



中华人民共和国国家标准

GB×××××-××××

代替 GB/T 20741-2006

食品安全国家标准

动物性食品及牛羊奶中地塞米松与 倍他米松残留量的测定 液相色谱- 串联质谱法

National food safety standards-

Determination of dexamethasone and betamethasone residues in
animal-derived foods and bovine and goat milk by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(公开征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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GB/T 20741-2006《畜禽肉中地塞米松与倍他米松残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。与GB/T 20741-2006相比，除结构调整和编辑性改动外，主要变化如下：

- 标准文本格式修改为食品安全国家标准文本格式。
- 标准范围中增加了猪、牛、羊和鸡组织（肝脏和肾脏）及牛羊奶。
- 标准范围中增加了药物种类。
- 更改了提取和净化方法。
- 更改了色谱参考条件。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 20741-2006。

食品安全国家标准

动物性食品及牛羊奶中地塞米松和倍他米松残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了猪、牛、羊和鸡组织（肌肉、肝脏和肾脏）及牛羊奶中地塞米松和倍他米松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、羊和鸡组织（肌肉、肝脏和肾脏）及牛羊奶中地塞米松和倍他米松残留量的检测，其他畜禽产品的检测可以参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中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

试样中药物经酶解后用乙腈提取，提取液进行液-液-液三相体系净化、碳酸钠溶液碱洗净化和硅胶柱固相萃取进行净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配内标法定量。

5 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别注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 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.1.2 正己烷（ C_6H_{14} ）。

5.1.3 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）。

5.1.4 丙酮（ CH_3COCH_3 ）。

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

5.1.6 乙酸 (CH_3COOH)。

5.1.7 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

5.1.8 碳酸钠 (Na_2CO_3)。

5.1.9 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶 (β -glucuronidase/arylsulfatase)： β -葡萄糖醛酸酶 4.5U/mL，芳基硫酸酯酶 14U/mL，或相当者。

5.2 溶液的配制

5.2.1 乙酸铵溶液：取乙酸铵 3.85 g，加水溶解并稀释至约 900 mL，用乙酸调节 pH 至 4.8，加水定容至 1000 mL，混匀。

5.2.2 10% 碳酸钠溶液：取碳酸钠 50 g，加水 450 mL 使其完全溶解。

5.2.3 乙腈-水-甲酸(95: 5: 0.5, v/v/v)：取乙腈 950 mL、水 50 mL 和甲酸 5 mL，混匀。

5.2.4 正己烷丙酮混合溶液：取 300 mL 正己烷、200 mL 丙酮，混匀。

5.3 标准品

地塞米松、倍他米松、地塞米松-D₄ 和倍他米松-D₅，纯度不低于 98%，见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液 (1 mg/mL)：取地塞米松和倍他米松标准品各约 10 mg，精密称定，分别加乙腈适量使溶解并稀释至 10 mL 棕色容量瓶，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标标准储备液 (100 $\mu\text{g/mL}$)：取地塞米松-D₄ 和倍他米松-D₅ 各约 1 mg，精密称定，分别加乙腈适量使溶解并稀释至 10 mL 棕色容量瓶，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的同位素内标标准储备液。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准储备液 (100 $\mu\text{g/mL}$)：分别准确移取标准储备液各 1.0 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中，用乙腈稀释至刻度。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.4 混合内标标准储备液 (50 $\mu\text{g/mL}$)：分别准确移取同位素内标标准储备液各 5.0 mL，于 10 mL 棕色容量瓶中。-18℃ 以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.5 混合标准中间液：准确移取混合标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度。该溶液中各标准品浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。现用现配。

5.4.6 混合内标标准工作液：准确移取混合内标标准储备液 0.1 mL 于 50 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度。该溶液中各内标浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 。现用现配。

5.4.7 混合系列标准工作液：准确移取混合标准工作液、混合内标工作液适量，用流动相稀释成浓度为 0.5、1.0、2.5、10、25 和 50 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液，每一标准工作溶液含各内标浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$ 。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 硅胶固相萃取小柱：500 mg，3mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.22 μm ，有机系。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱串联质谱仪：配电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 匀质器。

6.4 氮吹仪。

6.5 恒温振荡器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 离心管：聚丙烯塑料离心管，50 mL。

6.8 离心机：6000 r/min 或以上。

6.9 pH 计。

6.10 旋涡混合器。

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组织，绞碎，并使均质。

取新鲜或解冻的空白或供试牛奶和羊奶，混合均匀。

——取均质后的供试样品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——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 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试样（ 5 ± 0.05 ）g，于50 mL离心管，准确加入混合内标工作液50 μL ，混合15s，加乙

酸铵溶液10 mL、 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶50 μ L, 涡旋1 min, 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C振荡酶解16 h。酶解后样品以6000 r/min离心2 min, 收集提取液, 然后在残渣中加入乙腈10 mL, 涡旋1 min, 6000 r/min离心2 min, 取上清液, 残渣中再加入乙腈10 mL重复提取, 合并三次提取液。

8.2 净化

提取液中加入正己烷8 mL和乙酸乙酯2 mL, 涡旋1 min, 6000 r/min离心2 min, 取中间乙腈层, 50 $^{\circ}$ C氮吹至干, 用10 mL乙酸乙酯溶解残渣, 移入50 mL离心管中, 加入2 mL10%碳酸钠溶液, 旋涡混合1 min, 以6000 r/min离心2 min, 弃去下层水相, 再加入2 mL10%碳酸钠溶液, 重复上述步骤后将乙酸乙酯移入10 mL试管中, 在50 $^{\circ}$ C水浴中氮吹至干。

加入1 mL 乙酸乙酯和5 mL 正己烷溶解残渣, 转移至已依次用正己烷5 mL、乙酸乙酯5 mL活化并抽干处理后的硅胶柱上, 待溶液过柱后再用正己烷5 mL淋洗, 弃去正己烷淋洗液, 抽干柱子, 用正己烷丙酮混合溶剂6 mL洗脱, 收集洗脱液, 50 $^{\circ}$ C水浴氮吹至干, 准确加入0.50 mL流动相溶解残渣, 涡旋混匀, 0.22 μ m滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试样依次按8.1和8.2处理, 50 $^{\circ}$ C水浴氮吹至干后分别加入1.0 mL混合系列标准工作溶液, 过0.22 μ m滤膜, 得内标浓度均为10 μ g/L的0.5、1.0、2.5、10、25和50 μ g/L的系列基质匹配标准工作溶液, 供液相色谱-串联质谱测定。以定量离子对峰面积与内标物离子对峰面积的比值为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制基质匹配标准曲线。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: 多孔石墨碳色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 5.0 μ m) 或相当者;
- b) 流动相: 乙腈-水-甲酸(95: 5: 0.5, v/v/v), 等度洗脱;
- c) 流速: 0.5 mL/min;
- d) 柱温: 35 $^{\circ}$ C;
- e) 进样量: 10 μ L。

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源。
- b) 扫描方式: 负离子扫描。
- c) 检测方式: 多反应监测(MRM)。
- d) 毛细管电压: 1.5 KV。
- e) RF透镜电压: 0.5 V。
- f) 离子源温度: 150 $^{\circ}$ C。

- g) 脱溶剂气温度：600 ℃。
- h) 锥孔气流速：50 L/h。
- i) 脱溶剂气流速：1000 L/h。
- j) 倍增器电压：650 V。
- k) 二级碰撞气：氦气。
- l) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表1。

表1 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量 (eV)
地塞米松	437.3>307.2 437.3>361.2	437.3>361.2	12	32 18
倍他米松	437.3>307.2 437.3>361.2	437.3>361.2	12	32 18
地塞米松-D ₄	441.3>363.3	441.3>363.3	14	18
倍他米松-D ₅	442.3>364.3	442.3>364.3	14	18

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

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基质匹配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±1.0%之内，且样品中各组分的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准溶液的相对丰度一致，偏差不超过±40%，则可判定为样品中存在对应的待测物。

8.4.3.2 定量测定

取基质匹配标准工作溶液与试样溶液交替进样，每种药物选择对应的同位素内标物进行定量。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，猪肝基质匹配标准溶液多反应监测色谱图见附录B.1。对于试料中药物残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

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

试样中地塞米松和倍他米松的残留量按标准曲线或式（1）计算：

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

式中：

X —试样中地塞米松和倍他米松的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_{is} —试样溶液中地塞米松和倍他米松内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_s —基质匹配标准溶液中地塞米松和倍他米松浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C'_{is} —基质匹配标准溶液中地塞米松和倍他米松内标浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A_i —试样溶液中地塞米松和倍他米松的峰面积；

A_{is} —试样溶液中地塞米松和倍他米松内标的峰面积；

A_s —基质匹配标准溶液中地塞米松和倍他米松的峰面积；

A'_{is} —基质匹配标准溶液中地塞米松和倍他米松内标的峰面积；

V —定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试样的质量，单位为克（ g ）。

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 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛奶和羊奶中的检出限为 $0.05\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.15\mu\text{g/kg}$ ；在猪、牛和羊可食组织（肌肉、肝脏和肾脏）中的检出限为 $0.10\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.25\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在猪、牛和羊的肌肉和肾脏组织中，地塞米松在 $0.25\sim 2.0\mu\text{g/kg}$ （倍他米松在 $0.25\sim 1.5\mu\text{g/kg}$ ）添加浓度范围内，添加回收率为 $60\%\sim 130\%$ 。

本方法在猪、牛和羊的肝脏组织中，地塞米松和倍他米松在 $0.25\sim 4.0\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内，添加回收率为 $60\%\sim 130\%$ 。

本方法在牛奶和羊奶中，地塞米松和倍他米松在 $0.15\sim 0.60\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内，添加回收率为 $60\%\sim 130\%$ 。

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
(资料性附录)

地塞米松、倍他米松和同位素内标物的英文名称、化学分子式、CAS号

地塞米松、倍他米松和同位素内标物的英文名称、分子式、CAS号见表A.1。

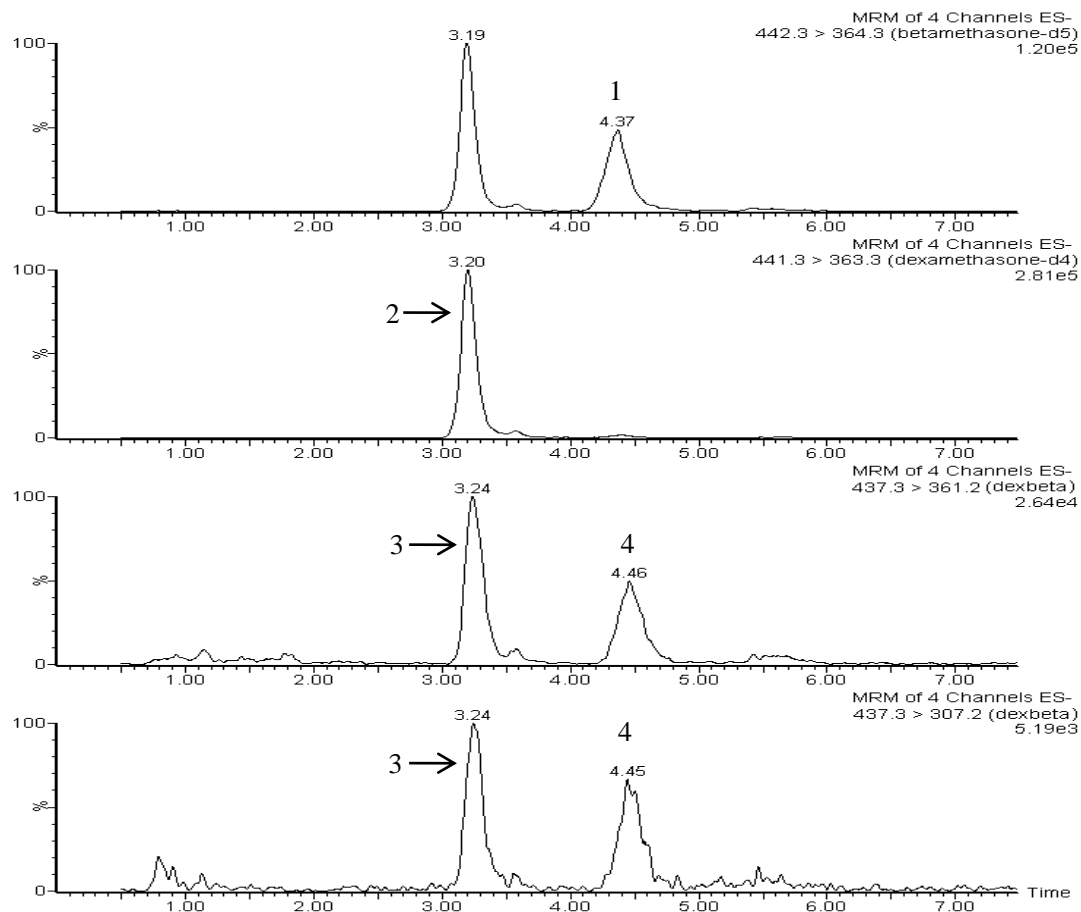
表A.1 地塞米松、倍他米松和同位素内标物的英文名称、化学分子式、CAS号

中文通用名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
地塞米松	dexamethasone	$C_{22}H_{29}FO_5$	4089-36-5
倍他米松	betamethasone	$C_{22}H_{29}FO_5$	378-44-9
地塞米松-D ₄	dexamethasone-D ₄	$C_{22}H_{25}D_4FO_5$	358731-91-6
倍他米松-D ₅	Betamethasone-D ₅	$C_{22}H_{25}D_5FO_5$	/

附录 B
(资料性附录)

猪肝基质匹配标准溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图

猪肝基质匹配标准溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图见图B.1。



注：图中1, 2, 3, 4色谱峰分别为倍他米松-D₅、地塞米松-D₄、地塞米松和倍他米松。

图B.1 猪肝基质匹配标准溶液（浓度1.0 µg/L，内标浓度10 µg/L）液相色谱串联质谱MRM
色谱图