混合基质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,标准物质多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 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

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 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率,回收率范围参见附录 B 中的表 B.1。

8 结果计算

试样中分析物的残留量利用数据处理系统计算或按式(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,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
 - c ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);
 - m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。
- 计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

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。

9.2 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),被测物的添加浓度范围及重复性方程见表 4 和表 5。

表 4 牛奶中四种分析物的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
β -群勃龙	1~10	$\lg r = 1.304\,6 \lg m - 1.025\,9$	$\lg R = 1.005 \lg m - 0.690\,2$
α -群勃龙	1~10	$\lg r = 0.827\,8 \lg m - 0.781\,1$	$\lg R = 0.941\,5 \lg m - 0.636\,7$
19-乙烯去甲睾酮	1~10	$\lg r = 0.912\,1 \lg m - 0.860\,3$	$\lg R = 0.904\,9 \lg m - 0.579\,1$
epi-19-乙烯去甲睾酮	1~10	$\lg r = 1.186\,8 \lg m - 0.971\,1$	$\lg R = 0.888\,8 \lg m - 0.597\,5$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 5 奶粉中四种分析物的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
β -群勃龙	5~50	$\lg r=1.178\ 5\ \lg m-1.209\ 4$	$\lg R=1.299\ 3\ \lg m-0.951\ 7$
α -群勃龙	5~50	$\lg r=0.774\ 9\ \lg m-0.532\ 6$	$\lg R=0.913\ 5\ \lg m-0.668\ 2$
19-乙烯去甲睾酮	5~50	$\lg r=0.820\ 5\ \lg m-0.551\ 8$	$\lg R=0.851\ 3\ \lg m-0.761\ 8$
epi-19-乙烯去甲睾酮	5~50	$\lg r=0.862\ 9\ \lg m-0.794\ 4$	$\lg R=0.702\ 9\ \lg m-0.450\ 4$
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。

9.3 再现性

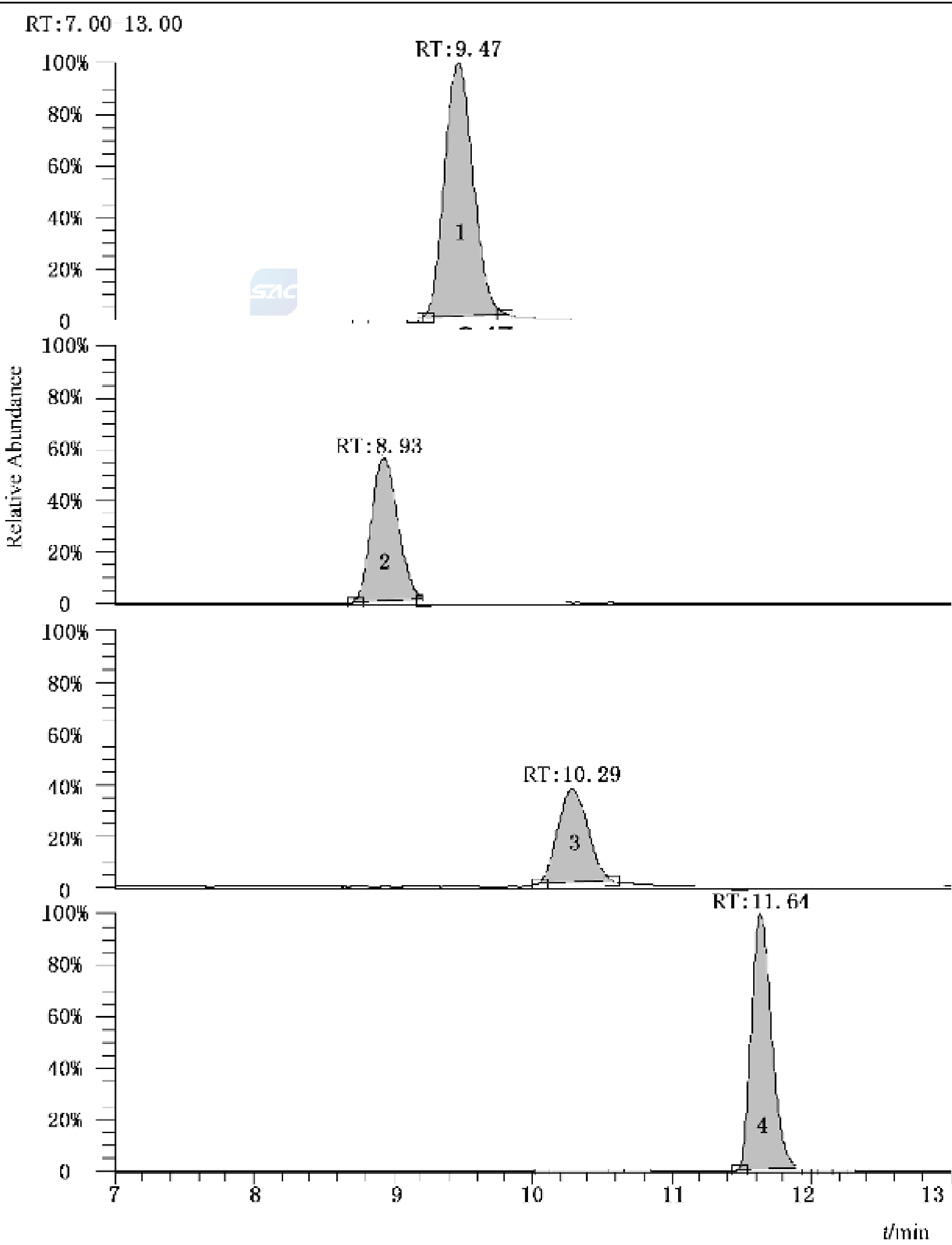
在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 (R),被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 4 和表 5。



附 录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。



- 1—— α -群勃龙;
- 2—— β -群勃龙;
- 3——19-乙烯去甲睾酮;
- 4——epi-19-乙烯去甲睾酮。

图 A.1 标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮的添加浓度及其回收率范围数据,见表 B.1。

表 B.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
的添加浓度及其回收率范围数据

化合物名称	牛 奶		奶 粉	
	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	回收率范围/%	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	回收率范围/%
β -群勃龙	1	76.0 ~91.0	5	75.2 ~95.6
	2	74.5 ~91.0	10	75.6 ~93.0
	5	73.6 ~90.6	25	70.5 ~89.4
	10	77.4 ~94.2	50	74.0 ~97.0
α -群勃龙	1	73.0 ~94.0	5	75.0 ~95.8
	2	73.5 ~96.0	10	75.5 ~88.6
	5	74.4 ~96.0	25	76.7 ~98.2
	10	79.9 ~92.5	50	77.0 ~92.8
19-乙烯去甲睾酮	1	75.0 ~90.0	5	78.2 ~96.4
	2	74.0 ~94.0	10	73.8 ~89.0
	5	78.0 ~97.8	25	82.3 ~99.0
	10	80.7 ~88.2	50	74.4 ~96.2
epi-19-乙烯去甲睾酮	1	76.0 ~96.0	5	81.4 ~96.0
	2	76.5 ~92.5	10	71.8 ~94.6
	5	76.8 ~95.0	25	80.8 ~98.1
	10	76.1 ~96.7	50	81.0 ~93.5