



中华人民共和国国家标准

GB/T 20760—2006

牛肌肉、肝、肾中的 α -群勃龙、 β -群勃龙残 留量的测定 液相色谱-紫外检测法和 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of α -trenbolone, β -trenbolone
residues in bovine muscle, liver and kidney—
LC-UV method and 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
中国国家标准化管理委员会 发布

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国家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、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、郭春海、王凤池、艾连峰。

本标准系首次发布的国家标准。

牛肌肉、肝、肾中的 α -群勃龙、 β -群勃龙残留量的测定

液相色谱-紫外检测法和液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肌肉、肝、肾中 α -群勃龙、 β -群勃龙残留量的液相色谱-紫外检测法和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肌肉、肝、肾中 α -群勃龙、 β -群勃龙残留量的测定。

本标准的方法检出限： α -群勃龙、 β -群勃龙的液相色谱-紫外检测法和液相色谱-串联质谱法的检出限均为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。

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

试样在 $\text{pH}=5.0$ 条件下加酶水解，用乙酸乙酯提取群勃龙残留，经凝胶色谱净化仪（GPC）和硅胶柱净化，用配有紫外检测器的液相色谱仪或用液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇：色谱纯。
- 4.2 乙酸：色谱纯。
- 4.3 乙腈：色谱纯。
- 4.4 乙酸乙酯。
- 4.5 环己烷。
- 4.6 丙酮。
- 4.7 正己烷。
- 4.8 β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸酯（ β -glucuronidase and aryl sulfatase）：100 000 unit/mL。
- 4.9 乙酸乙酯+环己烷：50+50。
- 4.10 丙酮+正己烷：10+90。
- 4.11 丙酮+正己烷：30+70。
- 4.12 乙酸钠缓冲液：0.02 mol/L, $\text{pH}=5.0$ 。称取无水乙酸钠 0.82 g 溶于 500 mL 水中，用乙酸调节 $\text{pH}=5.0$ 。

4.13 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.14 标准储备溶液:分别精确称取 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质(4.13)各0.010 0 g,用乙腈(4.3)溶解并定容至100 mL,配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。此溶液 -18°C 冷冻保存,可使用六个月。

4.15 混合标准工作溶液:取标准储备溶液(4.14)各5 mL至50 mL容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成混合标准工作溶液,浓度为10 $\mu\text{g/mL}$,此溶液 -18°C 冷冻保存,可使用三个月。

4.16 硅胶固相萃取柱:500 mg,3 mL;使用前用5 mL丙酮+正己烷(4.10)预处理,保持柱体湿润。

4.17 0.45 μm 滤膜。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱仪配有紫外检测器。

5.2 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.3 凝胶色谱仪。

5.4 均质器。

5.5 旋转蒸发器。

5.6 旋涡混合器。

5.7 离心机:最大转速5 000 r/min。

5.8 氮气浓缩仪。

5.9 恒温水浴摇床。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

牛肌肉、肝、肾组织用组织捣碎机绞碎,分出0.5 kg作为试样备用。

6.2 试样保存

制备好的试样置于 -18°C 冰柜中避光保存。

7 测定步骤

7.1 混合基质标准校准溶液的制备

7.1.1 试样的称取

称取5个阴性样品,每个样品为5 g(精确到0.01 g),置于50 mL具塞离心管中,再分别加入不同量混合标准工作溶液(4.15),使各被测组分的浓度均为2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

7.1.2 提取

向上述盛有5个阴性样品的50 mL具塞离心管中,加入5 mL乙酸钠缓冲液(4.12)和20 μL β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸酯(4.8),摇匀后盖好塞子置于恒温水浴摇床(5.9)上, 37°C 振荡水解过夜(≥ 5 h)。待水解液冷却至室温后,加入20 mL乙酸乙酯,在均质器(5.4)上以10 000 r/min的速度均质提取1 min后,3 000 r/min离心(5.7)10 min,将上清液过滤至鸡心瓶中。再用20 mL乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液于同一鸡心瓶中。

7.1.3 净化

7.1.3.1 凝胶色谱仪(GPC)条件

a) 净化柱:22 g S-X3 Bio-Beads 填料,200目~400目,200 mm \times 25 mm(内径)或相当者;

b) 流动相:乙酸乙酯+环己烷(50+50),流速5.0 mL/min;

- c) 定量环:5 mL;
- d) 净化程序:0 min~10.5 min 弃去洗脱液,10.5 min~15.5 min 收集洗脱液,15.5 min~18 min 弃去洗脱液。

7.1.3.2 GPC 及硅胶固相萃取净化

将提取液在 45℃ 下蒸至近干,用乙酸乙酯+环己烷(4.9)定容至 10 mL 的玻璃试管中,按 7.1.3.1 中 GPC 条件净化。净化后将收集的洗脱液蒸干,用 3 mL 丙酮+正己烷(4.10)旋涡振荡(5.6)溶解残渣,将溶液转移到预洗过的硅胶固相萃取柱(4.16)上的贮液器中,然后再用 3 mL 丙酮+正己烷(10+90)溶解一次,将合并的溶解液过硅胶固相萃取柱,接着用 3 mL 丙酮+正己烷(10+90)淋洗硅胶柱,最后用 5 mL 丙酮+正己烷(4.11)洗脱分析物并收集。洗脱液用氮气浓缩仪(5.8)在 60℃ 水浴中吹干,用 1 mL 流动相旋涡振荡溶解,过 0.45 μm 滤膜(4.17)供液相色谱-紫外检测和液相色谱-串联质谱测定。

7.2 试样溶液的制备

称取待测样品 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 带塞离心管中,按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 带塞离心管中,按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.4 液相色谱法测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: Diamonsil C_{18} , 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm (内径)或相当者;
- b) 流动相: 0.1% 乙酸水溶液-乙腈-甲醇(50+20+30);
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 检测波长: 345 nm;
- e) 柱温: 40℃;
- f) 进样量: 50 μL 。

7.4.2 色谱测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准校准溶液进样,以峰面积为纵坐标,基质混合校准溶液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, β -群勃龙、 α -群勃龙的保留时间分别约为 11.2 min 和 13.4 min。标准物质的液相色谱图参见图 A.1。本方法的添加回收率数据参见表 B.1。

7.5 液相色谱-串联质谱法测定

7.5.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: Inertsil C_{18} , 5 μm , 150 mm \times 2.1 mm (内径)或相当者;
- b) 流动相: 0.1% 乙酸水溶液+乙腈(62+38);
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 色谱柱温度: 35℃;
- e) 进样量: 20 μL 。

7.5.2 质谱条件

- a) 离子源 ESI, 正模式;
- b) 雾化喷嘴压力: 0.24 MPa;
- c) 干燥气流量: 9.0 L/min;
- d) 干燥气温度: 350℃;
- e) 毛细管电压、去集簇电压、碰撞电压等电压值应优化至最优灵敏度;
- f) 检测离子对见表 1。

表 1 被测物的保留时间、母离子和子离子

被测物名称	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	
β-群勃龙	6.5	271	253 ^a	199
α-群勃龙	7.2	271	253 ^a	199
^a 定量离子。				

7.5.3 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间,与基质混合标准校准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质混合标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差 %

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

7.5.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质混合标准校准溶液进样,以峰面积为纵坐标,基质混合校准溶液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。上述色谱和质谱条件下,标准选择离子流图参见图 A. 2。

本方法的添加回收率数据参见表 B. 1。

7.6 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.7 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液,得到相应浓度的混合标准溶液。用空白基质溶液(7.3)稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液,按 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

试样中被测组分残留量利用数据处理系统计算或按式(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(μg/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(ng/mL);
- V —— 样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 样品溶液所代表最终试样的质量,单位为克(g)。

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*,被测物的含量范围及重复性方程见表 3。

表 3 两种群勃龙的含量范围及重复性和再现性方程

被测物名称	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
β -群勃龙	2~40	$\lg r=0.437\ 6\ \lg m-0.712\ 2$	$\lg R=0.643\ 0\ \lg m-0.526\ 7$
α -群勃龙	2~40	$\lg r=0.499\ 0\ \lg m-0.754\ 3$	$\lg R=0.825\ 3\ \lg m-0.720\ 7$
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 ,被测物的含量范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)
标准物质液相色谱图

A.1 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质的色谱图, 见图 A.1。

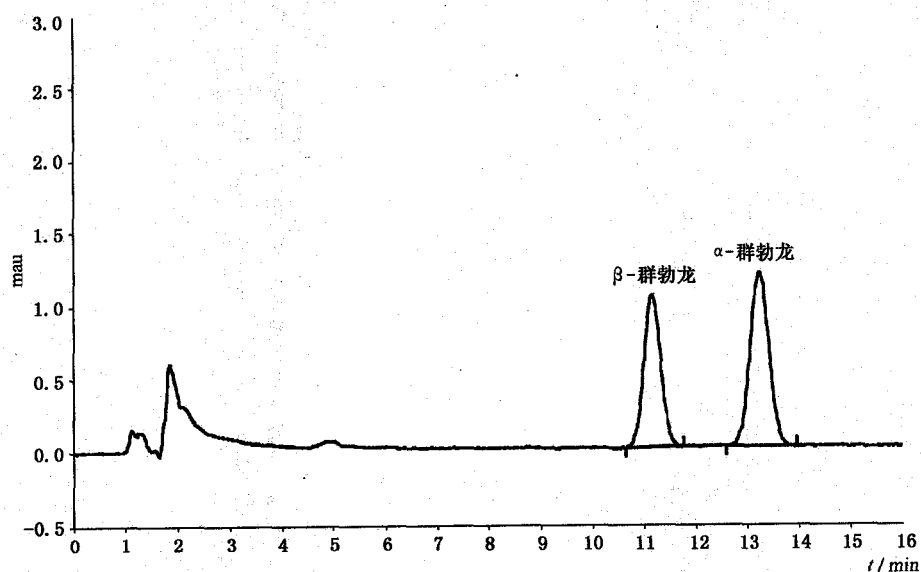


图 A.1 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质的色谱图

A.2 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质的选择离子 LC-MS-MS 图, 见图 A.2。

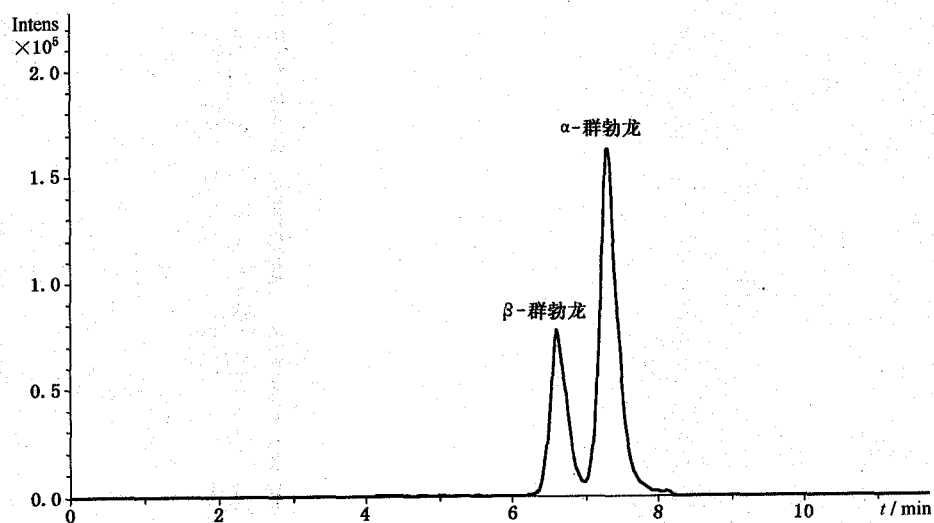


图 A.2 α -群勃龙、 β -群勃龙标准物质的选择离子 LC-MS-MS 图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

群勃龙的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 群勃龙的添加浓度及其平均回收率的试验数据($n=10$)

被测物名称	添加水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均回收率/(%)		
		牛 肉	牛 肝	牛 肾
β -群勃龙	2	80.7	79.5	80.8
	5	82.1	84.0	83.2
	10	81.3	80.3	80.3
α -群勃龙	2	78.5	81.0	82.7
	5	82.4	81.2	81.5
	10	83.2	80.3	80.8