



中华人民共和国国家标准

GB xxxxx—xxxx

食品安全国家标准 动物性食品及尿液中同化激素类药物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-

Determination of anabolic androgenic steroids in animal derived
foods and urine by Liquid chromatography - tandem mass
spectrometry

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx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
国家市场监督管理总局

发布

GB ×××××—××××

GB××××—××××

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

动物性食品及尿液中同化激素类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品组织及动物尿液中18种同化激素（群勃龙、诺龙、勃地酮、雄烯二酮、睾酮、雄烯醇酮、美雄酮、甲睾酮、甲氢睾酮、左炔诺孕酮、孕酮、康力龙、丙酸诺龙、氟甲睾酮、达那唑、丙酸睾酮、醋酸甲羟孕酮和苯丙酸诺龙）残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、羊、牛、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）、鸡蛋、牛奶、羊奶、奶粉及动物（猪、牛、羊）尿液中18种同化激素类药物残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

动物源性食品用叔丁基甲醚提取，酸性氧化铝净化，液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

动物尿液酶解后，上清液经固相萃取柱净化后，液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

5 试剂和材料

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

5.1 试剂

5.1.1 叔丁基甲醚（C₅H₁₂O）。

5.1.2 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。

5.1.3 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

5.1.4 甲酸 (CH₂O₂)：色谱纯。

5.1.5 酸性氧化铝 (100~200目)。

5.1.6 碳酸钠 (Na₂CO₃)。

5.1.7 盐酸。

5.1.8 氢氧化钠 (NaOH)。

5.1.9 β-盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶：100000 unit/mL。

5.2 对照品

群勃龙、诺龙、勃地酮、雄烯二酮、睾酮、雄烯醇酮、美雄酮、甲睾酮、甲氢睾酮、左炔诺孕酮、孕酮、康力龙、丙酸诺龙、氟甲睾酮、达那唑、丙酸睾酮、醋酸甲羟孕酮、苯丙酸诺龙对照品：纯度≥95.0%，见附录 A。

D₃-甲睾酮、D₉-孕酮、D₃-睾酮标准品：纯度≥90.0%。

5.3 溶液配制

5.3.1 10%碳酸钠溶液：称取 10 g 碳酸钠，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。

5.3.2 盐酸溶液 (2.0 mol/L)：取盐酸 18 mL，加水至 100 mL，混匀。

5.3.3 氢氧化钠溶液 (2.0 mol/L)：取氢氧化钠 80 g，加水溶解并稀释至 1000 mL，混匀。

5.3.4 40%甲醇溶液：取甲醇 40 mL，加水至 100 mL，混匀。

5.3.5 50%酸化乙腈溶液：取乙腈 500 mL，加甲酸 2 mL，混匀后，加水至 1000 mL，混匀。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液 (1.0 mg/mL)：准确称取 18 种激素类药物对照品约 10 mg，精确至 0.01 mg，分别置不同 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，分别配制成 1.0 mg/mL 标准储备液。-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 内标储备液 (1.0 mg/mL)：准确称取 3 种氘代内标对照品约 10 mg，精确至 0.01 mg，分别置不同 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，分别配制成 1.0 mg/mL 的激素类药物标准及内标储备液。-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准中间液 (1.0 μg/mL)：分别吸取 18 种激素类药物的标准储备液适量，置同一 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，混匀，使之成 1.0 μg/mL 的混合标准中间液。4℃避光保存，有效期 3 个月。

5.4.4 混合内标中间液（1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：分别吸取的3种内标储备液适量，置同一100 mL棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，混匀，使之成1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合内标中间液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期3个月。

5.4.5 混合标准曲线工作溶液：分别吸取适量的混合标准中间液及混合内标中间液，用50%乙腈溶液稀释成浓度为3.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、25.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和500.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准工作溶液，临用新配。

5.5 材料

5.5.1 C_{18} 固相萃取柱：十八烷基硅胶填料，500 mg，6 mL；或性能相当的萃取柱。

5.5.2 针头式过滤器通用型滤膜：尼龙材质，孔径0.22 μm 或性能相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱串联质谱仪：配有电喷雾电离源。

6.2 分析天平：感量0.01 g和0.000 01 g。

6.3 离心机：最高转速不低于10000 r/min。

6.4 固相萃取装置。

6.5 旋涡振荡器。

6.6 涡旋混合器。

6.7 氮吹仪。

6.8 酸度计。

6.9 隔水式培养箱。

6.10 匀浆机。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

7.1.1 动物组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织绞碎，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.2 鸡蛋

取适量新鲜的供试鸡蛋，去壳，并使均质。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.3 生鲜乳

取适量新鲜或冷藏的空白或供试生鲜乳，混合均匀。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.4 奶粉

取适量的空白或供试奶粉，混合均匀。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.1.5 动物尿液

取适量新鲜或冷藏的空白或供试动物尿液，混合均匀。如有混浊，离心后取上清液。

——取备用试样，作为供试试样。

——取空白试样，作为空白试样。

——取空白试样，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试料的保存

-18℃以下保存，3个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 动物性食品试料（动物组织、鸡蛋、生鲜乳、奶粉）

称取试料（ 5 ± 0.05 ）g，置50 mL离心管中，加入20 μ L混合内标中间液，加入叔丁基甲醚15 mL，涡旋混匀30 s，加入10%碳酸钠溶液3 mL，振荡提取10 min，5000 r/min离心10 min，将上清液转移至另一50 mL离心管中。残渣用叔丁基甲醚15 mL重复提取一次，合并上清液，

备用。

8.1.2 动物尿液试料

移取试样（ 5 ± 0.05 ）mL，置于50 mL离心管中，加入20 μ L混合内标中间液，用盐酸溶液（2.0 mol/L）或氢氧化钠溶液（2.0 mol/L）调节pH值至7.0左右，加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶50 μ L，37.0 $^{\circ}$ C酶解16 h，取出冷却至室温后，10000 r/min离心5 min，取上清液，备用。

8.2 净化

8.2.1 动物性食品试料（动物组织、鸡蛋、生鲜乳、奶粉）

取全部上清液，于40 $^{\circ}$ C水浴条件下，氮气吹干。用50%酸化乙腈溶液1.0 mL溶解残余物，加入酸性氧化铝0.2 g，涡旋混匀后，10000 r/min离心5 min。取上清液，经0.22 μ m滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

8.2.2 动物尿液试料

C₁₈固相萃取柱依次用甲醇5 mL和水5 mL活化，取全部上清液过柱，控制流速在1.0 mL/min以下，用40%甲醇溶液5 mL淋洗，挤干。用8 mL甲醇洗脱，收集全部洗脱液，挤干。于40 $^{\circ}$ C水浴条件下，氮气吹干，用50%酸化乙腈溶液1.0 mL溶解残余物，涡旋混匀后，用0.22 μ m滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取混合标准中间液适量，用50%酸化乙腈溶液稀释成浓度为3.0 μ g/L、5.0 μ g/L、25.0 μ g/L、50.0 μ g/L、100.0 μ g/L和500.0 μ g/L的系列混合标准液，上机测定。以定量离子对峰面积为纵坐标，标样浓度与内标浓度比值为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱： C₁₈色谱柱（150 mm \times 2.1 mm，3.5 μ m）或相当者；
- b) 流动相： A: 0.2%甲酸溶液， B: 乙腈，梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速： 0.3 mL/min；

d) 柱温: 30 °C;

f) 进样量: 10 μ L;

表1 流动相梯度洗脱条件

| 时间 min | A % | B % |
|-----------|--------|--------|
| 0.0 | 60 | 40 |
| 5.0 | 5 | 95 |
| 10.0 | 5 | 95 |
| 10.1 | 60 | 40 |
| 20.0 | 60 | 40 |

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子模式;
- c) 检测方式: 多反应离子监测;
- d) 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气
- e) 去簇电压、碰撞室入口电压、碰撞能量、碰撞室出口电压应优化至最佳灵敏度;
- f) 定性离子对、定量离子对、对应的去簇电压及碰撞能量参考值见表2。

表2 18种同化激素和3种氘代内标的质谱参数

| 名称 | 定性离子对 m/z | 定量离子对 m/z | 去簇电压 V | 碰撞能量 eV |
|--------|--------------|--------------|-----------|------------|
| 康力龙 | 329.2/81.0 | 329.2/81.0 | 121 | 85 |
| | 329.2/121.1 | | | 50 |
| 睾酮 | 289.2/97.1 | 289.2/97.1 | 121 | 27 |
| | 289.2/109.1 | | | 33 |
| 雄烯二酮 | 287.3/97.1 | 287.3/97.1 | 85 | 30 |
| | 287.3/109.1 | | | 30 |
| 甲睾酮 | 303.1/109.0 | 303.1/109.0 | 100 | 39 |
| | 303.1/97.1 | | | 39 |
| 苯丙酸诺龙 | 407.3/105.1 | 407.3/105.1 | 125 | 53 |
| | 407.3/257.2 | | | 24 |
| 醋酸甲羟孕酮 | 387.1/327.3 | 387.1/327.3 | 95 | 25 |
| | 387.1/285.4 | | | 25 |
| 丙酸睾酮 | 345.2/97.1 | 345.2/97.1 | 106 | 31 |
| | 345.2/109.1 | | | 44 |
| 勃地酮 | 287.1/121.1 | 287.1/121.1 | 90 | 27 |
| | 287.1/135.2 | | | 27 |
| 左炔诺孕酮 | 313.3/109.1 | 313.3/109.1 | 80 | 40 |

| | | | | |
|---------------------|-------------|-------------|-----|----|
| | 313.3/245.2 | | | 22 |
| 甲氢睾酮 | 305.2/269.3 | 305.2/269.3 | 100 | 20 |
| | 305.2/173.2 | | | 35 |
| 群勃龙 | 271.2/199.2 | 271.2/199.2 | 84 | 32 |
| | 271.2/253.2 | | | 28 |
| 诺龙 | 275.2/109.1 | 275.2/109.1 | 98 | 36 |
| | 275.2/257.2 | | | 24 |
| 丙酸诺龙 | 331.2/109.1 | 331.2/109.1 | 123 | 35 |
| | 331.2/145.2 | | | 32 |
| 雄烯醇酮 | 291.1/255.3 | 291.1/255.3 | 80 | 20 |
| | 291.1/273.2 | | | 14 |
| 达那唑 | 338.3/91.0 | 338.3/91.0 | 100 | 80 |
| | 338.3/310.3 | | | 27 |
| 孕酮 | 315.3/97.0 | 315.3/97.0 | 86 | 29 |
| | 315.3/109.0 | | | 31 |
| 美雄酮 | 301.3/121.1 | 301.3/121.1 | 90 | 35 |
| | 301.3/283.4 | | | 35 |
| 氟甲睾酮 | 337.3/241.4 | 337.3/241.4 | 80 | 30 |
| | 337.3/131.3 | | | 40 |
| D ₃ -甲睾酮 | 306.1/109.0 | 306.1/109.0 | 100 | 39 |
| D ₉ -孕酮 | 324.4/100.1 | 324.4/100.1 | 80 | 28 |
| D ₃ -睾酮 | 292.2/97.1 | 292.2/97.1 | 121 | 27 |

8.4.3 测定法

a) 定性测定

通过试样色谱图的保留时间与相应标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准溶液各色谱峰的特征离子相对照定性, 试样中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值与标准溶液中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内, 且样品中各组分的离子相对丰度与浓度接近的标准溶液的相对丰度一致, 其允许偏差为 $\pm 40\%$, 则可判定为样品中存在对应的待测物。

b) 定量测定

取标准工作溶液与试样溶液交替进样，采用内标法定量（康力龙、睾酮、勃地酮、群勃龙、诺龙、美雄酮和氟甲睾酮用D₃-睾酮校准；雄烯二酮、甲睾酮、左炔诺孕酮和雄烯醇酮用D₃-甲睾酮校准；苯丙酸诺龙、醋酸甲羟孕酮、丙酸睾酮、甲氢睾酮、丙酸诺龙、达那唑和孕酮用D₉-孕酮校准）。内标法定量试样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-质谱条件下，鸡蛋添加样品多反应监测色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用完全相同的操作步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中目标药物的残留量（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 $\mu\text{g}/\text{L}$ ）按标准曲线或公式（1）下式计算。

$$X_i = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times m} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X_i ——供试试样中目标药物残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）或微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）。

C_s ——标准工作溶液中目标药物浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）。

C_{is} ——试样溶液中相应同位素内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）。

A_i ——试样溶液中目标药物峰面积。

A_{is} ——试样溶液中相应同位素内标峰面积。

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）。

C'_{is} ——标准工作溶液中相应同位素内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）。

A_s ——标准工作溶液中目标药物峰面积。

A'_{is} ——标准工作溶液中相应同位素内标峰面积。

m ——供试试样的质量，单位为克（g）或毫升（mL）。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，含量不小于 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 的保留 3 位有效数字， $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下保留至小数点后 2 位。

10 检测方法灵敏度、准确度与精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、羊、牛、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）、鸡蛋、牛奶、羊奶、奶粉及动物尿液（猪、牛、羊）中 18 种同化激素的检出限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ （ $\mu\text{g}/\text{L}$ ），定量限为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$

($\mu\text{g/L}$)。

10.2 准确度

本方法在猪、羊、牛、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）、鸡蛋、牛奶、羊奶、奶粉及动物尿液（猪、牛、羊）中，18种同化激素在 $1.0\ \mu\text{g/kg}$ ($\mu\text{g/L}$)、 $2.0\ \mu\text{g/kg}$ ($\mu\text{g/L}$)、 $10.0\ \mu\text{g/kg}$ ($\mu\text{g/L}$)三个添加水平上的回收率在60%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录A

(资料性)

18种同化激素类药物的英文名称、CAS号

18种同化激素类药物的英文名称、分子式和CAS号见表A.1。

表A.1 同化激素类药物的英文名称、CAS号

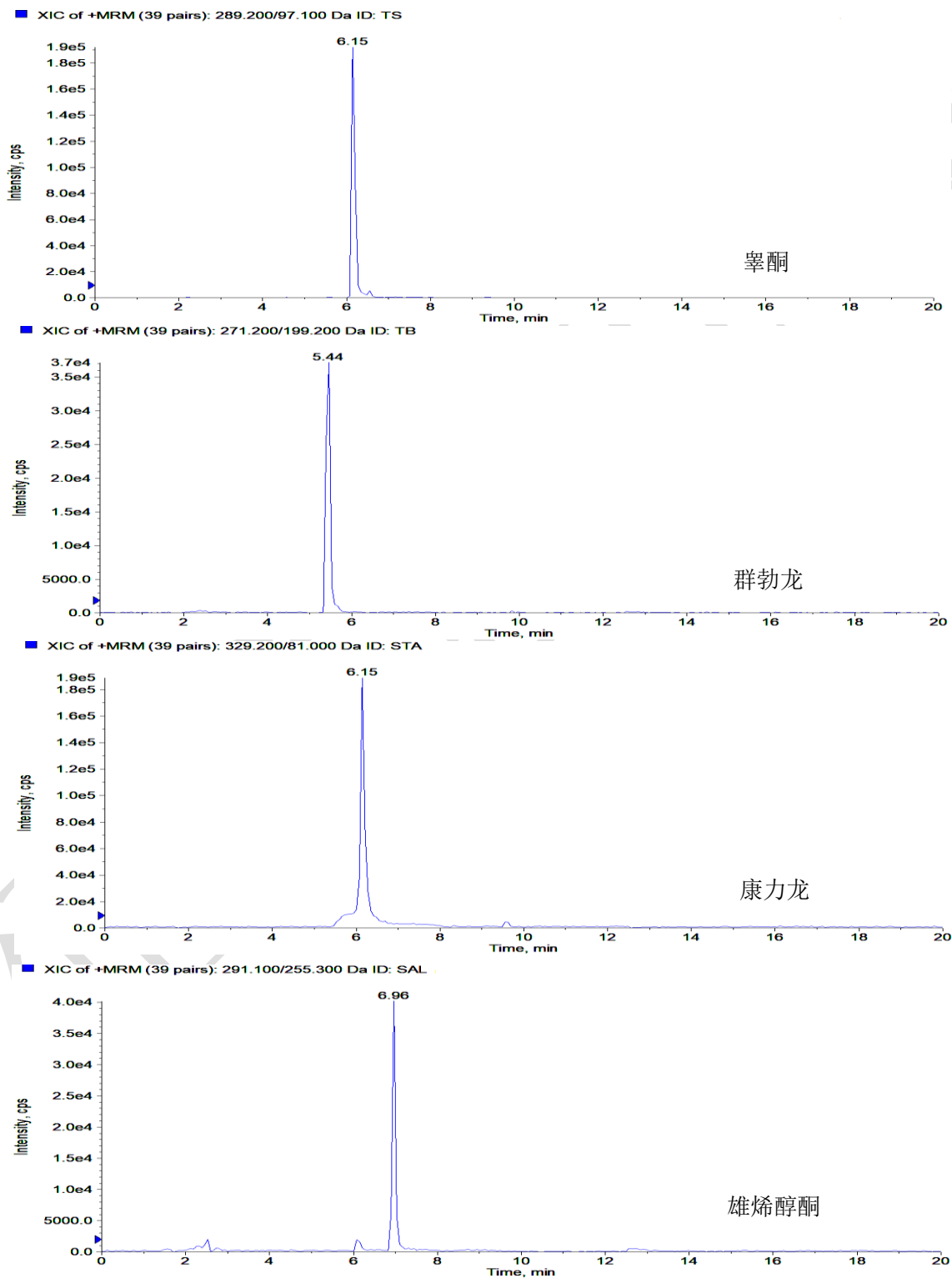
| 序号 | 药物名称 | 英文名称 | 分子式 | 分子量 | CAS号 |
|----|--------|--------------------------------|--|--------|------------|
| 1 | 甲氢睾酮 | Mesterolone | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 304.47 | 1424-00-6 |
| 2 | 雄烯醇酮 | Stanolone | C ₁₉ H ₃₀ O ₂ | 290.45 | 521-18-6 |
| 3 | 甲睾酮 | 17-Methyltestosterone | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | 302.46 | 58-18-4 |
| 4 | 康力龙 | Stanozolol | C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O | 328.49 | 10418-03-8 |
| 5 | 丙酸睾酮 | Testosterone propionate | C ₂₂ H ₃₂ O ₃ | 344.50 | 57-85-2 |
| 6 | 群勃龙 | Trenbolone | C ₁₈ H ₂₂ O ₂ | 270.37 | 10161-33-8 |
| 7 | 诺龙 | Nandrolone | C ₁₈ H ₂₆ O ₂ | 274.40 | 434-22-0 |
| 8 | 苯丙酸诺龙 | Nandrolone phenylpropionate | C ₂₇ H ₃₄ O ₃ | 406.57 | 62-90-8 |
| 9 | 达那唑 | Danazol | C ₂₂ H ₂₇ NO ₂ | 337.46 | 17230-88-5 |
| 10 | 睾酮 | Testosterone | C ₁₉ H ₂₈ O ₂ | 288.43 | 58-22-0 |
| 11 | 丙酸诺龙 | Nandrolone 17-propionate | C ₂₁ H ₃₀ O ₃ | 330.46 | 7207-92-3 |
| 12 | 雄烯二酮 | Androstenedione | C ₁₉ H ₂₆ O ₂ | 286.41 | 63-05-8 |
| 13 | 左炔诺孕酮 | Levonorgestrel | C ₂₁ H ₂₈ O ₂ | 312.45 | 797-63-7 |
| 14 | 孕酮 | Progesterone | C ₂₁ H ₃₀ O ₂ | 314.46 | 57-83-0 |
| 15 | 醋酸甲羟孕酮 | Medroxyprogesterone 17-acetate | C ₂₄ H ₃₄ O ₄ | 386.52 | 71-58-9 |
| 16 | 勃地酮 | Boldenone | C ₁₉ H ₂₆ O ₂ | 286.41 | 846-48-0 |
| 17 | 美雄酮 | Metandienone | C ₂₀ H ₂₈ O ₂ | 300.44 | 72-63-9 |
| 18 | 氟甲睾酮 | Fluoxymesterone | C ₂₀ H ₂₉ FO ₃ | 336.44 | 76-43-7 |

附录 B

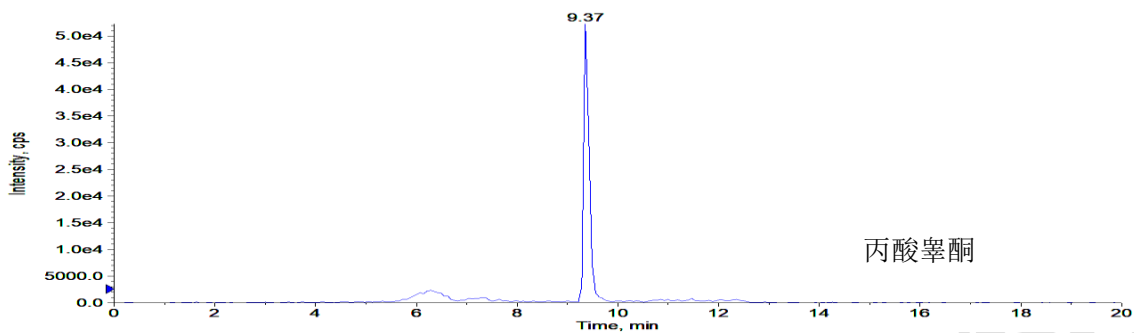
(资料性)

鸡蛋添加样品液相色谱串联质谱多反应监测 (MRM) 色谱图

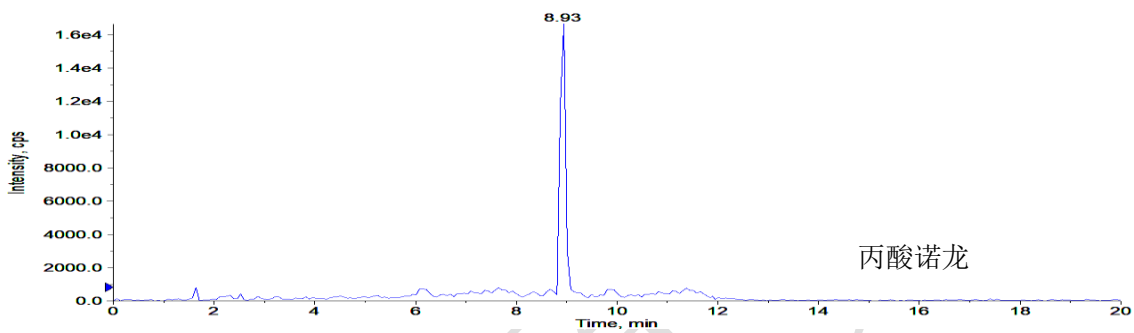
鸡蛋添加样品液相色谱串联质谱多反应监测 (MRM) 色谱图见表 B. 1。



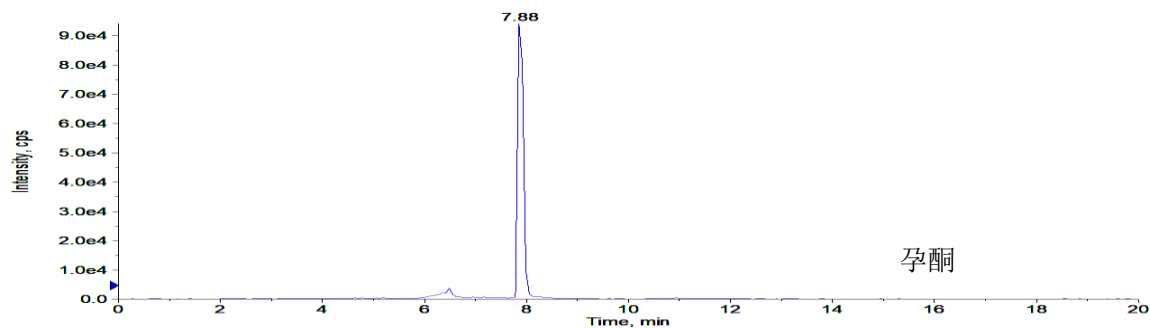
■ XIC of +MRM (39 pairs): 345.200/97.100 Da ID: PTG



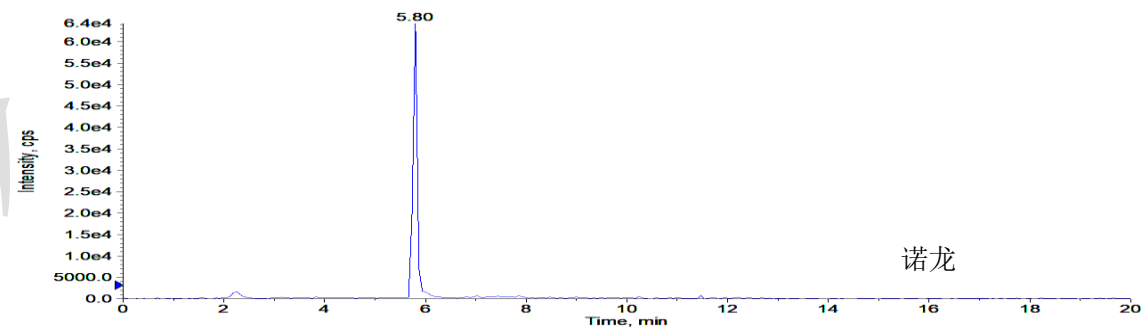
■ XIC of +MRM (39 pairs): 331.200/109.100 Da ID: PPNT



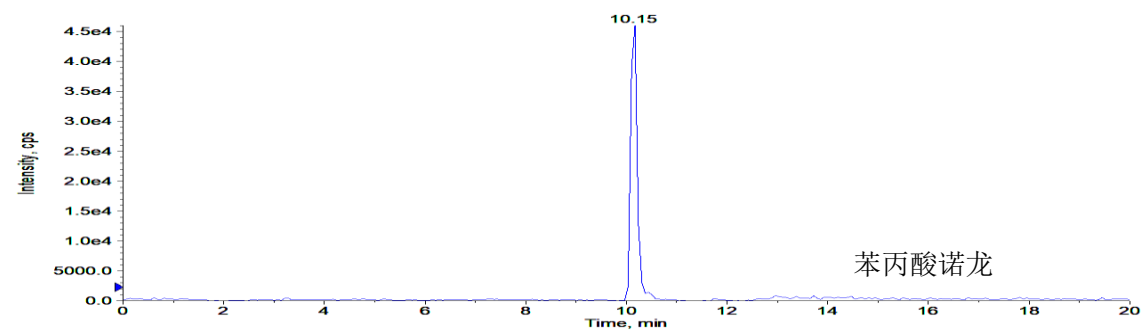
■ XIC of +MRM (39 pairs): 315.300/97.000 Da ID: PE



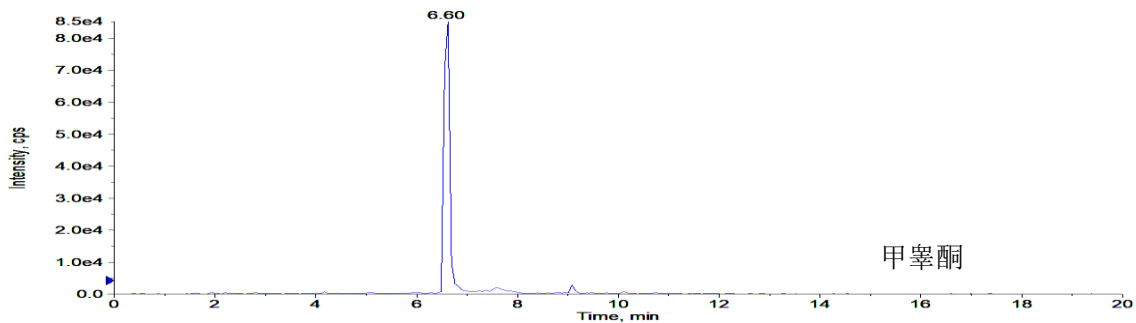
■ XIC of +MRM (39 pairs): 275.200/109.100 Da ID: NT



■ XIC of +MRM (39 pairs): 407.300/105.100 Da ID: NAP

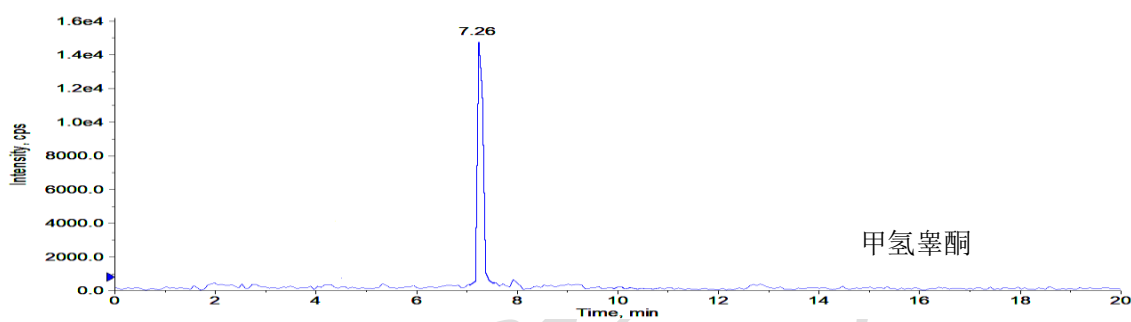


■ XIC of +MRM (39 pairs): 303.100/109.000 Da ID: MTS



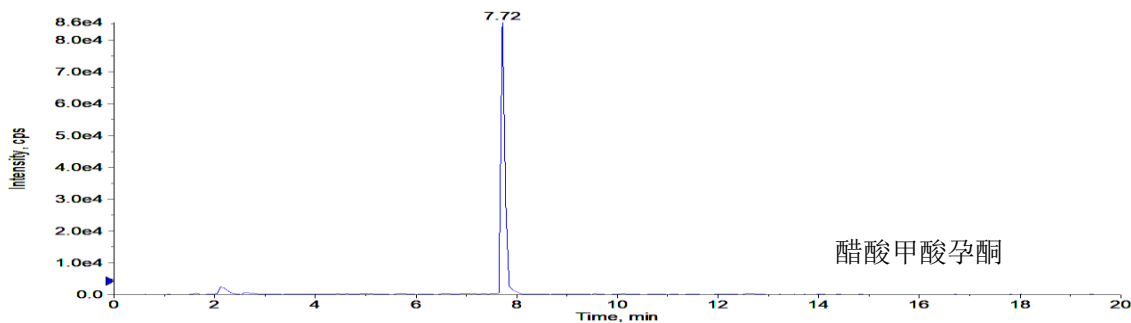
甲睾酮

■ XIC of +MRM (39 pairs): 305.200/269.300 Da ID: MST



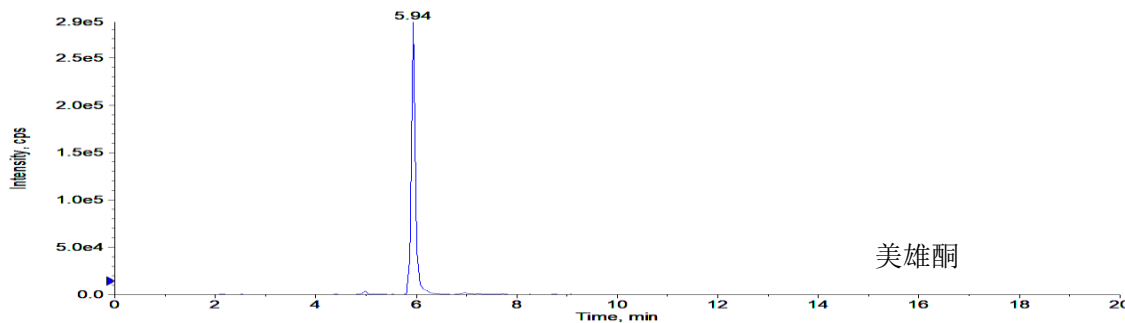
甲氢睾酮

■ XIC of +MRM (39 pairs): 387.100/327.300 Da ID: MPA



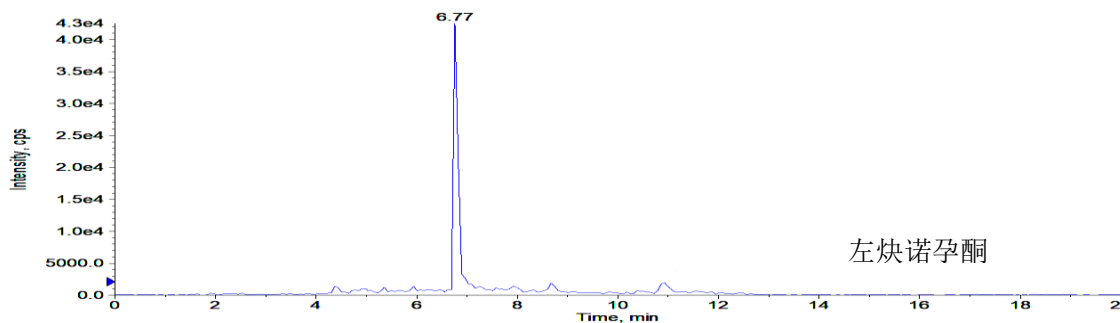
醋酸甲酸孕酮

■ XIC of +MRM (39 pairs): 301.300/121.100 Da ID: MD



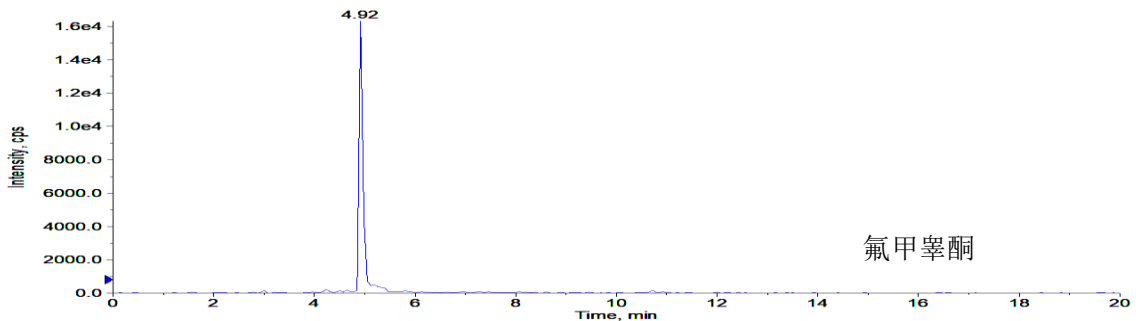
美雄酮

■ XIC of +MRM (39 pairs): 313.300/109.100 Da ID: LNG

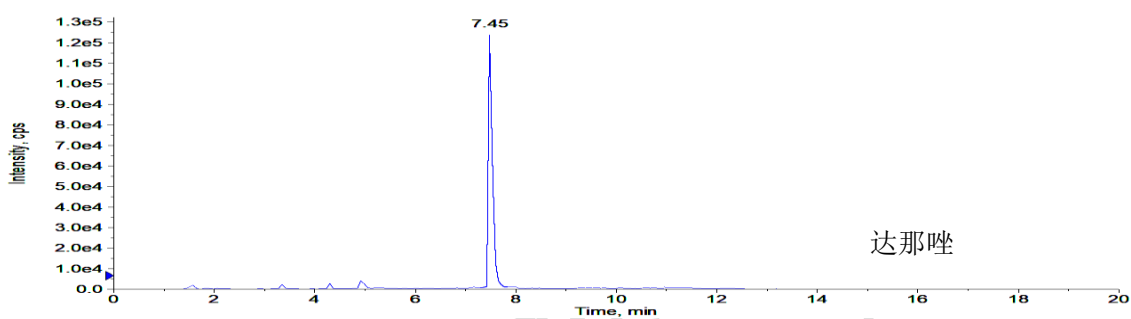


左炔诺孕酮

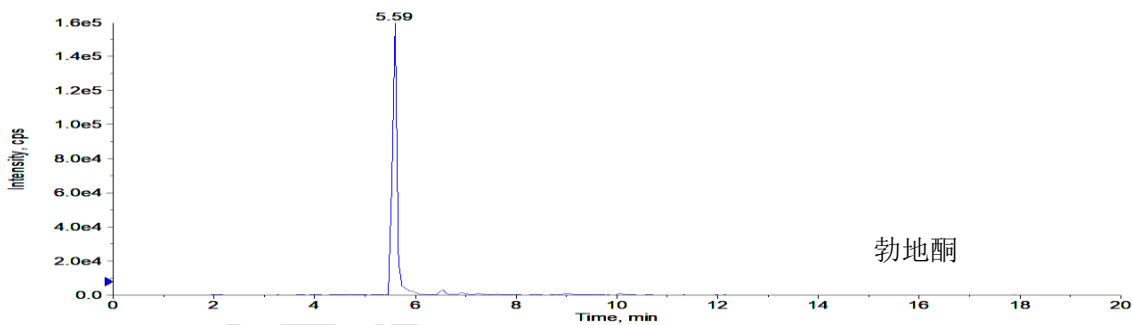
■ XIC of +MRM (39 pairs): 337.300/241.400 Da ID: FT



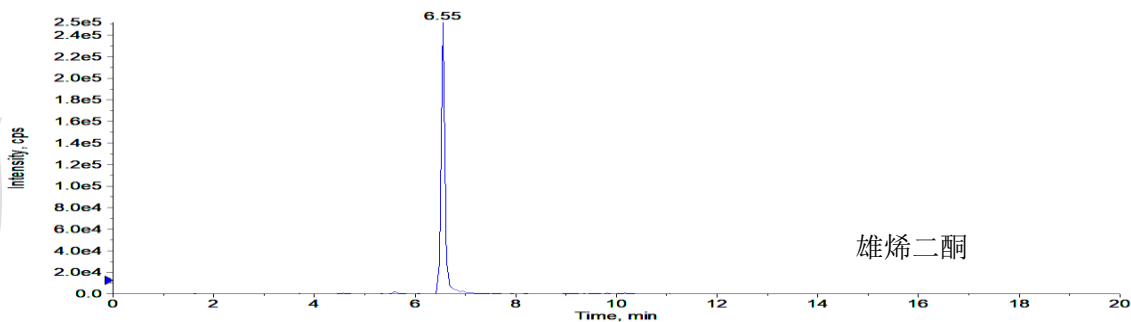
■ XIC of +MRM (39 pairs): 338.300/91.000 Da ID: DAN



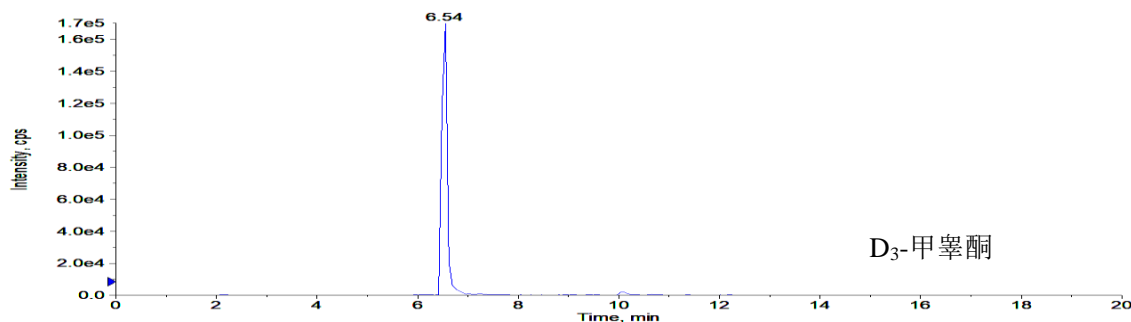
■ XIC of +MRM (39 pairs): 287.100/121.100 Da ID: BD



■ XIC of +MRM (39 pairs): 287.300/97.100 Da ID: AD



■ XIC of +MRM (39 pairs): 306.100/109.000 Da ID: D3-MTS



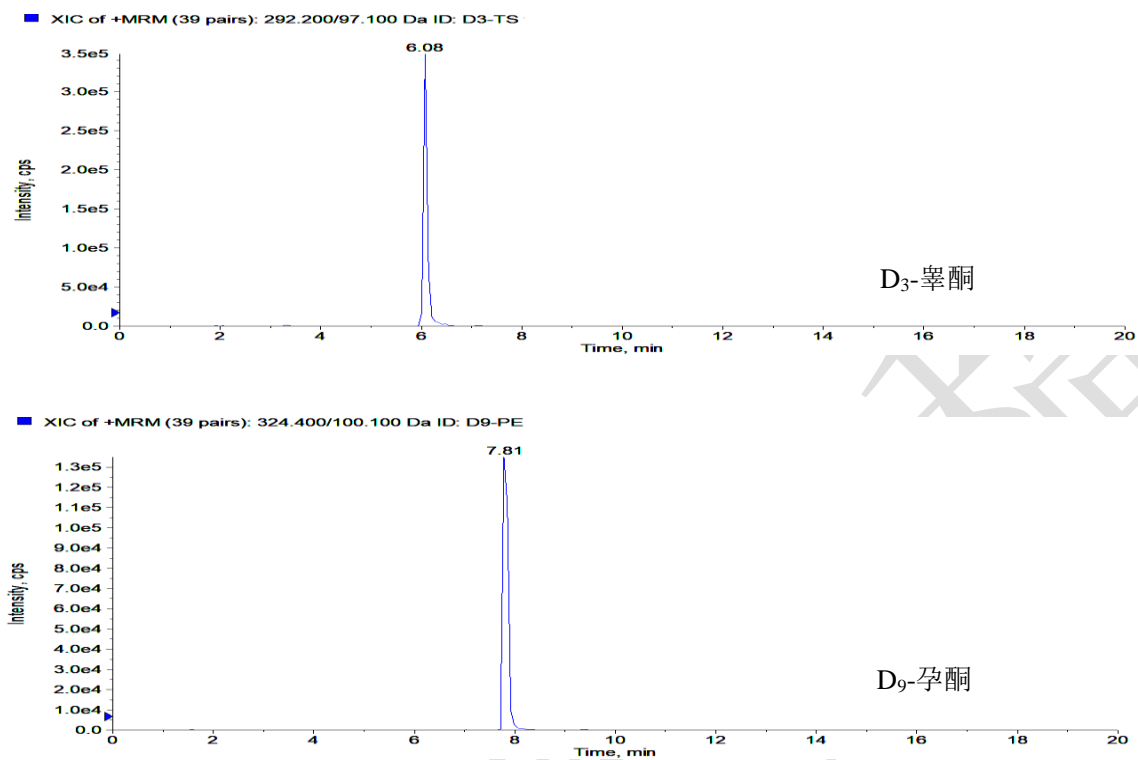


图 B.1 鸡蛋添加样品MRM色谱图 (添加浓度1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)