

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 679—2024

水牛乳中类固醇激素类药物多残留量的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of steroid hormones multiple residues in buffalo milk by
the method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2024 - 01 - 29 发布

2024 - 02 - 04 实施

广西标准化协会 发 布

前 言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由南宁市疾病预防控制中心提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：南宁市疾病预防控制中心、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西化工研究院有限公司、广西皇氏乳业有限公司。

本文件主要起草人：欧阳小艳、范云燕、黄珊、吕仕军、覃沛、周吉、徐斌、梁善范、吴家彬、卢秋影、李雯晓、张静。

水牛乳中类固醇激素类药物多残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水牛乳中13种类固醇激素类药物多残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于水牛乳中异氟泼尼松、卤米松、氟尼缩松、地索奈德、睾酮、美雄酮、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮、孕酮、己酸羟孕酮残留量等13种类固醇激素类药物多残留量的确证和定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T 27404 实验室质量控制规范 食品理化检测

3 方法提要

试样用水和乙腈提取，亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白，提取液经吸附剂无水硫酸镁、PSA、C18进行净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂与材料

除另有规定外，本文件所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682中规定的一级水。

4.1 试剂

- 4.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。
- 4.1.2 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。
- 4.1.3 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。
- 4.1.4 乙酸锌 $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 。
- 4.1.5 氯化钠（ NaCl ）。
- 4.1.6 无水乙酸钠（ CH_3COONa ）。
- 4.1.7 无水硫酸镁（ MgSO_4 ）。
- 4.1.8 N-丙基乙二胺（PSA）：粒径 $40\ \mu\text{m} \sim 60\ \mu\text{m}$ 。
- 4.1.9 HC-C18型吸附剂（C18）：粒径 $40\ \mu\text{m} \sim 63\ \mu\text{m}$ 。

4.2 试剂配制

- 4.2.1 亚铁氰化钾溶液（92 g/L）：称取 106 g 亚铁氰化钾，加入适量水溶解，用水定容至 1 000 mL。
- 4.2.2 乙酸锌溶液（183 g/L）：称取 220 g 乙酸锌，加入适量水溶解，用水定容至 1 000 mL。
- 4.2.3 乙腈水溶液（1+1, v/v）：取 500 mL 乙腈，加入 500 mL 水，摇匀备用。

4.3 标准品

13种类固醇激素标准物质纯度均大于96.3%或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。标准物质英文名称及CAS号参见附录A。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备液：分别称取适量（精确至 0.000 01 g）各标准物质，用甲醇溶解配制浓度为 1 mg/mL 的标准储备液，避光-18℃保存，保存期 6 个月。

4.4.2 混合标准中间液：分别准确移取适量的异氟泼尼松、卤米松、氟尼缩松、地索奈德、睾酮、美雄酮、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮、孕酮、己酸羟孕酮标准储备液，用甲醇稀释配制成浓度为 1 μg/mL，避光-18℃保存，保存期 2 个星期。

4.4.3 混合标准工作液：准确移取适量的混合标准中间液，用乙腈水（4.2.3）配制成适用浓度（至少 5 个浓度系列），分别为 0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L 用于做标准工作曲线，现配现用。

4.5 材料

4.5.1 微孔滤膜：0.2 μm，有机相。

4.5.2 聚丙烯离心管：15 mL，50 mL。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI 源）。

5.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

5.3 离心机：转速≥10 000 r/min。

5.4 涡旋混合器。

5.5 氮吹仪。

5.6 移液器：100 μL，1 000 μL，5 000 μL。

6 试样制备与保存

从所取全部样品中取出有代表性样品约 500 g，充分摇匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封，并标明标记。将试样置于 0℃~4℃冷藏存放。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2 g（精确至 0.01 g）混合均匀的样品，置于 50 mL 离心管中，分别加入 5.0 mL 水和 10.0 mL 乙腈，涡旋提取 10 min，加入亚铁氰化钾溶液（4.2.1）和乙酸锌溶液（4.2.2）各 0.2 mL，涡旋 5 min，加入 1.5 g NaCl（4.1.5）和 4 g CH₃COONa（4.1.6），涡旋提取 5 min，10 000 r/min 离心 5 min。

7.2 净化

取 2 mL 上清液转移至净化管（分别称取 0.15 g MgSO₄、0.10 g PSA、0.10 g C18 至 15 mL 离心管中），涡旋 1 min，10 000 r/min 离心 5 min。准确吸取 1 mL 上清液于 40℃ 下用氮气吹干，最后用 0.5 mL 乙腈水溶液（4.2.3）复溶，过 0.22 μm 有机滤膜，上机检测。

7.3 测定

7.3.1 参考条件

7.3.1.1 液相色谱

参考条件如下：

- 色谱柱：ShimNex HE C18-AQ, 3 μm, 2.1×100 mm，或性能相当者；
- 流动相：A 为水；B 为乙腈，梯度洗脱程序参见表 1；
- 柱温：35℃；
- 进样量：5 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/ (mL/min)	A/%	B/%
0	0.3	85	15
8	0.3	55	45
12	0.3	10	90
14	0.3	10	90
17	0.3	85	15
18	0.3	85	15

7.3.1.2 质谱

参考条件如下:

- ESI离子源, 正离子模式;
- 多反应监测 (MRM) 扫描;
- 离子喷雾电压: 5.5 kV;
- 离子源温度: 550 °C;
- 气帘气压力: 30 psi;
- 喷雾气压力: 50 psi;
- 辅助加热气压力: 55 psi;
- 13种类固醇激素类药物的监测离子对参数参见表2。

表2 13 种类固醇激素类药物的监测离子对参数

化合物	母离子/ (m/z)	子离子/ (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
异氟泼尼松	379.2	265.1 ^a	70	24	5.108
		147.1		38	
卤米松	445.2	155.0 ^a	80	45	7.292
		169.0		34	
氟尼缩松	435.2	321.2 ^a	80	27	6.551
		397.1		19	
地索奈德	417.2	147.0 ^a	70	39	6.512
		173.0		33	
睾酮	289.2	97.2 ^a	60	27	7.604
		109.1		32	
美雄酮	301.3	121.3 ^a	80	35	7.074
		283.3		17	
孕三烯酮	309.1	241.1 ^a	120	29	8.033
		199.2		43	
炔诺孕酮	313.2	245.3 ^a	115	24	8.797
		109		33	
醋酸氯地孕酮	405.2	309.2 ^a	100	21	10.255
		345.2		17	
醋酸甲地孕酮	385.1	325.1 ^a	90	20	10.099
		267.3		26	
醋酸甲羟孕酮	387.1	327.3 ^a	96	18	10.313
		123		30	
孕酮	315.3	97.1 ^a	80	32	10.145
		109.1		36	
己酸羟孕酮	429.1	313.2 ^a	76	20	12.100
		271.3		27	

注: a, 表示定量离子。

7.3.2 色谱测定与定性

7.3.2.1 根据试样中 13 种类固醇激素类药物的含量情况，选择浓度相近的标准工作液进行色谱分析，以峰面积进行外标曲线定量。在上述色谱条件下，13 种类固醇激素类药物的参考保留时间见表 2。标准溶液的多反应监测（MRM）离子色谱图参见附录 B。

7.3.2.2 按照上述条件测定样品和标准工作液，如果检测的质量色谱峰保留时间与标准工作液的色谱峰保留时间偏差在±2.5%之内；定性离子对的相对丰度与相当浓度的标准工作液的相对丰度一致，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

相对丰度（基峰）	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.4 空白实验

除不加试样外，均按7所述分析步骤进行。

8 结果计算

液相色谱-串联质谱法测定采用标准曲线法定量，标准曲线法定量结果按式（1）计算。

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中目标化合物的残留量的质量分数，单位为微克每千克（μg/kg）；
- c——由回归曲线计算得到的上机试样溶液中目标化合物的浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- V——浓缩至干后试样的定容体积，单位为毫升（mL）；
- f——稀释倍数；
- m——称样量，单位为克（g）。

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

9 精密度

本文件的精密度数据是按照GB/T 27404的要求确定的，以相对标准偏差（RSD）表示，参见附录C。

10 其他

10.1 检出限和定量限

本方法中13种类固醇激素类药物的检出限范围为0.1 μg/kg~0.3 μg/kg，定量限范围为0.4 μg/kg~1 μg/kg（参见附录D）。

10.2 回收率

13种类固醇激素类药物在不同的基质中的添加回收率试验数据参见附录C。

附 录 A
(资料性)

13 种类固醇激素标准物质的英文名称及 CAS 号

表A. 1给出了13种类固醇激素标准物质的英文名及CAS号。

表 A. 1 13 种类固醇激素标准物质的英文名称及 CAS 号

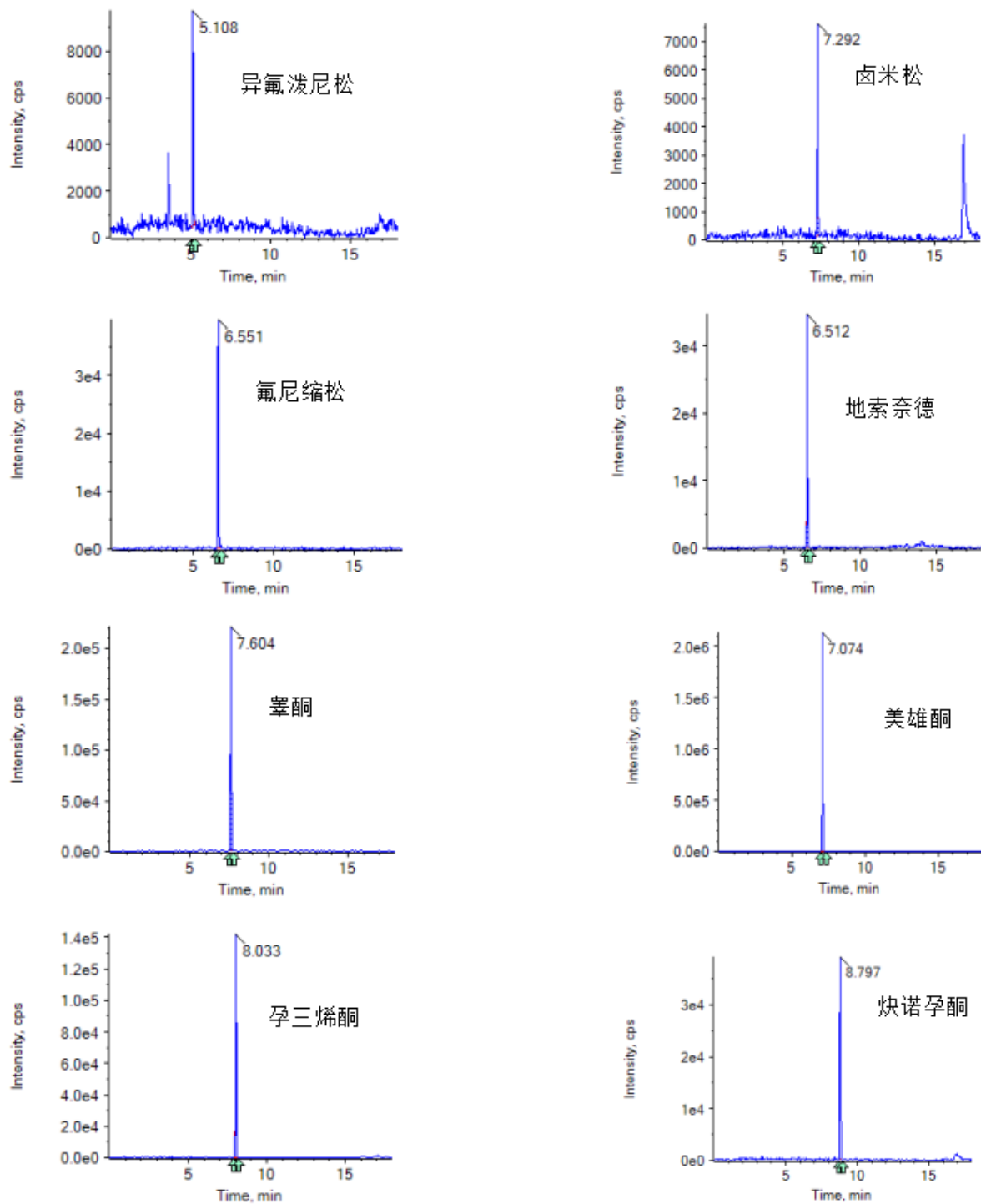
化合物	英文名称	CAS号
异氟泼尼松	9-fluoroprednisolone	338-95-4
卤米松	halometasone	50629-82-8
氟尼缩松	flunisolide	3385-03-3
地索奈德	desonide	638-94-8
睾酮	testosterone	58-22-0
美雄酮	metandienone	72-63-9
孕三烯酮	gestrinone	10161-33-8
炔诺孕酮	norgestrel	6533-00-2
醋酸氯地孕酮	chlormadinone acetate	302-22-7
醋酸甲地孕酮	megestrol acetate	595-33-5
醋酸甲羟孕酮	medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9
孕酮	progesterone	57-83-0
己酸羟孕酮	hydroxyprogesterone caproate	630-56-8

广西标准化协会

附 录 B
(资料性)

13 种类固醇激素标准溶液的多反应监测 (MRM) 离子色谱图

图B.1给出了13种类固醇激素标准溶液的多反应监测 (MRM) 离子色谱图。



图B.1 13 种类固醇激素标准溶液的多反应监测 (MRM) 离子色谱图

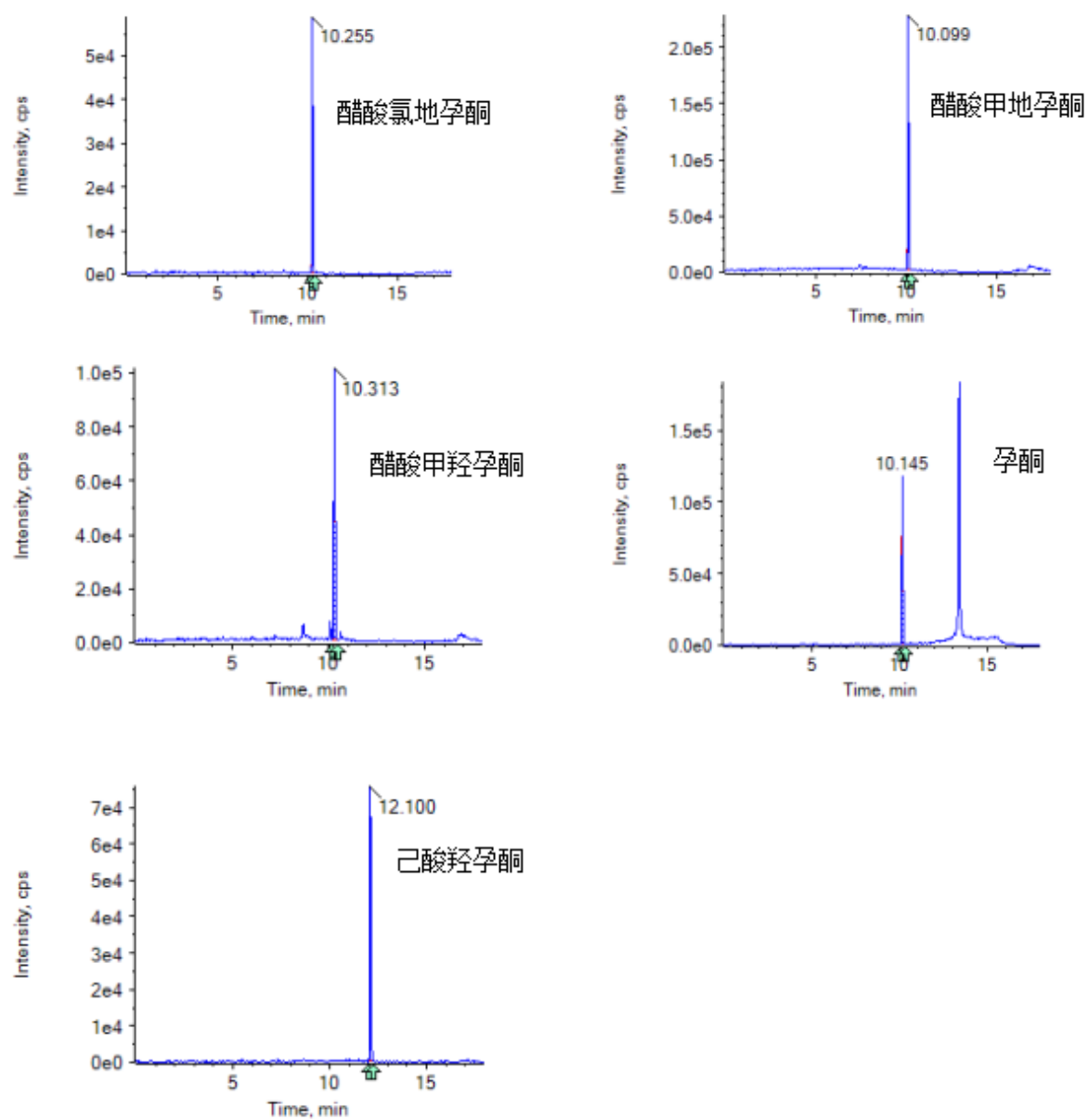


图 B.1 13 种类固醇激素标准溶液的多反应监测 (MRM) 离子色谱图 (续)

附录 C

(资料性)

13 种类固醇激素类药物测定的添加回收率试验数据

表C.1给出了13种类固醇激素类药物测定的添加回收率数据。

表C.1 13 种类固醇激素类药物测定的添加回收率试验数据 (n=6)

化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%			相对标准偏差RSD/%		
		水牛奶	水牛酸奶	调制水牛奶	水牛奶	水牛酸奶	调制水牛奶
异氟泼尼松	2.50	70.3%~105.3%	110.0%~118.0%	70.4%~89.8%	18.8	2.6	8.8
	6.25	72.3%~96.8%	72.4%~94.3%	81.3%~89.4%	13.5	8.9	3.3
	12.5	70.4%~88.7%	72.5%~78.5%	82.7%~87.0%	8.3	3.3	2.1
卤米松	2.50	88.3%~98.8%	77.8%~110.2%	75.6%~79.1%	4.7	13.3	1.7
	6.25	86.4%~97.9%	79.3%~103.1%	80.8%~98.2%	5.2	11.3	6.4
	12.5	80.6%~110.5%	82.1%~109.7%	78.0%~91.1%	11.4	12.3	6.6
氟尼缩松	2.50	72.4%~110.2%	72.0%~86.7%	73.2%~83.2%	17.3	6.4	4.7
	6.25	70.4%~84.8%	74.0%~81.5%	75.9%~80.5%	7.3	3.7	2.3
	12.5	70.1%~88.8%	73.5%~93.5%	71.4%~82.5%	9.1	11.5	5.4
地索奈德	2.50	70.7%~81.7%	71.6%~106.1%	70.4%~72.3%	5.8	18.1	1.0
	6.25	74.4%~80.8%	80.0%~99.2%	75.2%~89.3%	3.1	8.6	6.5
	12.5	70.1%~81.5%	76.1%~112.1%	79.3%~80.5%	5.9	16.0	0.7
睾酮	2.50	83.1%~90.3%	70.7%~81.6%	72.3%~79.8%	3.3	5.9	3.9
	6.25	82.0%~86.8%	78.0%~83.2%	85.6%~94.2%	2.4	2.4	3.4
	12.5	83.9%~88.7%	77.2%~83.9%	79.6%~94.2%	2.3	4.0	5.8
美雄酮	2.50	84.7%~91.5%	84.7%~91.5%	86.9%~98.7%	3.0	13.2	5.2
	6.25	81.5%~84.3%	81.5%~84.3%	98.3%~108.5%	1.2	4.5	3.2
	12.5	80.6%~87.2%	80.6%~87.2%	88.5%~99.3%	2.7	5.9	5.2
孕三烯酮	2.50	93.5%~107.3%	82.0%~98.8%	76.3%~79.8%	5.6	9.2	1.6
	6.25	92.4%~94.8%	83.6%~90.7%	87.3%~108.0%	0.9	3.5	8.0
	12.5	91.9%~93.5%	80.9%~89.4%	77.2%~90.3%	1.0	3.9	5.2
炔诺孕酮	2.50	85.1%~102.0%	73.6%~89.3%	72.8%~89.6%	7.3	6.3	8.1
	6.25	84.7%~89.2%	74.0%~81.1%	71.9%~88.0%	2.1	3.2	7.8
	12.5	84.6%~91.1%	76.4%~80.6%	75.6%~80.3%	2.8	2.0	2.2
醋酸氯地孕酮	2.50	72.2%~95.1%	77.1%~90.2%	74.3%~85.4%	9.8	5.8	4.5
	6.25	82.3%~90.4%	74.0%~79.5%	70.5%~94.3%	3.7	2.7	9.5
	12.5	78.2%~83.1%	71.2%~75.8%	70.8%~80.2%	2.6	2.5	5.3
醋酸甲地孕酮	2.50	82.5%~95.5%	70.4%~83.9%	74.3%~79.8%	5.9	5.8	2.3
	6.25	86.8%~90.8%	75.2%~83.9%	70.3%~85.4%	1.5	4.4	6.5
	12.5	88.6%~93.5%	77.2%~82.3%	77.4%~91.7%	2.2	2.9	8.1
醋酸甲羟孕酮	2.50	81.5%~94.3%	72.6%~78.0%	72.7%~80.1%	5.9	2.7	3.7
	6.25	80.0%~87.0%	73.2%~76.0%	70.8%~78.5%	3.3	1.5	4.4
	12.5	83.1%~89.5%	73.0%~76.3%	72.3%~80.2%	2.4	1.5	4.2
孕酮	2.50	78.7%~115.3%	100.8%~114.9%	74.1%~95.9%	17.0	4.7	8.9
	6.25	75.4%~84.0%	73.1%~81.2%	85.4%~101.7%	4.1	4.1	6.7
	12.5	82.1%~91.1%	70.7%~79.0%	74.9%~95.2%	4.4	5.7	9.4
己酸羟孕酮	2.50	71.1%~77.0%	70.7%~79.4%	74.6%~79.9%	2.9	4.7	2.9
	6.25	71.5%~76.3%	70.0%~71.5%	70.4%~78.4%	2.5	0.9	4.0
	12.5	70.4%~71.3%	70.5%~77.8%	70.8%~72.0%	0.4	3.9	0.6

附 录 D
(资料性)

13 种类固醇激素类药物的检出限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

表D. 1给出了13种类固醇激素类药物的检出限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

表D. 1 13 种类固醇激素类药物的检出限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

化合物	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)
异氟泼尼松	0.3	1
卤米松	0.3	1
氟尼缩松	0.3	1
地索奈德	0.3	1
睾酮	0.2	0.75
美雄酮	0.2	0.75
孕三烯酮	0.1	0.4
炔诺孕酮	0.3	1
醋酸氯地孕酮	0.3	1
醋酸甲地孕酮	0.2	0.75
醋酸甲羟孕酮	0.2	0.75
孕酮	0.2	0.75
己酸羟孕酮	0.3	1

中华人民共和国团体标准

水牛乳中类固醇激素类药物多残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

T/GXAS 679—2024

广西标准化协会统一印制

版权专有 侵权必究