

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 22957—2008

---

## 河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中九种糖皮质激素 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of nine glucocorticoids residues in fugu, eel and baked eel—  
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。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

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。

本标准主要起草人：刘永明、李金、吴艳萍、冯冠、曹彦忠、庞国芳。

# 河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中九种糖皮质激素 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本标准规定了河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中泼尼松龙、泼尼松、氢化可的松、可的松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松、倍氯米松、醋酸氟氢可的松九种糖皮质激素残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中九种糖皮质激素残留量的测定。

本标准的方法检出限：泼尼松龙、泼尼松、氢化可的松、可的松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松为 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；倍氯米松、醋酸氟氢可的松为 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 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

河豚鱼、鳗鱼、烤鳗样品中加入无水硫酸钠，用乙酸乙酯提取，提取液浓缩后，经过硅胶固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

## 4 试剂和材料

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 乙酸乙酯：色谱纯。

4.5 甲酸：优级纯。

4.6 正己烷：色谱纯。

4.7 丙酮：色谱纯。

4.8 丙酮-正己烷溶液：丙酮+正己烷(2+3)。量取 200 mL 丙酮与 300 mL 正己烷混匀。

4.9 无水硫酸钠：分析纯。在 650  $^{\circ}\text{C}$  马弗炉中灼烧 6 h，储存于干燥器中。

4.10 泼尼松龙(CAS:50-24-8)、泼尼松(CAS:53-03-2)、氢化可的松(CAS:50-23-7)、可的松(CAS:53-06-5)、甲基泼尼松龙(CAS:83-43-2)、倍他米松(CAS:378-44-9)、地塞米松(CAS:50-02-2)、倍氯米松(CAS:4419-39-0)、醋酸氟氢可的松(CAS:514-36-3)标准物质：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.11 1.0 mg/mL 标准储备溶液：分别准确称取适量的糖皮质激素标准物质，用甲醇溶解，分别配制成

1.0 mg/mL 储备溶液。配成的标准储备液应在温度低于-20 °C 冰箱中保存。

4.12 5.0 μg/mL 标准工作溶液:分别准确吸取适量的糖皮质激素标准储备溶液,用甲醇分别配制成 5.0 μg/mL 标准工作溶液。配成的标准工作溶液应在温度低于 4 °C 冰箱中保存。

4.13 混合标准工作溶液 I:分别吸取适量的氢化可的松和可的松标准工作溶液,用甲醇配成浓度为 0.05 μg/mL 的混合标准工作溶液。此溶液应在温度低于 4 °C 冰箱中保存。测定样品使用时,用 20% 乙腈溶液将混合标准工作溶液 I 配成不同浓度的混合标准工作溶液。

4.14 混合标准工作溶液 II:分别吸取适量的泼尼松龙、泼尼松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松、倍氯米松、醋酸氟氢可的松标准工作溶液,用甲醇配成泼尼松龙、泼尼松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松为 0.05 μg/mL,倍氯米松、醋酸氟氢可的松为 0.25 μg/mL 的混合标准工作溶液。此溶液应在温度低于 4 °C 冰箱中保存。

4.15 基质混合标准工作溶液:用空白样品提取液将混合标准工作溶液 II 配成不同浓度的基质混合标准工作溶液。此溶液应现用现配。

4.16 Cleanert Silica 固相萃取柱<sup>1)</sup>或相当者:500 mg,6 mL。使用前用 6 mL 正己烷预处理,保持柱体湿润。

4.17 滤膜:0.2 μm。

## 5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 固相萃取真空装置。

5.4 真空泵:真空度应达到 80 kPa。

5.5 均质器。

5.6 振荡器。

5.7 高速冷冻离心机:转速 13 000 r/min。

5.8 旋转蒸发器。

5.9 氮气浓缩仪。

5.10 具塞塑料离心管:50 mL。

5.11 样品管:10 mL。

5.12 梨形瓶:150 mL。

## 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 具塞塑料离心管中,加入 10 g 无水硫酸钠,加 25 mL 乙

1) Cleanert Silica 固相萃取柱是 Agela 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

酸乙酯,用均质器均质 1 min,在振荡器中振荡 20 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液至梨形瓶中。再用 25 mL 乙酸乙酯提取一次,合并上清液,用旋转蒸发器于 45 °C 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 Cleanert Silica 固相萃取柱中,用 6 mL 正己烷洗涤梨形瓶和萃取柱,弃去全部流出液。减压抽干 1 min,用 6 mL 丙酮+正己烷(2+3)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 20%乙腈溶液溶解残渣,以 4 000 r/min 离心 5 min,上清液过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

## 7.3 测定条件

### 7.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱:Atlantis C<sub>18</sub>,3 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- 柱温:30 °C;
- 进样量:20 μL;
- 流动相、流速和梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相、流速和梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	乙腈/%	0.1%甲酸溶液/%
0.00	200	20	80
10.00	200	70	30
13.00	200	90	10
13.01	200	20	80
20.00	200	20	80

### 7.3.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- 扫描方式:负离子扫描;
- 检测方式:多反应监测;
- 气帘气压力:0.138 MPa;
- 雾化气压力:0.276 MPa;
- 辅助加热气压力:0.138 MPa;
- 离子源温度:500 °C;
- 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 糖皮质激素的定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量

化合物中文名称	化合物英文名称	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
泼尼松龙	prednisolone	405/329	405/329	-30	-25
		405/359		-30	-15
泼尼松	prednisone	403/327	403/327	-19	-21
		403/357		-19	-15
氢化可的松	hydrocortisone	407/331	407/331	-28	-25
		407/361		-28	-15
可的松	cortisone	405/329	405/329	-22	-24
		405/359		-22	-15

表 2 (续)

化合物中文名称	化合物英文名称	定性离子对( $m/z$ )	定量离子对( $m/z$ )	去簇电压/V	碰撞能量/V
甲基泼尼松龙	methylprednisolone	419/343	419/343	-32	-23
		419/373		-32	-16
倍他米松	betamethasone	437/361	437/361	-25	-24
		437/391		-25	-15
地塞米松	dexamethasone	437/361	437/361	-25	-24
		437/391		-25	-15
倍氯米松	beclomethasone	453/377	453/377	-22	-20
		453/407		-22	-17
醋酸氟氢可的松	fludrocortisone acetate	467/421	467/421	-28	-17
		467/349		-28	-32

#### 7.4 液相色谱-串联质谱测定

##### 7.4.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个子离子, 在相同试验条件下, 样品中待测物质的保留时间与混合标准工作溶液的保留时间偏差在  $\pm 2.5\%$  之内; 且样品谱图中各组分监测离子的相对丰度与浓度接近的混合标准工作溶液谱图中对应的监测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

以 % 表示

相对离子丰度 $K$	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许最大偏差	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

##### 7.4.2 定量测定

外标法定量。在仪器最佳工作条件下, 对混合标准工作溶液 I 和基质混合标准工作溶液分别进样, 以峰面积为纵坐标, 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。在上述色谱条件下, 九种糖皮质激素的参考保留时间见表 4, 九种糖皮质激素的多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 A 中的图 A. 1。

本方法的添加回收率数据参见附录 B 中的表 B. 1。

表 4 九种糖皮质激素的参考保留时间

化合物名称	保留时间/min	化合物名称	保留时间/min
泼尼松龙	11.63	倍他米松	13.00
泼尼松	11.72	地塞米松	13.10
氢化可的松	11.79	倍氯米松	13.43
可的松	11.96	醋酸氟氢可的松	14.58
甲基泼尼松龙	12.71		

#### 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 空白试验

除不称取试样外, 均按上述步骤进行。

## 8 结果计算

九种糖皮质激素残留量的测定结果按式(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( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

$c$ ——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( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$V$ ——样品溶液最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$m$ ——样品溶液所代表最终试样的质量,单位为克( $\text{g}$ )。

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

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限  $r$ ,糖皮质激素添加浓度范围及重复性方程见表 5。

表 5 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 $R$
泼尼松龙	0.2~5.0	$\lg r = 0.859\ 4 \lg m - 0.778\ 2$	$R = 0.170\ 3 m + 0.031\ 9$
泼尼松	0.2~5.0	$r = 0.210\ 0 m - 0.000\ 6$	$\lg R = 1.079\ 8 \lg m - 0.619\ 6$
氢化可的松	0.2~5.0	$\lg r = 1.096\ 2 \lg m - 0.722\ 6$	$\lg R = 1.114\ 2 \lg m - 0.661\ 4$
可的松	0.2~5.0	$\lg r = 0.955\ 2 \lg m - 0.758\ 4$	$R = 0.236\ 6 m - 0.004\ 1$
甲基泼尼松龙	0.2~5.0	$\lg r = 1.062\ 1 \lg m - 0.718\ 7$	$\lg R = 0.964\ 3 \lg m - 0.642\ 3$
倍他米松	0.2~5.0	$\lg r = 1.068\ 6 \lg m - 0.689\ 9$	$\lg R = 1.158\ 5 \lg m - 0.616\ 8$
地塞米松	0.2~5.0	$\lg r = 1.121\ 7 \lg m - 0.690\ 0$	$\lg R = 1.188\ 2 \lg m - 0.622\ 9$
倍氯米松	1.0~25	$\lg r = 0.999\ 3 \lg m - 0.722\ 2$	$\lg R = 0.861\ 3 \lg m - 0.478\ 3$
醋酸氟氢可的松	1.0~25	$r = 0.109\ 2 m + 0.127\ 9$	$\lg R = 0.929\ 2 \lg m - 0.591\ 5$

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

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限  $R$ ,糖皮质激素添加浓度范围及再现性方程见表 5。

附录 A  
(资料性附录)

九种糖皮质激素的多反应监测(MRM)色谱图

九种糖皮质激素的多反应监测(MRM)色谱图见图 A.1。

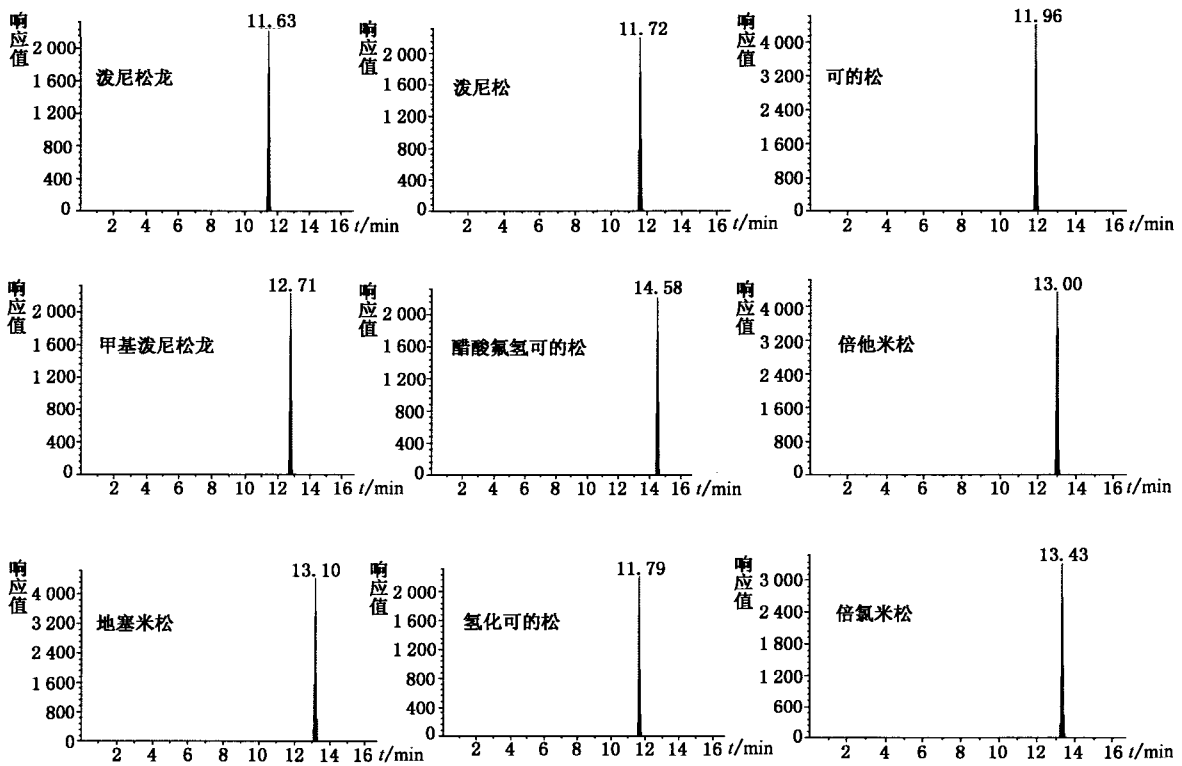


图 A.1 九种糖皮质激素的多反应监测(MRM)色谱图



附 录 B  
(资料性附录)  
回 收 率

本方法九种糖皮质激素的添加浓度及其平均回收率的试验数据见表 B.1。

表 B.1 九种糖皮质激素添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	添加浓度/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率/%
泼尼松龙	0.2	83.4
	0.4	87.1
	1.0	93.7
	5.0	79.4
泼尼松	0.2	92.5
	0.4	84.5
	1.0	82.0
	5.0	83.7
氢化可的松	0.2	89.0
	0.4	100.1
	1.0	100.4
	5.0	91.0
可的松	0.2	96.0
	0.4	89.4
	1.0	98.5
	5.0	84.4
甲基泼尼松龙	0.2	84.7
	0.4	87.3
	1.0	79.9
	5.0	79.7
倍他米松	0.2	92.5
	0.4	94.5
	1.0	84.9
	5.0	76.6
地塞米松	0.2	89.1
	0.4	91.8
	1.0	82.9
	5.0	78.1
倍氯米松	1.0	89.4
	2.0	86.5
	5.0	81.3
	25	82.0
醋酸氟氢可的松	1.0	78.0
	2.0	77.5
	5.0	80.5
	25	81.4