

中华人民共和国国家标准

农业部 1031 号公告—2—2008

动物源性食品中糖皮质激素类药物 多残留检测 液相色谱-串联质谱法

*Determination of glucocorticoids residues
in animal products C-MS/MS method*

2008-05-09 发布

2008-05-09 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：华中农业大学、北京市食品安全监控中心、河南省兽药监察所、福建省兽药监察所。

本标准主要起草人：袁宗辉、陈冬梅、陶燕飞、王玉莲、刘振利、彭大鹏、黄玲利、戴梦红、黄华、路勇、班付国、宋志超、贾振民、林永。

本标准系国内首次发布的国家标准。

动物源性食品中糖皮质激素类药物 多残留检测 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中糖皮质激素类药物残留检测的液相色谱-串联质谱测定法。

本标准适用于猪、牛、羊的肝脏和肌肉,鸡肌肉,鸡蛋,牛奶中泼尼松、泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、氟氢可的松、甲基泼尼松、倍氯米松、氢化可的松单个或多个药物残留量的检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 制样

3.1 样品的制备

- 3.1.1 取新鲜或冷冻空白或供试组织,并使均质。
- 3.1.2 取适量新鲜或冷藏空白供试牛奶和鸡蛋样品。

3.2 样品的保存

- 3.2.1 组织样品-20℃以下贮存备用。
- 3.2.2 牛奶和鸡蛋样品 4℃以下贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

组织样品用碱水解,乙酸乙酯提取。牛奶和鸡蛋样品用乙酸乙酯提取,提取液用固相萃取柱净化,高效液相色谱-串联质谱 ESI 负离子模式进行检测。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 糖皮质激素类药物标准品。

- 泼尼松,≥98%;
- 泼尼松龙,≥99.5%;
- 地塞米松,≥99.5%;
- 倍他米松,≥99.5%;
- 氟氢可的松乙酸盐,≥98%;
- 甲基泼尼松,≥99.5%;
- 倍氯米松,≥99.5%;
- 氢化可的松,≥99.5%。

4.2.2 甲醇。

4.2.3 正己烷。

4.2.4 乙腈:色谱纯。

4.2.5 乙酸乙酯。

4.2.6 丙酮。

4.2.7 甲酸。

4.2.8 氢氧化钠。

4.2.9 氢氧化钠溶液 0.1 mol/L:

称取 4.0 g 氢氧化钠,用水溶解,稀释定容至 1 000 mL。

4.2.10 正己烷-丙酮溶液(6/4,V/V)。

4.2.11 流动相:

A 相:水;

B 相:乙腈(色谱纯);

C 相:移取 20 mL 甲酸,用水定容至 1 000 mL,得到 0.2%甲酸水溶液。0.22 μm 滤膜过滤,现配现用。

4.2.12 糖皮质激素类药物标准贮备液

分别精密称取适量的糖皮质激素类药物标准品,用甲醇溶解定容,分别配制成 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液作为贮备液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

4.2.13 糖皮质激素类药物混合标准工作液

准确量取糖皮质激素类药物标准贮备液适量,用 20%乙腈水溶液稀释成适宜浓度的混合标准工作液,现配现用。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

4.3.2 天平:感量 0.01 g。

4.3.3 分析天平:感量 0.000 01 g。

4.3.4 冷冻高速离心机(15 000 r/min)。

4.3.5 振荡器。

4.3.6 旋涡混合器。

4.3.7 组织匀浆机。

4.3.8 氮吹仪。

4.3.9 旋转蒸发器。

4.3.10 固相萃取装置。

4.3.11 固相萃取柱。

Silica 柱:500 mg/6 mL,或相当者。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取供试样品均质,作为供试试料;

——取空白样品均质,作为空白试料。

4.4.2 提取

称取组织试料(2 \pm 0.05)g 于 50 mL 离心管中,加乙酸乙酯 15 mL,漩涡混合,8 000 r/min 离心

15 min, 移取乙酸乙酯层。于残渣中加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL, 混匀, 加乙酸乙酯 20 mL, 漩涡混合, 200 r/min 摇床振动 15 min, 8 000 r/min 离心 15 min, 移取乙酸乙酯层。合并两次提取液, 40°C 旋转蒸至近干, 加乙酸乙酯 1 mL 和正己烷 5 mL, 溶解残渣, 待净化。

取牛奶试料(2±0.05)mL 于 50 mL 离心管中, 加乙酸乙酯 20 mL, 漩涡混合, 200 r/min 摇床振动 15 min, 8 000 r/min 离心 15 min。移取乙酸乙酯层, 40°C 旋转蒸至近干, 加乙酸乙酯 1 mL 和正己烷 5 mL, 溶解残渣, 待净化。

称取鸡蛋试料(2±0.05)g 于 50 mL 离心管中, 加乙酸乙酯 20 mL, 漩涡混合, 200 r/min 摇床振动 15 min, 8 000 r/min 离心 15 min。移取乙酸乙酯层, 40°C 旋转蒸至近干, 加乙酸乙酯 1 mL 和正己烷 5 mL, 溶解残渣, 待净化。

4.4.3 净化

用正己烷 6 mL 活化固相萃取柱, 提取液过柱。用正己烷 6 mL 淋洗萃取柱, 抽干, 用正己烷—丙酮(6/4, V/V) 6 mL 洗脱。洗脱液 50°C 氮气吹干, 加 20% 乙腈水溶液 0.5 mL, 溶解残渣, 转入 1.5 mL 离心管中, 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 供高效液相色谱-串联质谱法测定。

4.4.4 标准曲线的制备

准确量取适量糖皮质激素类药物标准贮备液, 用 20% 乙腈水溶液配制成泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、地塞米松、倍他米松浓度为 0.2 μg/L、0.5 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、20 μg/L、50 μg/L, 倍氯米松和氟氢可的松浓度为 0.4 μg/L、1 μg/L、4 μg/L、10 μg/L、40 μg/L、100 μg/L, 氢化可的松浓度为 0.8 μg/L、2 μg/L、8 μg/L、20 μg/L、80 μg/L、200 μg/L 的混合标准系列工作液, 依次进行测定, 以得到的峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

- 色谱柱: C₁₈ 色谱柱, 150 mm×2.1 mm, 粒径 5 μm, 或相当者;
- 流动相: A 相: B 相: C 相, 梯度洗脱程序见表 1;
- 柱温: 40°C;
- 进样量: 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱条件和流速

时间, min	流速, mL/min	A 相, %	B 相, %	C 相, %
0	0.20	65	30	5
17	0.20	65	30	5
20	0.20	45	50	5
24	0.20	45	50	5
24.1	0.20	65	30	5
30	0.20	65	30	5

4.4.5.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源;
 扫描方式: 负离子扫描;
 检测方式: 选择反应监测;
 喷雾电压: 4 000 V;
 离子传输管温度: 330°C;
 鞘气压力: 40 arb;
 辅助气压力: 6 arb;
 糖皮质激素类药物选择反应监测的优化参数见表 2。

表 2 糖皮质激素类药物选择反应监测的优化参数

药物名称	英文名称	相对保留时间, min	定性离子对	定量离子对	Tube lens/V
泼尼松	prednisone	6.8	403.0>326.9	403.0>326.9	20
			403.0>357.2		11
泼尼松龙	prednisolone	6.5	405.0>329.0	405.0>329.0	22
			405.0>358.8		27
氢化可的松	hydrocortisone	6.8	407.1>331.1	407.1>331.1	16
			407.1>361.1		11
甲基泼尼松	methylprednisolone	13.5	419.0>342.9	419.0>342.9	19
			419.0>373.1		16
地塞米松*	dexamethasone	14.7	437.0>361.0	437.0>361.0	15
			437.0>391.5		10
倍他米松	betamethasone	16.2	437.0>361.0	437.0>361.0	15
			437.0>391.5		10
倍氯米松	beclomethasone	20.9	453.0>376.8	453.0>406.9	13
			453.0>406.9		13
氟氢可的松乙酸盐	fludrocortisones acetate	26.8	467.1>420.8	467.1>420.8	13
			467.1>349.2		26

* 地塞米松相对保留时间在倍他米松之前。

4.4.5.3 液相色谱/串联质谱测定

取适量试样溶液和相应的标准溶液,单点校准,按外标法,以峰面积积分值定量,标准工作液及试样液中糖皮质激素类药物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液和试样溶液中的特征离子的质量色谱图见附录 A。

4.4.6 空白试验

取空白试料采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.4.7 定性与定量

通过样品色谱图的保留时间与标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准品各色谱峰的特征离子相对照定性。样品与标准品保留时间的相对偏差不大于 5%;样品特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不超过表 3 的规定,则可判断样品中存在相应的被测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

将供试试样和标准溶液的定量离子面积之比作单点校正定量。

4.5 结果计算与表述

试料中糖皮质激素类药物的残留量(μg/kg)按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试料中糖皮质激素类药物的残留量,单位为微克每千克或微克每升(μg/kg 或 μg/L);

A——试样溶液中糖皮质激素类药物的峰面积;

A_s——标准工作液中糖皮质激素类药物的峰面积;

C_s——标准工作液中糖皮质激素类药物的浓度,单位为微克每升(μg/L);

V ——溶解残余物所得试样溶液体积,单位为毫升(mL);

W ——样品质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、地塞米松、倍他米松在牛奶中的定量限为 $0.2 \mu\text{g/L}$,肌肉和鸡蛋中定量限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$,肝脏中定量限为 $1 \mu\text{g/kg}$;倍氯米松和氟氢可的松在牛奶中定量限为 $0.4 \mu\text{g/L}$,肌肉和鸡蛋中定量限为 $1 \mu\text{g/kg}$,肝脏中定量限为 $2 \mu\text{g/kg}$;氢化可的松在牛奶中定量限为 $0.8 \mu\text{g/L}$,肌肉和鸡蛋中定量限为 $2 \mu\text{g/kg}$,肝脏中定量限为 $4 \mu\text{g/kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在牛奶中添加 $0.2 \mu\text{g/kg} \sim 0.6 \mu\text{g/kg}$ 浓度时回收率为 $50\% \sim 120\%$,在肝脏中添加 $1 \mu\text{g/kg} \sim 4 \mu\text{g/kg}$ 浓度时回收率为 $60\% \sim 120\%$,在肌肉和鸡蛋中添加 $0.5 \mu\text{g/kg} \sim 1.5 \mu\text{g/kg}$ 浓度时回收率为 $50\% \sim 120\%$ 。

5.3 精密度

本方法的批间变异系数不大于 20% 。

附录 A
(资料性附录)
糖皮质激素类药物特征离子质量色谱图

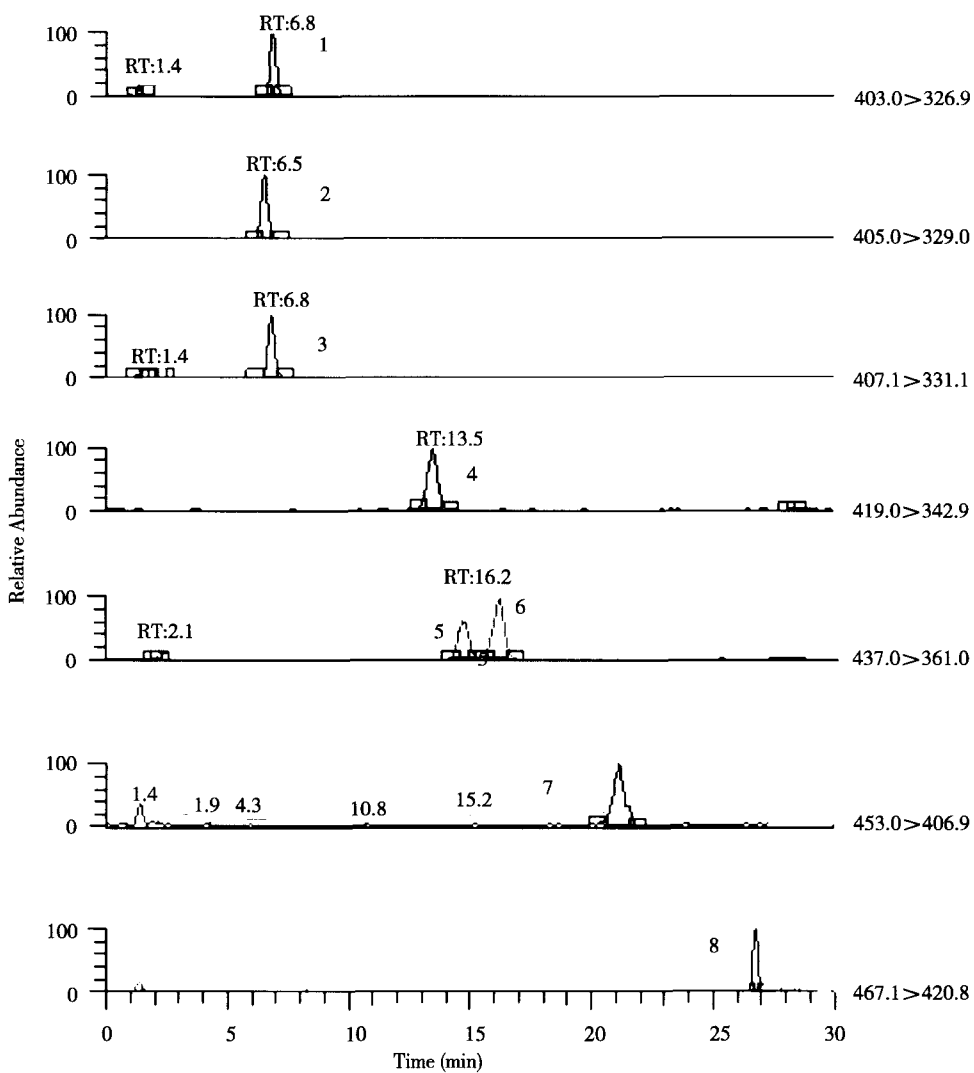


图 A.1 糖皮质激素类药物标准溶液特征离子质量色谱图(0.2 $\mu\text{g/L}$)

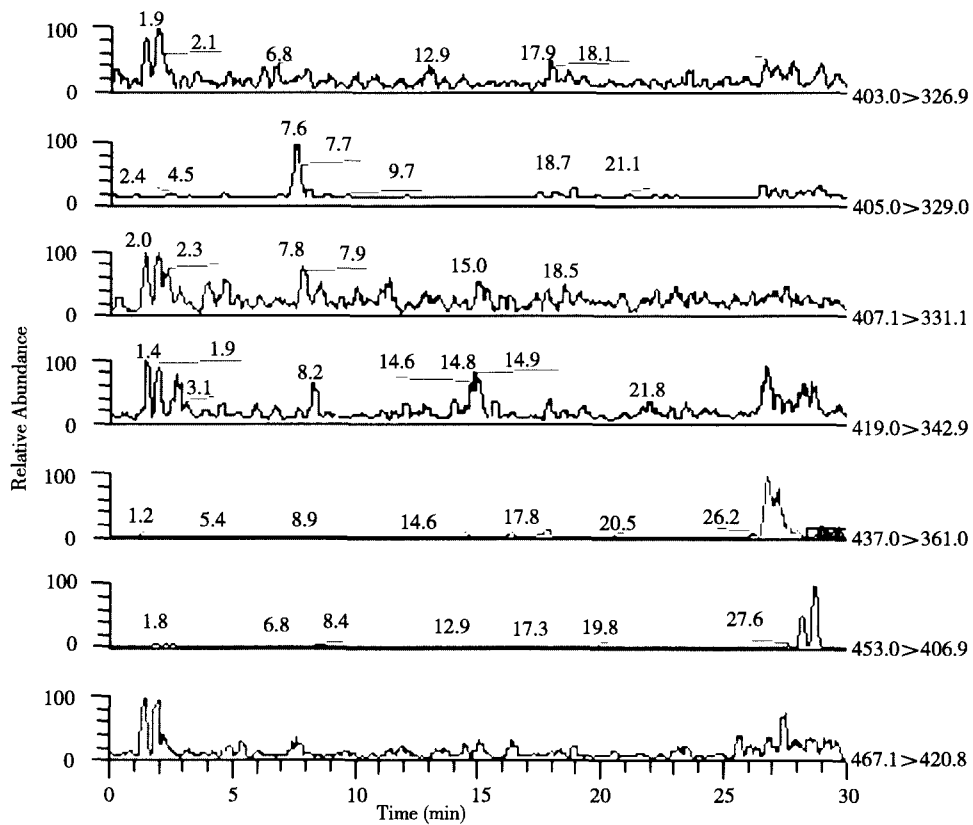


图 A. 2 空白猪肝脏特征离子质量色谱图

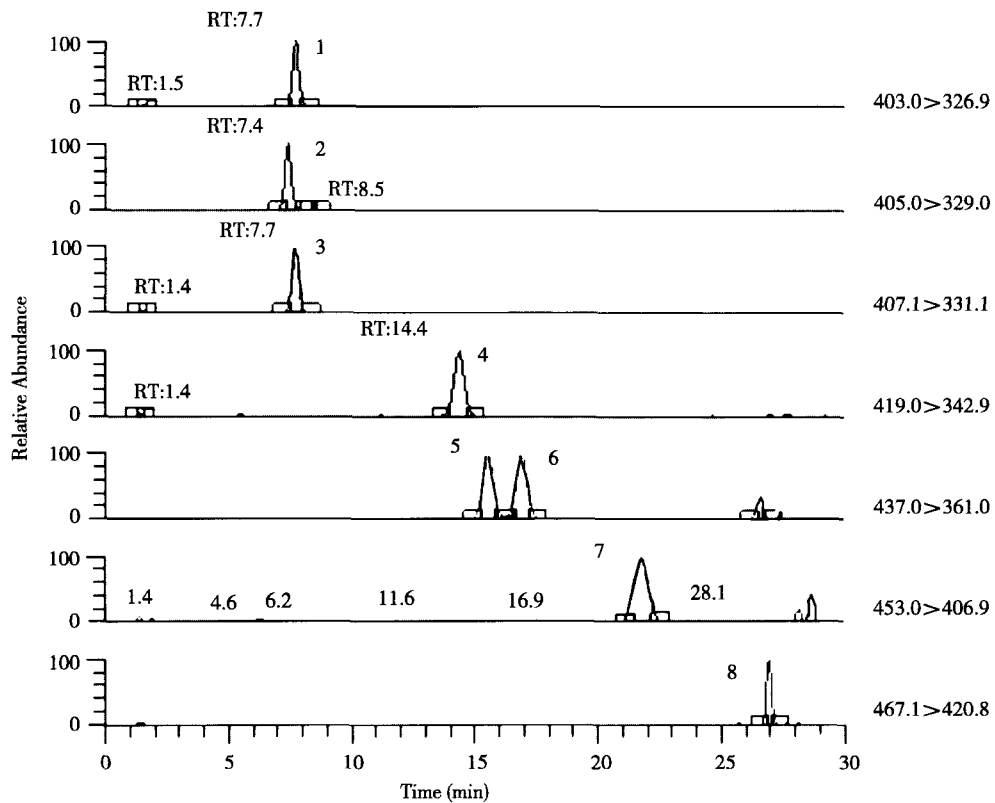


图 A. 3 猪肝脏中糖皮质激素类药物特征离子质量色谱图 (1 µg/kg)

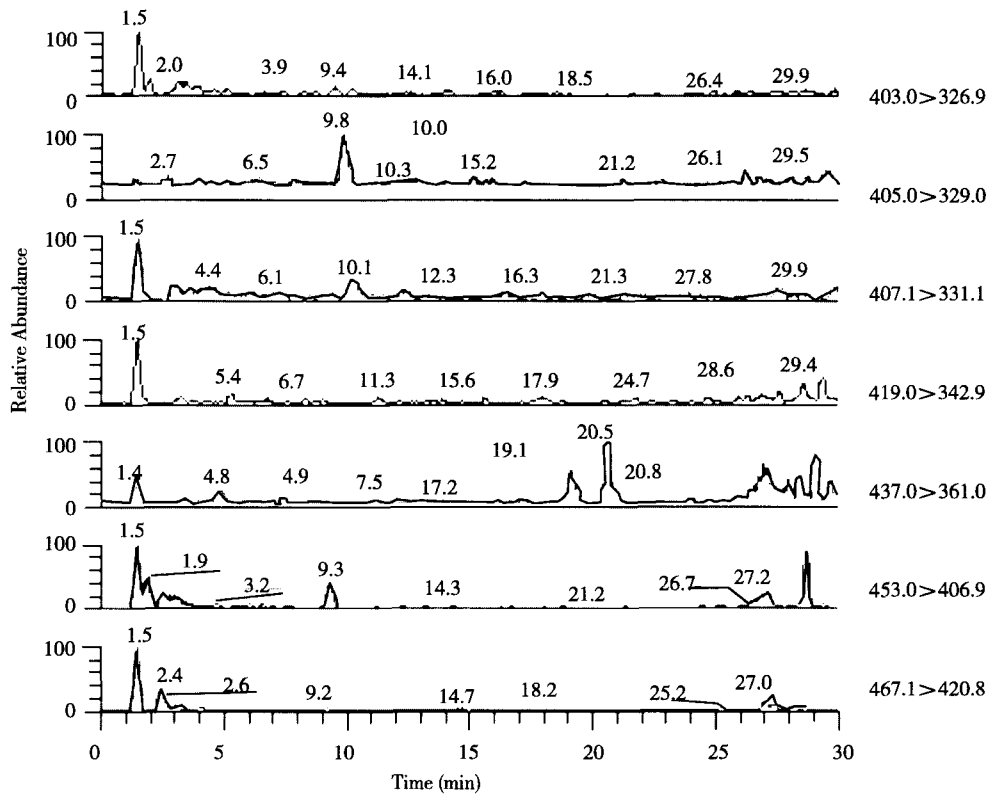


图 A. 4 空白牛奶特征离子质量色谱图

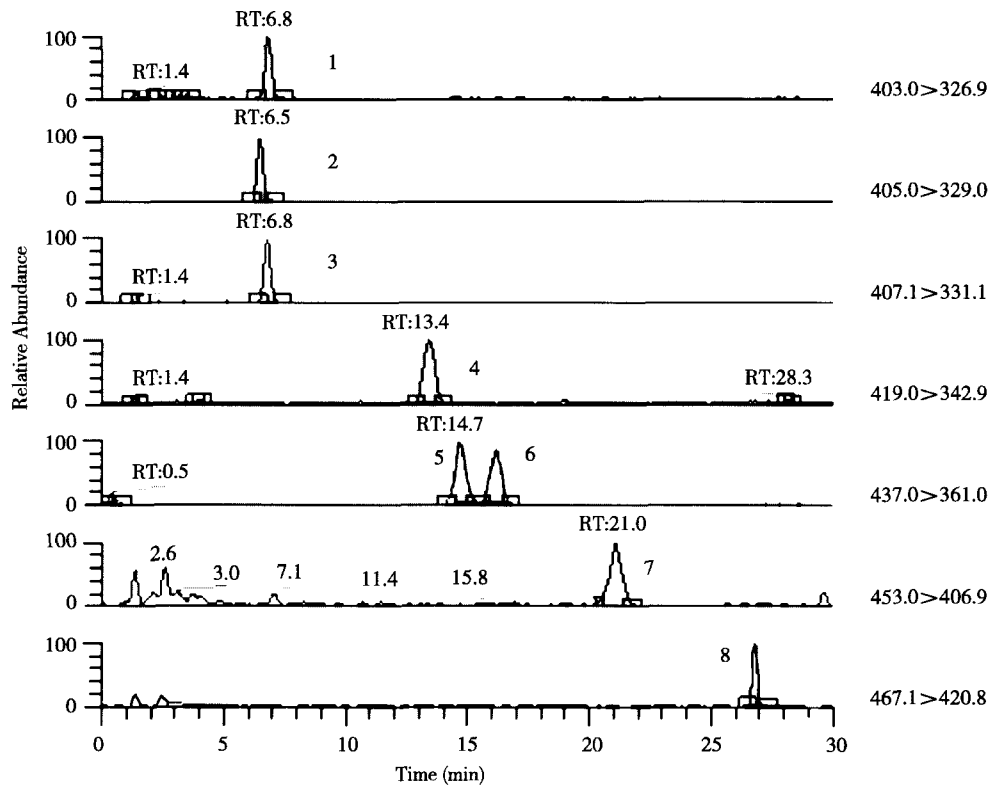


图 A. 5 牛奶中糖皮质激素类药物特征离子质量色谱图(0.2 µg/L)

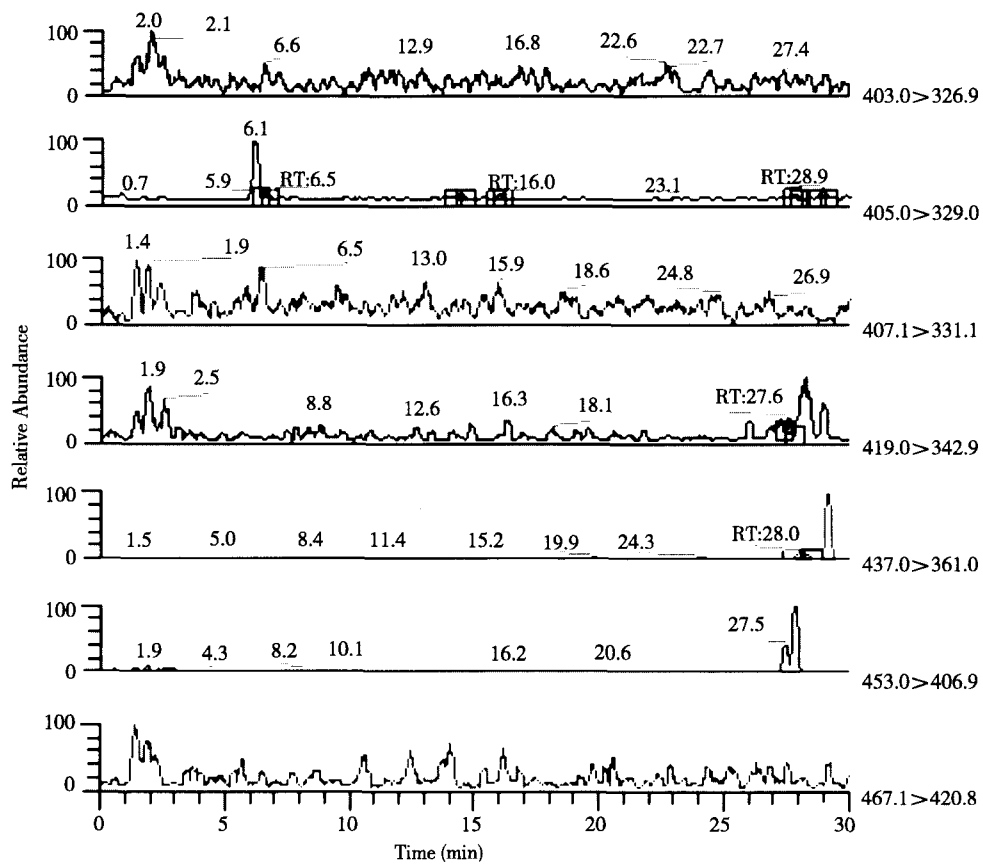


图 A.6 空白肌肉特征离子质量色谱图

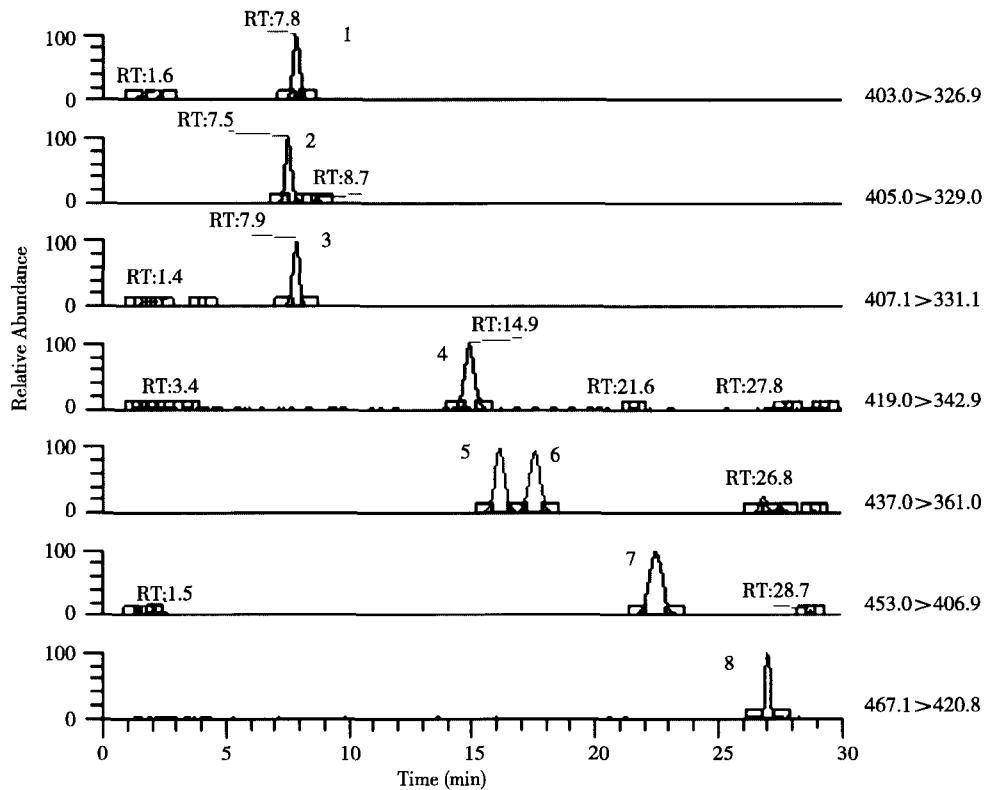


图 A.7 肌肉中糖皮质激素类药物特征离子质量色谱图(0.5 µg/kg)

农业部 1031 号公告—2—2008

质量色谱图中：

- 1——泼尼松的特征离子质量色谱图(403.0>326.9)；
 - 2——泼尼松龙的特征离子质量色谱图(405.0>329.0)；
 - 3——氢化可的松的特征离子质量色谱图(407.1>331.1)；
 - 4——甲基泼尼松的特征离子质量色谱图(419.0>342.9)；
 - 5——地塞米松的特征离子质量色谱图(437.0>361.0)；
 - 6——倍他米松的特征离子质量色谱图(437.0>361.0)；
 - 7——倍氯米松的特征离子质量色谱图(453.0>406.9)；
 - 8——氟氢可的松乙酸盐的特征离子质量色谱图(467.1>420.8)。
-