



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2069—2011

牛乳中孕酮含量的测定 高效液 相色谱—质谱法

Determination of progesterone in milk by HPLC-MS

2011-09-01 发布

2011-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准负责起草单位:中国科学院沈阳应用生态研究所农产品安全与环境质量检测中心。

本标准起草人:王颜红、张红、齐伟、王世成、林桂凤、李波、王姗姗。

牛乳中孕酮含量的测定 高效液相色谱—质谱法

1 范围

本标准规定了牛乳中孕酮含量的高效液相色谱—质谱测定方法。

本标准适用于牛乳中孕酮含量的测定。

本标准的方法检出限为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料经甲醇溶液提取后,经 C_{18} 萃取柱净化,经电喷雾离子源高效液相色谱—质谱测定,保留时间和选择离子丰度比定性,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,本方法仅使用确认为分析纯的试剂。水应为 GB/T 6682 一级用水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇。

4.3 乙酸铵溶液 [$c(\text{CH}_3\text{COONH}_4)=3\ \text{mmol}/\text{L}$]:称取 $0.231\ \text{g}$ 乙酸铵于 $1\ 000\ \text{mL}$ 容量瓶中,定容,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 水相滤膜。

4.4 乙酸铅溶液:称取 $20\ \text{g}$ 乙酸铅三水合物 [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$],溶解于 $100\ \text{mL}$ 的水中,配成质量分数为 20% 的乙酸铅溶液。

4.5 标准溶液

4.5.1 孕酮标准贮备液:质量浓度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

准确称取 $0.010\ \text{g}$ (精确到 $0.000\ 1\ \text{g}$) 孕酮 (纯度 $\geq 98\%$),用甲醇 (4.2) 溶解并定容至 $100\ \text{mL}$ 。于 $0^\circ\text{C}\sim 4^\circ\text{C}$ 贮存,贮存期三个月。

4.5.2 孕酮标准使用液

根据工作需要,用甲醇对标准贮备液 (4.5.1) 进行稀释。于 $0^\circ\text{C}\sim 4^\circ\text{C}$ 贮存。贮存期一个月。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱—质谱联用仪:配有电喷雾离子源和四级杆质量分析器。

5.2 高速离心机: $10\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

5.3 超声波发生器。

5.4 涡旋振荡仪。

5.5 分析天平:感量为 $0.000\ 1\ \text{g}$ 。

5.6 天平:感量为 $0.001\ \text{g}$ 。

5.7 C_{18} 固相萃取柱: $500\ \text{mg}$, $6\ \text{mL}$ 。

5.8 滤膜:孔径 0.45 μm 。

6 测定步骤

6.1 样品提取

准确称取 5 g 试料(精确至 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 甲醇(4.2)和 1 mL 乙酸铅溶液(4.4),涡旋 30 s,超声提取 10 min,10 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 25 mL 容量瓶,残渣再加入 5 mL 甲醇(4.2),涡旋 30 s,超声提取 10 min,10 000 r/min 离心 10 min。合并上清液,用甲醇(4.2)定容,得到甲醇提取液。

6.2 样品净化

取 C_{18} 萃取柱进行活化处理,加入 5 mL 甲醇(4.2),近流干时,加入 5 mL 水淋洗,抽至水面刚达到填料表面。取 5.00 mL 甲醇(4.2)提取液,加入 5 mL 水混合后,倾入 C_{18} 萃取柱(流速为 1 mL/min),用 5 mL 水淋洗,抽干后,用乙腈(4.1)洗脱,定容至 2.00 mL。洗脱液过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱—质谱联用仪测定。

6.3 基质标准曲线的制备

应用本标准方法进行牛乳中孕酮含量的检测,获得总离子流图和质谱谱图。试样总离子流图在孕酮标准总离子流图对应的保留时间 $\pm 5\%$ 范围内中无色谱峰,且该范围内无孕酮特征离子,则该牛乳为基质试样。

称取 5 g(精确至 0.001 g)基质试样 6 份,分别准确移取标准使用液(4.5.2)0.00 mL、0.01 mL、0.05 mL、0.10 mL、0.50 mL、1.00 mL,加入到空白试样中,按 6.1、6.2 步骤操作,供高效液相色谱—质谱联用仪测定,制作标准曲线。

6.4 测定

6.4.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} , 3.5 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm,或相当者。

流动相:乙腈(4.1)+乙酸铵溶液(4.3)(65+35)。

流速:0.3 mL/min。

柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:10 μL 。

6.4.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:正离子扫描。

毛细管电压:4.00 kV。

锥孔电压:30.0 V。

源温度:120 $^{\circ}\text{C}$ 。

脱溶剂气温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。

锥孔反吹气流速:100 L/h。

脱溶剂气流速:450 L/h。

特征选择离子(m/z):97,109,315。

6.4.3 高效液相色谱—质谱测定

取孕酮标准工作溶液系列(6.3)及试液各 10 μL ,分别注入高效液相色谱—质谱联用仪进行分析。孕酮标准总离子流图和质谱图参见图 A.1 和图 A.2。

6.4.4 定性与定量

6.4.4.1 定性

样品特征离子色谱图的保留时间与孕酮标准品的保留时间相差不大于5%；样品色谱峰的特征离子的相对丰度与相应浓度孕酮标准品色谱峰的特征离子的相对丰度相比较，若相对相差不超过最大允许差±10%，则可以判断样品中存在相应的待测物。

6.4.4.2 定量

以标准溶液中定量离子峰面积为纵坐标，标准浓度为横坐标绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对试样定量。样品溶液中的孕酮含量应在标准曲线线性范围内。外标法定量，定量离子为315。

7 结果计算

试样中孕酮含量以质量分数 ω 计，单位以毫克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示，按式(1)计算：

$$\omega = \frac{c \times V_0 \times V_2}{m \times V_1} \times 1000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c ——从标准曲线上得到的待测样液中孕酮的质量浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

V_0 ——提取液总体积，单位为毫升(mL)；

V_1 ——提取液分取体积，单位为毫升(mL)；

V_2 ——提取液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m ——称取的试样量，单位为克(g)。

测定结果用平行测定结果的算术平均值表示，保留至小数点后一位。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附 录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图和质谱参考图

A.1 孕酮标准物质总离子流图见图 A.1。

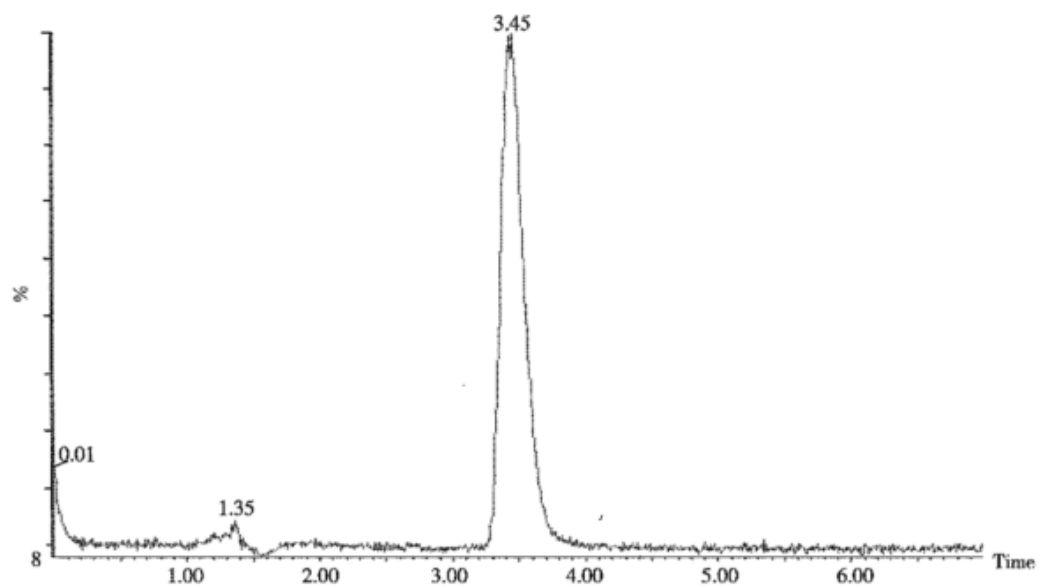


图 A.1 孕酮标准物质总离子流图

A.2 孕酮标准物质质谱图见图 A.2。

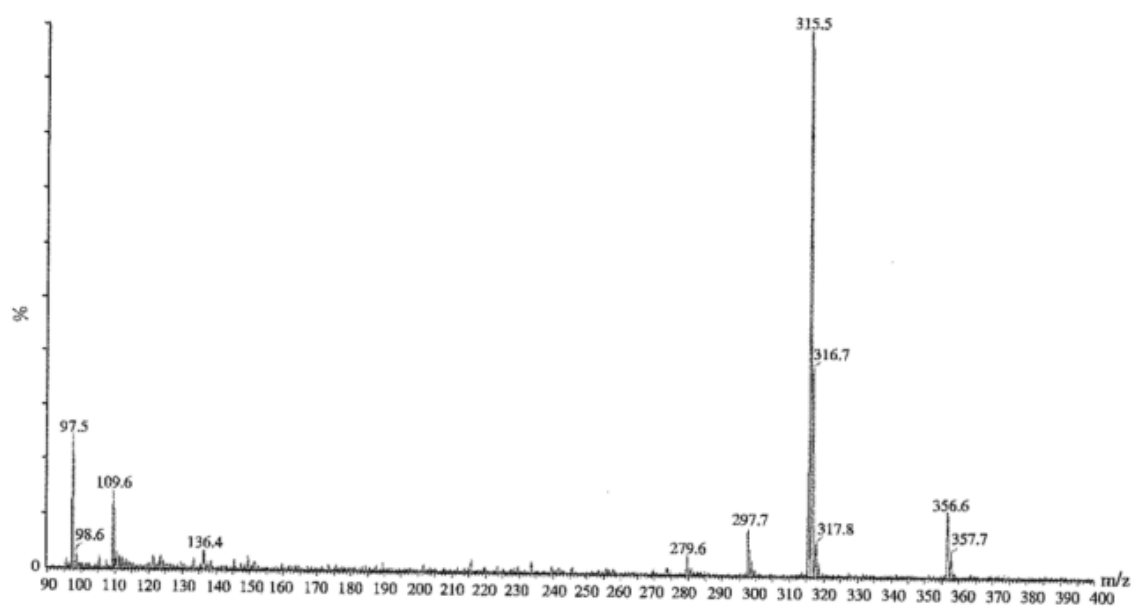


图 A.2 孕酮标准物质质谱图