



中华人民共和国国家标准

GB 31658.14—2021

食品安全国家标准 动物性食品中 α -群勃龙和 β -群勃龙 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of α -trenbolone, β -trenbolone residues in animal
derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2021-09-16 发布

2022-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

国家市场监督管理总局

前 言

本文件按照 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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中 α -群勃龙和 β -群勃龙残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中 α -群勃龙和 β -群勃龙残留量测定的制样和液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织及兔肉、鸡蛋、牛奶和羊奶中 α -群勃龙和 β -群勃龙残留量的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的 α -群勃龙和 β -群勃龙在弱酸性条件下酶解，用叔丁基甲醚提取，正己烷除脂，HLB 和氨基固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。
- 5.1.3 叔丁基甲醚($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$)。
- 5.1.4 正己烷(C_6H_{14})。
- 5.1.5 冰乙酸(CH_3COOH)。
- 5.1.6 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 含量(NH_3)约 25%。
- 5.1.7 乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)。
- 5.1.8 丙酮($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)。
- 5.1.9 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶: $>100\ 000\ \text{U/mL}$ 。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.04 mol/L 乙酸钠溶液: 取乙酸钠 3.28 g, 用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 5.2.2 80% 甲醇水溶液: 取甲醇 80 mL, 用水稀释至 100 mL。
- 5.2.3 10% 甲醇水溶液: 取甲醇 10 mL, 用水稀释至 100 mL。
- 5.2.4 2% 氨水溶液: 取氨水 8 mL, 用水稀释至 100 mL。
- 5.2.5 甲醇-2% 氨水溶液(5:95): 取甲醇 5 mL, 加 2% 氨水(5.2.4)95 mL, 混匀。

5.2.6 甲醇-2%氨水溶液(40:60):取甲醇40 mL,加2%氨水(5.2.4)60 mL,混匀。

5.2.7 丙酮-甲醇溶液(80:20):取丙酮80 mL,加甲醇20 mL,混匀。

5.3 标准品

5.3.1 α -群勃龙(17α -Trenbolone, $C_{18}H_{22}O_2$, CAS号:80657-17-6):含量 $\geq 98.5\%$ 。

5.3.2 β -群勃龙(17β -Trenbolone, $C_{18}H_{22}O_2$, CAS号:10161-33-8):含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取 α -群勃龙、 β -群勃龙标准品各约10 mg,精密称定,用甲醇适量使溶解并稀释定容至10 mL容量瓶,配制成浓度均为1 mg/mL的 α -群勃龙、 β -群勃龙标准储备液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期6个月。

5.4.2 混合标准中间液:准确量取 α -群勃龙、 β -群勃龙标准储备液各1 mL,于10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期3个月。

5.4.3 混合标准工作液:分别精密量取混合标准中间液适量,用甲醇稀释,配制成浓度分别为20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL和1 000 ng/mL的混合标准工作液。现配现用。

5.5 材料

5.5.1 HLB固相萃取柱¹⁾:200 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 氨基固相萃取柱:500 mg/6 mL,或相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量0.000 01 g和感量0.01 g。

6.3 pH计。

6.4 离心机:转速可达5 000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

6.6 恒温摇床。

6.7 水平振荡器。

6.8 固相萃取装置。

6.9 氮吹仪。

6.10 尼龙微孔滤膜:0.22 μm 。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

7.1.1 肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.1.2 奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试奶,混合均匀。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

1) 此处列出HLB固相萃取柱仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的固相萃取柱。

7.1.3 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋,去壳,并使均质。

- a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;
- b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;
- c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 酶解

取试料 5 g(准确至±0.02 g),置 50 mL 离心管,加 0.04 mol/L 乙酸钠溶液 10 mL,涡旋混合,用冰乙酸调 pH 至 4.3~4.8。加 β-葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶 20 μL,涡旋混合,于恒温水浴摇床,37℃振荡 14 h 以上。

8.2 提取

酶解液冷却至室温,加叔丁基甲醚 10 mL(牛奶、羊奶试料先加入乙腈 5 mL),涡旋混合,振荡 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上层液于另一离心管中。下层液用叔丁基甲醚 10 mL 重复提取一次,合并 2 次上层液,于 50℃水浴氮气吹干。加入 80%甲醇水溶液 4 mL,超声 2 min,溶解残余物。加正己烷 5 mL(脂肪试料加 10 mL),振荡 5 min,5 000 r/min 离心 10 min,弃上层正己烷。再加入正己烷 5 mL(脂肪试料加 10 mL)重复上述操作。取下层水相,50℃水浴氮气吹至约 0.5 mL,加入 10%甲醇水溶液 3 mL,超声 5 min,溶解残余物备用。

8.3 净化

HLB 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化,取备用液过柱,依次用甲醇-2%氨水溶液(5:95) 3 mL、甲醇-2%氨水溶液(40:60)3 mL 和水 3 mL 淋洗,抽干。取用丙酮-甲醇溶液(80:20)5 mL 活化的氨基固相萃取柱串接在 HLB 固相萃取柱下方,用丙酮-甲醇(80:20)5 mL 洗脱,收集洗脱液,于 50℃水浴氮气吹干。用 80%甲醇溶液 1.0 mL 溶解残余物,超声 5 min,涡旋 1 min,过 0.22 μm 尼龙微孔滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.4 基质添加标准曲线的制备

准确量取混合标准工作液适量,分别加入 6 份空白试料中,添加浓度分别为 0.4 μg/kg、1 μg/kg、2 μg/kg、4 μg/kg、10 μg/kg 和 20 μg/kg,充分混匀。按酶解、提取和净化步骤操作,制成浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的系列基质添加标准溶液,供液相色谱-串联质谱仪测定。以定量离子对质量色谱峰面积为纵坐标、相对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.5 测定

8.5.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),或相当者;
- b) 流动相:A 为水,B 为乙腈;
- c) 梯度洗脱:洗脱条件见表 1;
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 柱温:40℃;
- f) 进样量:5 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	70	30

表 1 (续)

时间 min	A %	B %
3.0	10	90
4.0	10	90
4.1	70	30
5.0	70	30

8.5.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 电离电压:3.0 kV;
- e) 离子源温度:150 °C;
- f) 雾化温度:500 °C;
- g) 锥孔气流速:150 L/h;
- h) 雾化气流速:1 000 L/h;
- i) 药物保留时间、定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 α-群勃龙、β-群勃龙保留时间、定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 min	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
α-群勃龙	2.18	271.2>199.1	271.2>199.1	50	23
		271.2>253.2			20
β-群勃龙	2.07	271.2>199.1	271.2>199.1	50	23
		271.2>253.2			20

8.6 测定法

8.6.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中 α-群勃龙和 β-群勃龙色谱峰的保留时间与基质添加标准溶液中相应峰的保留时间相对偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质添加标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

8.6.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质添加标准溶液,作单点或多点校准,按外标法以特征离子质量色谱峰面积定量,基质添加标准溶液及试料溶液中的 α-群勃龙和 β-群勃龙响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,基质添加标准溶液中 α-群勃龙和 β-群勃龙特征离子质量色谱图见附录 A。

8.7 空白试验

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算与表述

试料中 α-群勃龙或 β-群勃龙残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

X ——供试试料中相应的 α -群勃龙或 β -群勃龙残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_s ——基质匹配标准溶液中相应 α -群勃龙或 β -群勃龙浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_s ——基质匹配标准溶液中相应 α -群勃龙或 β -群勃龙峰面积;

A ——供试试料溶液中 α -群勃龙或 β -群勃龙峰面积;

V ——溶解残余物所用溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——供试试料质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在肝脏中的检测限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$;在肌肉、肾脏、脂肪、鸡蛋和奶中的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在肝脏 $2 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平的回收率为 $60\% \sim 120\%$,在肌肉、肾脏、脂肪、鸡蛋和奶 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

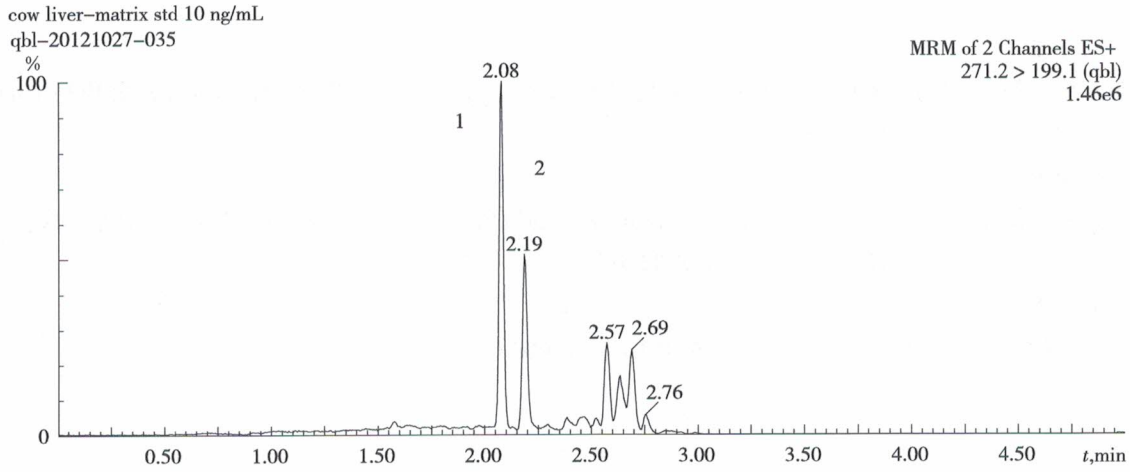
10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 20\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性)

牛肝基质添加标准溶液特征离子质量色谱图

牛肝基质添加标准溶液特征离子质量色谱图 A.1。



标引序号说明：
1——β-群勃龙；
2——α-群勃龙。

图 A.1 牛肝基质添加标准溶液特征离子质量色谱图(10 ng/mL)

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准
动物性食品中 α -群勃龙和 β -群勃龙残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

GB 31658.14—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

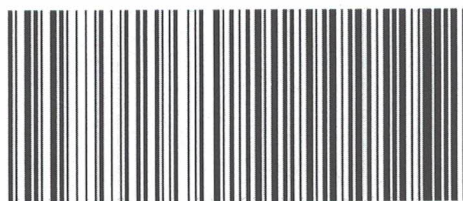
2022年1月第1版 2022年1月北京第1次印刷

书号: 16109·8765

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31658.14—2021