



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 动物性食品中美替诺龙残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of metenolone residues in animal derived foods
by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

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

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。

本文件代替SN/T 5169-2019《出口动物源食品中美替诺龙的测定 液相色谱-质谱/质谱法》。

本文件与SN/T 5169-2019相比，主要变化如下：

- 修改文本格式为食品安全国家标准文本格式；
- 增加了范围中的检测组织；
- 修改了测定步骤和仪器参考条件；
- 修改了的待测物的检出限和定量限。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- SN/T 5169-2019。

食品安全国家标准

动物性食品中美替诺龙残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中美替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、牛、羊、鸡、鸭的肌肉，鱼、虾可食组织，禽蛋和牛奶中美替诺龙残留量的测定。

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

GB/T 30891 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的美替诺龙残留，经 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶酶解后用氨水乙腈提取，亲水亲脂平衡固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.1.4 氯化钠（ NaCl ）。

5.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）。

5.1.6 乙酸（ CH_3COOH ）。

5.1.7 氨水（ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ）：25%~28%。

5.1.8 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ）。

5.1.9 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶：30U/60U/mL。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液：称取乙酸铵 15.4 g，溶解于 950 mL 水中，用乙酸调节 pH 为 5.2，并用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.2 5%氨水乙腈溶液：取氨水 50.0 mL，加乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.3 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1.0 mL，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.4 10%乙腈溶液：取乙腈 10.0 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.2.5 60%甲醇溶液：取甲醇 60mL，加水稀释至 100mL，混匀。

5.3 标准品

美替诺龙、美替诺龙-D₆标准品，含量均≥95.0%，见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取美替诺龙标准物质约 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中，转移至 10 mL 容量瓶中，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液，-18℃以下储存，有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标储备液：取美替诺龙-D₆标准物质约 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液，-18℃以下储存，有效期 6 个月。

5.4.3 标准中间液：精密量取 1.0 mL 美替诺龙标准储备液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成浓度为 10.0 μg/mL 的标准中间溶液，-18℃以下储存，有效期 3 个月。

5.4.4 同位素内标中间液：精密量取 1.0 mL 美替诺龙-D₆标准储备液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成浓度为 10.0 μg/mL 的标准中间溶液，-18℃以下储存，有效期 3 个月。

5.4.5 标准工作液：精密量取 1.0 mL 美替诺龙标准中间液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成美替诺龙浓度为 0.1 μg/mL 的标准中间溶液，现用现配。

5.4.6 同位素内标工作液：精密量取适量同位素内标中间液，用甲醇稀释，配制成 0.1 μg/mL 的内标工作液，现用现配。

5.5 材料

5.5.1 聚苯乙烯二乙烯基苯吡咯烷酮亲水亲脂平衡固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.22 μm 有机系聚尼龙滤膜。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

6.2 电子天平：感量为 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 离心机：9000 r/min 或以上。

6.4 涡旋混合器。

6.5 恒温水浴振荡器。

6.6 组织捣碎机。

6.7 氮气吹干仪。

6.8 旋转蒸发仪。

6.9 pH 计。

6.10 固相萃取装置

6.11 振荡器。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试肌肉组织，绞碎，并使均质。

取新鲜或解冻的空白或供试鱼、虾样品，按 SC/T 3016 的规定制备。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，去壳后混合均匀。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶，混合均匀。

a) 取均质后的供试样品，作为供试试样；

b) 取均质后的空白样品，作为空白试样；

c) 取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉、禽蛋、鱼和虾可食组织于-18℃以下保存，牛奶试料于0℃~4℃条件下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

准确称取试料（ 5 ± 0.05 ）g，置于50 mL离心管中，加入50 μ L内标工作液，涡旋混匀，加入10 mL乙酸铵缓冲液，加入25 μ L β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶，涡旋混匀，37℃水浴振荡2 h。向离心管中加入15 mL 5%氨水乙腈溶液，涡旋混匀1 min，加入4 g氯化钠，振荡20 min，以9000 r/min，4℃冷冻离心5 min，取上层清液于50 mL离心管中，残渣中再加15 mL 5%氨水乙腈，重复提取，合并上清液。将合并后的提取液经无水硫酸钠（约5 g）滤入100 mL旋转蒸发瓶中，用约10 mL乙腈冲洗离心管及无水硫酸钠2次，并入旋转蒸发瓶内，于40℃水浴中旋转蒸发至近干，用5 mL 10%乙腈水溶液溶解残渣，待净化。

8.2 净化

取固相萃取柱依次以6 mL甲醇和6 mL水预处理。取待净化液过柱，流速控制在约1滴/3s，弃去流出液。用6 mL 60%甲醇水溶液淋洗，抽干，用6 mL甲醇洗脱并收集洗脱液，40℃水浴氮气吹干，用1.0 mL 10%乙腈水溶液溶解，涡旋混匀，过0.22 μ m微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取美替诺龙标准工作液（0.1 μ g/mL）和美替诺龙-D₆内标工作液（0.1 μ g/mL）适量，用10%乙腈水溶液稀释，配制成美替诺龙浓度为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL和美替诺龙-D₆内标均为5 ng/mL的系列标准溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μ m），或性能相当者；
- 流动相：A：水（含 0.1%甲酸），B：乙腈，梯度洗脱条件见表 1；
- 流速：0.4 mL/min；
- 柱温：40℃；
- 进样量：5 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	90	10
1.0	90	10
2.0	50	50
4.0	5	95
4.1	90	10
5.0	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- 电离方式：电喷雾电离，正离子模式；
- 数据采集：多反应监测（MRM），质谱参数参见表 2；

- c) 离子源温度：150℃；
- d) 毛细管电压：3.5kV；
- e) 干燥气温度：500℃（氮气）；
- f) 干燥气流量：800L/h（氮气）；
- g) 碰撞气：氦气。

表2 美替诺龙的母离子及定量定性离子、碰撞能量

药物	定性离子对 m/z	定量离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
美替诺龙	303.1>83.0	303.1>83.0	30	20
	303.1>187.0			16
美替诺龙-D ₆	309.1>87.0	309.1>87.0	30	20

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试样溶液中的美替诺龙与其同位素内标（美替诺龙-D₆）的保留时间之比与标准溶液中美替诺龙与其同位素内标（美替诺龙-D₆）的保留时间之比偏差在1%以内；且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的标准溶液相对离子丰度一致，其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

按8.4.1和8.4.2设定仪器条件，以标准溶液中外内标浓度比为横坐标，以峰面积比为纵坐标，绘制标准工作曲线，作单点或多点校准，按内标法计算试样中药物的残留量，标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均在仪器检测的线性范围内。对于试料中美替诺龙药物残留量超过仪器测定线性范围的，在提取时根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量，使试样溶液稀释后美替诺龙的响应在仪器线性范围内，对应美替诺龙-D₆浓度与标准曲线制备中的美替诺龙-D₆浓度一致。在上述色谱质谱条件下，标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算，

$$\omega = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V \times 1000}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m \times 1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

ω —试样中美替诺龙的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_s —标准工作溶液中美替诺龙的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C_{is} —试样溶液中美替诺龙-D₆的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C'_{is} —标准工作溶液中美替诺龙-D₆的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A —试样溶液中美替诺龙的峰面积；

A'_{is} —标准工作溶液中美替诺龙-D₆的峰面积；

A_{is} —试样溶液中美替诺龙-D₆的峰面积；

A_s —标准工作溶液中美替诺龙的峰面积；

V ——试样测定液定容体积，单位为（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

1000—换算系数。

注：计算结果不小于 $1\mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1\mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉，鱼可食组织、禽蛋、牛奶中美替诺龙的检出限为 $0.2\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.5\mu\text{g/kg}$ ，虾中美替诺龙检出限为 $0.5\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $1.0\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉，鱼可食组织、禽蛋、牛奶在 $0.5\mu\text{g/kg}\sim 5.0\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度上的回收率为60%~120%，虾在 $1.0\mu\text{g/kg}\sim 10\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度上的回收率为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
(规范性)
美替诺龙化合物信息

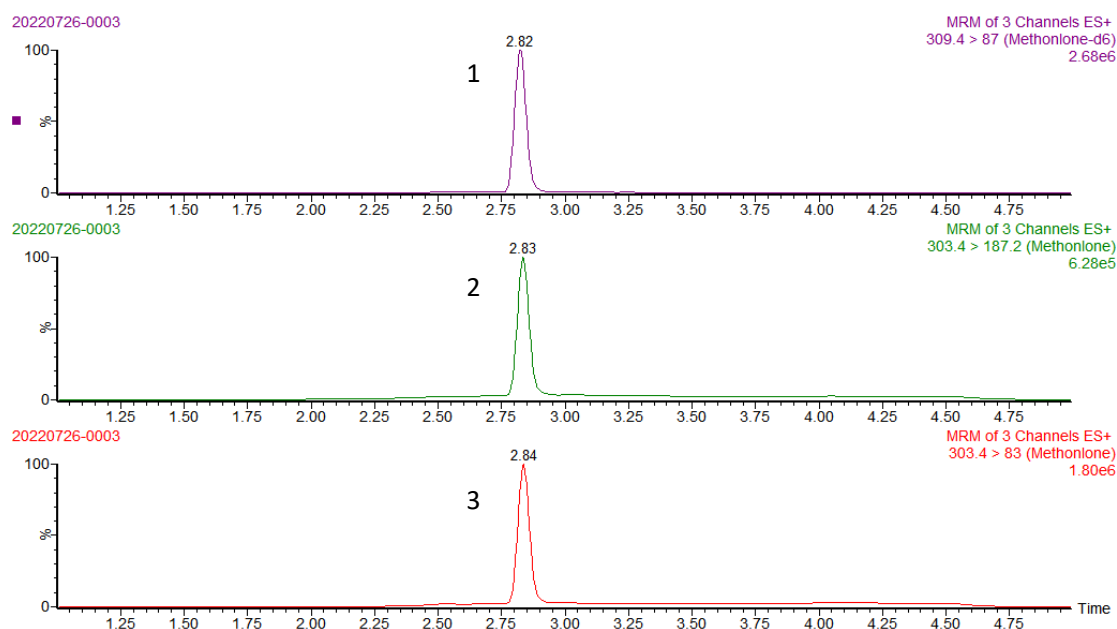
美替诺龙的中英文名称、CAS号、化学分子式及相对分子质量参见表A.1。

表A. 1 美替诺龙标准物质的信息

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	美替诺龙	Metenolone	153-00-4	$C_{20}H_{30}O_2$	302.5
2	美替诺龙-D ₆	Metenolone-D ₆		$C_{20}H_{24}D_6O_2$	308.5

附 录 B
(资料性)
标准物质选择离子质量色谱图

美替诺龙标准物质选择离子质量色谱图参见图B.1。



说明:

- 1.- 美替诺龙-D₆ 309.4>87.0
- 2.- 美替诺龙 303.4>187.2
- 3.- 美替诺龙 303.4>83.0

图 B.1 美替诺龙标准工作液 (2 ng/mL) 和同位素内标工作液 (5 ng/mL) 特征离子色谱图