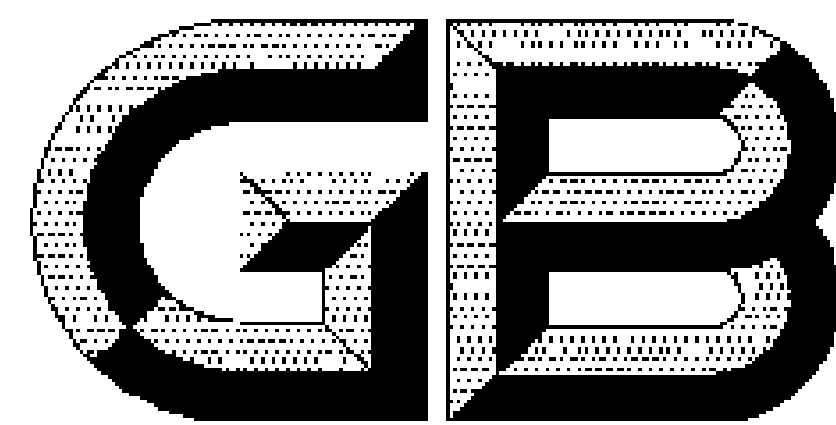




中华人民共和国国家标准

GB/T 20741—2006

畜禽肉中地塞米松残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of dexamethasone residues
in livestock and poultry muscles—
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、山东农业大学。

本标准主要起草人：庞国芳、刘永明、曹彦忠、范春林、张进杰、李学民、吴艳萍、李金、连玉晶、林忠。

本标准系首次发布的国家标准。



畜禽肉中地塞米松残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肉、猪肉、羊肉和鸡肉中地塞米松残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肉、猪肉、羊肉和鸡肉中地塞米松残留量的测定。

本标准的方法检出限： $0.2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

动物组织样品中加入内标甲基强的松龙（6- α -methylprednisolone），样品用乙酸乙酯提取，提取液浓缩后，经过 BOND-ELUT Si 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

4 试剂和材料

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 乙酸乙酯：色谱纯。

4.4 甲酸：优级纯。

4.5 正己烷：色谱纯。

4.6 丙酮：色谱纯。

4.7 丙酮-正己烷溶液 I：丙酮+正己烷（2+8）。

4.8 丙酮-正己烷溶液 II：丙酮+正己烷（4+6）。

4.9 无水硫酸钠：分析纯。在 650°C 马弗炉中灼烧 6 h，贮存于干燥器中。

4.10 氢氧化钠：优级纯。

4.11 氢氧化钠溶液： $0.3\ \text{mol}/\text{L}$ 。称取 12 g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 1 000 mL。

4.12 地塞米松和甲基强的松龙标准物质：纯度 $\geq 99\%$ 。

4.13 地塞米松标准储备溶液： $1.0\ \text{mg}/\text{mL}$ 。准确称取 100 mg 地塞米松标准物质，用甲醇溶解，定容至 100 mL。配成的标准储备液可在温度低于 -20°C 冰箱中保存三个月。

4.14 甲基强的松龙标准储备溶液： $1.0\ \text{mg}/\text{mL}$ 。准确称取 100 mg 甲基强的松龙标准物质，用甲醇溶

解,定容至 100 mL。配成的标准储备液可在温度低于 -20°C 冰箱中保存三个月。

4.15 地塞米松标准工作溶液:吸取适量的地塞米松标准储备溶液,用甲醇分别配成 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $0.050\text{ }\mu\text{g/mL}$ 两种浓度的标准工作溶液。配成的标准工作溶液可在温度低于 -20°C 冰箱中保存一个月。

4.16 地塞米松基质标准工作溶液:分别吸取适量的地塞米松标准工作溶液,用空白样品提取液分别配成浓度分别为 1.0 ng/mL 、 2.0 ng/mL 、 5.0 ng/mL 、 50.0 ng/mL 的基质标准工作溶液。基质标准工作溶液应现用现配。

4.17 甲基强的松龙标准工作溶液:吸取适量的甲基强的松龙标准储备溶液,用甲醇分别配成 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 两种浓度的标准工作溶液。配成的标准工作溶液可在温度低于 -20°C 冰箱中保存一个月。

4.18 BOND-ELUT Si 固相萃取柱或相当者:500 mg,3 mL。使用前用 2 mL 丙酮+正己烷(2+8)预处理,保持柱体湿润。

4.19 滤膜: $0.20\text{ }\mu\text{m}$ 。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有大气压化学电离源(APCI)。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g 。

5.3 液体混匀器。

5.4 固相萃取真空装置。

5.5 均质器。

5.6 振荡器。

5.7 具塞玻璃离心管:50 mL。

5.8 真空泵:真空度应达到 80 kPa 。

5.9 离心机。

5.10 旋转蒸发器。

5.11 氮气浓缩仪。

5.12 样品管:10 mL。

5.13 梨形瓶:150 mL。

5.14 筒形漏斗。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

从全部样品中取出有代表性样品约 1 kg,充分搅碎,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封作为试样,注明标记。在抽样和制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样保存

将试样于 -18°C 冷冻保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 内标甲基强的松龙(6- α -methylprednisolone)标准工作溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,加入 10 mL 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液,在液体混匀器上混匀 1 min,加 20 mL 乙酸乙酯,用均质器均质 1 min,在振荡器振荡 20 min,以 $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min,取上清液过盛有 25 g 无水硫酸钠的筒形漏斗至梨形瓶中。再用 20 mL 乙酸乙酯提取一次,过无

水硫酸钠筒形漏斗,合并上清液,用旋转蒸发器于 45℃ 水浴上减压蒸发至近干,用 1 mL 乙酸乙酯和 5 mL 正己烷溶解。

7.2 净化

将提取液移至经预处理的 BOND-ELUT Si 固相萃取柱中,用 2 mL 丙酮+正己烷(4+6)洗涤梨形瓶和萃取柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 1 min,用 6 mL 丙酮+正己烷(4+6)以 ≤3 mL/min 流速洗脱,收集洗脱液于 10 mL 样品管中,用氮气浓缩仪吹干,用 1 mL 流动相溶解,过 0.20 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Atlantis dC₁₈, 3 μm, 150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相:乙腈+0.1%甲酸水(50+50);
- c) 流速:200 μL/min;
- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:20 μL。

7.3.2 质谱条件

- a) 离子源:大气压化学电离源(APCI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 雾化电流:3.00 μA;
- e) 气帘气压力:0.138 MPa;
- f) 雾化气压力:0.276 MPa;
- g) 辅助加热气压力:0.138 MPa;
- h) 离子源温度:250℃;
- i) 定性离子对,定量离子对,去簇电压和碰撞能量见表 1。

表 1 地塞米松和甲基强的松龙的质谱参数

名称	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/V
地塞米松	393.2/373.2	393.2/373.2	21	14
	393.2/355.2		21	17
甲基强的松龙	375.2/161.2	375.2/161.2	16	26
	375.2/339.2		16	9

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

在仪器最佳工作条件下,采用内标法进行定量测定,内标为甲基强的松龙,为减少基质的影响,定量采用基质标准工作溶液进样,样品溶液中地塞米松的响应值应在仪器测定的线性范围内。地塞米松和甲基强的松龙标准物质总离子流图参见图 A.1。在上述色谱条件和质谱条件下,地塞米松和甲基强的松龙参考保留时间见表 2。

表 2 地塞米松和甲基强的松龙的参考保留时间

名 称	保留时间/min
地塞米松	3.75
甲基强的松龙	3.48

本方法的添加回收率数据参见附录 B。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

测定结果可由计算机按内标法自动计算,也可按式(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)。

注:计算结果应扣除空白值。

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

在重复性测定条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r,动物组织中地塞米松含量范围及重复性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

名称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
地塞米松	0.2~10.0	lg r=1.068 2lg m-0.657 9	lg R=1.035 7lg m-0.558 3
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

在再现性测定条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R,动物组织中地塞米松的含量范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)

地塞米松和甲基强的松龙标准物质总离子流图

地塞米松和甲基强的松龙标准物质总离子流图,见图 A.1。

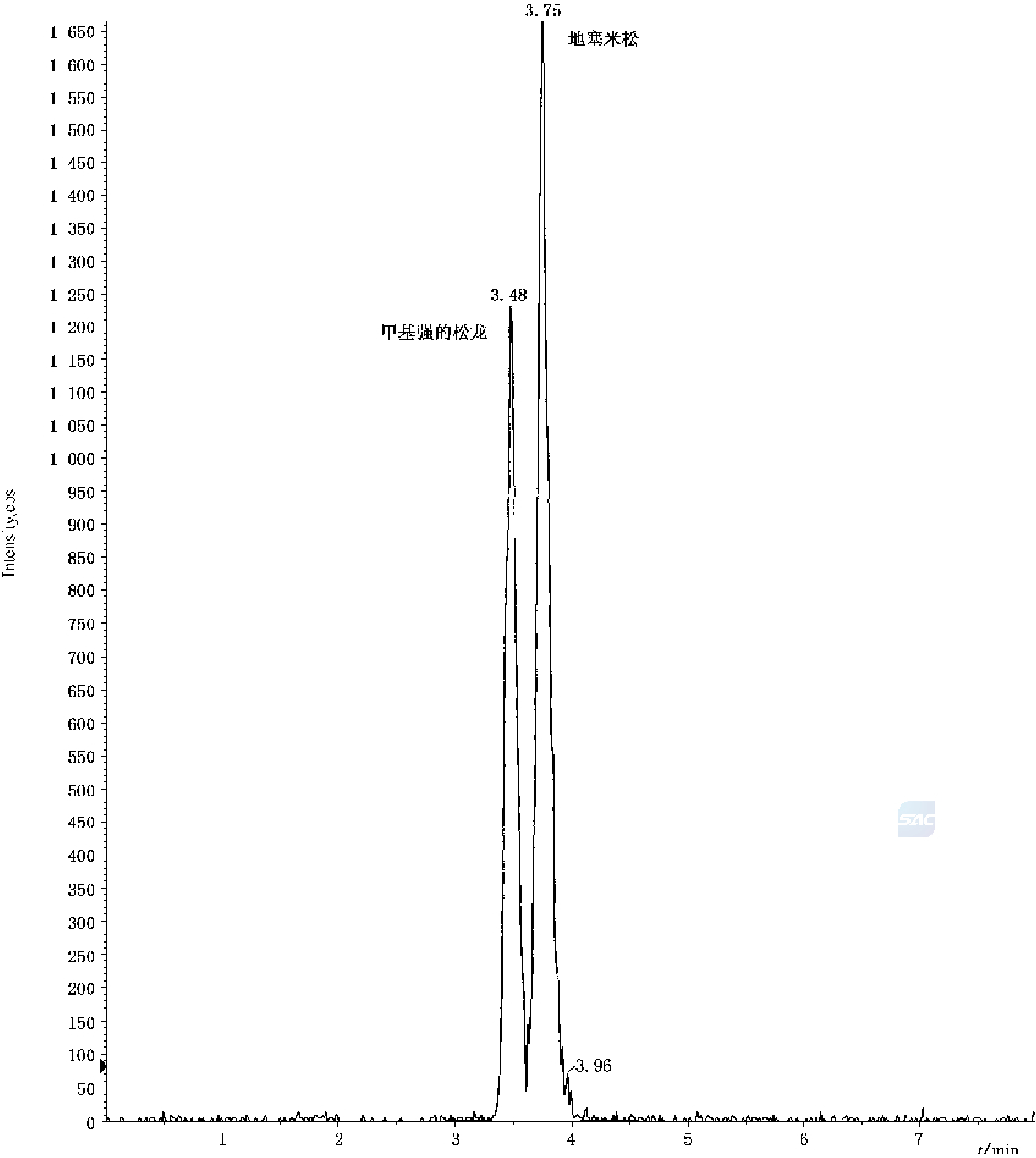


图 A.1 地塞米松和甲基强的松龙标准物质总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法牛肉中地塞米松添加浓度及其平均回收率的试验数据见表 B.1。

表 B.1 地塞米松添加浓度及其平均回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/(%)
地塞米松	0.2	98.68
	0.4	89.94
	1.0	91.36
	10.0	98.72