



中华人民共和国国家标准

GB/T 22973—2008

牛奶和奶粉中醋酸美仑孕酮、 醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of melengestrol acetate, chlormadinone acetate and megestrol
acetate residues in milk and milk powder—
HPLC-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
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准负责起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王传现、唐毅锋、方晓明、盛永刚、庞国芳。

牛奶和奶粉中醋酸美仑孕酮、 醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中醋酸美仑孕酮(melengestrol acetate)、醋酸氯地孕酮(chlormadinone acetate)和醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮残留量的测定。

本标准的方法检出限:牛奶中醋酸美仑孕酮、醋酸甲地孕酮和醋酸氯地孕酮检测限均为 $2\ \mu\text{g}/\text{kg}$;奶粉中醋酸美仑孕酮、醋酸甲地孕酮和醋酸氯地孕酮的检测限均为 $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

从牛奶样品中提取脂肪后,用乙腈提取,皂化后,经氰丙基型固相萃取柱净化, C_{18} 色谱柱分离,液相色谱-串联质谱检测,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。

- 4.1 水:GB/T 6682,一级。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 甲醇:色谱纯。
- 4.4 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.5 正己烷:色谱纯。
- 4.6 氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.7 氢氧化钠。
- 4.8 甲酸。
- 4.9 25%氨水。
- 4.10 95%乙醇。
- 4.11 石油醚。
- 4.12 无水硫酸钠。

- 4.13 乙酸乙酯+正己烷(1+19):量取 10 mL 乙酸乙酯(4.4)与 190 mL 正己烷(4.5)混合。
- 4.14 乙酸乙酯+正己烷(1+4):量取 40 mL 乙酸乙酯(4.4)与 160 mL 正己烷(4.5)混合。
- 4.15 1.0 mol/L 氯化镁溶液:称取 20.3 g 氯化镁(4.6),用水溶解并定容到 100 mL。
- 4.16 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 1.00 g 氢氧化钠(4.7),用水溶解并定容到 250 mL。
- 4.17 乙腈+水(7+3):量取 700 mL 乙腈(4.2)与 300 mL 水混合,摇匀。
- 4.18 标准物质:醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮,纯度 $\geq 97\%$ 。
- 4.19 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备溶液:准确称取醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准物质(4.18)各 0.050 0 g 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇(4.3)溶解并定容至刻度。标准储备溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 4.20 100 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液 I。分别吸取 10.0 mL 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准储备液(4.19)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容。该混合标准溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 4.21 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液 II。取 1.0 mL 混合标准溶液 I(4.20)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容。该混合标准溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 4.22 基质混合标准工作溶液:根据需要,取适量的混合标准溶液 II(4.21),用空白样品提取液配成不同浓度的基质混合标准溶液。标准工作溶液现用现配。
- 4.23 氰丙基固相萃取柱或相当者:3 mL/500 mg。使用前分别用 5 mL 乙酸乙酯和 6 mL 正己烷淋洗,保持柱体湿润。
- 4.24 滤膜:0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 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 氮气浓缩仪。
- 5.4 固相萃取装置:配有真空泵。
- 5.5 低温离心机:—5 $^{\circ}\text{C}$ 至室温,最大转速 5 000 r/min。
- 5.6 液体混匀器。
- 5.7 恒温水浴。
- 5.8 微波炉。
- 5.9 移液器:10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

取样品 500 g 搅拌混匀,装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

6.2 试样的保存

如果制备好的试样不立刻测定,则将测试样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 中保存。

7 测定步骤

7.1 样品称量

7.1.1 牛奶样品

称取 10 g(精确到 0.01 g)牛奶样品,置于 50 mL 具塞聚丙烯离心管中。

7.1.2 奶粉样品

称取 1 g 样品(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞聚丙烯离心管中,然后加入 8 倍质量的水溶解后混匀。

7.2 样品提取

加 1.0 mL 氨水(4.9),混匀。加入 10 mL 95%乙醇(4.10),混匀后加入 10 mL 乙酸乙酯(4.4),振荡 1 min,再加入 10 mL 石油醚(4.11),同样振荡 1 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上层提取液通

过装有 15 g 无水硫酸钠的玻璃柱过滤到 50 mL 具塞聚丙烯离心管中。再用 8 mL 乙酸乙酯(4.4)和 8 mL 石油醚(4.11)重复提取残液一次,以 4 000 r/min 离心 5 min,提取液过相同的无水硫酸钠的玻璃柱,用 5 mL 乙酸乙酯淋洗无水硫酸钠柱后,合并提取液,提取液于 60 ℃用氮气浓缩仪吹干。

加入 5 mL 乙腈,于 60 ℃水浴中保持 3 min,使脂肪融化。涡旋 1 min,于-5 ℃以 4 000 r/min 离心 7 min,吸取上清液至 15 mL 具塞聚丙烯离心管中,再向沉淀物中加入 5 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液。向合并的乙腈提取液中加入 2 mL 正己烷(4.5),涡旋 1 min,于-5 ℃以 4 000 r/min 离心 5 min,弃去正己烷层,再用 2 mL 正己烷重复洗涤乙腈相,弃去正己烷层。乙腈提取液于 60 ℃用氮气浓缩仪吹干。

7.3 皂化

向乙腈提取液(7.2)中依次加入 4 mL 正己烷(4.5)、1 mL 氢氧化钠溶液(4.16)和 0.5 mL 氯化镁溶液(4.15),于液体混匀器上快速混匀 10 s,在 60 ℃水浴中保持 15 min,于-5 ℃以 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至 15 mL 离心管中。向沉淀物中再加入 4 mL 正己烷,混匀,于 60 ℃水浴中加热 15 min 后,于-5 ℃以 4 000 r/min 离心 5 min,合并上清液。于 60 ℃用氮气浓缩仪吹干,用 1.0 mL 正己烷溶解残渣,待净化。

7.4 净化

将上述样液(7.3)移入氰丙基固相萃取柱中(4.23),用 2 mL 正己烷分两次润洗玻璃试管,洗液也移入固相萃取柱中。待样液流出后,依次用 5 mL 正己烷和 6 mL 乙酸乙酯+正己烷溶液(1+19)(4.13)淋洗固相萃取柱,淋洗液流出后,固相萃取柱抽干 2 min,最后用 3.5 mL 乙酸乙酯+正己烷溶液(1+4)(4.14)洗脱,洗脱液收集于另一 15 mL 离心管中,于 60 ℃用氮气浓缩仪吹干。残余物用 1 mL 乙腈+水(7+3)(4.17)涡旋溶解,过滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

7.5 测定条件

7.5.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,3 μ m,50 mm $\times$ 2.0 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:30 ℃;
- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 进样量:10 μ L;
- e) 梯度洗脱,洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	0.1%甲酸水溶液/%	乙腈含 0.1%甲酸/%
0	90	10
1.0	20	80
7.0	20	80
8.0	90	10

7.5.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源:正离子电喷雾;
- b) 扫描方式:多反应检测 MRM;
- c) 电喷雾电压:4 000 V;
- d) 离子源温度:350 ℃;
- e) 雾化气、气帘气、辅助气:均为高纯氮气,使用前调节各气流流量,以使质谱仪灵敏度达到检测要求;
- f) 定性离子对,定量离子对,去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对,定量离子对,去簇电压和碰撞能量

化合物名称	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
醋酸美仑孕酮	397/337	397/337	120	5
	397/279		120	28
醋酸氯地孕酮	405/345	405/345	80	6
	405/309		80	13
醋酸甲地孕酮	385/325	385/325	130	6
	385/267		130	16

7.5.3 液相色谱-串联质谱测定

7.5.3.1 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混合基质标准溶液中对对应物质的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品谱图中各定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标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 3 规定的范围,则可判断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

%

相对离子丰度 <i>K</i>	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> <50	10< <i>K</i> <20	<i>K</i> ≤10
允许相对偏差	±20	±25	±30	±50

7.5.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,用混合基质标准校准溶液分别进样,以峰面积为纵坐标,以混合基质标准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,醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准物质的多反应检测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1、图 A.2 和图 A.3。

本方法的添加回收率数据参见附录 B 中的表 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 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮残留量的测定按式(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——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(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 ,牛奶中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度范围及重复性方程见表 4,奶粉中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度范围及重复性方程见表 5。

表 4 牛奶中三种孕酮的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
醋酸美仑孕酮	0.002~0.020	$\lg r=0.757\ 6\ \lg m-0.952\ 7$	$\lg R=0.972\ 5\ \lg m-0.518\ 7$
醋酸氯地孕酮	0.002~0.020	$\lg r=0.886\ 8\ \lg m-0.908\ 4$	$\lg R=0.931\ 4\ \lg m-0.494\ 2$
醋酸甲地孕酮	0.002~0.020	$\lg r=0.871\ 8\ \lg m-0.905\ 9$	$\lg R=0.896\ 4\ \lg m-0.497\ 6$
注: m 为两次测定值的平均值。			

表 5 奶粉中三种孕酮的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
醋酸美仑孕酮	0.020~0.200	$\lg r=0.933\ 6\ \lg m-0.972\ 4$	$\lg R=0.987\ 6\ \lg m-0.546\ 0$
醋酸氯地孕酮	0.020~0.200	$\lg r=0.681\ 4\ \lg m-0.446\ 1$	$\lg R=0.916\ 6\ \lg m-0.423\ 5$
醋酸甲地孕酮	0.020~0.200	$\lg r=0.987\ 6\ \lg m-0.979\ 8$	$\lg R=0.963\ 6\ \lg m-0.552\ 5$
注: m 为两次测定值的平均值。			

如果两次测定值的差值超过重复性限 r ,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 ,牛奶中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度范围及再现性方程见表 4,奶粉中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度范围及再现性方程见表 5。

附录 A
(资料性附录)

标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

醋酸美仑孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

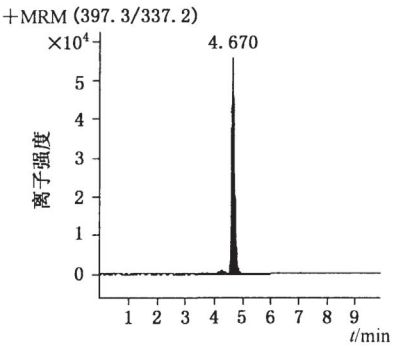


图 A.1 醋酸美仑孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

醋酸氯地孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.2。

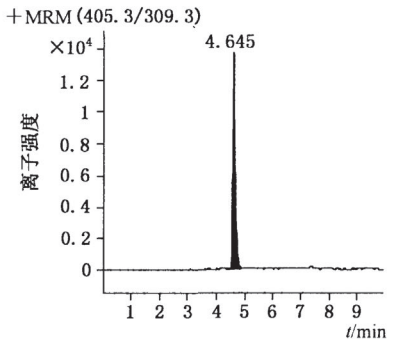


图 A.2 醋酸氯地孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

醋酸甲地孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.3。

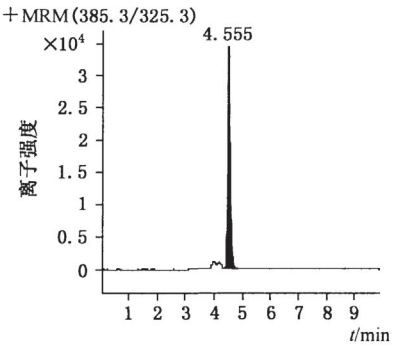


图 A.3 醋酸甲地孕酮标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮添加浓度及其平均回收率的试验数据

样品基质	化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%
牛奶	醋酸美仑孕酮	2.0	86.7
		4.0	89.6
		10	90.2
		20	89.7
	醋酸氯地孕酮	2.0	86.5
		4.0	87.8
		10	91.0
		20	90.8
	醋酸甲地孕酮	2.0	86.9
		4.0	87.1
		10	89.3
		20	89.7
奶粉	醋酸美仑孕酮	20	88.3
		40	89.7
		100	90.3
		200	90.3
	醋酸氯地孕酮	20	88.7
		40	87.8
		100	90.3
		200	89.9
	醋酸甲地孕酮	20	87.2
		40	87.6
		100	90.1
		200	91.3